

ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY

w Szczecinie

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej

mgr inż. Justyna Milek

Badanie i modelowanie dezaktywacji katalazy

Studying and modeling of deactivation of catalase

Praca doktorska wykonana
w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Bioprosesowej
Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy

Promotor
prof. UTP dr hab. inż. Marek Wójcik

Bydgoszcz 2011

*Praca doktorska finansowana
ze środków Komitetu Badań Naukowych
w latach 2009-2010 jako projekt badawczy
Nr PB/1510/H03/2009/3*

Podziękowanie

*Słowa głębokiego uznania kieruję do Pana
prof. dr hab. inż. Marka Wójcika
bez którego pomocy, praca ta nie ujrzałaby światła dziennego.*

Pracę dedykuję...

*...Mojej Rodzinie
Mężowi, dziękuję Ci Kochany za to, że dzielłeś ze mną cały ten czas
wytężonej pracy.
Naszym wspaniałym synom **Mateuszowi** (10 lat) i **Tymoteuszowi** (8 lat)
dedykuję tę pracę jako rekompensatę minionych wspólnych chwil.
...Moim Przyjaciołom, którzy byli przy mnie i mnie wspierali.*

| | |
|---|-----------|
| WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ..... | 7 |
| WYKAZ RYSUNKÓW..... | 9 |
| WYKAZ TABEL..... | 11 |
| WPROWADZENIE..... | 15 |
| CZĘŚĆ TEORETYCZNA | 21 |
| 1. Katalaza..... | 23 |
| 1.1. Ogólne charakterystyka i budowa katalazy..... | 23 |
| 1.2. Występowanie i właściwości..... | 24 |
| 1.2.1. Katalazy ludzkie, zwierzęce i roślinne | 24 |
| 1.2.2. Katalazy mikroorganizmów..... | 26 |
| 1.3. Rozkład H_2O_2 | 30 |
| 1.4. Stabilizatory i aktywatory katalazy..... | 32 |
| 1.5. Inhibitory katalazy..... | 32 |
| 1.6. Wpływ immobilizacji na właściwości katalazy..... | 34 |
| 1.7. Zastosowanie katalazy..... | 38 |
| 2. Kinetyka reakcji enzymatycznych..... | 42 |
| 2.1. Kinetyka prostej reakcji enzymatycznej z uwzględnieniem inhibicji..... | 42 |
| 2.2. Kinetyka reakcji katalizowanej przez katalazę | 46 |
| 2.2.1. Mechanizm reakcji rozkładu H_2O_2 | 46 |
| 2.2.2. Struktura równania kinetycznego rozkładu H_2O_2 | 47 |
| 2.2.3. Metodyka pomiarów szybkości reakcji rozkładu H_2O_2 | 48 |
| 2.2.4. Wpływ temperatury na szybkość reakcji rozkładu H_2O_2 | 49 |
| 2.2.5. Wpływ pH na szybkość reakcji rozkładu H_2O_2 | 51 |
| 3. Kinetyka dezaktywacji enzymów..... | 52 |
| 3.1. Dezaktywacja termiczna enzymów | 53 |
| 3.1.1. Jednostopniowy schemat dezaktywacji nieodwracalnej..... | 53 |
| 3.1.2. Złożone mechanizmy dezaktywacji termicznej | 57 |
| 3.1.2.1. Ujednociona teoria dezaktywacji Henleya i Sadany..... | 58 |
| 3.1.2.2. Ujednociona teoria dezaktywacji Polakoviča i Vrábla..... | 59 |
| 3.2. Dezaktywacja termiczna katalazy..... | 68 |
| 3.3. Dezaktywacja katalazy pod wpływem substratu..... | 70 |

| | | |
|---------------------|--|-----|
| 3.4. | Wpływ pH środowiska na dezaktywację katalazy..... | 74 |
| 3.5. | Dezaktywacja termiczna oraz dezaktywacja równoległa substratem..... | 74 |
| CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA | | |
| 4. | Analizowany model matematyczny izotermicznego reaktora do rozkładu H_2O_2 | 79 |
| 5. | Sposób wyznaczenia stałych kinetycznych i stosowane preparaty enzymatyczne..... | 81 |
| 6. | Dezaktywacja termiczna katalazy..... | 83 |
| 6.1. | Pomiar aktywności katalazy przy użyciu elektrody tlenowej..... | 83 |
| 6.2. | Ocena wpływu czasu przechowywania na zmianę aktywności roztworu katalazy S-A..... | 86 |
| 6.3. | Dezaktywacja termiczna katalazy S-A..... | 88 |
| 6.4. | Dezaktywacja termiczna katalazy N..... | 92 |
| 6.5. | Wpływ rozcieńczenia enzymu na szybkość dezaktywacji termicznej..... | 93 |
| 7. | Badanie wpływu nadtlenu wodoru na dezaktywację katalazy..... | 95 |
| 7.1. | Badania wstępne | 95 |
| 7.1.1. | Spektrofotometryczne pomiary stężenia H_2O_2 | 95 |
| 7.1.2. | Wyznaczenie stałej szybkości reakcji rozkładu H_2O_2 | 97 |
| 7.1.2.1. | Manganometryczna metoda wyznaczania stałej szybkości k_R^* | 97 |
| 7.1.2.2. | Spektrofotometryczna metoda wyznaczania stałej szybkości k_R^* | 100 |
| 7.1.3. | Wpływ pH na aktywność enzymu..... | 104 |
| 7.1.3.1. | Porównanie aktywność enzymu w buforze fosforanowym i buforze Brittona-Robinsona..... | 104 |
| 7.1.3.2. | Wpływ pH na stałą szybkości k_R^* | 106 |
| 7.2. | Dezaktywacja katalazy pod wpływem substratu..... | 106 |
| 7.3. | Wpływ pH na dezaktywację katalazy substratem..... | 109 |
| 8. | Opis matematyczny rozkładu H_2O_2 z uwzględnieniem dezaktywacji katalazy..... | 111 |
| 8.1. | Dezaktywacja termiczna katalazy..... | 111 |
| 8.1.1. | Parametry kinetyczne procesu dezaktywacji termicznej dla katalazy S-A..... | 112 |
| 8.1.2. | Parametry kinetyczne procesu dezaktywacji termicznej dla katalazy N..... | 114 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 8.2. | Dezaktywacja katalazy pod wpływem substratu..... | 117 |
| 8.2.1. | Stałe szybkości dezaktywacji substratem dla katalazy S-A..... | 119 |
| 8.2.2. | Stałe szybkości dezaktywacji substratem dla katalazy N..... | 123 |
| 8.3. | Energie aktywacji procesu dezaktywacji substratem dla katalazy S-A oraz katalazy N..... | 127 |
| 8.4. | Stałe szybkości dezaktywacji k_D w zależności od pH roztworu H_2O_2 dla katalazy S-A oraz katalazy N..... | 128 |
| <hr/> | | |
| 9. | Ocena wpływu dezaktywacji termicznej na rozkład nadtlenu wodoru | 129 |
| 9.1. | Badany układ reakcyjny o stężeniu początkowym $0,015 \text{ mol/dm}^3$ | 129 |
| 9.2. | Badany układ reakcyjny o stężeniu początkowym $0,0015 \text{ mol/dm}^3$ | 131 |
| <hr/> | | |
| 10. | Omówienie i dyskusja wyników badań | 134 |
| <hr/> | | |
| | Wnioski..... | 141 |
| <hr/> | | |
| | Literatura..... | 143 |
| <hr/> | | |

Wykaz ważniejszych oznaczeń

| | |
|---------------------|---|
| a | - bezwymiarowa aktywność enzymu |
| A | - całkowita aktywność enzymu |
| C_E | - stężenie enzymu |
| C_{E0} | - początkowe stężenie enzymu |
| C_I | - stężenie inhibitora |
| C_P | - stężenie produktu |
| C_S | - stężenie substratu |
| C_{S0} | - początkowe stężenie substratu |
| D | - zdezaktywowana forma enzymu |
| D_i | - częściowo zdezaktywowana forma enzymu |
| E | - aktywna forma enzymu |
| E_i | - przejściowa forma enzymu |
| E_D | - energia aktywacji procesu dezaktywacji równoległej substratem |
| E_{DT} | - energia aktywacji procesu dezaktywacji termicznej enzymu |
| E_R | - energia aktywacji reakcji |
| EI | - kompleks enzym-inhibitor |
| $Enz(Por-Fe^{III})$ | - katalaza z układem porfiryńowym |
| ES | - pierwszorzędowy kompleks enzym – substrat |
| ESI | - kompleks enzym – substrat - inhibitor |
| ESS | - drugorzędowy kompleks enzym – substrat |
| I | - inhibitor |
| k_D | - stała szybkości dezaktywacji substratem |
| k_{D0} | - przedwykładnicza stała szybkości dezaktywacji |
| k_{DT} | - stała szybkości dezaktywacji termicznej |
| $k_{(DT)0}$ | - przedwykładnicza stała szybkości dezaktywacji termicznej |
| $k_{D,Tod}$ | - stała szybkości dezaktywacji w temperaturze odniesienia |
| k_R | - stała szybkości reakcji |
| k_R^* | - stała szybkości reakcji |
| k_{R0} | - przedwykładnicza stała szybkości reakcji |
| K_I | - stała inhibicji |

| | |
|----------------|---|
| K_M | - stała Michaelisa-Menten |
| P | - produkt |
| r | - współczynnik korelacji Pearsona |
| r_s | - szybkość reakcji |
| R | - stała gazowa |
| R^2 | - współczynnik determinacji |
| t | - czas reakcji |
| T | - temperatura |
| T_{od} | - temperatura odniesienia |
| T_{opt} | - temperatura optymalna |
| S | - substrat |
| U | - (unit) to ilość enzymu katalizująca przemianę 1 μ mola substratu w czasie 1 minuty w temperaturze 25°C, używając stężenia substratu, przy którym reakcja jest zerowego rzędu (w przypadku katalazy stężenie początkowe H_2O_2 jest w zakresie od 0,0092 do 0,0103 mol/dm ³) |
| V_{max} | - maksymalna szybkość reakcji |
| α | - stopień przemiany |
| $\bar{\delta}$ | - średni błąd względny |
| ϵ | - molowy współczynnik absorpcji |
| λ | - długość fali pomiaru spektrofotometrycznego |
| ρ | - współczynnik kowariancji |
| σ | - odchylenie standardowe |
| Asn | - asparagina |
| Asp | - kwas asparaginowy |
| His | - histydyna |
| Try | - tryptofan |

Wykaz rysunków

| | | |
|------------|--|-----|
| Rys. 1-1. | Katalaza z wątroby wołowej [wg 87]..... | 25 |
| Rys. 1-2. | Katalaza z erytrocytów ludzkich [wg 88]..... | 25 |
| Rys. 1-3. | Katalaza grzybowa z <i>Penicillium vitale</i> [wg 86]..... | 29 |
| Rys. 2-1. | Zależność szybkości reakcji enzymatycznej Michaelisa-Menten od stężenia substratu..... | 42 |
| Rys. 3-1. | Zmiana aktywności oksydazy fenolowej w zależności od temperatury..... | 57 |
| Rys. 3-2. | Mechanizm działania katalazy [wg 115]..... | 71 |
| Rys. 4-1. | Schemat izotermicznego reaktora okresowego dla rozkładu H ₂ O ₂ | 80 |
| Rys. 6-1. | Schemat układu pomiarowego do oznaczenia aktywności katalazy..... | 83 |
| Rys. 6-2. | Zmiana stężenia powstającego O ₂ podczas rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę S-A oraz katalazę N..... | 86 |
| Rys. 6-3. | Zmiana stężenia powstającego O ₂ w roztworze reakcyjnym dla katalazy przetrzymywanej w temperaturze 50°C przez okres od 0 do 1610 min | 89 |
| Rys. 7-1. | Zależność $\ln(C_{S0}/C_S)$ od czasu t dla katalazy S-A dla różnych temperatur | 98 |
| Rys. 7-2. | Zależność logarytmu stałej szybkości reakcji k_R^* od odwrotności temperatury..... | 99 |
| Rys. 7-3. | Zmiana absorpcji podczas rozkładu H ₂ O ₂ przez katalazę S-A w temperaturze 35°C | 100 |
| Rys. 7-4. | Zależność logarytmu stałej szybkości reakcji k_R^* od odwrotności temperatury dla pomiaru spektrofotometrycznego..... | 102 |
| Rys. 7-5. | Zależność $\ln(C_{S0}/C_S)$ od czasu rozkładu H ₂ O ₂ przy pH 7..... | 105 |
| Rys. 8-1. | Zmiana aktywności katalazy S-A podczas dezaktywacji termicznej..... | 114 |
| Rys. 8-2. | Porównanie aktywności obliczonych i doświadczalnych dla katalazy S-A..... | 114 |
| Rys. 8-3. | Zmiana aktywności katalazy N podczas dezaktywacji termicznej..... | 115 |
| Rys. 8-4. | Porównanie aktywności obliczonych i doświadczalnych dla katalazy N..... | 116 |
| Rys. 8-5. | Porównanie stopni przemiany obliczonych i doświadczalnych dla katalazy S-A..... | 120 |
| Rys. 8-6. | Zmiana stopnia przemiany w czasie dla katalazy S-A w temperaturze 40°C | 121 |
| Rys. 8-7. | Obliczona zmiana aktywności w czasie dla katalazy S-A w temperaturze 40°C..... | 121 |
| Rys. 8-8. | Zmiana stopnia przemiany w czasie dla 0,1 cm ³ katalazy S-A w temperaturach z zakresu od 35°C do 50°C..... | 122 |
| Rys. 8-9. | Obliczona zmiana aktywności dla 0,1 cm ³ katalazy S-A w temperaturach z zakresu od 35°C do 50°C..... | 123 |
| Rys. 8-10. | Porównanie stopni przemiany obliczonych i doświadczalnych dla katalazy N | 124 |
| Rys. 8-11. | Zmiana stopnia przemiany w czasie dla katalazy N w temperaturze 40°C..... | 125 |
| Rys. 8-12. | Obliczona zmiana aktywności w czasie dla katalazy N w temperaturze 40°C..... | 125 |
| Rys. 8-13. | Zmiana stopnia przemiany w czasie dla 0,1 cm ³ katalazy N w temperaturach z zakresu od 35°C do 50°C..... | 126 |
| Rys. 8-14. | Obliczona zmiana aktywności dla 0,1 cm ³ katalazy N w temperaturach z zakresu od 35°C do 50°C..... | 127 |
| Rys. 8-15. | Zależność k_D od temperatury dla katalazy S-A oraz katalazy N..... | 127 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Rys. 9-1. | Zmiana stężenia 0,015 mol/dm ³ H ₂ O ₂ dla katalazy S-A..... | 130 |
| Rys. 9-2. | Zmiana stężenia 0,015 mol/dm ³ H ₂ O ₂ dla katalazy N..... | 131 |
| Rys. 9-3. | Zmiana stężenia nadtlenu wodoru 0,0015 mol/dm ³ dla katalazy N w temperaturze 50°C..... | 132 |
| Rys. 9-4. | Zmiana aktywności katalazy N podczas rozkładu 0,0015 mol/dm ³ H ₂ O ₂ w temperaturze 50°C.... | 132 |
| Rys. 10-1. | Zależność k_{DT} od temperatury dla katalazy S-A oraz katalazy N..... | 134 |
| Rys. 10-2. | Porównanie literaturowych i obliczonych czasów połowicznego spadku aktywności dla katalazy S-A oraz katalazy N..... | 135 |
| Rys. 10-3. | Zależność k_D od temperatury dla katalazy S-A oraz katalazy N..... | 137 |
| Rys. 10-4. | Stałe szybkości dezaktywacji substratem k_D dla katalazy S-A oraz katalazy N w zależności od pH roztworu nadtlenu wodoru..... | 138 |

Wykaz tabel

| | | |
|---------------|---|----|
| Tabela 1-1. | Porównanie właściwości podjednostek katalazy-A i katalazy-R z <i>Aspergillus niger</i> [16]..... | 29 |
| Tabela 1-2. | Stężenia inhibitorów katalazy powodujące spadek aktywności enzymu o 50%..... | 33 |
| Tabela 1-3. | Optymalna temperatura dla katalazy natywnej i immobilizowanej..... | 36 |
| Tabela 1-4. | Stabilność katalazy natywnej i immobilizowanej katalazy podczas przechowywania | 37 |
| Tabela 1-5. | Stabilność operacyjna immobilizowanej katalazy..... | 38 |
| Tabela 1-6. | Preparaty handlowe katalaz..... | 40 |
| Tabela 2-1. | Energie aktywacji dla reakcji rozkładu H ₂ O ₂ przez katalazę..... | 50 |
| Tabela 3-1. | Wartości stałych b ₁ i d ₁ dla II poziomu dezaktywacji [142]..... | 60 |
| Tabela 3-2. | Mechanizmy III poziomu dezaktywacji enzymu wg Polakoviča i Vrábela [142]..... | 63 |
| Tabela 3-3. | Mechanizmy IV poziomu dezaktywacji enzymu wg Polakoviča i Vrábela [142]..... | 67 |
| Tabela 3-4. | Wpływ temperatury na stabilność termiczną katalazy z wątroby wołowej | 69 |
| Tabela 3-5. | Wpływ temperatury na stabilność termiczną katalazy z <i>Aspergillus niger</i> | 70 |
| Tabela 3-6. | Stałe szybkości dezaktywacji k _D dla katalazy natywnej | 72 |
| Tabela 3-7.1. | Pozorne stałe szybkości dezaktywacji k' _D dla katalazy <i>Aspergillus niger</i> poddanej immobilizacji | 73 |
| Tabela 3-7.2. | Pozorne stałe szybkości dezaktywacji k' _D dla katalazy z wątroby wołowej poddanej immobilizacji..... | 74 |
| Tabela 6-1. | Zmiana stopnia nasycenia roztworu reakcyjnego tlenem przy zastosowaniu katalazy S-A lub katalazy N..... | 85 |
| Tabela 6-2. | Zmiana stopnia nasycenia roztworu reakcyjnego tlenem przy braku enzymu | 85 |
| Tabela 6-3. | Zmiana stężenia powstającego O ₂ podczas rozkładu H ₂ O ₂ przez katalazę S-A lub katalazę N | 86 |
| Tabela 6-4. | Zmiana stopnia nasycenia tlenem roztworu reakcyjnego przy pomiarze aktywności dla katalazy S-A przechowywanej w temperaturze 4-6°C..... | 87 |
| Tabela 6-5. | Zmiana stężenia O ₂ podczas rozkładu H ₂ O ₂ przez katalazę S-A poddanej dezaktywacji termicznej 50°C..... | 88 |
| Tabela 6-6. | Zmiana aktywności katalazy podczas dezaktywacji termicznej w 50°C..... | 89 |
| Tabela 6-7. | Zmiana znormalizowanej aktywności katalazy S-A podczas dezaktywacji termicznej od 35°C do 70°C..... | 90 |
| Tabela 6-8. | Zmiana znormalizowanej aktywności katalazy N podczas dezaktywacji termicznej od 35°C do 70°C | 92 |
| Tabela 6-9. | Zmiana stopnia nasycenia tlenem roztworu reakcyjnego przy pomiarze aktywności dla katalazy dezaktywowanej w temperaturze 40°C..... | 93 |
| Tabela 6-10. | Zmiana aktywności katalazy S-A dezaktywowanej w temperaturze 40°C dla dwóch rozcieńczeń enzymu | 94 |
| Tabela 7-1. | Pomiary absorpcji dla badanych roztworów nadtlenu wodoru..... | 96 |
| Tabela 7-2. | Zmiana stężenia H ₂ O ₂ dla katalazy S-A – metoda manganometryczna..... | 97 |
| Tabela 7-3. | Doświadczalne stałe szybkości reakcji k _R * katalazy S-A - metoda manganometryczna..... | 98 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| Tabela 7-4. | Obliczone stałe szybkości reakcji k_R^* katalazy S-A - metoda manganometryczna..... | 99 |
| Tabela 7-5. | Doświadczalne stałe szybkości reakcji k_R^* katalazy S-A - metoda spektrofotometryczna..... | 101 |
| Tabela 7-6. | Stałe szybkości reakcji k_R^* dla katalazy S-A określone metodą spektrofotometryczną i obliczone z metody managnometrycznej..... | 103 |
| Tabela 7-7. | Stałe szybkości reakcji k_R^* określone metodą spektrofotometryczną dla katalazy N | 103 |
| Tabela 7-8. | Stałe szybkości reakcji k_R^* dla reakcji przebiegającej przy pH 7..... | 104 |
| Tabela 7-9. | Stałe szybkości reakcji k_R^* katalazy S-A oraz katalazy N w zależności od pH roztworu H ₂ O ₂ ... | 106 |
| Tabela 7-10. | Rozkład H ₂ O ₂ przez katalazę S-A oraz katalazę N w temperaturze 35°C..... | 107 |
| Tabela 7-11. | Rozkład H ₂ O ₂ przez katalazę S-A oraz katalazę N w temperaturze 40°C..... | 107 |
| Tabela 7-12. | Rozkład H ₂ O ₂ przez katalazę S-A oraz katalazę N w temperaturze 45°C..... | 108 |
| Tabela 7-13. | Rozkład H ₂ O ₂ przez katalazę S-A oraz katalazę N w temperaturze 50°C..... | 108 |
| Tabela 7-14. | Rozkład H ₂ O ₂ (pH 4) przez katalazę S-A oraz katalazę N | 109 |
| Tabela 7-15. | Rozkład H ₂ O ₂ (pH 7) przez katalazę S-A oraz katalazę N | 109 |
| Tabela 7-16. | Rozkład H ₂ O ₂ (pH 9) przez katalazę S-A oraz katalazę N | 110 |
| Tabela 7-17. | Rozkład H ₂ O ₂ (pH 10) przez katalazę S-A oraz katalazę N | 110 |
| <hr/> | | |
| Tabela 8-1. | Wyznaczone parametry kinetyczne procesu dezaktywacji termicznej dla katalazy S-A..... | 112 |
| Tabela 8-2. | Wskaźniki statystyczne dla doświadczeń z katalazą S-A dezaktywowaną termicznie..... | 113 |
| Tabela 8-3. | Wyznaczone parametry kinetyczne katalazy N dla procesu dezaktywacji termicznej | 115 |
| Tabela 8-4. | Wskaźniki statystyczne dla doświadczeń z katalazą N dezaktywowaną termicznie..... | 116 |
| Tabela 8-5. | Stałe szybkości dezaktywacji substratem dla katalazy z S-A | 119 |
| Tabela 8-6. | Stałe szybkości dezaktywacji substratem dla katalazy N..... | 123 |
| Tabela 8-7. | Parametry kinetyczne procesu dezaktywacji substratem dla katalazy S-A i katalazy N..... | 128 |
| Tabela 8-8. | Wpływ pH na stałe szybkości dezaktywacji katalazy S-A oraz katalazy N..... | 128 |
| <hr/> | | |
| Tabela 9-1. | Stałe szybkości dla katalazy S-A stosowane w analizie matematycznej reaktora | 129 |
| Tabela 9-2. | Stałe szybkości dla katalazy N stosowane w analizie matematycznej reaktora | 129 |
| <hr/> | | |
| Tabela 10-1. | Parametry kinetyczne procesu rozkładu H ₂ O ₂ przez katalazę S-A oraz katalazę N..... | 136 |
| Tabela 10-2. | Porównanie literaturowych i obliczonych wartości k_D | 137 |
| <hr/> | | |
| Tabela Z-1. | Katalaza S-A Temperatura 35°C..... | 153 |
| Tabela Z-2. | Katalaza S-A Temperatura 40°C..... | 153 |
| Tabela Z-3. | Katalaza S-A Temperatura 45°C..... | 153 |
| Tabela Z-4. | Katalaza S-A Temperatura 50°C..... | 154 |
| Tabela Z-5. | Katalaza S-A Temperatura 55°C..... | 154 |
| Tabela Z-6. | Katalaza S-A Temperatura 60°C..... | 154 |
| Tabela Z-7. | Katalaza S-A Temperatura 65°C i 70°C..... | 155 |
| Tabela Z-8. | Katalaza N Temperatura 35°C..... | 155 |
| Tabela Z-9. | Katalaza N Temperatura 40°C..... | 155 |
| Tabela Z-10. | Katalaza N Temperatura 45°C..... | 156 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| Tabela Z-11. | Katalaza N Temperatura 50°C..... | 156 |
| Tabela Z-12. | Katalaza N Temperatura 55°C..... | 156 |
| Tabela Z-13. | Katalaza N Temperatura 60°C..... | 157 |
| Tabela Z-14. | Katalaza N Temperatura 65°C i 70°C..... | 157 |

Wprowadzenie

Biotechnologia jest interdyscyplinarną dziedziną nauki posługująca się wiedzą z biochemii, mikrobiologii i nauk inżynierskich. Zajmuje się ona zastosowaniem procesów biologicznych w technologii i produkcji przemysłowej. Obecne i przyszłe badania biotechnologiczne obejmują zastosowania złożonych substancji naturalnych (komórek lub ich części) oraz molekularnych analogów (rekombinowanych pochodnych lub zupełnie nowych, produkowanych biosyntetycznie substancji quasi-naturalnych) w celu pozyskania produktów i usług w procesach biokatalizy i biotransformacji [104].

W reakcjach biokatalizy, zastosowany materiał biologiczny służy do prowadzenia reakcji chemicznych *in vitro* lub *in vivo*. Użyty w reakcji biokatalizy substrat ulega biotransformacji, a otrzymany produkt nie wykazuje aktywności biologicznej, funkcji metabolicznej oraz nie dostarcza energii [15]. W celu zwiększenia użycia preparatów enzymatycznych w skali przemysłowej m.in. otrzymywane są one: z mikroorganizmów żyjących w ekstremalnych warunkach; poprzez dodanie związków stabilizujących enzymy, poprzez modyfikację chemiczną białka enzymu lub stosując metody inżynierii genetycznej lub technik immobilizacji.

Wśród przemysłowych procesów biotransformacji z użyciem enzymów najczęściej stosowane są m.in. oksydoreduktazy (około 30%), a wśród nich katalaza, używana do rozkładu nadtlenu wodoru. W ostatnich latach obserwuje się szybko wzrastające zużycie nadtlenu wodoru w procesach przemysłowych i oczyszczaniu ścieków. W większości przypadków niezbędne jest wyeliminowanie pozostałości nadtlenu wodoru. Tradycyjnie stosowane metody chemiczne mają szereg wad. Alternatywą jest więc użycie katalazy. Enzym ten używany jest głównie w przemyśle włókienniczym do usuwania nadtlenu wodoru, po procesie rozjaśniania tkanin [75, 115] oraz w przemyśle spożywczym, w którym nadtlenek wodoru powstaje, w wyniku działania oksydazy glukozy, przyczyniającej się do podniesienia trwałości produktów spożywczych poprzez usunięcie tlenu. Katalaza może być również używana podczas rozkładu H_2O_2 pozostałego po zimnej sterylizacji nabiału.

Od wielu lat stosowano katalazę wołową [4,101,127,195] charakteryzującej się niską stabilnością w porównaniu z innymi katalazami. Jednak do zastosowań w przemyśle włókienniczym, gdzie zalecane jest szybkie i niezawodne usunięcie H_2O_2 , zalecana jest katalaza z *Aspergillus niger* [46,76,83,192,194] o wyższej stabilności. Stosowana katalaza powinna spełniać wymagania stawiane wszystkim enzymom tzn. charakteryzować się wysoką aktywnością, odpowiednią specyficznością i wysoką stabilnością w warunkach procesowych

– odpornością m.in. na dezaktywujący wpływ temperatury oraz pH. Katalaza stosowana w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym musi pochodzić z drobnoustrojów zaklasyfikowanych jako GRAS. Tak jest w przypadku *Aspergillus niger*, który jest źródłem wielu enzymów, także katalazy.

Celem pracy było przeprowadzenie badań i modelowanie reakcji enzymatycznej z uwzględnieniem dezaktywacji katalazy z *Aspergillus niger*. Prowadzono badania stosując katalazę *A. niger* pochodzącą z firmy Sigma-Aldrich dalej nazywaną katalazą S-A oraz z firmy Novozymes (o nazwie handlowej Terminox Ultra) dalej nazywaną katalazą N.

Większość prac badawczych dotyczących katalazy *A. niger*, dotyczyła badania enzymu w postaci unieruchomionej [5,6,167,169,173]. Jednak preparaty enzymatyczne katalazy *A. niger* dostępne w sprzedaży [9, 46, 77-83] oraz zalecane w użyciu, są w formie natywnej. Zauważa się, iż brak jest danych wartości stałych szybkości reakcji i dezaktywacji w zależności od temperatury dla tego rodzaju katalazy. Przeprowadzenie rozkładu nadtlenu wodoru w bioreaktorach sterowanych optymalnie wymaga znajomości parametrów kinetycznych. Przeprowadzone wcześniej analizy wykazały, że zastosowanie sterowania optymalnego temperaturą może doprowadzić nawet do kilkukrotnego skrócenia czasu, a tym samym do zmniejszenia kosztów reakcji, w porównaniu z procesem izotermicznym [64,65].

W rozdziale 1 pracy przedstawiono właściwości katalaz pochodzących z różnych źródeł. Kinetykę reakcji rozkładu H_2O_2 katalizowanej przez katalazę przedstawiono w rozdziale 2. Kinetykę dezaktywacji enzymów ze szczególną analizą dezaktywacji termicznej i dezaktywacji katalazy substratem, przedstawiono w rozdziale 3. Literaturowy przegląd modeli matematycznych do rozkładu H_2O_2 z dezaktywacją katalazy, pozwolił sformułować model matematyczny opisujący reaktor okresowy do rozkładu H_2O_2 przez katalazę wraz z dezaktywacją (rozdział 4). W praktyce przemysłowej katalaza jest stosowana do obróbki roztworów, które zawierają zwykle od 10 ppm do 500 ppm nadtlenu wodoru. Przy tak niskich stężeniach H_2O_2 kinetykę reakcji i dezaktywacji enzymu substratem można opisać równaniami pierwszego rzędu w odniesieniu do stężenia enzymu i substratu – rów. (4.1a) i (4.1b). Dla katalazy *A. niger* nie prowadzono dotychczas obszerniejszych badań związanych z kinetyką dezaktywacji termicznej, dlatego nie uwzględniano wpływu tej dezaktywacji w równaniu kinetycznym (4.1b). Po weryfikacji o część dotyczącą dezaktywacji termicznej otrzymano układ rów. (4.4a) i (4.4b). Rozwiązanie tego układu uzyskano poprzez zastosowanie metody numerycznej, po wcześniejszej identyfikacji stałych kinetycznych k_R^* , k_D , k_{DT} .

Badano dezaktywację termiczną w celu określenia k_{DT} (rozdział 6). Po raz pierwszy zastosowano metodę badania kinetyki dezaktywacji termicznej katalazy z *A. niger* przy użyciu elektrody tlenowej. Pomiary, których celem było wyznaczenie stałych kinetycznych k_R^* i k_D , związane były z badaniem procesu rozkładu nadtlenu wodoru o stężeniu początkowym $0,015 \pm 0,001 \text{ mol/dm}^3$, przebiegającym przez okres 2 h. Reakcję rozkładu nadtlenu wodoru przeprowadzono dla zakresu temperatur od 35°C do 50°C . Badania dotyczące k_R^* i k_D zamieszczono w rozdziale 7.

Wyniki pomiarów przedstawione w rozdziałach 6 i 7 pozwoliły zidentyfikować parametry kinetyczne procesu dezaktywacji katalazy. W celu wyznaczenia stałych równania Arrheniusa $-E_{DT}$, $k_{(DT)0}$ wykorzystano procedurę Levenberga-Marquardta poszukując minimum funkcji celu opisanej równ. (8.1). Przy wstępnej identyfikacji stałych kinetycznych k_R^* i k_D , na podstawie zmian stężenia nadtlenu wodoru w procesie jego rozkładu, stwierdzono korelację między k_R^* i k_D . W związku z tym, zdecydowano się na niezależne wyznaczenie stałej szybkości reakcji metodą spektrofotometryczną, stosując wyższe stężenie enzymu i redukując czas reakcji do 15 sekund, aby tym samym ograniczyć zjawisko dezaktywacji substratem. Wyznaczono stałe w równaniu Arrheniusa dla katalazy S-A oraz katalazy N. Energia aktywacji rozkładu nadtlenu wodoru dla katalazy S-A wynosiła $12,92 \text{ kJ/mol}$, natomiast dla katalazy N jej wartość była równa $11,59 \text{ kJ/mol}$.

W rozdziale 8 przedstawiono opis matematyczny rozkładu H_2O_2 z uwzględnieniem dezaktywacji katalazy. Założono, iż dezaktywacja termiczna katalazy przebiega według jednostopniowego mechanizmu $E \rightarrow D$, z równaniem kinetycznym w postaci $r_{DT} = k_{DT} C_E$. Przeprowadzone analizy pozwoliły na wyznaczenie energii aktywacji dezaktywacji termicznej dla katalazy S-A, której wartość wynosiła $116,0 \text{ kJ/mol}$, natomiast dla katalazy N była równa $141,6 \text{ kJ/mol}$. W celu określenia stałej szybkości dezaktywacji substratem k_D , wykorzystano równania opisujące kinetykę reakcji i dezaktywacji enzymu substratem - pierwszego rzędu – równ. (4.1a) i (4.1b). Identyfikując k_D wykorzystano procedurę Levenberga - Marquardta poszukując minimum funkcji celu opisanej równ. (8.9). Stałe k_D dla katalazy S-A i katalazy N zależą od temperatury według równania Arrheniusa, a energia dezaktywacji substratem dla katalazy S-A wynosiła $152,69 \text{ kJ/mol}$, natomiast dla katalazy N była trzy razy mniejsza, o wartości $44,83 \text{ kJ/mol}$.

W rozdziale 9 potwierdzono, iż dezaktywacja termiczna k_{DT} katalazy S-A oraz katalazy N przebiega znacznie wolniej od dezaktywacji substratem.

Introduction

Biotechnology is a scientific area of microbiology and biochemistry, oriented to practical applications and strictly connected with industrial chemistry, process technology, and equipment engineering. It deals with the application of biological processes in commercial production and technology. The biotechnological studies of the present and future include the use of complex natural substances (cells or parts of cells) and their molecular analogs (recombinant derivatives or entirely new, biosynthetic quasi-natural substances) in order to obtain products and services in the processes of biocatalysis and biotransformation [104].

As used in biocatalytic processes, biological material serves the purpose of carrying out chemical reactions *in vitro* or *in vivo*. In a biocatalytic reaction, the substrate is subjected to biotransformation and the resulting product shows neither biological activity nor metabolic functions, and is not a source of energy [15]. To augment their consumption in industrial processes enzymatic preparations are obtained, *inter alia*, from microorganisms living in extreme conditions; by adding certain compounds to stabilize the enzymes; by the chemical modification of the enzyme protein; by using genetic engineering methods or immobilization techniques.

In industrial biotransformation processes based on the use of enzymes, those most commonly used include oxidoreductases (approx. 30%), such as catalase which is used to decompose hydrogen peroxide. The use of hydrogen peroxide in industrial processes and waste treatment has been growing fast in the recent years. In a majority of cases, it is indispensable to eliminate any residual hydrogen peroxide. Traditionally used chemical methods are far from being perfect, therefore, the use of catalase is an alternative. The enzyme is mainly used in the textile industry for removing hydrogen peroxide after the textile bleaching process [75, 115] and in the food processing industry where hydrogen peroxide is formed due to the effect of glucose oxidase which contributes to the stability of food products by removing any oxygen therefrom. Moreover, catalase may be used for decomposition of any residual H_2O_2 after cold sterilization of dairy products.

Bovine catalase, which is characterized by low stability, compared with other kinds of catalase, has been used for many years [4,101,127,195]. However, catalase from *Aspergillus niger* [46,76,83,192,194], with higher stability, is preferably used in the textile industry, where it is recommended to remove H_2O_2 fast and in a reliable manner. Catalase for such applications is expected to meet requirements for all enzymes, i.e., show high activity, suitable specificity, and high stability in process conditions: resistance, *inter alia*, to the deactivating effect of temperature and pH. Catalase for application in the food processing, cosmetic or pharmaceutical industries must originate from microorganisms classified as GRAS. Such requirements are satisfied by *Aspergillus niger*, which is a source of a number of enzymes, including catalase.

It has been the objective of the present work to carry out studies and model an enzymatic reaction including the deactivation of catalase from *Aspergillus niger*. The studies were conducted using a catalase from *A. niger*, obtained from Sigma-Aldrich (referred to as Catalase S-A later in this work) and from Novozymes (trade name Terminox Ultra, referred to as Catalase N).

In a majority of research works on the catalase from *A. niger* so far studies of an immobilized enzyme have been discussed [5,6,167,169,173]. However, enzymatic preparations of catalase from *A. niger* which are commercially available [9, 46, 77-83] and recommended for use are in a native form. It is noted that there are no data on the values of reaction constants for the reaction and for deactivation, depending on temperature for this form of catalase. It is indispensable to have information on the kinetic parameters of the process of decomposition of hydrogen peroxide in optimally controlled bioreactors. Kinetic parameters are necessary for optimizing the operation of periodic bioreactors. From previous analyses it follows that the use of optimum temperature control may help obtain reaction times which are even several times as short, thereby lowering the reaction costs, compared with the isothermal process [64,65].

Shown in Chapter 1 are the properties of catalases obtained from various sources. The kinetics of decomposition of H_2O_2 which is catalyzed by means of catalase is shown in Chapter 2. The kinetics of deactivation of enzymes, with a special focus on analyzing thermal deactivation and substrate-induced deactivation of catalase, is shown in Chapter 3. A literature survey of mathematical models for decomposition of H_2O_2 with catalase deactivation has enabled the formulation of a mathematical model describing a periodic reactor for decomposition of H_2O_2 while catalase is in the process of deactivation (Chapter 4). Industrially, catalase is used to treat solutions containing usually from 10 ppm to 500 ppm of hydrogen peroxide. At such low concentrations of H_2O_2 , the kinetics of the reaction and enzyme deactivation by means of the substrate may be described by first-order equations with reference to the concentration of the enzyme and the substrate – Equations (4.1a) and (4.1b). The kinetics of thermal deactivation for catalase *A. niger* has not been studied extensively so far, therefore, the effect of such deactivation is not taken into consideration in the kinetic equation (4.1b). Providing information on thermal deactivation has produced the system of Equations (4.4a) and (4.4b) which has been solved numerically, following identification of the kinetic constants k_R^* , k_D , k_{DT} .

Thermal deactivation was studied in order to define k_{DT} (Chapter 6). For the first time, the kinetics of thermal deactivation of catalase from *A. niger* was examined using an oxygen electrode. Measurements, which were intended to find the kinetic constants k_R^* and k_D , involved examination of the process of decomposition of hydrogen peroxide at an initial concentration of 0.015 ± 0.001 mol/dm³, which was continued for a period of 2 hours. Hydrogen peroxide

decomposition was carried out for a temperature range from 35°C to 50°C. Studies concerning k_R^* and k_D are described in Chapter 7.

The results of measurements shown in Chapters 6 and 7 have enabled identification of the kinetic parameters of the catalase deactivation process. The Levenberg-Marquardt procedure was used to find the Arrhenius equation constants $-E_{DT}$, $k_{(DT)0}$, searching for the minimum of the objective function described by Equation (8.1). After initial identification of the kinetic constants, k_R^* and k_D , based on changes in the concentration of hydrogen peroxide in the process of its decomposition, a correlation was found between k_R^* and k_D . Therefore, it was decided that the reaction rate constant would be found, independently, by the spectrophotometric method, for higher enzyme concentrations and with the reaction time reduced to 15 seconds in order to inhibit the phenomenon of substrate - induced deactivation. The Arrhenius equation constants were found for Catalase S-A and Catalase N. Activation energy for hydrogen peroxide decomposition was 12.92 kJ/mol and 11.59 kJ/mol, for Catalase S-A and for Catalase N, respectively.

Shown in Chapter 8 is a mathematical description of H_2O_2 decomposition, taking into consideration deactivation of catalase. It was assumed that thermal deactivation of catalase follows a single-step mechanism $E \rightarrow D$, for which the kinetic equation takes the form $r_{DT} = k_{DT}C_E$. The analyses made have enabled determination of activation energy for thermal deactivation; its value was found to be 116.0 kJ/mol and 141.6 kJ/mol for Catalase S-A and Catalase N, respectively. First order equations describing the reaction kinetics and the kinetics of the substrate-induced deactivation of the enzyme – Equations (4.1a) and (4.1b) – were used in order to find the deactivation rate constant for the substrate k_D . The Levenberg-Marquardt procedure was used to identify the value of k_D searching for the minimum of the objective function, as described by Equation (8.9). The k_D constants for Catalase S-A and Catalase N depend on temperature according to the Arrhenius equation. The substrate-induced deactivation energy for Catalase S-A was 152.69 kJ/mol while for Catalase N it was 44.83 kJ/mol, which is three times as small.

It has been confirmed in Chapter 9 that thermal deactivation of Catalase S-A and Catalase N is much slower than substrate-induced deactivation.

Część teoretyczna

1. Katalaza

Katalaza jest enzymem z grupy oksydoreduktaz (E.C.1.11.1.6), występującym w komórkach ludzkich, zwierzęcych, roślin fotosyntetyzujących oraz grzybów i bakterii tlenowych. Przyspiesza ona rozkład nadtlenu wodoru powstającego w żywych komórkach. Jest bardzo aktywnym enzymem, którego grupę prostetyczną stanowi hemina.

Po raz pierwszy w 1937 roku Sumner i Dounce [162] wyizolowali w postaci krystalicznej katalazę z wątroby wołowej. Od tego momentu stała się ona przedmiotem licznych badań i z tego względu jest enzymem o dobrze poznanej strukturze chemicznej [40,50,110,114,195].

Katalaza rozkłada nadtlenek wodoru powodując uwalnianie tlenu cząsteczkowego. Nadtlenek wodoru powstaje w wielu reakcjach enzymatycznych jako produkt uboczny i jest substancją toksyczną dla organizmu. W wyniku reakcji nadtlenu wodoru z jonami metali (żelazo, miedź) powstaje najbardziej reaktywny rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$). Katalaza występuje u wszystkich organizmów tlenowych, chroni komórki przed szkodliwym działaniem nadtlenu wodoru [165].

1.1. Ogólna charakterystyka i budowa katalazy

Katalaza wraz z peroksydazą należą do grupy hydroperoksydaz, reprezentujących enzymatyczne białka zawierające żelazoporfirynę – połączenie Fe^{III} z układem porfiryńowym tworząc kompleks tzw. hem [55]. Żelazo hemu łączy się z atomami azotu układu porfiryńowego wiązaniami kowalencyjnymi i koordynacyjnymi a z częścią białkową enzymu za pomocą wiązań koordynacyjnych [52]. Zbadano występowanie katalazy u ponad 300 organizmów [34]. Budowa katalaz różni się pod względem liczby podjednostek i struktury poszczególnych domen tworzących białko [165]. Wiele katalaz było izolowanych i poddawanych badaniom. Opublikowano budowę przestrzenną dla katalaz pochodzących z: ludzkich erytrocytów [147], wątroby wołowej [50], *Penicillium vitale* [178], *Micrococcus lysodeikticus* [132,133], *Proteus mirabilis* [10,61], *Escherichia coli* [20], *Saccharomyces cerevisiae* [123], *Lactobacillus plantarum* [13], *Pseudomonas syringae* [26], *Helicobacter pylori* [119], *Enterococcus faecalis* [67].

Rozróżniamy trzy grupy katalaz [34, 53, 171, 203]:

- jednofunkcyjne, typowe - Składające się z około 390 aminokwasów, o budowie zazwyczaj tetramerycznej. Masie cząsteczkowej w zakresie od 140 do 340 kDa; złożone z podjednostek o dużej masie cząsteczkowej powyżej 75 kDa każda, lub mniejszej masie cząsteczkowej poniżej 60 kDa. Do tej grupy zalicza się katalazy pochodzące np. z: *Apergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus*

lysodeiticus, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium vitale*, wątroby wołowej oraz ludzkich erytrocytów. Wykazują one aktywność w szerokim zakresie pH (5-10) oraz cechują się odpornością na działanie chloroformu oraz anionów ditionianowych $S_2O_4^{2-}$. Inhibitorami jej są: aminotriazole, hydroksyloamina, jony cyjnkowe lub azydkowe.

- dwufunkcyjne katalazo-peroksydazy - Są to enzymy o dużej wielkości cząsteczki zbudowane z ponad 700 aminokwasów. Złożone są z jednej do sześciu podjednostek o łącznej masie cząsteczkowej w zakresie od 120 do 340 kDa. Katalazo-peroksydazy pochodzą z roślin, grzybów i bakterii np. z *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces reticuli*. Ich optymalne pH mieści się w granicach od 6 do 6,5 i są bardziej wrażliwe na działanie temperatury oraz etanolu, chloroformu i H_2O_2 . Wykazują odporność na inhibicję aminotriazolem.
- pseudokatalazy - W swojej budowie nie zawierają atomów Fe^{III} , a zawierają połączenie dwóch atomów Mn^{II} - Mn^{II} . Złożone są z dwóch podjednostek o budowie heksamerycznej i łącznej masie cząsteczkowej od 170 do 210 kDa. Występują w bakteriach np. *Pyrobaculum calidifontis* [2], *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus plantarum* [13], *Thermus thermophilus*. Wykazują odporność na obecność jonów azydkowych i cyjankowych [74].

Katalazy charakteryzują się wartościami aktywności w przedziale od 20 700 do 379 000 U/mg, a ich maksymalna szybkość reakcji wynosi od 54 000 do 833 000 mol H_2O_2 /(mol enzymu·s). Aktywność katalaz z trzech wymienionych wyżej grup, jest różna w zależności od wpływu nadtlenu wodoru, inhibitorów oraz działania temperatury [163, 201].

1.2. Występowanie i właściwości

Katalazy są jednymi z ważniejszych enzymów w komórkach. Występują w peroksysomach komórek zapewniając im ochronę przed toksycznym działaniem nadtlenu wodoru jak i innych pochodnych. Wśród ponad 300 zidentyfikowanych katalaz różnego pochodzenia, funkcję typowo katalazową wykazuje ponad 225, dwufunkcyjną katalazowo-peroksydazową około 50 a katalaz zawierających mangan jest więcej niż 25 [34].

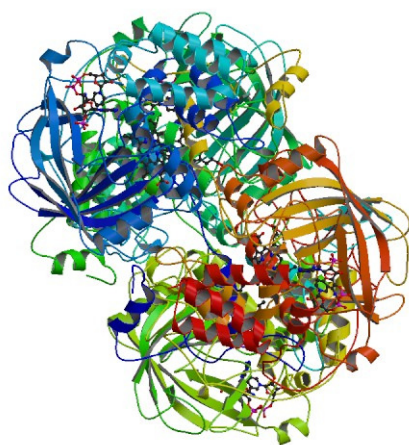
1.2.1 Katalazy ludzkie, zwierzęce i roślinne

Katalazy ludzkie i zwierzęce

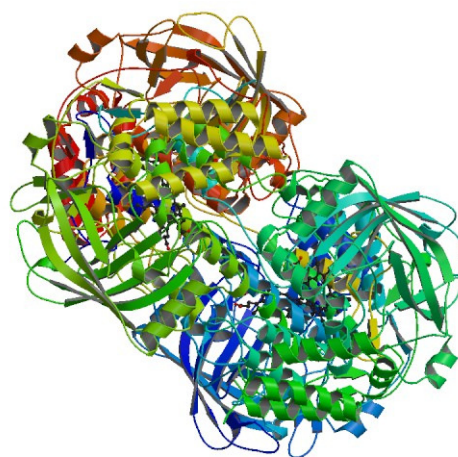
Katalaza obecna jest w komórkach wszystkich tkanek zwierzęcych. W dużych ilościach występuje w wątrobie, nerkach, krwinkach czerwonych i białych oraz tkance nerwowej. Usuwa

powstały podczas procesów metabolicznych H_2O_2 . W krwinkach czerwonych chroni glutation i hemoglobinę przed utlenieniem [52]. Całkowita masa cząsteczkowa katalaz zwierzęcych waha się w granicach 220-340 kDa.

Pierwsza najlepiej poznana katalaza z wątroby wołowej (rys. 1-1), jest typową katalazą o masie cząsteczkowej 250 kDa. Zbudowana jest z czterech podjednostek, każda o masie cząsteczkowej 50-60 kD. Na jedną podjednostkę katalazy przypada jeden atom żelaza Fe^{III} (na jedną cząsteczkę katalazy – cztery atomy Fe^{III}) [52]. Struktura tetrameryczna katalazy zapewnia odizolowanie hemu w miejscu aktywnym od reszty enzymu, co umożliwia prawidłowy przebieg reakcji katalizowanej przez enzym. Nieodizolowanie hemu od środowiska reakcji, mógłoby prowadzić do powstania rodnika hydroksylowego.



Rys. 1-1. Katalaza z wątroby wołowej [wg 87]



Rys. 1-2. Katalaza z erytrocytów ludzkich [wg 88]

Katalaza ludzka z erytrocytów zbudowana jest, podobnie jak katalaza wołowa, z czterech identycznych podjednostek, każda o masie cząsteczkowej 60 kDa (rys. 1-2). Jest białkiem mocno uwodnionym. Do katalazy ludzkiej przyłączone są cztery cząsteczki NADPH (fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego), po jednej przypadającej na każdą podjednostkę katalazy. Zadaniem tego zredukowanego nukleotydu jest ochrona enzymu przed dezaktywacją spowodowaną działaniem nadtlenku wodoru. Stwierdzono, iż katalaza ludzka i wołowa mają zdolność zarówno przyłączania jak i uwalniania NADPH [12,50,163].

Maksymalna szybkość reakcji dla katalazy ludzkiej wynosi $548\ 000\ \text{mol}\ H_2O_2/(\text{mol}\ \text{enzymu}\ s)$ i jest prawie dwukrotnie wyższa niż dla katalazy *A. niger*, a trzykrotnie wyższa niż w przypadku katalazy wołowej [163]. Stężenie katalazy ludzkiej ulega zmianie w różnych stanach chorobowych. Spadek aktywności tego enzymu wykryto w wielu chorobach nowotworowych

(płuc, przewodu pokarmowego, piersi, nerek oraz białaczkach), wrzodziejącym zapaleniu dziąseł, a także u alkoholików [52].

Katalazy roślinne

Katalazy roślinne są enzymatycznymi przeciwutleniaczami występującymi w peroksysomach i glioksysomach komórek roślinnych w towarzystwie oksydaz flawinowych, wytwarzających H_2O_2 , którego stężenie $10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ może zahamować fotosyntezę do 50% [3]. Katalazy roślinne występują m. in. w takich roślinach jak: pietruszka [138], buraki czerwone [42], jabłka [199]. Całkowita masa cząsteczkowa katalaz roślinnych waha się w granicach 160-250 kDa. Maksymalną aktywność wykazują one zazwyczaj w zakresie pH od 5 do 8 oraz w temperaturze 30°C .

Aktywność katalaz w roślinach można powiązać ze stresem oksydacyjnym, występującym przy ich wzroście na glebach zasolonych. Stwierdzono, że im wyższe zasolenie gleby, tym niższa aktywność katalazy [14,73].

1.2.2 Katalazy mikroorganizmów

Większość katalaz bakterii i grzybów zaliczanych jest do typowych jednofunkcyjnych katalaz (tak jak zwierzęce) oraz dwufunkcyjnych katalazo-peroksydaz, które są bardziej wrażliwe na temperaturę, rozpuszczalniki organiczne oraz H_2O_2 niż typowe katalazy. Inhibująco wpływają na nie aniony ditionianowe $S_2O_4^{2-}$ natomiast odporne są na działanie aminotriazolu [201].

Katalazy bakteryjne

Katalazy bakteryjne mogą być pojedynczą katalazą lub katalazą zbudowaną od dwóch do sześciu podjednostek, o masie podjednostki 60-90 kDa. W budowie katalaz bakteryjnych mogą pojawiać się różnice. Przykładem katalazy bakteryjnej złożonej z dwóch izoenzymów jest wyizolowana katalaza z *Comamonas terrigena* N3H. Izoenzymy te należą do dwóch różnych grup katalaz. W typowej katalazie, aktywność stabilizowana jest przez jony kadmu, natomiast w katalazo-peroksydazie aktywność stabilizowana przez obecność fenolu [202].

W mikrobiologii [151] przy identyfikacji bakterii powszechnie jest stosowany test na obecność katalazy. Bakterie zawierające katalazę określane są jako katalazo(+) np. bakterie octanowe *Acetobacter*, a nie posiadające tego enzymu jako katalazo(-) np. bakterie mlekowe *Lactococcus lactis*.

