

AKADEMIA TECHNICZNO-ROLNICZA  
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH  
W BYDGOSZCZY

Rozprawy  
nr 31

MAREK WÓJCIK

BADANIA NAD KINETYKĄ  
DEZAKTYWACJI KATALAZY DROŹDŹY  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*  
PRZEZ NADTLENEK WODORU

BYDGOSZCZ - 1988



AKADEMIA TECHNICZNO-ROLNICZA  
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH  
W BYDGOSZCZY

**Rozprawy**  
**nr 31**

MAREK WÓJCIK

**BADANIA NAD KINETYKĄ  
DEZAKTYWACJI KATALAZY DROŹDŹY  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*  
PRZEZ NADTLENEK WODORU**

BYDGOSZCZ – 1988

**PRZEWODNICZĄCY KOMITETU REDAKCYJNEGO**  
doc. dr hab. Juliusz Skonieczny

**OPINIODAWCY**  
prof. dr hab. Jerzy Kączkowski  
prof. dr hab. Ryszard Pohorecki

**REDAKTOR NAUKOWY**  
prof. dr hab. Jerzy Roszak

**OPRACOWANIE REDAKCYJNE I TECHNICZNE**  
mgr Halina Kluczyńska



Wydano za zgodą Rektora  
Akademii Techniczno-Rolniczej  
w Bydgoszczy

73079

ISSN 0209-0597

**WYDAWNICTWO UCZELNIANE AKADEMII TECHNICZNO-ROLNICZEJ  
W BYDGOSZCZY**

---

Wyd. I. Nakład 150 egz. Ark. aut. 6, ark. druk. 4. Papier offset. kl. III, B-1.  
Oddano do druku 1988.11.16. Druk ukończono w grudniu 1988 r.  
Cena 150 zł  
Uczelniany Zakład Małej Poligrafii ATR, Bydgoszcz, ul. Olszewskiego 20  
Zamówienie nr 408/88. TR E-8

89 D 3/61

## Spis treści

	str.
WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ .....	5
1. WSTĘP .....	7
2. OBECNY STAN BADAŃ .....	9
2.1. Kinetyka rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę .....	9
2.2. Kinetyka procesu dezaktywacji katalazy przez nadtlenek wodoru .....	14
2.3. Rozkład nadtlenu wodoru przez katalazę w komórce .....	16
3. MODEL MATEMATYCZNY DLA UKŁADU KATALAZA - NADTLENEK WODORU .....	17
3.1. Katalaza uwolniona z komórki .....	17
3.2. Katalaza w komórce .....	22
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA .....	25
4.1. Opis aparatury doświadczalnej .....	25
4.2. Materiały i metody analityczne .....	25
4.3. Sposób przeprowadzenia dcświadczeń .....	26
4.3.1. Katalaza uwolniona z komórki .....	26
4.3.2. Katalaza w komórce .....	27
5. WYNIKI BADAŃ DOŚWIADCZALNYCH .....	29
5.1. Katalaza uwolniona z komórki .....	29
5.2. Katalaza w komórce .....	40
6. DYSKUSJA .....	49
7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....	57
8. LITERATURA .....	58
STRESZCZENIA OBCOJĘZYCZNE .....	63



## WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ

$c_p$	- ciepło właściwe	$\text{kJ/kg} \cdot ^\circ\text{C}$
$E$	- stężenie enzymu	$\text{kmol/m}^3$
$\bar{E}$	- bezwymiarowe stężenie enzymu	
$E_a$	- całkowite stężenie aktywnego enzymu	$\text{kmol/m}^3$
$E_1$	- energia aktywacji dla enzymatycznego rozkładu $\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{kJ/mol}$
$E_2$	- energia aktywacji dla procesu dezaktywacji katalazy przez $\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{kJ/mol}$
$E_3$	- energia aktywacji dla procesu przenikania $\text{H}_2\text{O}_2$ przez błonę komórkową	$\text{kJ/mol}$
$E_4$	- energia aktywacji dla procesu dezaktywacji katalazy przez $\text{H}_2\text{O}_2$ wewnątrz komórki	$\text{kJ/mol}$
$(-\Delta H)$	- ciepło reakcji rozkładu $\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{kJ/mol}$
$k$	- stała szybkości reakcji, $k = \frac{v_m}{K_m}$	$1/\text{s}$
$k_2$	- stała szybkości reakcji w równaniu Michaelisa-Menten	$1/\text{s}$
$k_d$	- stała szybkości dezaktywacji, $k_d = \frac{v_d}{K_d}$	$\text{m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$
$k_q$	- współczynnik przenikania ciepła	$1/\text{h}$
$k_s$	- współczynnik przenikania $\text{H}_2\text{O}_2$ przez błonę komórkową	$1/\text{s}$
$K_d$	- stała Michaelisa dla procesu dezaktywacji	$\text{kmol/m}^3$
$K_m$	- stała Michaelisa dla reakcji rozkładu $\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{kmol/m}^3$
$r_d$	- szybkość dezaktywacji	$\text{kmol/m}^3 \cdot \text{s}$
$r_s$	- szybkość reakcji	$\text{kmol/m}^3 \cdot \text{s}$
$S$	- stężenie $\text{H}_2\text{O}_2$ w reaktorze	$\text{kmol/m}^3$
$S_k$	- stężenie $\text{H}_2\text{O}_2$ wewnątrz komórek	$\text{kmol/m}^3$
$t$	- czas	$\text{s, h}$
$T$	- temperatura roztworu reakcyjnego	$\text{K}$
$T_w$	- temperatura wody w ultratermostacie	$\text{K}$
$v_d$	- stała szybkości dezaktywacji	$1/\text{s}$
$v_m$	- stała szybkości reakcji	$\text{kmol/m}^3 \cdot \text{s}$
$\alpha$	- stopień przemiany	
$\psi$	- stosunek szybkości dezaktywacji katalazy uwolnionej z komórki do szybkości dezaktywacji katalazy w komórce	

### Indeksy

$o$	- stan początkowy
$k$	- odnosi się do katalazy wewnątrz komórki





## 1. WSTĘP

Poznanie kinetyki procesu dezaktywacji enzymów ma bardzo ważne znaczenie przy projektowaniu reaktorów biochemicznych. Odnosi się to zwłaszcza do reaktorów zawierających katalizatory biologiczne w postaci unieruchomionych enzymów lub komórek drobnoustrojów. Katalizatory biologiczne powinny charakteryzować się długotrwałym i stabilnym działaniem, gdyż można je wtedy stosować w procesach ciągłych lub wielokrotnie w procesach periodycznych.

Praktyka przemysłowa wykazała, że bardzo często występuje bardzo szybka dezaktywacja (inaktywacja) enzymów [1, 2] i zjawisko to stanęło na przeszkodzie szerszemu zastosowaniu enzymów unieruchomionych w procesach technologicznych, natomiast coraz częściej znajdują zastosowanie katalizatory biologiczne w postaci unieruchomionych komórek drobnoustrojów [3-5]. Katalizator otrzymany w ten sposób jest wprawdzie mniej selektywny [2], ale unika się znacznych nakładów na wydziałanie i oczyszczanie enzymów. Za najważniejszą zaletę tego rodzaju katalizatora biologicznego uważa się jego długotrwałą stabilność, którą tłumaczy się korzystnym wpływem naturalnego dla enzymu środowiska komórki, powodującego zwolnienie procesu dezaktywacji. Zagadnienie to jest dotychczas mało poznane.

Badania nad kinetyką dezaktywacji enzymów unieruchomionych sprawiają wiele trudności, gdyż bezpośrednio nie można zmierzyć szybkości dezaktywacji. Wielkością obserwowaną jest pozorna szybkość dezaktywacji, która zależy od szybkości dyfuzji zewnętrznej i wewnętrznej. Opracowano wprawdzie metodą [6, 7] wyznaczania rzeczywistej stałej szybkości dezaktywacji na podstawie pomiarów stopnia przemiany w reaktorze rurowym, ale można ją stosować tylko w przypadku, gdy opory dyfuzji zewnętrznej są nieznaczne. Zagadnienie dodatkowo komplikuje się dla enzymów znajdujących się w komórkach unieruchomionych drobnoustrojów. Badania własne [8] i innych autorów [9] wykazały, że efektywny współczynnik dyfuzji dla katalizatorów biologicznych jest zależny od ilości komórek w porach nośnika. Wyeliminowanie wpływu oporów dyfuzji zewnętrznej i wewnętrznej na pomiar szybkości dezaktywacji enzymów jest możliwe przez umieszczenie materiału biologicznego bezpośrednio w roztworze reakcyjnym.

Niniejsza praca miała na celu porównanie szybkości dezaktywacji enzymu pozostającego wewnątrz komórek i po jego uwolnieniu z komórek. W badaniach stosowano drożdże *Saccharomyces cerevisiae* wykazujące aktywność katalazy, która rozkłada nadtlenek wodoru na tlen i wodę. Układ katalaza — nadtlenek wodoru jest bardzo interesujący z teoretycznego punktu widzenia, ponieważ reakcji chemicznej towarzyszy równoległa dezaktywacja enzymu. Kinetyka i mechanizm dezaktywacji katalazy nie zostały dotychczas w pełni poznane, chociaż enzyma znalazł wiele zastosowań w praktyce [10]. W przemyśle mle-

czarskim katalaza jest wykorzystywana do rozkładu  $H_2O_2$  po „zimnej pasteryzacji” mleka przy produkcji serów [11]. Stosuje się ją także, w połączeniu z oksydazą glukozową, do odcukrzania masy jajowej przed suszeniem i do usuwania tlenu ze środków spożywczych oraz otrzymywania kwasu glukonowego metodą enzymatyczną [12, 13]. Dezaktywacja katalazy przez nadtlenek wodoru ograniczała dotychczas możliwości wykorzystania tego enzymu na znacznie szerszą skalę. Wyrażana jest jednak opinia [13], że zastosowanie katalazy w unieruchomionych komórkach drobnoustrojów powinno znacznie poprawić jej stabilność.

W ostatnich latach opatentowano metodę indukcji katalazy w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* [14], a także sposób uzyskiwania katalizatora biologicznego o bardzo wysokiej aktywności katalazy przez unieruchomienie komórek drożdży [15]. Opublikowano również wyniki badań [16-18] nad wykorzystaniem układów enzymatycznych zawierających katalazę do prowadzenia procesów biotechnologicznych metodą komórek unieruchomionych. Prace te wyraźnie wskazują na istnienie zależności między stabilnością stosowanych katalizatorów i ich efektywnością ekonomiczną, a szybkością dezaktywacji katalazy. W tej sytuacji istnieje pilna potrzeba podjęcia systematycznych badań nad kinetyką dezaktywacji katalazy, które pozwolą na opracowanie ilościowych metod oceny katalizatorów biologicznych zawierających katalazę i będą mogły być wykorzystane do celów projektowych.

## 2. OBECNY STAN BADAŃ

### 2.1. Kinetyka rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę

Katalaza (oksydoreduktaza  $H_2O_2 : H_2O_2$ , EC 1.11.1.6) rozkłada nadtlenek wodoru zgodnie z reakcją:



Mechanizm tej reakcji nie został dotychczas w pełni wyjaśniony, mimo wieloletnich badań [19 - 23] nad tym zagadnieniem. Chanca [24] stosując metodę spektrofotometryczną odkrył związek przejściowy występujący w trakcie reakcji katalizowanej przez katalazę. Zaproponowany przez Chanca „mechanizm peroksydacyjny” [24] polega na tym, że wytworzony z nadtlenu wodoru i enzymu kompleks  $ES_I$  reaguje z drugą cząsteczką substratu S dając produkt P i enzym E:



Po przyjęciu hipotezy o stanie quasi - ustalonym dla powyższego mechanizmu okazuje się, że stężenie kompleksu  $ES_I$  nie zależy od stężenia substratu:

$$ES_I = \frac{k_1}{k_1 + k_4} E_c \quad (4)$$

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

$$r_s = - \frac{dS}{dt} = \frac{2 k_1 k_4}{k_1 + k_4} E_c S \quad (5)$$

Według szacunku wykonanego przez Chanca, wartości stałych szybkości reakcji wynoszą:  $k_1 = (4 + 5) \cdot 10^6 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$ ,  $k_4 = (1,5 + 1,8) \cdot 10^7 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$ . Wyniki te ponownie przeanalizowali Zidoni i Kremer [26] oraz Kremer i Baer [27]. Otrzymali oni za pomocą komputera rozwiązania numeryczne równań różniczkowych odpowiadające „mechanizmowi peroksydacyjnemu”. Z obliczeń tych wynika, że w doświadczeniach Chanca nie były spełnione warunki stanu ustalonego, ale proponowany mechanizm reakcji nie został zakwestionowany. Obliczone metodą najlepszego dopasowania stałe wynoszą:  $k_1 = 3 \cdot 10^6 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$ ,

$$k_4 = 5,6 \cdot 10^6 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}.$$

Niezależnie od pomiarów spektrofotometrycznych pozwalających na wyznaczenie stężenia kompleksu  $ES_I$ , prowadzone były liczne badania [28, 29] polegające na bezpośrednim wyznaczaniu szybkości reakcji przez pomiar ilości tworzącego się produktu (tłemu) lub ubywającego substratu (nadtlenku wodoru). Manometryczna metoda pomiaru szybkości wydzielania się tlenu, przy oznaczaniu aktywności preparatów katalazy, daje znaczne zaniżenie wyników [30, 31] i dlatego obecnie wykorzystuje się do tego celu elektrodę tlenową [32, 33]. Szybkość reakcji wyznaczano najczęściej przez pomiar stężenia nieprzereagowanego  $H_2O_2$  metodą miareczkową [28]; stosowane były również inne metody: spektrofotometryczna [34 - 36], fotometryczna [37, 38] i fluorymetryczna [39].