Katalazy otrzymano z halofili [22], termofili [2,54,74,171,172], alkalofili [54,172] oraz psychrofilii [201]. Mają one często wyjątkowe cechy i różnią się znacznie aktywnościami. Dla przykładu wśród bakterii psychrofilnych jest *Vibrio rumoiensis*, z której otrzymana katalaza ma bardzo wysoką aktywność wynoszącą 397 000 U/mg. Aktywność ta jest ponad czterokrotnie wyższa niż katalaz z eukariontów. Natomiast katalazo-peroksydaza z *Rhodobacter capsulatus* ma jedynie aktywność wynoszącą 7 800 U/mg (wśród katalaz o masach cząsteczkowych około 240 kDa) [201].

Pod kątem zastosowań przemysłowych poszukuje się katalaz termostabilnych. Te katalazy są wśród bakterii *Thermus sp.*, dodatkowo odpornych na inhibitujący wpływ jonów fluorkowych. Do termostabilnych należą także katalazy z bakterii *Micrococcus sp.* [200]. Dodatkową zaletą katalaz bakteryjnych, oprócz termo stabilności, jest odporność na warunki alkaliczne. Takie katalazy można znaleźć w każdej z trzech wymienionych w pkt. 1.1. grup.

W pierwszej grupie jednofunkcyjnych katalaz są katalazy wyjątkowo odporne termicznie, zbudowane z dwóch podjednostek. Przykładem jest katalaza z *Rhodobacter sphaeroides* o masie cząsteczkowej około 143 kDa [170], która jest stabilna w zakresie temperatur od 30°C do 70°C. Inną katalazą zbudowaną z czterech podjednostek, każda o masie cząsteczkowej 42,5 kDa, jest pochodząca z *Thermus brockianus* [171,172] o aktywności 5300 U/mg. Wykazuje ona aktywność w zakresie temperatur od 30°C do 94°C i w zakresie pH od 6 do 10, z optymalną aktywnością w temperaturze 90°C i pH 8.

W drugiej grupie dwufunkcyjnych katalazo-peroksydaz jest np. katalaza z *Bacillus SF* z optymalną aktywnością w temperaturze 60°C oraz w pH 9 [54,200]. Inna katalazo-peroksydaza z *Escherichia coli* wykazuje optymalną aktywność w temperaturze 82°C [163].

Do trzeciej grupy pseudokatalaz bakteryjnych zaliczyć można katalazę pochodzącą z beztlenowego hipertermofilnego *Pyrobaculum calidifontis*. Jej aktywność wynosi 23 500 U/mg w temperaturze optymalnej 70°C i jest trzykrotnie większa od aktywności innej pseudokatalazy z *L. plantarum* [2,13].

Nakayama i wsp. [134] wyizolowali katalazę z *Rhizobium radiobacter*, która hodowana była na odpadach ściekowych z zawartością 5% H₂O₂. Prowadząc hodowlę przez okres 20 h otrzymano katalazę stabilną w zakresie temperatur od 30°C do 60°C oraz w zakresie pH od 5 do 11. Aktywność tej katalazy wynosiła 30420 U/mg. Dla porównania katalaza otrzymana z *Aspergillus niger* charakteryzowała się dużo mniejszą aktywnością 9 U/mg po 72 h wzrostu *A. niger* [51], natomiast katalaza z *Vibrio rumoiensis* miała aktywność 4092 U/mg po 48 h [197].

Katalazy drożdżowe

Komórki drożdży są zdolne przetrwać w środowisku o wysokim stężeniu H_2O_2 w zakresie od 0,01 do 0,1 mol/dm³. Odporność na nadtlenek wodoru przypisuje się działaniu katalazy i peroksydazy. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* wykazano katalazy wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe. Drożdże wytwarzają dwie katalazy: typową, cytoplazmatyczną katalazę T oraz nietypową, peroksysomalną katalazę A. Katalaza T jest rozpuszczalnym białkiem, syntetyzowanym w odpowiedzi na stresy metaboliczne i środowiskowe. Dodanie do pożywki niewielkich ilości H_2O_2 indukuje wytwarzanie enzymu. Czynnikiem regulującym syntezę katalaz w komórkach drożdży jest tlen. Katalaza występuje wyłącznie w obrębie matriks cytoplazmatycznego. Katalaza A i T nie występują w dzikich, rosnących w warunkach beztlenowych komórkach drożdży [51,52].

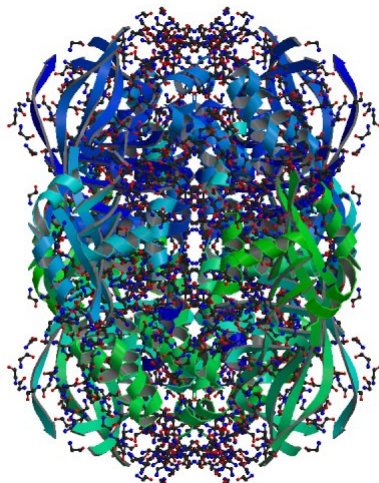
Katalazy grzybów nitkowych

Katalazy grzybów nitkowych są nieco inne niż u pozostałych eukariontów pod względem podjednostek i zawartości hemu. Katalazy kropidlaka są identyczne z enzymem występującym w wątrobie ssaków. Jest ona tetrametrem, składającym się z czterech podjednostek, z czterema atomami Fe^{III} . Wyróżniają się natomiast znacznie większymi cząsteczkami o masie podjednostek wynoszącymi 80-97 kDa. Katalaza *Aspergillus niger* jest znacznie stabilniejsza niż katalaza wołowa w warunkach skrajnych wartości pH, temperatury i zawartości H_2O_2 . Katalaza *A. niger* w postaci natywnej wykazuje optymalną aktywność w temperaturze 40°C oraz w pH zbliżonym do obojętnego. Optymalna aktywność immobilizowanej katalazy *A. niger* występuje w pH od 7 do 7,5 w zależności od użytego nośnika [6]. Struktura krystaliczna katalazy *A. niger* nie jest znana. Jako przykład katalazy grzybowej na rys. 1-3 przedstawiono katalazę z *Penicillium vitale*. Masa podjednostki tej katalazy waha się w przedziale 80-97 kDa [52, 92, 125].

Berka i wsp. (Genencor International, Inc.) [16] stwierdzili, iż u grzyba *A. niger* występują dwa rodzaje katalaz. Technikami biologii molekularnej zidentyfikowano dwa geny: *catA* (gen sklonowany, poprzez krzyżową hybrydyzację drożdży *Saccharomyces cerevisiae*) i *catR* (gen kodujący), odpowiadające różnym typom katalaz: katalazie A i katalazie R. Katalaza A (właściwości porównywalne do katalazy z wątroby wołowej) jest mniej stabilna, szybciej się dezaktywuje pod wpływem wysokiego stężenia H_2O_2 , jak również jest mniej aktywna od katalazy R w niskim pH. Katalaza R jest wykorzystywana głównie w preparatach komercyjnych. W przeciwieństwie do katalazy A jest ona stabilna w szerokim przedziale pH, odporna na dezaktywację H_2O_2 o stężeniu powyżej 0,03 mol/dm³.

W tabeli 1-1 przedstawiono porównanie właściwości różnych podjednostek wyizolowanych z katalazy *A. niger*. Masa cząsteczkowa podjednostek katalazy A i katalazy R jest

porównywalna z masami cząsteczkowymi wyznaczonymi przez innych badaczy. Gruf i wsp. [66] określili masę cząsteczkowa katalazy *A. niger* wynoszącą 323 kDa, natomiast masa cząsteczkowa wyznaczona przez Kikuchi-Torii i wsp. [106] a także Bučkową i wsp. [24] wynosiła 385 kDa.



Rys. 1-3. Katalaza grzybowa z *Penicillium vitale* [wg 86]

Tabela 1-1. Porównanie właściwości podjednostek katalazy A i katalazy R z *Aspergillus niger* [16]

| Właściwości | Katalaza A | Katalaza R |
|--|------------|------------|
| Masa cząsteczkowa [kDa] | 46 | 80 |
| Aktywność (U/mg) | 6 300 | 7 500 |
| Stabilność przy wysokim stężeniu H ₂ O ₂ | Nie | Tak |
| Stabilność podczas przechowywania (35°C, 3 dni, pH 7) | 55% | >90% |

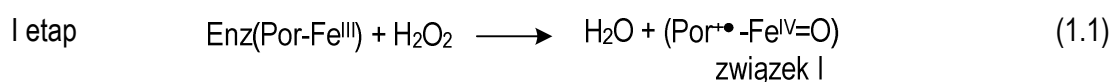
Również wśród katalaz grzybowych poszukiwano termostabilnych i alkalostabilnych. Przykładem takich katalaz są pochodzące z *Scytalidium thermophilum* oraz *Humicola insolens*, które w temperaturze 70°C oraz z zakresie pH od 9 do 10,5 po czasie 20 minut zachowują 75% aktywności. Katalazy z *S. thermophilum* oraz *H. insolens* rozkładają nadtlenuk wodoru w zakresie od 25 do 250 ppm przez okres 10-20 min przy dwukrotnie mniejszej ilości enzymu w porównaniu z katalazą *A. niger* [37].

1.3. Rozkład H₂O₂

Nadtlenek wodoru powstający w reakcjach biochemicznych jest dla komórek silnie toksyczny. W przypadku nadmiernego nagromadzenia H₂O₂ w organizmie ludzkim dochodzić może do zapalenia, nowotworu, cukrzycy, choroby wieńcowej, anemii, choroby Parkinsona, choroby Alzheimera [165]. Procesy starzenia się tkanki nerwowej są częściowo związane z wytwarzanymi w procesach metabolicznych aktywnymi formami tlenu. Katalaza oraz inne enzymy antyoksydacyjne, dzięki swoim właściwościom usuwają nadtlenki, tym samym opóźniając degenerację tkanek i chroniąc lipidy, białka, cukry i kwasy nukleinowe przed uszkodzeniem [52, 165].

Ogólny schemat reakcji katalizowanej przez katalazę

Katalaza może wykazywać aktywność katalazową lub peroksydazową. Aktywność katalazową wykazuje w reakcji rozkładu nadtlenku wodoru. Katalaza przekształca dwie cząsteczki nadtlenku wodoru do dwóch cząsteczek wody i jednej cząsteczki tlenu. Mechanizm działania hemu katalaz jest złożony i w pełni niezrozumiany [95,98,203]. W większości preferowany jest sposób przedstawiania mechanizmu jako procesu dwuetapowego [12,30,31,40]. W pierwszym etapie następuje redukcja nadtlenku wodoru do wody z udziałem Fe^{IV} układu hemowego katalazy i utworzeniem związku I (Por^{•+}-Fe^{IV}=O), w którym żelazo hemu jest na czwartym stopniu utlenienia. Mechanizm powstawania tego związku po raz pierwszy opisali w roku 1947 Chance i wsp. [30].



Nowoczesne metody badawcze pozwoliły tłumaczyć przebieg reakcji w I etapie w ten sposób, że nadtlenek wodoru trafia do centrum aktywnego (hemu) przez wąski kanał hydrofobowy. Takie dostarczanie substratu do centrum aktywnego jest bardzo korzystne, uniemożliwiając wejście substratów większych niż nadtlenek wodoru. W katalazie reszty His (w pozycji 75) i Asn (w pozycji 148) wzajemnie ze sobą oddziałują. Następują przesunięcia w obrębie cząsteczki nadtlenku wodoru. Jeden z protonów zostaje przeniesiony z jednego atomu tlenu na drugi. Prowadzi to do wydłużenia i polaryzacji wiązania O-O. W takiej postaci cząsteczka H₂O₂ jest przyłączona do żelaza w centrum hemu. Następuje zerwanie wiązania O-O, co prowadzi do uwolnienia cząsteczki wody i wytworzenia związku I (Por^{•+}-Fe^{IV}=O). Przyłączenie pierwszej cząsteczki H₂O₂ otwiera hydrofobowy kanał i możliwe jest przyłączenie kolejnej cząsteczki H₂O₂, zapobiegając być może rozpadowi kompleksu [34, 203].

1.4. Stabilizatory i aktywatory katalazy

Stabilizatory enzymów są to związki, które zwiększają ich odporność na czynniki dezaktywujące. Aktywatory są związkami, które dodane do roztworów enzymów powodują wzrost aktywności. Ten sam związek może być stabilizatorem dla jednej katalazy, a inhibitorem dla drugiej np. etanol (2% roztwór) lub sól sodowa siarczanu dodecyłu (SDS). Polialkohole wpływają stabilizująco na katalazę, uniemożliwiając hydratację białka. Cząsteczki polialkoholi otaczają powierzchnię cząsteczki białka, utrudniając dostęp cząsteczkom wody. Użycie polialkoholi jako dodatków powoduje wzrost odporności katalazy na środowisko zasadowe.

Katalaza *A. niger* jest stabilnym enzymem nie potrzebującym aktywatorów. Jednak prowadzone badania wskazały, iż w obecności SDS aktywność katalazy nie tylko była stabilizowana, lecz nietypowo wzrosła. W pH 6,4 oraz 8 związek ten powodował wzrost aktywności katalazy *A. niger* do 180% w porównaniu do enzymu bez zastosowania SDS. Przy kwaśnym pH 3,2 oraz zasadowym pH 10 dodanie SDS do katalazy powodowało inhibicję [130].

Dodanie 2% etanolu do katalazy *A. niger* lub katalazy wołowej, przechowywanej przez okres 12 dni, powodowało w przypadku katalazy wołowej spadek aktywności o 70% (dla pH 4,5 oraz 25°C) w stosunku do enzymu bez 2% etanolu, natomiast aktywność katalazy *A. niger* nie ulegała zmianie w pH 6 [127].

Dla katalazy z bakterii *Bacillus sp.*, wyizolowanych z wód odpadowych przemysłu włókienniczego stabilizujący wpływ na aktywność katalazy mają polialkohole [39]. Najlepszy skutek stabilizacji, zwiększający siedmiokrotnie aktywność katalazy przetrzymywanej przez okres 24 h (w temperaturze 30°C, przy pH 7) otrzymano przy zastosowaniu 20% obj. roztworu gliceryny. Także w temperaturze 60°C użycie gliceryny powodował wzrost aktywności o około 30%. Stabilność katalazy *Bacillus sp.* poprawiona zostaje w pH 10 i 11 przez dodatek 5% obj. gliceryny. Dodanie gliceryny do katalazy powoduje w pH 11 i temperaturze 60°C wzrost aktywności o około 40% w porównaniu z enzymem bez dodatków polialkoholi.

1.5. Inhibitory katalazy

Badano wpływ inhibitorów na reakcję, rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę, określając najczęściej ich stężenie, przy którym następował 50% spadek aktywności katalazy. Prowadzone badania w większości przypadków, ograniczały się do oceny jakościowej wpływu tych inhibitorów na reakcję rozkładu H₂O₂. Stwierdzono [163,201], że inhibitujące działanie na katalazę wywierają zarówno związki organiczne jak i nieorganiczne.

Związkami organicznymi inhibitującymi dla różnego rodzaju katalaz są aminotriazole. Wykazują one inhibitujący wpływ przy wielokrotnie wyższych stężeniach niż hydroksyloamina (tabela 1-2).

Tabela 1-2. Stężenia inhibitorów katalazy powodujące spadek aktywności enzymu o 50%

| Katalaza | Aminotriazol [mmol/dm ³] | NH ₂ OH [μmol/dm ³] | NaCN [μmol/dm ³] | NaN ₃ [μmol/dm ³] | Autorzy |
|---------------------------------|---|---|---------------------------------|---|------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | 45 | 0,4 | 300 | 150 | Switala i Loewen [163] |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 6 | 2,0 | 35 | 1,5 | |
| wątroba wołowa | 4 | 3,0 | 30 | 1,5 | |
| ludzkie erytrocyty | 3 | 2,0 | 20 | 1,5 | |
| <i>Aspergillus niger</i> | - | 0,26 | - | - | Kulys i wsp. [112] |
| <i>Scytalidium thermophilum</i> | - | 0,25 | - | - | |
| <i>Penicillium vitale</i> | - | 0,40 | - | - | |
| <i>Vibrio rumoiensis</i> | 20 | - | 10 | 100 | Yumoto i wsp. [201] |
| <i>Rhodospirillum rubrum S1</i> | - | 0,11 | 11,5 | 0,52 | Kang i wsp. [103] |

Wpływ soli SDS jako inhibitora na aktywność katalazy *A. niger* został określony przez Moosavi-Movahediego i wsp. [99, 129]. Przy kwaśnym pH 3,2 oraz zasadowym pH 10 następował gwałtowny spadek aktywności.

Nieorganicznymi inhibitorami katalaz są jony cyjnkowe, azydkowe [103,106,163], fluorkowe [106]. Hydroksyloamina jest inhibitorem odwracalnym katalazy *A. niger*, ponieważ enzym wykazuje ponownie aktywność po przeprowadzeniu dializy i dodaniu do roztworu nadtlenu wodoru. Dla katalaz pochodzących z *Scytalidium thermophilum* oraz *Penicillium vitale* hydroksyloamina jest inhibitorem w warunkach pH obojętnego i zasadowego, w temperaturze 30°C i stężeniu

0,001 mol/dm³ H₂O₂ (tabela 1-2). Hydrazyna która jest strukturalnym analogiem hydroksyloaminy, nie wpływała inhibitorycznie na aktywność katalazy *A. niger*, aż do stężenia 0,2·10⁻³ mol/dm³ w zakresie pH od 7,2 do 9 [112].

Wśród kilkunastu badanych katalaz, katalaza z *A. niger* wykazywała największą odporność na wpływ inhibitorów (tabela 1-2). Katalaza *A. niger* charakteryzowała się spadkiem aktywności o 50% przy około 10 krotnie wyższym stężeniu NaCN oraz aminotriazolu, w porównaniu do katalaz z *S. cerevisiae*, wątroby wołowej i ludzkich erytrocytów. W przypadku użycia jako inhibitorów jonów azydowych, by nastąpił spadek aktywności o 50%, ich stężenie dla katalazy *A. niger* było około 100 krotnie wyższe niż dla pozostałych katalaz.

1.6. Wpływ immobilizacji na właściwości katalazy

Od początku lat 70. XX wieku podejmowano wiele prób immobilizacji katalazy. Stosowano wszystkie typowe metody polegające na sieciowaniu agregatów [187], wiązaniu z nośnikiem [6,7,46,48,75,140,167,169] i pułapkowaniu [101,145]. Najszerzej stosowana była immobilizacja na nośnikach, poprzez wiązanie kowalencyjne, ale podejmowano także próby bezpośredniej adsorpcji. Pamula i Rouxhet [139] badali wpływ właściwości hydrofobowych włókien węglowych na adsorpcję katalazy z *Aspergillus niger*. Na materiale o niskiej hydrofobowości immobilizowały się niewielkie ilości katalazy. Ze wzrostem hydrofobowości wzrastała ilość adsorbowanej katalazy ale temu procesowi towarzyszyła jednoczesna dezaktywacja enzymu. Kowalencyjne wiązanie enzymu z nośnikiem usztywnia jego strukturę [203] i w wielu przypadkach prowadzi do wzrostu stabilności. Katalazę immobilizowano metodami chemicznymi na wielu nośnikach nieorganicznych (Al₂O₃, Fe₃O₄, SiO₂) [6,38,46,54,75,177,182] i organicznych pochodzenia syntetycznego (poliamidy, akrylonitryl, poliuretany) [28,29,48,140,169,185]. W przypadkach nośników nieorganicznych stosowano zazwyczaj aktywację γ -aminopropyleno-trietoksysilanem i następnie sprzężanie enzymu z nośnikiem za pomocą aldehydu glutarowego [181]. Horst i wsp. [75] zastosowali oryginalne rozwiązanie polegające na aktywacji magnetytu bezpośrednio aldehydem glutarowym. W przypadku nośników organicznych istnieje znacznie bardziej zróżnicowana metodyka aktywacji nośników. Wysokie wydajności przy immobilizacji katalazy uzyskiwano dla nośników aktywowanych barwnikami [140].

Opublikowano również wyniki szeregu badań nad pułapkowaniem katalazy w żelach polisacharydów [6, 27, 62]. Tego rodzaju żele mają część porów o rozmiarach większych od wielkości cząstek enzymów i w trakcie procedury żelowania istnieje możliwość uwalniania się enzymów z granulek biokatalizatora. Akertek i Tarhan [6] stwierdzili, że katalaza immobilizowana w karagenie ma znacznie mniejszą aktywność niż immobilizowana w alginianie wapnia.

Przydatność alginianu do immobilizacji katalazy potwierdzili także Görenek i wsp. [62]. Tradycyjną procedurą otrzymywania granulek alginianu zmodyfikowali w ten sposób, że użyli roztworu alginianu sodu i żelatyny, a roztwór żelujący z CaCl_2 uzupełnili aldehydem glutarowym. W tej metodzie oprócz pułapkowania w żelu alginianu zachodziło jednocześnie sieciowanie cząsteczek katalazy i żelatyny aldehydem glutarowym. Przy pułapkowaniu w chitozanie [27] stosowano, także jako uzupełnienie, sieciowaniem aldehydem glutarowym. Pułapkowanie katalazy metodą zol-żel [101] przy zastosowaniu tetraetoksyilanu prowadzi do immobilizowanego biokatalizatora, który jednak ma aktywność o 1000 razy mniejszą niż użyta katalaza w postaci natywnej.

Bezpośrednie porównanie przedstawionych metod immobilizacji jest praktycznie niemożliwe, ponieważ w większości przypadków badacze nie podają uzyskiwanych wydajności procesu immobilizacji. Zamieszczone dane pozwalają jednak na przeprowadzenie oceny wpływu immobilizacji na następujące parametry:

- optymalne pH,
- optymalną temperaturę,
- stabilność podczas przetrzymywania,
- stabilność operacyjną.

Immobilizacja przy zastosowaniu przedstawionych powyżej metod prowadziła do niewielkich zmian w wartościach optymalnego pH przy porównaniu z enzymem natywnym. W większości przypadków zmiany nie przekraczały $\pm 0,5$ jednostki pH. Immobilizowana katalaza wykazywała jednak znacznie szerszy zakres wartości pH, dla których aktywność była bliska maksymalnej [6,38,62,169].

W tabeli 1-3 zamieszczono wartości temperatury optymalnej dla katalazy natywnej i immobilizowanej. Na podstawie tych danych można stwierdzić, że poza pewnymi szczególnymi przypadkami, optymalna temperatura katalazy natywnej i immobilizowanej ma taką samą wartość [6, 27, 29, 62, 140, 167]. Zatem immobilizacja nie prowadzi do istotnego wzrostu stabilności enzymu, chociaż z reguły powyżej temperatury optymalnej obserwowany jest większy spadek aktywności katalazy natywnej w porównaniu z katalazą immobilizowaną. Można ponadto zauważyć, że optymalna temperatura katalazy wołowej jest niższa o 5°C od optymalnej temperatury katalazy z *Aspergillus niger*. Potwierdza to powszechnie akceptowalną opinię, że katalaza wołowa jest mniej stabilna niż katalazy pochodzenia mikrobiologicznego. Niższa temperatura optymalna wyznaczona dla enzymów w formie natywnej przez Tukela i Alptekina [177] oraz Wanga i wsp. [185] może być rezultatem stosowanej metodyki oznaczania aktywności. Istotne znaczenie ma tutaj stężenie początkowe substratu i czas pomiaru.

Tabela 1-3. Optymalna temperatura dla katalazy natywnej i immobilizowanej

| Temperatura optymalna [°C] | | Autorzy |
|--|----------------------|------------------------|
| Enzym natywny | Enzym immobilizowany | |
| Katalaza z <i>Aspergillus niger</i> | | |
| 40 | 40 | Akertek i Tarhan [6] |
| 40 | 40 | Pifferi i wsp. [140] |
| 40 | 40 | Tarhan [167] |
| 30 | 40 | Wang i wsp. [185] |
| Katalaza z wątroby wołowej | | |
| 35 | 35 | Çetinus i Öztop [27] |
| 35 | 35 | Çetinus i wsp. [29] |
| 35 | 35 | Görenek i wsp. [62] |
| 25 | 35 | Tukel i Alptekin [177] |

W części prac dotyczących immobilizacji katalazy podawane są informacje na temat stabilności biokatalizatora podczas przetrzymywania w określonej temperaturze. Z reguły prezentowane są one jako porównanie z enzymem natywnym. W tabeli 1-4 zamieszczono czasy połowicznego spadku aktywności katalazy z *A. niger* i wątroby wołowej. Analiza tych danych pozwala na stwierdzenie, że katalaza immobilizowana zachowuje znacznie dłużej aktywność niż katalaza natywna.

Przy ocenie możliwości praktycznego wykorzystania immobilizowanych preparatów znacznie istotniejsza jest stabilność operacyjna, którą wyznacza się dla warunków w jakich biokatalizator ma być zastosowany. Jako miarę stabilności operacyjnej, stosuje się często także czas połowicznego spadku aktywności biokatalizatora. Wielkość ta powinna być wyznaczona dla stężenia nadtlenu wodoru, występującego w procesie.

Badacze jednak zazwyczaj ograniczają się do przytoczenia danych potwierdzających możliwość wielokrotnego użycia immobilizowanej katalazy. W tabeli 1-5 zebrano dane dotyczące stabilności operacyjnej katalazy, które badacze wyznaczyli, przy początkowym stężeniu nadtlenu wodoru w układach reakcyjnych 0,01 mol/dm³. Okazuje się, że nawet przy tak niskim stężeniu nadtlenu wodoru, czas połowicznego spadku aktywności immobilizowanej katalazy z *A. niger* nie przekracza 13,4 h. Dla katalazy z wątroby wołowej stwierdzono jeszcze mniejszą stabilność. Wyklucza to opłacalność zastosowania immobilizowanej katalazy do rozkładu nadtlenu wodoru w procesach przemysłowych. Możliwe jest jednak jej użycie w tej postaci do celów analitycznych, gdy stężenie nadtlenu wodoru jest znacznie mniejsze od 0,01 mol/dm³.

Tabela 1-4. Stabilność katalazy natywnej i immobilizowanej podczas przechowywania

| Temperatura [°C] | Czas połowicznego spadku aktywności [h] | | Autorzy |
|--|--|----------------------|------------------------|
| | Enzym natywny | Enzym immobilizowany | |
| Katalaza z <i>Aspergillus niger</i> | | | |
| 30 | 612 | 882 | Costa i wsp. [38] |
| 60 | 18 | 287 | |
| Katalaza z wątroby wołowej | | | |
| 4 | 240 | 672 | Akgöl i Denizli [7] |
| 5 | 504 | 1128 | Çetinus i Öztop [27] |
| 25 | 120 | 288 | |
| 5 | 96 | 2040 | Tukel i Alptekin [177] |
| temperatura pokojowa | 48 | 1320 | |
| 40 | 9 | 29 | Alptekin i wsp. [8] |
| 50 | 6,7 | 4,8 | |

Tabela 1-5. Stabilność operacyjna immobilizowanej katalazy

| Temperatura [°C] | Czas połowicznego spadku aktywności [h] | Metoda immobilizacji | Autorzy |
|--|---|--|------------------------|
| Katalaza z <i>Aspergillus niger</i> | | | |
| 30 | 13,4 | kowalencyjne wiązanie na SiO ₂ | Akertek i Tarhan [6] |
| 30 | 4,2 | pułapkowanie w alginianie | |
| 25 | 2,0 | kowalencyjne wiązanie na Al ₂ O ₃ | Tarhan [167] |
| 27 | 4,3 | | |
| 27 | 4,0 | kowalencyjne wiązanie na kopolimerze akroleiny i styrenu | Tarhan i Uslan [169] |
| Katalaza z wątroby wołowej | | | |
| 35 | 3,3 | pułapkowanie w chitozanie sieciowanym aldehydem glutarowym | Çetinus i Öztop [27] |
| 35 | 1,1 | adsorpcja na chitozanie | Çetinus i wsp. [29] |
| 25 | 3,0 | kowalencyjne wiązanie na komercyjnym nośniku Florisil | Tukel i Alptekin [177] |
| 25 | 0,7 | kowalencyjne wiązanie na granulkach chitozanowych | Çetinus i Öztop [28] |

1.7. Zastosowanie katalazy

Katalaza jest stosowana do rozkładu pozostałości nadtlenu wodoru używanego na dużą skalę w przemyśle włókienniczym, celulozowo-papierniczym i spożywczym.

Nadtlenek wodoru stosowany w przemyśle włókienniczym do bielenia włókien lnianych i bawełnianych powoduje z jednej strony wysokie wybielenie włókna, przy zachowaniu niezmiennych właściwości mechanicznych, a z drugiej strony jest przeszkodą podczas dyfuzji cząsteczek barwnika do powierzchni włókna oraz jego obszarów wewnętrznych. Z tego powodu, po procesie rozjaśniania tkanin, stosowana jest katalaza do usuwania nadmiernych ilości nadtlenu wodoru [38,54,85]. Zastosowanie katalazy w przemyśle włókienniczym, powoduje

zmniejszenie zużycia energii o 48%, obniża koszty środków chemicznych o 83%, zmniejsza zużycie wody o 50%, oraz redukuje czas trwania procesu o 33% [9,193] w porównaniu z procesem usuwania H_2O_2 bez użycia katalazy.

W przemyśle spożywczym katalaza rozkłada H_2O_2 używany w zimnej sterylizacji [6,84,140,169] np. masy jajecznej. Najpierw masa jajeczna zostaje pogrzana do temperatury $54^\circ C$ w celu dezaktywacji katalazy endogennej. Następnie dodaje się do niej 0,1% roztwór H_2O_2 i przez okres 3-10 min utrzymuje się w temperaturze $60-67^\circ C$. Gdy masa ochłodzi się do $45^\circ C$, powoli dodaje się sterylny roztwór katalazy. Masę jajeczną chłodzi się do temperatury $10^\circ C$ i pakuje w sterylnych warunkach [43].

W technologii żywności stosowane jest połączenie oksydazy glukozowej wraz z katalazą, do utleniania glukozy. Jej obecność może zahamować powstanie związków Maillarda o ciemnym zabarwieniu i nieprzyjemnym zapachu. Zastosowanie oksydazy glukozowej w sokach dodatkowo powoduje zachowanie witaminy C, natomiast użyta w winiarstwie zastępuje proces pasteryzacji i siarkowania. W produkcji konserw mięsnych i owocowo-warzywnych stosowanie oksydazy glukozowej stabilizuje barwę, smak i zawartość witaminy C. We wszystkich tych procesach usuwana jest glukoza z produktów spożywczych, a powstający nadtlenek wodoru usuwany jest przez katalazę [17,52,127,152]. Produkty rybne mogą być wybielane [90, 198] przy użyciu ok. 1% H_2O_2 , a jego pozostałości usuwane przy użyciu katalazy.

Możliwe jest też zastosowanie połączenia katalazy z oksydazą D-aminokwasową, która utlenia aminokwas do ketokwasu z wytworzeniem H_2O_2 [48,175]. Takie połączenie enzymów stosowane jest w przemyśle farmaceutycznym w procesie utleniania cefalosporyn.

Poza przemysłem spożywczym i włókienniczym katalaza używana jest w mniejszej skali podczas syntezy fosforanu dihydroksyacetonu [158] oraz w przemyśle elektronicznym, do rozkładu nadtlenu wodoru stosowanego do czyszczenia płytek krzemowych oraz półprzewodników [78]. W farmaceutyce i kosmetyce stosowana jest katalaza immobilizowana w biosensorach [25, 62, 78, 136] do oznaczania nadtlenu wodoru w kremach, emulsjach, środkach dezynfekujących.

Pomiary aktywności katalazy mogą służyć do wykrywania zmian chorobowych w organizmie. Przykładem może być wykrywanie cukrzycy u dzieci, obecności bakterii w moczu lub ostrego zapalenia wątroby [43, 52].

W tabeli 1-6 przedstawiono charakterystykę preparatów handlowych katalaz oraz zalecane ich użycie w określonych gałęziach przemysłu. Ze względu na wysoką stabilność dominują preparaty katalazy *A. niger*. Oferowane preparaty polecane są do zastosowania w przemyśle tekstylnym oraz spożywczym.

Tabela 1-6. Preparaty handlowe katalaz

| Nazwa handlowa | Aktywność | Warunki zastosowania preparatu | | Zastosowanie | Producent |
|---|-------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| | | Optymalne pH | Optymalna temperatura | | |
| Katalaza <i>Aspergillus niger</i> | | | | | |
| Catalase FL | 80 000 U/ml | 5,5-10 | 50°C | przemysł kosmetyczny i elektroniczny | Asa-enzyme [78] |
| Catalase | 50 000 U/g | 4-8 | 60°C | przemysł spożywczy | Biocon [81] |
| Catalase Fluorometric Detection Kit | - | 7-8 | - | diagnostyka laboratoryjna | Assay Designs, Inc. [79] |
| Catalase NL Amano | 50 000 U/ml | 6 | 30°C | przemysł spożywczy | Amano Enzyme, Inc. [77] |
| Catazyme 25L | 25 000 U/ml | 8-10 | 60°C | przemysł tekstylny | Novo Nordisk [46,75] |
| GENENCOR® CATALASE T100 | - | - | - | przemysł tekstylny | Genencor International, Inc. [83] |
| Terminox Ultra | 10 000 U/g | 6-10 | <50°C | przemysł tekstylny | Novozymes [9, 192,194] |
| Katalazy innego pochodzenia | | | | | |
| Catalase C641L (<i>Micrococcus lysodeikticus</i>) | 16 500 U/g | 3-9 | 60°C | przemysł spożywczy | Biocatalysts [80] |

W przemyśle tekstylnym katalaza stosowana jest przy pH zasadowym oraz temperaturze 50-60°C (Terminox Ultra, Catazyme 25L). W przemyśle spożywczym katalazy mogą być używane w temperaturze 30°C (Catalase NL Amano) oraz 60°C (Catalase z Biocon).

Dla pewnych skrajnych warunków (w wysokiej temperaturze i szerokim zakresie pH) zalecane jest stosowanie preparatu bakteryjnego np. Catalase C641L z *Micrococcus lysodeikticus* [80].

2. Kinetyka reakcji enzymatycznych

Reakcja enzymatyczna opisana modelem kinetycznym, pozwala przewidzieć szybkość przebiegu reakcji oraz sprawność katalityczną stosowanego enzymu.

2.1. Kinetyka prostej reakcji enzymatycznej z uwzględnieniem inhibicji

Model Michaelisa-Menten jest najprostszym schematem kinetycznym opisującym reakcję katalizowaną przez enzymu. W swojej teorii Michaelis i Menten założyli, iż podczas reakcji powstaje pośredni kompleks enzym-substrat ES, który następnie w wyniku nieodwracalnej reakcji powoduje powstanie produktu P oraz uwolnienie enzymu E:



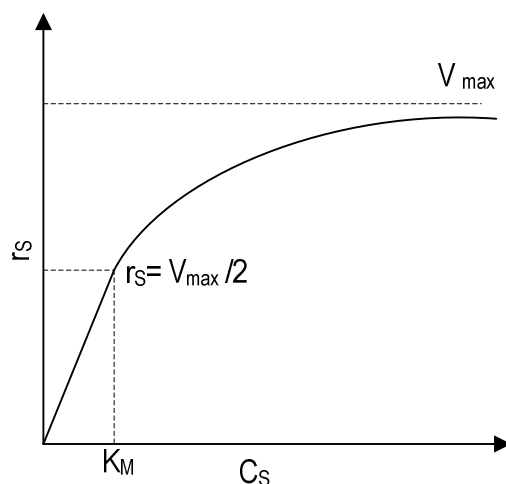
gdzie: k_1, k_{-1}, k_2 - stałe szybkości poszczególnych reakcji.

Ogólną zależność szybkości reakcji enzymatycznej o schemacie przedstawionym powyżej opisuje kinetyczne równanie Michaelisa-Menten:

$$r_s = \frac{V_{\max} C_S}{K_M + C_S} \quad (2.2)$$

gdzie: $V_{\max} = k_2 C_{E0}$ (2.2a)

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.2b)$$



Rys. 2-1. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej Michaelisa-Menten od stężenia substratu

Stała K_M nosi nazwę stałej Michaelisa-Menten. Jeżeli szybkość reakcji równa jest połowie szybkości maksymalnej $r_s = V_{\max}/2$, wówczas z rów. (2.2) wynika że $K_M = C_S$.

Stała Michaelisa-Menten K_M jest więc stężeniem substratu C_S , przy którym wartość szybkości reakcji jest połową wartości szybkości maksymalnej – graficznie przedstawiono to na rys. 2-1 [105, 188].

Szybkość reakcji zależy od stężenia substratu i enzymu, a także od temperatury, stężenia jonów wodorowych, enzymatycznych aktywatorów i inhibitorów.

Stężenie substratu

Szybkość reakcji uzależniona jest od stężenia substratu, a właściwie od szybkości rozpadu kompleksu ES. Przy małych stężeniach substratu (rys. 2-1) szybkość reakcji wzrasta proporcjonalnie do stężenia substratu, zgodnie z równaniem pierwszego rzędu:

$$C_S \ll K_M \Rightarrow r_s = \frac{V_{\max} C_S}{K_M + C_S} = k' C_S \quad (2.3)$$

gdzie: k' stałą szybkości reakcji przebiegającej według kinetyki pierwszego rzędu.

Równanie to związane jest z niecałkowitym wysyceniem cząsteczek enzymu substratem. Dalszy wzrost stężenia substratu pozwala na osiągnięcie całkowitego wysycenia cząsteczek enzymu, a tym samym uzyskanie maksymalnej aktywności katalitycznej – maksymalnej szybkości reakcji [105, 188]:

$$C_S \gg K_M \Rightarrow r_s = V_{\max} \quad (2.4)$$

Stężenie enzymu

Szybkość reakcji możemy regulować stężeniem enzymu pod warunkiem, że w układzie reakcyjnym występuje odpowiednia ilość substratu. Graficzna zależność szybkości reakcji początkowej od stężenia enzymu jest linią prostą. Maksymalna szybkość reakcji przy nadmiarze substratu zależy od stężenia enzymu i osiągana jest po przejściu w kompleks ES wszystkich cząsteczek enzymu [105, 188].

Temperatura

Temperatura wpływa na zmianę aktywności cząsteczek substratów oraz enzymu, powodując tym samym wzrost szybkości reakcji. Wzrost ten następuje zgodnie z regułą Van't Hoffa. W wyższych temperaturach, szybkość reakcji rośnie, ale pojawia się równocześnie dezaktywacja białka enzymu a wzrost szybkości reakcji jest powolniejszy. Następnie dezaktywacja jest na tyle znacząca, że szybkość reakcji gwałtownie spada.

Maksymalną szybkość reakcji enzymatycznej osiąga się w temperaturze optymalnej. Jej wartość dla enzymów, zależy od ich pochodzenia - dla enzymów zwierzęcych znajduje się w pobliżu

ciepłoty ciała, natomiast dla enzymów pochodzących z bakterii termofilnych temperatury optymalne osiągają wartości przekraczające 90°C.

Przyczyną niejednakowej oporności cieplnej enzymów jest zróżnicowanie energii niezbędnej do pokonania większej lub mniejszej liczby oddziaływań stabilizujących strukturę natywnego białka. Termolabilność enzymu maleje najczęściej w przypadku obecności substratu, który wiążąc się z cząsteczkami białka - stabilizuje drugo- i trzeciorzędową strukturę łańcucha polipeptowego.

Jednym z celów badań stabilności enzymów jest zwiększenie ich trwałości w warunkach procesowych, z uwzględnieniem podwyższonej temperatury. Procesy prowadzone w temperaturach powyżej 55°C są korzystne ze względu na m.in. wzrost rozpuszczalności substratu, redukcję rozwoju mikroorganizmów oraz łatwość zatrzymania reakcji poprzez obniżenie temperatury [23].

Stężenie jonów wodorowych w mieszaninie reakcyjnej

Enzym wykazuje dużą aktywność w środowisku o ograniczonym (optymalnym) dla niego zakresie pH, zapewniającym występowanie i najlepsze dla przebiegu reakcji rozmieszczenie ładunku elektrycznego w centrum aktywnym i pozostałej części białka. Wpływ pH na szybkość reakcji wynika z wpływu na stopień dysocjacji grup funkcyjnych aminokwasów białek enzymatycznych oraz zmiany konformacji białek enzymatycznych, co w skrajnych przypadkach powoduje denaturację (degradację) enzymu. Dla większości enzymów w roztworach wodnych optymalne pH jest zbliżone do obojętnego. Optymalne pH działania enzymu zależy często od stosowanego buforu. Są enzymy wykazujące maksymalną aktywność w środowisku silnie kwasowym (np. pepsyna pH=1) lub silnie zasadowym (np. trypsyna pH=11) [105].

Aktywatory

W celu uzyskania odpowiedniej aktywności lub osiągnięcia jej maksimum przez część enzymów, wymagana jest obecność specyficznych (określonych) związków chemicznych – aktywatorów. Ze względu na mechanizm działania aktywatory można podzielić na:

- koenzymy (kofaktory) – składniki enzymu niezbędne do prawidłowego przebiegu reakcji tj. jony metali, witaminy, NADH
- regulatory potencjału oksydacyjno-redukcyjnego środowiska reakcyjnego, znoszące negatywny wpływ niekorzystnych warunków reakcji np. zawartości metali ciężkich; są to głównie niskocząsteczkowe związki organiczne np. cysteina lub 2-merkaptoetanol
- aktywatory nieaktywnych proenzymów (zymogenów) katalizujące hydrolizę wiązań peptydowych w cząsteczce enzymu

- aktywatory allosteryczne, wiążące się z centrum allosterycznym występującym w cząsteczkach niektórych enzymów, pozwalające osiągnąć właściwą konformację przestrzenną centrum aktywnego enzymu [105].

Inhibitory

Reakcja enzymatyczna może zostać zahamowana lub spowolniona pod wpływem działania związków zwanych inhibitorami. Inhibitory mogą powodować dezaktywację enzymu, wówczas mamy do czynienia z inhibicją nieodwracalną. Inhibitory nieodwracalne reagują z enzymem, wiążąc się kowalencyjnie, a zatem nieodwracalnie, do jego łańcuchów białkowych. Taka inhibicja trwale unieczynnia daną cząsteczkę enzymu. Do inhibitorów tego typu należą między innymi penicylina (inhibitor transpeptydazy) i aspiryna (inhibitor cyklooksygenazy).

W przypadku gdy inhibitor zostaje usunięty ze środowiska reakcyjnego, enzym odzyskuje przynajmniej częściowo aktywność, to wtedy mamy do czynienia z inhibicją odwracalną.

Wśród inhibicji odwracalnej wyróżniamy dwie podstawowe:

- **Inhibicję kompetycyjną (współzawodniczącą):** o centrum katalityczne cząsteczki enzymu konkurują ze sobą cząsteczki inhibitora oraz cząsteczki substratu, pozornie zmniejszają powinowactwo enzymu do substratu (wzrasta wartość K_M).

Taki mechanizm wynika z podobieństwa w strukturze inhibitora i substratu. Schemat działania inhibitora kompetycyjnego przedstawia się następująco:



Zjawisko inhibicji kompetycyjnej można ograniczyć używając większego stężenia substratu, wówczas szybkość maksymalna V_{max} pozostaje niezmienną [105].

- **Inhibicja niekompetycyjna:** substrat i inhibitor wiązane są przez cząsteczkę enzymu, łącząc się z nią w różnych miejscach wiążących. Uniemożliwia to przyjęcie przez enzym odpowiedniej konformacji, wymaganej do jego aktywności katalitycznej, co powoduje zmniejszenie się maksymalnej szybkości reakcji enzymatycznej V_{max} . Cząsteczki enzymu pozostające w środowisku reakcyjnym wykazują niezmienną powinowactwo do substratu (K_M pozostaje bez zmian). Schemat działania inhibitora niekompetycyjnego przedstawia się następująco:



W przeciwieństwie do inhibicji kompetycyjnej, zwiększenie stężenia substratu nie ogranicza wpływu inhibitora niekompetycyjnego.

Dodatkowo inhibicja odwracalna występuje jako:

- **Inhibicja akompetycyjna:** inhibitor wiąże się tylko z kompleksem ES, tworząc nieaktywny kompleks ESI. Ten rodzaj inhibicji rzadko występuje w układach z jednym substratem.

- **Inhibicja mieszana:** hamowanie reakcji enzymatycznej spowodowane jest działaniem inhibitora kompetycyjnego i niekompetycyjnego dla tej samej reakcji przy jednoczesnym wzroście wartości stałej Michaelisa-Menten [105, 188].

Inhibitory mogą być stosowane jako leki, lub jeżeli blokują ważne fizjologicznie enzymy, są silnymi truciznami. Stosowanie inhibitorów w celu zatrzymywania procesów przemysłowych po uzyskaniu pożądanego stopnia konwersji substratu jest ograniczone uwzględniając koszt i fizjologiczne oddziaływanie inhibitorów. Lepszym rozwiązaniem jest dezaktywacja enzymu poprzez podniesienie temperatury lub zmianę pH środowiska.

2.2. Kinetyka reakcji katalizowanej przez katalazę

2.2.1. Mechanizm reakcji rozkładu H_2O_2

Katalaza rozkłada nadtlenek wodoru zgodnie z reakcją:



Mechanizm działania katalazy różni się istotnie od typowego mechanizmu dla kinetyki reakcji enzymatycznej. W 1947 roku Chance [30] jako pierwszy zidentyfikował przy zastosowaniu metody spektrofotometrycznej związek przejściowy występujący w trakcie reakcji rozkładu nadtlenku wodoru przez katalazę. Mechanizm zaproponowany przez Chance'a polega na tym, że wytworzony z nadtlenku wodoru i enzymu kompleks ES reaguje z drugą cząsteczką substratu S dając produkt P i enzym E:



Przyjmując założenie o stanie pseudoustalonym dla powyższego mechanizmu okazuje się, że stężenie kompleksu ES nie zależy od stężenia substratu:

$$C_{ES} = \frac{k_1}{k_1 + k_2} C_{E0} \quad (2.10)$$

a szybkość reakcji jest opisana równaniem kinetycznym pierwszego rzędu w odniesieniu do stężenia substratu:

$$r_s = -\frac{dC_s}{dt} = \frac{2k_1k_2}{k_1+k_2} C_{E0}C_s \quad (2.11)$$

Według szacunku wykonanego przez Chance'a wartości stałych wynoszą:

$$k_1 = (4 - 5) \cdot 10^6 \text{ dm}^3/(\text{mol s}) \text{ oraz } k_2 = (1,5 - 1,8) \cdot 10^7 \text{ dm}^3/(\text{mol s}).$$

Wyniki te zostały ponownie przeanalizowane przez Kremera i Baera [111]. Otrzymali oni rozwiązania numeryczne równań różniczkowych odpowiadające mechanizmowi reakcji zaproponowanemu przez Chance'a. Wyniki obliczeń nie kwestionowały mechanizmu reakcji, jedynie to że w doświadczeniach Chance'a nie spełniono warunku stanu ustalonego. Stałe obliczone metodą najlepszego dopasowania, wynoszą:

$$k_1 = 3 \cdot 10^6 \text{ dm}^3/(\text{mol s}) \text{ oraz } k_2 = 5,6 \cdot 10^6 \text{ dm}^3/(\text{mol s}).$$

2.2.2. Struktura równania kinetycznego reakcji rozkładu H_2O_2

Od początków badań kinetyki reakcji podstawowy problem stanowiła dezaktywacja katalazy przez H_2O_2 , dlatego stosowane były różne metody korygowania wartości stałych szybkości reakcji.

Bonnichsena i wsp. [18] krytycznie przeanalizowali wcześniejsze prace i wykazali, że występowanie zjawiska dezaktywacji doprowadziło do błędnej interpretacji mechanizmu reakcji przez część badaczy, tzn. przyjęcia modelu Michaelisa–Menten i wyznaczenia stałej $K_M = 0,025 \text{ mol/dm}^3$. Stosowana metoda, przy czasie pomiaru 12 minut, powodowała otrzymanie zaniżonych wartości stałej szybkości reakcji dla katalazy pochodzenia zwierzęcego z powodu wystąpienia dezaktywacji enzymu substratem. Bonnichsen i wsp. [18] skrócili czas pomiaru do 30 sekund. Stwierdzili, że reakcja rozkładu H_2O_2 pod wpływem katalazy przebiega według równania kinetycznego:

$$r_s = -\frac{dC_s}{dt} = kC_{E0}C_s \quad (2.13)$$

Równanie (2.13) odpowiada modelowi peroksydacyjnemu przyjętemu przez Chance'a. Wyznaczona stała $k = 3,5 \cdot 10^7 \text{ dm}^3/(\text{mol s})$ dla katalazy pochodzącej z wątroby wołowej jest większa od obliczonej na podstawie stałych k_1 i k_2 wyznaczonych przez Chance'a.

Badania nad działaniem katalazy przy wysokich stężeniach H_2O_2 (do 5 mol/dm^3) prowadził Ogura [137], stosując technikę przepływu ciągłego. Prowadząc pomiary dla bardzo wysokich stężeń enzymu równych $1,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$ i czasów reakcji od 0,1 do 0,4 s, zależność

między szybkością reakcji a stężeniem H_2O_2 , mimo różnicy w mechanizmie działania katalazy, opisano równaniem Michaelisa-Menten:

$$r_s = \frac{V_{\max} C_s}{K_M + C_s} \quad (2.14)$$

gdzie: V_{\max} - maksymalna szybkość reakcji,

K_M – pozorna stała Michaelisa-Menten.

Korzystając z rów. (2.14) określona wartość K_M dla katalazy bakteryjnej wynosiła 1,1 mol/dm³ przy stężeniu początkowym nadtlenu wodoru w zakresie od 0,30 do 0,74 mol/dm³ [96].

Wartości K_M zależą od tego, do której z grup należy katalaza. Dla jednofunkcyjnych katalaz (np. z wątroby wołowej) wartość K_M jest dużo wyższa niż dla katalazo-peroksydaz (np. z *Mycobacterium tuberculosis*). Dla pierwszej z nich wartość K_M wynosi 0,093 mol/dm³ a dla drugiej 0,002 mol/dm³ [94, 163].

Wartości K_M zależą także od ich pochodzenia. Dla katalaz bakteryjnych wartość K_M określono w szerokim zakresie od 0,0039 mol/dm³ (z *E. coli*) do 0,537 mol/dm³ (z *Proteus mirabilis*) [163, 171]. Dla katalaz grzybowych wartości K_M są wyższe od 0,0480 mol/dm³ (z *Thermoascus aurantiacus*) [148]. W szczególnym przypadku katalazy *A. niger* określone wartości są z zakresu od 0,322 do 0,465 mol/dm³ [115, 163, 171] i są ponad czterokrotnie większe od wartości K_M dla katalazy z ludzkich erytrocytów (0,080 mol/dm³) [163].

Przy typowych zastosowaniach katalazy do rozkładu pozostałości nadtlenu wodoru, którego stężenie wynosi poniżej 0,02 mol/dm³ rów. (2.14) upraszcza się do postaci rów. (2.13). Tę postać równania kinetycznego reakcji rozkładu nadtlenu wodoru stosowano wielokrotnie [59, 60, 167, 168].

2.2.3. Metodyka pomiarów szybkości reakcji rozkładu H_2O_2

Szybkość reakcji wyznacza się poprzez pomiar ilość rozłożonego substratu lub ilość powstającego produktu. Obydwa sposoby pomiaru były stosowane w badaniach kinetyki reakcji katalizowanej przez katalazę.

Do pomiaru stężenia H_2O_2 stosowano najczęściej metodą spektrofotometryczną lub manganometryczną.

Metoda spektrofotometryczną [18,25,99] polega na pomiarze stężenia H_2O_2 przy długości fali 240 nm. Zazwyczaj stosowano molowy współczynnik absorpcji ε wynoszący 39,40 dm³/(mol cm) (Aebi [1]), a niekiedy używano wartości ε w zakresie od 35,76 do 43,60 dm³/(mol cm) [59,103,115,116]. Metoda spektrofotometryczna pozwala na oznaczenie stężeń H_2O_2 poniżej 0,02 mol/dm³.

Metoda manganometryczna [18, 46, 122] jest bardzo wygodna w użyciu, ponieważ zakwaszenie pobranej próbki kwasem siarkowym (VI), powoduje natychmiastowe zahamowanie reakcji enzymatycznej. Użycie tej metody pozwala także na prowadzenie pomiarów w szerokim zakresie stężeń nadtlenu wodoru.

Pomiar szybkości powstającego w trakcie reakcji tlenu mierzono manometrycznie i przy zastosowaniu elektrody tlenowej. Metoda manometryczna była jedną z pierwszych stosowanych metod do pomiaru szybkości wydzielania się tlenu przy oznaczaniu aktywności preparatów katalazy [32] ale jest stosowana nadal [126, 182]. Ze względu na łatwość pomiaru, zaczęto stosować elektrodę tlenową [61,75,101,111,115,148,149,163].

Rorth i Jensen [149] jako pierwsi do badań kinetyki rozkładu H_2O_2 przez katalazę wołową, zastosowali elektrodę tlenową, która umożliwiła wykonanie pomiarów dla stężenia początkowego nadtlenu wodoru $0,0335 \text{ mol/dm}^3$ w czasie krótszym od jednej minuty, pomijając tym samym zjawisko dezaktywacji. Rio i wsp. [148] rozszerzyli zakres pomiaru elektrodą tlenową do stężenia nadtlenu wodoru poniżej $0,0335 \text{ mol/dm}^3$, poprzez wcześniejsze usunięcie tlenu z roztworu przy użyciu azotu. Stała K_M wyznaczona za pomocą elektrody tlenowej mieściła się w zakresie od $0,047$ do $0,19 \text{ mol/dm}^3$. Jej wartość zależała od doboru metody opracowania wyników prowadzonych doświadczeń. Porównując powyższe wartości z wartościami wyznaczonymi metodą przepływu ciągłego, zauważyć można, że wartości K_M wyznaczone przy pomocy elektrody tlenowej są około 5 do 22 razy mniejsze. Lardinois i wsp. [115] zastosowali także elektrodę tlenową do pomiaru szybkości rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę. Dla stężeń nadtlenu wodoru od $0,01$ do 2 mol/dm^3 użyli procedury pomiarowej która trwała 50 s.

Switala i Loewen [163] określali aktywność dla szesnastu katalaz (otrzymanych z różnych organizmów) przy użyciu elektrody tlenowej. Badanie prowadzono dla stężeń początkowych nadtlenu wodoru z zakresu od $0,06$ do 5 mol/dm^3 . Rozkład H_2O_2 nie przebiegał zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten dla całego przedziału stężeń H_2O_2 . W celu porównania właściwości katalaz, określono wartości stałej K_M , które mieściły się w przedziale od $0,067$ do $0,465 \text{ mol/dm}^3$. Niższe wartości K_M otrzymano dla katalaz o mniejszej masie cząsteczkowej podjednostek.

2.2.4. Wpływ temperatury na szybkość reakcji rozkładu H_2O_2

Szybkość reakcji rozkładu nadtlenu wodoru prowadzonej przy niskich stężeniach H_2O_2 opisuje rów. (2.13). W tym równaniu występuje stała kinetyczna k , której wartość zależy od temperatury. Wpływ jej opisany jest zależnością Arrheniusa:

$$k = k_{R0} \exp\left(-\frac{E_R}{RT}\right) \quad (2.15)$$

W tabeli 2-1 zamieszczono wartości energii aktywacji dla katalaz pochodzących z różnych materiałów biologicznych.

Tabela 2-1. Energie aktywacji dla reakcji rozkładu H_2O_2 przez katalazę

| Temperatura [°C] | E_R [kJ/ mol] | Rodzaj katalazy | Autor |
|------------------|------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| - | 2,50-7,10 | ludzkie erytrocyty | Aebi [1] |
| - | $8,80 \pm 1,00$ | wątroba wołowa | Ghadermarzi i Moosavi-Movahedi [60] |
| 5-60 | $14,40 \pm 3,50$ | wątroba wołowa | Tukel i Alptekin [177] |
| 5-25 | 19,84 | grzybowa immobilizowana | Altomare i wsp. [5] |
| 13-30 | $3,76 \pm 0,21$ | bakteryjna | Jones i Suggett [96,97] |

Wśród katalaz pochodzących z różnych źródeł najniższą wartość energii aktywacji reakcji rozkładu nadtlenu wodoru miała katalaza z ludzkich erytrocytów. Dla pozostałych katalaz wartości energii reakcji są z zakresu od 8 do 20 kJ/mol. Wartości te są niewielkie, w porównaniu z typowymi energiami aktywacji reakcji enzymatycznych, wynoszącymi od 21 kJ/mol do 63 kJ/mol [105].

Szybkość reakcji enzymatycznej wzrasta ze wzrostem temperatury zgodnie z równaniem Arrheniusa ale tylko w pewnym zakresie. W wyższych temperaturach szybkość reakcji rośnie, ale pojawia się równocześnie dezaktywacja białka enzymu. Dezaktywacja jest na tyle znacząca, iż następuje gwałtowny spadek szybkości reakcji. Krzywa zależności aktywności enzymatycznej od temperatury, posiada charakterystyczne maksimum, przy którym szybkość katalizowanej reakcji jest największa w optymalnej temperaturze T_{opt} . Wartości optymalnych temperatur dla katalaz są w zakresie od 15°C do 90°C. Optymalną temperaturą 15°C charakteryzuje się katalaza z *Penicillium cyclopium* [52], natomiast 90°C posiadają katalazy z *Pyrobaculum calidifontis* [2] oraz *Thermus brockianus* [171]. Dla katalazy wołowej optymalną temperaturą jest 30-35°C [62, 177].

Producenci preparatów handlowych zawierających katalazę deklarują optymalne temperatury w zakresie od 30°C do 60°C (Tabela 1-6). Większość przedstawionych preparatów katalazy osiąga najwyższą aktywność w temperaturze 50-60°C. Przykładowo katalaza *A. niger*

produkowana przez Asa-Enzyme [78], charakteryzuje się optymalną temperaturą 50°C przy pH=7. Także w zakresie temperatur od 20°C do 85°C enzym ten posiada aktywność powyżej 80%.

2.2.5. Wpływ pH na szybkość reakcji rozkładu H₂O₂

Katalazy różnego pochodzenia wykazują większą lub mniejszą wrażliwość na pH środowiska. Większość katalaz zarówno pochodzenia zwierzęcego jak i mikrobiologicznego ma pH optymalne w zakresie od 6 do 7,5. Przykładowo Görenek i wsp. [62] dla katalazy wołowej określili optymalne pH równe 7. W środowisku kwaśnym pH 4 oraz zasadowym pH 9 aktywność katalazy wołowej spada o ponad połowę w porównaniu z aktywnością w pH optymalnym.

Katalaza *A. niger* wykazuje aktywność maksymalną w pH w zakresie od 6,7 do 7,5 [6,75,169,185]. W środowisku kwaśnym pH 4 oraz zasadowym pH 9 aktywność spada o około 20%. Można zatem stwierdzić, iż katalaza wołowa jest bardziej wrażliwa od katalazy grzybowej.

Katalazą która charakteryzuje się szerokim zakresem pH jest katalaza z *Escherichia coli*. Jej dwie formy wykazują dwa różne optymalne pH: jedno w pH 6,8 a drugie w pH 10,5 [124]. Zatem określono optymalne pH dla katalaz w zakresie od 5 do 11 [124,172].

Dla zastosowań przemysłowych poszukuje się katalaz odpornych na warunki alkaliczne. Katalaza *A. niger* produkowana przez Asa-Enzyme [78] spełnia to założenie. Charakteryzuje się optymalną aktywnością dla szerokiego zakresu pH od 5 do 9. W bardziej kwaśnym środowisku reakcji pH 3,5 aktywność enzymu spada do 60% aktywności w porównaniu z aktywnością w pH optymalnym.

3. Kinetyka dezaktywacji enzymów

Dezaktywacja enzymów w czasie trwania procesu zwiększa koszt jednostkowy produktu, dlatego poznanie czynników wywołujących dezaktywację jest niezbędne do właściwego doboru warunków procesowych. Czynniki wpływającymi na zmniejszenie się aktywności enzymu mogą być: temperatura, pH, substraty, produkty lub inne składniki mieszaniny reakcyjnej a także naprężenia ścinające. Dezaktywacja enzymów spowodowana naprężeniami ścinającymi, następuje w warstwie monomolekularnej otaczającej pęcherzyki powietrza (pianie), powstającej w dużych ilościach podczas homogenizacji tkanek, intensywnym mieszaniu roztworów lub ich przelewaniu [188].

Dezaktywacja enzymów jest procesem bardzo złożonym, nawet wtedy, gdy jego przebieg opisują proste równania [70]. Mozhaev i Martinek [131] określili, że w trakcie dezaktywacji może występować między innymi agregacja, dysocjacja na podjednostki i denaturacja.

Stosując różne metody spektroskopowe (absorpcji promieniowania elektromagnetycznego) tj. fluorescencji [191,196], analizy światła rozproszonego [144,159,196,204], elektroforezy [47] a także analizy termicznej [47,146] obserwuje się zmiany makromolekularne struktury biologicznie aktywnej, dostarczające informacji o aktywności enzymu.

Wpływ różnych czynników na dezaktywację został dokładnie opisany w opracowaniach Lenckiego i wsp. [117,118]. Najczęściej badania dezaktywacji są zgodne z pierwszorzędowym modelem kinetycznym, wprost wyjaśniającym zniszczenie struktury przestrzennej enzymu dezaktywowanego i wiązania enzym-substrat [118]. Lencki i wsp. przedstawili dezaktywację jako proces złożony z kilku reakcji uwzględniających dysocjację, denaturację, agregację, koagulację i chemiczny rozkład.

Jeżeli podczas dezaktywacji enzymu obserwuje się spełnienie modelu pierwszorzędowego, wówczas szybkość dezaktywacji uwzględnia jedno z wyżej wymienionych zjawisk [117]. Jeżeli szybkość dezaktywacji opisywana jest modelem nieliniowym [118], wówczas dezaktywacja spowodowana jest działaniem kilku czynników – model dezaktywacji wieloetapowej [63,71,72,150]. Analiza takiej dezaktywacji polega na oddzieleniu poszczególnych etapów i wpływu różnych czynników.

Opracowano wiele teorii opisujących dezaktywację. Różniły się one przede wszystkim terminologią, oraz założeniami początkowymi. Próbowano powiązać różne możliwe teorie dezaktywacji i stworzyć ogólną teorię przedstawiającą model matematyczny. Uogólniona teoria dezaktywacji dostarcza wgląd w strukturę enzymu. Poznanie mechanizmów dezaktywacji

enzymów w postaci odwracalnych i nieodwracalnych reakcji złożonych, ma na celu poprawić wykorzystanie enzymów jako biokatalizatorów [205].

3.1. Dezaktywacja termiczna enzymów

Temperatura jest jednym z czynników wpływających na dezaktywację enzymów. Zjawisko dezaktywacji uwidacznia się wyraźnie w pobliżu temperatury optymalnej, chociaż zachodzi ono także w znacznie niższych temperaturach. Prosty mechanizmy dezaktywacji oparty na zmianie konformacji cząsteczek enzymu, przedstawili najpierw Lumry i Eyring [120]. W latach 80. XX wieku ukazało się wiele publikacji odnoszących się do różnych modeli dezaktywacji [56, 57, 69, 70].

3.1.1. Jednostopniowy schemat dezaktywacji nieodwracalnej

Najczęściej dezaktywację termiczną enzymu przedstawia się jako nieodwracalne przejście formy aktywnej E w formę nieaktywną D



Dla kinetyki dezaktywacji pierwszego rzędu, zmianę stężenia aktywnego enzymu C_E opisuje następujące równanie różniczkowe:

$$\frac{dC_E}{dt} = -k_{DT}C_E \quad (3.2)$$

W chwili początkowej $t=0$ stężenie enzymu wynosi C_{E0} a jego zmianę w czasie można uzyskać po scałkowaniu rów. (3.2). Doświadczalne wyznaczenie stężenia aktywnego enzymu jest praktycznie niemożliwe, dlatego powszechnie wprowadza się pojęcie aktywności względnej $a = C_E / C_{E0}$. Po uwzględnieniu aktywności względnej w rów. (3.2) i rozdzieleniu zmiennych uzyskuje się rozwiązanie dla warunku początkowego $a(t=0) = 1$ opisujące zmianę aktywności w czasie:

$$a = \exp(-k_{DT}t) \quad (3.3)$$

Stała k_{DT} zależy od temperatury i do jej opisu zwykle stosuje się równanie Arrheniusa:

$$k_{DT} = k_{(DT)0} \exp\left(-\frac{E_{DT}}{RT}\right) \quad (3.4)$$

Jednym z ważnych zagadnień praktycznych jest wyznaczenie stałych występujących w rów. (3.4).

Typowy sposób wyznaczania stałych $k_{(DT)0}$ i E_{DT}

Stałe równania (3.4) $k_{(DT)0}$ i E_{DT} wyznacza się zazwyczaj na podstawie pomiarów szybkości dezaktywacji enzymu w określonych temperaturach z zakresu, w którym obserwuje się dezaktywację termiczną. Dla każdej z temperatur wyznacza się najpierw stałe k_{DT} szybkości dezaktywacji na podstawie równ. (3.3). Następnie korzystając ze zlogarytmowanej postaci równ. (3.4) i przy wykorzystaniu metody najmniejszych kwadratów oblicza się wartości stałych $k_{(DT)0}$ i E_{DT} . Ten sposób postępowania stosowano do wyznaczania parametrów dezaktywacji termicznej wielu enzymów m.in. katalazy wołowej [101], peroksydazy [121] oraz fosfatazy alkalicznej [186].

Wyznaczanie stałych $k_{(DT)0}$ i E_{DT} przy pomocy zlogarytmowanej postaci równ. (3.4) budzi wiele kontrowersji [19, 108, 154, 161], ze względu na silną korelację pomiędzy parametrami $k_{(DT)0}$ i E_{DT} . W celu zmniejszenia korelacji pomiędzy parametrami w równ. (3.4) wprowadza się temperaturę odniesienia T_{od} . Wówczas równ. (3.4) przyjmuje następującą postać:

$$k_{DT} = k_{D,Tod} \exp \left[\frac{E_{DT}}{R} \left(\frac{1}{T_{od}} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad (3.5)$$

gdzie: T_{od} - temperatura odniesienia [K],

E_{DT} - energia aktywacji procesu dezaktywacji termicznej [kJ/mol],

k_{DT} - szybkość dezaktywacji termicznej w temperaturze T [1/min],

$k_{D,Tod}$ - stała szybkości dezaktywacji termicznej w temperaturze odniesienia T_{od} [1/min].

Gdy stała k_{DT} opisana jest równ. (3.5) wówczas zmianę aktywności enzymu można opisać następującą zależnością:

$$a_i = \exp \left[-k_{D,Tod} \exp \left[\frac{E_{DT}}{R} \left(\frac{1}{T_{od}} - \frac{1}{T_j} \right) \right] t_i \right] \quad (3.6)$$

gdzie: i - numer pomiaru (0,1,2...n),

j - temperatura pomiaru [K].

Schwaab i Pinto [154] zakładając brak korelacji pomiędzy $k_{D,Tod}$ a E_{DT} otrzymali następującą zależność, pozwalającą określić optymalną temperaturę odniesienia:

$$-\frac{\partial a_i}{\partial k_{D,Tod}} \frac{\partial a_i}{\partial E_{DT}} = 0 \quad (3.7)$$

Natomiast pochodne cząstkowe $\frac{\partial a_i}{\partial k_{D,Tod}}$, $\frac{\partial a_i}{\partial E_{DT}}$ równ. (3.6) wynoszą odpowiednio:

$$\frac{\partial a_i}{\partial k_{D, \text{Tod}}} = \frac{\ln(a_i)}{k_{D, \text{Tod}}} \quad (3.8a)$$

$$\frac{\partial a_i}{\partial E_{DT}} = \left(\frac{1}{T_{od}} - \frac{1}{T_i} \right) \frac{\ln(a_i)}{R} \quad (3.8b)$$

Użycie równań (3.7), (3.8a) i (3.8b) pozwala określić temperaturę odniesienia T_{od} w postaci:

$$T_{od} = \frac{\sum_{i=0}^n (\ln(a_i))^2}{\sum_{i=0}^n \frac{(\ln(a_i))^2}{T_i}} \quad (3.9)$$

Użycie tak zdefiniowanej wartości T_{od} pozwala określić stałe procesu dezaktywacji termicznej tj: przedwykładniczą stałą szybkości dezaktywacji $k_{(DT)0}$ oraz energię aktywacji procesu dezaktywacji termicznej E_{DT} z najmniejszym statystycznie błędem.

Alternatywny sposób wyznaczania stałych $k_{(DT)0}$ i E_{DT}

Zaproponowano [128] nowy sposób wyznaczenia parametrów kinetycznych, który opiera się na doświadczalnej zmianie aktywności enzymu w zależności od temperatury. Wyznaczenie parametrów kinetycznych dezaktywacji termicznej przy użyciu tej metody nie wymaga prowadzenia czasochłonnych pomiarów zmian aktywności enzymu w czasie, w określonych temperaturach.

Reakcję enzymatyczną Michaelisa-Menten, przy dużych wartościach stężenia substratu $C_S \gg K_M$ opisuje zależność:

$$\frac{dC_P}{dt} = -\frac{dC_S}{dt} = -k_2 C_E \quad (3.10)$$

W chwili początkowej $C_E(t=0) = C_{E0}$.

Szybkość dezaktywacji enzymu dla jedностopniowej dezaktywacji nieodwracalnej ma postać rów. (3.2). Z tego równania po uwzględnieniu aktywności względnej enzymu, zależności arrheniusowskiej oraz całkowaniu określono zmianę aktywności enzymu w czasie t dla którego prowadzono oznaczenie:

$$a = \exp \left[-k_{(DT)0} \left[\exp \left(-\frac{E_{DT}}{RT} \right) \right] t \right] \quad (3.11)$$

Dokonując kolejnych przekształceń otrzymamy wyrażenie opisujące zmianę stężenia produktu w zależności od temperatury:

$$C_p = \frac{k_{(2)0} C_{E0}}{k_{(DT)0}} \exp\left(\frac{E_{DT} - E_R}{RT}\right) \left\{ 1 - \exp\left[-\beta \exp\left(-\frac{E_{DT}}{RT}\right)\right] \right\} \quad (3.12)$$

gdzie: $\beta = k_{(DT)0} t$

Wprowadzając wartość maksymalnego stężenia produktu C_{Pmax} wraz z temperaturą optymalną T_{opt} zdefiniowano aktywność enzymu a , jako iloraz stężenia produktu C_p do jego maksymalnego stężenia C_{Pmax} . Tak zdefiniowana aktywność enzymu przyjmuje postać:

$$a = \frac{\exp\left(\frac{(E_{DT} - E_R)(T_{opt} - T)}{RTT_{opt}}\right) \left\{ 1 - \exp\left[-\beta_1 \exp\left(\frac{E_{DT}(T - T_{opt})}{RTT_{opt}}\right)\right] \right\}}{1 - \exp(-\beta_1)} \quad (3.13)$$

$$\text{gdzie: } \beta_1 = k_{(DT)0} \left[\exp\left(-\frac{E_{DT}}{RT_{opt}}\right) \right] t = k_{DTopt} t \quad (3.13a)$$

W równaniu (3.13) występują cztery stałe: energia aktywacji reakcji E_R , energia aktywacji dezaktywacji E_{DT} , temperatura optymalna T_{opt} , i parametr β_1 opisany zależnością (3.13a). Liczbę stałych do wyznaczenia można zmniejszyć, korzystając z definicji temperatury optymalnej. W tej temperaturze uzyskujemy aktywność maksymalną. Zatem po obliczeniu pochodnej aktywności względem temperatury i przyrównaniu do zera otrzymano:

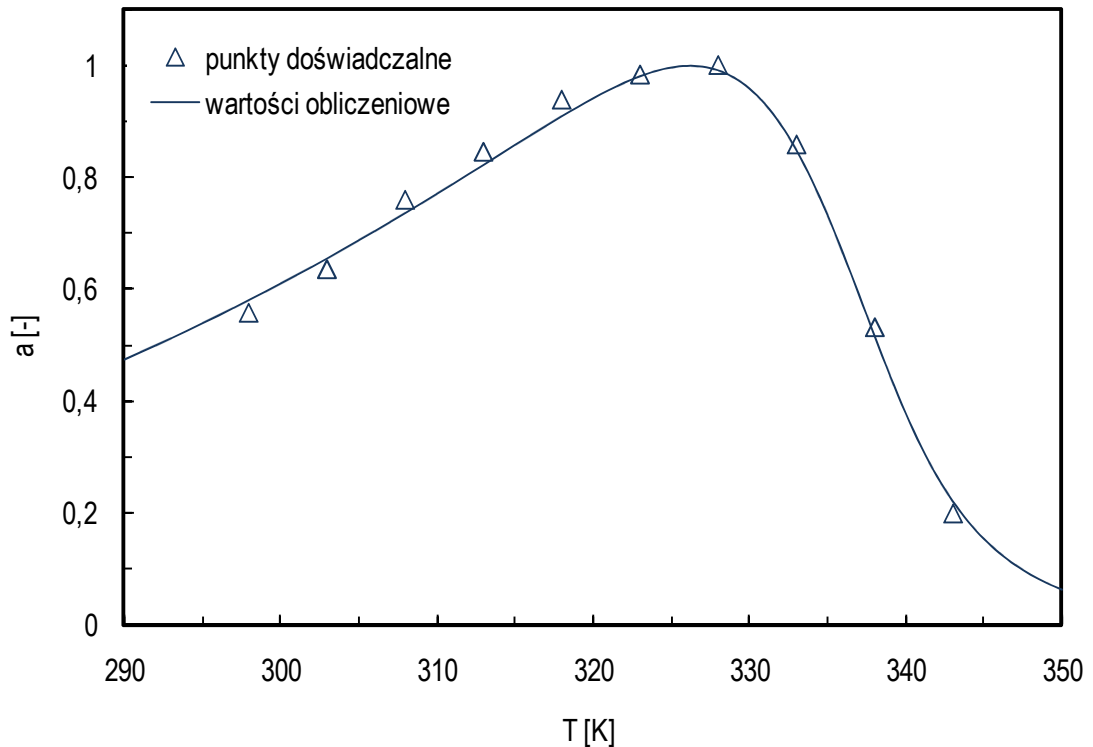
$$E_{DT} - E_R = \frac{E_{DT} \beta_1}{\exp(\beta_1) - 1} \quad (3.14)$$

Równanie (3.13) po uwzględnieniu zależności (3.14) przyjmuje postać:

$$a = \frac{\exp\left(\frac{(T_{opt} - T)}{RTT_{opt}} \frac{E_{DT} \beta_1}{\exp(\beta_1) - 1}\right) \left\{ 1 - \exp\left[-\beta_1 \exp\left(\frac{E_{DT}(T - T_{opt})}{RTT_{opt}}\right)\right] \right\}}{1 - \exp(-\beta_1)} \quad (3.15)$$

Identyfikację parametrów β_1 , T_{opt} i E_{DT} w rów. (3.15) przeprowadzono dla oksydazy fenolowej [156], a w obliczeniach zastosowano procedurę Levenberga-Marquardta [141]. Dla znanych parametrów β_1 , T_{opt} i doświadczalnego czasu pomiaru aktywności t obliczono następnie $k_{(DT)0}$ z rów. (3.13a). Zaletą tej metody jest możliwość wyznaczenia dodatkowo energii aktywacji E_R z zależności (3.14). Przebieg zmian aktywności obliczonej w porównaniu z aktywnością doświadczalną przedstawia rys. 3-1.

Dysponując danymi literaturowymi zmian aktywności od temperatury, można dla innych enzymów określić stałe procesu dezaktywacji termicznej.



Rys. 3-1. Zmiana aktywności oksydazy fenolowej w zależności od temperatury. Wartości obliczonych stałych wynoszą: $T_{opt} = 326,2 \text{ K}$; $\beta_1 = 0,18$; $E_R = 18,28 \text{ kJ/mol}$; $E_{DT} = 199,2 \text{ kJ/mol}$ [128].

3.1.2. Złożone mechanizmy dezaktywacji termicznej

W wielu analizowanych przypadkach dezaktywacji enzymów nie potwierdza się jednostopniowy mechanizm dezaktywacji nieodwracalnej. Dezaktywacja może przebiegać według złożonych mechanizmów. Henley i Sadana [70-72] oraz Polakovič i Vrabel [142,183,184] podjęli próby uogólnienia procesów dezaktywacji przedstawiając te same modele, różniące się w istocie jedynie oznaczeniami. Henley i Sadana sformułowali najpierw ogólny schemat dezaktywacji, który po odpowiednich uproszczeniach prowadzi do szczególnych przypadków dezaktywacji. Natomiast Polakovič i Vrabel jako punkt wyjścia przyjęli jednostopniowy mechanizm dezaktywacji nieodwracalnej, który nazwali mechanizmem I poziomu. Kolejne mechanizmy dezaktywacji nosiły nazwę mechanizmów II poziomu, które następnie rozwijali, formułując coraz to bardziej złożone mechanizmy dezaktywacji III i IV poziomu.

Zarówno u Henley i Sadany jak i Polakoviča i Vrabela występują następujące założenia:

- pojedynczy etap przebiegu reakcji w każdym z mechanizmów jest opisany pierwszorzędowym równaniem kinetycznym,
- aktywność jest wprost proporcjonalna do stężenia aktywnej formy enzymu [11].

Aktywność enzymu jest określana poprzez szybkość reakcji enzymatycznej w danych warunkach. Całkowita aktywność enzymu A, jest sumą aktywnych form enzymu:

$$A = \sum_i a_i = \sum_i \gamma_i C_i \quad (3.16)$$

gdzie: γ_i - molarna aktywność będąca funkcją stężenia substratu C_s , temperatury T, pH oraz innych czynników,

C_i - stężenie molowe aktywnej formy enzymu.

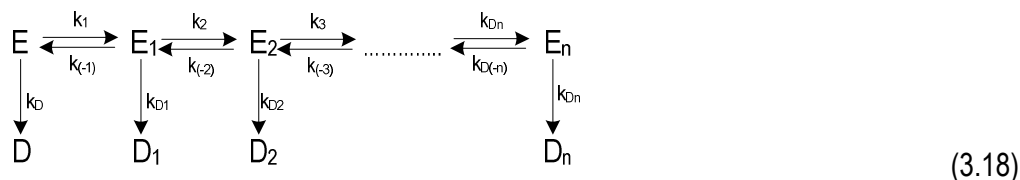
Aktywność enzymu przedstawiono w postaci bezwymiarowej jako zależność:

$$a = \frac{A}{A_0} = \frac{\sum_i \gamma_i C_i}{\sum_i \gamma_i C_{i0}} \quad (3.17)$$

gdzie: C_{i0} - początkowe stężenie molowe aktywnej formy enzymu.

3.1.2.1. Ujednoczona teoria dezaktywacji Hanleya i Sadany

Henley i Sadana [70] przedstawili ogólny mechanizm dezaktywacji, w którym enzymu natywny E, może przechodzić odwracalnie w formy pośrednie E_1, E_2, \dots, E_n . Przejścia te mogą być w szczególnych przypadkach nieodwracalne. Każda forma podlega dezaktywacji nieodwracalnej do formy D_i . Stosując oznaczenia przyjęte w niniejszej pracy mechanizm dezaktywacji Henleya i Sadany można przedstawić w następującej postaci:



gdzie: k_i i k_{-i} - pierwszorzędowe stałe szybkości reakcji ($i = 1, 2, \dots, n$),

k_D, k_{Di} - pierwszorzędowe stałe szybkości dezaktywacji nieodwracalnej,

E - natywna forma enzymu,

E_i - przejściowa forma enzymu o określonej aktywności,

D, D_i - zdezaktywowana forma enzymu.

Bezwymiarowa aktywność formy pośredniej a_i zdefiniowana jest jako iloraz aktywności formy E_i i aktywności formy początkowej E. Ogólny model matematyczny dla aktywności enzymu a przyjmuje postać:

$$a = C_1 \exp(-\eta_1 t) + C_2 \exp(-\eta_2 t) + \dots + C_n \exp(-\eta_n t) \quad (3.19)$$

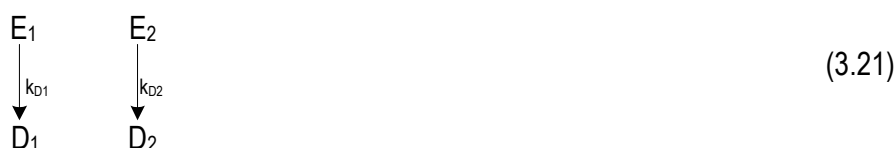
gdzie C_i - stałe całkowania, a $\eta_i = f(k_i, k_{-i}, k_D, k_{Di})$.

Z ogólnego mechanizmu (3.18), przyjmując pewne uproszczenia, można otrzymać kolejne mechanizmy dezaktywacji:

- następczej, zakładając iż reakcje są nieodwracalne ($k_{(-1)}=0$; $k_{(-2)}=0$) oraz brak jest dezaktywacji form przejściowych enzymu ($k_D = 0$; $k_{D1} = 0$)



- równoległej dla izoenzymów, przy założeniu występowania aktywnych form enzymu, których dezaktywacja następuje niezależnie od siebie



- równoległej dla pojedynczej formy enzymu natywnego przy założeniu, iż dezaktywacja przebiega w kilku różnych etapach



- szeregowo - równoległej, przy założeniu iż każdy z etapów dezaktywacji, przebiega dwuetapowo, prowadząc do otrzymania w pierwszym etapie form pośrednich będących we wzajemnej równowadze chemicznej, które w drugim etapie ulegają zdezaktywowaniu



Brak możliwości zidentyfikowania eksperymentalnie aktywnych form pośrednich enzymu, ogranicza możliwości zastosowania teorii Henleya i Sadany.

3.1.2.2. Ujednolicona teoria dezaktywacji Polakoviča i Vrábła

Prosty jednostopniowy schemat dezaktywacji nieodwracalnej, przedstawiony w rozdziale 3.1.1 jest podstawą ujednoliconej teorii dezaktywacji Polakoviča i Vrábła [142]. Autorzy określili go schematem dezaktywacji I poziomu. Bardziej złożone mechanizmy dezaktywacji, podzielili na

kolejne poziomy dezaktywacji II, III lub IV. Analizując pod względem statystycznym dane literaturowe aktywności wybranych enzymów, określili poziom, według którego zachodzi dezaktywacja. W przypadku, gdy analizowane są pomiary aktywności enzymu dla jednej temperatury, zgodność statystyczną otrzymali dla kilku poziomów dezaktywacji. Właściwe określenie schematu dezaktywacji jest więc utrudnione. Rozwiązaniem tego problemu są pomiary szybkości dezaktywacji, prowadzone w kilku temperaturach. W takim przypadku można ocenić zgodność dezaktywacji z mechanizmem odpowiedniego poziomu.

Dezaktywacja według II poziomu

Polakovič i Vrábek do schematów dezaktywacji II poziomu zaliczyli trzy przypadki (tabela 3-1), w których:

- forma aktywna E_1 przechodzi w sposób odwracalny w formę zdezaktywowaną D ,
- forma aktywna E_1 przechodzi w sposób odwracalny w drugą formę aktywną E_2 ,
- forma aktywna E_1 przechodzi w sposób nieodwracalny w drugą formę aktywną E_2 .

Tabela 3-1. Wartości stałych b_1 i d_1 dla II poziomu dezaktywacji [142]

| Oznaczenie mechanizmu | Mechanizm | b_1 | d_1 |
|-----------------------|--|---|----------------------|
| II A | $E_1 \xrightleftharpoons[k_{D(-1)}]{k_{D1}} D$ | $\frac{k_{D1}}{k_{D1} + k_{D(-1)}}$ | $k_{D1} + k_{D(-1)}$ |
| II B | $E_1 \xrightleftharpoons[k_{D(-1)}]{k_{D1}} E_2$ | $\frac{k_{D1}}{k_{D1} + k_{D(-1)}} \left(1 - \frac{Y_1}{Y_{-1}}\right)$ | $k_{D1} + k_{D(-1)}$ |
| II C | $E_1 \xrightarrow{k_{D1}} D_1$ | $\left(1 - \frac{Y_1}{Y_{-1}}\right)$ | k_{D1} |

Analizę pierwszego przypadku dezaktywacji II poziomu (IIA), przytoczono poniżej, by zilustrować metodykę matematycznej analizy schematów dezaktywacji. Mechanizm przebiega w następujący sposób:



gdzie: k_{D1} , $k_{D(-1)}$ - stałe szybkości reakcji.

Na podstawie mechanizmu (3.24) równania określające zmianę stężenia enzymu natywnego oraz enzymu zdezaktywowanego przyjmują następującą postać:

$$\frac{dC_{E1}}{dt} = -k_{D1}C_{E1} + k_{D(-1)}C_D \quad (3.25a)$$

$$\frac{dC_D}{dt} = k_{D1}C_{E1} - k_{D(-1)}C_D \quad (3.25b)$$

Korzystając z definicji aktywności względnych $a = C_{E1}/C_{E0}$ i $a_1 = C_D/C_{E0}$ rów. (3.25a) i (3.25b) można przekształcić do postaci:

$$\frac{da}{dt} = -k_{D1}a + k_{D(-1)}a_1 \quad (3.26a)$$

$$\frac{da_1}{dt} = k_{D1}a - k_{D(-1)}a_1 \quad (3.26b)$$

z warunkami początkowymi: $a(t=0) = 1$ oraz $a_1(t=0) = 0$.

Układ równań różniczkowych (3.26a) i (3.26b) rozwiązano wyznaczając z rów. (3.26a) zależność określającą aktywność a_1 formy zdezaktywowanej D:

$$a_1 = \frac{1}{k_{D(-1)}} \frac{da}{dt} + \frac{k_{D1}}{k_{D(-1)}} a \quad (3.27)$$

Obliczono pochodną $\frac{da_1}{dt}$ i po podstawieniu do rów. (3.26b) otrzymano równanie różniczkowe drugiego rzędu:

$$\frac{d^2a}{dt^2} + (k_{D1} + k_{D(-1)}) \frac{da}{dt} = 0 \quad (3.28)$$

Poprzez podstawienie $X = \frac{da}{dt}$, otrzymano równanie kwadratowe w postaci:

$$X^2 + (k_{D1} + k_{D(-1)})X = 0 \quad (3.28a)$$

Rozwiązaniem rów. (3.28a) są dwa pierwiastki: $X_1 = 0$ oraz $X_2 = -(k_{D1} + k_{D(-1)})$. Przy założeniu że $X \neq 0$ zmiana aktywności enzymu a jest wyrażona równaniem w postaci ogólnej:

$$a = C_1 \exp(X_2 t) + C_2 \quad (3.29)$$

w którym C_1, C_2 są stałymi całkowania.

Z równania (3.29) obliczono pochodną $\frac{da}{dt}$, po podstawieniu otrzymanej zależności oraz wyrażenia opisanego rów. (3.29) do rów. (3.27), na podstawie warunków początkowych $a_1(t=0) = 0$, określono wartości C_1 i C_2 :

$$C_1 = \frac{k_{D1}}{k_{D1} + k_{D(-1)}} \quad (3.30a)$$

$$C_2 = 1 - \frac{k_{D1}}{k_{D1} + k_{D(-1)}} \quad (3.30b)$$

Zmiana aktywności względnej enzymu w czasie t przyjmuje ostatecznie postać:

$$a = \frac{k_{D(-1)}}{k_{D1} + k_{D(-1)}} + \frac{k_{D1}}{k_{D1} + k_{D(-1)}} \exp[-(k_{D1} + k_{D(-1)})t] \quad (3.31)$$

Pomiary zmiany aktywności w wyniku dezaktywacji termicznej, zgodne z mechanizmem (3.24) pozwalają na wyznaczenie wartości dwóch stałych szybkości dezaktywacji k_{D1} oraz $k_{D(-1)}$ na podstawie rów. (3.31).

Analizy matematyczne pozostałych mechanizmów II (IIB i IIC), III i IV poziomu dezaktywacji przebiegają podobnie jak przedstawiono to powyżej. Dla II poziomu dezaktywacji Polakovič

i Vrábek [142] zaprezentowali ogólne równanie opisujące zmianę aktywności w czasie:

$$a = (1 - b_1) + b_1 \exp(-d_1 t) \quad (3.32)$$

w którym stałe b_1, d_1 w zależności od mechanizmu dezaktywacji, opisują równania przedstawione w tabeli 3-1. Wartość b_1 może zależeć od dwóch lub czterech stałych, natomiast stała d_1 zależy od stałej szybkości dezaktywacji k_{D1} lub sumy k_{D1} i $k_{D(-1)}$.

Jeżeli zmiana aktywności enzymu określana jest w długim okresie czasu ($t \rightarrow \infty$), a w końcowym jego etapie pomiarów, aktywność jest stała, to wówczas dezaktywacja enzymu przebiega według poziomu II. Zgodnie z rów. (3.32), przy bardzo długich czasach pomiaru, aktywność enzymu opasana jest zależnością: $a = 1 - b_1$.

Dezaktywacje termiczne przebiegające według mechanizmów II poziomu stosowane są do opisu enzymów endogennych [11] zawartych w produktach spożywczych pochodzenia roślinnego. Podczas przechowywania tych produktów, enzymy endogenne wpływają na zmianę właściwości użytkowych produktów (brązowienie enzymatyczne). W celu wyeliminowania tego efektu, żywność poddana jest w krótkim okresie czasu wpływowi wysokiej temperatury.

Zgodnie z mechanizmem II B przebiega dezaktywacja termiczna acylazy penicylinowej w temperaturze 40°C oraz ureazy w temperaturach 45°C i 50°C [142]. Do enzymów, których dezaktywacja termiczna przebiega zgodnie z mechanizmami II C poziomu należą:

- lucyferaza (enzym katalizujący utlenianie lucyferyny, której towarzyszy bioluminescencja) dezaktywowana w temperaturze 40°C,
- izomeraza glukofosforanowa dezaktywowana w temperaturach 45°C i 50°C,
- fosfataza kwaśna dezaktywowana w 60°C [142].

Jeżeli podczas dezaktywacji następuje całkowita utrata aktywności enzymu, nie rozpatrujemy jej jako przebiegającej według mechanizmów II poziomu dezaktywacji. W takim przypadku dezaktywacja zachodzi według III poziomu.

Dezaktywacja według III poziomu

Mechanizm dezaktywacji III poziomu brany jest pod uwagę wówczas, gdy podczas pomiarów aktywności enzymu zauważa się całkowitą utratę jego aktywności, a dezaktywacja nie przebiega według jednostopniowego mechanizmu. Wśród mechanizmów dezaktywacji III poziomu są reakcje przebiegające w dwóch etapach. W pierwszym z etapów forma aktywna E_1 przechodzi odwracalnie lub nieodwracalnie w drugą formę aktywną E_2 , lub formę nieaktywną D_1 . Natomiast w drugim z etapów produkt etapu pierwszego (E_2 lub D_1) przechodzi nieodwracalnie w formę odpowiednio nieaktywną D lub D_2 , bądź też formy aktywne E_1 i E_2 równolegle przechodzą w formy dezaktywowane.

Polakovič i Vrábel [142] wyróżnili sześć modeli dezaktywacji (Tabela 3-2), opisanych ogólną zależnością zmiany aktywności względnej w czasie:

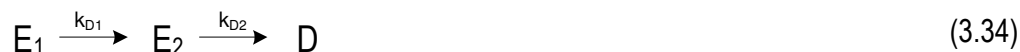
$$a = b_2 \exp(-d_3 t) + (1 - b_2) \exp(-d_4 t) \quad (3.33)$$

w którym stałe b_2 , d_3 oraz d_4 uzależnione są od stałych szybkości dezaktywacji.

Tabela 3-2. Mechanizmy III poziomu dezaktywacji enzymu wg Polakoviča i Vrábla [142]

| Oznaczenie mechanizmu | Mechanizm |
|-----------------------|---|
| III A1 | $E_1 \rightleftharpoons D_1 \longrightarrow D_2$ |
| III A2 | $E_1 \rightleftharpoons D_1 \quad E_1 \longrightarrow D_2$ |
| III B | $E_1 \longrightarrow E_2 \longrightarrow D$ |
| III C1 | $E_1 \begin{matrix} \rightleftharpoons E_2 \\ \longrightarrow D \end{matrix}$ |
| III C2 | $E_1 \rightleftharpoons E_2 \longrightarrow D$ |
| III D | $E_1 \longrightarrow D_1 \quad E_2 \longrightarrow D_2$ |

Najczęściej spotykanymi w literaturze mechanizmami III poziomu dezaktywacji są trzy przypadki: III B, III C2 i III D. W mechanizmie III B forma aktywna E_1 przechodzi w sposób nieodwracalny w drugą formę aktywną E_2 , która następnie przechodzi w sposób nieodwracalny w formę nieaktywną D.



W przypadku, gdy $k_{D1} \neq k_{D2}$ mechanizm ten rozważali teoretycznie Gianfreda i wsp. [57], Henley i Sadana [69,150] oraz Szewczyk [164]. Wartości stałych b_2 , d_3 i d_4 w rów. (3.33) wynoszą odpowiednio:

$$b_2 = \frac{k_{D2}}{k_{D2} - k_{D1}}, \quad d_3 = k_{D1}, \quad d_4 = k_{D2} \quad (3.34a)$$

Warto zwrócić uwagę na to, że mechanizm III B jest szczególnym przypadkiem mechanizmu dezaktywacji III C2, gdy nie występuje przejście $E_2 \xrightarrow{k_{D(-1)}} E_1$

Na podstawie danych literaturowych Polakovič i Vrabel [142], potwierdzili występowanie mechanizmu III B dla następujących enzymów:

- kalikreiny dezaktywowanej w zakresie temperatur od 45°C do 60°C [196],
- kwaśnej fosfatazy dezaktywowanej w temperaturze 45°C [57],
- ureazy dezaktywowanej w zakresie temperatur od 45°C do 52,5°C [118].

Według mechanizmu III B przebiega również dezaktywacja termiczna β -galaktozydazy z *Kluyveromyces fragilis* w zakresie temperatur od 25°C do 50°C [113].

Mechanizm dezaktywacji III C2 to tzw. mechanizm Lumry i Eyringa [120], w którym enzymem natywnym E_1 , przechodzi w formę aktywną E_2 (pozostającą w równowadze z formą E_1), która następnie ulega dezaktywowaniu do formy D. Mechanizm ten analizowali także Henley i Sadana [70] przedstawiając kinetykę dezaktywacji glukoamylazy [36,143] oraz proteinyazy [153]. Enzymem dezaktywującym się według mechanizmu III C2 jest β -galaktozydaza [100].

W mechanizmie III D natywna forma enzymu składa się dwóch izoenzymów E_1 i E_2 , które ulegają dezaktywacji do D_1 i D_2 według jednostopniowych, nieodwracalnych reakcji.



W tym mechanizmie występują dwa izoenzymy, różniące się odpornością na działanie temperatury. Każda z nich ulega przekształceniu z charakterystyczną dla siebie stałą szybkości dezaktywacji [11]. Z kinetycznego punktu widzenia, mechanizm III D jest najprostszym wśród innych mechanizmów dezaktywacji III poziomu. Rozważany mechanizm został opisany przez Grego i Gianfredę [63], Lenckiego i wsp. [118], oraz Polakoviča i Vrabla [142]. W ogólnym

równaniu dla poziomu III (rów. (3.33)), w mechanizmie III D stałe d_3 , d_4 powiązane są ze stałymi kinetycznymi:

$$d_3 = k_{D1}, \quad d_4 = k_{D2} \quad (3.35a)$$

a stała b_2 odpowiada początkowemu udziałowi izoenzymów E_1 i E_2 .

Przedstawione powyżej przypadki dezaktywacji III poziomu nie wyczerpują wszystkich możliwych mechanizmów. Aymard i Belardi [11] przedstawili pomiary dezaktywacji enzymów przebiegające według mechanizmów III A1, III A2. Natomiast Strambini i Gonnelli [157] rozpatrywali mechanizm III C1 podczas badań dezaktywacji dehydrogenazy alkoholowej.

Nowym mechanizmem identyfikowanym na podstawie rów. (3.33), a przebiegającym według dwóch reakcji nieodwracalnych analizowali Aymard i Belardini [11]. W pierwszej reakcji forma aktywna E_1 ulega dezaktywowaniu do formy D_1 , w drugiej reakcji forma aktywna E_1 przechodzi w formę aktywną E_2 , a następnie zostaje dezaktywowana do formy D_2 .



Od prawie trzydziestu lat, jeżeli pomiary aktywności enzymu opisać można było poprzez równanie z trzema parametrami, wówczas często mówiono o istnieniu izoenzymów. Jednak ze względu na to, iż tym samym rów. (3.33) możemy opisać różne mechanizmy dezaktywacji (Tabela 3-2), takie podejście budzi kontrowersje. Podczas identyfikacji mechanizmów dezaktywacji, na podstawie pomiarów doświadczalnych, najpierw stosuje się metodę z dopasowaniem trzech stałych. Jeżeli stałe ulegają zmianie w zmiennych warunkach pomiaru (np. stężenie enzymu, temperatura) w takich przypadkach można postawić hipotezę o dezaktywacji.

Dezaktywacja według IV poziomu

Wśród mechanizmów dezaktywacji IV poziomu występują mechanizmy dwuetapowe, w których w pierwszym etapie – odwracalnym lub nieodwracalnym – może powstać forma aktywna E_3 , natomiast w drugim etapie proces może przebiegać odwracalnie. W IV poziomie mechanizmów dezaktywacji występują cztery aktywne formy enzymu oraz dwie formy dezaktywowane (Tabela 3-3).

Zmianę aktywności enzymów ulegających dezaktywacji według mechanizmów IV poziomu, można opisać ogólną zależnością:

$$a = (1 - b_3 - b_4) + b_3 \exp(-d_5 t) + b_4 \exp(-d_6 t) \quad (3.37)$$

w której stałe b_3 , b_4 oraz d_5 , d_6 są skomplikowanymi funkcjami zależnymi od stałych szybkości dezaktywacji.

Mechanizm dezaktywacji IV poziomu w szczególności mechanizm IV B2, IV D3, IV D4 (Tabela 3-3) analizowali Ladero i wsp. [113] podczas badań dezaktywacji β -galaktozydazy z *Kluyveromyces fragilis* w zakresie temperatur od 25 °C do 50°C.

Polakovič i wsp. [142,181] określili na podstawie danych literaturowych, iż dezaktywacja termiczna następujących enzymów zgodna jest z mechanizmem IV B2:

- lucyferaza dezaktywowana w zakresie temperatur od 45°C do 50°C,
- celulaza dezaktywowana w temperaturze 50°C,
- inwertaza dezaktywowana w zakresie temperatur od 40°C do 60°C.

Tabela 3-3. Mechanizmy IV poziomu dezaktywacji enzymu wg Polakoviča i Vrabela [142]

| Oznaczenie mechanizmu | Mechanizm |
|-----------------------|--|
| IV A1 | $E_1 \rightleftharpoons D_1 \rightleftharpoons D_2$ |
| IV A2.1 | $E_1 \rightleftharpoons D_1; E_1 \longrightarrow E_2$ |
| IV A2.2 | $E_1 \rightleftharpoons D_1; E_1 \rightleftharpoons D_2$ |
| IV B1 | $E_1 \longrightarrow E_2 \rightleftharpoons D$ |
| IV B2 | $E_1 \longrightarrow E_2 \longrightarrow E_3$ |
| IV B3 | $E_1 \longrightarrow E_2 \rightleftharpoons E_3$ |
| IV C1.1 | $E_1 \rightleftharpoons E_2; E_1 \rightleftharpoons D$ |
| IV C1.2 | $E_1 \rightleftharpoons E_2; E_1 \longrightarrow E_3$ |
| IV C1.2 | $E_1 \rightleftharpoons E_2; E_1 \rightleftharpoons E_3$ |
| IV C2.1 | $E_1 \rightleftharpoons E_2 \rightleftharpoons D$ |
| IV C2.2 | $E_1 \rightleftharpoons E_2 \longrightarrow E_3$ |
| IV C2.3 | $E_1 \rightleftharpoons E_2 \rightleftharpoons E_3$ |
| IV D1 | $E_1 \rightleftharpoons D_1; E_2 \longrightarrow D_2$ |
| IV D2 | $E_1 \rightleftharpoons D_1; E_2 \rightleftharpoons D_2$ |
| IV D3 | $E_1 \longrightarrow E_3; E_2 \longrightarrow D$ |
| IV D4 | $E_1 \rightleftharpoons E_3; E_2 \longrightarrow D$ |
| IV D5 | $E_1 \longrightarrow E_3; E_2 \rightleftharpoons D$ |
| IV D6 | $E_1 \rightleftharpoons E_3; E_2 \rightleftharpoons D$ |
| IV D7 | $E_1 \longrightarrow E_3; E_2 \longrightarrow E_4$ |
| IV D8 | $E_1 \rightleftharpoons E_3; E_2 \longrightarrow E_4$ |
| IV D9 | $E_1 \rightleftharpoons E_3; E_2 \rightleftharpoons E_4$ |

3.2. Dezaktywacja termiczna katalaz

Dezaktywacja termiczna katalazy, nie była dotychczas przedmiotem systematycznych badań. W większości przypadków publikowane dane doświadczalne mają charakter jakościowy i ich celem jest jedynie wykazanie, że forma immobilizowana katalazy jest bardziej stabilna termicznie niż forma natywna. Przy takich porównaniach stosuje się dwa sposoby prowadzenia doświadczeń. W pierwszym przypadku wybiera się określoną stałą temperaturę, w której przetrzymuje się zarówno formę natywną i immobilizowaną, a następnie co pewien okres czasu mierzy się ich aktywności. Zwykle wybiera się przechowywanie w chłodziarce (temperatura 4-6°C) lub w warunkach otoczenia (temperatura 20-25°C). Jeżeli pomiary prowadzone są przez odpowiednio długi okres i aktywność zmniejszy się o ponad 50%, wówczas można na podstawie publikowanych wykresów oszacować czas połowicznego spadku aktywności. Wielkość ta jest powszechnie stosowana w enzymologii do oceny stabilności termicznej enzymów. Drugi sposób podejścia polega na przyjęciu określonego, stałego czasu przetrzymywania preparatów enzymatycznych i oznaczaniu aktywności przy różnych temperaturach dezaktywacji. Wyniki doświadczeń przedstawia się w postaci zależności aktywności od temperatury, w której przetrzymywano preparat enzymatyczny. Na podstawie takiego wykresu można odczytać temperaturę, w której nastąpił 50% spadek aktywności dla stosowanego czasu przetrzymywania. Wyjątek stanowi opracowanie Jürgen-Lohmanna i Legge [101], którzy prowadząc badania nad immobilizacją katalazy z wątroby wołowej metodą zol-żel wyznaczyli stałe szybkości dezaktywacji termicznej dla enzymu natywnego i immobilizowanego. Jürgen-Lohmann i Legge przyjęli w obliczeniach jednostopniowy mechanizm dezaktywacji, prowadzący do równania kinetycznego pierwszego rzędu. W takim przypadku można dokonać bezpośrednio obliczenia połowicznego spadku aktywności $t_{1/2}$ z zależności:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{DT}} \quad (3.38)$$

W tabeli 3-4 przedstawiono zestawienie czasów połowicznego spadku aktywności katalazy z wątroby wołowej, które obliczono na podstawie badań Jürgen-Lohmanna i Legge [101] oraz oszacowań wykonanych przez analizę wykresów zamieszczonych w publikacjach.

Dane zamieszczone w tabeli potwierdzają ogólną tendencję polegającą na zmniejszaniu się czasu połowicznego spadku aktywności katalazy ze wzrostem temperatury. Dla katalazy przechowywanej w lodówce $t_{1/2}$ dochodzi do 17 dób, a w temperaturze 55°C nie przekracza 2 h. Powyżej temperatury 60°C następuje bardzo szybka dezaktywacja termiczna enzymu i $t_{1/2}$ jest rzędu minut. Ponadto można zauważyć w wielu przypadkach duże różnice w wartościach $t_{1/2}$

uzyskanych dla tej samej temperatury przez różnych badaczy. Można to wytłumaczyć wpływem stężenia katalazy z wątroby wołowej na jej stabilność termiczną [171].

Tabela 3-4. Wpływ temperatury na stabilność termiczną katalazy z wątroby wołowej

| Temperatura [°C] | Czas połowicznego spadku aktywności | Autorzy |
|------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 4 | 15 dób | Chang [33] |
| | 10 dób | Akgöl i Denizli [7] |
| 5 | 17 dób | Çetinus i Öztop [27,28] |
| | 4 doby | Tukel i Alptekin [177] |
| 25 | 5 dób | Çetinus i Öztop [28] |
| 37 | 18 h | Chang [33] |
| | 5 h | Çetinus i Öztop [28] |
| 40 | 35 min | Jürgen-Lohmann i Legge [101] |
| | 10 h | Tukel i Alptekin [177] |
| | 2 h | Çetinus i Öztop [28] |
| 45 | 18 h | Görenek i wsp. [62] |
| 50 | 2 h | Çetinus i Öztop [27] |
| | 8 h | Tukel i Alptekin [177] |
| 55 | 23 min | Jürgen-Lohmann i Legge [101] |
| | 1-2 h* | Yoshimoto i wsp. [195] |
| 60 | 6,3 min | Jürgen-Lohmann i Legge [101] |
| 65 | 18 s | Switala i Loewen [163] |
| | 126 s | Jürgen-Lohmann i Legge [101] |

*1 h dla stężenia katalazy 0,25 µg/cm³, 2 h dla stężenia katalazy 5,0 µg/cm³

Informacji dotyczących dezaktywacji termicznej katalazy z *Aspergillus niger* jest znacznie mniej w porównaniu z dezaktywacją katalazy z wątroby wołowej. W tabeli 3-5 zamieszczono czasy połowicznego spadku aktywności, które oszacowano na podstawie publikacji, postępując podobnie jak w przypadku katalazy z wątroby wołowej.