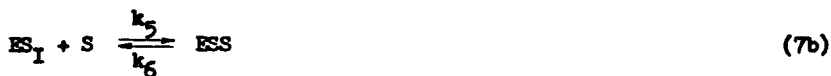
Od początku badań podstawowym problemem pomiarowym było występowanie zjawiska dezaktywacji katalazy przez  $H_2O_2$  i dlatego stosowano różne metody korygowania stałych szybkości reakcji. Bonnichsen i współpracownicy [40] przeprowadzili krytyczną analizę wcześniej publikowanych prac i wykazali, że występowanie zjawiska dezaktywacji doprowadziło do błędnej interpretacji mechanizmu reakcji, to znaczy przyjęcia schematu Michaelisa-Menten i wyznaczenia stałej  $K_m = 0,025 \text{ kmol/m}^3$ . W powszechnie wówczas stosowanej metodzie Eulera-Josephsona pomiary trwały 12 minut i dla tak długiego czasu kontaktu katalazy z  $H_2O_2$  dezaktywacja jest na tyle istotna, że nie można jej pominąć w obliczeniach stałej szybkości reakcji. Bonnichsen i współpracownicy [40] skrócili czas pomiaru do 30 sekund. Wynikiem ich badań było stwierdzenie, że reakcja rozkładu  $H_2O_2$  wobec katalazy przebiega według następującego równania kinetycznego:

$$r_s = - \frac{ds}{dt} = k E_0 S \quad (6)$$

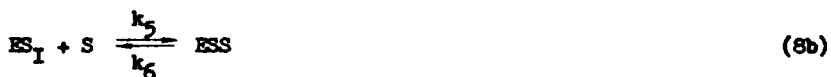
Równanie (6) jest zgodne z modelem peroksydacyjnym przyjętym przez Chanca, jakkolwiek wyznaczona stała  $k = 3,5 \cdot 10^7 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$  dla katalazy pochodzącej z wątroby wołowej jest znacznie większa od obliczonej na podstawie stałych  $k_1$  i  $k_4$  wyznaczonych metodą spektrofotometryczną. Dla katalazy pochodzenia mikrobiologicznego uzyskuje się wartości stałej  $k$  około dwukrotnie większe [41, 42]. Mimo upływu wielu lat procedura Bonnichsena i współpracowników [40] jest dalej zalecana [43] przy wyznaczaniu stałej szybkości reakcji lub stężenia katalazy w układach biologicznych.

Ogura [44] prowadził badania nad działaniem katalazy przy wysokich stężeniach  $H_2O_2$  (do  $5 \text{ kmol/m}^3$ ) stosując technikę przepływu ciągłego. Dla czasów reakcji 0,1 + 0,4 s i bardzo wysokich stężeń enzymu ( $\sim 1,2 \cdot 10^{-7} \text{ kmol/m}^3$ ), zależność między szybkością reakcji a stężeniem  $H_2O_2$  opisana została równaniem Michaelisa-Menten ze stałą  $K_m = 1,1 \text{ kmol/m}^3$ . Otrzymanych danych doświadczalnych nie można wyjaśnić na podstawie „mechanizmu peroksydacyjnego” (równania (2) i (3)). Ogura założył, że istnieje dodatkowy związek i zaproponował dwa następujące mechanizmy reakcji:

## a) mechanizm I



## b) mechanizm II



W obydwu proponowanych mechanizmach reakcji przyjmuje się występowanie potrójnego kompleksu ESS, przy czym w mechanizmie I jest on nieaktywny.

Jones i Suggett [45] stosowali również technikę przepływu ciągłego do badania kinetyki reakcji rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę. Zwrócili oni uwagę na występowanie poważnych ograniczeń w zastosowaniu tej metody do badań katalazy. Rozkład  $H_2O_2$  w metodzie przepływu ciągłego przebiega w warunkach adiabatycznych i zmiana stężenia o  $1 \text{ kmol/m}^3$  powoduje wzrost temperatury o  $23,5^\circ\text{C}$ .

Ogura [44] zakładał izotermiczność warunków doświadczeń, a obliczenia ciepłe wykazują, że zmiany temperatury dochodziły do  $20^\circ\text{C}$ . Jones i Suggett dobrali tak warunki, aby zmiany temperatury roztworu reakcyjnego nie przekraczały  $1^\circ\text{C}$ . Stosując początkowe stężenia  $H_2O_2$  od  $0,3 \text{ kmol/m}^3$  do  $0,7 \text{ kmol/m}^3$  i czasy reakcji od  $0,2 \text{ s}$  do  $0,5 \text{ s}$  otrzymali oni dla stężeń katalazy od  $8,5 \cdot 10^{-9} \text{ kmol/m}^3$  do  $16,9 \cdot 10^{-9} \text{ kmol/m}^3$  wyniki wskazujące na bardziej skomplikowaną zależność kinetyczną, niż to przedstawił Ogura. Zaproponowany przez Jonesa i Suggetta [45] mechanizm reakcji przedstawia się następująco:





gdzie  $ES_{II}$  jest nieaktywnym kompleksem.

Dla krótkich czasów reakcji, po przyjęciu uproszczenia:

$$\frac{dES_{II}}{dt} = \frac{\Delta ES_{II}}{\Delta t} \quad (10)$$

Jones i Suggett otrzymali równanie kinetyczne

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{k' E_0 S}{K_m + S} \quad (11)$$

gdzie:

$$k' = \frac{2 k_3 k_4}{k_4 + k_5 + k_3 k_5 \Delta t}$$

$$K_m = \frac{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5 + k_3 k_4 + k_1 k_3}{k_1 k_4 + k_1 k_5 + k_1 k_3 k_5 \Delta t}$$

Stała kinetyczna  $K_m$  wyznaczona przez ekstrapolację wyników do czasu  $t = 0$  wyniosła  $1,1 \text{ mol/dm}^3$ .

Elektroda tlenowa zastosowana po raz pierwszy przez Rortha i Jensena [32] do badań kinetyki rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę umożliwia wykonanie pomiarów w czasie krótszym od jednej minuty i dzięki temu pominięcie zjawiska dezaktywacji. Goldstein [46] stosując elektrodę tlenową do pomiaru aktywności katalazy w zakresie stężeń  $H_2O_2$  od  $0,015 \text{ kmol/m}^3$  do  $0,1 \text{ kmol/m}^3$  stwierdziła, że wyniki doświadczeń najlepiej opisuje równanie kinetyczne Michaelisa-Menten ze stałą  $K_m = 0,1 \text{ kmol/m}^3$ . Rio i współpracownicy [47] wprowadzili modyfikację do tej metody, polegającą na wcześniejszym usunięciu tlenu z roztworu przez przedmuchiwanie go azotem. Pozwoliło to na znaczne rozszerzenie zakresu pomiarowego. Stała  $K_m$  wyznaczona za pomocą elektrody tlenowej mieści się w zakresie od  $0,047 \text{ kmol/m}^3$  do  $0,19 \text{ kmol/m}^3$  zależnie od pochodzenia enzymu i metody opracowania wyników doświadczeń [46-48]. Należy zwrócić uwagę, że powyższe wartości są od około 5 do 22 razy mniejsze od wyznaczonych metodą przepływu ciągłego.

Mechanizmy reakcji zaproponowane przez Ogurę [44] oraz Jonesa i Suggetta [45] przeanalizowałem przy założeniu stanu quasi-ustalonego. Okazuje się, że dla obydwu mechanizmów przedstawionych przez Ogurę należy przyjąć  $k_2 = 0$ , aby uzyskać równanie kinetyczne Michaelisa-Menten:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{v_m S}{K_m + S} \quad (12)$$

przy czym wartości stałych wynoszą:

a) mechanizm I (równania (7a), (7b), (7c)):

$$v_m = \frac{2 k_4 k_6}{k_5} E_0$$

$$K_m = \frac{(k_1 + k_4) k_6}{k_1 k_5}$$

b) mechanizm II (równania (8a), (8b), (8c)):

$$v_m = \frac{k_5 k_7}{k_5 + k_6 + k_7} E_0$$

$$K_m = \frac{k_5 k_7}{k_1 k_7 + k_1 k_6 + k_1 k_5}$$

Warto zwrócić uwagę, że dla  $S \ll K_m$  mechanizm I prowadzi do równania (5), które odpowiada „mechanizmowi peroksydacyjnemu” (równania (2) i (3)).

Dla mechanizmu reakcji zaproponowanego przez Jonesa i Suggetta [45] otrzymuje się następujące stałe kinetyczne:

$$v_m = 2 k_3 E_0$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} + \frac{k_3}{k_4}$$

Na podstawie doświadczalnych pomiarów szybkości reakcji jako funkcji stężenia, nie można wykluczyć żadnego z powyższych mechanizmów.

Prowadzone były również badania nad wpływem pH i temperatury na kinetykę reakcji rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę. Chance [49] stwierdził, że szybkość reakcji nie zależy od pH w zakresie od 4 do 8,5 pH. Odnosi się to zarówno do szybkości etapów pośrednich, jak i ogólnego równania kinetycznego. Strother i Ackerman [50] stosując metodę spektrofotometryczną wyznaczyli stałe  $k_1$  i  $k_4$  (równania (2) i (3)) w zakresie temperatur od  $-20^\circ C$  do  $+45^\circ C$ . Stała  $k_4$  zmieniała się zgodnie z równaniem Arrheniusa, a energia aktywacji wynosiła 21,4 kJ/mol. Zależność stałej  $k_1$  od temperatury miała postać bardziej skomplikowaną, ponieważ wystąpiły dwa załamania na wykresie Arrheniusa. Wpływ temperatury na stałą szybkości reakcji  $k$  w ogólnym równaniu kinetycznym (6) badany był wielokrotnie [42, 51, 52]. Stwierdzono zgodność z równaniem Arrheniusa, a wyznaczona energia aktywacji (od 2,5 kJ/mol do 5,9 kJ/mol) ma bardzo niską wartość w porównaniu z innymi reakcjami enzymatycznymi. Warto zwrócić uwagę na to, że w większości podręczników i monografii (przykładowo [53-55]) błędnie jest podawana znacznie wyższa wartość energii aktywacji ( $E = 17,6$  kJ/mol), którą wyznaczył Sizer [56]. Wyniki jego pracy nie zostały jednak później potwierdzone.

## 2.2. Kinetyka procesu dezaktywacji katalazy przez nadtlenek wodoru

Katalaza rozkładając  $H_2O_2$  ulega jednocześnie dezaktywacji, która stanowi znaczne utrudnienie w pomiarach aktywności enzymu oraz szybkości reakcji. Dotychczasowe badania były prowadzone przede wszystkim w kierunku poszukiwań takich metod pomiarowych, które minimalizowałyby wpływ dezaktywacji. Zalecane jest wykonywanie doświadczeń przy niskich stężeniach substratu, niskiej temperaturze i stosowaniu krótkich czasów reakcji.

Sam mechanizm dezaktywacji i jego kinetyka są dotychczas słabo poznane. Większość prac badawczych ma charakter jakościowy, a tylko nieliczne próbowały ująć to zjawisko ilościowo. Chance [57] odkrył nieaktywny kompleks katalazy i  $H_2O_2$ , który nazwał kompleksem II w odróżnieniu od kompleksu I biorącego udział w reakcji. W obecności nadmiaru  $H_2O_2$  powstaje inny, nieaktywny kompleks katalazy, który nazwano kompleksem III [58, 59].

Scott i Hamner [60] stwierdzili doświadczalnie, że katalaza pochodzenia mikrobiologicznego (*Aspergillus niger*) jest bardziej odporna na dezaktywację niż katalaza pochodzenia zwierzęcego. Podobne zjawisko zaobserwowano również w przypadku unieruchomionego enzymu [61]. Badania nad rozkładem  $H_2O_2$  za pomocą unieruchomionej katalazy [62-64] wskazują na szybką dezaktywację enzymu, jednak zamieszczone wyniki nie pozwalają na ilościowy opis procesu. Praca Georga [65] stanowiła pierwszą próbę przedstawienia szybkości procesu dezaktywacji doświadczalnym równaniem kinetycznym:

$$-\frac{dE}{dt} = E \left( \frac{aS}{b+S} + cS \right) \quad (13)$$

gdzie stałe:  $a = 0,072 \text{ 1/s}$ ,  
 $b = 0,15 \text{ kmol/m}^3$ ,  
 $c = 0,0185 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$ ,

zostały wyznaczone dla reakcji przebiegającej w temperaturze  $0^\circ\text{C}$  w obecności katalazy pochodzącej z wątroby wołowej.

Powyższe równanie wykorzystał O'Neill [66] w analizie teoretycznej, która miała na celu zminimalizowanie szybkości dezaktywacji przez dobór odpowiedniego typu reaktora. Warto zwrócić uwagę na to, że po wykonaniu dodawania i pominięciu wyrazu  $cS^2$  równanie (13) przyjmuje postać równania Michaelisa-Menten ze stałą  $K_d = b$

$$-\frac{dE}{dt} = \frac{v_d ES}{K_d + S} \quad (14)$$

gdzie:  $v_d = 0,075 \text{ 1/s}$ .

Dla stężeń  $S \ll K_d$  równanie (14) upraszcza się do postaci:

$$-\frac{dE}{dt} = k_d ES \quad (15)$$

gdzie:  $k_d = 0,5 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$ .



Równanie w tej postaci stosował autor [67, 68] w modelu matematycznym opisującym symulacje doświadczalne [33] rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę w reaktorze półokresowym.

W badaniach nad dezaktywacją katalazy unieruchomionej również przyjmowano założenie, że szybkość procesu dezaktywacji można przedstawić równaniem kinetycznym pierwszego rzędu w odniesieniu do stężenia enzymu oraz substratu [61, 69]. Wyznaczone stałe szybkości dezaktywacji są jednak wielkościami pozornymi, gdyż nie uwzględniono w obliczeniach procesu dyfuzji w porach nośnika. Wyjątek stanowi praca doświadczalna Tai i Greenfieldda [70], w której wpływ procesu dezaktywacji na współczynnik efektywności katalizatora przedstawiono jako rozwiązanie analityczne modelu zlinearyzowanego [71]. Wyniki doświadczalne Tai i Greenfieldda były przedmiotem krytycznych analiz matematycznych [72-74], które wykazały, że błędne było założenie o równomiernym rozkładzie stężenia enzymu w porach nośnika.

Tse i Gough [75] badali dezaktywację katalazy z *Aspergillus niger* unieruchomionej w membranie z kolagenu. Zastosowali oni bardzo niskie stężenie enzymu i membrany o małej grubości. Dzięki temu w znacznym stopniu wyeliminowali wpływ oporów dyfuzji wewnętrznej na wyznaczoną stałą szybkości dezaktywacji ( $k_d = 0,015 \text{ kmol/m}^3 \cdot \text{s}$  w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ ).

Badania Lücka [76] nad dezaktywacją katalazy w roztworze wykazały, że dla szerokiego zakresu stężeń  $H_2O_2$  nie można wykorzystywać równań kinetycznych:

$$r_s = kES \quad (16)$$

$$r_d = k_d ES \quad (17)$$

Miller [77] wyznaczając aktywność katalazy dla stężeń  $H_2O_2$  mniejszych od  $0,06 \text{ kmol/m}^3$  zastosował równanie kinetyczne dezaktywacji  $r_d = k_d E$  niezależne od stężenia  $H_2O_2$ .