Tabela 3-5. Wpływ temperatury na stabilność termiczną katalazy z *Aspergillus niger*

| Temperatura [°C] | Czas połowicznego spadku aktywności [h] | Autorzy |
|------------------|---|------------------------|
| 30 | 612 | Costa i wsp. [38] |
| 40 | 43 | Yoshimoto i wsp. [195] |
| 43 | 15 | Tarhan i Uslan [169] |
| 55 | 3 | Kaddour i wsp. [102] |
| 60 | 18 | Costa i wsp. [38] |
| 65 | 0,23 | Switala i Loewen [163] |
| 67 | 2 | Costa i wsp. [38] |

Porównanie danych z tabeli 3-4 oraz tabeli 3-5 wskazuje na to, że katalaza z *A. niger* jest bardziej stabilna termicznie niż katalaza z wątroby wołowej. Producenci katalazy z *A. niger* często deklarują jeszcze wyższą stabilność termiczną niż podana w tabeli 3-5. Według danych firmy Asa-Enzyme [78], w temperaturze 85°C czas połowicznego spadku aktywności wynosi ponad 0,5 h. Znane są również katalazy z organizmów termofilnych, które charakteryzują się wyższą termostabilnością. Przykładowo czas połowicznego spadku aktywności katalazy z *Thermus brokianus* w temperaturze 80°C wynosi 330 h [171,172].

3. 3. Dezaktywacja katalazy pod wpływem substratu

Badania nad dezaktywacją katalazy pod wpływem nadtlenu wodoru prowadzone są od wielu lat. Stosuje się w nich katalazy pochodzące z różnych materiałów biologicznych.

Sam mechanizm dezaktywacji i jego kinetyka w szerokim zakresie stężeń nadtlenu wodoru nie zostały dotychczas w pełni poznane. George [58] jako pierwszy opisał szybkość dezaktywacji katalazy z erytrocytów, doświadczalnym równaniem kinetycznym:

$$\frac{dC_E}{dt} = -C_E \left(\frac{bC_s}{c + C_s} + dC_s \right) \quad (3.39)$$

gdzie stałe: $b = 0,072 \text{ 1/s}$,

$c = 0,15 \text{ mol/dm}^3$,

$d = 0,0185 \text{ dm}^3/(\text{mol s})$,

wyznaczono dla temperatury 0°C. Powyższe równanie wskazuje na bardzo szybką dezaktywację katalazy, nawet przy niskich stężeniach nadtlenu wodoru.

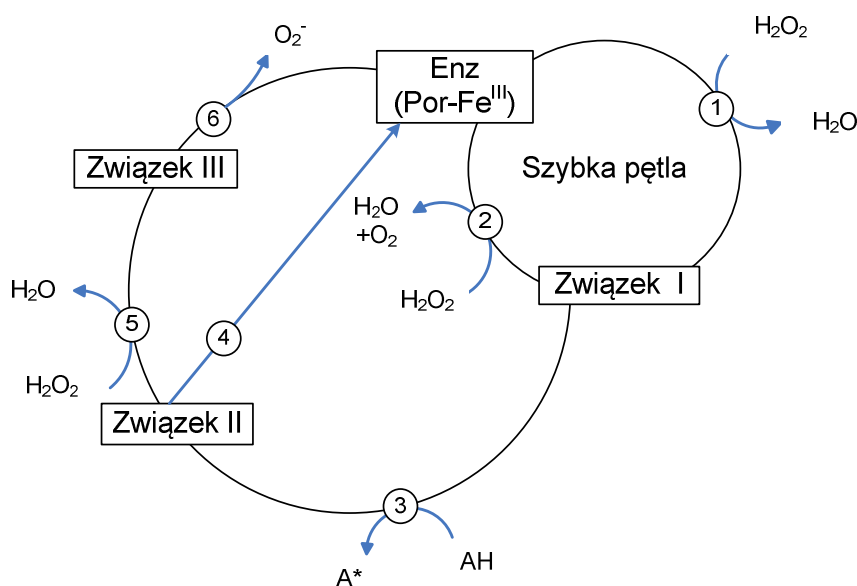
Scott i Hammer [155] stwierdzili doświadczalnie, że katalaza *Aspergillus niger* jest bardziej odporna na dezaktywację niż katalaza z wątroby wołowej. Podobne zjawisko zaobserwował Altomare i wsp. [4,5] a także Vasudevan i Weiland [179,180].

Jones i Suggett [96] zaproponowali dla katalazy pochodzenia bakteryjnego następujące równanie kinetyczne:

$$\frac{dC_E}{dt} = -\frac{v_D C_E C_S}{K_D + C_S} \quad (3.40)$$

Wyznaczone przez Jonesa i Suggetta parametry kinetyczne procesu dezaktywacji w temperaturze 20°C wynosiły $v_D = 0,65 \text{ 1/s}$, $K_D = 1,1 \text{ mol/dm}^3$.

Do i Weiland [44] analizowali zgodność między równaniami kinetycznymi reakcji i dezaktywacji enzymu przez substrat. Wykazali, że dla prostych mechanizmów dezaktywacji uzyskuje się taką samą postać równania kinetycznego reakcji i dezaktywacji, a stała $K_M = K_D$. Tych analiz nie potwierdziły jednak badania Lardinoisa i wsp. [115]. Dla katalazy z *A. niger* uzyskali oni równanie kinetyczne o postaci równania Michaelisa-Menten ze stałą $K_M = 0,322 \text{ mol/dm}^3$, a dezaktywacja substratem przebiegała zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu. Zgodność z tym modelem uzyskali dla szerokiego zakresu stężeń nadtlenu wodoru od 0,01 do 2 mol/dm³. W przypadku katalazy z wątroby wołowej Lardinois i wsp. [115] stwierdzili zjawisko inhibicji substratem. Natomiast szybkość dezaktywacji enzymu wzrastała liniowo do stężenia nadtlenu wodoru 80 mmol/dm³, a przy wyższych stężeniach miała wartość stałą. Występowanie odmiennych mechanizmów dezaktywacji katalazy z wątroby wołowej i z *A. niger* wyjaśnia schemat (Rys. 3-2), który zaproponowali Lardinois i wsp. [115].



Rys. 3-2. Mechanizm działania katalazy [wg 115]

Uwzględnia on występowanie związku I, który zidentyfikował Chance [30], oraz związku II i III. Ich wzajemne przejścia ilustrują odpowiednie pętle. „Pętla szybka”, w której występuje związek I, decyduje o szybkości reakcji rozkładu nadtlenu wodoru i przebiega poprzez etap 1 i 2. „Wolne pętle” związane są z przejściem związku I do związku II (etap 3), który może prowadzić do formy natywnej katalazy - Enz(Por-Fe^{III}) dwoma drogami, w zależności od stężenia nadtlenu wodoru:

- 1) bardzo wolna redukcja związku II do katalazy natywnej (etap 4);
- 2) nieodwracalne utlenianie związku III, który następnie jest redukowany do natywnej katalazy z niewielką szybkością (etap 6).

Wszystkie prezentowane przez ostatnie 60 lat modele dezaktywacji katalazy przez nadtlenek wodoru [4,5,6,38,41,115,166-169] można sprowadzić do równania kinetycznego:

$$r_D = k_D C_E C_S \quad (3.41)$$

przy niskich stężeniach nadtlenu, które zwykle występują w praktyce.

W tabeli 3-6 zamieszczono wartości stałych k_D wyznaczone przez badaczy dla katalazy pochodzącej z różnych źródeł w warunkach, gdy stężenie nadtlenu wodoru było mniejsze od 0,02 mol/dm³.

Tabela 3-6. Stałe szybkości dezaktywacji k_D dla katalazy natywnej

| Temperatura [°C] | k_D [dm ³ /(mol s)] | Rodzaj katalazy | Autor |
|---------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--|
| 25 | 0,0085 | <i>Aspergillus niger</i> | DeLuca i wsp. [41] |
| | 0,148 | wątroba wołowa | |
| 27 | 0,114 | wątroba wołowa | Ghadermarzi i Moosavi-Movahedi [59] |
| 30 | 0,044 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Wójcik [190] |

Prezentowane stałe k_D były wyznaczone dla temperatur nieznacznie różniących się między sobą, dlatego istnieje możliwość ich bezpośredniego porównania. Badania DeLuci i wsp. [41] wyraźnie wskazują na to, że katalaza z wątroby wołowej ulega znacznie szybciej dezaktywacji nadtlakiem wodoru niż katalaza z *Aspergillus niger*. Również katalaza z *Saccharomyces cerevisiae* [190] jest bardziej stabilna niż katalaza z wątroby wołowej. Potwierdza to powszechnie panującą opinię, że katalazy mikrobiologiczne są stabilniejsze niż pochodzące z tkanek zwierzęcych.

Równanie (3.41) było także powszechnie stosowane do opisu kinetyki dezaktywacji katalazy immobilizowanej. W tabelach 3-7.1 i 3-7.2 zebrano pozorne stałe szybkości dezaktywacji k_D' wyznaczone dla immobilizowanych biokatalizatorów.

Tabela 3-7.1. Pozorne stałe szybkości dezaktywacji k_D' dla katalazy *Aspergillus niger* poddanej immobilizacji

| Temperatura [°C] | k_D' [dm ³ /(mol s)] | Charakterystyka procesu immobilizacji | Autor |
|------------------|-----------------------------------|---|--------------------------|
| 25 | 0,00017 | wiązanie kowalencyjne na diatomicie impregnowanym Ni i aktywowanym aminopropylotrietoksysilanem i aldehydem glutarowym | Altomare i wsp. [5] |
| | 0,00102 | wiązanie kowalencyjne na porowatym SiO ₂ po aktywacji aminopropylotrietoksysilanem i aldehydem glutarowym | Akertek i Tarhan [6] |
| | 0,00437 | pułapkowanie w żelu alginianu wapnia | |
| | 0,00338 | wiązanie kowalencyjne na DEAE-celulozie poddanej modyfikacji chemicznej | Tarhan [167] |
| | 0,00223 | wiązanie kowalencyjne na DEAE-celulozie poddanej modyfikacji chemicznej | Tarhan i Telefoncu [168] |
| 27 | 0,00425 | wiązanie kowalencyjne na Al ₂ O ₃ aktywowanym aminopropylotrietoksysilanem i aldehydem glutarowym | Tarhan i Usfan [169] |

Tabela 3-7.2. Pozorne stałe szybkości dezaktywacji k_D' dla katalazy z wątroby wołowej poddanej immobilizacji

| Temperatura [°C] | k_D' [dm ³ /(mol·s)] | Charakterystyka procesu immobilizacji | Autor |
|---------------------|--------------------------------------|---|---------------------------|
| 5 | 0,0055 | wiązanie kowalencyjne na porowatym SiO ₂ - Al ₂ O ₃ poddanym silanizacji i aktywacji tiofosgenem | Altomare i wsp. [4] |
| 25 | 0,021 | wiązanie kowalencyjne na diatomicie poddanym silanizacji i aktywacji tiofosgenem | |
| 25 | 0,0012-0,0097 | wiązanie kowalencyjne na nośniku SiO ₂ - Al ₂ O ₃ poddanym silanizacji i aktywacji aldehydem glutarowym | Tai i Greenfield [166] |

Wielkości te mają z reguły zaniżone wartości stałej szybkości dezaktywacji na skutek występowania efektów dyfuzyjnych. Dokładniejsza analiza nie jest jednak możliwa bez znajomości modułu Thielego. Z obliczeń Tai i Greenfielda [166] wynika, że zwykle wartości pozornej stałej k_D' są od 3 do 5 razy mniejsze od rzeczywistej stałej dezaktywacji k_D .

3.4. Wpływ pH środowiska na dezaktywację katalazy

Akertek i Tarhan [6] badali wpływ przechowywania katalazy natywnej *A. niger* w buforach o pH od 4,5 do 9 przez okres 18 h w temperaturze 25°C. W buforze o pH 7 następował nieznaczny spadek aktywności o 5%, a w buforach o pH 5 i 9 aktywność enzymu spadła o około 30-40%. Dla porównania katalaza wołowa przechowywana w tych samych warunkach, optymalną aktywność posiadała w buforze o pH równym 8. W buforze o pH 4 i 10 jej aktywność była o połowę mniejsza w porównaniu do aktywności w pH optymalnym (Görenek i wsp. [62])

3.5. Dezaktywacja termiczna oraz dezaktywacja równoległa substratem

Analiza kinetyki dezaktywacji katalazy dla bardzo niskich stężeń nadtlenu wodoru nie może pomijać dezaktywacji termicznej. Taki przypadek był przedmiotem badań prowadzonych przez Tse i Gough [176], którzy stosowali katalazę z *A. niger* immobilizowaną w membranie z kolagenu. Szybkość dezaktywacji opisali następującym równaniem kinetycznym:

$$\frac{da}{dt} = -(k_{DT} + k_D C_S) a \quad (3.42)$$

Stałe szybkości dezaktywacji k_{DT} i k_D dla stałej temperatury 37°C wyznaczyli przy zastosowaniu procedury dwuetapowej. Najpierw dla membrany przechowywanej w buforze bez nadtlenu wodoru ($C_S=0$) wyznaczyli stałą k_{DT} , wykorzystując równanie $a = \exp(-k_{DT}t)$. Stała szybkości dezaktywacji termicznej wynosiła zaledwie $1,5 \cdot 10^{-7}$ 1/s, co odpowiada czasowi połowicznego spadku aktywności około 53 dób. Dla membrany przetrzymywanej w roztworze nadtlenu wodoru o stałym stężeniu C_S można wykorzystać całą równania (3.42) do opisu zmian aktywności w czasie:

$$a = \exp(k_{DT}t - k_D C_S t) \quad (3.43)$$

Tse i Gough przeprowadzi pomiary zmian aktywności membrany z katalazą dla stężeń nadtlenu wodoru nie przekraczających $0,0004$ mol/dm³. Wartość stałej dezaktywacji k_D wynosiła $0,015$ dm³/(mol s). Uznano za bliską rzeczywistej stałą dezaktywacji ze względu na niewielkie opory dyfuzyjne, gdyż zastosowano membranę o małej grubości i niewielkie stężenie enzymu.

Dezaktywację termiczną katalazy i dezaktywację równoległą substratem uwzględnił także Wójcik [189] przy analizie badań Ibrahima i Schlegla [91]. Stałe szybkości dezaktywacji katalazy wołowej były wyznaczone metodą najlepszego dopasowania rozwiązań numerycznych do zmierzonych doświadczalnie przez Ibrahima i Schlegla zmian aktywności enzymu. Otrzymano następujące wartości stałych dla temperatury 30°C: $k_{DT} = 1,42 \cdot 10^{-5}$ 1/s i $k_D = 0,4$ dm³/(mols). Wartości te są znacznie większe od wyznaczonych przez Tse i Gough dla katalazy z *A. niger*.

Część doświadczalna

4. Analizowany model matematyczny izotermicznego reaktora do rozkładu

H₂O₂

Zastosowanie nadtlenu wodoru w procesach przemysłowych jako utleniacza lub środka sterylizującego związane jest z koniecznością rozkładu jego pozostałości. Najczęściej do tego celu stosuje się obecnie katalazę (EC 1.11.1.6), która jest bardzo efektywnym katalizatorem. Rozkład nadtlenu wodoru przez katalazę związany jest jednak z równoległe przebiegającą dezaktywacją enzymu. Na podstawie analizy zebranej literatury można stwierdzić, że enzym ulega zarówno dezaktywacji termicznej jak i dezaktywacji pod wpływem substratu. Dezaktywacja substratem dominuje przy wyższych stężeniach nadtlenu wodoru.

W praktyce przemysłowej katalaza jest stosowana do obróbki roztworów, które zawierają zwykle poniżej 500 ppm nadtlenu wodoru. Podczas reakcji rozkładu nadtlenu wodoru jego stężenie spada nawet poniżej 10 ppm. Przy takich stężeniach nadtlenu wodoru kinetykę reakcji i dezaktywacji enzymu substratem można opisać równaniami pierwszego rzędu, w odniesieniu do stężenia enzymu i substratu:

$$r_s = k_R C_E C_S \quad (4.1a)$$

$$r_D = k_D C_E C_S \quad (4.1b)$$

Kinetyka dezaktywacji termicznej może przebiegać według prostego, jednostopniowego mechanizmu lub bardziej złożonych mechanizmów wielostopniowych. Prace Jürgena-Lohmanna [101], Tse i Gough [176] oraz Wójcika [189] wskazują, że dezaktywacja termiczna katalazy może przebiegać według jednostopniowego mechanizmu $E \rightarrow D$, z równaniem kinetycznym w postaci:

$$r_{DT} = k_{DT} C_E \quad (4.2)$$

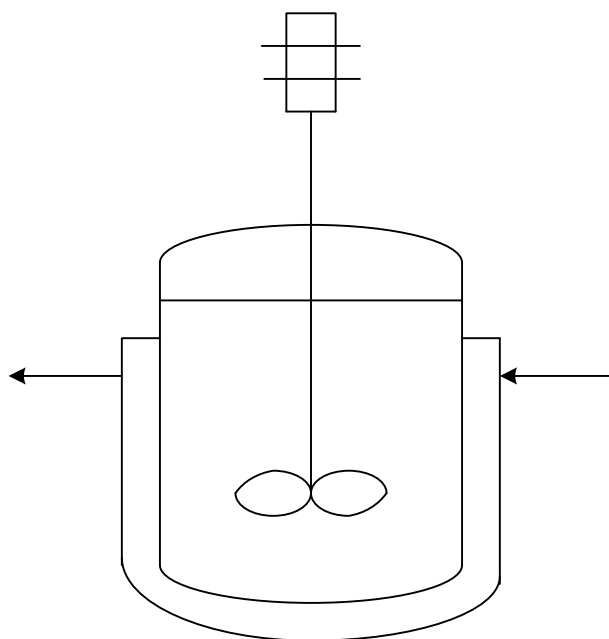
Dezaktywacja termiczna katalazy wołowej w postaci natywnej i immobilizowanej była badana w zakresie temperatur od 25°C do 70°C [83], natomiast w przypadku katalazy *A. niger* nie prowadzono dotychczas obszerniejszych badań związanych z kinetyką dezaktywacji termicznej. Równanie (4.2) będzie przedmiotem weryfikacji doświadczalnej w dalszej części pracy.

Uwzględniając dezaktywację katalazy w izotermicznym reaktorze okresowym (Rys. 4-1) bilans masy substratu i aktywnego enzymu opisuje układ dwóch równań różniczkowych zwyczajnych:

$$\frac{dC_s}{dt} = -k_R C_E C_S \quad (4.3a)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = -k_D C_E C_S - k_{DT} C_E \quad (4.3b)$$

z warunkami początkowymi $C_s(t=0) = C_{s0}$ oraz $C_E(t=0) = C_{E0}$.



Rys. 4-1. Schemat izotermicznego reaktora okresowego do rozkładu H_2O_2

Bezpośrednie wyznaczenie stężenia aktywnego enzymu nie jest możliwe i dlatego wprowadza się aktywność bezwymiarową $a = C_E/C_{E0}$. Po uwzględnieniu tej zależności, otrzymujemy układ równań o następującej postaci:

$$\frac{dC_s}{dt} = -k_R^* a C_s \quad (4.4a)$$

$$\frac{da}{dt} = -k_D a C_s - k_{DT} a \quad (4.4b)$$

gdzie: $k_R^* = C_{E0} k_R$,

z warunkami początkowymi $C_s(t=0) = C_{s0}$ oraz $a(t=0) = 1$.

Powyższy model może być stosowany do opisu pracy izotermicznego reaktora okresowego i przewidywania zmian stężenia nadtlenu wodoru. W modelu pominięto niewielkie zmiany temperatury na skutek wydzielanego ciepła reakcji podczas rozkładu nadtlenu wodoru. Taki sposób podejścia uzasadniony jest bardzo niskim stężeniem początkowym nadtlenu wodoru i stąd niewielką ilością wydzielonego ciepła. Rozwiązanie układu równ. (4.4a) i (4.4b) uzyskuje się metodami numerycznymi, jeżeli dysponujemy stałymi kinetycznymi k_R^* , k_D i k_{DT} . Ze względu na prowadzenie rozkładu nadtlenu wodoru w różnych temperaturach, konieczna jest także znajomość wpływu temperatury na stałe kinetyczne. Z tego względu w części doświadczalnej i obliczeniowej pracy skupiono się przede wszystkim na identyfikacji parametrów kinetycznych procesu i określeniu wpływu temperatury na ich wartości.

5. Sposób wyznaczenia stałych kinetycznych i stosowane preparaty enzymatyczne

Wyznaczenie parametrów kinetycznych k_R^* , k_D i k_{DT} dla reakcji rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę *Aspergillus niger*, przebiegało w kilku etapach.

Najpierw badano dezaktywację termiczną w celu określenia k_{DT} . Zastosowano typową technikę określania kinetyki dezaktywacji enzymów. Roztwory katalazy przechowywano przez około 30 h w termostатовanej łaźni wodnej o stałej temperaturze w zakresie od 35°C do 70°C. W określonych odstępach czasu pobierano próbki roztworów katalazy i wyznaczano jej aktywność przy zastosowaniu elektrody tlenowej.

Wyznaczenie stałych kinetycznych k_R^* i k_D , związanych bezpośrednio z reakcją rozkładu nadtlenu wodoru przeprowadzono dla zakresu temperatur od 35°C do 50°C. Proces rozkładu nadtlenu wodoru o stężeniu początkowym $0,015 \pm 0,001$ mol/dm³ przebiegał okresowo przez 2 h. Stężenie nadtlenu wodoru w trakcie reakcji oznaczano metodą spektrofotometryczną, a jego wartość nigdy nie była mniejsza niż 0,001 mol/dm³. W takich warunkach dominuje dezaktywacja substratem i rów. (4.4a) i (4.4b) upraszczają się do postaci:

$$\frac{dC_s}{dt} = -k_R^* a C_s \quad (5.1)$$

$$\frac{da}{dt} = -k_D a C_s \quad (5.2)$$

Warunki początkowe nie ulegają zmianie i są zdefiniowane następująco:

$$C_s(t=0) = C_{s0} \text{ oraz } a(t=0) = 1$$

Przy identyfikacji stałych kinetycznych k_R^* i k_D , na podstawie zmian stężenia nadtlenu wodoru w procesie jego rozkładu, stwierdzono silne skorelowanie między k_R^* i k_D . W związku z tym zdecydowano się na niezależne wyznaczenie stałej szybkości reakcji, stosując wyższe stężenie enzymu i ograniczając czas reakcji do 15 sekund, aby ograniczyć zjawisko dezaktywacji substratem.

W badaniach stosowano katalazę z Sigmy-Aldrich o numerze katalogowym C3135 oraz katalazę z Novozymes o nazwie handlowej Terminox Ultra 50L. Katalaza z Sigma-Aldrich oznaczona dalej w pracy jako katalaza S-A jest preparatem o zastosowaniach laboratoryjnych i występuje w postaci zawiesiny w roztworze siarczanu amonu. Producent deklaruje, że jej aktywność wynosi ponad 4 000 U/(mg białka).

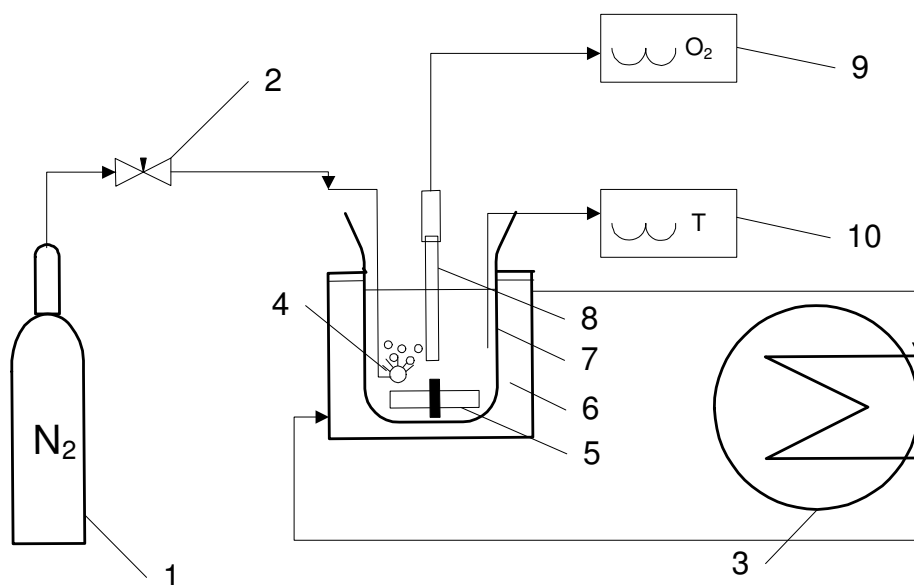
Katalaza z Novozymes, którą w pracy oznaczono jako katalaza N jest preparatem stosowanym na skalę przemysłową do rozkładu nadtlenu wodoru w przemyśle włókienniczym. Aktywność Terminoxu Ultra wynosi 50 000 U/g. Przy porównaniu aktywności obydwu preparatów odniesionej do jednostki objętości okazało się, że aktywność katalazy S-A jest około 50 razy większa niż aktywność katalazy N. W badaniach stosowano roztwory enzymów o odpowiednich rozcieńczeniach.

6. Dezaktywacja termiczna katalazy

Kinetyka dezaktywacji termicznej katalazy z *Aspergillus niger* nie była dotychczas przedmiotem systematycznych badań, prowadzonych w szerokim zakresie temperatur. W nielicznych publikacjach podejmujących to zagadnienie występują jedynie fragmentaryczne informacje, odnoszące się do wybranych temperatur. Dostępne dane doświadczalne nie pozwalają na sformułowanie i zweryfikowanie modelu matematycznego, który opisywałby proces dezaktywacji termicznej katalazy. W związku z tym zaplanowano i wykonano obszerny program badań dla obydwu rodzajów katalazy (katalaza S-A i katalaza N). Dezaktywację termiczną katalazy przeprowadzono w zakresie temperatur od 35°C do 70°C, a pomiary jej aktywności wykonano przy pomocy elektrody tlenowej.

6.1. Pomiar aktywności katalazy przy użyciu elektrody tlenowej

W badaniach kinetyki dezaktywacji enzymów, jednym z zasadniczych zagadnień jest dobór odpowiedniej metody analitycznej, która pozwoliłaby mierzyć aktywność enzymu w możliwie szerokim zakresie. Z publikowanych dotychczas badań wynika, że takie warunki spełnia metoda polegająca na pomiarze ilości wydzielonego tlenu przy wykorzystaniu elektrody tlenowej. Na rys. 6-1 przedstawiono schemat układu pomiarowego, który stosowano do oznaczenia aktywności katalazy.



Rys. 6-1. Schemat układu pomiarowego do oznaczenia aktywności katalazy: 1-butla z azotem, 2-zawór redukujący, 3-termostat, 4-bełkotka doprowadzająca N₂, 5-mieszadło magnetyczne, 6-układ termostatujący, 7-zlewka szklana (reaktor okresowy), 8-elektroda tlenowa, 9-tlenomierz, 10-termometr

Aktywność katalazy była określona na podstawie pomiaru szybkości wydzielania tlenu w reaktorze podczas reakcji rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę. Jako reaktor użyto zlewki szklanej (7) o pojemności 150 cm³. Wprowadzano do niej 100 cm³ nadtlenu wodoru o stężeniu 0,01 mol/dm³. Zawartość zlewki była mieszana za pomocą mieszadła magnetycznego (5). Po uzyskaniu temperatury 20°C w reaktorze, otwierano zawór (2) i przeprowadzono desorpcję tlenu za pomocą azotu znajdującego się w butli (1). Jednocześnie obserwowano wskazania tlenomierza Elmetron CPO 501, który wcześniej wykalibrowano. Ilość rozpuszczonego tlenu odczytywano jako procent nasycenia (%). W momencie obniżania się stężenia tlenu do poziomu 20±5 % zamykano dopływ azotu i wprowadzano 1 cm³ roztworu zawierającego katalazę. Następnie przez okres 150 sekund odczytywano co 30 sekund stopień nasycenia tlenem.

Przed przystąpieniem do właściwych badań i następnie pomiarów aktywności za pomocą elektrody tlenowej przygotowano roztwory enzymów o odpowiednich stężeniach. Ilość enzymu w próbce o objętości 1 cm³ musiała być tak dobrana, aby przy pomiarze aktywności po 150 sekundach nie przekroczyć 100% nasycenia tlenem w roztworze reakcyjnym. Rozcieńczenia enzymów wykonano według następującej procedury:

- **Katalaza S-A** była preparatem o bardzo wysokiej aktywności i dlatego zastosowano procedurę dwuetapową. W pierwszym etapie do kolby miarowej o objętości 50 cm³ dodano 0,05 cm³ katalazy S-A i uzupełniono do kreski buforem fosforanowym o pH 7 [109]. W drugim etapie do kolby miarowej o objętości 50 cm³ dodano 1 cm³ roztworu enzymu wcześniej przygotowanego i uzupełniono do kreski buforem fosforanowym o pH 7. W ten sposób uzyskano rozcieńczenie katalazy S-A 1:50 000.
- **Katalaza N** była preparatem o znacznie mniejszej aktywności i dlatego wystarczyła procedura jednostopniowa. Do kolby miarowej o objętości 100 cm³ dodano 0,1 cm³ preparatu z enzymem i uzupełniono do kreski buforem fosforanowym o pH 7. W tym przypadku uzyskano rozcieńczenie 1:1000.

Na podstawie wszystkich średnich pomiarów w czasie t=0 (tj. enzym niedeaktywowany) zawartych z załączniku, przedstawiono zmiany stopnia nasycenia roztworu reakcyjnego tlenem przy zastosowaniu katalazy S-A i katalazy N (tabela 6-1).

Wzrost stopnia nasycenia roztworu tlenem spowodowany jest przede wszystkim wydzielaniem tlenu podczas reakcji rozkładu nadtlenu wodoru. Jednak ze względu na stykanie się powierzchni roztworu reakcyjnego z powietrzem, możliwa jest także dyfuzja tlenu do roztworu. Aby określić udział tego mechanizmu w procesie natleniania roztworu wykonano dwa doświadczenia, w których po odtlenieniu azotem, nie dodano enzymu do roztworu reakcyjnego.

Tabela 6-1. Zmiana stopnia nasycenia roztworu reakcyjnego tlenem przy zastosowaniu katalazy S-A lub katalazy N

| Czas [s] | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 |
|--|------|------|------|------|------|------|
| Stopień nasycenia roztworu reakcyjnego tlenem [%] | | | | | | |
| Katalaza S-A | 23,4 | 38,0 | 52,9 | 67,9 | 82,9 | 97,9 |
| Katalaza N | 22,0 | 35,6 | 50,4 | 66,7 | 81,6 | 97,0 |

W tabeli 6-2 zamieszczono średnie wyniki dwóch doświadczeń. Wskazują one na niewielki wzrost stopnia natlenienia roztworu (2,2 %) na skutek dyfuzji tlenu z powietrza.

Tabela 6-2. Zmiana stopnia nasycenia roztworu reakcyjnego tlenem przy braku enzymu

| Czas [s] | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | ΔO_2 |
|---|------|------|------|------|------|------|--------------|
| Średni pomiar O_2 [%] | 16,9 | 17,3 | 17,6 | 18,1 | 18,6 | 19,1 | 2,2 |

Warto zwrócić uwagę na to, że dodanie katalazy o wysokiej aktywności do roztworu nadtlenu wodoru powoduje szybki wzrost stopnia nasycenia roztworu reakcyjnego na skutek wydzielania się tlenu podczas reakcji i siła napędowa dla procesu dyfuzji tlenu z powietrza maleje. W takiej sytuacji natlenianie roztworu reakcyjnego na skutek dyfuzji w większości przypadków można pominąć. Zjawisko to może mieć jednak pewien wpływ na wynik pomiaru przy niewielkiej aktywności katalazy. W dalszych obliczeniach przyjęto, że wpływ natleniania na skutek dyfuzji tlenu z powietrza można pominąć, jeżeli stanowi mniej niż 5% całkowitego wzrostu stopnia natlenienia.

W oparciu o dane z tabeli 6-1, stężenie powstającego tlenu w roztworze reakcyjnym w przeliczeniu na $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ określono z zależności:

$$O_2 = \frac{((\%O_2)_t - (\%O_2)_{t=0}) \cdot 9,08 \cdot 10}{32} \quad (6.1)$$

w którym $(\%O_2)_t$ - stopień nasycenia tlenem roztworu reakcyjnego w [%] w chwili t,

$(\%O_2)_{t=0}$ - stopień nasycenia roztworu reakcyjnego w [%] w chwili t=0,

9,08 - rozpuszczalność tlenu w wodzie w temperaturze 20°C wyrażoną w $[\text{mg}/\text{dm}^3]$,

32 - masa molowa

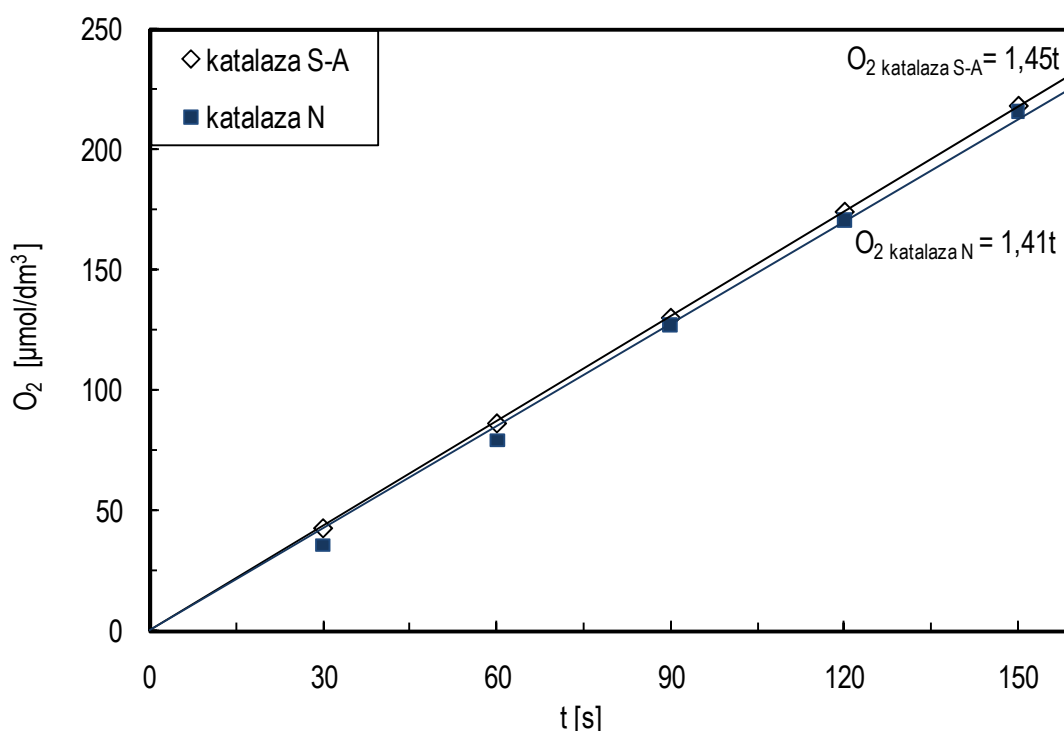
10 - współczynnik wynikający z przeliczenia objętości.

Obliczone wartości stężenia powstającego tlenu przedstawiono w tabeli 6-3.

Tabela 6-3. Zmiana stężenia powstającego O_2 podczas rozkładu H_2O_2 przez katalazę S-A lub katalazę N

| Czas [s] | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 |
|---|---|----|----|-----|-----|-----|
| Stężenie O_2 [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$] | | | | | | |
| Katalaza S-A | 0 | 43 | 86 | 130 | 176 | 218 |
| Katalaza N | 0 | 36 | 79 | 127 | 170 | 216 |

Dane z tabeli 6-3 pozwalają przedstawić graficznie zmianę stężenia powstającego O_2 podczas rozkładu nadtlenu wodoru na rys 6-2. Współczynnik kierunkowy prostej, określa aktywność katalazy wyrażoną poprzez szybkość powstawania produktu O_2 - $\mu\text{mol}/(\text{dm}^3 \text{ s})$.



Rys. 6-2. Zmiana stężenia powstającego O_2 podczas rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę S-A i katalazę N

6.2. Ocena wpływu czasu przechowywania na zmianę aktywności roztworu katalazy S-A

W badaniach dezaktywacji termicznej używano buforowane roztwory katalazy S-A oraz katalazy N. Roztwór katalazy N o odpowiednim rozcieńczeniu przygotowywano za każdym razem przed rozpoczęciem kolejnej serii doświadczeń. Było to możliwe, ponieważ dysponowano dużą ilością preparatu handlowego Terminox Ultra z Novozymes. Natomiast w przypadku katalazy S-A (Sigma-Aldrich) przygotowany roztwór o rozcieńczeniu 1:50 000 przechowywano w lodówce w temperaturze 4-6°C i przez kolejne dni, używano jako źródło enzymu w badaniach dezaktywacji termicznej. Taki sposób postępowania wymagał jednak wcześniejszego

sprawdzenia stabilności katalazy S-A przy dłuższym przechowywaniu. Przeprowadzono zatem pomiary aktywności roztworu katalazy S-A przechowywanego w temperaturze 4-6°C przez okres 21 dób. Pomiar aktywności enzymu, wykonywano w każdym dniu roboczym, zgodnie z metodyką pomiarów opisaną w pkt. 6.1. Określono bezwymiarową aktywności enzymu $a = a_t/a_0$ wyrażaną jako stopień nasycenia roztworu reakcyjnego tlenem w danym dniu a_t do stopienia nasycenia roztworu reakcyjnego tlenem w dniu pierwszym a_0 . Wyniki pomiarów umieszczono w tabeli 6-4.

Tabela 6-4. Zmiana stopnia nasycenia tlenem roztworu reakcyjnego przy pomiarze aktywności dla katalazy S-A przechowywanej w temperaturze 4-6°C

| Czas [s] | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | a [-] |
|------------------------------------|--|------|------|------|------|------|--------------|
| Okres przechowywania [doby] | Stopień nasycenia roztworu reakcyjnego tlenem [%] | | | | | | |
| 1 | 16,2 | 32,5 | 49,1 | 65,7 | 82,4 | 99,2 | 1,00 |
| 2 | 18,2 | 33,5 | 50,1 | 66,6 | 83,2 | 99,8 | 0,98 |
| 3 | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | 17,2 | 33,4 | 50,1 | 66,8 | 83,0 | 98,6 | 0,98 |
| 6 | 16,2 | 32,5 | 49,1 | 65,7 | 82,0 | 98,2 | 0,99 |
| 7 | 18,3 | 34,4 | 51,0 | 67,6 | 84,0 | 99,3 | 0,98 |
| 8 | 19,2 | 34,3 | 50,9 | 67,4 | 83,7 | 99,9 | 0,97 |
| 9 | 19,4 | 34,8 | 51,1 | 67,4 | 83,9 | 99,7 | 0,97 |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | - | - | -- | - | - | - | - |
| 12 | 20,2 | 35,9 | 51,8 | 68,9 | 84,8 | 99,6 | 0,96 |
| 13 | 18,1 | 33,8 | 50,3 | 66,5 | 83,0 | 99,0 | 0,97 |
| 14 | 18,0 | 33,5 | 49,1 | 65,1 | 81,4 | 97,7 | 0,96 |
| 15 | 22,5 | 37,9 | 53,8 | 69,7 | 85,6 | 99,6 | 0,93 |
| 16 | 20,1 | 34,5 | 50,4 | 65,7 | 81,1 | 96,4 | 0,92 |
| 17 | - | - | - | - | - | - | - |
| 18 | - | - | - | - | - | - | - |
| 19 | 18,0 | 32,9 | 47,8 | 62,7 | 77,7 | 92,7 | 0,90 |
| 20 | 18,1 | 32,5 | 47,1 | 61,7 | 76,4 | 91,2 | 0,88 |
| 21 | 22,2 | 36,5 | 50,7 | 65,1 | 79,2 | 93,4 | 0,86 |

Na podstawie wyników pomiarów zawartych w tabeli 6-4 można stwierdzić, że roztwór katalazy S-A nie wykazuje istotnych zmian aktywności przez okres 14 dób. W dalszych badaniach stosowano roztwory katalazy S-A przechowywane w lodówce przez okres nie przekraczający dwóch tygodni.

6.3. Dezaktywacja termiczna katalazy S-A

Roztwór enzymu o rozcieńczeniu 1:50 000 rozlewano do 10 próbek szklanych w ilości po 3 cm³ i umieszczano w termostacie o zadanej temperaturze. Zgodnie z metodyką opisaną w pkt. 6.1 wykonywano pomiar początkowej aktywności katalazy S-A a następnie po określonych czasach przetrzymywania. Pomiar dla katalazy S-A, wykonane dla całego zakresu temperatur od 35°C do 70°C zostały zamieszczone w załączniku w tabelach od A-1 do A-7.

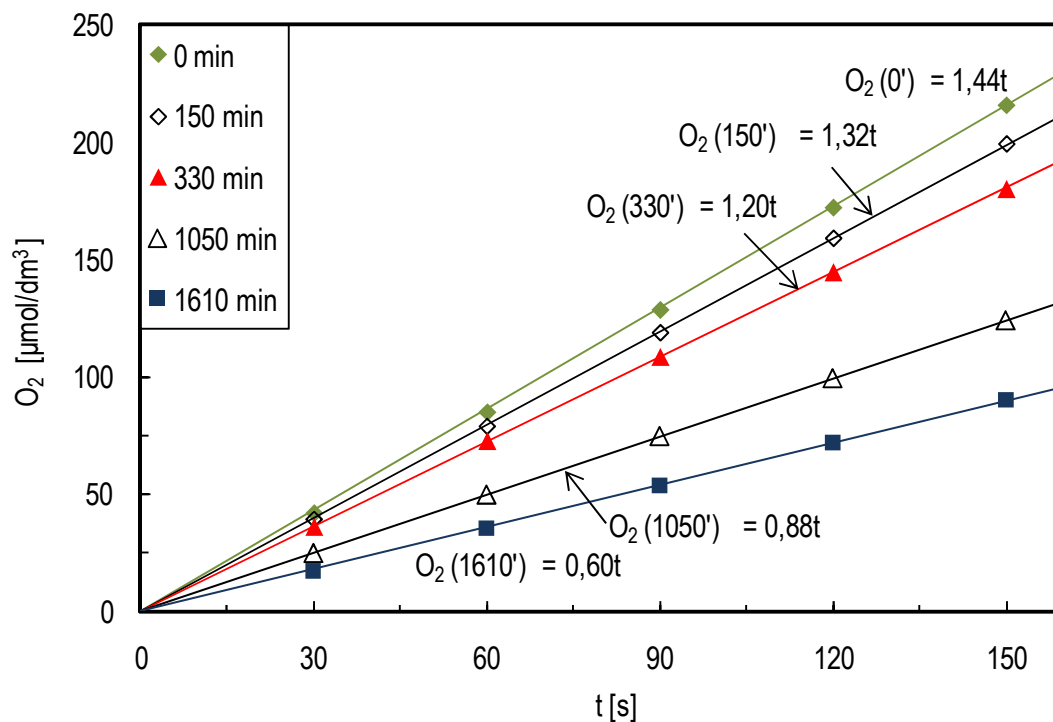
Podczas badań dezaktywacji termicznej zaobserwowano, że pomiary w temperaturze 50°C, najlepiej ilustrują stopniowy spadek aktywności katalazy w czasie. Z tego względu na podstawie tych danych przedstawiono poniżej metodykę analizy danych doświadczalnych. Na podstawie wyników pomiarów z tabeli Z-4 (załącznik) oraz korzystając z równ. (6.1) obliczono zmiany stężenia O₂, względem stężenia początkowego, dla katalazy S-A dezaktywowanej termicznej w temperaturze 50°C. Wyniki umieszczono w tabeli 6-5.

Tabela 6-5. Zmiana stężenia O₂ podczas rozkładu H₂O₂ przez katalazę S-A poddanej dezaktywacji termicznej 50°C

| | Czas dezaktywacji termicznej [min] | | | | | | | | |
|------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| | 0 | 75 | 150 | 260 | 330 | 860 | 1050 | 1310 | 1610 |
| Czas pomiaru [s] | stężenie O ₂ [μmol/dm ³] | | | | | | | | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 42 | 41 | 40 | 37 | 36 | 26 | 25 | 20 | 18 |
| 60 | 85 | 82 | 79 | 74 | 73 | 52 | 50 | 41 | 36 |
| 90 | 129 | 123 | 119 | 112 | 108 | 77 | 75 | 62 | 54 |
| 120 | 172 | 164 | 159 | 149 | 144 | 102 | 99 | 83 | 72 |
| 150 | 216 | 204 | 199 | 187 | 180 | 128 | 124 | 103 | 90 |

Na podstawie danych z powyższej tabeli dla czasów dezaktywacji termicznej: 0min, 150min, 330 min, 1050 min oraz 1610 min sporządzono wykres zależności stężenia O₂ = f(t) (rys. 6-3). Na wykresach współczynniki kierunkowe powstałych prostych, określają aktywności

katalazy wyrażone jako stężenie O_2 [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$] powstającego w czasie 1 sekundy. Ze względu na to, iż pomiary wykonano w objętości 100 cm^3 nadtlenu wodoru, aktywność katalazy przeliczono według rów. (6.1) jako ilość μmoli powstającego O_2 w czasie 1 sekundy. Zmianę aktywności katalazy dezaktywowanej w temperaturze 50°C w czasie przedstawiono w tabeli 6-6.



Rys. 6-3. Zmiana stężenia powstającego O_2 w roztworze reakcyjnym dla katalazy przetrzymywanej w temperaturze 50°C przez okres od 0 do 1610 min

Tabela 6-6. Zmiana aktywności katalazy podczas dezaktywacji termicznej w 50°C

| Czas [min] | Aktywność katalazy [$(\mu\text{mol } O_2)/\text{s}$] | a [-] |
|------------|---|-------|
| 0 | 0,144 | 1,00 |
| 75 | 0,141 | 0,98 |
| 150 | 0,132 | 0,92 |
| 260 | 0,127 | 0,88 |
| 330 | 0,120 | 0,83 |
| 860 | 0,094 | 0,65 |
| 1050 | 0,088 | 0,61 |
| 1310 | 0,066 | 0,46 |
| 1610 | 0,060 | 0,42 |

W celu porównania zmian aktywności katalazy dla całego zakresu temperatur od 35°C do 70°C aktywność katalazy została normalizowana względem aktywności początkowej.

Na podstawie danych doświadczalnych zamieszczonych w załączniku (Tabela od Z-1 do Z-7), obliczono dla całego zakresu temperatur zmiany znormalizowanej aktywności katalazy S-A w czasie. Wyniki tych obliczeń przedstawiono w tabeli 6-7. W temperaturach 35°C, 40°C oraz 45°C pomiary zmian aktywności dokonywano przez okres około 1700 minut. Ze względu na znacznie szybszą dezaktywację enzymu w temperaturach wyższych od 50°C, stopniowo skracano całkowity czas prowadzenia dezaktywacji termicznej katalazy.

Tabela 6-7. Zmiana znormalizowanej aktywności katalazy S-A podczas dezaktywacji termicznej od 35°C do 70°C

| T=35°C | | T=40°C | | T=45°C | | T=50°C | |
|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|
| Czas [min] | a [-] | Czas [min] | a [-] | Czas [min] | a [-] | Czas [min] | a [-] |
| 0 | 1,00 | 0 | 1,00 | 0 | 1,00 | 0 | 1,00 |
| 60 | 0,99 | 80 | 0,99 | 85 | 0,96 | 75 | 0,98 |
| 140 | 0,99 | 135 | 0,99 | 170 | 0,94 | 150 | 0,92 |
| 255 | 0,98 | 250 | 0,98 | 255 | 0,91 | 260 | 0,87 |
| 390 | 0,98 | 420 | 0,95 | 390 | 0,87 | 330 | 0,83 |
| 585 | 0,97 | 555 | 0,92 | 860 | 0,77 | 860 | 0,60 |
| 860 | 0,94 | 885 | 0,88 | 1045 | 0,73 | 1050 | 0,57 |
| 1105 | 0,93 | 1145 | 0,84 | 1300 | 0,69 | 1310 | 0,46 |
| 1355 | 0,91 | 1570 | 0,82 | 1480 | 0,68 | 1610 | 0,42 |
| 1730 | 0,86 | 1720 | 0,77 | 1710 | 0,63 | - | - |
| T=55°C | | T=60°C | | T=65°C | | T=70°C | |
| 0 | 1,00 | 0 | 1,00 | 0 | 1,00 | 0 | 1,00 |
| 45 | 0,93 | 50 | 0,87 | 25 | 0,90 | 20 | 0,79 |
| 85 | 0,88 | 90 | 0,78 | 110 | 0,67 | 90 | 0,56 |
| 210 | 0,78 | 220 | 0,56 | 230 | 0,41 | 120 | 0,45 |
| 380 | 0,61 | 375 | 0,42 | 310 | 0,28 | 240 | 0,19 |
| 1005 | 0,31 | 1015 | 0,07 | - | - | 315 | 0,07 |
| 1290 | 0,20 | 1300 | 0,04 | - | - | - | - |
| 1380 | 0,18 | 1390 | 0,04 | - | - | - | - |

I tak w temperaturze 50°C wynosił około 1600 minut, w temperaturach 55°C i 60°C około 1400 minut, natomiast w temperaturze 65°C i 70°C jedynie około 310 minut.

Wzrost temperatury powodował znaczne przyspieszenie dezaktywacji termicznej katalazy, a tym samym enzym wykazywał coraz mniejszą aktywność wraz z upływem czasu. W temperaturze 35°C aktywność enzymu obniżyła się o 14% natomiast w temperaturze 40°C o 23% przez okres 1720-1730 minut. W wyższych temperaturach aktywność malała dużo szybciej. Połowiczny spadek aktywności enzymu w temperaturze 50°C nastąpił po czasie 1310 minut, dla temperatury 60°C czas ten wynosił 300 minut, a dla temperatury 70°C skrócił się do 110 minut.

6.4. Dezaktywacja termiczna katalazy N

Badania dezaktywacji katalazy N wykonano w ten sam sposób jak dla katalazy S-A. Katalaza N charakteryzuje się mniejszą aktywnością w stosunku do katalazy S-A, dlatego przygotowano jednoetapowo mniejsze rozcieńczenie enzymu 1:1000. Do dziesięciu probówek szklanych rozlano po 3 cm³ roztworu katalazy N i umieszczono w termostacie w zadanej temperaturze. Po 15 minutach termostatowania, dokonywano pomiar początkowej aktywności katalazy N, zgodnie z metodyką opisaną w pkt. 6.1, po określonym czasie przetrzymywania. Wyniki pomiarów dla katalazy N, dla zakresu temperatur od 35°C do 70°C, przedstawiono w załączniku w tabelach od Z-8 do Z-14. Na podstawie tych danych, obliczono zmiany znormalizowanej aktywności katalazy N w czasie. Wyniki tych obliczeń przedstawiono w tabeli 6-8.

Tabela 6-8. Zmiana znormalizowanej aktywności katalazy N podczas dezaktywacji termicznej w temperaturach od 35°C do 70°C

| T=35°C | | T=40°C | | T=45°C | | T=50°C | |
|------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|
| Czas [min] | a [-] | Czas [min] | a [-] | Czas [min] | a [-] | Czas [min] | a [-] |
| 0 | 1,00 | 0 | 1,00 | 0 | 1,00 | 0 | 1,00 |
| 60 | 0,99 | 70 | 0,99 | 75 | 0,98 | 60 | 0,95 |
| 150 | 0,99 | 135 | 0,98 | 135 | 0,97 | 120 | 0,92 |
| 275 | 0,99 | 250 | 0,95 | 245 | 0,95 | 260 | 0,89 |
| 420 | 0,99 | 420 | 0,95 | 340 | 0,93 | 355 | 0,84 |
| 595 | 0,98 | 585 | 0,95 | 865 | 0,86 | 1000 | 0,71 |
| 870 | 0,97 | 910 | 0,94 | 985 | 0,85 | 1330 | 0,66 |
| 1165 | 0,97 | 1155 | 0,91 | 1265 | 0,83 | 1535 | 0,64 |
| 1535 | 0,96 | 1520 | 0,88 | 1520 | 0,78 | 1750 | 0,61 |
| 1715 | 0,95 | 1700 | 0,89 | 1760 | 0,74 | - | - |
| T=55°C | | T=60°C | | T=65°C | | T=70°C | |
| 0 | 1,00 | 0 | 1,00 | 0 | 1,00 | 0 | 1,00 |
| 60 | 0,91 | 40 | 0,94 | 25 | 0,88 | 40 | 0,67 |
| 120 | 0,89 | 110 | 0,76 | 110 | 0,68 | 110 | 0,52 |
| 260 | 0,76 | 310 | 0,63 | 260 | 0,51 | 120 | 0,32 |
| 450 | 0,71 | 495 | 0,57 | 320 | 0,27 | 250 | 0,21 |
| 1025 | 0,53 | 1045 | 0,22 | - | - | 335 | 0,14 |
| 1290 | 0,43 | 1310 | 0,17 | - | - | - | - |
| 1410 | 0,34 | 1460 | 0,11 | - | - | - | - |

6.5. Wpływ rozcieńczenia enzymu na szybkość dezaktywacji termicznej

Enzymy oligomeryczne, złożone w dwóch lub więcej podjednostek, mogą ulegać dysocjacji - rozpadowi na podjednostki, a te z kolei mogą ulegać szybszej dezaktywacji [105]. Ponieważ katalaza składa się z podjednostek, wykonano pomiary których celem było określenie wpływu rozcieńczenia enzymu na szybkość dezaktywacji katalazy. W tym celu przygotowano następujące roztwory katalazy S-A:

- 1:5000 (enzym : bufor fosforanowy pH 7)
- 1:500 (enzym : bufor fosforanowy pH 7)

Obydwa roztwory katalazy, poddano dezaktywacji termicznej w temperaturze 40°C. Pomiary aktywności katalazy wykonano przy użyciu elektrody tlenowej.

Do pomiarów ilości powstającego tlenu w roztworze reakcyjnym użyto 1 cm³ roztworu enzymu o rozcieńczeniu (1:5000) lub enzymu o rozcieńczeniu 0,1 cm³ roztworu 1:500. Zatem sumaryczne ilości enzymu były identyczne. Pomiary nasycenia roztworu reakcyjnego tlenem przedstawiono w tabelach 6-9 a obliczone na ich podstawie aktywności zamieszczono w tabeli 6-10.

Tabela 6-9. Zmiana stopnia nasycenia tlenem roztworu reakcyjnego przy pomiarze aktywności dla katalazy dezaktywowanej w temperaturze 40°C

| | Roztwór enzymu 1:5000 | | | | | Roztwór enzymu 1:500 | | | | |
|------------------|---|------|------|------|------|----------------------|------|------|------|------|
| | Czas dezaktywacji termicznej [min] | | | | | | | | | |
| | 0 | 95 | 140 | 1200 | 1500 | 0 | 110 | 150 | 1210 | 1490 |
| Czas pomiaru [s] | Stopień nasycenia roztworu reakcyjnego tlenem [%] | | | | | | | | | |
| 0 | 16,2 | 17,2 | 17,8 | 17,9 | 21,8 | 15,2 | 15,2 | 15,8 | 23,2 | 23,9 |
| 30 | 32,5 | 33,2 | 34,0 | 31,7 | 35,4 | 33,8 | 32,5 | 32,6 | 38,5 | 38,4 |
| 60 | 49,1 | 49,8 | 50,4 | 45,6 | 49,2 | 51,5 | 49,8 | 49,6 | 53,9 | 53,1 |
| 90 | 65,7 | 66,4 | 66,8 | 59,5 | 62,6 | 70,1 | 67,6 | 66,5 | 69,4 | 67,7 |
| 120 | 82,4 | 83,0 | 83,0 | 73,0 | 76,0 | 86,8 | 85,0 | 83,4 | 83,9 | 82,5 |
| 150 | 99,2 | 99,5 | 99,9 | 87,0 | 89,9 | 99,9 | 99,6 | 99,3 | 96,4 | 95,9 |

Tabela 6-10. Zmiana aktywności katalazy S-A dezaktywowanej w temperaturze 40°C dla dwóch rozcieńczeń enzymu

| Roztwór enzymu 1:5000 | | Roztwór enzymu 1:500 | |
|-----------------------|-------|----------------------|-------|
| Czas [min] | a [-] | Czas [min] | a [-] |
| 0 | 1,00 | 0 | 1,00 |
| 95 | 0,99 | 110 | 1,00 |
| 140 | 0,99 | 150 | 0,99 |
| 1200 | 0,83 | 1210 | 0,86 |
| 1500 | 0,82 | 1490 | 0,85 |

Na podstawie wyników z tabeli 6-10, nie stwierdzono istotnych zmian aktywności enzymu spowodowanych sposobem rozcieńczenia. Maksymalna różnica w pomiarach wynosiła 3%.

7. Badanie wpływu nadtlenu wodoru na dezaktywację katalazy

Szybkości dezaktywacji katalazy S-A oraz katalazy N pod wpływem nadtlenu wodoru nie można określić w sposób bezpośredni. Dlatego prowadzono pomiary podczas rozkładu nadtlenu wodoru w reaktorze okresowym izotermicznym, w którym zachodziła równolegle dezaktywacja substratem.

Model takiego reaktora opisuje układ równań różniczkowych (4.4a) i (4.4b). W celu określenia stałej szybkości dezaktywacji k_D katalazy w danej temperaturze, konieczna jest znajomość stałej szybkości dezaktywacji termicznej k_{DT} oraz stałej szybkości reakcji k_R^* rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę. Stałą szybkości dezaktywacji termicznej k_{DT} wyznaczono na podstawie pomiarów zamieszczonych w rozdziale 6, natomiast pomiary k_R^* przeprowadzono w warunkach, gdy można przyjąć, stałość aktywności katalazy. Osiągnięto to przy odpowiednio wysokich stężeniach enzymu i krótkich czasach reakcji.

7.1. Badania wstępne

Wartość stałej szybkości reakcji k_R^* zależy od temperatury oraz pH roztworu nadtlenu wodoru. Przed przystąpieniem do właściwych badań nad dezaktywacją katalazy substratem określono wpływ pH oraz temperatury na szybkość reakcji.

7.1.1. Spektrofotometryczne pomiary stężenia H_2O_2

Według danych literaturowych [1, 6, 106] molowy współczynnik absorpcji ϵ stosowany dla układów reakcyjnych z H_2O_2 w badaniach katalazy wynosi od 35,76 do 46,2 $dm^3/(mol\ cm)$. Te wahania mogą być spowodowane stosowaniem jako dodatków różnego rodzaju buforów.

Podczas prowadzonych pomiarów nadtlenek wodoru buforowano buforem fosforanowym o pH 7. Sprawdzone zatem wpływ użycia buforu na wartość molowego współczynnika absorpcji ϵ .

Przygotowano roztwór nadtlenu wodoru o stężeniu 0,02 mol/dm^3 . Jego stężenie określano metodą manganometryczną, używając roztwór 0,0067 mol/dm^3 manganianu (VII) potasu z mianem nastawionym na szczawian sodu. Następnie przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu wyjściowego (0,02 mol/dm^3) uzyskano roztwory nadtlenu wodoru o stężeniach z zakresu od 0,002 do 0,02 mol/dm^3 . Kolejno przygotowano następujące roztwory H_2O_2 w takim samym zakresie stężeń:

- bez buforu fosforanowego (rozcieńczenie wodą destylowaną),

- z buforem fosforanowym o pH 7,
- z buforem fosforanowym o pH 7 i dodatkiem 20% kwasu siarkowego (VI).

Użycie dodatku kwasu siarkowego (VI) wynikało stąd, że podczas pomiarów określając stężenie nadtlenku wodoru w układzie reakcyjnym dodawano kwasu siarkowego (VI) w celu zahamowania reakcji enzymatycznej.

Wykonano pomiary absorpcji przy użyciu spektrofotometru UV VIS JASCO 530 przy długości fali $\lambda = 240$ nm, dla stężeń nadtlenku wodoru z zakresu od 0,002 do 0,02 mol/dm³. Średnie wartości absorpcji z dwóch pomiarów zestawiono w tabeli 7-1.

Tabela 7-1. Pomiary absorpcji dla badanych roztworów nadtlenku wodoru

| H₂O₂ [mol/dm³] | Absorbancja [-] | | |
|--|------------------------|-------------------|---|
| | bez buforu | buforowany | buforowany i H₂SO₄ |
| 0,02 | 0,8116 | 0,8059 | 0,8096 |
| 0,018 | 0,7347 | 0,7277 | 0,7307 |
| 0,016 | 0,6655 | 0,6455 | 0,6555 |
| 0,014 | 0,5765 | 0,5663 | 0,5665 |
| 0,012 | 0,4948 | 0,4812 | 0,4748 |
| 0,01 | 0,3930 | 0,4079 | 0,393 |
| 0,008 | 0,3300 | 0,3286 | 0,305 |
| 0,006 | 0,2485 | 0,2364 | 0,2185 |
| 0,004 | 0,1682 | 0,1605 | 0,1482 |
| 0,002 | 0,0787 | 0,0853 | 0,0687 |

Na podstawie zebranych wyników wyznaczono molowy współczynnik absorpcji ϵ , którego wartość wynosiła dla poszczególnych roztworów H₂O₂ :

- bez buforu - 40,91 dm³/(mol cm),
- z buforem - 40,38 dm³/(mol cm)
- z buforem i H₂SO₄ - 41,32 dm³/(mol cm).

Stwierdzono, brak wpływu buforu fosforanowego o pH 7 oraz H₂SO₄ na wartość molowego współczynnika absorpcji (różnica jedynie 1% w wartości ϵ) oraz różnicę pomiędzy pomiarami molowego współczynnika absorpcji a danymi literaturowymi mniejszą od 4%.

7.1.2. Wyznaczenie stałej szybkości reakcji rozkładu H_2O_2

Znajomość stałej k_R^* jest konieczna do wyznaczenia stałej szybkości dezaktywacji k_D . Wykonano pomiary pozwalające na wyznaczenie stałej szybkości reakcji k_R^* roztworu reakcyjnego w zakresie temperatur nadtlenu wodoru od $0^\circ C$ do $50^\circ C$. Stężenie nadtlenu wodoru określano dwoma metodami: manganometryczną oraz spektrofotometryczną.

7.1.2.1. Manganometryczna metoda wyznaczania stałej szybkości k_R^*

Przygotowano roztwór katalazy S-A poprzez dodanie $0,05\text{ cm}^3$ preparatu handlowego katalazy S-A do kolby miarowej o objętości 25 cm^3 i uzupełnienie do kreski buforem fosforanowym o pH 7.

Na wytrząsarce umieszczano pięć kolb Erlenmeyera zawierających po 25 cm^3 roztworu nadtlenu wodoru o stężeniach początkowych z zakresu od $0,0152$ do $0,0157\text{ mol/dm}^3$. Całość termostutowano w zadanej temperaturze. Po ustabilizowaniu się temperatury do każdego z układów reakcyjnych, dodawano po $0,1\text{ cm}^3$ roztworu katalazy. Po upływie 2 min, zahamowano reakcję rozkładu, poprzez dodanie do pierwszej kolby 5 cm^3 kwasu siarkowego (VI) (20%). W ten sam sposób mierzono stężenie H_2O_2 w kolejnych próbach po 4 min, 6 min, 8 min, 10 min. Postępując w sposób opisany wyżej dokonano pomiary dla temperatur: $0^\circ C$, $10^\circ C$, $20^\circ C$, $30^\circ C$, $40^\circ C$, $50^\circ C$.

W tabeli 7-2 zebrano średnie wartości stężenia H_2O_2 z dwóch pomiarów, które wykonywano dla całego zakresu temperatur.

Tabela 7-2. Zmiana stężenia H_2O_2 dla katalazy S-A – metoda manganometryczna

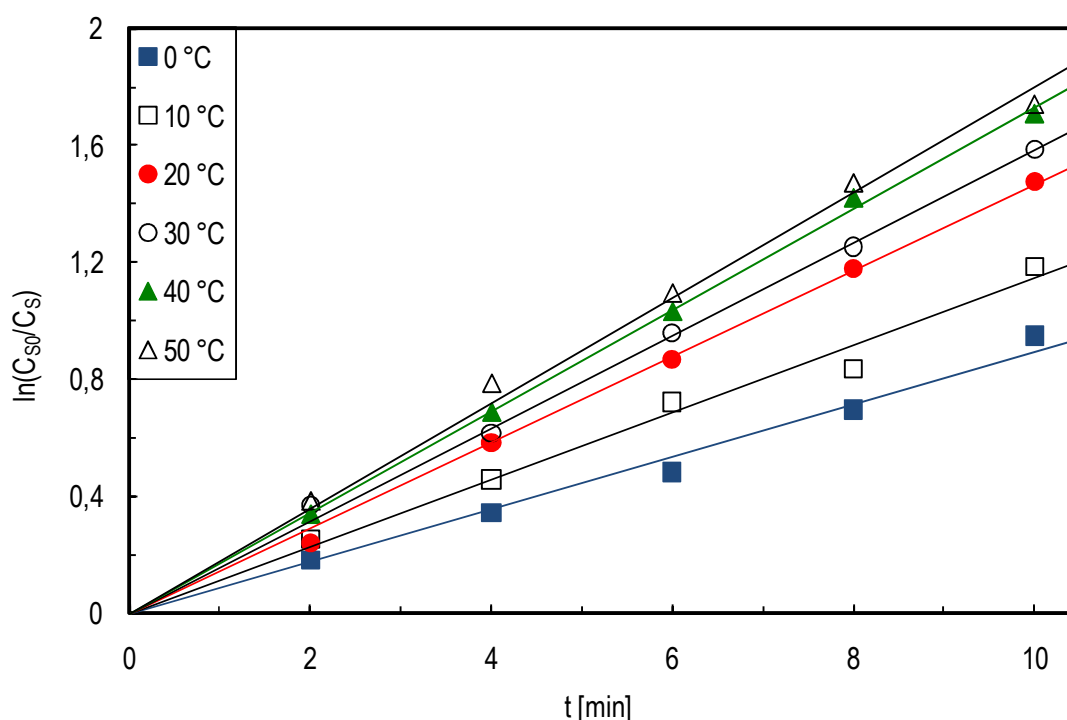
| Temperatura | $0^\circ C$ | $10^\circ C$ | $20^\circ C$ | $30^\circ C$ | $40^\circ C$ | $50^\circ C$ |
|-------------|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Czas [min] | $C_{H_2O_2}$ [mol/dm ³] | | | | | |
| 0 | 0,0152 | 0,0152 | 0,0157 | 0,0154 | 0,0157 | 0,0157 |
| 2 | 0,0127 | 0,0119 | 0,0124 | 0,0107 | 0,0112 | 0,0107 |
| 4 | 0,0108 | 0,0097 | 0,0088 | 0,0083 | 0,0079 | 0,0072 |
| 6 | 0,0094 | 0,0074 | 0,0066 | 0,0059 | 0,0056 | 0,0053 |
| 8 | 0,0076 | 0,0066 | 0,0049 | 0,0044 | 0,0038 | 0,0036 |
| 10 | 0,0059 | 0,0047 | 0,0036 | 0,0032 | 0,0029 | 0,0028 |

Pomiary zmian stężenia nadtlenu wodoru prowadzono przez okres 10 minut. Dla tak krótkiego czasu, można założyć, że dezaktywacja substratem jest do pominięcia i wówczas rozkład

nadtlenku wodoru opisuje rów. (4.4a). Dla warunków początkowych $C_s(t=0) = C_{s0}$ rozwiązując to równanie otrzymujemy następującą postać:

$$\ln \frac{C_{s0}}{C_s} = ak_R^* t \quad (7.1)$$

Dla zakresu temperaturowego od 0°C do 50°C, przy założeniu że $a = 1$, wyznaczono stałe k_R^* metodą regresji liniowej w oparciu o rów. (7.1). Na rys. 7-1 przedstawiono przebieg linii $\ln(C_{s0}/C_s) = f(t)$.



Rys. 7-1. Zależność $\ln(C_{s0}/C_s)$ od czasu t dla katalazy S-A dla różnych temperatur

Współczynniki kierunkowe prostych na rys. 7-1 są równe stałym szybkościom reakcji k_R^* , których wartości zamieszczono w tabeli 7-3.

Tabela 7-3. Doświadczalne stałe szybkości reakcji k_R^* dla katalazy S-A - metoda manganometryczna

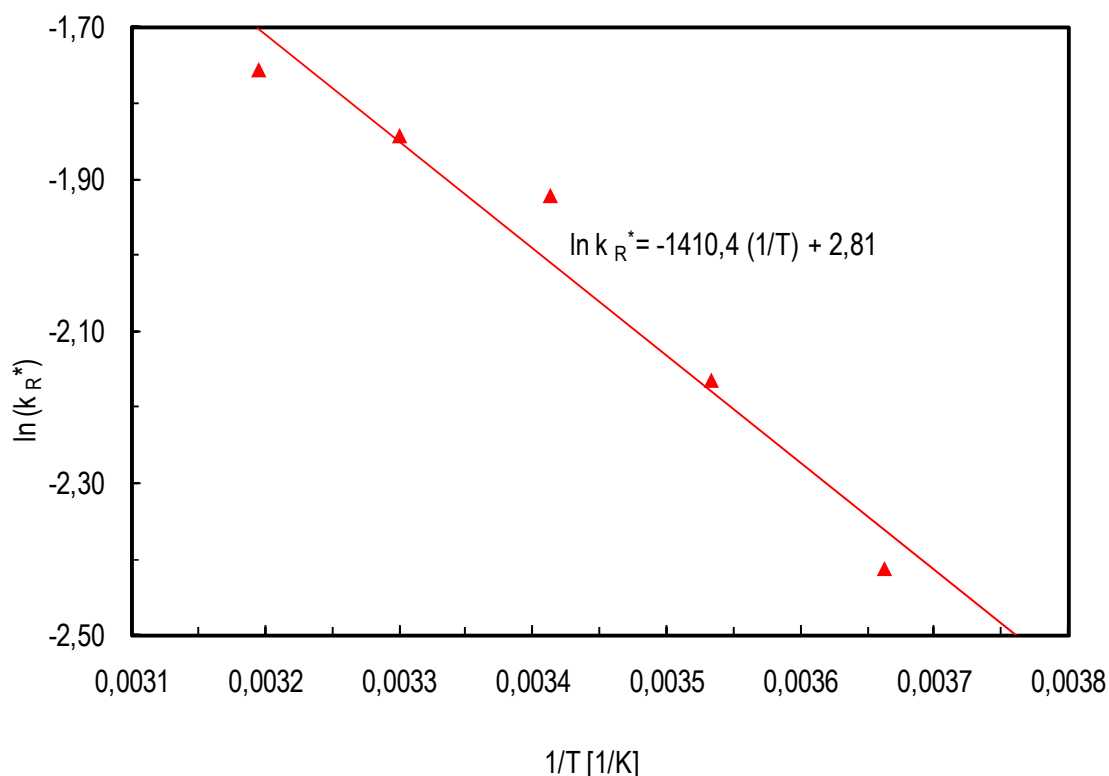
| Temperatura | 0°C | 10°C | 20°C | 30°C | 40°C | 50°C |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| k_R^* [1/min] | 0,0896 | 0,1148 | 0,1464 | 0,1584 | 0,1728 | 0,1804 |
| R^2 | 0,9890 | 0,9890 | 0,9980 | 0,9980 | 0,9990 | 0,9960 |

Stałe szybkości reakcji określone w zakresie temperatur od 0°C do 40°C umożliwiają wyznaczenie energii aktywacji reakcji E_R oraz stałej przedwykładniczej reakcji k_{R0}^* przy

zastosowaniu metody regresji liniowej. W tym celu wykorzystano przekształconą postać równania Arrheniusa:

$$\ln(k_R^*) = \ln(k_{R0}^*) - \frac{E_R}{RT} \quad (7.2)$$

Na rysunku 7-2 przedstawiono zależność logarytmu stałej szybkości reakcji k_R^* od odwrotności temperatury w oparciu o dane z tabeli 7-3.



Rys. 7-2. Zależność logarytmu stałej szybkości reakcji k_R^* od odwrotności temperatury

Korzystając z metody regresji liniowej wyznaczono dla katalazy S-A stałe w równaniu Arrheniusa, które wynoszą $E_R=11,72$ kJ/mol oraz $k_{R0}^*=16,53$ 1/min. W oparciu o wartości stałej energii aktywacji E_R i stałej przedwykładniczej reakcji k_{R0}^* obliczono dla temperatur z zakresu od 35°C do 50°C wartości stałych k_R^* , które użyto do wyznaczania stałych dezaktywacji k_D . W tabeli 7-4 zamieszczono te wartości k_R^* .

Tabela 7-4. Obliczone stałe szybkości reakcji k_R^* katalazy S-A - metoda manganometryczna

| Temperatura | 35°C | 40°C | 45°C | 50°C |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|
| k_R^* [1/min] | 0,1701 | 0,1830 | 0,1964 | 0,2104 |

W celu porównania otrzymanych wyników przeprowadzono kolejne badania pozwalające wyznaczyć k_R^* metodą spektrofotometryczną, przy czasach znacznie krótszych niż w metodzie manganometrycznej.

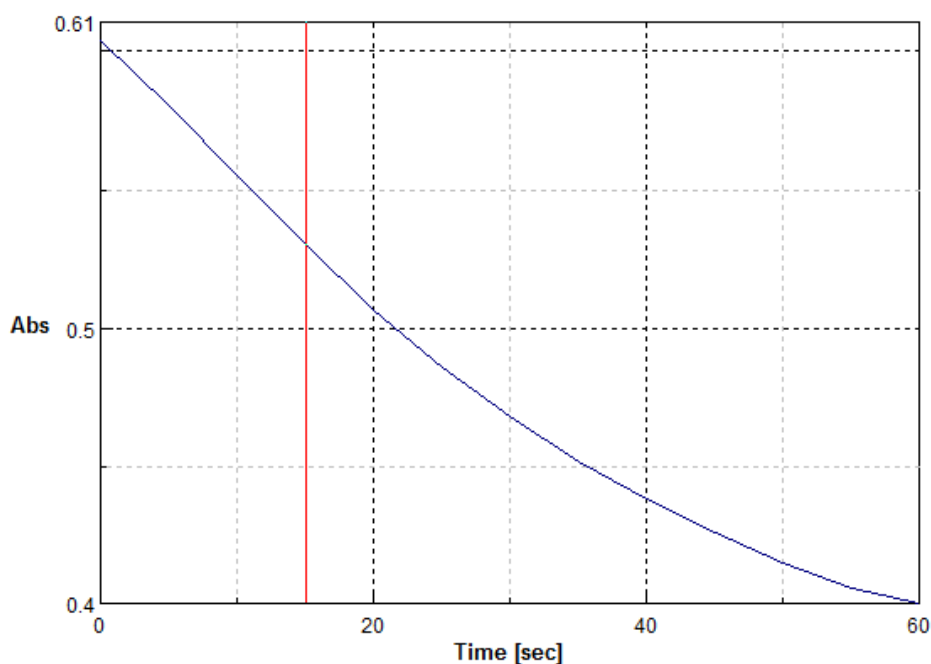
7.1.2.2. Spektrofotometryczna metoda wyznaczania stałej szybkości k_R^*

Pomiary wykonano przy użyciu spektrofotometru UV VIS JASCO 530, stosując termostatowaną przystawkę z mieszadłem magnetycznym, w której umieszczano badaną próbę w kuwecie. Po przeprowadzonych badaniach wstępnych stwierdzono, że pomiar przy wyznaczeniu stałej szybkości k_R^* można skrócić do 15 sekund.

A. Katalaza S-A

Przygotowano roztwór enzymu o stężeniu pozwalającym na wykonanie pomiarów szybkości reakcji. W tym celu do kolby miarowej o objętości 250 cm³ dodano katalazy S-A w ilości 0,05 cm³, uzupełniając następnie buforem fosforanowym o pH 7 do objętości 250 cm³.

Kuweta o objętości 4 cm³ pełniła rolę izotermicznego reaktora okresowego z idealnym wymieszaniem. Do kuwety dodawano nadtlenek wodoru o stężeniu około 0,015 mol/dm³ w ilości 2 cm³. Roztwór mieszano i po osiągnięciu określonej temperatury wprowadzano 0,12 cm³ roztworu katalazy S-A rozpoczynając pomiar spektrofotometryczny, przez okres 60 sekund. Wyniki pomiarów były zapisane w programie Spectra Manager spektrofotometru UV VIS JASCO 530. Na rys. 7-3 przedstawiono przykładowo dla temperatury 35°C przebieg zmian absorpcji w czasie.



Rys. 7-3. Zmiana absorpcji podczas rozkładu H_2O_2 przez katalazę S-A w temperaturze 35°C

Przy pomocy programu Spectra Manager określono wartości k_R^* dla całego zakresu temperatur od 20°C do 60°C. Zdecydowano się określać wartości stałej k_R^* dla pomiarów do 15 sekund, ponieważ zmiana stężenia H_2O_2 przebiegała w tym czasie według zależności liniowej. Dla wartości k_R^* wyznaczonej z wyników pomiarów w zakresie od 0 do 15 sekund, współczynnik determinacji R^2 dla całego zakresu temperatur wynosił powyżej 0,99. W zakresie pomiarowym od 0 do 60 sekund, współczynnik determinacji R^2 dla wyznaczonej wartości k_R^* miał niższą wartość, co wytłumaczyć można ujawnieniem się dezaktywacji substratem.

W tabeli 7-5 przedstawiono średnie wartości k_R^* otrzymane z dwóch pomiarów absorbancji dla nadtlenu wodoru.

Tabela 7-5. Doświadczalne stałe szybkości reakcji k_R^* katalazy S-A – metoda spektrofotometryczna

| T | 20°C | 25°C | 30°C | 35°C | 40°C | 45°C | 50°C | 55°C | 60°C |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| k_R^* [1/min] | 0,2509 | 0,2662 | 0,2941 | 0,2982 | 0,3599 | 0,3725 | 0,4040 | 0,3731 | 0,3388 |
| R^2 | 0,9975 | 0,9978 | 0,9984 | 0,9986 | 0,9982 | 0,9978 | 0,9993 | 0,9934 | 0,9982 |

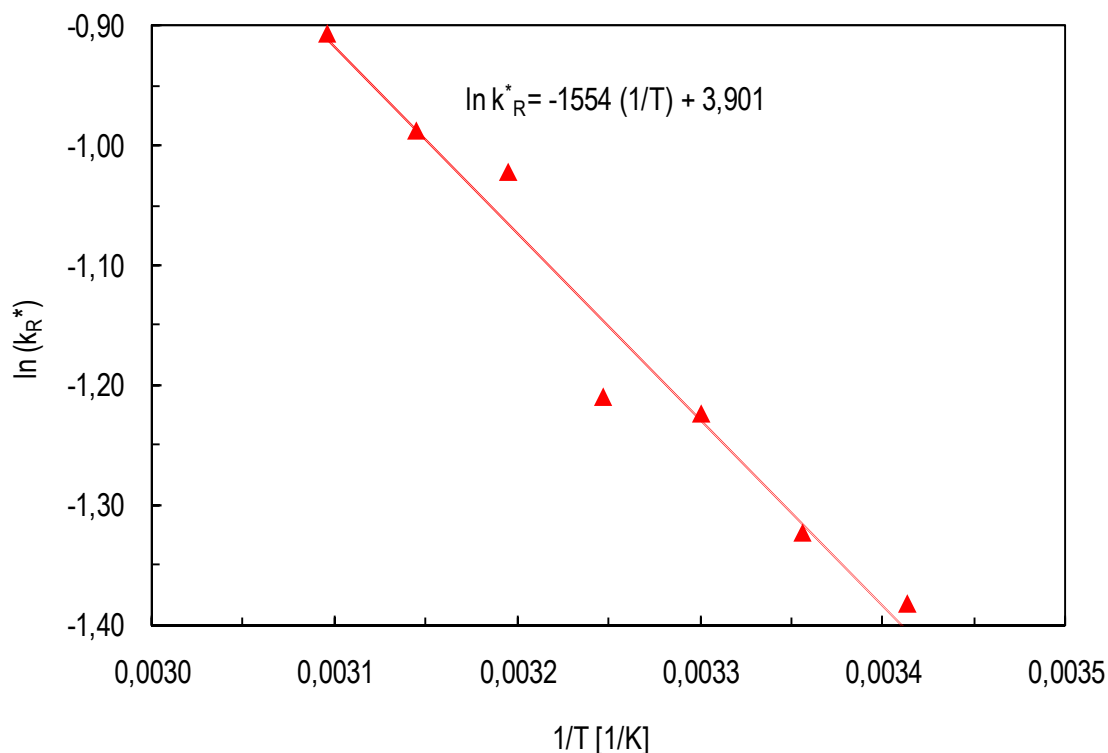
Z danych zawartych w tabeli 7-5 wynika, iż stałe szybkości reakcji wykazują wzrost jedynie do temperatury 50°C. W wyższych temperaturach na wartość wyznaczonej stałej szybkości reakcji wpływa dezaktywacji enzymu. Rezultatem tego są malejące wartości k_R^* .

Stale szybkości reakcji z zakresu temperatur od 20°C do 50°C umożliwiają wyznaczenie stałych z równania Arrheniusa przy zastosowaniu metody regresji liniowej. Na rys. 7-4 przedstawiono zależność logarytmu stałej szybkości reakcji k_R^* od odwrotności temperatury w oparciu o dane z tabeli 7-5. Wyznaczone stałe wynoszą: energia aktywacji reakcji $E_R=12,92$ kJ/mol oraz stała przedwykładnicza szybkości reakcji $k_{R0}^* = 49,47$ 1/min.

Zastosowanie metody spektrofotometrycznej do określania stałej szybkości k_R^* reakcji rozkładu nadtlenu wodoru, dzięki skróceniu czasu pomiaru do 15 sekund, pozwoliło na wykonanie pomiarów w szerszym zakresie temperatur niż w metodzie manganometrycznej – do 50°C bez wpływu dezaktywacji enzymu na dokonywany pomiar.

Wartości k_R^* wyznaczonych w metodzie manganometrycznej i spektrofotometrycznej nie można bezpośrednio porównać, ponieważ w badaniach użyto różne stężenia enzymu. W związku z tym pomocne są obliczenia:

- w metodzie manganometrycznej użyto $8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3$ enzymu na 1 cm^3 nadtlenu wodoru
- w metodzie spektrofotometrycznej użyto $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3$ enzymu na 1 cm^3 nadtlenu wodoru.



Rys. 7-4. Zależność logarytmu stałej szybkości reakcji k_R^* od odwrotności temperatury dla pomiaru spektrofotometrycznego

Z powyższych danych wynika, że wartości stałej k_R^* z pomiarów manganometrycznych powinny być pomnożone przez 1,5 (w związku z różnicą w stężeniach enzymu), by mogły być one porównane z pomiarami k_R^* dokonywanymi metodą spektrofotometryczną.

Korzystając z danych z tabeli 7-4 obliczono wartości stałych k_R^* w zakresie temperatur od 35°C do 50°C i zamieszczono je w tabeli 7-6. W tabeli umieszczono także wartości k_R^* otrzymane w pomiarach spektrofotometrycznych. Z tabeli 7-6 wynika, że w metodzie manganometrycznej otrzymujemy zaniżone wartości k_R^* o około 20-30% w porównaniu do wartości k_R^* wyznaczonych metodą spektrofotometryczną. W metodzie manganometrycznej uwidacznia się wpływ dezaktywacji pod wpływem substratu.

Brak dezaktywacji podczas pomiarów k_R^* w szerokim zakresie temperatur, przy użyciu metody spektrofotometrycznej, jest powodem przyjęcia jej dla pomiarów k_R^* w przypadku katalazy N.

Tabela 7-6. Stałe szybkości reakcji k_R^* dla katalazy S-A określone metodą spektrofotometryczną i obliczone z metody managometrycznej

| Temperatura | | | 35°C | 40°C | 45°C | 50°C |
|-----------------------------|-----|---|--------|--------|--------|--------|
| k_R^* [1/min] | (1) | metoda spektrofotometryczna | 0,2982 | 0,3599 | 0,3725 | 0,4040 |
| | (2) | metoda manganometryczna (obliczone wartości) | 0,2552 | 0,2745 | 0,2746 | 0,3156 |
| $\frac{k_R^*(1)}{k_R^*(2)}$ | | | 1,18 | 1,31 | 1,26 | 1,28 |

B. Katalaza N

Roztwór enzymu przygotowano jednoetapowo. Do kolby miarowej o objętości 50 cm³ dodano katalazy N w ilości 0,05 cm³, uzupełniono buforem fosforanowym o pH 7 do objętości 50 cm³.

Stałą szybkości reakcji rozkładu nadtlenu wodoru k_R^* dla katalazy N, wyznaczono tak samo jak dla katalazy S-A przy użyciu metody spektrofotometrycznej. Średnie wartości z dwóch pomiarów k_R^* wyznaczonych w zakresie temperatur od 20°C do 60°C przedstawiono w tabeli 7-7.

Tabela 7-7. Stałe szybkości reakcji k_R^* określone metodą spektrofotometryczną dla katalazy N

| T | 20°C | 25°C | 30°C | 35°C | 40°C | 45°C | 50°C | 55°C | 60°C |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| k_R^* [1/min] | 0,1595 | 0,1695 | 0,1921 | 0,1978 | 0,1974 | 0,1899 | 0,1827 | 0,1625 | 0,1392 |
| R ² | 0,9986 | 0,9994 | 0,9993 | 0,9992 | 0,9991 | 0,9965 | 0,9978 | 0,9968 | 0,9949 |

Stała szybkości k_R^* katalazy N wykazuje wzrost wartości do temperatury 35°C. W wyższych temperaturach wartości k_R^* maleją. W przypadku katalazy S-A stała szybkości k_R^* wzrastała do temperatury 50°C. Katalaza N charakteryzuje się mniejszą stabilnością w procesie rozkładu nadtlenu wodoru powyżej temperatury 35°C w porównaniu z katalazą S-A.

Dla katalazy N przyjmując rozkład nadtlenu wodoru w temperaturach z zakresu od 20°C do 35°C określono energię reakcji $E_R=11,59$ kJ/mol oraz stałą przedwykładniczą szybkości reakcji $k_{R0}^* = 18,52$ 1/min.

7.1.3. Wpływ pH na aktywność enzymu

7.1.3.1. Porównanie aktywności enzymu w buforze fosforanowym i buforze Brittona-Robinsona

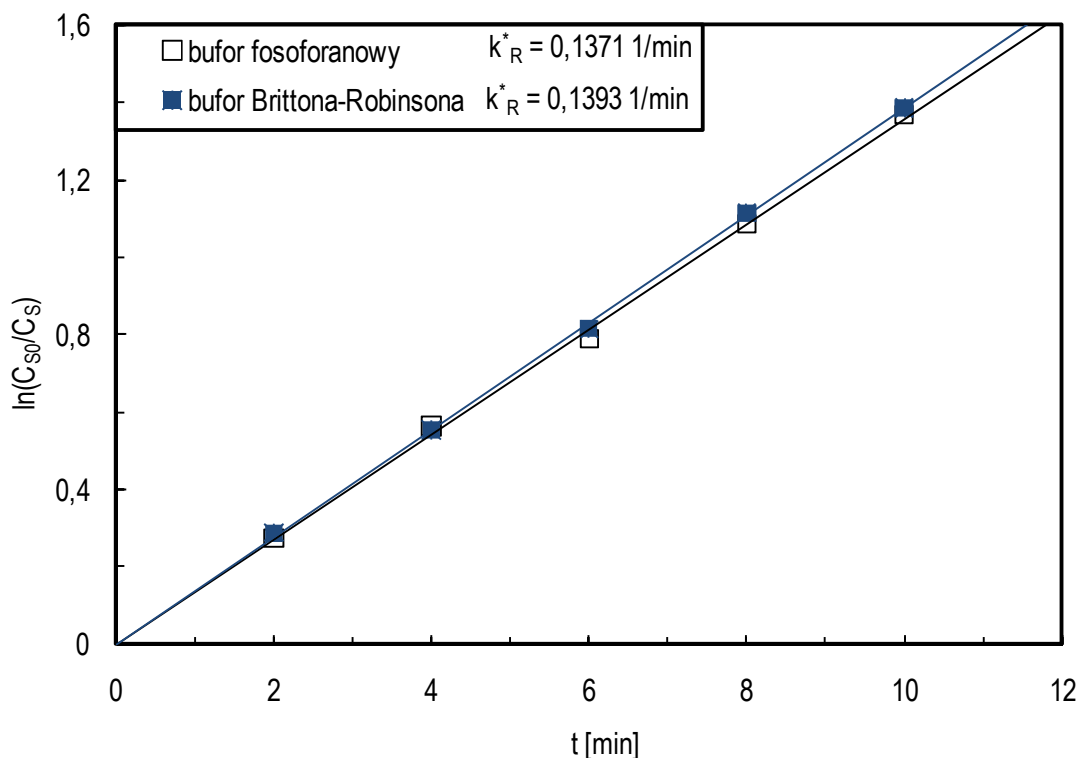
W wielu przypadkach przy tym samym pH rodzaj użytego buforu wpływa na aktywność enzymów. Celem badań było określenie wpływu pH na aktywność katalazy w szerokim zakresie pH od 4 do 10. Ponieważ w całym tym zakresie, nie można użyć buforu fosforanowego, zastosowano więc bufor Brittona-Robinsona. We wcześniejszych badaniach używano roztworu nadtlenu wodoru buforowanego buforem fosforanowym o pH 7. Dlatego pierwsze pomiary jakie wykonano miały na celu wykazać, czy istnieje różnica w aktywności katalazy podczas rozkładu nadtlenu wodoru buforowanego buforem fosforanowym o pH 7 a buforem Brittona-Robinsona o tym samym pH.

Pomiary aktywności katalazy wykonano zgodnie z metodyką pomiarów opisaną w pkt. 7.1.2.1 w temperaturze 20°C. Używano roztworu nadtlenu wodoru o stężeniu 0,015 mol/dm³ buforowanego buforem fosforanowym o pH 7 oraz nadtlenu wodoru o stężeniu 0,0149 mol/dm³ buforowanego buforem Brittona-Robinsona o pH 7. Zmianę stężenia nadtlenu wodoru określano metodą manganometryczną.

Tabela 7-8. Stałe szybkości reakcji k_R^* dla reakcji przebiegającej przy pH 7

| Czas [min] | bufor fosforanowy | bufor Brittona-Robinsona |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | $C_{H_2O_2}$ [mol/dm ³] | $C_{H_2O_2}$ [mol/dm ³] |
| 0 | 0,0150 | 0,0149 |
| 2 | 0,0114 | 0,0111 |
| 4 | 0,0085 | 0,0085 |
| 6 | 0,0067 | 0,0066 |
| 8 | 0,0051 | 0,0049 |
| 10 | 0,0038 | 0,0037 |

Na podstawie średnich wyników z dwóch pomiarów umieszczonych w tabeli 7-8 w oparciu o równ. (7.1) sporządzono rys. 7-5. Korzystając z metody najmniejszych kwadratów określono stałe szybkości reakcji k_R^* .



Rys. 7-5. Zależność $\ln(C_{S0}/C_S)$ od czasu rozkładu H_2O_2 przy pH 7

Otrzymane wartości średnich stałych szybkości reakcji k_R^* dla obydwu buforów różnią się między sobą zaledwie o 1,6% co świadczy o braku wpływu rodzaju stosowanego buforu na aktywność katalazy.

7.1.3.2. Wpływ pH na stałą szybkości k_R^*

Pomiary szybkości reakcji rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę S-A i katalazę N wykonano dla zakresu pH od 4 do 10 w temperaturze 35°C. W całym zakresie pH stosowano bufor Brittona-Robinsona.

Postępowano według metodyki pomiarów przedstawionej w punkcie 7.1.2.2. Zmianę stężenia nadtlenu wodoru o różnym pH określano spektrofotometrycznie.

Na podstawie zebranych danych doświadczalnych spektrofotometrycznych dla czasu pomiaru 15 sekund określono wartości stałej szybkości reakcji k_R^* przy zmiennym pH nadtlenu wodoru. Otrzymane wartości k_R^* ze współczynnikami korelacji dla katalazy S-A oraz katalazy N umieszczono w tabeli 7-9.

Tabela 7-9. Stałe szybkości reakcji k_R^* katalazy S-A oraz katalazy N w zależności od pH roztworu H_2O_2

| pH | k_R^* [1/min] | | | |
|--------------|-----------------|------------|------------|-------------|
| | 4,0 ± 0,10 | 7,0 ± 0,02 | 9,0 ± 0,02 | 10,0 ± 0,13 |
| Katalaza S-A | 0,241 | 0,247 | 0,240 | 0,208 |
| Katalaza N | 0,196 | 0,205 | 0,218 | 0,197 |

Katalaza S-A i N nie wykazują istotnych zmian wartości stałej szybkości reakcji k_R^* w zakresie pH od 4 do 9. W środowisku zasadowym o pH 10 stała szybkości k_R^* spada o około 14% dla katalazy S-A, a o około 10% dla katalazy N.

7.2. Dezaktywacja katalazy pod wpływem substratu

Dezaktywację katalazy S-A oraz katalazy N określano poprzez zmianę stężenia nadtlenu wodoru w reaktorze okresowym izotermicznym, którego rolę spełniała kolba Erlenmeyera.

Do badań przygotowano następujące rozcieńczenia enzymów:

- katalazy S-A (1:500) poprzez dodanie 0,05 cm³ katalazy S-A do kolby miarowej o objętości 25 cm³ i uzupełnieniu do kreski buforem fosforanowym o pH 7,
- katalazy N (1:100) przygotowano poprzez dodanie 1 cm³ enzymu do kolby miarowej o objętości 100 cm³ i uzupełnieniu do kreski buforem fosforanowym o pH 7.

Podczas pomiarów stosowano różne ilości katalazy. Przy większej ilości enzymu otrzymywano wyższy stopień przemiany, przy mniejszych ilościach enzymu uzyskiwano niższy stopień przemiany.

Na wytrząsarce z łąnią wodną w zadanej temperaturze umieszczono 3 kolby Erlenmeyera, w każdej po 200 cm³ nadtlenu wodoru o stężeniu w zakresie od 0,0141 mol/dm³ do 0,0147 mol/dm³. Do każdej z kolb dodano roztwór katalazy (A lub N) w ilości: 0,05 cm³, 0,1 cm³ oraz 0,2 cm³. W odstępach 15 minutowych przez okres 2 h pobierano po 5 cm³ nadtlenu wodoru do probówek szklanych, zawierających 0,1 cm³ 20% H₂SO₄ (w celu zahamowania reakcji rozkładu nadtlenu wodoru).

Pomiar stężenia nadtlenu wodoru wykonywano spektrofotometrem UV VIS JASCO 530, przy długości fali 240 nm. Pomiar dezaktywacji katalazy pod wpływem substratu przeprowadzano w temperaturach: 35°C, 40°C, 45°C i 50°C.

Wyniki pomiarów stężeń podczas rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę S-A lub katalazę N zamieszczono w tabelach od 7-10 do 7-13.

Tabela 7-10. Rozkład H_2O_2 przez katalazę S-A oraz katalazę N w temperaturze 35°C

| Czas [min] | KATALAZA S-A | | | KATALAZA N | | |
|------------|--------------|--------|--------|------------|--------|--------|
| | 0,05 ml | 0,1ml | 0,2 ml | 0,05ml | 0,1ml | 0,2ml |
| 0 | 0,0147 | 0,0147 | 0,0147 | 0,0141 | 0,0141 | 0,0141 |
| 15 | 0,0123 | 0,0105 | 0,0079 | 0,0121 | 0,0103 | 0,0080 |
| 30 | 0,0103 | 0,0076 | 0,0043 | 0,0110 | 0,0091 | 0,0076 |
| 45 | 0,0086 | 0,0059 | 0,0025 | 0,0106 | 0,0083 | 0,0063 |
| 60 | 0,0077 | 0,0049 | 0,0018 | 0,0104 | 0,0079 | 0,0059 |
| 75 | 0,0069 | 0,0041 | 0,0013 | 0,0100 | 0,0075 | 0,0038 |
| 90 | 0,0061 | 0,0034 | 0,0009 | 0,0098 | 0,0075 | 0,0033 |
| 105 | 0,0056 | 0,0030 | 0,0007 | 0,0096 | 0,0074 | 0,0031 |
| 120 | 0,0051 | 0,0028 | 0,0006 | 0,0095 | 0,0071 | 0,0031 |

Tabela 7-11. Rozkład H_2O_2 przez katalazę S-A oraz katalazę N w temperaturze 40°C

| Czas [min] | KATALAZA S-A | | | KATALAZA N | | |
|------------|--------------|--------|--------|------------|--------|--------|
| | 0,05 ml | 0,1ml | 0,2 ml | 0,05ml | 0,1ml | 0,2ml |
| 0 | 0,0145 | 0,0145 | 0,0145 | 0,0146 | 0,0146 | 0,0146 |
| 15 | 0,0119 | 0,0096 | 0,0064 | 0,0129 | 0,0117 | 0,0090 |
| 30 | 0,0098 | 0,0070 | 0,0037 | 0,0128 | 0,0109 | 0,0076 |
| 45 | 0,0086 | 0,0055 | 0,0026 | 0,0128 | 0,0103 | 0,0071 |
| 60 | 0,0078 | 0,0047 | 0,0019 | 0,0115 | 0,0100 | 0,0070 |
| 75 | 0,0068 | 0,0040 | 0,0013 | 0,0112 | 0,0098 | 0,0068 |
| 90 | 0,0068 | 0,0038 | 0,0012 | 0,0110 | 0,0098 | 0,0067 |
| 105 | 0,0065 | 0,0035 | 0,0010 | 0,0109 | 0,0094 | 0,0065 |
| 120 | 0,0062 | 0,0031 | 0,0008 | 0,0105 | 0,0094 | 0,0063 |

Pomiary wykonane w temperaturze 35°C oraz 40°C prowadzono przez okres 2 h. Natomiast dla temperatur 45°C oraz 50°C skrócono je do 90 minut ze względu na brak zmian stężenia nadtlenu wodoru.

Tabela 7-12. Rozkład H_2O_2 przez katalazę S-A oraz katalazę N w temperaturze 45°C

| Czas [min] | KATALAZA S-A | | | KATALAZA N | | |
|------------|--------------|--------|--------|------------|--------|--------|
| | 0,05 ml | 0,1ml | 0,2 ml | 0,05ml | 0,1ml | 0,2ml |
| 0 | 0,0141 | 0,0141 | 0,0141 | 0,0144 | 0,0144 | 0,0144 |
| 15 | 0,0113 | 0,0096 | 0,0082 | 0,0131 | 0,0113 | 0,0085 |
| 30 | 0,0105 | 0,0087 | 0,0066 | 0,0120 | 0,0108 | 0,0077 |
| 45 | 0,0105 | 0,0082 | 0,0057 | 0,0120 | 0,0104 | 0,0078 |
| 60 | 0,0102 | 0,0083 | 0,0055 | 0,0117 | 0,0099 | 0,0071 |
| 75 | 0,0099 | 0,0081 | 0,0054 | 0,0110 | 0,0097 | 0,0071 |
| 90 | 0,0097 | 0,0078 | 0,0050 | 0,0109 | 0,0096 | 0,0069 |

Tabela 7-13. Rozkład H_2O_2 przez katalazę S-A oraz katalazę N w temperaturze 50°C

| Czas [min] | KATALAZA S-A | | | KATALAZA N | | |
|------------|--------------|--------|--------|------------|--------|--------|
| | 0,05 ml | 0,1ml | 0,2 ml | 0,05ml | 0,1ml | 0,2ml |
| 0 | 0,0145 | 0,0145 | 0,0145 | 0,0144 | 0,0144 | 0,0144 |
| 15 | 0,0129 | 0,0113 | 0,0095 | 0,0128 | 0,0119 | 0,0096 |
| 30 | 0,0121 | 0,0108 | 0,0090 | 0,0125 | 0,0114 | 0,0085 |
| 45 | 0,0119 | 0,0105 | 0,0089 | 0,0120 | 0,0108 | 0,0083 |
| 60 | 0,0115 | 0,0104 | 0,0089 | 0,0115 | 0,0105 | 0,0080 |
| 75 | 0,0113 | 0,0102 | 0,0088 | 0,0114 | 0,0102 | 0,0078 |
| 90 | 0,0112 | 0,0099 | 0,0087 | 0,0111 | 0,0101 | 0,0079 |

Analiza wyników pomiarów została przedstawiona w rozdziale 9.2, a ich omówienie w rozdziale 11.

7.3. Wpływ pH na dezaktywację katalazy substratem

Przeprowadzono badania, których celem było określenie wpływu pH roztworu nadtlenu wodoru na dezaktywację katalazy S-A oraz katalazy N. Do badań używano nadtlenu wodoru o stężeniu początkowym w zakresie od 0,0142 do 0,0148 mol/dm³, buforowanego buforem Brittona -Robinsona o pH w zakresie od 4 do 9.

Metodyka prowadzenia badań była zgodna z opisem w punkcie 7.2. Badania prowadzono w temperaturze 35°C przy zmiennym pH (4, 7, 9, 10) roztworu nadtlenu wodoru. Wyniki pomiarów zmieniającego się stężenia nadtlenu wodoru w czasie, dla katalazy S-A oraz katalazy N przedstawiono w tabelach od 7-14 do 7-17.

Tabela 7-14. Rozkład H₂O₂ (pH 4) przez katalazę S-A oraz katalazę N

| Czas [min] | KATALAZA S-A | | | KATALAZA N | | |
|------------|--------------|--------|--------|------------|--------|--------|
| | 0,05 ml | 0,1ml | 0,2 ml | 0,05ml | 0,1ml | 0,2ml |
| 0 | 0,0142 | 0,0142 | 0,0142 | 0,0142 | 0,0142 | 0,0142 |
| 15 | 0,0114 | 0,0100 | 0,0069 | 0,0116 | 0,0106 | 0,0069 |
| 30 | 0,0098 | 0,0076 | 0,0040 | 0,0111 | 0,0094 | 0,0047 |
| 45 | 0,0083 | 0,0059 | 0,0023 | 0,0107 | 0,0090 | 0,0041 |
| 60 | 0,0075 | 0,0048 | 0,0016 | 0,0104 | 0,0087 | 0,0038 |
| 75 | 0,0067 | 0,0039 | 0,0010 | 0,0101 | 0,0085 | 0,0034 |
| 90 | 0,0058 | 0,0032 | 0,0009 | 0,0097 | 0,0084 | 0,0033 |
| 105 | 0,0056 | 0,0029 | 0,0008 | 0,0094 | 0,0082 | 0,0032 |
| 120 | 0,0055 | 0,0027 | 0,0007 | 0,0091 | 0,0080 | 0,0030 |

Tabela 7-15. Rozkład H₂O₂ (pH 7) przez katalazę S-A oraz katalazę N

| Czas [min] | KATALAZA S-A | | | KATALAZA N | | |
|------------|--------------|--------|--------|------------|--------|--------|
| | 0,05 ml | 0,1ml | 0,2 ml | 0,05ml | 0,1ml | 0,2ml |
| 0 | 0,0142 | 0,0142 | 0,0142 | 0,0142 | 0,0142 | 0,0142 |
| 15 | 0,0112 | 0,0098 | 0,0070 | 0,0116 | 0,0096 | 0,0068 |
| 30 | 0,0097 | 0,0076 | 0,0041 | 0,0115 | 0,0089 | 0,0047 |
| 45 | 0,0085 | 0,0059 | 0,0024 | 0,0109 | 0,0085 | 0,0043 |
| 60 | 0,0079 | 0,0048 | 0,0018 | 0,0105 | 0,0082 | 0,0037 |
| 75 | 0,0075 | 0,0040 | 0,0016 | 0,0106 | 0,0081 | 0,0032 |
| 90 | 0,0069 | 0,0032 | 0,0010 | 0,0103 | 0,0078 | 0,0030 |
| 105 | 0,0064 | 0,0028 | 0,0008 | 0,0099 | 0,0074 | 0,0028 |
| 120 | 0,0057 | 0,0018 | 0,0003 | 0,0095 | 0,0070 | 0,0026 |

Tabela 7-16. Rozkład H_2O_2 (pH 9) przez katalazę S-A oraz katalazę N

| Czas [min] | KATALAZA S-A | | | KATALAZA N | | |
|------------|--------------|--------|--------|------------|--------|--------|
| | 0,05 ml | 0,1ml | 0,2 ml | 0,05ml | 0,1ml | 0,2ml |
| 0 | 0,0143 | 0,0143 | 0,0143 | 0,0144 | 0,0144 | 0,0144 |
| 15 | 0,0124 | 0,0116 | 0,0087 | 0,0118 | 0,0105 | 0,0062 |
| 30 | 0,0118 | 0,0113 | 0,0064 | 0,0116 | 0,0094 | 0,0044 |
| 45 | 0,0118 | 0,0108 | 0,0054 | 0,0111 | 0,0090 | 0,0035 |
| 60 | 0,0115 | 0,0105 | 0,0049 | 0,0109 | 0,0086 | 0,0031 |
| 75 | 0,0109 | 0,0102 | 0,0045 | 0,0105 | 0,0083 | 0,0028 |
| 90 | 0,0107 | 0,0101 | 0,0042 | 0,0098 | 0,0077 | 0,0023 |
| 105 | 0,0099 | 0,0094 | 0,0040 | 0,0097 | 0,0075 | 0,0021 |
| 120 | 0,0097 | 0,0090 | 0,0038 | 0,0094 | 0,0073 | 0,0019 |

Tabela 7-17. Rozkład H_2O_2 (pH 10) przez katalazę S-A oraz katalazę N

| Czas [min] | KATALAZA S-A | | | KATALAZA N | | |
|------------|--------------|--------|--------|------------|--------|--------|
| | 0,05 ml | 0,1ml | 0,2 ml | 0,05ml | 0,1ml | 0,2ml |
| 0 | 0,0144 | 0,0144 | 0,0144 | 0,0148 | 0,0148 | 0,0148 |
| 15 | 0,0133 | 0,0116 | 0,0100 | 0,0127 | 0,0098 | 0,0071 |
| 30 | 0,0127 | 0,0101 | 0,0090 | 0,0123 | 0,0085 | 0,0054 |
| 45 | 0,0121 | 0,0097 | 0,0085 | 0,0118 | 0,0078 | 0,0043 |
| 60 | 0,0115 | 0,0094 | 0,0083 | 0,0115 | 0,0074 | 0,0041 |
| 75 | 0,0111 | 0,0091 | 0,0081 | 0,0112 | 0,0072 | 0,0039 |
| 90 | 0,0109 | 0,0086 | 0,0078 | 0,0102 | 0,0070 | 0,0040 |
| 105 | 0,0100 | 0,0085 | 0,0075 | 0,0099 | 0,0068 | 0,0037 |
| 120 | 0,0097 | 0,0080 | 0,0072 | 0,0095 | 0,0065 | 0,0037 |

Na podstawie wyników pomiarów, określono wartości k_D które zamieszczono w rozdziale 9.3.