Podejmowane były również próby [20, 78] przedstawienia jednego, spójnego logicznie mechanizmu, który uwzględniałby dezaktywację enzymu podczas przebiegu reakcji. Przedstawione schematy mają jednak bardzo ogólną postać i nie pozwalają na jednoznaczne sformułowanie równań kinetycznych. Jones i Suggett [45] przedstawiając mechanizm reakcji (równania (9a), (9b) i (9c)) uwzględnili w nim proces dezaktywacji (równanie (9d)), który prowadzi do następującego równania kinetycznego:

$$-\frac{dE}{dt} = \frac{v_d ES}{K_d + S} \quad (18)$$

Wyznaczone przez Jonesa i Suggetta parametry kinetyczne procesu dezaktywacji w temperaturze  $20^\circ\text{C}$  dla katalazy pochodzenia mikrobiologicznego wynosiły:  $v_d = 0,65 \text{ 1/s}$ ,  $K_d = 1,1 \text{ kmol/m}^3$ . Należy zwrócić uwagę, że przyjęty tutaj mechanizm dezaktywacji nie jest zgodny z wcześniejszymi obserwacjami wskazującymi na istnienie dwóch nieaktywnych kompleksów katalazy. Do i Weiland [79] analizując teoretycznie szybkość reakcji enzymatycznych z

prostym, jednostopniowym mechanizmem dezaktywacji enzymu przez substrat doszli do wniosku, że równania kinetyczne powinny mieć postać równania Michaelisa-Menten ze stałymi  $K_m = K_d$ .

### 2.3. Rozkład nadtlenu wodoru przez katalazę w komórce

Aktywność katalazy w komórkach badano wielokrotnie. Początkowo nie zdawano sobie sprawy, że dyfuzja  $H_2O_2$  przez błonę komórkową może decydować o szybkości procesu [80]. Wykazał to jako pierwszy Clayton [81] podczas badań aktywności katalazy w komórkach *Rhodospseudomonas spheroides*. Występowanie znacznego oporu dyfuzyjnego przy przenikaniu  $H_2O_2$  przez błonę komórkową potwierdziły również późniejsze pomiary dla komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [82-85]. Nie prowadzono jednak dotychczas systematycznych badań nad kinetyką reakcji rozkładu  $H_2O_2$  oraz dezaktywacją katalazy w komórce.

### 3. MODEL MATEMATYCZNY DLA UKŁADU KATALAZA - NADTLENEK WODORU

#### 3.1. Katalaza uwolniona z komórki

Z przedstawionego przeglądu podstawowych prac z zakresu kinetyki reakcji rozkładu  $H_2O_2$  katalizowanej przez katalazę wynika, że w szerokim zakresie stężeń substratu można stosować równanie Michaelisa-Menten:

$$r_s = - \frac{dS}{dt} = \frac{k_2 E_o S}{K_m + S} \quad (19)$$

Dla procesu dezaktywacji katalazy przez  $H_2O_2$  żadne z równań kinetycznych nie zostało dotychczas zweryfikowane doświadczalnie w szerokim zakresie stężeń. Kierując się wynikami rozważań teoretycznych Do i Weillanda [79] nad dezaktywacją enzymów substratem przyjmijmy jako najbardziej prawdopodobne równanie o następującej postaci:

$$r_d = - \frac{dE_a}{dt} = \frac{v_d E_a S}{K_d + S} \quad (20)$$

gdzie:

$E_a$  - całkowite stężenie aktywnego enzymu

Dotychczasowe badania wskazują, że mechanizm dezaktywacji katalazy jest znacznie bardziej skomplikowany, niż założono to w pracy [79] i dlatego może zachodzić przypadek  $K_m \neq K_d$ . Po przyjęciu założenia, że dezaktywację termiczną enzymu można pominąć, proces rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę w izotermicznym reaktorze okresowym opisuje układ dwóch równań różniczkowych:

$$- \frac{dS}{dt} = \frac{k_2 E_a S}{K_m + S} \quad (21)$$

$$- \frac{dE_a}{dt} = \frac{v_d E_a S}{K_d + S} \quad (22)$$

wraz z warunkami początkowymi

$$S(t=0) = S_o \quad (23)$$

$$E_a(t=0) = E_o$$

Pomiar stężenia aktywnego enzymu w trakcie doświadczenia nie jest możliwy i dlatego wprowadzenie pojęcia bezwymiarowego stężenia (aktywności)

enzymu  $\bar{E} = E_0/E_0$  znacznie uprości dalszą analizę. Po wykonaniu prostych przekształceń matematycznych otrzymuje się:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{v_m \bar{E} S}{K_m + S} \quad (24)$$

$$-\frac{dE}{dt} = \frac{v_d \bar{E} S}{K_d + S} \quad (25)$$

$$S(t=0) = S_0 \quad (26)$$

$$\bar{E}(t=0) = 1$$

gdzie:  $v_m = k_2 E_0$  ma taki sam wymiar i sens fizyczny, jak maksymalna szybkość reakcji w równaniu Michaelisa-Menten.

Teoretycznie możliwe są dwa przypadki:

$$1^{\circ} \quad K_m = K_d = K$$

$$2^{\circ} \quad K_m \neq K_d$$

Dla pierwszego przypadku układ równań (24) i (25) upraszcza się do postaci:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{v_m \bar{E} S}{K + S} \quad (27)$$

$$-\frac{d\bar{E}}{dt} = \frac{v_d \bar{E} S}{K + S} \quad (28)$$

Po podzieleniu równania (27) przez równanie (28) otrzymuje się:

$$\frac{dS}{d\bar{E}} = \frac{v_m}{v_d} \quad (29)$$

Całkowanie równania (29) w granicach  $(S_0, S)$  oraz  $(1, \bar{E})$  prowadzi do zależności wiążącej stężenie aktywnego enzymu ze stężeniem substratu:

$$\bar{E} = 1 - \frac{v_d}{v_m} (S_0 - S) \quad (30)$$

Podstawiając zależność (30) do równania (27) uzyskujemy:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{v_d S^2 + v_m S - v_d S_0 S}{K + S} \quad (31)$$

Całkując równanie (31) w granicach  $(S_0, S)$  oraz  $(0, t)$  otrzymuje się rozwiązanie:

$$t = \frac{1}{v_d} \left[ \ln \frac{\frac{v_m}{v_d}}{\frac{v_m}{v_d} - S_0 + S} + \frac{K}{\frac{v_m}{v_d} - S_0} \ln \frac{\left(\frac{v_m}{v_d} - S_0 + S\right) S_0}{\frac{v_m}{v_d} S} \right] \quad (32)$$

Dla drugiego przypadku, gdy  $K_m \neq K_d$ , podzielenie równań (24) i (25) stronami prowadzi do równania różniczkowego:

$$\frac{dS}{d\bar{E}} = \frac{v_m(K_d + S)}{v_d(K_m + S)} \quad (33)$$

Całkując równanie (33) w granicach  $(S_0, S)$  oraz  $(1, \bar{E})$  otrzymuje się zależność między stężeniem aktywnego enzymu  $\bar{E}$  a stężeniem substratu:

$$\bar{E} = 1 - \frac{v_d}{v_m} (S_0 - S) + \frac{v_d}{v_m} (K_m - K_d) \ln \frac{K_d + S}{K_d + S_0} \quad (34)$$

Podstawienie zależności (34) do równania (24) daje równanie różniczkowe opisujące zmianę stężenia substratu:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{v_d S^2 + (v_m - v_d S_0) S + v_d (K_m - K_d) S \ln \frac{K_d + S}{K_d + S_0}}{K_m + S} \quad (35)$$

Rozwiązanie tego równania można uzyskać tylko metodami numerycznymi. Dla ograniczonego zakresu stężeń, po dokonaniu odpowiednich uproszczeń, można jednak rozwiązać analitycznie układ równań różniczkowych (24) i (25).

Jeżeli stężenia spełniają warunki:

$$S \gg K_d \quad \text{oraz} \quad S \gg K_m$$

równania (24) i (25) upraszczają się do postaci:

$$-\frac{dS}{dt} = v_m \bar{E} \quad (36)$$

$$-\frac{d\bar{E}}{dt} = v_d \bar{E} \quad (37)$$

Dzieląc równania (36) i (37) stronami, otrzymuje się:

$$\frac{dS}{d\bar{E}} = \frac{v_m}{v_d} \quad (38)$$

Należy zwrócić uwagę na to, że równanie (38) jest identyczne z równaniem (29), które zostało wyprowadzone dla przypadku  $K_m = K_d = K$ . W dalszych rozważaniach można więc korzystać z zależności (30), która po podstawieniu do równania (36) daje:

$$-\frac{dS}{dt} = v_m - v_d S_0 + v_d S \quad (39)$$

Całkowanie w granicach  $(S_0, S)$  prowadzi do zależności:

$$t = \ln \frac{v_m}{v_m - v_d (S_0 - S)} \quad (40)$$

Dla stężeń spełniających warunki:

$$S \ll K_d \quad \text{oraz} \quad S \ll K_m$$

równania (24) i (25) przybiorą postać:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{v_m}{K_m} \bar{E} S \quad (41)$$

$$-\frac{d\bar{E}}{dt} = \frac{v_d}{K_d} \bar{E} S \quad (42)$$

Dzieląc stronami równania (41) i (42) otrzymuje się:

$$\frac{dS}{d\bar{E}} = \frac{v_m K_d}{v_d K_m} \quad (43)$$

Całkując w granicach  $(S_0, S)$  oraz  $(1, \bar{E})$  uzyskujemy rozwiązanie w postaci:

$$\bar{E} = 1 - \frac{v_d K_m}{v_m K_d} (S_0 - S) \quad (44)$$

Podstawiając zależność (44) do równania (41) otrzymuje się:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{v_d}{K_d} S^2 + \frac{v_m}{K_m} S - \frac{v_d}{K_d} S_0 S \quad (45)$$

Całkowanie w granicach  $(S_0, S)$  oraz  $(0, t)$  prowadzi do rozwiązania:

$$t \left( \frac{v_m}{K_m} - \frac{v_d}{K_d} S_0 \right) = \ln \frac{S_0 \left( \frac{v_d}{K_d} S + \frac{v_m}{K_m} - \frac{v_d}{K_d} S_0 \right)}{S \frac{v_m}{K_m}} \quad (46)$$

które jednak ze względu na uwikłaną postać nie jest dogodnie do identyfikacji parametrów kinetycznych. Uwaga ta dotyczy również rozwiązania przedstawionego zależnością (32). Warto jednak szczegółowo przeanalizować równania (30) i (34), które wiążą aktywność enzymu ze stężeniem  $H_2O_2$ . Dla przypadku  $K_m = K_d = K$ , po przekształceniu równania (34), otrzymuje się:

$$S_0 - S = \frac{v_m}{v_d} (1 - \bar{E}) \quad (47)$$

Natomiast równanie (38), słuszne dla  $K_m \neq K_d$ , przyjmuje po przekształceniu następującą postać:

$$S_0 - S = \frac{v_m}{v_d} (1 - \bar{E}) + (K_m - K_d) \ln \frac{K_d + S}{K_d + S_0} \quad (48)$$

Warunki doświadczenia (stężenie enzymu) można tak dobrać, aby doszło do całkowitej dezaktywacji enzymu zanim stężenie  $S$  spadnie do zera. Po u-

względnieniu tego w równaniach (47) i (48) otrzymuje się:

- dla  $K_m = K_d = K$

$$\frac{S_0 - S}{v_m} = \frac{1}{v_d} = \text{const.} \quad (49)$$

- dla  $K_m \neq K_d$

$$\frac{S_0 - S}{v_m} = \frac{1}{v_d} + \frac{K_m - K_d}{v_m} \ln \frac{K_d + S}{K_d + S_0} \quad (50)$$

Powyższe równania pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- jeżeli  $K_m = K_d = K$ , to wówczas ilość substratu rozkładanego przez jednostkę enzymu nie zależy od stężenia początkowego substratu;
- jeżeli  $K_m \neq K_d$ , to wówczas ilość substratu rozkładanego przez jednostkę enzymu zmienia się wraz ze zmianą stężenia początkowego substratu, przy czym wielkość ta rośnie ze wzrostem stężenia początkowego dla  $K_m > K_d$ , a maleje dla  $K_m < K_d$ .

Powyzsze rozważania, biorące za podstawę model matematyczny składający się z układu równań różniczkowych (24) i (25) oraz warunków początkowych (26), są słuszne dla warunków izotermicznych. Wiadomo, że reakcja rozkładu nadtlenu wodoru przebiega ze znacznym efektem cieplnym i dlatego można spodziewać się trudności z utrzymaniem stałej temperatury reakcji. Odnosi się to szczególnie do doświadczeń dla wysokich stężeń  $H_2O_2$ , gdy ze względu na dużą szybkość dezaktywacji trzeba stosować wysokie stężenia enzymu. W takim przypadku należy uwzględnić wpływ temperatury na szybkość reakcji oraz dezaktywacji i wówczas otrzymuje się następujący układ równań:

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{v_m(T) \bar{E} S}{K_m(T) + S} \quad (51)$$

$$\frac{d\bar{E}}{dt} = - \frac{v_d(T) \bar{E} S}{K_d(T) + S} \quad (52)$$

$$\frac{dT}{dt} = \frac{(-\Delta H) v_m(T) \bar{E} S}{\rho c_p [K_m(T) + S]} - k_q (T - T_w) \quad (53)$$

wraz z warunkami początkowymi:

$$S(t=0) = S_0$$

$$\bar{E}(t=0) = 1 \quad (54)$$

$$T(t=0) = T_w$$

gdzie:

$v_m(T), v_d(T), K_m(T), K_d(T)$  - doświadczalnie wyznaczone zależności parametrów kinetycznych od temperatury

## 3.2. Katalaza w komórce

Przystępując do formułowania modelu matematycznego procesu rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przyjmujemy następujące założenia:

1. Równanie opisujące kinetykę rozkładu  $H_2O_2$  ma taką samą postać, jak dla enzymu znajdującego się w roztworze:

$$r_{sk} = \frac{k_{2k} E_a S}{K_{mk} + S} \quad (55)$$

2. Równanie opisujące kinetykę dezaktywacji katalazy przez  $H_2O_2$  ma również taką samą postać, jak dla enzymu znajdującego się w roztworze:

$$r_{dk} = \frac{v_{dk} E_a S}{K_{dk} + S} \quad (56)$$

3. Stałe występujące w równaniach (55) i (56) mogą się różnić od stałych wyznaczonych dla katalazy uwolnionej z komórek drożdży.
4. Proces dezaktywacji termicznej katalazy jest znacznie wolniejszy od dezaktywacji substratem i można go pominąć.
5. Przenoszenie  $H_2O_2$  przez błonę komórkową wpływa na szybkość procesu.
6. Przenoszenie  $H_2O_2$  przez błonę komórkową jest procesem dyfuzyjnym.