8. Opis matematyczny rozkładu H₂O₂ z uwzględnieniem dezaktywacji katalazy

W rozdziale 4 przedstawiono model matematyczny opisujący rozkład nadtlenu wodoru w izotermicznym reaktorze okresowym. Wykazano, że numeryczne rozwiązania tego modelu jest możliwe jeżeli będą znane stałe kinetyczne reakcji oraz stałe kinetyczne dezaktywacji katalazy. Najpierw wykonano badania nad dezaktywacją termiczną katalazy S-A oraz katalazy N a wyniki pomiarów zamieszczono w rozdziale 6. Następnie na podstawie pomiarów szybkości reakcji rozkładu nadtlenu wodoru wyznaczono stałe szybkości reakcji k_R^* (rozdział 7). W tym samym rozdziale zamieszczono wyniki badań dezaktywacji katalazy pod wpływem substratu. Analiza wyników pomiarów pozwoliła na identyfikację parametrów kinetycznych dezaktywacji termicznej i substratem, którą przedstawiono w tym rozdziale.

8.1. Dezaktywacja termiczna katalazy

Zakładając, że dezaktywacja termiczna przebiega według jednostopniowego mechanizmu $E \rightarrow D$ wówczas stosownie do analizy z rozdziału 3.1.1 zmianę aktywności enzymu opisuje rów. (3.3):

$$a = \exp(-k_{DT}t) \quad (3.3)$$

Po uwzględnieniu zależności Arrheniusa i wprowadzeniu temperatury odniesienia T_{od} , zmianę aktywności można opisać rów. (3.6):

$$a_i = \exp \left[-k_{D,T_{od}} \exp \left[\frac{E_{DT}}{R} \left(\frac{1}{T_{od}} - \frac{1}{T_j} \right) \right] t_i \right] \quad (3.6)$$

gdzie: i - numer pomiaru (0,1,2...n),

j - temperatura pomiaru [K].

W oparciu o to równanie poszukiwano stałych $k_{D,T_{od}}$ i E_{DT} . Temperaturę odniesienia T_{od} określono na podstawie rów. (3.9).

W celu wyznaczenia stałych $k_{D,T_{od}}$ i E_{DT} dezaktywacji termicznej katalazy, zastosowano program Mathcad 14. Wykorzystano procedurę Levenberga-Marquardta, przy poszukiwaniu minimum funkcji celu SSE:

$$SSE(E_{DT}, k_{D,T_{od}}) = \sum_{i=0}^n ((a_{dosw})_i - a(E_{DT}, k_{D,T_{od}}, t_i, T_i, T_{od}))^2 \quad (8.1)$$

gdzie: $(a_{dosw})_i$ - to kolejne aktywności wyznaczone doświadczalnie zawarte w tabeli 6-7 lub 6-8,

$a(E_{DT}, k_{D,T_{od}}, t_i, T_i, T_{od})$ -aktywności obliczone na podstawie rów. (3.6).

8.1.1. Parametry kinetyczne procesu dezaktywacji termicznej dla katalazy S-A

Na podstawie wyników pomiarów aktywności katalazy S-A (Tabela 6-7) obliczono stałe: T_{od} , $k_{D,Tod}$, E_{DT} , które zamieszczono w tabeli 8-1, a przy ich użyciu po przekształceniu zależności arrheniusowskiej obliczono wartość stałej przedwykładniczej szybkości dezaktywacji $k_{(DT)0}$:

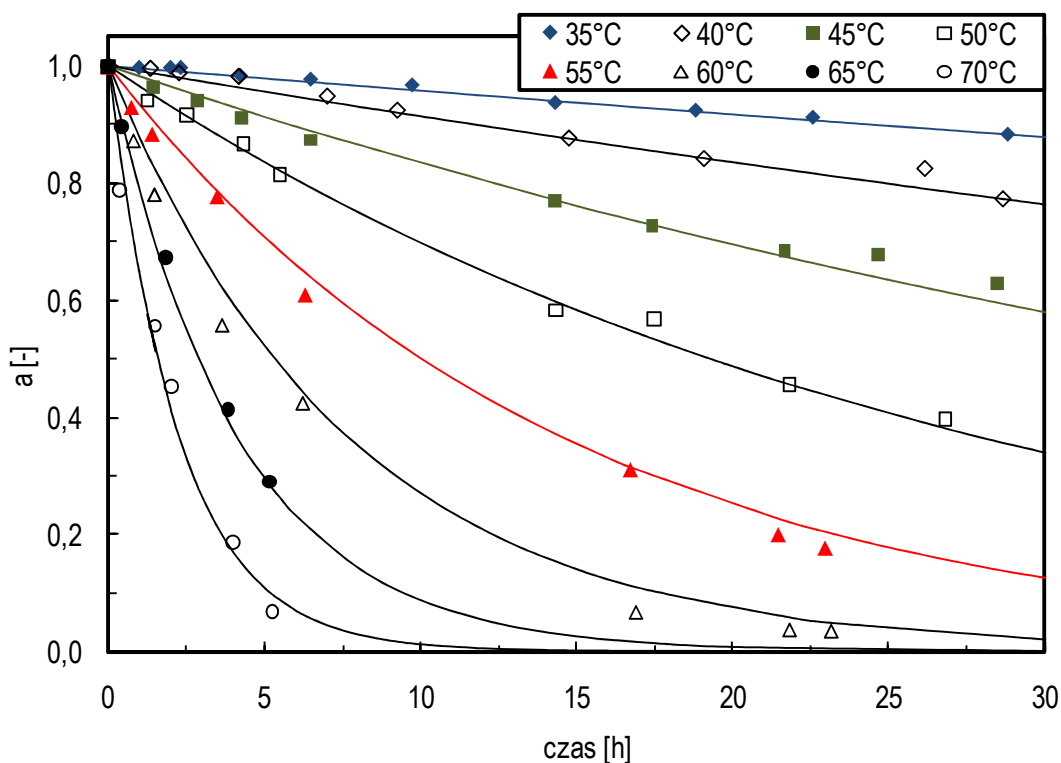
$$k_{(DT)0} = \frac{k_{D,Tod}}{\exp\left(-\frac{E_R}{RT_{od}}\right)} \quad (8.2)$$

Tabela 8-1. Wyznaczone parametry kinetyczne procesu dezaktywacji termicznej dla katalazy S-A

| Wyznaczone parametry kinetyczne | | Wskaźniki statystyczne | | |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------|-------|----------|
| | | SSE | r | σ |
| T_{od} [K] | 328,9 | 0,030 | 0,997 | 0,022 |
| $k_{D,Tod}$ [1/h] | 0,078 | | | |
| E_{DT} [kJ/mol] | 116,0 | | | |
| $k_{(DT)0}$ [1/h] | $2,057 \cdot 10^{17}$ | | | |

Wskaźniki statystyczne z tabeli 8-1 potwierdzają to, iż obliczone na podstawie 66 punktów doświadczalnych stałe T_{od} , $k_{D,Tod}$, E_{DT} , $k_{(DT)0}$ są najlepszym rozwiązaniem.

Wyznaczone wartości przedwykładniczej stałej szybkości dezaktywacji $k_{(DT)0}$ oraz energii aktywacji procesu dezaktywacji termicznej E_{DT} pozwoliły na określenie zmian aktywności enzymu w czasie. Na rys. 8-1 przedstawiono obliczone wartości aktywności dla całego zakresu temperatur od 35°C do 70°C i porównano je z punktami doświadczalnymi.



Rys. 8-1. Zmiana aktywności katalazy S-A podczas dezaktywacji termicznej

W tabeli 8-2 zebrano dane statystyczne (współczynnik korelacji r , odchylenie standardowe σ , średni błąd względny $\bar{\delta}$) dla poszczególnych temperatur, w których prowadzono dezaktywację termiczną katalazy S-A.

Tabela 8-2. Wskaźniki statystyczne dla doświadczeń z katalazą S-A dezaktywowaną termicznie

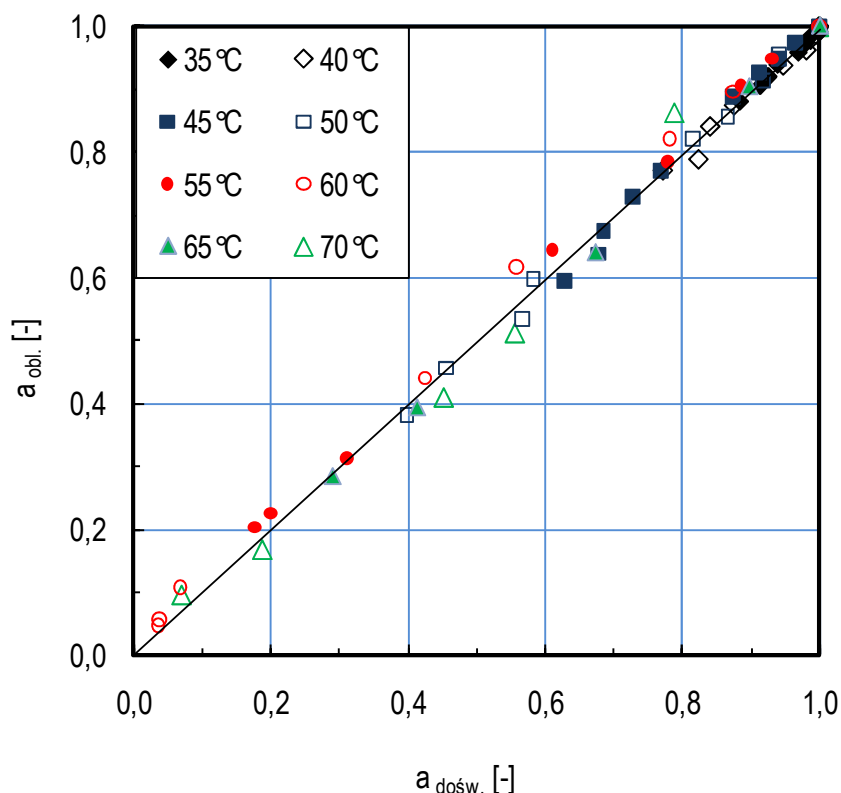
| | T=35°C | T=40°C | T=45°C | T=50°C | T=55°C | T=60°C | T=65°C | T=70°C |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| r | 0,997 | 0,991 | 0,996 | 0,998 | 0,999 | 0,998 | 0,999 | 0,993 |
| σ | 0,004 | 0,012 | 0,012 | 0,015 | 0,014 | 0,024 | 0,017 | 0,044 |
| $\bar{\delta}$ | 0,004 | 0,009 | 0,007 | 0,007 | 0,049 | 0,207 | 0,022 | 0,038 |

Pomiędzy obliczoną aktywnością a aktywnością doświadczalną katalazy S-A dla wszystkich temperatur z zakresu od 35°C do 70°C:

- współczynniki korelacji Pearsona r wynosił powyżej 0,99
- odchylenie standardowe było niższe od 0,025
- średni błąd względny dla katalazy S-A był niższy od 0,05 poza temperaturą 60°C.

Analiza wykazała, że średni błąd względny dla temperatury 60°C spowodowany jest pomiarami w końcowej fazie doświadczeń, przy bardzo niskiej aktywności, gdy stosunkowo niewielkie różnice w wartościach bezwzględnych prowadzą do dużych błędów względnych.

Na rysunku 8-2 porównano aktywność katalazy obliczoną z rów. (3.6) dla wyznaczonych stałych, $k_{(DT)0}$, E_{DT} z aktywnością katalazy określoną doświadczalnie.



Rys. 8-2. Porównanie aktywności obliczonych i doświadczalnych dla katalazy S-A

Rozmieszczeniem punktów wzdłuż przekątnej na rys. 8-2 świadczy o niewielkich różnicach pomiędzy aktywnością katalazy S-A obliczoną z rów. (3.6) i aktywnością określoną w sposób doświadczalny.

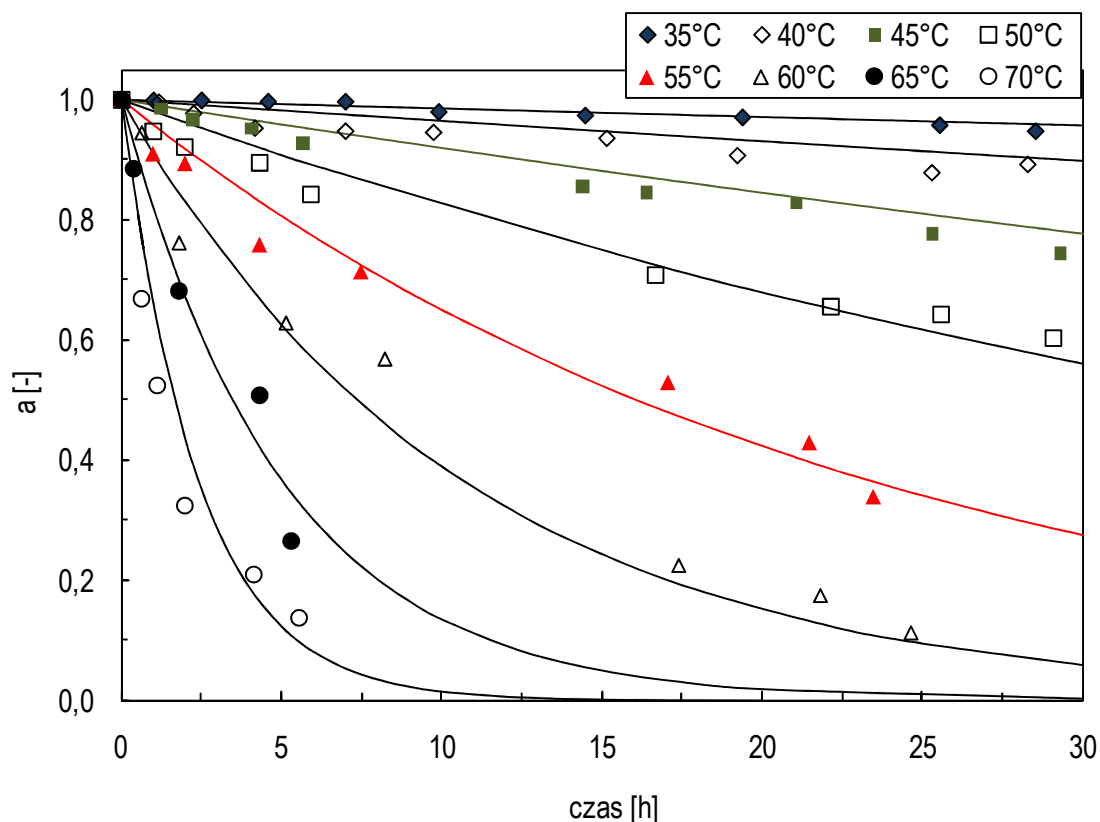
8.1.2. Parametry kinetyczne procesu dezaktywacji termicznej dla katalazy N

Wykorzystując dane doświadczalne dezaktywacji termicznej katalazy N z tabeli 6-8, określono stałe T_{od} , $k_{D,Tod}$, E_{DT} , $k_{(DT)0}$ których wartości zamieszczono w tabeli 8-3. Tak, jak w przypadku katalazy S-A, tak i w tym przypadku wskaźniki statystyczne z tabeli 8-3 potwierdzają, iż obliczone na podstawie 66 punktów doświadczalnych stałe T_{od} , $k_{D,Tod}$, E_{DT} , $k_{(DT)0}$ są najlepszym rozwiązaniem.

Tabela 8-3. Wyznaczone parametry kinetyczne katalazy N dla procesu dezaktywacji termicznej

| Wyznaczone parametry kinetyczne | | Wskaźniki statystyczne | | |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------|-------|----------|
| | | SSE | r | σ |
| T_{od} [K] | 331,6 | 0,544 | 0,948 | 0,083 |
| $k_{D,Tod}$ [1/h] | 0,076 | | | |
| E_{DT} [kJ/mol] | 141,6 | | | |
| $k_{(DT)0}$ [1/h] | $1,528 \cdot 10^{21}$ | | | |

Wyznaczone wartości $k_{(DT)0}$ oraz E_{DT} pozwoliły na określenie zmian aktywności enzymu w czasie. Na rysunku 8-3 przedstawiono obliczone wartości aktywności dla całego zakresu temperatur od 35°C do 70°C i porównano je z punktami doświadczalnymi.



Rys. 8-3. Zmiana aktywności katalazy N podczas dezaktywacji termicznej

W tabeli 8-4 zebrano dane statystyczne dla poszczególnych temperatur w których prowadzono dezaktywację termiczną katalazy N.

Pomiędzy obliczoną aktywnością a aktywnością doświadczalną katalazy N dla wszystkich temperatur z zakresu od 35°C do 70°C:

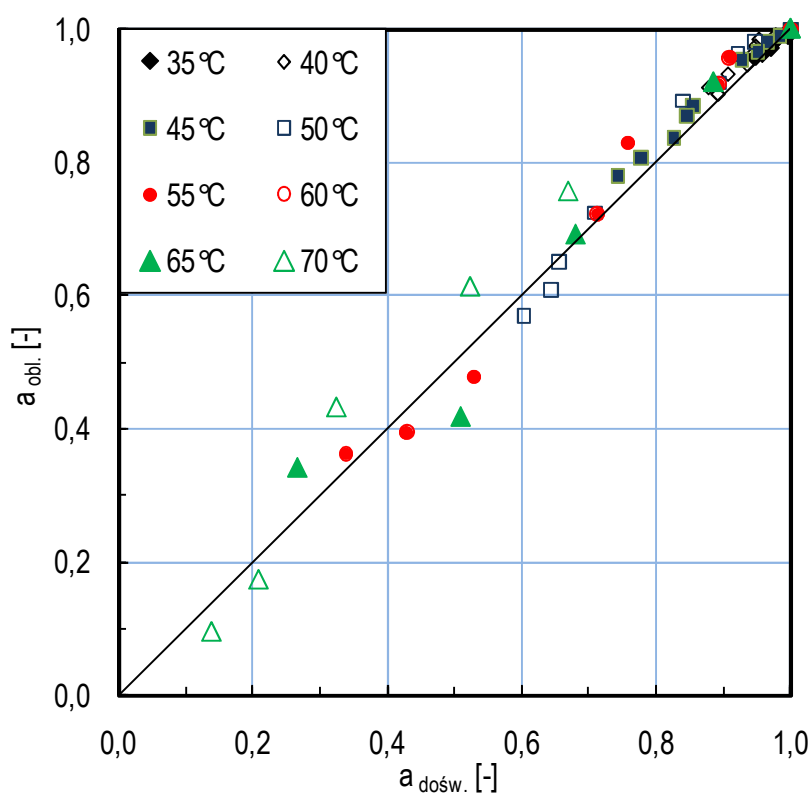
- współczynniki korelacji Pearsona r wynosił powyżej 0,95,
- odchylenie standardowe było niższe od 0,071,
- średni błąd względny niższy od 0,08.

W tabeli 8-3 minimum funkcji celu SSE dla wyznaczonych stałych w przypadku katalazy N wynosi 0,544. Również wyższe było odchylenie standardowe w porównaniu do wyników badań dezaktywacji termicznej katalazy S-A (tabela 8-1).

Tabela 8-4. Wskaźniki statystyczne dla doświadczeń z katalazą N dezaktywowaną termicznie

| | T=35°C | T=40°C | T=45°C | T=50°C | T=55°C | T=60°C | T=65°C | T=70°C |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| r | 0,982 | 0,956 | 0,996 | 0,990 | 0,991 | 0,991 | 0,978 | 0,981 |
| σ | 0,004 | 0,013 | 0,009 | 0,023 | 0,036 | 0,050 | 0,071 | 0,069 |
| $\bar{\delta}$ | 0,001 | 0,020 | 0,023 | 0,008 | 0,010 | 0,080 | 0,034 | 0,030 |

Rozmieszczeniem punktów wzdłuż przekątnej na rys. 8-4 wykazuje nieco wyższe odchylenia pomiędzy aktywnością katalazy N obliczoną z równ. (3.6) dla stałych T_{od} , $k_{D,Tod}$, E_{DT} , $k_{(DT)0}$ a aktywnością określoną w sposób doświadczalny, w porównaniu z katalazą S-A (rys. 8-2).



Rys. 8-4. Porównanie aktywności obliczonych i doświadczalnych dla katalazy N

Jednak przeprowadzone analizy statystyczne w poszczególnych temperaturach z zakresu od 35°C do 70°C dla katalazy N dały zadawalające wyniki. Pozwalają one na stwierdzenie, iż zarówno w przypadku katalazy S-A jak i katalazy N właściwie określono stałe E_{DT} oraz $k_{(DT)0}$.

8.2. Dezaktywacja katalazy pod wpływem substratu

Model bioreaktora okresowego izotermicznego do rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę, opisany jest układem równań (4.4a) i (4.4b)

$$\frac{dC_s}{dt} = -k_R^* a C_s \quad (4.4a)$$

$$\frac{da}{dt} = -k_D a C_s - k_{DT} a \quad (4.4b)$$

z warunkami początkowymi $C_s(t=0) = C_{s0}$ oraz $a(t=0) = 1$.

Podczas analizy tego typu bioreaktora konieczna jest identyfikacja parametrów modelu: stałej szybkości reakcji k_R^* , stałej szybkości dezaktywacji termicznej k_{DT} , a na ich podstawie stałej szybkości dezaktywacji k_D . Wyznaczanie tych parametrów odbywa się poprzez pomiary wykonywane w warunkach laboratoryjnych.

Podczas rozkładu nadtlenu wodoru o stężeniach w zakresie od 0,0015 mol/dm³ do 0,015 mol/dm³, można założyć brak wpływu dezaktywacji termicznej ($k_{DT}=0$). Wówczas model bioreaktora można uprościć do następującej postaci:

$$\frac{dC_s}{dt} = -k_R^* a C_s \quad (5.1)$$

$$\frac{da}{dt} = -k_D a C_s \quad (5.2)$$

z warunkami początkowymi jak dla równań (4.4a) i (4.4b).

Korzystając z definicji stopnia przemiany $\alpha = (C_{s0} - C_s)/C_{s0}$ powyższy układ równań (5.1) i (5.2) można opisać:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k_R^* a (1 - \alpha) \quad (8.3a)$$

$$\frac{da}{dt} = -k_D C_{s0} (1 - \alpha) \quad (8.3b)$$

z warunkami początkowymi:

$$\alpha(t=0) = 0 \quad a(t=0) = 1 \quad (8.3c)$$

W celu analitycznego rozwiązania tego układu równań, podzielono rów. (8.3a) i (8.3b) stronami otrzymując

$$\frac{d\alpha}{da} = -\frac{k_R^*}{k_D C_{S_0}} \quad (8.4)$$

Zakładając warunki początkowe i końcowe:

$$\alpha(t=0) = 0 \quad \alpha(t) = \alpha \quad a(t=0) = 1 \quad a(t) = a \quad (8.4a)$$

wykonano całkowanie rów. (8.4) i otrzymano następującą zależność:

$$a = 1 - \frac{k_D C_{S_0}}{k_R^*} \alpha \quad (8.5)$$

Podstawienie rów. (8.5) do rów. (8.3a) oraz po rozdzieleniu zmiennych otrzymano

$$\frac{d\alpha}{(1-\alpha) \left(1 - \frac{k_D C_{S_0}}{k_R^*} \alpha \right)} = k_R^* dt \quad (8.6)$$

Rozwiązaniem tego równania przy założeniu, że $\frac{k_D C_{S_0}}{k_R^*} \neq 1$ jest zależność między stopniem

przemiany α a czasem t :

$$\alpha = \frac{1 - \exp[(k_R^* - k_D C_{S_0}) t]}{C_{S_0} \frac{k_D}{k_R^*} - \exp[(k_R^* - k_D C_{S_0}) t]} \quad (8.7)$$

W szczególnym przypadku, gdy $\frac{k_D C_{S_0}}{k_R^*} = 1$ otrzymujemy poniższe zależności:

$$\alpha = 1 - \frac{1}{(k_R^* t + 1)} \quad (8.8a)$$

$$a = \frac{1}{(k_R^* t + 1)} \quad (8.8b)$$

Do wyznaczenia stałej szybkości dezaktywacji k_D wykorzystano pomiary stężeń nadtlenku wodoru podczas jego rozkładu przez katalazę S-A i katalazę N. Wyniki tych pomiarów zamieszczono w tabelach od 7-10 do 7-13. Dane te pozwoliły obliczyć stopnie przemiany. Wykorzystano je w poszukiwaniu minimum funkcji celu SSE przy zastosowaniu regresji nieliniowej i procedury optymalizacyjnej Levenberga-Marquardta:

$$SSE(k_D) = \sum_{i=0}^n ((\alpha_{dosw})_i - \alpha(k_D, t_i))^2 \quad (8.9)$$

gdzie: $(\alpha_{dosw})_i$ - stopień przemiany określony w oparciu o dane z tabel 7-10 do 7-13,

$\alpha(k_D, t_i)$ - stopnie przemiany obliczone na podstawie rów. (8.7).

Wstępna analiza danych doświadczalnych wykazała jednak, że stałe k_R^* i k_D w rów. (8.7) są silnie skorelowane. W związku z tym w obliczeniach użyto stałych szybkości reakcji k_R^* wyznaczonych na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych zamieszczonych w pkt 7.1.2.2.

8.2.1. Stałe szybkości dezaktywacji substratem dla katalazy S-A

Na podstawie pomiarów stężenia nadtlenu wodoru z tabel od 7-10 do 7-13 obliczono stopnie przemiany w czasie przebiegu reakcji rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę S-A. Wyznaczono stałe szybkości dezaktywacji k_D w zakresie temperatur od 35°C do 50°C, a otrzymane dane zamieszczono w tabeli 8-5.

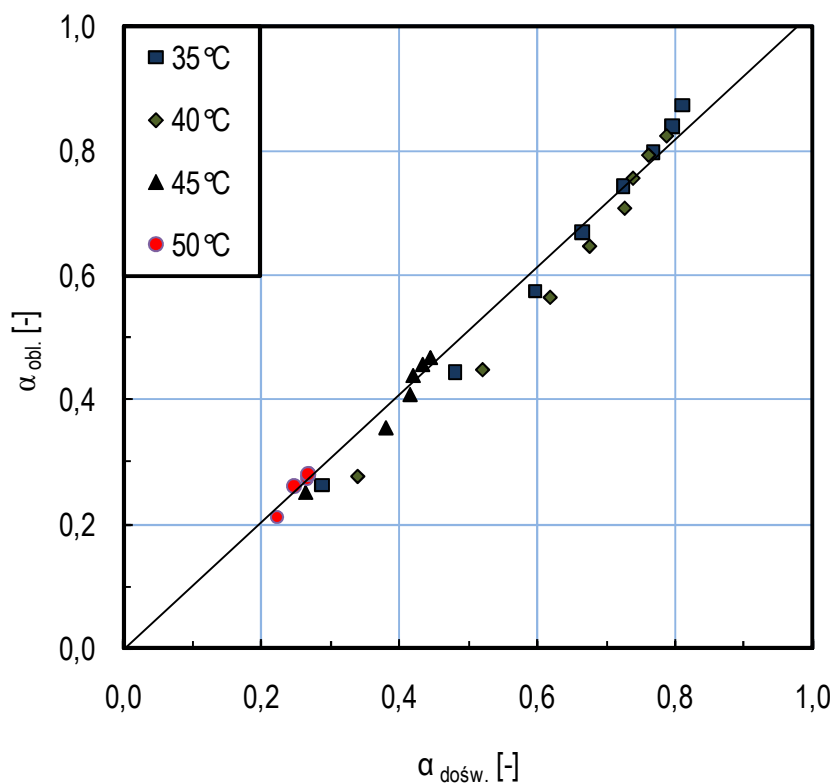
Tabela 8-5. Stałe szybkości dezaktywacji substratem dla katalazy S-A

| | T | 35°C | 40°C | 45°C | 50°C |
|-------------------------------|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Katalaza S-A | k_D [dm ³ /(mol·h)] | 28,40 | 70,49 | 238,06 | 409,00 |
| Wskaźniki statystyczne | SSE | 0,000 | 0,029 | 0,002 | 0,000 |
| | σ | 0,002 | 0,168 | 0,125 | 0,008 |
| | $\bar{\delta}$ | 0,0003 | 0,0460 | 0,0007 | 0,0284 |

Pomiędzy obliczonymi stopniami przemiany a stopniami przemiany doświadczalnymi dla wszystkich temperatur z zakresu od 35°C do 50°C:

- funkcje celu SSE miały wartości mniejsze od 0,029;
- odchylenie standardowe było niższe od 0,168
- średni błąd względny osiągał wartości niższe od 0,0460.

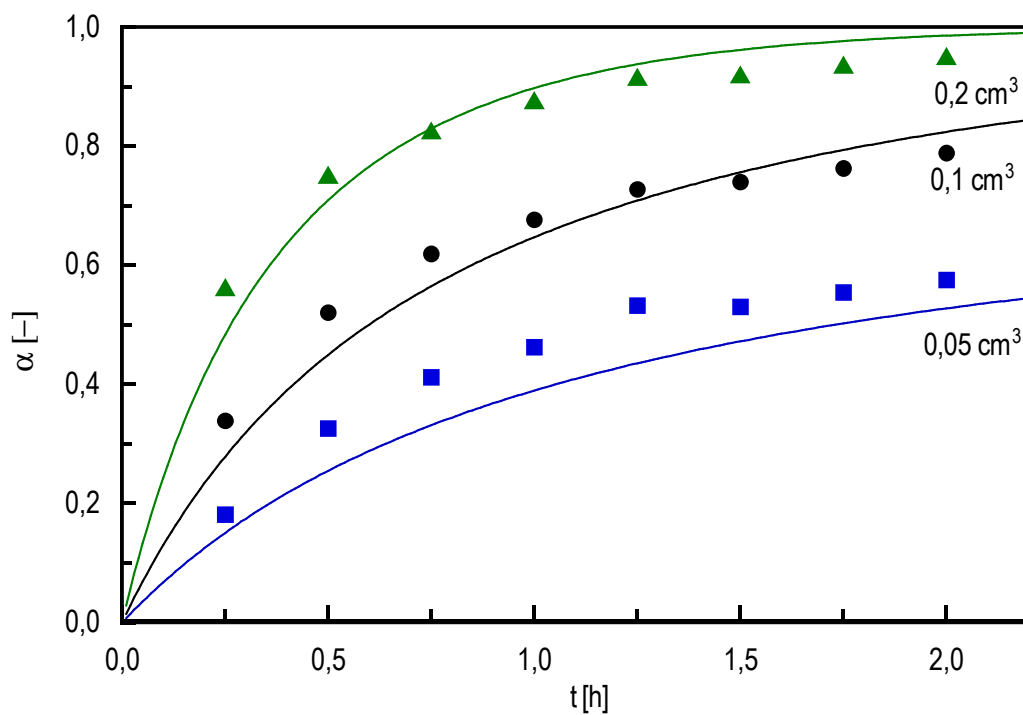
Wskaźniki statystyczne mają największe wartości dla temperatury 40°C, co świadczy o największej rozbieżności wyników doświadczalnych z obliczonymi. Dla temperatur z zakresu od 35°C do 50°C przedstawiono na rys. 8-5 porównanie stopni przemiany doświadczalnych z obliczonymi dla rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę S-A w ilości 0,1 cm³.



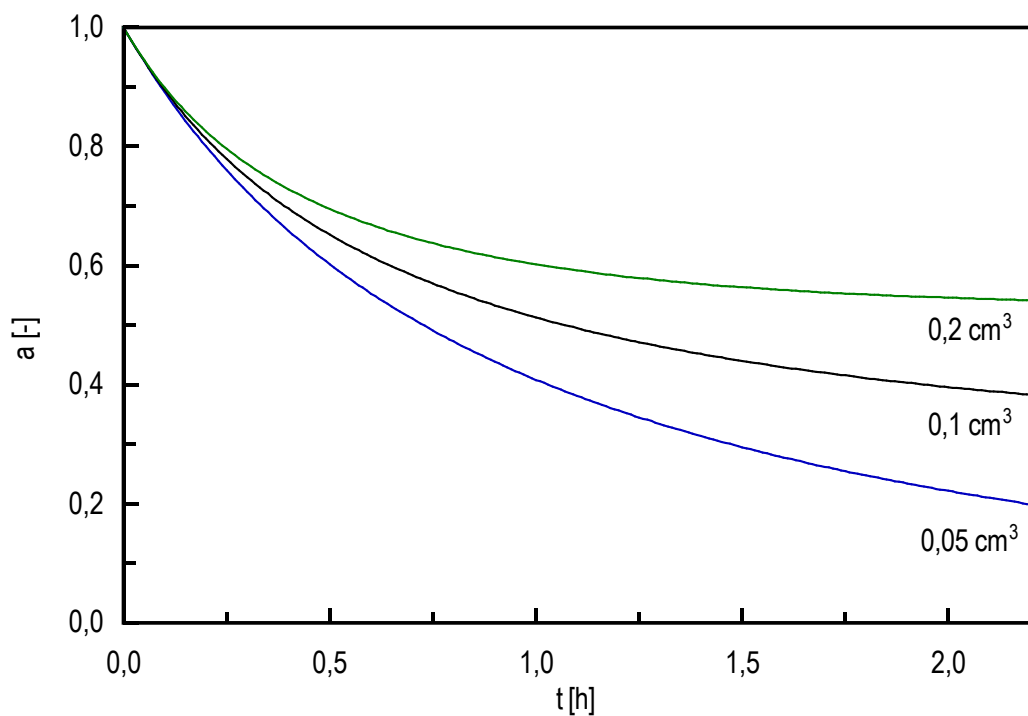
Rys. 8-5. Porównanie stopni przemiany obliczonych i doświadczalnych dla katalazy S-A

Na rysunku 8-6 przedstawiono zmianę stopnia przemiany rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę S-A w temperaturze 40°C w zależności od ilości użytego enzymu. Dane doświadczalne stopni przemiany porównano ze stopniami przemiany obliczonym według równ. (8.7) korzystając z wartości stałych szybkości k_R^* i k_D określonych na podstawie pomiarów eksperymentalnych. Z rysunku 8-6 wynika, iż w długotrwałym procesie rozkładu nadtlenu wodoru o stężeniu około 0,015 mol/dm³, w temperaturze 40°C możemy zwiększyć stopień przemiany rozkładu H₂O₂ poprzez użycie zwiększonej dawki enzymu. Z tym, że podwójna porcja enzymu (0,1 cm³) powoduje wzrost stopnia przemiany o około 0,2 a cztery razy większa porcja enzymu (0,2 cm³) powoduje wzrost stopnia przemiany o 0,5.

Natomiast na rys. 8-7 przedstawiono zmianę aktywności katalazy S-A w temperaturze 40°C w zależności od ilości użytego enzymu, korzystając z równ. (8.5). Zauważa się, iż użycie większej ilości enzymu po czasie około 2 h, powoduje pozostanie enzymu o wyższej aktywności.

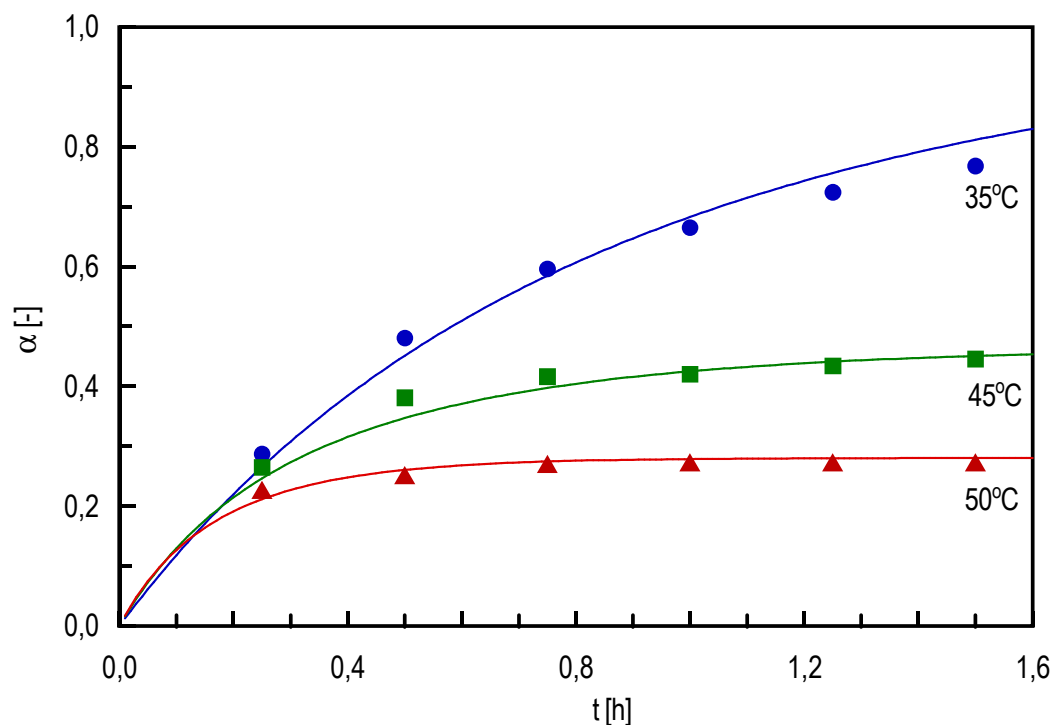


Rys. 8-6. Zmiana stopnia przemiany w czasie dla katalazy S-A w temperaturze 40°C



Rys. 8-7. Obliczona zmiana aktywności w czasie dla katalazy S-A w temperaturze 40°C

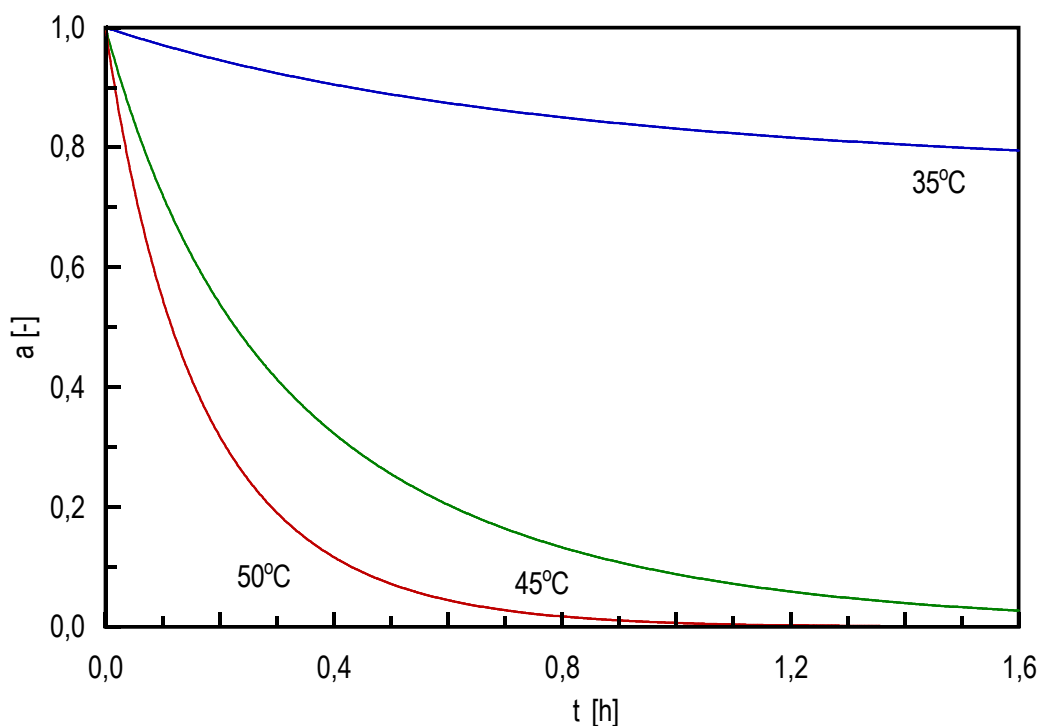
Porównanie zmiany stopnia przemiany doświadczalnej i obliczeniowej rozkładu nadtlenu wodoru przez 0,1 cm³ roztworu katalazy S-A w zależności od temperatury z zakresu od 35°C do 50°C przedstawiono na rys. 8-8.



Rys. 8-8. Zmiana stopnia przemiany w czasie dla 0,1 cm³ katalazy S-A w temperaturach z zakresu od 35°C do 50°C

Z rysunku 8-8 wynika, iż w długotrwałym procesie rozkładu nadtlenu wodoru o stężeniu około 0,015 mol/dm³ końcowy stopień przemiany H₂O₂ wynosi około 0,8 dla temperatury 35°C. Wraz ze wzrostem temperatury stopień przemiany H₂O₂ maleje.

Na rysunku 8-9 określono w oparciu o równ. (8.5) zmianę aktywności katalazy S-A w zależności od temperatury 35°C do 50°C. Im wyższa temperatura, w której przebiega rozkład H₂O₂ przez okres 1,5 h tym większa aktywność pozostałego enzymu.



Rys. 8-9. Obliczona zmiana aktywności dla 0,1 cm³ katalazy S-A w temperaturach z zakresu od 35°C do 50°C

8.2.2. Stałe szybkości dezaktywacji substratem dla katalazy N

Na podstawie pomiarów stężenia nadtlenu wodoru z tabel od 7-10 do 7-13 obliczono stopnie przemiany w czasie przebiegu reakcji rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę N. Wyznaczono stałe szybkości dezaktywacji k_D w zakresie temperatur od 35°C do 50°C, a otrzymane dane zamieszczono w tabeli 8-6.

Tabela 8-6. Stałe szybkości dezaktywacji substratem dla katalazy N

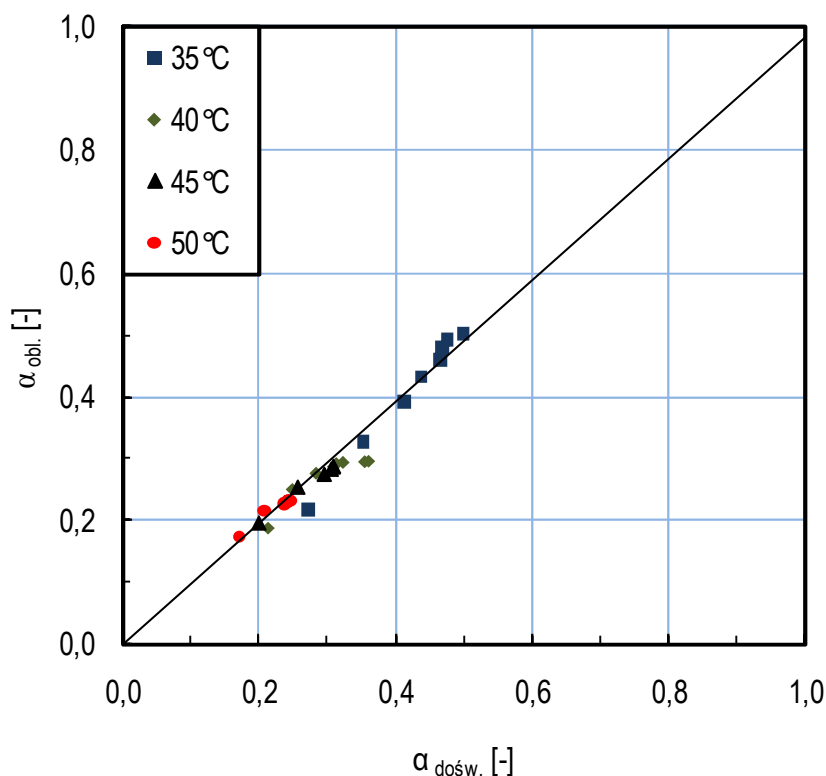
| | T | 35°C | 40°C | 45°C | 50°C |
|-------------------------------|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Katalaza N | k_D [dm ³ /(mol·h)] | 185,29 | 303,51 | 358,21 | 431,31 |
| Wskaźniki statystyczne | SSE | 0,000 | 0,018 | 0,001 | 0,021 |
| | σ | 0,002 | 0,121 | 0,125 | 0,104 |
| | $\bar{\delta}$ | 0,0357 | 0,0885 | 0,0574 | 0,0227 |

Pomiędzy obliczonymi stopniami przemiany a stopniami przemiany doświadczalnymi katalazy N dla wszystkich temperatur z zakresu od 35°C do 50°C

- funkcje celu SSE osiągały wartości mniejsze od 0,021
- odchylenie standardowe było niższe od 0,125

- średni błąd względny miał wartości niższe od 0,0885.

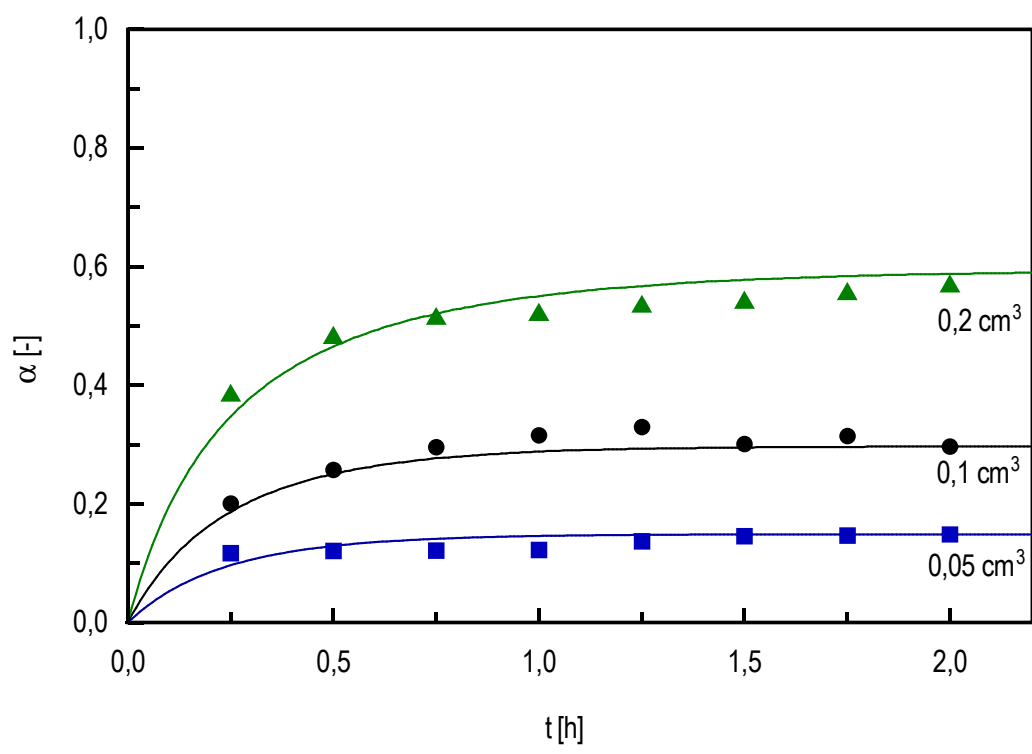
Na rysunku 8-10 porównano stopnie przemiany doświadczalne z obliczonymi dla rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę N w ilości 0,1 cm³ w temperaturach z zakresu od 35°C do 50°C.



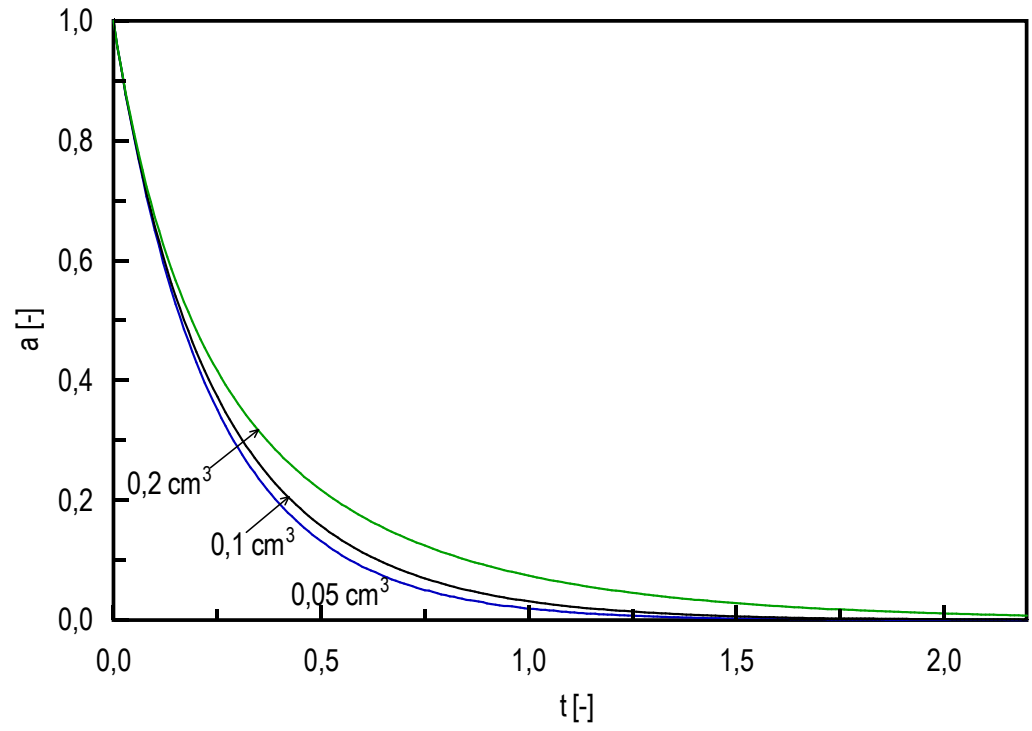
Rys. 8-10. Porównanie stopni przemiany obliczonych i doświadczalnych dla katalazy N

Podobnie jak dla katalazy S-A (rozdział 8.1.1) przedstawiono na rys. 8-11 dla katalazy N zmianę stopnia przemiany w temperaturze 40°C w zależności od ilości użytego enzymu. Dane doświadczalne stopni przemiany porównano ze stopniami przemiany obliczonymi według równ. (8.7) korzystając z wartości stałych szybkości k_R^* i k_D określonych na podstawie pomiarów eksperymentalnych. Z rysunku 8-11 wynika, iż zwiększając porcję katalazy N dwukrotnie, zwiększamy stopień przemiany każdorazowo o około 100%.

Na rysunku 8-12, korzystając z równ. (8.5) przedstawiono zmianę aktywności katalazy N w temperaturze 40°C w zależności od ilości użytego enzymu. Zauważa się, iż następuje gwałtowny spadek enzymu, bez znacznego wpływu ilości użytego enzymu na aktywność katalazy N. Używając 0,05 cm³ lub 0,2 cm³ katalazy N po 0,5 h rozkładu nadtlenu wodoru, aktywność enzymu wynosi około 0,20.