Liczne badania nad przenoszeniem substancji przez błony komórkowe drobnoustrojów [86-88] wykazały, że proces ten z dobrą dokładnością opisuje równanie dyfuzji Ficka. Natomiast dla pewnych substancji o ważnym znaczeniu fizjologicznym istnieją inne wyspecjalizowane mechanizmy transportu.

Strumień masy przenoszonej na drodze dyfuzji przez błonę o powierzchni  $A$  opisuje następujące równanie:

$$I = PA(C_1 - C_2) \quad (57)$$

gdzie:

$C_1, C_2$  - stężenia substancji w roztworze po obydwu stronach błony,  
 $P$  - stała przepuszczalności.

Po uwzględnieniu współczynnika podziału:

$$K_p = \frac{C_1^m}{C_1} = \frac{C_2^m}{C_2} \quad (58)$$

gdzie:

$C_1^m, C_2^m$  - stężenia substancji dyfundującej w błonie na granicy faz,  
otrzymuje się:

$$I = \frac{PA}{K_p} (C_1^m - C_2^m) \quad (59)$$



Strumień masy dyfundującej w błonie wynosi:

$$I = D_m A \frac{C_1^m - C_2^m}{l} \quad (60)$$

gdzie:

$D_m$  - współczynnik dyfuzji w błonie,

$l$  - grubość błony.

Po porównaniu zależności (59) i (60) otrzymuje się:

$$P = \frac{K_p D_m}{l} \quad (61)$$

7. Opór przenoszenia przez błonę komórkową jest głównym oporem dyfuzyjnym, a gradient stężenia substratu wewnątrz komórki można pominąć.

Zmiany stężenia  $H_2O_2$  w reaktorze okresowym zawierającym komórki drożdży, które wykazują aktywność katalazy, można opisać równaniem:

$$- \frac{dS}{dt} = k_s (S - S_k) \quad (62)$$

Współczynnik przenikania  $H_2O_2$  przez błonę komórkową  $k_s$  jest zdefiniowany następująco:

$$k_s = \frac{K_p D_m}{l} a = Pa \quad (63)$$

gdzie:

$a$  - powierzchnie międzyfazowa tworzona przez błonę komórkową na jednostkę objętości układu.

Szybkość procesu dezaktywacji katalazy opisuje równanie:

$$- \frac{dE_a}{dt} = \frac{v_{dk} E_a S_k}{K_{dk} + S_k} \quad (64)$$

które po wprowadzeniu bezwymiarowego stężenia (aktywności) enzymu przyjmuje postać:

$$- \frac{d\bar{E}}{dt} = \frac{v_{dk} \bar{E} S_k}{K_{dk} + S_k} \quad (65)$$

Wartość stężenia substratu  $S_k$  wewnątrz komórki jest określona przez równowagę dynamiczną między szybkością dyfuzji przez błonę komórkową składnika reagującego, a szybkością zużywania tego składnika w trakcie reakcji:

$$k_s (S - S_k) = \frac{k_{2k} E_a S_k}{K_{mk} + S_k} \quad (66)$$

Stosując bezwymiarowe stężenie enzymu  $\bar{E}$ , uzyskujemy:

$$k_s (S - S_k) = \frac{v_{mk} \bar{E} S_k}{K_{mk} + S_k} \quad (67)$$

gdzie:

$$v_{mk} = k_{2k} E_0.$$

Po wykonaniu prostych przekształceń otrzymuje się równanie kwadratowe ze względu na  $S_k$ :

$$S_k^2 + S_k \left( K_{mk} + \frac{v_{mk} \bar{E}}{k_s} - S \right) - K_{mk} S = 0 \quad (67)$$

Tylko jeden pierwiastek równania (67) ma sens fizyczny:

$$S_k = \frac{S - K_{mk} - \frac{v_{mk} \bar{E}}{k_s} + \sqrt{\left( K_{mk} + \frac{v_{mk} \bar{E}}{k_s} - S \right)^2 + 4 K_{mk} S}}{2} \quad (68)$$

Zależność (68) przedstawia zmianę stężenia  $H_2O_2$  wewnątrz komórek drożdży ze zmianą stężenia aktywnego enzymu  $\bar{E}$  oraz stężenia  $H_2O_2$  w reaktorze.

Model matematyczny opiewający rozkład  $H_2O_2$  w reaktorze okresowym przez katalazę znajdującą się w komórkach tworzy układ dwóch równań różniczkowych zwyczajnych:

$$- \frac{dS}{dt} = k_s (S - S_k) \quad (69)$$

$$- \frac{d\bar{E}}{dt} = \frac{v_{dk} \bar{E} S_k}{K_{dk} + S_k} \quad (70)$$

z warunkami początkowymi:

$$S(t=0) = S_0 \quad (71)$$

$$\bar{E}(t=0) = 1$$

Stężenie  $S_k$  występujące w równaniach (69) i (70) jest zdefiniowane zależnością (68). Jeżeli komórki mają błonę o małej przepuszczalności lub wykazują wysoką aktywność katalazy, stężenie  $H_2O_2$  wewnątrz komórek będzie bardzo niskie. W takich warunkach równanie (55) upraszcza się do postaci:

$$r_{sk} = \frac{k_{2k}}{K_{mk}} E_a S_k \quad (72)$$

Korzystając z tego równania wyznacza się stężenie  $S_k$  wewnątrz komórki z zależności:

$$S_k = \frac{k_s S}{k_s + \frac{v_{mk} \bar{E}}{K_{mk}}} \quad (73)$$

## 4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### 4.1. Opis aparatury doświadczalnej

Doświadczenia wykonywano w szklanej reaktorze okresowym o pojemności  $1,5 \text{ dm}^3$ , przy czym początkowa objętość przestrzeni reakcyjnej wynosiła  $1 \text{ dm}^3$ . Reaktor był umieszczony w ultratermostacie pozwalającym na utrzymanie stałej temperatury z dokładnością  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ , co kontrolowano termometrem rtęciowym, zanurzonym w roztworze reakcyjnym. Zawartość reaktora mieszano mieszadłem laboratoryjnym.

### 4.2. Materiały i metody analityczne

W badaniach stosowano drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, których próbki otrzymano z wytwórni drożdży w Tczewie. Wykazywały one stężenie katalazy wystarczające do badań nad szybkością dezaktywacji enzymu znajdującego się w komórce. Znane są metody indukcji katalazy w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [14, 82-84], ale po zastosowaniu takich drożdży czas trwania doświadczeń znacznie wydłużyłby się nie zwiększając dokładności pomiaru szybkości dezaktywacji. Podczas badań wstępnych okazało się, że próbki drożdży pochodzące z różnych szarż produkcyjnych wykazują różnice w aktywności katalazy i dlatego zdecydowano się na wykonanie całej serii doświadczeń stosując tę samą próbkę materiału biologicznego. Stwierdzono doświadczalnie, że drożdże można przechowywać w lodówce w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  przez okres 2 miesięcy bez zmian w aktywności katalazy i przepuszczalności  $\text{H}_2\text{O}_2$  przez błonę komórkową. Część drożdży, która służyła do badań nad dezaktywacją katalazy uwolnionej z komórek, przechowywano przez okres 5 miesięcy w temperaturze  $-20^\circ\text{C}$  nie stwierdzając uchwytynych doświadczalnie zmian aktywności enzymu.

Uwolnienie enzymu z komórek przeprowadzono za pomocą wielokrotnego zamrażania i rozmrażania. Wykonując tę operację uzyskuje się preparaty o coraz to wyższej aktywności katalazy. Początkowo ten wzrost jest szybki, ale między szóstą i dziesiątą operacją zmiany aktywności nie przekraczają już 10%. Dalsze zamrażanie i rozmrażanie nie prowadzi do wzrostu aktywności. Nie zaobserwowano również, aby tak przygotowane próbki wykazywały większą podatność na dezaktywację, nawet po 15 kolejnych operacjach zamrażania i rozmrażania. Oznaczanie aktywności katalazy w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* prowadzono poprzednio [84] po 8 kolejnych operacjach zamrażania i rozmrażania próbki. Ze względu na to, że ten sposób uwalniania enzymów zależy również od szybkości zmian temperatury i trudno uzyskać za

każdym razem powtarzalne warunki, dlatego w dalszych badaniach przeprowadzono dziesięciokrotnie operację zamrażania i rozmrażania próbek.

Pomiary stężenia  $H_2O_2$  wykonywano metodą manganometryczną, która była stosowana wielokrotnie w badaniach nad kinetyką działania katalazy [28, 29, 89]. Pobieranie próbek o zmiennej objętości (od  $1\text{ cm}^3$  do  $20\text{ cm}^3$ ) i użycie mianowanych roztworów  $KMnO_4$  o stężeniach od  $0,005\text{ mol/dm}^3$  do  $0,02\text{ mol/dm}^3$  umożliwiło wykorzystanie jednej metody pomiarowej dla całego zakresu stężeń  $H_2O_2$  (od  $0,0015\text{ mol/dm}^3$  do  $0,8\text{ mol/dm}^3$ ).

Ze względu na to, że w badaniach stosowano materiał biologiczny, istniała możliwość występowania reakcji ubocznych. Doświadczenia wykonane z drożdżami, w których katalaza została zdezaktywowana termicznie, wykazały jednak, że stopień przemiany  $H_2O_2$  stanowi mniej niż 2% wartości uzyskanej dla próbek bez wcześniejszej dezaktywacji katalazy. Wskazuje to na możliwość pominięcia wpływu reakcji ubocznych. Przy doborze parametrów procesu dezaktywacji termicznej (3 godziny w temperaturze  $90^\circ\text{C}$ ) kierowano się wynikami innych badaczy [90, 91], którzy stwierdzili, że katalaza pochodzenia mikrobiologicznego jest stosunkowo odporna na dezaktywację termiczną.

#### 4.3. Sposób przeprowadzenia doświadczeń

##### 4.3.1. Katalaza uwolniona z komórki

Badania nad dezaktywacją katalazy wymagają stosowania bardzo niskich stężeń enzymu. W trakcie doświadczeń wstępnych stwierdzono, że stężenie drożdży, które były źródłem katalazy, powinno wynosić od około  $0,004\text{ g/dm}^3$  do  $0,1\text{ g/dm}^3$  w przeliczeniu na suchą masę. Materiałem wyjściowym do badań były zawiesiny drożdży w buforze fosforanowym ( $NaH_2PO_4 - NaHPO_4$ ) o stężeniu  $0,05\text{ mol/dm}^3$  i  $\text{pH} = 7,0$ . Przygotowano zawiesiny o następujących stężeniach drożdży:  $1,79\text{ g/dm}^3$ ;  $3,58\text{ g/dm}^3$ ;  $7,16\text{ g/dm}^3$ ;  $14,32\text{ g/dm}^3$  i  $28,64\text{ g/dm}^3$ . Następnie przelano je do polietylenowych pojemników i przechowywano w temperaturze  $-20^\circ\text{C}$ .

Próbkę do badań o objętości  $2,5\text{ cm}^3$  lub  $5\text{ cm}^3$  odmierzano pipetą z zawiesiny, która wcześniej poddana była dziesięciu kolejnym zamrażaniom i rozmrażaniom celem uwolnienia katalazy z komórek. Przed rozpoczęciem każdego z doświadczeń przygotowywano roztwór  $H_2O_2$  o założonym stężeniu w buforze fosforanowym (stężenie  $0,02\text{ mol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 7$ ). Dokładną wartość stężenia  $H_2O_2$  wyznaczano przez pobranie próbki i zmiareczkowanie. Następnie odmierzano  $1\text{ dm}^3$  przygotowanego roztworu  $H_2O_2$  i umieszczano w termostatowanej reaktorze. Po ustaleniu się temperatury wprowadzano próbkę zawierającą katalazę uwolnioną z komórek. W określonych odstępach czasu pobierano próbki roztworu reakcyjnego, wprowadzano do 5 n  $H_2SO_4$  w celu zahamowania reakcji i metodą manganometryczną wyznaczano stężenie  $H_2O_2$ . Doświadczenie kończono w chwili, gdy nie obserwowano już dalszych zmian stężenia substratu, co świadczyło o całkowitej dezaktywacji katalazy.

W części doświadczeń (dla niskich stężeń  $H_2O_2$  i wysokich stężeń enzymu) dezaktywacja nie zachodziła do końca w trakcie jednej szarży, gdyż wcześniej następował rozkład  $H_2O_2$  i dlatego wprowadzano do reaktora świeżą porcję  $H_2O_2$ , a pobrana w ciągu 30 sekund próbka roztworu reakcyjnego służyła do wyznaczenia stężenia początkowego dla drugiej szarży.

Należy zwrócić uwagę na znaczenie prób wstępnych, w trakcie których tak dobrano stężenie katalazy, aby można było w pełni uchwycić zjawisko dezaktywacji. Zastosowanie zbyt wysokiego stężenia enzymu powoduje szybkie zmniejszanie się stężenia  $H_2O_2$  w reaktorze i dezaktywacja zachodzi tylko w niewielkim stopniu. W ten sposób prowadzone są z reguły badania nad kinetyką reakcji, gdy dąży się do wyeliminowania zjawiska dezaktywacji. Wiedząc o tym, że szybkość dezaktywacji wzrasta ze wzrostem stężenia  $H_2O_2$ , należało dla wysokich stężeń początkowych  $H_2O_2$  zastosować odpowiednio wyższe stężenie enzymu, gdyż inaczej stopień przemiany substratu byłby nieznaczny, a przez to pomiar mało dokładny. Przy doborze ilości katalazy użytej w poszczególnych doświadczeniach należało jeszcze uwzględnić wpływ temperatury na szybkość reakcji i dezaktywacji. Okazało się, że ze wzrostem temperatury szybkość reakcji zmienia się nieznacznie (przy wzroście temperatury o  $10^\circ C$  stała szybkości wzrastała poniżej 10%), natomiast szybkość dezaktywacji wzrasta bardzo wyraźnie. Z tego względu w doświadczeniach dla tego samego stężenia początkowego  $H_2O_2$ , ale dla niższych temperatur, stosowano odpowiednio niższe stężenia enzymu. Przygotowane zawiesiny drożdży o stężeniach od  $1,79 \text{ g/dm}^3$  do  $28,64 \text{ g/dm}^3$  zapewniały źródło enzymu dla całego badanego zakresu stężeń  $H_2O_2$  i temperatur.

Doświadczenia wykonywano w następujących temperaturach:  $5^\circ C$ ,  $10^\circ C$ ,  $20^\circ C$  i  $30^\circ C$ . W temperaturach wyższych od  $30^\circ C$  dezaktywacja katalazy uwolnionej z komórki jest bardzo szybka i pomiary nie dają zadowalającej dokładności.

W badaniach dążono do zastosowania możliwie najszerszego zakresu stężeń  $H_2O_2$ , ponieważ na podstawie zmian stężenia  $H_2O_2$  w reaktorze weryfikowano zarówno równanie kinetyczne reakcji, jak i dezaktywacji. Dla stężeń początkowych  $H_2O_2$  niższych od  $0,005 \text{ kmol/m}^3$  dezaktywacja katalazy przez  $H_2O_2$  zachodzi bardzo wolno i nie jest możliwe całkowite pominięcie dezaktywacji termicznej. Dodatkowo pojawiają się problemy natury analitycznej przy oznaczaniu stężenia  $H_2O_2$  metodą manganometryczną. Natomiast dla stężeń początkowych wyższych od  $0,4 \text{ kmol/m}^3$  występuje znaczny efekt cieplny podczas rozkładu  $H_2O_2$  i nie udawało się już zachować w pełni warunków izotermicznych, a wzrost temperatury przekraczał  $0,5^\circ C$  podczas pierwszych kilkunastu minut doświadczenia. W badaniach stosowano następujące stężenia początkowe  $H_2O_2$ : od  $0,005 \text{ kmol/m}^3$  do  $0,01 \text{ kmol/m}^3$ ,  $0,025 \text{ kmol/m}^3$ ,  $0,05 \text{ kmol/m}^3$ ,  $0,1 \text{ kmol/m}^3$ ,  $0,2 \text{ kmol/m}^3$  i  $0,4 \text{ kmol/m}^3$ .

#### 4.3.2. Katalaza w komórce

Doświadczenia przebiegały w podobny sposób, jak dla katalazy uwolnionej z komórki. Przygotowano buforowany (bufor fosforanowy o stężeniu

0,02 mol/dm<sup>3</sup> i pH=7) roztwór H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o założonym stężeniu i po pobraniu próbki dla wyznaczenia dokładnej wartości stężenia początkowego odmierza-  
no 1 dm<sup>3</sup> roztworu i umieszczano w termostatowanym reaktorze. Po ustaleniu  
się temperatury wprowadzano do reaktora odmierzoną pipetą próbkę zawiesziny  
drożdży, którą uprzednio przygotowano w kolbach miarowych i przechowywano  
w lodówce w temperaturze 4°C. Stosując taką samą ilość drożdży, jak w przy-  
padku katalazy uwolnionej z komórki uzyskiwano znacznie wolniejszy rozkład  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i dlatego wydłużeniu uległy czasy, po których pobierano próbki z re-  
aktora. Doświadczenia kończono w chwili, gdy nie obserwowano już dalszych  
zmian stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, co świadczyło o pełnej dezaktywacji katalazy. Dla  
niskich stężeń początkowych H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dezaktywacja enzymu przebiegała wolniej,  
niż rozkład H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i dlatego zachodziła konieczność doprowadzenia do reakto-  
ra nowych porcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Doświadczenia wykonano w temperaturze 30°C dla następujących stężeń  
początkowych H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0,005 kmol/m<sup>3</sup> < S<sub>0</sub> < 0,01 kmol/m<sup>3</sup>, 0,0175 kmol/m<sup>3</sup>,  
0,025 kmol/m<sup>3</sup>, 0,05 kmol/m<sup>3</sup>, 0,075 kmol/m<sup>3</sup>, 0,01 kmol/m<sup>3</sup>, 0,015 kmol/m<sup>3</sup>,  
0,2 kmol/m<sup>3</sup>, 0,4 kmol/m<sup>3</sup> i 0,8 kmol/m<sup>3</sup>. W niższych temperaturach maleje  
przepuszczalność błony komórkowej i szybkość dezaktywacji, powodując nad-  
mierne wydłużenie czasu doświadczeń. Przeprowadzono ponadto doświadczenia  
porównawcze dla stężenia początkowego 0,025 kmol/m<sup>3</sup> w zakresie temperatur  
od 20°C do 50°C. Pozwoliło to na oszacowanie wpływu temperatury na prze-  
puszczalność błony komórkowej i szybkość dezaktywacji katalazy w komórce.

## 5. WYNIKI BADAŃ DOŚWIADCZALNYCH

### 5.1. Katalaza uwolniona z komórki

Otrzymane wyniki doświadczeń poddano analizie wykorzystując rozważania matematyczne zamieszczone w podrozdziale 3.1. Dla całego badanego zakresu temperatur stwierdzono, że ilość nadtlenu wodoru rozkładanego przez jednostkę katalazy wzrasta ze wzrostem stężenia początkowego. Świadczy to o możliwości zastosowania modelu w postaci układu równań (24) i (25) wraz z warunkami początkowymi (26):

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{v_m \bar{E} S}{K_m + S} \quad (74)$$

$$-\frac{d\bar{E}}{dt} = \frac{v_d \bar{E} S}{K_d + S} \quad (75)$$

$$S(t=0) = S_0 \quad (76)$$

$$\bar{E}(t=0) = 1$$

przy czym musi być spełniony warunek  $K_m > K_d$ .

Korzystając z danych doświadczalnych należy przeprowadzić identyfikację czterech parametrów kinetycznych:  $v_m$ ,  $K_m$ ,  $v_d$  i  $K_d$ . Można to uzyskać metodą najlepszego dopasowania rozwiązań modelu (równania (74) i (75)) do doświadczalnie zmierzonych stężeń stosując przy doborze parametrów kinetycznych jedną ze standardowych procedur optymalizacyjnych [92]. Wymaga to jednak długotrwałych obliczeń ze względu na dużą liczbę doświadczeń i konieczność stosowania metod numerycznych przy wyznaczaniu rozwiązań modelu.

Z wcześniejszych rozważań wiadomo, że dla stężeń spełniających warunek  $S \ll K_m$  oraz  $S \ll K_d$  układ równań (74) i (75) można uprościć do następującej postaci:

$$-\frac{dS}{dt} = k \bar{E} S \quad (77)$$

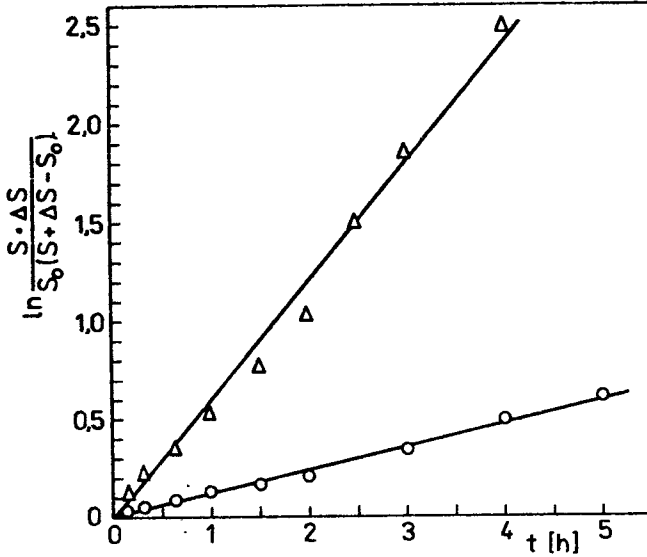
$$-\frac{d\bar{E}}{dt} = k_d \bar{E} S \quad (78)$$

gdzie:

$$k = v_m / K_m$$

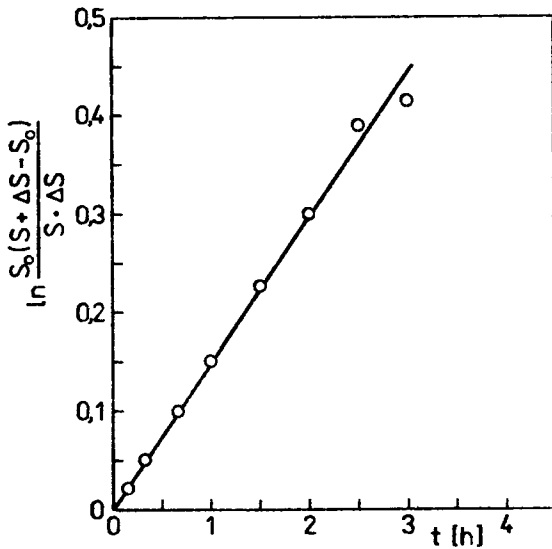
$$k_d = v_d / K_d$$

Jeżeli uda się w sposób niezależny wyznaczyć parametry  $k$  i  $k_d$ , to wówczas całe zagadnienie uprości się do identyfikacji tylko dwóch parametrów [93].



Rys.1. Zależność  $\ln \frac{S \cdot \Delta S}{S_0(S + \Delta S - S_0)}$  od  $t$ :

- (Δ)  $S_0 = 0,0095 \text{ kmol/m}^3$ ;  $k_d = 0,042 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$ ;  $k = 2,29 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$   
 (O)  $S_0 = 0,0098 \text{ kmol/m}^3$ ;  $k_d = 0,037 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$ ;  $k = 4,06 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$   
 (dwukrotnie wyższe stężenie enzymu)



Rys.2. Zależność  $\ln \frac{S_0(S + \Delta S - S_0)}{S \cdot \Delta S}$  od  $t$ :

- (O)  $S_0 = 0,063 \text{ kmol/m}^3$ ;  $k_d = 0,036 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$ ;  $k = 1,98 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$



Układ równań (77) i (78) ma rozwiązanie analityczne:

$$\ln \frac{S \frac{k}{k_d}}{S_0 \left( S + \frac{k}{k_d} - S_0 \right)} = \left( S_0 - \frac{k}{k_d} \right) k_d t \quad (79)$$

które przedstawiono tutaj jako przekształconą postać równania (46). Sporządzając wykres zależności

$$\ln \frac{S \frac{k}{k_d}}{S_0 \left( S + \frac{k}{k_d} - S_0 \right)} \quad \text{od } t$$

otrzymuje się linię prostą o nachyleniu  $\left( S_0 - \frac{k}{k_d} \right) k_d$ , przechodzącą przez początek układu współrzędnych. Algorytm obliczeń zależy od sposobu przeprowadzenia doświadczeń i można wyróżnić dwa przypadki:

- 1) enzym zostaje dezaktywowany całkowicie,
- 2) enzym zostaje dezaktywowany częściowo.

Dla pierwszego przypadku można wyznaczyć całkowitą ilość rozłożonego substratu przez jednostkę enzymu:

$$\Delta S = S_0 - S = \frac{k}{k_d}$$

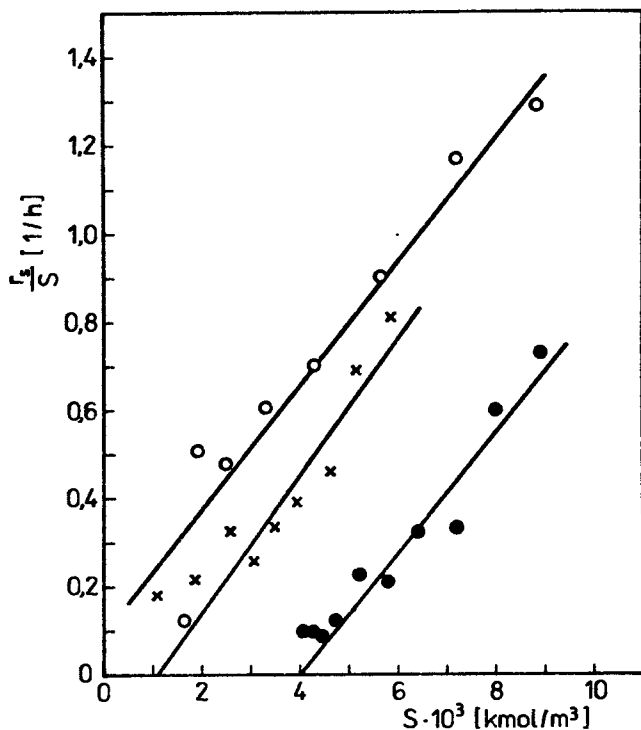
Znając wartość  $k/k_d$  można przedstawić zależność (79) na wykresie. Po wyznaczeniu współczynnika kierunkowego prostej oblicza się stałe  $k_d$  i  $k$ .

Dla drugiego przypadku, gdy występuje tylko częściowa dezaktywacja katalazy, obliczenia polegają na znalezieniu takiej wartości parametru  $b = k/k_d$ , która maksymalizuje współczynnik korelacji dla równania linii prostej. Znając współczynnik kierunkowy prostej oraz parametr  $b$  można obliczyć stałe  $k_d$  i  $k$ . Przedstawiona tutaj metoda wymaga wprawdzie wielokrotnych obliczeń, ale łatwo ją zaprogramować na mikrokomputer.

Stałe kinetyczne ( $k_d$ ,  $k$ ) można także wyznaczyć przez zastosowanie metody różniczkowej [94]. Równania różniczkowe (77) i (78), po wykonaniu przekształceń matematycznych, dają się sprowadzić do jednego równania (równanie (45)), które po podzieleniu przez  $S$  przedstawia linię prostą:

$$\frac{r_s}{S} = k - k_d S_0 + k_d S \quad (80)$$

Z nachylenia linii prostej wyznacza się  $k_d$ , natomiast z odciętej dla  $\frac{r_s}{S} = 0$  wyznacza się  $k$  znając  $k_d$  i  $S_0$ . Metodę tę można zastosować niezależnie od stopnia dezaktywacji enzymu. Wyniki doświadczalne uzyskane dla stężeń początkowych  $H_2O_2$  niższych od  $0,01 \text{ kmol/m}^3$  analizowano za pomocą metody całkowej (rys.1 i 2) i różniczkowej (rys.3). Można zauważyć, że w metodzie różniczkowej uzyskuje się znacznie większe odchylenie punktów doświadczalnych od linii prostej, niż w metodzie całkowej.