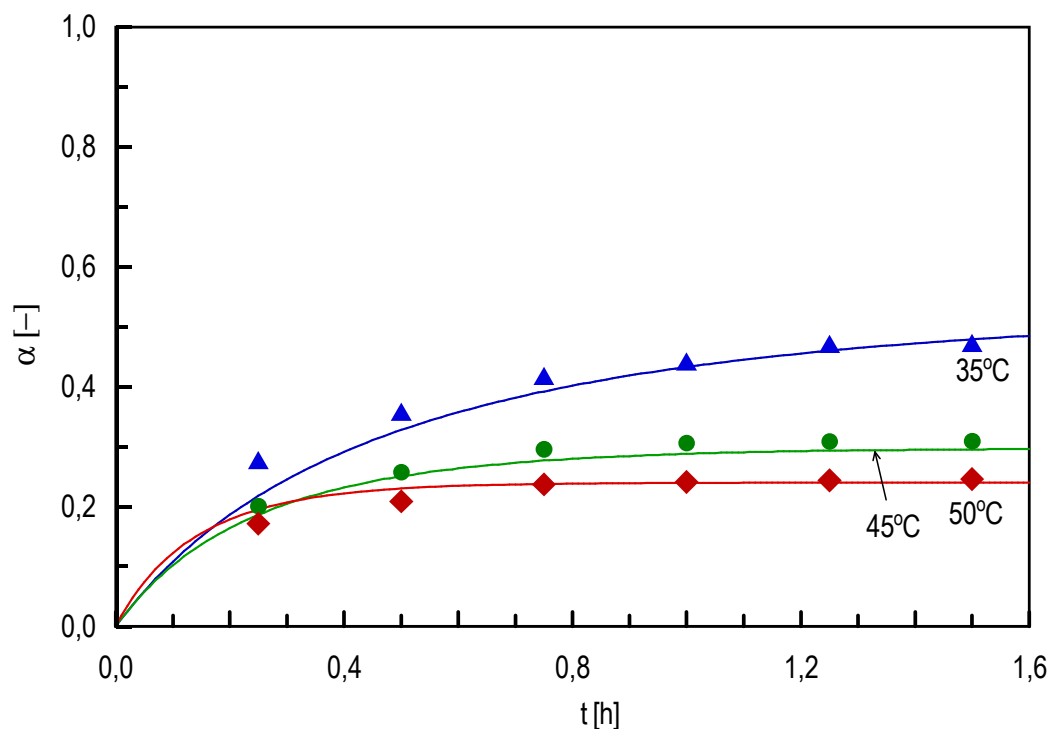


Rys. 8-11. Zmiana stopnia przemiany w czasie dla katalazy N w temperaturze 40°C



Rys. 8-12. Obliczona zmiana aktywności w czasie dla katalazy N w temperaturze 40°C

Na rysunku 8-13 porównano doświadczalne zmiany stopni przemiany doświadczalnych z obliczeniowymi podczas rozkładu nadtlenu wodoru przez 0,1 cm³ roztworu katalazy N w zależności od temperatury z zakresu od 35°C do 50°C.



Rys. 8-13. Zmiana stopnia przemiany w czasie dla 0,1 cm³ katalazy N w temperaturach z zakresu od 35°C do 50°C

Z rysunku 8-13 wynika, iż w długotrwałym procesie rozkładu nadtlenu wodoru o stężeniu około 0,015 mol/dm³ końcowy stopień przemiany H₂O₂ wynosi około 0,4 dla temperatury 35°C.

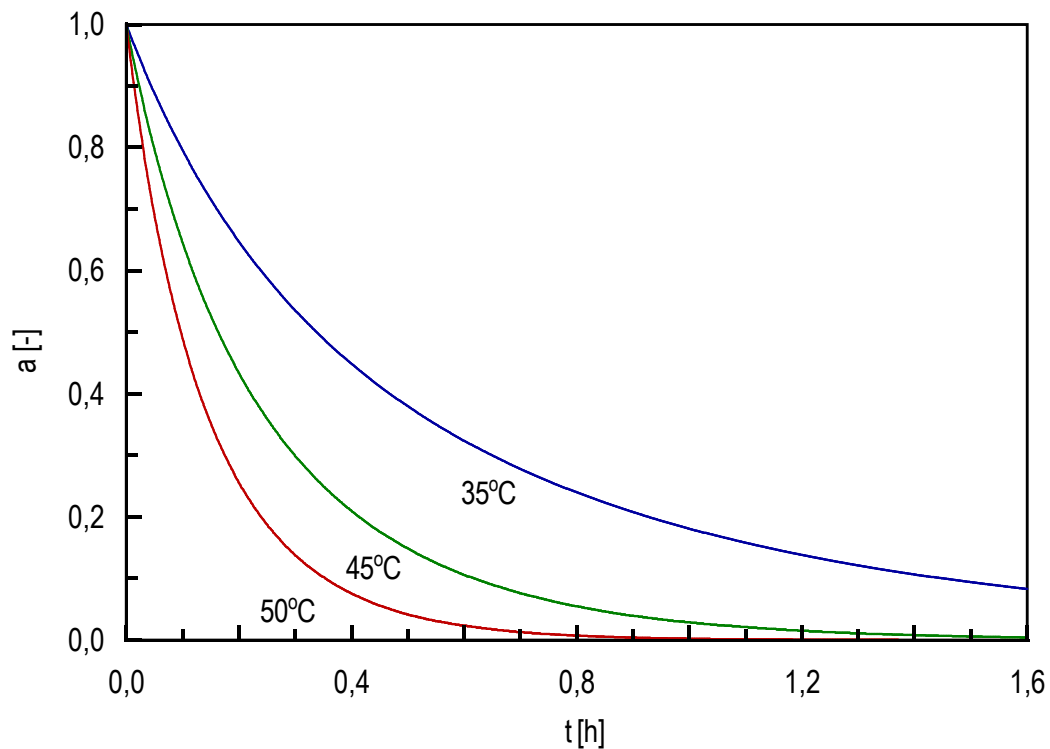
Na rys. 8-14 przedstawiono zmiany obliczonej aktywności w czasie korzystając z równ. (9.5). Końcowa aktywność katalazy N jest tym niższa im wyższa jest temperatura.

8.3. Energie aktywacji procesu dezaktywacji substratem dla katalazy S-A oraz katalazy N

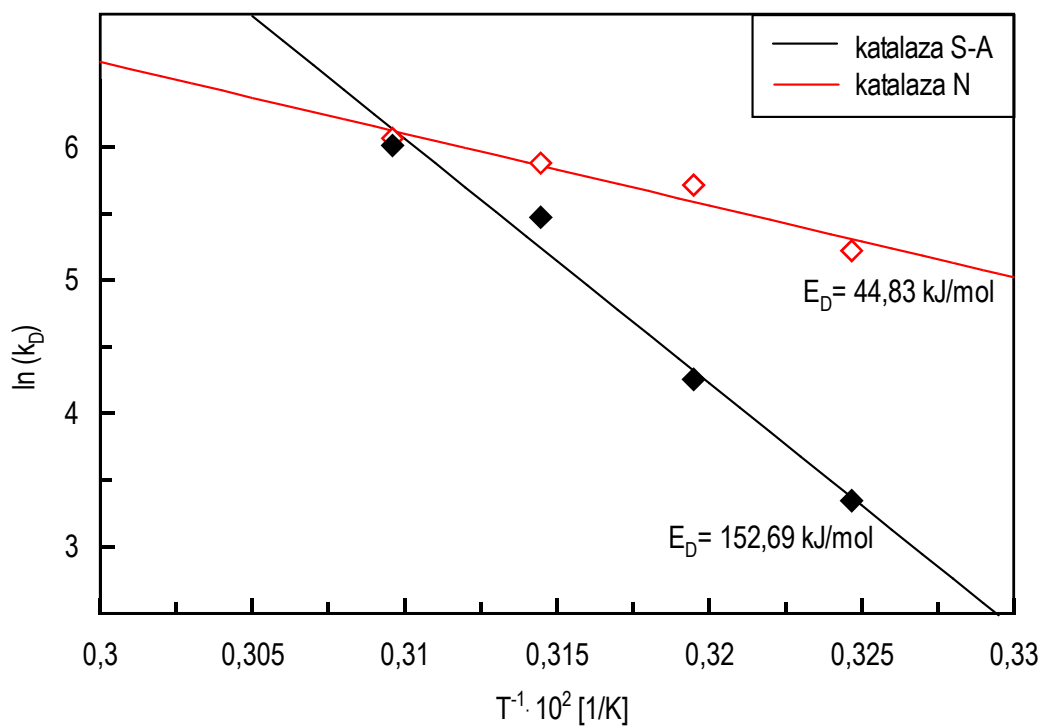
Energie aktywacji procesu dezaktywacji substratem wyznaczono na podstawie stałych szybkości dezaktywacji k_D zawartych w tabeli 8-5 (dla katalazy S-A) oraz w tabeli 8-6 (dla katalazy N) stosując metodą regresji liniowej dla zależności w postaci:

$$\ln(k_D) = \ln(k_D) - \frac{E_D}{RT} \quad (8.10)$$

Na rys. 8-15 przedstawiono zależność logarytmu stałej szybkości dezaktywacji substratem k_D od odwrotności temperatury dla danych z tabeli 8-5 oraz tabeli 8-6.



Rys. 8-14. Obliczona zmiana aktywności dla $0,1 \text{ cm}^3$ katalazy N w temperaturach z zakresu od 35°C do 50°C



Rys. 8-15. Zależność k_D od temperatury dla katalazy S-A oraz katalazy N

Wyznaczone stałe z równania Arrheniusa - k_{D0} i E_D dla obu katalaz zamieszczono w tabeli 8-7.

Tabela 8-7. Parametry kinetyczne procesu dezaktywacji substratem dla katalazy S-A i katalazy N

| Parametry kinetyczne | Katalaza S-A | Katalaza N |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------|
| k_{D0} [dm ³ /(mol·h)] | $2,27 \cdot 10^{27}$ | $8,06 \cdot 10^9$ |
| E_D [kJ/mol] | 152,69 | 44,83 |

Z danych przedstawionych w tabeli 8-7 wynika, iż katalaza N charakteryzuje się ponad trzykrotnie mniejszą energią dezaktywacji w porównaniu do katalazy S-A.

8.4. Stałe szybkości dezaktywacji k_D w zależności od pH roztworu H₂O₂ dla katalazy S-A oraz katalazy N

Zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 8.2 dokonano obliczeń stałych szybkości dezaktywacji k_D w temperaturze 35°C i zmiennym pH nadtlenu wodoru w zakresie od 4 do 10. W obliczeniach wykorzystano wyniki pomiarów dla katalazy S-A i katalazy N zamieszczonych w tabelach od 7-14 do 7-17. W obliczeniach użyto stałych szybkości reakcji k_R^* wyznaczonych na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych dla obu katalaz, które zamieszczono w pkt. 7.1.3.2. W tabeli 8-8 zamieszczono otrzymane stałe szybkości dezaktywacji k_D .

Tabela 8-8. Wpływ pH na stałe szybkości dezaktywacji katalazy S-A oraz katalazy N

| pH | 4 | 7 | 9 | 10 |
|--------------|----------------------------------|--------|--------|--------|
| | k_D [dm ³ /(mol·h)] | | | |
| Katalaza S-A | 57,11 | 51,45 | 195,27 | 207,63 |
| Katalaza N | 179,26 | 173,76 | 142,53 | 184,43 |

Z danych zamieszczonych w tabeli 8-8 wynika, iż katalaza S-A jest bardziej wrażliwa na zmianę pH nadtlenu wodoru niż katalaza N. Wartość stałej szybkości dezaktywacji k_D katalazy S-A w pH 9 oraz pH 10 jest około czterech razy wyższa niż w pH 4 i pH 7. Katalaza N wykazuje porównywalną stabilność w całym zakresie pH od 4 do 10, przy czym najbardziej stabilna jest w pH 9. Wyniki badań potwierdzają, iż katalaza N (Terminox Ultra) jest odpowiednim preparatem do zastosowania w przemyśle włókienniczym, w którym nadtlenek wodoru znajduje się w roztworze o odczynie alkalicznym.

9. Ocena wpływu dezaktywacji termicznej na rozkład nadtlenu wodoru

Wpływ dezaktywacji termicznej na rozkład nadtlenu wodoru oceniano poprzez porównanie zmiany stężeń H_2O_2 dla następujących przypadków:

- występowanie stałej szybkości dezaktywacji termicznej $k_{DT}=0$,
- występowanie stałej szybkości termicznej dezaktywacji k_{DT} .

9.1. Badany układ reakcyjny o stężeniu początkowym $0,015 \text{ mol/dm}^3$

Przy wyznaczaniu stałej szybkości dezaktywacji katalazy przez nadtlenek wodoru przyjęto, że dezaktywację termiczną można pominąć. Dysponując wszystkimi stałymi kinetycznymi (k_{DT} , k_R^* i k_D) można obecnie ocenić, czy to uproszczenie prowadzi do istotnych zmian w wartościach stężeń nadtlenu wodoru podczas reakcji. W tym celu wyznaczono rozwiązania numeryczne modelu matematycznego rów. (4.4a) i rów. (4.4b) dla dwóch przypadków:

- brak dezaktywacji termicznej $k_{DT}=0$,
- dezaktywacja termiczna k_{DT} przebiega według kinetyki pierwszego rzędu ze stałą szybkości k_{DT} .

Obliczenia wykonano przy zastosowaniu metody numerycznej Rungego-Kutty IV-rzędu, w programie Mathcad 14. Użyto w nich stałe szybkości reakcji i dezaktywacji dla katalazy S-A (tabela 9-1) oraz katalazy N (tabela 9-2). Na podstawie pomiarów doświadczalnych prowadzonych w temperaturach 35°C i 50°C wyznaczono parametry kinetyczne, których wartości dla katalazy S-A przedstawiono w tabeli 9-1, natomiast dla katalazy N w tabeli 9-2.

Tabela 9-1. Stałe szybkości dla katalazy S-A stosowane w analizie matematycznej reaktora

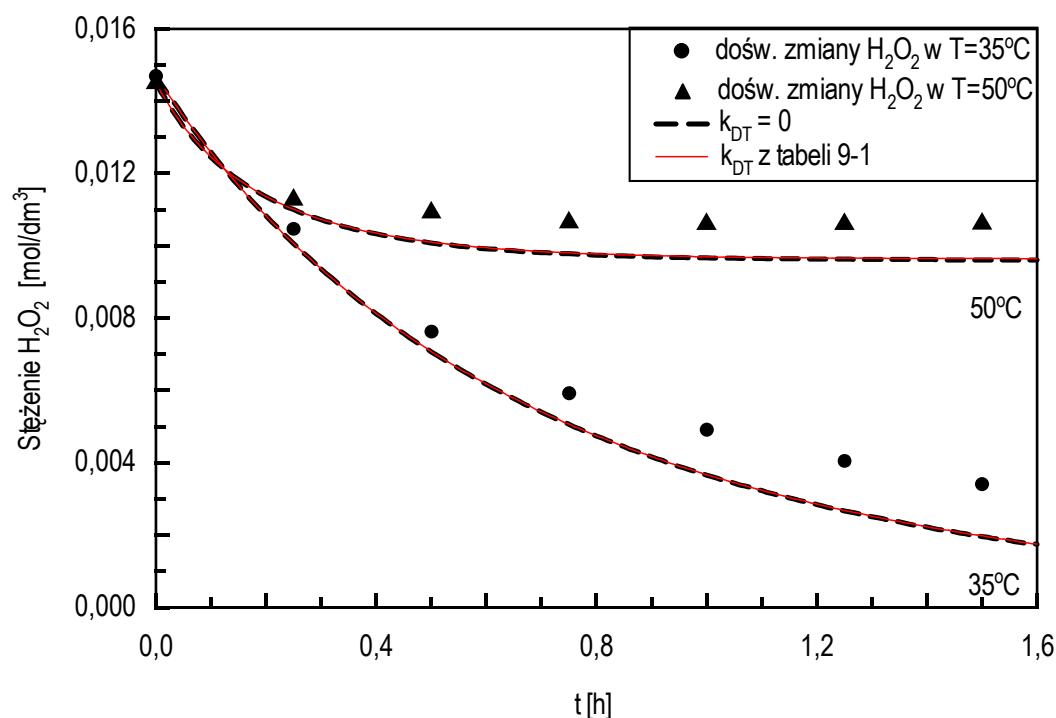
| Temperatura | k_{DT} [1/h] | k_R^* [1/h] | k_D [$\text{dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{h})$] |
|--------------------|----------------|---------------|---|
| 35°C | 0,0044 | 1,491 | 28,40 |
| 50°C | 0,0360 | 2,020 | 409,00 |

Tabela 9-2. Stałe szybkości dla katalazy N stosowane w analizie matematycznej reaktora

| Temperatura | k_{DT} [1/h] | k_R^* [1/h] | k_D [$\text{dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{h})$] |
|--------------------|----------------|---------------|---|
| 35°C | 0,0015 | 1,0028 | 185,29 |
| 50°C | 0,0194 | 1,2372 | 431,31 |

Na rys. 9-1 przedstawiono dla katalazy S-A w temperaturach 35°C i 50°C porównanie:

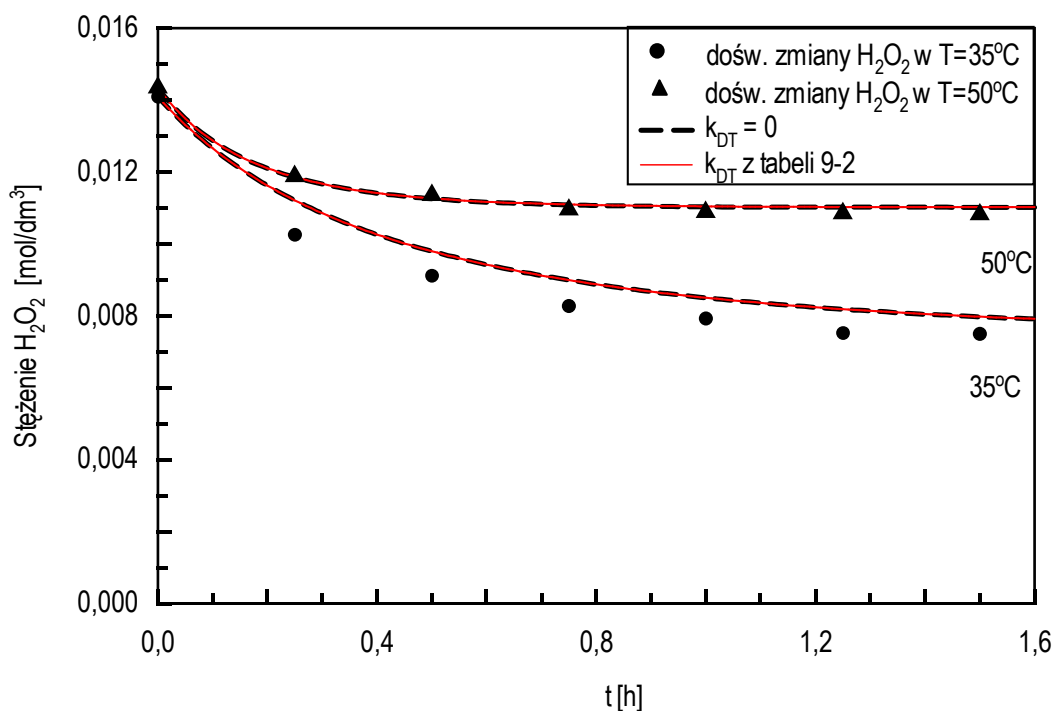
- doświadczalnie wyznaczonych zmian stężeń nadtlenu wodoru w określonych czasach,
- obliczonych stężeń z rów. (4.4a) i (4.4b) przy stałych szybkościach k_{DT} , k_R^* , k_D (tabela 9-1),
- obliczonych stężeń z rów. (4.4a) i (4.4b) przy stałych szybkościach k_R^* , k_D i braku dezaktywacji termicznej.



Rys. 9-1. Zmiana stężenia 0,015 mol/dm³ H₂O₂ dla katalazy S-A

W ten sam sposób przedstawiono na rys. 9-2 porównanie zmian stężeń nadtlenu wodoru dla katalazy N.

Z rysunków 9-1 oraz 9-2 wynika, iż dezaktywacja termiczna w zakresie temperatur od 35°C do 50°C nie wpływa na przebieg zmian stężenia nadtlenu wodoru o stężeniu początkowym 0,015 mol/dm³ podczas rozkładu przy użyciu katalazy S-A lub katalazy N.

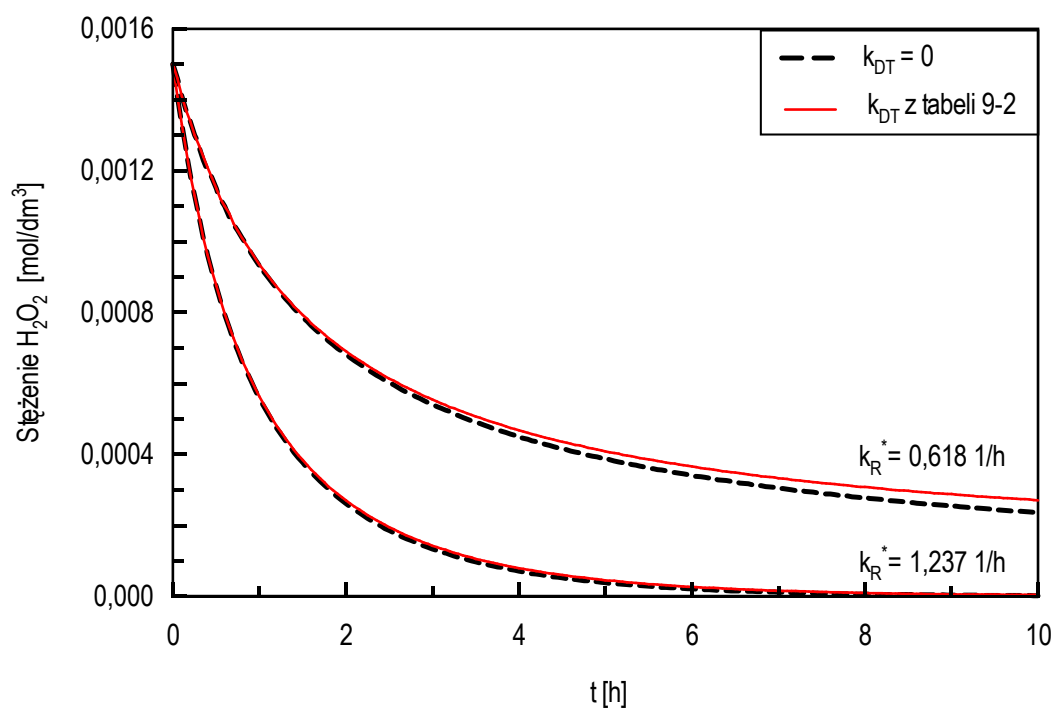


Rys. 9-2. Zmiana stężenia 0,015 mol/dm³ H₂O₂ dla katalazy N

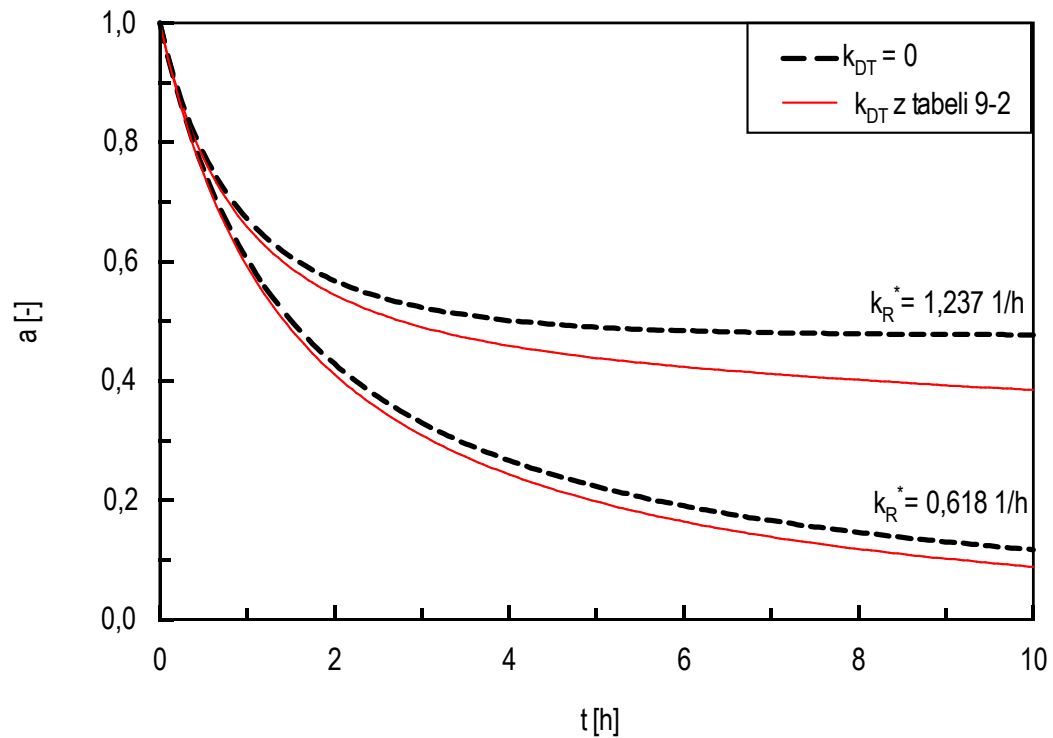
9.2. Badany układ reakcyjny o stężeniu początkowym 0,0015 mol/dm³

Z wcześniejszej analizy, dla stosowanego układu reakcyjnego wynika, że dezaktywacja termiczna może wpływać na rozkład nadtlenu wodoru przy stężeniach znacznie mniejszych od 50 ppm. Ze względu na powszechne zastosowanie w przemyśle włókienniczym oraz dużo niższą cenę w porównaniu do katalazy S-A, dokonano analizy rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę N. Przeprowadzono analizę wpływu dezaktywacji termicznej przy stężeniu początkowym nadtlenu wodoru 0,0015 mol/dm³.

Na rysunkach 9-3 i 9-4 przedstawiono analizę rozkładu nadtlenu wodoru dla katalazy N w temperaturze 50°C przez okres rozkładu 10 h. Na rys. 9-3 przedstawiono zmianę stężenia nadtlenu wodoru 0,0015 mol/dm³ w temperaturze 50°C, w której dezaktywacja termiczna może się ujawnić. Zmianę stężenia nadtlenu wodoru i aktywności katalazy N analizowano dla dwóch wartości k_R^* : 0,618 1/h oraz 1,237 1/h. Na rysunku 9-3 zauważa się, iż zmiana stężenia nadtlenu wodoru 0,0015 mol/dm³ w przypadku gdy uwzględnia się dezaktywację termiczną oraz w przypadku jej braku ($k_{DT}=0$), różnią się nieznacznie. Zarówno dla wartości k_R^* równej 0,618 1/h oraz 1,237 1/h przez 10 h rozłożono około 75% nadtlenu wodoru z tym, że dla wyższej wartości k_R^* rozkład ten nastąpił znacznie szybciej. Wpływ dezaktywacji termicznej ujawnił się w zmianie aktywności przedstawionej na rysunku 9-4.



Rys. 9-3. Zmiana stężenia nadtlenku wodoru 0,0015 mol/dm³ dla katalazy N w temperaturze 50°C



Rys. 9-4. Zmiana aktywności katalazy N podczas rozkładu 0,0015 mol/dm³ H₂O₂ w temperaturze 50°C

Z przedstawionego rysunku 9-4 wynika, że po 10 h, dla stałej szybkości reakcji k_R^* równej 1,237 1/h, aktywność końcowa katalazy N wynosiła 0,5 w przypadku, gdy brak jest dezaktywacji termicznej ($k_{DT}=0$). W przypadku, gdy w modelu reaktora uwzględniono wpływ k_{DT} , końcowa aktywność wynosiła 0,4. Użycie dwukrotnie mniejszej ilości enzymu (stała szybkości reakcji k_R^* wynosiła 0,618 1/h) powoduje nieznaczne różnice w zmianie aktywności dla obu przypadków.

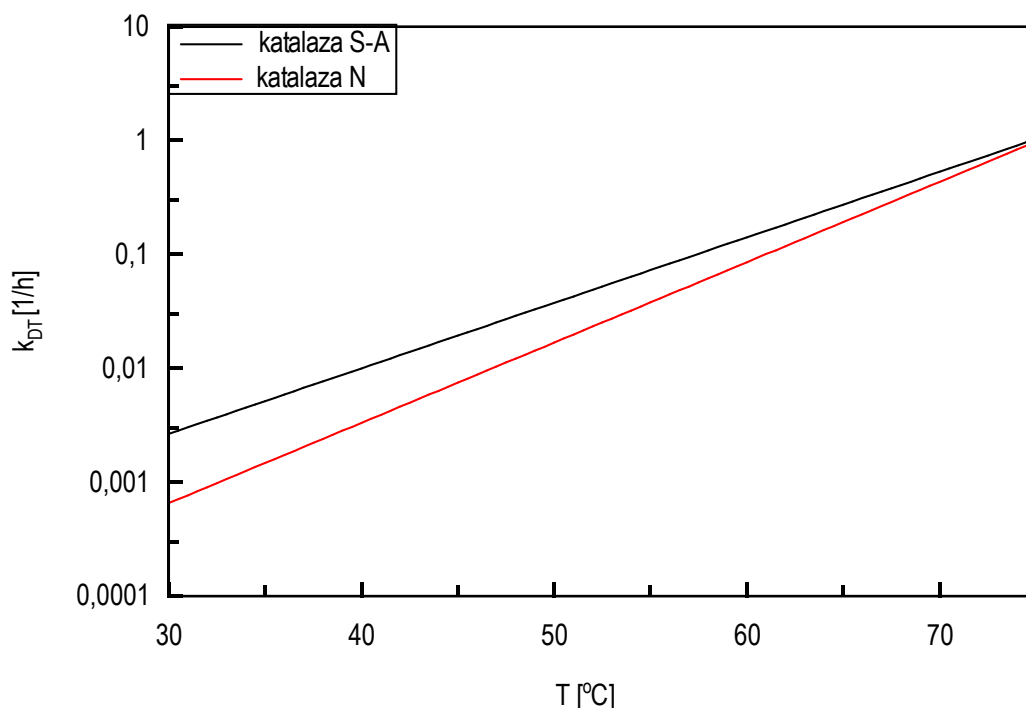
10. Omówienie i dyskusja wyników badań

1. W pracy przedstawiono wyniki badań nad dezaktywacją katalazy *Aspergillus niger* z Sigma-Aldrich (katalaza S-A) oraz Novozymes (katalaza N). Wyznaczono równanie kinetyczne dezaktywacji termicznej oraz dezaktywacji substratem w zakresie stężeń nadtlenu wodoru od 0,001 mol/dm³ do 0,015 mol/dm³.

Założono, iż dezaktywacja termiczna katalazy przebiega według jednostopniowego mechanizmu $E \rightarrow D$, z równaniem kinetycznym $r_{DT} = k_{DT} C_E$, które stosowano do opisu dezaktywacji termicznej katalazy z wątroby wołowej [101,189] oraz katalazy z *Aspergillus niger* [176]. Wyznaczając stałe dezaktywacji termicznej katalazy k_{DT} w zakresie temperatur od 35°C do 70°C stosowano rów. (3.6) w postaci:

$$a_i = \exp \left[-k_{D, \text{Tod}} \exp \left[\frac{E_{DT}}{R} \left(\frac{1}{T_{\text{od}}} - \frac{1}{T} \right) \right] t_i \right] \quad (3.6)$$

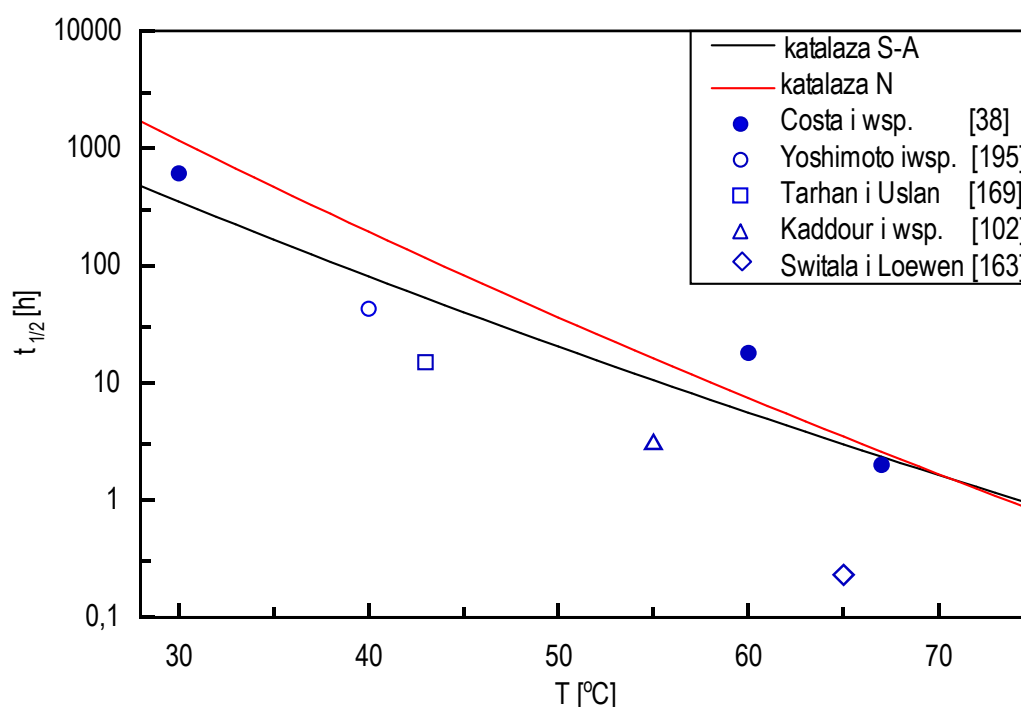
Przeprowadzono identyfikację stałych $k_{D, \text{Tod}}$, E_{DT} a następnie obliczono wartość stałej przedwykładniczej szybkości dezaktywacji $k_{(DT)0}$ z rów. (8.2). Na podstawie parametrów kinetycznych zamieszczonych w tabeli 8-1 dla katalazy S-A oraz w tabeli 8-3 dla katalazy N przedstawiono na rys. 10-1 zmianę k_{DT} w zależności od temperatury.



Rys. 10-1. Zależność k_{DT} od temperatury dla katalazy S-A oraz katalazy N

Z rysunku 10-1 wynika, iż katalaza S-A jest odporniejsza na działanie temperatury niż katalaza N w zakresie temperatur od 35°C do 70°C. Największa różnica w wartościach k_{DT} pomiędzy katalazą S-A i katalazą N jest w temperaturze 35°C. Wraz ze wzrostem temperatury, wartości k_{DT} obu katalaz zbliżają się do siebie.

W literaturze brak jest danych dotyczących dezaktywacji termicznej katalazy S-A (Sigma –Aldrich) oraz katalazy N (Terminoxu Ultra z Novozymes) w całym zakresie temperatur od 35°C do 70°C. Literaturowe czasy połowicznego spadku dla katalazy z *Aspergillus niger* z tabeli 3-5 porównano z wyznaczonymi wartościami $t_{1/2}$ dla katalazy S-A oraz katalazy N na rys. 10-2.



Rys. 10-2. Porównanie literaturowych i obliczonych czasów połowicznego spadku aktywności dla katalazy S-A oraz katalazy N

Z rysunku 10-2 wynika, że wartości połowicznego spadku aktywności, wyznaczone dla katalazy S-A oraz katalazy N, mieszczą się w zakresie wartości $t_{1/2}$ wyznaczonych przez innych badaczy. Występuje jednak rozbieżność wyników.

Porównanie czasów połowicznego spadku aktywności z wartościami $t_{1/2}$ literaturowymi w zakresie temperatur od 35°C do 70°C jest utrudnione ze względu na pochodzenie enzymu od różnych dostawców, dokonywanie pomiaru aktywności w różnych warunkach oraz przetrzymywanie katalazy w różnym pH podczas badań dezaktywacji termicznej [194,102].

2. Do wyznaczenia stałej szybkości dezaktywacji k_D konieczna jest znajomość stałej szybkości reakcji k_R^* . Metodą spektrofotometryczną wyznaczono stałe szybkości reakcji w zakresie temperatur od 20°C do 60°C. Na podstawie danych z tabeli 7-5 (stałe k_R^* dla katalazy S-A) oraz danych z tabeli 7-7 (stałe k_R^* dla katalazy N) wyznaczono stałe w równaniu Arrheniusa dla katalazy S-A oraz katalazy N a otrzymane dane zamieszczono w tabeli 10-1.

Tabela 10-1. Parametry kinetyczne procesu rozkładu H_2O_2 przez katalazę S-A oraz katalazę N

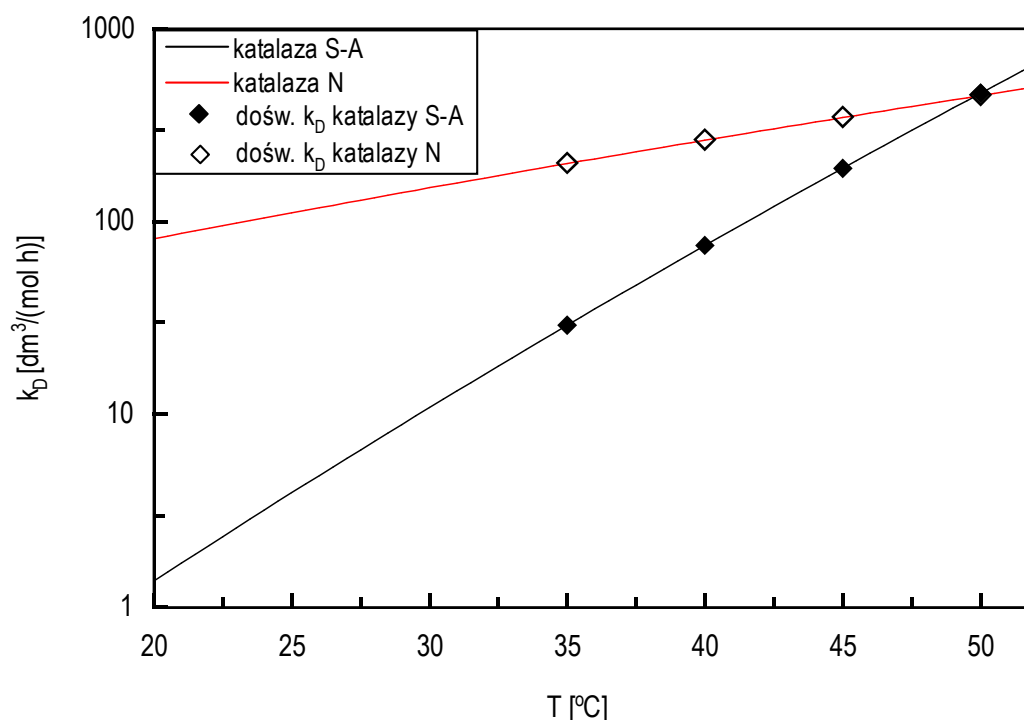
| Parametry kinetyczne | Katalaza S-A | Katalaza N |
|----------------------|-------------------|-------------------|
| k_{R0}^* [1/h] | $2,97 \cdot 10^3$ | $1,11 \cdot 10^3$ |
| E_R [kJ/mol] | 12,92 | 11,59 |

Z danych przedstawionych w tab. 10-1 wynika, iż energie aktywacji reakcji dla obu katalaz miały porównywalne wartości, natomiast ponad dwukrotnie wyższa była przedwykładnicza stała szybkości reakcji k_{R0}^* dla katalazy S-A.

Brak jest danych w literaturze wartości energii aktywacji reakcji rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę z *Aspergillus niger*. Jediną napotkaną informacją dotyczącą energii aktywacji reakcji była wartość E_R dla katalazy grzybowej w postaci immobilizowanej i wynosiła ona 19,84 kJ/mol [5]. Wyznaczone energie aktywacji reakcji dla katalazy S-A oraz katalazy N są niższe o około 7-8 kJ/mol (tabela 10-1) od wartości literaturowej dla katalazy immobilizowanej.

3. Wartości stałych szybkości dezaktywacji substratem k_D w zakresie temperatur od 35°C do 50°C, przedstawiono w tabeli 8-5 dla katalazy S-A oraz w tabeli 8-6 dla katalazy N, zakładając iż podczas rozkładu nadtlenu wodoru, występuje jedynie dezaktywacja substratem.

Na podstawie parametrów kinetycznych zamieszczonych w tabeli 10-1 dla katalazy S-A oraz katalazy N, na rys. 10-3 przedstawiono obliczoną zmianę k_D obu katalaz w zakresie temperatur od 20°C do 50°C.



Rys. 10-3. Zależność k_D od temperatury dla katalazy S-A oraz katalazy N

Z rysunku 10-3 wynika, iż katalaza S-A jest odporniejsza na działanie substratu niż katalaza N w zakresie temperatur od 20°C do 50°C. W temperaturze 35°C wartość k_D dla katalazy N jest prawie 7 krotnie większa od wartości k_D wyznaczonej dla katalazy S-A, natomiast w temperaturze 50°C wartości stałych dezaktywacji mają porównywalne wartości.

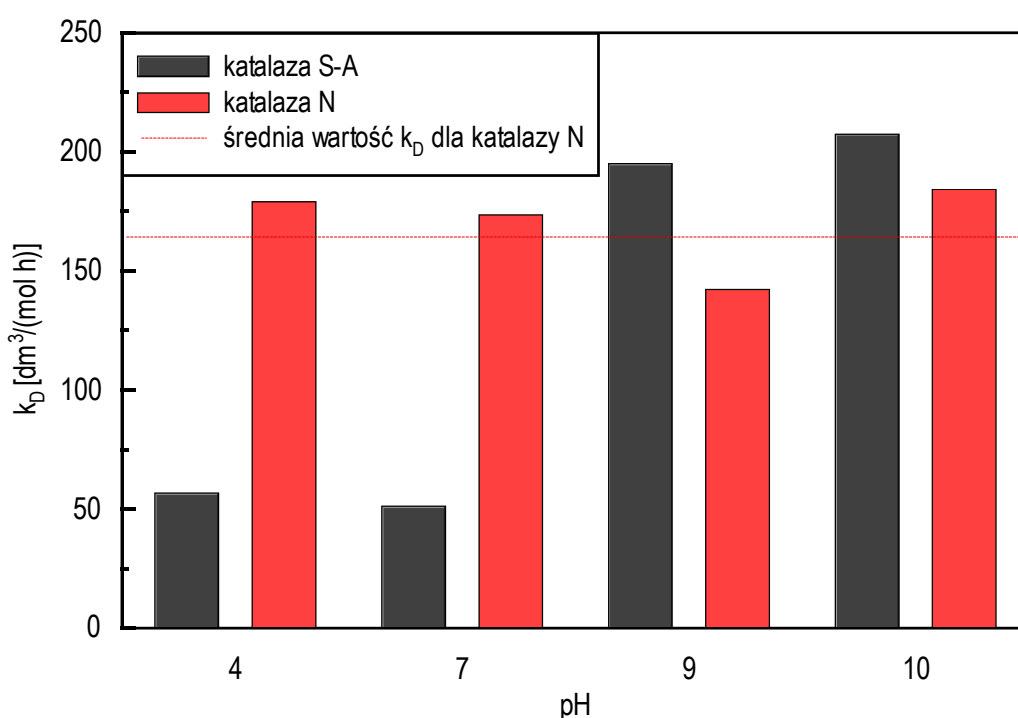
Tak, jak dla dezaktywacji termicznej, tak i dla dezaktywacji substratem brak jest w literaturze danych w zakresie temperatur od 35°C do 50°C. Na podstawie przedstawionych w tabeli 10-2 danych literaturowych k_D dla katalazy z *Aspergillus niger* można było je porównać z danymi otrzymanymi dla katalazy S-A oraz katalazy N.

Tabela 10-2. Porównanie literaturowych i obliczonych wartości k_D

| k_D [dm ³ / (mol h)] | 25°C | 37°C |
|--|------------|-------------|
| Katalaza S-A | 3,93 | 42,67 |
| Katalaza N | 111,96 | 225,51 |
| Katalaza <i>Aspergillus niger</i> | 30,60 [41] | 54,00 [176] |

Zamieszczone w tabeli 10-2 wartości k_D dla katalazy *Aspergillus niger* wyznaczone dla temperatury 25°C i 37°C są w zakresie od 30 do 54 $\text{dm}^3/(\text{mol h})$. Dla katalazy S-A w temperaturze 25°C wartość k_D jest 10 razy mniejsza niż wyznaczona przez DeLucę [41], w temperaturze 37°C wartość k_D jest niższa niż określona przez Tse i Gough [176]. W przypadku katalazy N dla obu temperatur wartości k_D są kilka razy wyższe.

4. Wyznaczono w zależności od pH roztworu nadtlenu wodoru stałe szybkości dezaktywacji substratem k_D dla katalazy S-A oraz katalazy N (Tabela 8-8). Na podstawie danych z tabeli 8-8 sporządzono rys. 10-4.



Rys.10-4. Stałe szybkości dezaktywacji substratem k_D dla katalazy S-A oraz katalazy N w zależności od pH roztworu nadtlenu wodoru

Z rysunku 10-4 można zauważyć, iż katalaza N jest stabilna w zakresie od 4 do 10. Średnia wartość stałej dezaktywacji k_D w tym zakresie pH dla katalazy N wynosiła około $163 \pm 21 \text{ dm}^3/(\text{mol h})$. Otrzymane stałe k_D są około trzy razy większe od stałych k_D dla katalazy S-A w środowisku o pH kwaśnym i obojętnym, natomiast niższe o około 10-20% w pH zasadowym.

W literaturze brak jest danych dotyczących wpływu pH na wartość stałej szybkości dezaktywacji k_D dla katalazy *Aspergillus niger*. Można jednak odnieść otrzymane wyniki do wpływu pH na aktywność enzymu. Z danych literaturowych wynika, że katalaza *A. niger*

wykazuje aktywność maksymalną w pH obojętnym a spadek o około 20% w środowisku kwaśnym [6,38,75,169,185]. Wyznaczone wartości k_D , wzrastające w pH kwaśnym, powodują spadek aktywności katalazy N, co jest zgodne z danymi literaturowymi.

Preparat handlowy katalazy *A. niger* z firmy Asa-Enzyme [78] wykazywał optymalną aktywność w zakresie pH od 7 do 10. Wyznaczone wartości k_D dla katalazy N, charakteryzują się najniższą wartością k_D w pH 9, co powoduje iż w badanym zakresie pH od 4 do 10 osiąga maksymalną wartość aktywności, co jest zgodne z danymi literaturowymi.

- 5 Dysponując doświadczalnymi wartościami stałej szybkości dezaktywacji termicznej k_{DT} oraz stałej szybkości dezaktywacji substratem k_D , analizowano rozkład nadtlenu wodoru o stężeniu początkowym równym $0,015 \text{ mol/dm}^3$ dla temperatur 35°C i 50°C oraz o stężeniu początkowym równym $0,0015 \text{ mol/dm}^3$ dla temperatury 50°C . Stwierdzono, iż wartość stałej szybkości dezaktywacji termicznej k_{DT} nie wpływa na znaczące różnice w stopniach przemiany nadtlenu wodoru, nawet przy dziesięciokrotnym zmniejszeniu jego stężenia początkowego. Dezaktywacja termiczna widoczna jest bardziej w przebiegu zmiany aktywności katalazy N rozkładającej nadtlenek wodoru w temperaturze 50°C przez 10 h. Dla stałej szybkości reakcji k_R^* równej $1,237 \text{ 1/h}$, w modelu opisującym reaktor do rozkładu H_2O_2 w którym nie występowała dezaktywacja termicznej ($k_{DT}=0$), aktywność końcowa katalazy N było o około 20% wyższa, w porównaniu do obliczonej aktywności końcowej katalazy N, w której uwzględniono dezaktywację termiczną.

Wnioski

Przeprowadzone badania nad dezaktywacją katalazy z *Aspergillus niger* pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Dezaktywacja katalazy z Sigma-Aldrich (katalazy S-A) oraz z Novozymes -Terminox Ultra (katalazy N) przebiega według tych samych równań kinetycznych. Różnią się one w znacznym stopniu wartościami stałych kinetycznych.
2. Dezaktywacja termiczna jest zgodna z jednostopniowym mechanizmem $E \rightarrow D$. Wszystkie stałe kinetyczne zmieniają się pod wpływem temperatury zgodnie z równaniem Arrheniusa.

Katalaza S-A miała niższe wartości stałych szybkości dezaktywacji termicznej k_{DT} w zakresie temperatur od 35°C do 70°C od katalazy N. Świadczy to o tym, iż charakteryzuje się wyższą odpornością termiczną niż katalaza N.

3. Rozkład nadtlenu wodoru, w warunkach stałej aktywności katalazy, przebiega według równania kinetycznego pierwszego rzędu, ze względu na stężenie substratu.
4. Dezaktywacja katalazy pod wpływem nadtlenu wodoru określona jest równaniem pierwszego rzędu, ze względu na stężenie enzymu i substratu.
5. Katalaza S-A wykazywała większą odporność na dezaktywację substratem w temperaturach z zakresu od 35°C do 45°C w porównaniu z katalazą N. W temperaturze 50°C wartości k_D były porównywalne dla obu katalaz.
6. Dezaktywacja katalazy pod wpływem nadtlenu wodoru zależy także od wartości pH. Wpływ pH nadtlenu wodoru jest znaczący dla katalazy S-A. W przypadku katalazy N stwierdzono, iż jest ona stabilna w zakresie pH od 4 do 9. Dla katalazy S-A optymalną aktywność otrzymano dla pH 7, natomiast dla katalazy N optimum przesunięte jest w stronę pH=9.
5. Zazwyczaj dezaktywacja termiczna katalazy S-A oraz katalazy N przebiega znacznie wolniej od dezaktywacji substratem. Dopiero przy stężeniach nadtlenu wodoru poniżej 0,001 mol/dm³ dezaktywacja termiczna stanowi ponad 8% dezaktywacji substratem.

Literatura

- [1] Aebi H.: *Catalase in vitro*, Methods Enzymol., **105**, 121-126 (1984).
- [2] Amo T., Atomi H., Imanaka T.: *Unique presence of a manganese catalase in a hyperthermophilic archaeon, Pyrobaculum calidifontis VA1*, J. Bacteriol., **184**, 3305-3312 (2002).
- [3] Allen R. D.: *Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants*, Plant Physiol., **107**, 1049-1054 (1995).
- [4] Altomare R. E., Kohler J., Greenfield P. F., Kittrell J. R.: *Deactivation of immobilized beer liver catalase by hydrogen peroxide*, Biotechnol. Bioeng., **16**, 1659-1672 (1974).
- [5] Altomare R. E., Greenfield P. F., Kittrell J. R.: *Inactivation of immobilized fungal catalase by hydrogen peroxide*, Biotechnol. Bioeng., **16**, 1675-1680 (1974).
- [6] Akertek E., Tarhan L.: *Characterization of immobilized catalases and their application in pasteurization of milk with H₂O₂*, Appl. Biochem. Biotechnol., **50**, 291-303 (1995).
- [7] Akgöl S., Denizli A.: *Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in catalase adsorption*, J. Mol. Catal. B: Enzym., **28**, 7-14 (2004).
- [8] Alptekin O., Tükel S. S., Yildirim D., Alagöz D.: *Immobilization of catalase onto Eupergit C and its characterization*, J. Mol. Catal. B: Enzym., **64**, 177-183 (2010).
- [9] Andersen J. T., Kloverpris J.: *Environmental assessment of enzymatic biotechnology*, Case Study Report 2004.
- [10] Andreoletti P., Sainz G., Jaquinod M., Gagnon J., Jouve H. M.: *High-resolution structure and biochemical properties of a recombinant Proteus mirabilis catalase depleted in iron*, Proteins: Struct. Funct. Bioinform., **50**, 261-271 (2003).
- [11] Aymard C., Belardi A.: *Kinetics of thermal inactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of mechanism*, Enz. Microb. Technol., **27**, 612-618 (2000).
- [12] Bartosz G.: *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, PWN Warszawa, 2006.
- [13] Barynin V. V., Whittaker M. M., Antonyuk S. V., Lamzin V. S., Harrison P. M., Artymiuk P. J., Whittaker J. W.: *Crystal structure of manganese catalase from Lactobacillus plantarum*, Structure, **9**, 725-738 (2001).
- [14] Biczak R., Herman B., Rychter P.: *Wpływ zasolenia NaCl na aktywność katalazy i peroksydazy w liściach selera naciowego i fasoli szparagowej*, Chemia i Inż. Ekol., **9**, 205-211 (2002).
- [15] Bednarski W., Fiedurek J. (red.): *Podstawy biotechnologii przemysłowej*, WNT Warszawa, 2007.
- [16] Berka R. M., Fowler T., Vaha-Vahe P.: *Use of Aspergillus niger catalase-R for hydrogen peroxide neutralization*, Patent EP629134, Genecor International Inc. (1993).
- [17] Blandino A., Macías M., Cantero D.: *Modelling and simulation of a bienzymatic reaction system co-immobilised within hydrogel-membrane liquid-core capsules*, Enz. Microb. Technol., **31**, 556-565 (2002).
- [18] Bonnichsen R. K., Chance B., Theorell H.: *Catalase activity*, Acta Chem. Scand., **1**, 685-709 (1947).
- [19] Brauner N., Shacham M.: *Statistical analysis of linear and nonlinear correlation of the Arrhenius equation constants*, Chem. Eng. Proc., **36**, 243-249 (1997).
- [20] Bravo J., Verdaguer N., Tormo J., Betzel C., Switala J., Loewen P. C., Fita I.: *Crystal structure of catalase HP11 from Escherichia coli*, Structure, **3**, 491-502 (1995).
- [21] Brill A. S., Williams R. J. P.: *Primary compounds of catalase and peroxidase*, Biochem. J., **78**, 253-262 (1961).