Rys.3. Zależność  $\frac{r_s}{S}$  od  $S$ :

- (x)  $S_0 = 0,0063 \text{ kmol/m}^3$ ;  $k_d = 0,044 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$ ;  $k = 2,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$   
 (●)  $S_0 = 0,0095 \text{ kmol/m}^3$ ;  $k_d = 0,036 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$ ;  $k = 2,1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$   
 (o)  $S_0 = 0,0098 \text{ kmol/m}^3$ ;  $k_d = 0,039 \text{ m}^3/\text{kmol} \cdot \text{s}$ ;  $k = 4,1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$   
 (dwukrotnie wyższe stężenie enzymu)

Dla porównania wyznaczono stałe  $k$  i  $k_d$  metodą najlepszego dopasowania rozwiązań numerycznych równania (45) do zmierzonych stężeń  $\text{H}_2\text{O}_2$  (dla  $S_0 < 0,01 \text{ kmol/m}^3$ ). Przy doborze parametrów  $k$  i  $k_d$  stosowano metodę simplex [95] poszukując minimum funkcji celu:

$$F = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M (\alpha_{\text{dośw.}} - \alpha_{\text{obl.}})^2 \quad (81)$$

gdzie:

- $N$  - ilość doświadczeń dla  $S_0 < 0,01 \text{ kmol/m}^3$ ,  
 $M$  - ilość punktów doświadczalnych w  $i$ -tym doświadczeniu,  
 $\alpha_{\text{dośw.}}$  - stopień przemiany substratu obliczony na podstawie doświadczenia wyznaczonego stężenia  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  
 $\alpha_{\text{obl.}}$  - stopień przemiany obliczony na podstawie stężenia  $\text{H}_2\text{O}_2$  otrzymanego przez numeryczne rozwiązanie równania (45) metodą Rungego-Kutty.

Wyznaczoną w ten sposób stałą  $k_d$  porównano z wartościami wyznaczonymi metodą całkową i różniczkową. Z obliczeń wynika, że średni błąd dla metody całkowej wynosi 8%, a dla metody różniczkowej 13%. Ze względu na prostotę obydwie metody mogą znaleźć w przyszłości zastosowanie przy ocenie stałej szybkości dezaktywacji różnych preparatów katalazy. Wykonując tylko jedno doświadczenie jesteśmy w stanie wyznaczyć zarówno stałą szybkości reakcji, jak i stałą szybkości dezaktywacji. Dokładność oznaczenia można poprawić przez zwiększenie liczby doświadczeń dla tego samego stężenia początkowego  $H_2O_2$ .

W następnym etapie obliczeń wyznaczono stałe  $K_m$ ,  $K_d$ ,  $v_d$  i  $v_m$  wykorzystując wyniki doświadczalne dla całego badanego zakresu stężeń  $H_2O_2$ . Dysponując wyznaczonymi wcześniej wartościami  $k = v_m/K_m$  i  $k_d = v_d/K_d$  zagadnienia możemy aprowadzić do identyfikacji tylko dwóch parametrów. Przy doborze tych parametrów stosowano metodę simpleks poazukując minimum funkcji celu o postaci równania (81). Stężenia wyznaczano rozwiązując numerycznie układ równań różniczkowych (74) i (75) metodą Rungego-Kutty ozwartego rzędu. Dla doświadczeń wykonywanych w temperaturze  $30^\circ C$  najlepszą zgodność uzyskano dla następujących wartości parametrów:

$$K_d = 0,052 \text{ kmol/m}^3,$$

$$K_m = 0,138 \text{ kmol/m}^3,$$

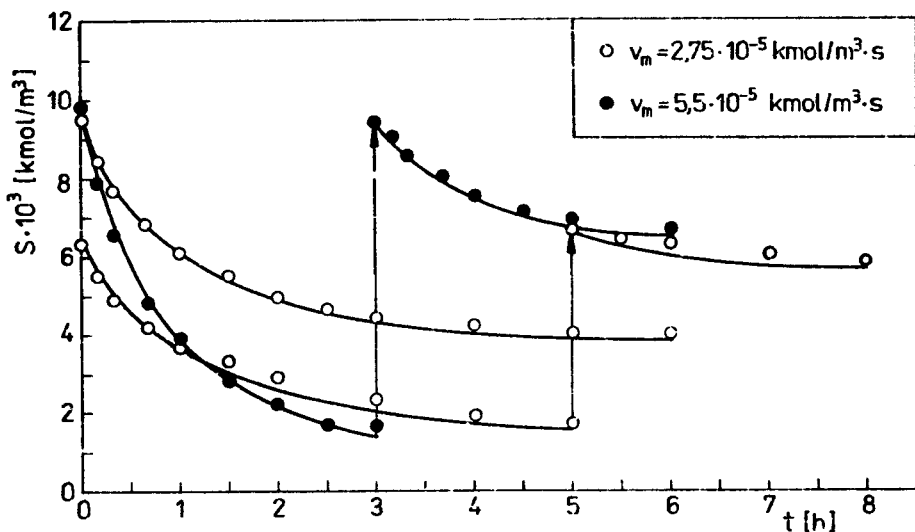
$$v_d = 1,92 \cdot 10^{-3} \text{ 1/s},$$

$$v_m = 2,75 \cdot 10^{-5} \text{ kmol/m}^3 \cdot s \text{ lub wielokrotność tej wartości (zależne od stosowanego stężenia katalazy).}$$

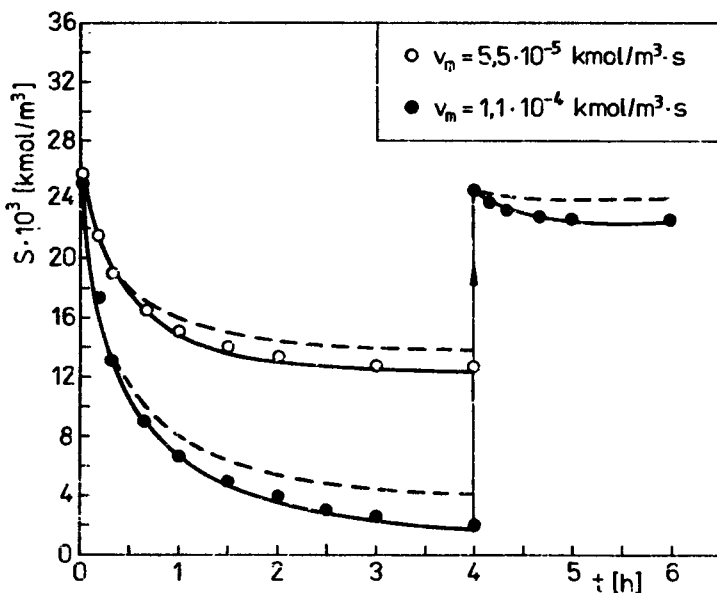
Na rys.4-9 przedstawiono porównanie doświadczalnie wyznaczonych stężeń  $H_2O_2$  z rozwiązaniami numerycznymi modelu matematycznego (równania (74), (75) i (76)) wykorzystując podane powyżej wartości parametrów. Na rysunkach tych można zauważyć bardzo dobrą zgodność danych doświadczalnych z rozwiązaniami w całym badanym zakresie stężeń. Na rys.5 i 6 przedstawiono dodatkowo linią przerywaną rozwiązania numeryczne modelu uproszczonego (równania (77) i (78)). Wykazują one narastające odchylenia od danych doświadczalnych ze wzrostem stężenie początkowego. Na rys.7 przedstawiono linią przerywaną rozwiązania numeryczne przy założeniu  $K_m = K_d = K$  dla dwóch wartości tej stałej:  $0,052 \text{ kmol/m}^3$  i  $0,138 \text{ kmol/m}^3$ . Można zauważyć bardzo duże odchylenia od danych doświadczalnych, a ponad 2,5 krotna zmiana wartości stałej  $K$  prowadzi tylko do nieznacznej zmiany przebiegu rozwiązania.

Dla doświadczeń wykonanych w niższych temperaturach ( $20^\circ C$ ,  $10^\circ C$  i  $5^\circ C$ ) przeprowadzono identyfikację parametrów kinetycznych w taki sam sposób, jak opisany powyżej. Otrzymane wyniki pozwalają na następujące stwierdzenia:

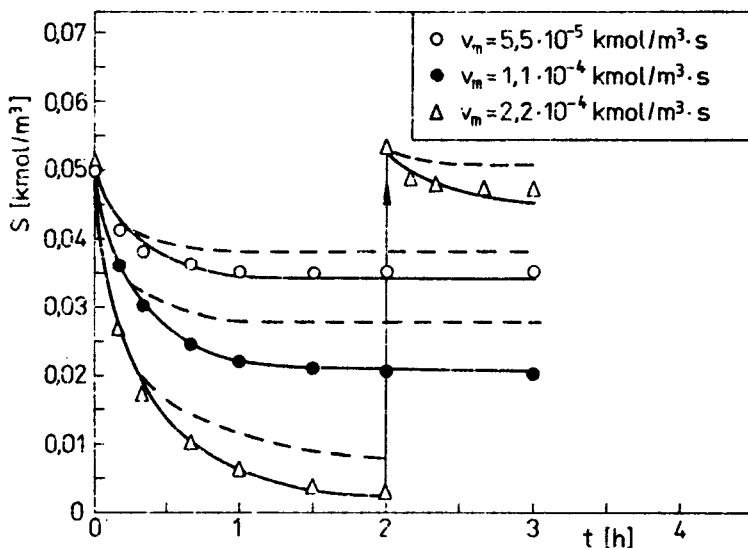
- $K_m$  i  $K_d$  nie zależą od temperatury w badanym zakresie  $5 + 30^\circ C$ ,
- $v_d$  maleje bardzo szybko ze spadkiem temperatury,
- $v_m$  maleje nieznacznie ze spadkiem temperatury.



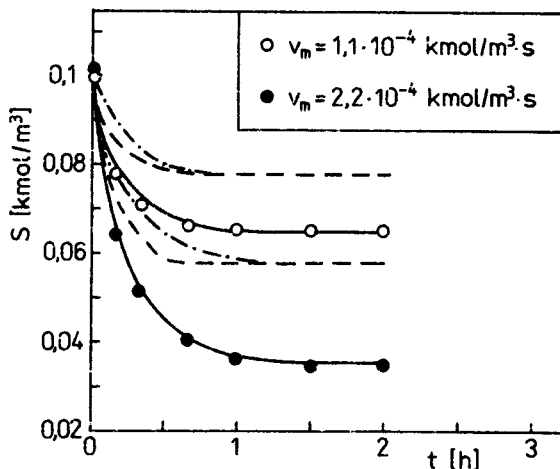
Rys.4. Zmiany stężeń podczas rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę uwolnioną z komórki ( $S_0 < 0,01 \text{ kmol/m}^3$ ):  
 (○), (●) punkty doświadczalne,  
 (—) rozwiązania numeryczne równań (74) i (75)



Rys.5. Zmiany stężeń podczas rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę uwolnioną z komórki ( $S_0 = 0,025 \text{ kmol/m}^3$ ):  
 (○), (●) punkty doświadczalne,  
 (—) rozwiązania numeryczne równań (74) i (75),  
 (---) rozwiązania numeryczne modelu uproszczonego (równania (77) i (78))

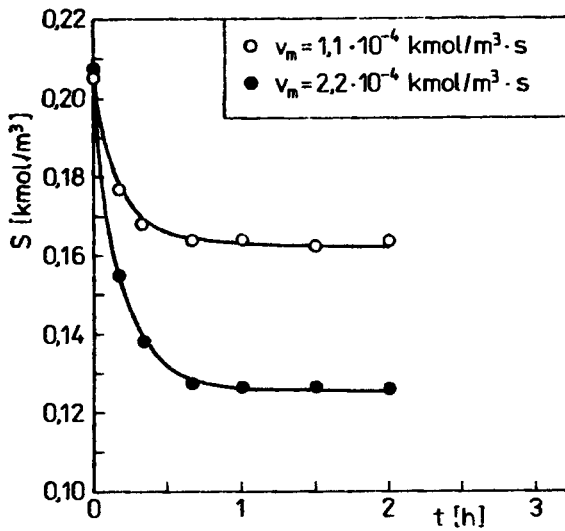


Rys.6. Zmiany stężeń podczas rozkładu  $\text{H}_2\text{O}_2$  przez katalazę uwolnioną z komórki ( $S_0 = 0,05 \text{ kmol/m}^3$ ):  
 (o), (•), (Δ) punkty doświadczalne,  
 (---) rozwiązania numeryczne równań (74) i (75),  
 (- - -) rozwiązania numeryczne modelu uproszczonego (równania (77) i (78))

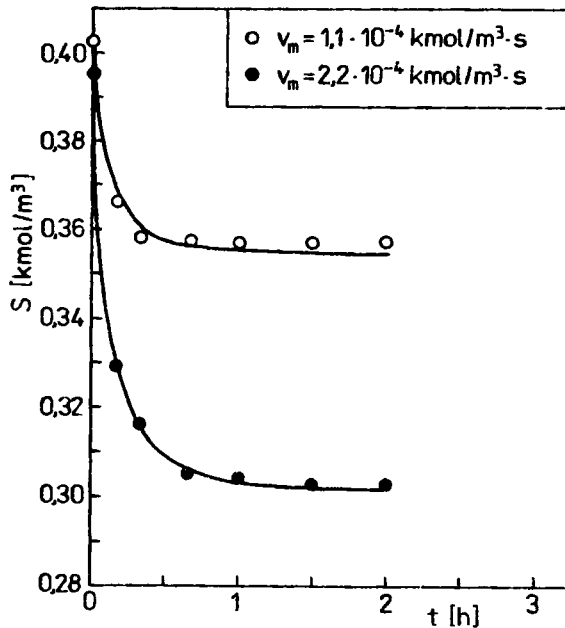


Rys.7. Zmiany stężeń podczas rozkładu  $\text{H}_2\text{O}_2$  przez katalazę uwolnioną z komórki ( $S_0 = 0,1 \text{ kmol/m}^3$ ):  
 (o), (•) punkty doświadczalne.

Linie na wykresie przedstawiają zmiany stężeń wyznaczone przez numeryczne rozwiązanie równań (74) i (75).  
 (—)  $K_m = 0,138 \text{ kmol/m}^3$ ,  $K_d = 0,052 \text{ kmol/m}^3$ ;  
 (- - -)  $K_m = K_d = 0,052 \text{ kmol/m}^3$ ;  
 (- · - ·)  $K_m = K_d = 0,138 \text{ kmol/m}^3$

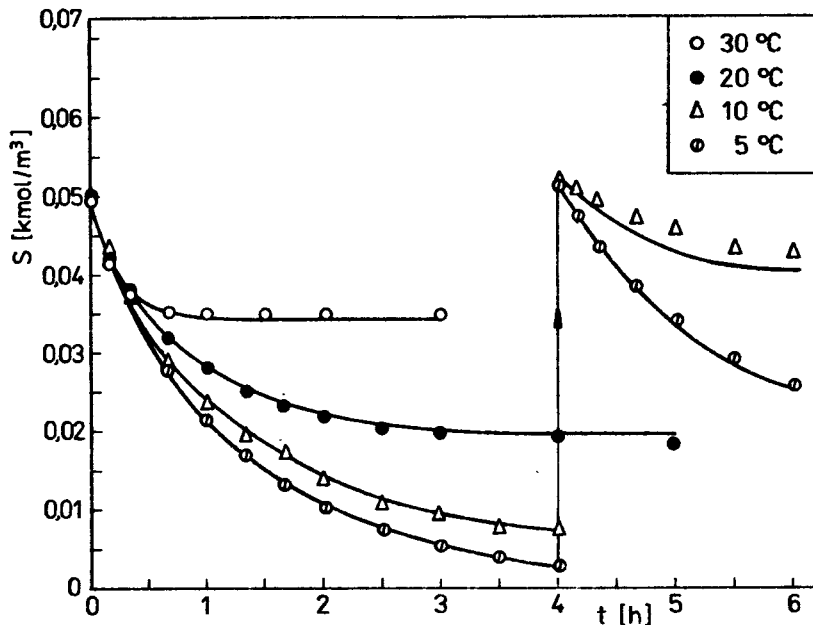


Rys.8. Zmiany stężeń podczas rozkładu  $\text{H}_2\text{O}_2$  przez katalazę uwolnioną z komórki ( $S_0 = 0,2 \text{ kmol/m}^3$ ):  
 (o), (•) punkty doświadczalne,  
 (—) rozwiązania numeryczne równań (74) i (75)



Rys.9. Zmiany stężeń podczas rozkładu  $\text{H}_2\text{O}_2$  przez katalazę uwolnioną z komórki ( $S_0 = 0,4 \text{ kmol/m}^3$ ):  
 (o), (•) punkty doświadczalne,  
 (—) rozwiązania numeryczne równań (74) i (75)

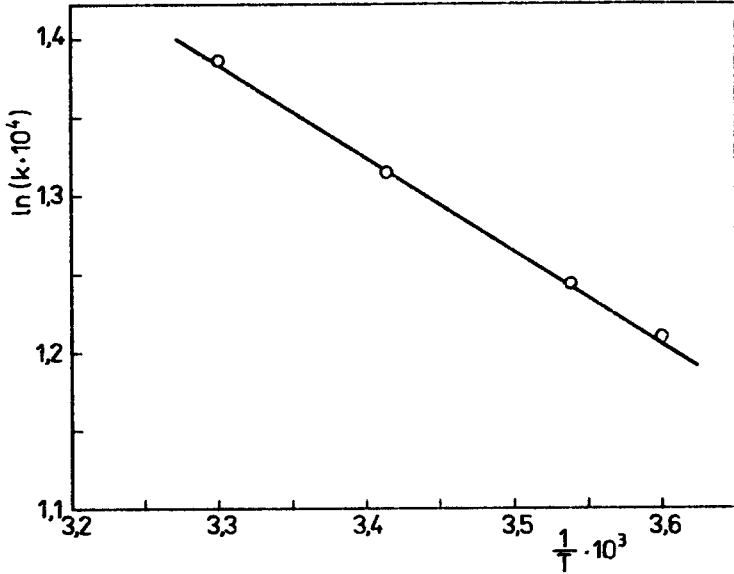
Na rys.10 przedstawiono wyniki doświadczeń wykonanych dla tego samego stężenia enzymu i stężenia początkowego  $H_2O_2$  ( $0,05 \text{ kmol/m}^3$ ), ale w różnych temperaturach.



Rys.10. Wpływ temperatury na zmiany stężenia podczas rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę uwolnioną z komórki:  
(o),(•),(Δ),(◻) punkty doświadczalne,  
(—) rozwiązania numeryczne równań (74) i (75)

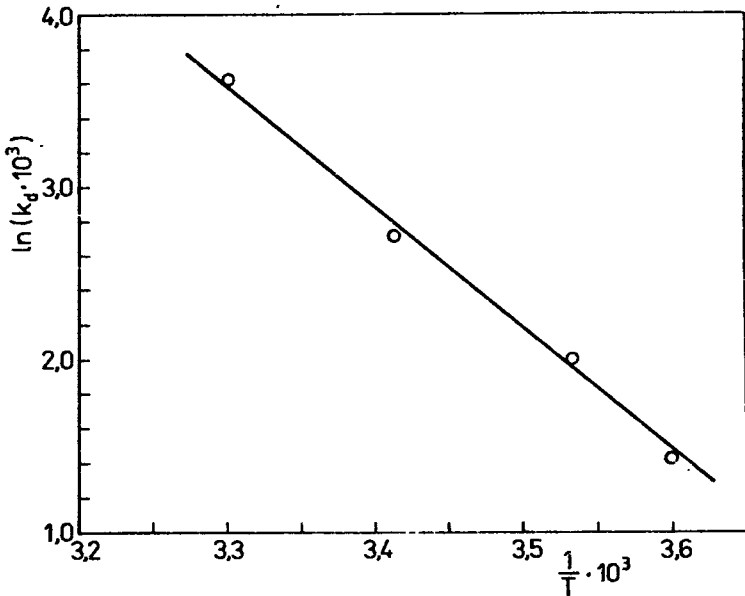
W pierwszym okresie procesu (około 20 minut) szybkość reakcji jest w przybliżeniu taka sama dla każdej z badanych temperatur. Następnie uwiadcza się znaczny wpływ temperatury na szybkość dezaktywacji katalazy. W temperaturze  $30^\circ\text{C}$ , już po około 1 godzinie, następuje całkowita dezaktywacja enzymu. Natomiast dla doświadczenia wykonanego w najniższej badanej temperaturze ( $5^\circ\text{C}$ ) w ciągu 4 godzin substrat zostaje prawie zupełnie wyczerpany i należy dodać nową porcję  $H_2O_2$ , aby doprowadzić do całkowitej dezaktywacji enzymu.

Na rys.11 przedstawiono wykres zależności  $\ln k$  od odwrotności temperatury ( $1/T$ ). Energia aktywacji obliczona na podstawie danych zamieszczonych na tym wykresie wynosi  $4,9 \text{ kJ/mol}$ . Wartość ta zgadza się z wcześniej publikowanymi danymi [45, 51, 52]. Należy zwrócić uwagę na to, że w niniejszej pracy zastosowano odmienną od dotychczas stosowanej metodykę badania rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę, która polega na analizowaniu obydwu występujących równolegle procesów: reakcji chemicznej i dezaktywacji enzymu. Poprzednio publikowane wartości energii aktywacji wyznaczono na podstawie badań kinetyki w warunkach umożliwiających pominięcie procesu dezaktywacji.



Rys.11. Wpływ temperatury na stałą szybkości reakcji rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę uwolnioną z komórki

Na rys.12 przedstawiono wykres zależności  $\ln k_d$  od odwrotności temperatury ( $1/T$ ).



Rys.12. Wpływ temperatury na stałą szybkości dezaktywacji katalazy uwolnionej z komórki



Obliczona energia aktywacji dla procesu dezaktywacji katalazy wynosi 58,6 kJ/mol i jest 12 razy większa od wyznaczonej dla reakcji rozkładu  $H_2O_2$ .

Wykonując doświadczenia dla najwyższych stężeń początkowych  $H_2O_2$  ( $0,4 \text{ kmol/m}^3$ ) w temperaturze  $30^\circ\text{C}$  zaobserwowano znaczny efekt cieplny reakcji prowadzący do wzrostu temperatury o około  $0,5^\circ\text{C}$  mimo termostatowania reaktora. Otrzymane wyniki wskazują na to, że energia aktywacji procesu dezaktywacji zależy silnie od temperatury. W związku z tym przeprowadzono obliczenia mające na celu oszacowanie wpływu odchylenia od warunków izotermicznych na uzyskiwany stopień przemiany. Rozwiązano numerycznie układ równań różniczkowych (51), (52) i (53) wraz z warunkami początkowymi stosując metodę Rungego-Kutty czwartego rzędu. W obliczeniach wykorzystano wyznaczone wcześniej wartości energii aktywacji. Współczynnik przenikania ciepła  $k_q = 16 \text{ h}^{-1}$  wyznaczono na podstawie krzywej chłodzenia zawartości reaktora od  $50^\circ\text{C}$  do  $30^\circ\text{C}$ , która stanowi rozwiązanie równania:

$$\frac{dT}{dt} = -k_q (T - T_c) \quad (82)$$

$$T(t=0) = 50^\circ\text{C}$$

W tabeli 1 zamieszczono wyniki obliczeń stężenia  $H_2O_2$ , aktywności enzymu i temperatury roztworu reakcyjnego dla następujących przypadków:

- nieskończona szybkość odprowadzenia ciepła z reaktora - proces izotermiczny,
- ograniczona szybkość odprowadzania ciepła z reaktora przez termostat,
- brak odprowadzania ciepła - proces adiabatyczny.

Tabela 1

Wyniki obliczeń stężenia  $H_2O_2$ , aktywności enzymu i temperatury roztworu reakcyjnego dla różnych warunków odprowadzania ciepła z reaktora

t min.	$k_q = \infty$			$k_q = 16 \text{ h}^{-1}$			$k_q = 0$		
	S kmol/m <sup>3</sup>	$\bar{E}$	T K	S kmol/m <sup>3</sup>	$\bar{E}$	T K	S kmol/m <sup>3</sup>	$\bar{E}$	T K
0	0,395	1,000	303,00	0,395	1,000	303,00	0,395	1,000	303,00
2	0,377	0,819	303,00	0,377	0,816	303,32	0,377	0,816	303,41
4	0,363	0,671	303,00	0,363	0,665	303,44	0,363	0,662	303,74
6	-	-	303,00	0,352	0,541	303,46	0,352	0,536	304,01
8	-	-	303,00	0,343	0,441	303,44	0,343	0,481	304,13
10	0,335	0,371	303,00	0,335	0,360	303,39	0,335	0,347	304,40
20	0,313	0,139	303,00	0,314	0,133	303,17	0,316	0,114	304,86
30	0,305	0,053	303,00	0,306	0,050	303,05	0,309	0,037	305,00
40	0,302	0,020	303,00	0,303	0,019	303,02	0,307	0,011	305,06
50	0,300	0,008	303,00	0,302	0,007	303,00	0,307	0,004	305,07
60	0,300	0,003	303,00	0,302	0,003	303,00	0,307	0,001	305,08

Z przeprowadzonych obliczeń wynika, że w warunkach prowadzonych doświadczeń, przy największych zmianach temperatury roztworu reakcyjnego dochodzących do  $0,5^{\circ}\text{C}$ , uzyskuje się ilość rozłożonego  $\text{H}_2\text{O}_2$  tylko o około 2 % mniejszą, niż gdyby to był proces idealnie izotermiczny ( $k_q = \infty$ ). Natomiast dla reakcji w warunkach adiabatycznych ilość rozłożonego  $\text{H}_2\text{O}_2$  jest o około 7 % mniejsza, niż w warunkach izotermicznych.

## 5.2. Katalaza w komórce

Przy opracowaniu danych doświadczalnych wykorzystano rozważania matematyczne zamieszczone w podrozdziale 3.2. Szybkość zmian stężenia  $\text{H}_2\text{O}_2$  w reaktorze oraz aktywności katalazy wewnątrz komórek opisuje układ równań różniczkowych:

$$-\frac{dS}{dt} = k_s (S - S_k) \quad (83)$$

$$-\frac{d\bar{E}}{dt} = \frac{v_{dk} \bar{E} S_k}{K_{dk} + S_k} \quad (84)$$

z warunkami początkowymi:

$$S(t=0) = S_0 \quad (85)$$

$$\bar{E}(t=0) = 1$$

Stężenie  $\text{H}_2\text{O}_2$  wewnątrz komórki  $S_k$  występujące w równaniach (83) i (84) wyznaczono z zależności

$$S_k = \frac{S_0 - K_{mk} - \frac{v_{mk} \bar{E}}{k_s} + \sqrt{\left(K_{mk} + \frac{v_{mk} \bar{E}}{k_s} - S\right)^2 + 4K_{mk} S}}{2} \quad (86)$$

lub dla  $S_k \ll K_{mk}$

$$S_k = \frac{k_s S}{k_s + \frac{v_{mk}}{K_{mk}} \bar{E}} \quad (87)$$

Układ równań (83) i (84) rozwiązywano numerycznie metodą Rungego-Kuty. Wykonując obliczenia i porównując rozwiązania z danymi doświadczalnymi sprawdzono następujące przypadki:

1. Parametry kinetyczne dla katalazy uwolnionej z komórki i wewnątrz komórki są identyczne, zatem  $K_m = K_{mk}$ ,  $K_d = K_{dk}$ ,  $v_m = v_{mk}$ ,  $v_d = v_{dk}$ .
2. Parametry kinetyczne dla reakcji rozkładu  $\text{H}_2\text{O}_2$  przez katalazę uwolnioną z komórki i w komórce są identyczne, natomiast różnią się parametry dla procesu dezaktywacji, zatem  $K_m = K_{mk}$ ,  $v_m = v_{mk}$ ,  $K_d \neq K_{dk}$ ,  $v_d \neq v_{dk}$ .

3. Parametry kinetyczne dla katalazy uwolnionej z komórki i w komórce są różne, zatem  $K_m \neq K_{mk}$ ,  $v_m \neq v_{mk}$ ,  $K_d \neq K_{dk}$ ,  $v_d \neq v_{dk}$ .