- [22] Brown-Peterson N. J., Salin. M. L.: *Purification and characterization of mesohalic catalase from the halophilic bacterium Halobacterium halobium.*, J. Bacteriol., **177**, 378–384 (1995).
- [23] Bryjak J.: *Immobilizacja enzymów. Część I: Metody konwencjonalne*, Wiad. Chem., **58**, 691-746 (2004).
- [24] Bučkowa M., Godočiková J., Šimonovičova A., Polek B.: *Production of catalase by Aspergillus niger isolates as a response to pollutant stress by heavy metals*, Curr. Microbiol., **50**, 175-179 (2005).
- [25] Campanella L., Roversi R., Sammartino M. P., Tomassetti M.: *Hydrogen peroxide determination in pharmaceutical formulations and cosmetics using a new catalase biosensor*, J. Pharm. Biomed. Anal., **18**, 105-116 (1997).
- [26] Carpena X., Soriano M., Klotz M. G., Duckworth H. W., Donald L. J., Melik-Adamyany W., Fita I., Loewen P. C.: *Structure of the clade 1 catalase, catf of Pseudomonas syringae at 1.8 Å resolution*, Proteins: Struct. Funct. Bioinform., **50**, 423-436 (2003).
- [27] Çetinus Ş. A., Öztöp H. N.: *Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads*, Enz. Microb. Technol., **32**, 889-894 (2003).
- [28] Çetinus Ş. A., Öztöp H. N.: *Immobilization of catalase on chitosan film*, Enz. Microb. Technol., **26**, 497-501 (2000).
- [29] Çetinus S. A., Şahin E., Saraydin D.: *Preparation of Cu(II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization*. Food Chemistry, **114**, 962–969 (2009).
- [30] Chance B.: *An intermediate compound in the catalase-hydrogen peroxide reaction*, Acta Chem. Scand., **1**, 236-267 (1947).
- [31] Chance B., Maehly A.C.: *Assay of catalases and peroxidases*, Methods Enzymol., **2**, 764 -775 (1955).
- [32] Chance B., Sies M., Boveris A.: *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*, Physiol. Rev., **59**, 527- 605 (1979).
- [33] Chang T. M. S.: *Stabilization of enzymes by microencapsulation with a concentrated protein solution or by microencapsulation followed by cross-linking with glutaraldehyde*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **44**, 1531-1536 (1971).
- [34] Chelikani P., Fita I., Loewen P. C.: *Diversity of structures and properties among catalases*, Cell. Mol. Life Sci., **61**, 192-208 (2004).
- [35] Chen K. Ch., Wu J. Y.: *Substrate protection of immobilized glucose isomerase*, Biotechnol. Bioeng., **30**, 817-824 (1987).
- [36] Christensen T., Svensson B., Sigurskjold B. W.: *Thermodynamics of reversible and irreversible unfolding and domain interactions of glucoamylase from Aspergillus niger studied by differential scanning and isothermal titration calorimetry*, Biochemistry, **38**, 6300-6310 (1999).
- [37] Christensen B. E., Lange N. K., Daimon K.: *Catalase, its production and use*, Patent US 5571719A, Novo Nordisk (1996).
- [38] Costa S., Tzanov T., Carneiro A. F., Gübitz G. M., Cavaco-Paula A.: *Recycling of textile bleaching effluents for dyeing using immobilized catalase*, Biotechnol. Lett., **24**, 173-176 (2002).
- [39] Costa S., Tzanov T., Carneiro A. F., Gübitz G. M., Cavaco-Paula A.: *Studies of stabilization of native catalase using additives*, Enz. Microb. Technol., **30**, 387-391 (2002).
- [40] Deisseroth A., Dounce L. A.: *Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physical role*, Physiol. Rev., **50**, 319-375 (1970).

- [41] DeLuca D.C., Dennis R., Smith W. G.: *Inactivation of an animal a fungal catalase by hydrogen peroxide*, Arch. Biochem. Biophys., **320**, 129-134 (1995).
- [42] Dıngler A., Aydemir T.: *Purification and characterization of catalase from chard (Beta vulgaris var. cicla)*, J. Enzyme Inhib., **16**, 165–175 (2001).
- [43] Dhaese P.: *Catalase: an enzyme with growing industrial potential*, Chim. Oggi, **14**,19-21 (1996).
- [44] Do D. D., Weiland R. H.: *Consistency between rate expressions for enzyme reactions and deactivation*, Biotechnol. Bioeng., **22**, 1087-1093 (1980).
- [45] Dunfold H.B.: *Peroxidases and catalases: Biochemistry, biophysics, biotechnology and physiology*, Wiley 2010
- [46] Eberhardt A. M., Pedroni V., Volpe M., Ferreira M. L.: *Immobilization of catalase Aspergillus niger on inorganic and biopolymeric supports for H₂O₂ decomposition*, Appl. Catal. B: Envir., **47**, 153-163 (2004).
- [47] Edwards R. A., Jacobson A. L., Huber R. E.: *Thermal denaturation of β -galactosidase and two site-specific mutants*, Biochemistry, **29**, 11001-11008 (1990).
- [48] Fernández-Lafuente R., Rodríguez V., Guisán J. M.: *The coimmobilization of d-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of d-amino acids (d-phenylalanine) into α -keto acids (phenylpyruvic acid)*, Enz. Microb. Technol., **23**, 28-33 (1998).
- [49] Feuers R. J., Pattillo F. M., Osborn C. K., Adams K. L., DeLuca D., Smith W. G.: *Application of an integrated rate equation to the inactivation of catalase*, Free Rad. Biol. Med., **15**, 223-226 (1993).
- [50] Fita I., Rossmann M. G.: *The NADPH binding site on beef liver catalase*, Proc. Natl. Acad. Sci., **82**, 1604-1608 (1985).
- [51] Fiedurek A., Gromada A.: *Selection of biochemical mutants of Aspergillus niger with enhanced catalase production*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **47**, 313–316 (1997).
- [52] Fiedurek J., Szczodrak J.: *Katalaza – właściwości, rola fizjologiczna i zastosowanie*, Post. mikrobiol., **36**, 71-80 (1997).
- [53] Fiedurek J., Gromada A., Slomka A., Kornilowicz-Kowalska T., Kurek E., Melke J.: *Catalase activity in arctic microfungi grown at different temperatures*, Acta Biol. Hung., **54**, 105-112 (2003).
- [54] Fruhwirth G. O., Paar A., Gudelj M., Cavaco-Paulo A., Robra K.-H., Gübitz G. M.: *An immobilised catalase peroxidase from the alkalothermophilic Bacillus SF for the treatment of textile-bleaching effluents*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **60**, 313-319 (2002).
- [55] Gasyna Z.: *Struktura i funkcje katalazy*, Post. Biochem., **21**, 175-191 (1975).
- [56] Gianfreda L., Marrucci G., Grizzuti N., Greco G.: *Acid phosphatase deactivation by a series mechanism*, Biotechnol. Bioeng., **26**, 518-527 (1984).
- [57] Gianfreda L., Marrucci G., Grizzuti N., Greco G.: *Series mechanism of enzyme inactivation. Characterization of intermediate forms*, Biotechnol. Bioeng., **27**, 877-882 (1985).
- [58] George P.: *Reaction between catalase and hydrogen peroxide*, Nature, **160**, 41-43 (1947).
- [59] Ghadermarzi M., Moosavi-Movahedi A. A.: *Determination of the kinetic parameters for the "suicide substrate" inactivation of bovine liver catalase by hydrogen peroxide*, J. Enz. Inhib., **10**, 167-175 (1996).
- [60] Ghadermarzi M., Moosavi-Movahedi A. A.: *The effects of temperature and pH on the kinetics of reactions between catalase and its suicide substrate hydrogen peroxide*, Ital. J. Biochem., **46**, 197-205 (1997).
- [61] Gouet P., Jouve H. M., Dideberg O.: *Crystal structure of Proteus mirabilis PR catalase with and without bound NADPH*, J. Mol. Biol., **249**, 933-954 (1995).

- [62] Görenek G., Akyilmaz E., Dinçkaya E.: *Immobilization of catalase by entrapping in alginate beads and catalase biosensor preparation for the determination of hydrogen peroxide decomposition*, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotech.*, **32**, 453-461 (2004).
- [63] Grego G., Gianfreda L.: *An experimental technique for the discrimination between series and parallel mechanisms of enzyme deactivation*, *Biotechnol. Lett.*, **6**, 693-698 (1980).
- [64] Grubecki I., Wójcik M.: *Comparison between isothermal and optimal temperature policy for batch reactor*, *Chem. Eng. Sci.*, **55**, 5161-5163 (2000).
- [65] Grubecki I., Wójcik M.: *Analysis of temperature policies for batch reactors with concentration independent catalyst deactivation*, *J. Chem. Eng. Jap.*, **39**, 1065-1068 (2006).
- [66] Gruf H., Ruck R., Traynor J.: *Properties of a unique catalase isolated from Aspergillus niger*, *Can. J. Biochem.*, **56**, 916-919 (1978).
- [67] Hakansson K. O., Brugna M., Tasse L.: *The three-dimensional structure of catalase from Enterococcus faecalis*, *Acta Crystallogr., Sect. D*, **60**, 1374-1380 (2004).
- [68] Hara I., Ichise N., Kojima K., Kondo H., Ohgiya S., Matsuyama H., Yumoto I.: *Relationship between the size of the bottleneck 15 Å from iron in the main channel and the reactivity of catalase corresponding to the molecular size of substrates*, *Biochemistry*, **46**, 11-22 (2007).
- [69] Henley J. P., Sadana A.: *A mathematical analysis of enzyme stabilization by a series type mechanism: influence of chemical modifiers*, *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 959-969 (1984).
- [70] Henley J. P., Sadana A.: *Deactivation theory*, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1277-1285 (1986).
- [71] Henley J. P., Sadana A.: *Categorization of enzyme deactivations using series-type mechanism*, *Enz. Microb. Technol.*, **7**, 50-60 (1985).
- [72] Henley J. P., Sadana A.: *Series-types enzyme deactivation: influence of intermediate activity on deactivation kinetics*, *Enz. Microb. Technol.*, **6**, 35-41 (1984).
- [73] Herman B., Biczak R., Rychter P.: *Reakcje owśa na zasolenie podłoża*, *Chemia i Inż. Ekol.*, **10**, 73-80 (2003).
- [74] Hidalgo A., Betancor L., Lopez-Gallego F., Moreno R., Berenguer J.: *Design of an immobilized preparation of catalase from Thermus thermophilus to be used in a wide range of conditions.: Structural stabilization of a multimeric enzyme*, *Enz. Microb. Technol.*, **33**, 278-285 (2003).
- [75] Horst F., Rueda E. H., Ferreira M. L.: *Activity of magnetite-immobilized catalase in hydrogen peroxide decomposition*, *Enz. Microb. Technol.*, **38**, 1005-1012 (2006).
- [76] Houg J. Y., Yu H. Y., Chen K. Ch., Tiu C.: *Analysis of substrate protection of an immobilized glucose isomerase reactor*, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 451-458 (1993).
- [77] http://www.amano-enzyme.co.jp/pdf/food_e/ms_food_CNU-5_e.pdf
- [78] http://www.asa-enzyme.de/produkte/technische/catalase_fl/catalasefl-3720-de.pdf
- [79] http://www.assaydesigns.com/objects/catalog/product/extras/907-027_MSDS.pdf
- [80] http://www.biocatalysts.com/pages/enzymes_by_application.php
- [81] http://www.biocon.es/documentos/fds/fds_emzimas_comerciales/catalase_food_aspergillus_n.pdf
- [82] http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=1.11.1.6
- [83] http://www.genencor.com/wps/wcm/connect/011171004fb4e0f1a782f745de7f5ba1/Textile_leaflet_march_06-for+customers.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=011171004fb4e0f1a782f745de7f5ba1
- [84] <http://www.poch.com.pl/karty-charakterysty,0,0>
- [85] <http://www.p2pays.org/ref/10/09235.htm>

- [86] <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=4BLC>
- [87] <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=4CAT>
- [88] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1F4J>
- [89] <http://www.sigmaaldrich.com>
- [90] Hughes A. R., McCrudden J. E., Mayes B. J. R.: *Process for bleaching dark fish meat*, Patent US 4136204 (1979).
- [91] Ibrahim H., Schlegel H. G.: *Efficiency of bovine liver catalase as catalyst to cleave H₂O₂ added continually to buffer solutions*, *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1895-1906 (1980).
- [92] Isobe K., Inoue N., Takamatsu Y., Kamada K., Wakao N.: *Production of catalase by fungi growing at low pH and high temperature*, *J. Bios. Bioeng.*, **101**, 73-76 (2006).
- [93] Jakopitsch Ch., Auer M., Regelsberger G., Jantschko W., Furtmüller P. G., Rüter F., Obinger Ch.: *Distal site aspartate is essential in the catalase activity of catalase-peroxidases*, *Biochemistry*, **42**, 5292-5300 (2003).
- [94] Jakopitsch Ch., Vlasits J., Wiseman B., Loewen P. C., Obinger Ch.: *Redox intermediates in the catalase cycle of catalase-peroxidases from Synechocystis PCC 6803, Burkholderia pseudomallei, and Mycobacterium tuberculosis*, *Biochemistry*, **46**, 1183-1193 (2007).
- [95] Jones P., Suggett A.: *The catalase-hydrogen peroxide system. A theoretical appraisal of the mechanism of catalase action*, *Biochem. J.*, **110**, 621-629 (1968).
- [96] Jones P., Suggett A.: *The catalase-hydrogen peroxide system. Kinetics of catalatic action at high substrate concentrations*, *Biochem. J.*, **110**, 617-620 (1968).
- [97] Jones P., Suggett A.: *The catalase-hydrogen peroxide system. Role of sub-units in the thermal deactivation of bacterial catalase in the absence of substrate*, *Biochem. J.*, **108**, 833 - 838 (1968).
- [98] Jones P., Wynne-Jones W. F. K.: *Mechanism of catalase action*, *Trans Faraday Soc.*, **58**, 1148-1158 (1962).
- [99] Jones M. N., Finn A., Moosavi-Movahedi A., Waller B. J.: *The activation of Aspergillus niger catalase by sodium n-dodecyl-sulphate*, *Biochim. Biophys. Acta*, **913**, 395-398 (1987).
- [100] Jurado E., Camacho F., Luzón G., Vicaria J. M.: *Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature*, *Enz. Microb. Technol.*, **34**, 33-40 (2004).
- [101] Jürgen-Lohmann D. L., Legge R. L.: *Immobilization of bovine catalase in sol-gels*, *Enz. Microb. Technol.*, **39**, 626- 633 (2006).
- [102] Kaddour S., López-Gallego F., Sadoun T., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M.: *Preparation of an immobilized -stabilized catalase derivative from Aspergillus niger having its multimeric structure stabilized: The effect of Zn²⁺ on enzyme stability*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **55**, 142-145 (2008).
- [103] Kang Y. S., Lee D. H., Yoon B. J., Oh D. C.: *Purification and characterization of a catalase from photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum S1 grown under anaerobic conditions*, *J. Microbiol.*, **44**, 185-191 (2006).
- [104] Kayser O., Müller R.: *Biotechnologia farmaceutyczna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa, 2003.
- [105] Kączkowski J.: *Podstawy biochemii*, WNT Warszawa, 2009.
- [106] Kikuchi-Torii K., Hayashi S., Nakamoto H., Nakamura S.: *Properties of Aspergillus niger catalase*, *J. Biochem.*, **92**, 1449-1456 (1982).
- [107] Kikuchi K., Kawamura-Konishi Y., Suzuki H.: *The reaction of Aspergillus niger catalase with methyl hydroperoxide*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 88-94 (1992).
- [108] Klička R., Kubáček L.: *Statistical properties of linearization of the Arrhenius equation via the logarithmic transformation*, *Chemom. Intell. Lab. Sys.*, **39**, 69-75 (1997).

- [109] Klyszeko-Stefanowicz L.: *Ćwiczenia z biochemii*, PWN Warszawa-Poznań, 1982.
- [110] Ko T. P., Day J., Malkin A. J., McPherson A.: *Structure of orthorhombic crystals of beef liver catalase*, Acta Crystallogr. Sect. D, **55**, 1383-1394 (1999).
- [111] Kremer M. L., Baer S.: *Stable intermediates in kinetic models of catalase action*, J. Phys. Chem., **78**, 1919-1922 (1974).
- [112] Kulys J., Kriauciunas K., Vidziunaite R.: *Biphasic character of fungal catalases inhibition with hydroxylamine in presence of hydrogen peroxide*, J. Mol. Catal. B: Enzym., **26**, 79-85 (2003).
- [113] Ladero M., Santos A., García-Ochoa F.: *Kinetic modeling of the thermal inactivation of an industrial β -galactosidase from Kluyveromyces fragilis*, Enz. Microb. Technol., **38**, 1-9 (2006).
- [114] Lardinois O. M.: *Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide*, Free Rad. Res., **22**, 251-274 (1995).
- [115] Lardinois O. M., Mestdagh M. M., Rouxhet P. G.: *Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide*, Biochim. Biophys. Acta, **1295**, 222-238 (1996).
- [116] Lartillot S., Kedziora P., Athias A.: *Purification and characterization of a new fungal catalase*, Prep. Biochem., **18**, 241-246 (1988).
- [117] Lencki R. W., Arul J., Neufeld R. J.: *Effect of subunit dissociation, denaturation, aggregation, coagulation and decomposition on enzyme inactivation kinetics: I. First-order behavior*, Biotechnol. Bioeng., **40**, 1421-1426 (1992).
- [118] Lencki R. W., Arul J., Neufeld R. J.: *Effect of subunit dissociation, denaturation, aggregation, coagulation and decomposition on enzyme inactivation kinetics: II. Biphasic and grace period behavior*, Biotechnol. Bioeng., **40**, 1427-1434 (1992).
- [119] Loewen P. C., Carpena X., Rovira C., Ivancich A., Perez-Luque R., Haas R., Odenbreit S., Nicholls P., Fita I.: *Structure of Helicobacter pylori catalase, with and without formic acid bound, at 1.6 Å resolution*, Biochemistry, **43**, 3089-3103 (2004).
- [120] Lumry R., Eyring H. J.: *Conformational changes of proteins*, J. Phys. Chem., **58**, 110-120 (1954).
- [121] Machado M. F., Saraiva J.: *Inactivation and reaction kinetics of horseradish peroxidase in phosphate buffer and buffer-dimethylformamide solutions*, J. Mol. Catal. B: Enzym., **19-20**, 451-457 (2002).
- [122] Maehly A. C., Chance B.: *The assay of catalases and peroxidase*, Methods Biochem. Anal., **1**, 357-424 (1954).
- [123] Maté M. J., Zamocky M., Nykyri L. M., Herzog C., Alzari P. M., Betzel C., Koller F., Fita I.: *Structure of catalase-A from Saccharomyces cerevisiae*, J. Mol. Biol., **268**, 135-149 (1999).
- [124] Meir E., Yagil E.: *Further characterization of the two catalases in Escherichia coli*, Curr. Microbiol., **12**, 315-319 (1985).
- [125] Melik-Adamyany W. R., Barynin V. V., Vagin A. A., Borisov V. V., Vainshtein B. K., Fita I., Murthy M. R. N., Rossmann M. G.: *Comparison of beef liver and Penicillium vitale catalases*, J. Mol. Biol., **188**, 63-72 (1986).
- [126] Melo E. P., Carvalho C. M. L., Aires-Barros M. R., Costa S. M. B., Cabral J. M. S.: *Deactivation and conformational changes of cutinase in reverse micelles*, Biotechnol. Bioeng., **58**, 380-386 (1998).
- [127] Meyer A. S., Pedersen L. H., Isaksen A.: *The effect of various food parameters on the activity and stability of catalase from Aspergillus niger and catalase from bovine liver*, Food Chem., **60**, 137-142 (1997).
- [128] Milek J., Wójcik M.: *Wyznaczenie parametrów termicznej dezaktywacji enzymów*, Inż. Ap. Chem., **3**, 69-70 (2009).

- [129] Moosavi-Movahedi A. A., Wilkinson A. E., Jones M. N.: *Characterization of Aspergillus niger catalase*, Int. J. Biol. Macromol., **9**, 327-332 (1987).
- [130] Moosavi-Movahedi A. A.: *Interaction of Aspergillus niger catalase with sodium N-dodecyl sulphate*, Pure App. Chem., **66**, 71-75 (1994).
- [131] Mozhaev V. V., Martinek K.: *Inactivation and reactivation of proteins (enzymes)*, Enz. Microb. Technol., **4**, 299-309 (1982).
- [132] Murshudov G. N., Melik-Adamyany W. R., Grebenko A. I., Barynin V. V., Vagin A. A., Vainshtein B. K., Dauter Z., Wilson K. S.: *Three-dimensional structure of catalase from Micrococcus lysodeikticus at 1.5 Å resolution*, FEBS Lett., **312**, 127-131 (1992).
- [133] Murshudov G. N., Grebenko A. I., Brannigan J. A., Antson A. A., Barynin V. V., Dodson G. G., Dauter Z., Wilson K. S., Melik-Adamyany W. R.: *The structures of Micrococcus lysodeikticus catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex*, Acta Crystallogr. Sect. D, **58**, 1972-1982 (2002).
- [134] Nakayama M., Nakajima-Kambe T., Katayama H., Higuchi K., Kawasaki Y., Fuji R.: *High catalase production by Rhizobium radiobacter Strain 2-1*, J. Bios. Bioeng., **106**, 6, 554–558 (2008).
- [135] Oancea D., Stuparu A., Nita M., Puiu M., Raducan A.: *Estimation of the overall kinetic parameters of enzyme inactivation using an isoconversional method*, Biophys. Chem., **138**, 50-54 (2008).
- [136] O'Brien K. B., Killoran S. J., O'Neill R. D., Lowry J. P.: *Development and characterization in vitro of a catalase-based biosensor for hydrogen peroxide monitoring*, Biosens. Bioelectron., **22**, 2994-3000 (2007).
- [137] Ogura Y.: *Catalase activity at high concentration of hydrogen peroxide*, Arch. Biochem. Biophys., **57**, 288-300 (1955).
- [138] Oztürk L., Bülbül M., Elmastas M., Ciftçi M.: *Purification and some kinetic properties of catalase from parsley (Petroselinum hortense Hoffm., Apiaceae) leaves*, Prep. Biochem Biotechnol., **37**, 229-238 (2007).
- [139] Pamula E., Rouxhet P. G.: *Influence of surface properties of carbon fibres on the adsorption of catalase*, Carbon, **43**, 1432-1438 (2005).
- [140] Pifferi P. G., Bonora V., Spagna G., Tramontini M.: *Immobilization of catalase on macromolecular supports activated with acid dyes*, Proc. Biochem., **28**, 29-38 (1993).
- [141] Polak E.: *Optimization – Algorithms and consistent approximations*, Springer-Verlag New York, 1997.
- [142] Polakovič M., Vrabel P.: *Analysis of the mechanism and kinetics of thermal inactivation of enzymes: Critical assessment of isothermal inactivation experiments*, Proc. Biochem., **31** (8), 787-800 (1996).
- [143] Polakovič M., Bryjak J.: *Modelling of the kinetics of thermal inactivation of glucoamylase from Aspergillus niger*, J. Mol. Catal. B: Enzym., **19-20**, 443-450 (2002).
- [144] Porter W. R., Staack H., Brandt K., Manning M. C.: *Thermal stability of low molecular weight urokinase during heat treatment. I Effect of protein concentration, pH and ionic strength*, Thrombosis Rev., **71**, 265-279 (1993).
- [145] Poznansky M. J., Chang T. M.S.: *Comparison of the enzyme kinetics and immunological properties of catalase immobilized by microencapsulation and catalase in free solution for enzyme replacement*, Biochim. Biophys. Acta, **334**, 103-115 (1974).
- [146] Privalov P. L.: *Thermodynamic problem of protein structure*, Ann. Rev. Biophys. Chem., **18**, 47-49 (1989).
- [147] Putnam C. D., Arvai A. S., Bourne Y., Tainer J. A.: *Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism*, J. Mol. Biol., **296**, 295-309 (2000).
- [148] Rio L. A., Ortega M. G., Lopez A. L., Gorge J. L.: *A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode*, Anal. Biochem., **80**, 409–415 (1977).

- [149] Rorth M., Jensen P. K.: *Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode*, *Biochim. Biophys. Acta*, **139**, 171-173 (1967).
- [150] Sadana A., Henley J. P.: *Mechanistic analysis of complex enzyme deactivation: influence of various parameters on series type inactivations*, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 977-987 (1986).
- [151] Schlegel H. G.: *Mikrobiologia ogólna*, PWN Warszawa, 1996.
- [152] Schoevaart R., Kieboom T.: *Combined catalytic reactions – nature's way*, *Chem. Innov.*, **31**, 33-38 (2001).
- [153] Schokker E. P., van Boekel M. A. J. S.: *Kinetic modeling of enzyme inactivation: kinetics of heat inactivation at 90-110°C of extracellular proteinase from Pseudomonas fluorescens 22F*, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4740-4747 (1997).
- [154] Schwab M., Pinto J. C.: *Optimum reference temperature for reparameterization of the Arrhenius equation. Part 1: Problems involving one kinetic constant*, *Chem. Eng. Science*, **62**, 2750-2764 (2007).
- [155] Scott D., Hammer F.: *Properties of Aspergillus catalase*, *Enzymology*, **22**, 229-237 (1960).
- [156] Setsushi M.: *Purification and characterization of polyphenol oxidase from Trametes sp. MS39401*, *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 137-143 (1999).
- [157] Strambini G. R., Gonnelli M., Galley W. C.: *Room temperature phosphorescence of Trp 314 and monitoring of subunit communications in alcohol dehydrogenase from horse liver*, *Biochemistry*, **29**, 203-208 (1990).
- [158] Streitenberger S. A., Villaverde M. J., Sánchez-Ferrer Á., García-Carmona F.: *Microencapsulation of Aerococcus viridans with catalase and its application for the synthesis of dihydroxyacetone phosphate*, *Appl. Microb. Biotech.*, **58**, 73-76 (2002).
- [159] Sugawara T., Kuwajima K., Sugai S.: *Folding of staphylococcal nuclease, A studied by equilibrium and kinetic circular dichroism spectra*, *Biochemistry*, **30**, 2698-2706 (1991).
- [160] Sun W., Kadima T. A., Picard M. A., Dunford H. B.: *Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity*, *Biochem. Cell. Biol.*, **72**, 321-331 (1994).
- [161] Sunberg R.: *Statistical aspects on fitting the Arrhenius equation*, *Chemom. Intell. Lab. Sys.*, **41**, 249-252 (1998).
- [162] Sumner J. B., Dounce A. I.: *Crystalline catalase*, *J. Biol. Chem.*, **121**, 417-427 (1937).
- [163] Switala J., Loewen P. C.: *Diversity of properties among catalases*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **401**, 145-154 (2002).
- [164] Szewczyk K. W.: *Bilansowanie i kinetyka procesów biochemicznych*, OWPW Warszawa, 2000.
- [165] Ścibor D., Czeczot H.: *Katalaza - budowa, właściwości, funkcje*, *Postępy Hig. Med. Dośw.* **60**, 170-180 (2006).
- [166] Tai M. M., Greenfield P. F.: *Determination of the inherent deactivation characteristics for the parallel poisoning of immobilized catalase*, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 805-822 (1981).
- [167] Tarhan L.: *Use immobilized catalase to remove H₂O₂ used in the sterilization of milk*, *Proc. Biochem.*, **30**, 623-628 (1995).
- [168] Tarhan L., Telefoncu A.: *Characterization of immobilized glucose oxidase-catalase and their deactivation in a fluid-bed reactor*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **30**, 45-57 (1990).
- [169] Tarhan L., Uslan A. H.: *Characterization and operational stability of immobilized catalase*, *Proc. Biochem.*, **25**, 14-18 (1990).
- [170] Terzenbach D. P., Blaut M.: *Purification and characterization of a catalase from the nonsulfur phototrophic bacterium Rhodospirillum rubrum and its role in the oxidative stress response*, *Arch. Microbiol.* **169**, 503-508 (1998).

- [171] Thompson V. S.; Schaller K. D., Apel W. A.: *Purification and characterization of a novel thermo-alkali-stable catalase from *Thermus brockianus**, Biotechnol. Prog., **19**, 1292-1299 (2003).
- [172] Thompson V. S.; Schaller K. D., Apel W. A.: *High temperature and alkaline stable catalase*, Patent Appl. US 2005/0112742 (2005).
- [173] Tijkens L. M. M., Rodis P. S., Hertog M. L. A., Proxenia N., Van Dijk C.: *Activity of pectin methyl esterase during of peaches*, J. Food Engin., **39**, 167-177 (1999).
- [174] Traher A. D., Kittrell J. R.: *Film diffusion studies of immobilized catalase in tubular flow reactors*, Biotechnol. Bioeng., **16**, 419-422 (1974).
- [175] Trost E.-M., Fischer L.: *Minimalization of by-product formation during D-amino acid oxidase catalyzed racemate resolution of D/L-amnio acids*, J. Mol. Catal. B: Enzym., **19-20**, 189-195 (2002).
- [176] Tse P. H. S., Gough D.: *Time-dependent inactivation of immobilized glucose oxidase and catalase*, Biotechnol. Bioeng., **29**, 705-713 (1987).
- [177] Tukul S.S., Alptekin O.: *Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate*, Proc. Biochem., **39**, 2149-2155 (2004).
- [178] Vainshtein B. K., Melik-Adamyany W. R., Barynin V. V., Vagin A. A., Grebenko A. I., Borisov V. V., Bartels K. S., Fita I., Rossmann M. G.: *Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution*, J. Mol. Biol., **188**, 49-61 (1986).
- [179] Vasudevan P. T., Weiland R. H.: *Deactivation of catalase by hydrogen peroxide*, Biotechnol. Bioeng., **36**, 783-789 (1990).
- [180] Vasudevan P. T., Weiland R. H.: *Immobilized catalase: Deactivation and reactor stability*, Biotechnol. Bioeng., **41**, 231-236 (1993).
- [181] Vasudevan P. T., Weiland R. H.: *Studies on the morphology of immobilized catalase*, Chem. Eng. J., **55**, B41-B44 (1994).
- [182] Vasudevan P. T., Thakur D. S.: *Soluble and immobilized catalase. Effect of pressure and inhibition on kinetics and deactivation*, Appl. Biochem. Biotechnol., **49**, 173-189 (1994).
- [183] Vrabel P., Polakovič M., Štefuca V., Bálež V.: *Analysis of mechanism and kinetics of thermal inactivation of enzymes: Evaluation of multitemperature data applied to inactivation of yeast invertase*, Enz. Microb. Technol., **20**, 348-354 (1997).
- [184] Vrabel P., Polakovič M., Godó Š., Bálež V., Dočolomanský P., Gemeiner P.: *Influence of immobilization on the thermal inactivation of yeast invertase*, Enz. Microb. Technol., **21**, 196-202 (1997).
- [185] Wang Q., Li Ch. X., Fan X., Wang P., Cui L.: *Immobilization of catalase on cotton fabric oxidized by sodium periodate*, Biocatal. Biotrans., **26**, 437-443 (2008).
- [186] Wilińska A., Bryjak J., Illeová V., Polakovič M.: *Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer*, Internat. Dairy J., **17**, 579-586 (2007).
- [187] Wilson L., Betancor L., Fernandez-Lorente G., Fuentes M., Hidalgo A., Guisan J. M., Pessela B. C. C., Fernandez-Lafuente R.: *Cross-linked aggregates of multimeric enzymes: A simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure*, Biomacromolecules, **5**, 814-817 (2004).
- [188] Witwicki J., Ardelt W.: *Elementy enzymologii*, PWN Warszawa, 1984.
- [189] Wójcik M.: *Enzymatyczny rozkład nadtlenu wodoru w reaktorze półokresowym*, Inż. Chem. i Proc., **8**, 149-155 (1987).
- [190] Wójcik M.: *Wyznaczenie stałej szybkości dezaktywacji równoległej katalazy*, Inż. Ap. Chem., **1**, 20-22 (1989).

- [191] Xiao J., Liang S. J., Tsou C. L.: *Inactivation before significant conformational change during denaturation of papain by guanidine hydrochloride*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1164**, 54-60 (1993).
- [192] Yin G., Ni Y.: *Using hydrogen peroxide in a methanol-based chlorine dioxide generation process*, *Ind. Eng. Chem. Res. J.*, **38**, 3319-3323 (1999).
- [193] Yoon D. S., Won K., Kim Y. H., Song B. K., Kim S. J., Moon S. J., Kim B. S.: *Continuous removal of hydrogen peroxide with immobilised catalase for wastewater reuse*, *Wat. Sci. Tech.*, **55**, 27-33 (2007).
- [194] Yoshimoto M., Wang S., Fukunaga K., Fournier D., Walde P., Kuboi R., Nakao K.: *Novel immobilized liposomal glucose oxidase system using the channel protein OmpF and catalase*, *Biotechnol. Bioeng.*, **90**, 231-238 (2005).
- [195] Yoshimoto M., Sakamoto H., Yoshimoto N., Kuboi R., Nakao K.: *Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver catalase through encapsulation in liposomes*, *Enz. Microb. Technol.*, **41**, 849-858 (2007).
- [196] Yoshioka S., Izutsu K., Aso Y., Takeda Y.: *Inactivation kinetics of enzyme pharmaceuticals in aqueous solution*, *Pharm. Res.*, **8**, 480-484 (1991).
- [197] Yumoto I., Iwata H., Sawabe T., Ueno K., Ichise N., Matsuyama H., Okuyama H., Kawasaki K.: *Characterization of a facultatively psychrophilic bacterium, Vibrio rumoiensis sp. nov., that exhibits high catalase activity*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 67-72 (1999).
- [198] Yumoto I., Hishinuma-Narisawa M., Hirota K., Shingyo T., Takebe F., Nodasaka Y., Matsuyama H., Hara I. *Exiguobacterium oxidotolerans sp. nov., a novel alkaliphile exhibiting high catalase activity*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2013-2017 (2004).
- [199] Yörük I. H., Demir H., Ekici K., Savran A.: *Purification and properties of catalase from Van Apple (Golden delicious)*. *Pakistan J. Nutr.*, **4**, 8-10 (2005).
- [200] Yuichi F., Yoshihiro Y.: *Catalase from Bacillus and process for producing the same*, Patent US 005622849A (1997).
- [201] Yumoto I., Ichihashi D., Iwata H., Istokovics A., Ichise N., Matsuyama H., Okuyama H., Kawasaki K.: *Purification and characterization of a catalase from the facultatively psychrophilic bacterium Vibrio rumoiensis S-1T exhibiting high catalase activity*, *J. Bacteriol.*, **182**, 1903-1909 (2000).
- [202] Zámocký M., Godočiková J., Koller F., Polek B.: *Potential application of catalase-peroxidase from Comamonas terrigena N3H in the biodegradation of phenolic compounds*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **79**, 109-117 (2001).
- [203] Zámocký M., Koller F.: *Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis*, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **72**, 19-66 (1999).
- [204] Zhang Y. L., Zhou J. M., Tsou C.L.: *Inactivation precedes conformation change during thermal denaturation of adenylate kinase*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1164**, 61-67 (1993).
- [205] Zhang Z., He Z., He M.: *Stabilization mechanism of MPEG modified trypsin based on thermal inactivation kinetic analysis and molecular modeling computation*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **14**, 85-94 (2001).

Załącznik

Dezaktywacja termiczna katalazy

Stopień nasycenia tlenem roztworu reakcyjnego podczas pomiaru aktywności katalazy S-A

Tabela Z-1. Temperatura 35°C

| Czas dezaktywacji termicznej | 0 min | 60 min | 140 min | 255 min | 390 min | 585 min | 860 min | 1105 min | 1355 min | 1730 min |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 23,6 | 20,2 | 22,0 | 24,5 | 24,5 | 23,0 | 22,9 | 24,0 | 22,2 | 24,2 |
| 30 | 38,0 | 35,2 | 36,8 | 39,0 | 39,0 | 37,9 | 36,9 | 39,0 | 36,6 | 36,9 |
| 60 | 53,2 | 50,4 | 52,0 | 53,9 | 53,3 | 53,4 | 51,4 | 53,9 | 51,0 | 50,6 |
| 90 | 68,6 | 65,7 | 67,6 | 69,0 | 68,9 | 68,0 | 66,4 | 68,4 | 65,6 | 65,5 |
| 120 | 83,9 | 80,9 | 82,8 | 84,1 | 84,3 | 83,1 | 81,8 | 83,6 | 80,7 | 81,2 |
| 150 | 99,4 | 96,2 | 96,8 | 99,2 | 99,0 | 97,4 | 97,2 | 98,0 | 95,8 | 96,8 |
| Δ O ₂ | 75,8 | 75,0 | 74,8 | 74,7 | 74,5 | 74,4 | 74,3 | 74,0 | 73,6 | 72,6 |

Tabela Z-2. Temperatura 40°C

| Czas dezaktywacji termicznej | 0 min | 80 min | 135 min | 250 min | 420 min | 555 min | 885 min | 1145 min | 1570 min | 1720 min |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 23,6 | 20,2 | 22,0 | 24,8 | 24,9 | 23,0 | 23,9 | 24,0 | 22,2 | 24,2 |
| 30 | 38,0 | 35,1 | 36,8 | 39,6 | 39,1 | 37,0 | 37,2 | 36,7 | 34,6 | 35,9 |
| 60 | 53,2 | 50,3 | 52,0 | 54,3 | 53,6 | 51,2 | 50,4 | 49,6 | 47,3 | 47,9 |
| 90 | 68,6 | 65,7 | 67,3 | 69,1 | 68,1 | 65,2 | 64,0 | 62,4 | 59,9 | 59,9 |
| 120 | 83,9 | 81,0 | 82,5 | 84,3 | 82,7 | 79,3 | 77,4 | 75,3 | 72,2 | 71,8 |
| 150 | 99,4 | 96,0 | 97,5 | 99,5 | 97,2 | 93,3 | 90,8 | 88,3 | 85,4 | 83,3 |
| Δ O ₂ | 75,8 | 75,8 | 75,5 | 74,7 | 72,3 | 70,3 | 68,9 | 64,3 | 63,2 | 59,6 |

Tabela Z-3. Temperatura 45°C

| Czas dezaktywacji termicznej | 0 min | 85 min | 170 min | 255 min | 390 min | 860 min | 1045 min | 1300 min | 1480 min | 1710 min |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 23,4 | 20,2 | 22,0 | 23,2 | 22,5 | 23,0 | 23,9 | 24,0 | 16,2 | 24,2 |
| 30 | 38,0 | 34,2 | 35,8 | 36,8 | 35,5 | 34,4 | 33,9 | 34,2 | 26,2 | 33,9 |
| 60 | 52,7 | 48,5 | 49,5 | 50,4 | 48,3 | 45,8 | 44,4 | 44,4 | 36,3 | 43,3 |
| 90 | 67,6 | 63,0 | 63,3 | 63,9 | 61,2 | 57,2 | 55,1 | 54,7 | 46,4 | 53,0 |
| 120 | 82,5 | 77,4 | 77,3 | 77,3 | 74,3 | 68,6 | 65,8 | 64,9 | 56,6 | 62,4 |
| 150 | 97,4 | 91,8 | 91,2 | 90,6 | 87,3 | 79,9 | 77,2 | 75,1 | 66,8 | 71,8 |
| Δ O ₂ | 74,0 | 71,6 | 69,2 | 67,4 | 64,8 | 56,9 | 53,3 | 51,3 | 50,6 | 47,6 |

Tabela Z-4. Temperatura 50°C

| Czas dezaktywacji termicznej | 0 min | 75 min | 150 min | 260 min | 330 min | 860 min | 1050 min | 1310 min | 1610 min |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 23,4 | 20,2 | 22,0 | 24,5 | 24,5 | 23,0 | 22,9 | 24,0 | 22,2 |
| 30 | 38,0 | 34,2 | 35,5 | 37,0 | 36,8 | 31,9 | 31,4 | 31,0 | 28,2 |
| 60 | 52,7 | 48,1 | 49,0 | 49,8 | 49,3 | 40,7 | 39,9 | 38,1 | 34,4 |
| 90 | 67,6 | 62,1 | 62,6 | 62,9 | 61,5 | 49,2 | 48,4 | 45,2 | 40,5 |
| 120 | 82,5 | 76,1 | 76,3 | 75,4 | 73,8 | 57,8 | 56,8 | 52,2 | 46,8 |
| 150 | 97,4 | 90,0 | 90,0 | 88,4 | 85,9 | 66,6 | 65,2 | 59,1 | 53,0 |
| Δ O₂ | 74,0 | 69,8 | 68,0 | 63,9 | 61,4 | 43,6 | 42,3 | 35,1 | 30,8 |

Tabela Z-5. Temperatura 55°C

| Czas dezaktywacji termicznej | 0min | 45min | 85 min | 210 min | 380 min | 1005 min | 1290 min | 1380 min |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 23,8 | 20,2 | 22,0 | 24,5 | 24,5 | 23,0 | 22,9 | 24,0 |
| 30 | 38,0 | 34,2 | 35,1 | 36,0 | 33,8 | 27,9 | 26,2 | 27,0 |
| 60 | 52,8 | 48,4 | 48,3 | 47,3 | 43,0 | 32,8 | 29,5 | 30,0 |
| 90 | 67,6 | 62,5 | 61,3 | 58,9 | 52,1 | 37,8 | 32,8 | 33,1 |
| 120 | 82,8 | 76,5 | 74,5 | 70,5 | 61,4 | 42,7 | 36,2 | 36,0 |
| 150 | 97,7 | 90,5 | 87,9 | 82,3 | 70,6 | 47,6 | 39,4 | 39,0 |
| Δ O₂ | 73,9 | 70,3 | 65,9 | 57,8 | 46,1 | 24,6 | 16,5 | 15,0 |

Tabela Z-6. Temperatura 60°C

| Czas dezaktywacji termicznej | 0min | 50min | 90 min | 220 min | 375 min | 1015 min | 1300 min | 1390 min |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 23,8 | 20,2 | 22,0 | 24,5 | 24,5 | 23,0 | 22,9 | 24,0 |
| 30 | 38,0 | 33,1 | 33,6 | 33,0 | 31,1 | 24,3 | 23,8 | 25,0 |
| 60 | 52,8 | 46,2 | 45,0 | 41,3 | 37,6 | 25,7 | 24,9 | 26,0 |
| 90 | 67,6 | 59,3 | 56,6 | 49,5 | 44,3 | 27,1 | 25,9 | 26,9 |
| 120 | 82,8 | 72,5 | 68,4 | 58,1 | 50,7 | 28,5 | 26,9 | 27,9 |
| 150 | 97,7 | 85,5 | 80,4 | 66,9 | 57,3 | 30,0 | 27,9 | 28,8 |
| Δ O₂ | 73,9 | 65,3 | 58,4 | 42,4 | 32,8 | 7,0 | 5,0 | 4,8 |

Tabela Z-7. Katalaza S-A Temperatura 65°C i 70°C

| Czas dezaktywacji termicznej | Temperatura 65°C | | | | | Temperatura 70°C | | | | |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 0 min | 25 min | 110 min | 230 min | 310 min | 20min | 90 min | 120 min | 240 min | 315 min |
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 22,7 | 20,2 | 22,0 | 24,5 | 24,5 | 20,2 | 18,0 | 24,5 | 24,5 | 23,0 |
| 30 | 38,0 | 33,2 | 32,1 | 31,0 | 29,0 | 31,9 | 26,4 | 31,3 | 27,6 | 24,3 |
| 60 | 52,8 | 46,6 | 42,1 | 37,2 | 33,3 | 43,7 | 34,8 | 38,2 | 30,8 | 25,7 |
| 90 | 67,6 | 60,0 | 52,2 | 43,4 | 37,9 | 55,3 | 43,2 | 45,2 | 33,9 | 27,1 |
| 120 | 82,4 | 73,5 | 62,3 | 49,6 | 42,3 | 66,9 | 51,5 | 52,0 | 37,1 | 28,7 |
| 150 | 97,2 | 87,0 | 72,3 | 55,9 | 46,6 | 78,8 | 60,0 | 59,0 | 40,2 | 30,2 |
| ΔO_2 | 74,5 | 66,8 | 50,3 | 31,4 | 22,1 | 58,6 | 42,0 | 34,5 | 15,7 | 7,2 |

Stopień nasycenia tlenem roztworu reakcyjnego podczas pomiaru aktywności katalazy N

Tabela Z-8. Temperatura 35°C

| Czas dezaktywacji termicznej | 0 min | 60 min | 150 min | 275 min | 420 min | 595 min | 870 min | 1165 min | 1535 min | 1715 min |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 22,6 | 20,2 | 22,0 | 23,5 | 23,5 | 23,0 | 22,9 | 24,0 | 22,2 | 23,2 |
| 30 | 37,9 | 37,2 | 36,8 | 38,0 | 38,0 | 37,9 | 36,9 | 39,0 | 36,6 | 36,9 |
| 60 | 53,2 | 53,7 | 52,0 | 52,3 | 52,3 | 53,4 | 51,4 | 53,9 | 51,0 | 50,9 |
| 90 | 68,3 | 69,0 | 67,6 | 67,9 | 67,9 | 68,0 | 66,4 | 68,4 | 65,6 | 65,5 |
| 120 | 83,8 | 84,5 | 83,3 | 83,3 | 83,3 | 83,1 | 81,8 | 83,6 | 81,7 | 81,2 |
| 150 | 99,1 | 96,3 | 98,5 | 99,9 | 98,9 | 98,3 | 97,2 | 98,1 | 96,1 | 96,8 |
| ΔO_2 | 76,5 | 76,5 | 76,5 | 76,4 | 76,4 | 75,3 | 74,3 | 74,1 | 73,9 | 73,6 |

Tabela Z-9. Temperatura 40°C

| Czas dezaktywacji termicznej | 0 min | 70 min | 135 min | 250 min | 420 min | 585 min | 910 min | 1155 min | 1520 min | 1700 min |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Czas pomiaru[s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 22,6 | 24,5 | 17,3 | 16,5 | 17,4 | 15,1 | 15,1 | 22,3 | 15,8 | 16,2 |
| 30 | 37,9 | 38,2 | 31,6 | 30,8 | 31,7 | 27,8 | 28,8 | 36,3 | 28,1 | 29,7 |
| 60 | 53,2 | 54,6 | 46,2 | 45,3 | 46,4 | 42,3 | 43,4 | 50,3 | 41,1 | 43,4 |
| 90 | 68,3 | 70,6 | 61,2 | 59,8 | 60,5 | 57,3 | 58,2 | 64,2 | 55,3 | 57,2 |
| 120 | 83,8 | 85,3 | 76,8 | 74,8 | 74,9 | 71,8 | 71,7 | 77,1 | 69,6 | 70,9 |
| 150 | 99,1 | 100,7 | 92,2 | 90,0 | 90,3 | 86,6 | 85,0 | 90,6 | 83,1 | 81,2 |
| ΔO_2 | 76,5 | 76,2 | 74,9 | 73,5 | 72,9 | 71,5 | 69,9 | 68,3 | 67,3 | 65,0 |

Tabela Z-10. Temperatura 45°C

| Czas dezaktywacji termicznej | 0 min | 75 min | 135 min | 245 min | 340 min | 865 min | 985 min | 1265 min | 1520 min | 1760 min |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 21,2 | 17,1 | 24,0 | 24,1 | 19,1 | 22,1 | 17,4 | 23,0 | 15,8 | 38,2 |
| 30 | 34,9 | 31,3 | 37,5 | 36,5 | 32,3 | 35,1 | 30,4 | 35,5 | 25,7 | 49,2 |
| 60 | 50,8 | 47,2 | 53,3 | 51,4 | 45,9 | 49,3 | 44,4 | 48,5 | 38,4 | 61,0 |
| 90 | 67,3 | 63,4 | 68,7 | 67,7 | 59,7 | 63,0 | 58,2 | 62,0 | 51,0 | 73,1 |
| 120 | 82,9 | 78,8 | 83,5 | 82,9 | 74,9 | 76,2 | 71,7 | 75,3 | 63,9 | 85,0 |
| 150 | 99,4 | 94,4 | 99,3 | 98,2 | 90,6 | 89,5 | 84,7 | 88,8 | 76,6 | 97,1 |
| Δ O₂ | 78,2 | 77,3 | 75,3 | 74,1 | 71,5 | 67,4 | 67,3 | 65,8 | 60,8 | 58,9 |

Tabela Z-11. Temperatura 50°C

| Czas dezaktywacji termicznej | 0 min | 60 min | 120 min | 260 min | 355 min | 1000 min | 1330 min | 1535 min | 1750 min |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 21,2 | 18,1 | 19,7 | 18,0 | 24,2 | 15,1 | 16,6 | 20,5 | 22,0 |
| 30 | 34,9 | 32,1 | 34,4 | 30,8 | 34,5 | 25,6 | 26,1 | 28,3 | 31,2 |
| 60 | 50,8 | 47,6 | 48,5 | 44,4 | 48,2 | 37,1 | 37,0 | 39,3 | 40,8 |
| 90 | 67,3 | 63,8 | 63,5 | 58,0 | 62,2 | 48,6 | 48,0 | 50,0 | 50,6 |
| 120 | 82,9 | 79,1 | 77,9 | 72,5 | 76,5 | 59,6 | 57,8 | 60,8 | 60,4 |
| 150 | 99,4 | 93,6 | 92,0 | 87,0 | 90,0 | 70,9 | 68,4 | 71,5 | 70,2 |
| Δ O₂ | 78,2 | 75,5 | 72,3 | 69,0 | 65,8 | 55,8 | 51,8 | 51,0 | 48,2 |

Tabela Z-12. Temperatura 55°C

| Czas dezaktywacji termicznej [h, min] | 0h | 1h | 2h | 4h 20min | 7h 30min | 17h 05min | 21h 30min | 23h 30min |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 24,8 | 15,3 | 15,2 | 15,2 | 24,2 | 15,8 | 18,5 | 24,2 |
| 30 | 37,8 | 27,5 | 27,5 | 25,2 | 31,9 | 22,7 | 23,6 | 29,8 |
| 60 | 51,8 | 40,5 | 40,5 | 36,2 | 41,3 | 30,6 | 29,2 | 34,9 |
| 90 | 66,4 | 53,6 | 53,4 | 47,2 | 51,4 | 38,0 | 35,8 | 40,0 |
| 120 | 81,0 | 66,6 | 65,8 | 58,2 | 62,0 | 46,1 | 43,0 | 44,9 |
| 150 | 95,0 | 79,6 | 78,5 | 69,1 | 72,6 | 54,3 | 49,9 | 49,4 |
| Δ O₂ | 70,2 | 64,3 | 63,3 | 53,9 | 48,4 | 38,5 | 31,4 | 25,2 |

Tabela Z-13. Temperatura 60°C

| Czas dezaktywacji termicznej [h, min] | 0h | 40min | 1h 50min | 5h 10min | 8h 15min | 17h 25min | 21h 50min | 24h 20min |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 24,8 | 16,6 | 22,5 | 16,6 | 25,0 | 21,8 | 23,7 | 22,0 |
| 30 | 37,8 | 27,3 | 32,7 | 23,8 | 33,6 | 24,9 | 26,3 | 24,0 |
| 60 | 51,8 | 40,3 | 44,1 | 32,9 | 42,3 | 28,4 | 29,1 | 26,1 |
| 90 | 66,4 | 54,6 | 55,5 | 42,6 | 50,7 | 32,0 | 31,9 | 28,1 |
| 120 | 81,0 | 68,9 | 66,3 | 52,0 | 58,8 | 35,6 | 34,7 | 30,2 |
| 150 | 95,0 | 83,2 | 76,5 | 61,1 | 66,0 | 39,1 | 37,6 | 32,2 |
| Δ O₂ | 70,2 | 66,6 | 54,0 | 44,5 | 41,0 | 17,3 | 13,9 | 10,2 |

Tabela Z-14. Temperatura 65°C i 70°C

| Czas dezaktywacji termicznej [h, min] | Temperatura 65°C | | | | | Temperatura 65°C | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 0h | 25min | 1h 50min | 4h 20min | 5h 20min | 40min | 1h 10min | 2h 00min | 4h 10min | 5h 35min |
| Czas pomiaru [s] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] | O ₂ [%] |
| 0 | 18,2 | 20,9 | 21,2 | 19,8 | 16,2 | 18,7 | 16,6 | 17,8 | 21,9 | 18,9 |
| 30 | 31,1 | 34,2 | 31,4 | 26,4 | 20,3 | 28,5 | 24,0 | 22,4 | 25,5 | 21,2 |
| 60 | 45,7 | 47,9 | 41,6 | 34,1 | 24,6 | 38,5 | 32,4 | 27,5 | 28,8 | 23,7 |
| 90 | 61,9 | 62,0 | 51,8 | 41,7 | 29,2 | 48,6 | 40,3 | 32,6 | 32,4 | 26,3 |
| 120 | 77,7 | 75,7 | 62,0 | 49,9 | 33,3 | 58,9 | 48,5 | 37,9 | 35,7 | 28,6 |
| 150 | 93,6 | 88,7 | 72,7 | 58,3 | 37,6 | 69,7 | 56,9 | 43,6 | 39,0 | 31,1 |
| Δ O₂ | 75,4 | 67,8 | 51,5 | 38,5 | 21,4 | 51,0 | 40,3 | 25,8 | 17,1 | 12,2 |