Otrzymane wyniki doświadczalne wskazywały na to, że proces dezaktywacji katalazy w komórce przebiega wolniej, niż dezaktywacja katalazy po jej uwolnieniu z komórki. Świadczyło o tym znaczne wydłużenie się okresu aktywności enzymu w komórce dla tych samych warunków przebiegu reakcji. Mogła to być jednak obserwacja pozorna wynikająca ze zmniejszenia się stężenia  $H_2O_2$  wewnątrz komórek na skutek działania błony komórkowej jako bariery dyfuzyjnej dla substratu. Dlatego wykonano obliczenia dla różnych wartości  $k_s$  stosując parametry kinetyczne katalazy uwolnionej z komórki (przypadek 1). Okazało się jednak, że nie można uzyskać zgodności rozwiązań modelu matematycznego z danymi doświadczalnymi bez istotnej zmiany stałych dla procesu dezaktywacji. Znacznie lepszą zgodność uzyskano dla przypadku 2, chociaż dla stężeń początkowych wyższych od  $0,01 \text{ mol/m}^3$  również obserwuje się odchylenie od danych doświadczalnych. Dla przypadku 3 uzyskano zgodność danych doświadczalnych z rozwiązaniami numerycznymi dla całego badanego zakresu stężeń początkowych (od  $0,005 \text{ kmol/m}^3$  do  $0,8 \text{ kmol/m}^3$ ).

Parametry modelu wyznaczono stosując, podobnie jak i dla katalazy uwolnionej z komórki (podrozdział 5.1), metodę najłapczego dopasowania rozwiązań numerycznych do danych doświadczalnych. Dla temperatury  $30^\circ\text{C}$  uzyskano następujące wartości stałych:

$$\begin{aligned}k_s &= 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} \\v_{dk} &= 1,92 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1} \\v_{mk} &= 1,65 \cdot 10^{-5} \text{ kmol/m}^3 \cdot \text{s} \\K_{dk} &= 0,016 \text{ kmol/m}^3 \\K_{mk} &= 0,083 \text{ kmol/m}^3\end{aligned}$$

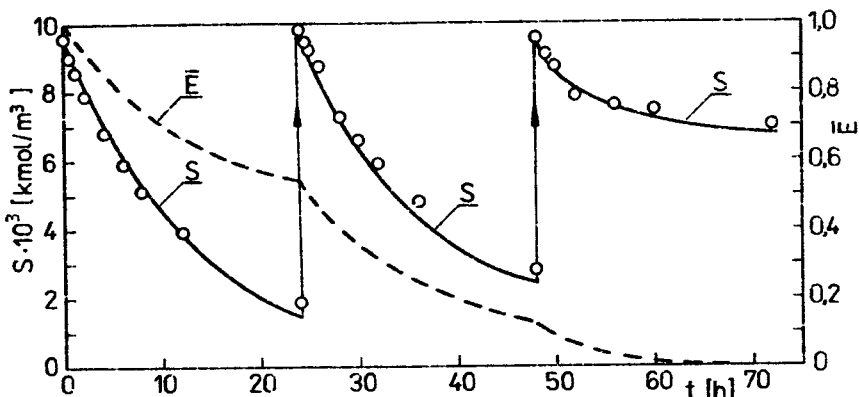
Na rys.13-18 przedstawiono porównanie rozwiązań numerycznych modelu matematycznego (równania (83), (84), (85) i (86)) z danymi doświadczalnymi. W obliczeniach wykorzystano podane powyżej wartości parametrów. Dla stężenia początkowego  $0,4 \text{ kmol/m}^3$  (rys.18) wykonano również doświadczenie z dwukrotnie większą ilością komórek drożdży i wówczas w obliczeniach stosowano dwukrotnie większe wartości  $k_s$  oraz  $v_{mk}$ .

Na rysunkach widać dobrą zgodność rozwiązań z wynikami pomiarów, chociaż nieco gorszą w porównaniu z katalazą uwolnioną z komórki. Można to tłumaczyć większą złożonością procesu.

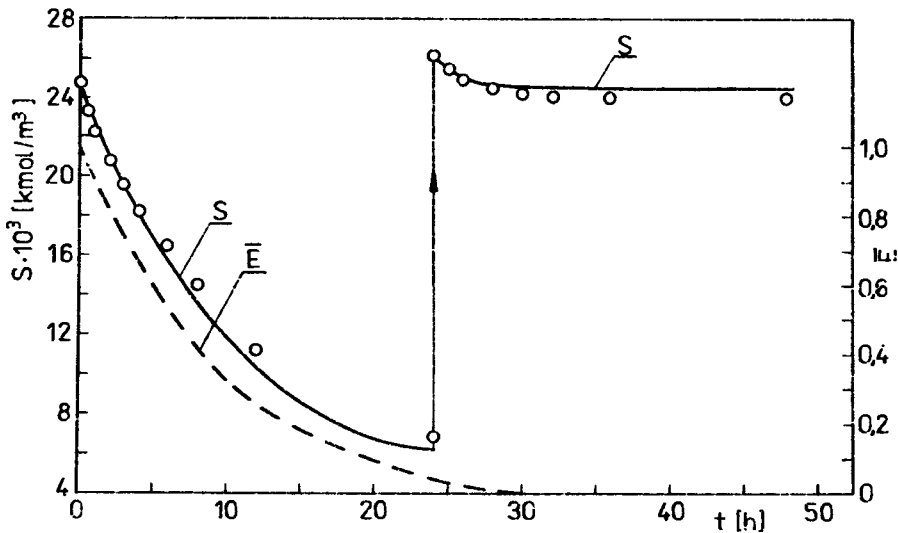
W tabelach 2-4 przedstawiono przykładowo wyniki obliczeń, pozwalające na zorientowanie się w zmiannach stężenia  $H_2O_2$  wewnątrz komórki ze zmiannami stężenia  $H_2O_2$  w reaktorze i aktywnością enzymu.

Dla stężenia początkowego  $S_0 < 0,01 \text{ kmol/m}^3$  obliczenia wykazały spadek stężenia  $H_2O_2$  wewnątrz komórki w trakcie pierwszej i drugiej szarży. Dopiero podczas trzeciej szarży, gdy aktywność enzymu zmniejszyła się bardzo znacznie, uzyskano wzrost stężenia  $H_2O_2$  wewnątrz komórki mimo jego spadku

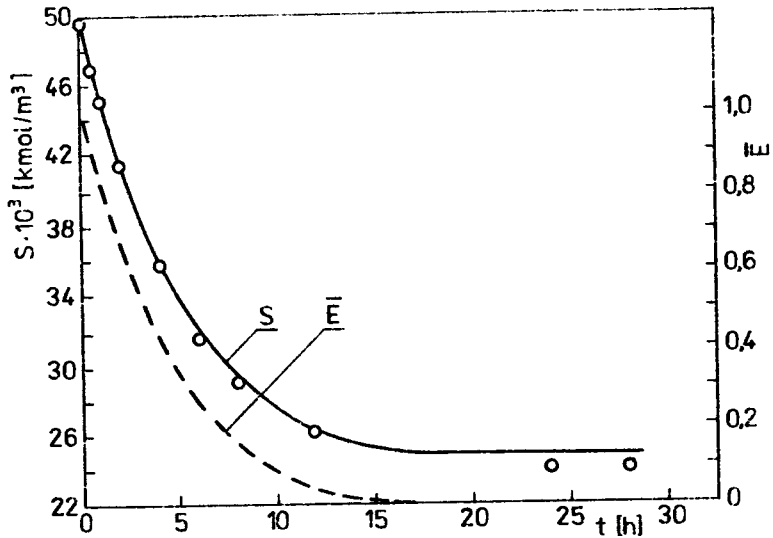
w reaktorze. Dla wyższych stężeń początkowych zawsze uzyskiwano z obliczeń wzrost stężenia  $H_2O_2$  wewnątrz komórki wraz z upływem czasu doświadczenia (tabela 3 i 4).



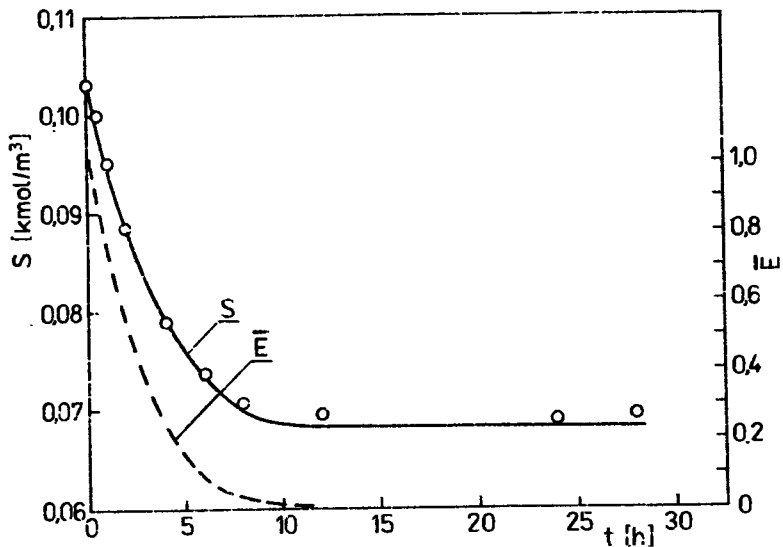
Rys.13. Zmiany stężeń i aktywności enzymu podczas rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę w komórce ( $S_0 < 0,01 \text{ kmol/m}^3$ ). Linie na wykresie przedstawiają rozwiązania numeryczne równań (83) i (84), (o) doświadczalne S



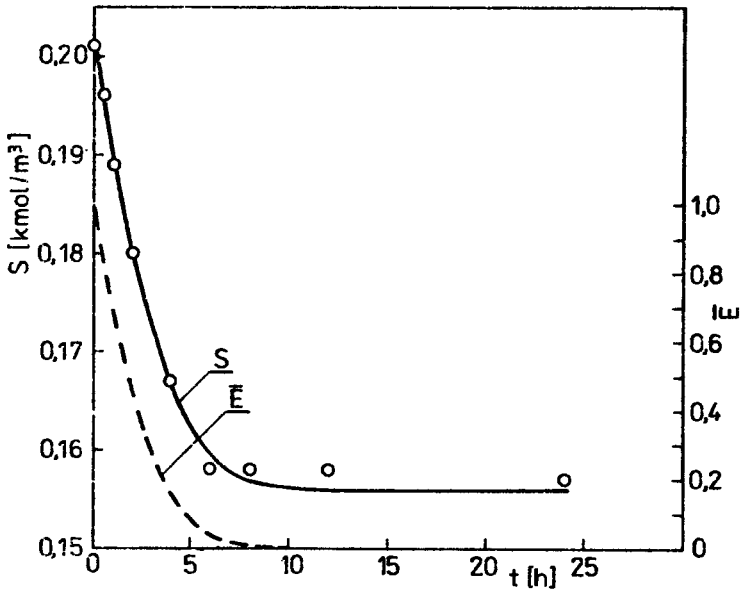
Rys.14. Zmiany stężeń i aktywności enzymu podczas rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę w komórce ( $S_0 = 0,025 \text{ kmol/m}^3$ ). Linie na wykresie przedstawiają rozwiązanie numeryczne równań (83) i (84), (o) doświadczalne S



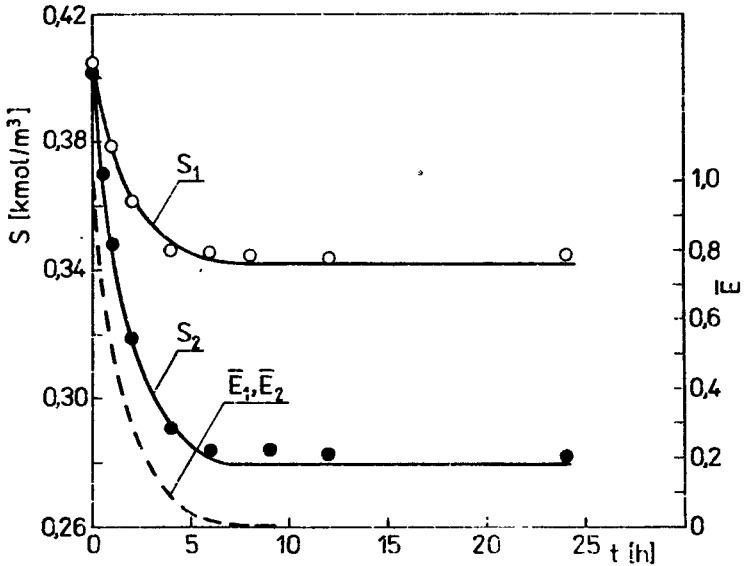
Rys.15. Zmiany stężeń i aktywności enzymu podczas rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę w komórce ( $S_0 = 0,05 \text{ kmol/m}^3$ ). Linie na wykresie przedstawiają rozwiązania numeryczne równań (83) i (84), (o) doświadczalne S



Rys.16. Zmiany stężeń i aktywności enzymu podczas rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę w komórce ( $S_0 = 0,1 \text{ kmol/m}^3$ ). Linie na wykresie przedstawiają rozwiązanie numeryczne równań (83) i (84), (o) doświadczalne S



Rys.17. Zmiany stężeń i aktywności enzymu podczas rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę w komórce ( $S_0 = 0,2 \text{ kmol/m}^3$ ). Linie na wykresie przedstawiają rozwiązania numeryczne równań (83) i (84), (o) doświadczalne  $S$



Rys.18. Zmiany stężeń i aktywności enzymu podczas rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę w komórce ( $S_0 = 0,4 \text{ kmol/m}^3$ ). Linie na wykresie przedstawiają rozwiązania numeryczne równań (83) i (84), (o), (•) doświadczalne  $S$

Tabela 2

Wyniki doświadczeń i obliczeń dla  $S_0 < 0,01 \text{ kmol/m}^3$ 

t h	$S_{\text{dośw.}}$ $\text{kmol/m}^3$	$S_{\text{obl.}}$ $\text{kmol/m}^3$	$S_K$ $\text{kmol/m}^3$	$\bar{E}$
0	0,0096	0,0096	0,00108	1,000
0,5	0,0090	0,0092	0,00106	0,979
1	0,0086	0,0089	0,00104	0,958
2	0,0079	0,0082	0,00099	0,919
4	0,0068	0,0070	0,00091	0,851
6	0,0059	0,0060	0,00083	0,793
8	0,0052	0,0051	0,00075	0,743
12	0,0039	0,0038	0,00060	0,664
24	0,0019	0,0015	0,00030	0,534
24	0,0098	0,0098	0,00190	0,534
24,5	0,0094	0,0094	0,00189	0,514
25	0,0092	0,0091	0,00187	0,496
26	0,0086	0,0085	0,00185	0,462
28	0,0072	0,0074	0,00179	0,401
30	0,0066	0,0065	0,00173	0,350
32	0,0059	0,0057	0,00168	0,306
36	0,0047	0,0044	0,00156	0,238
48	0,0028	0,0024	0,00123	0,123
48	0,0095	0,0095	0,00494	0,123
49	0,0090	0,0091	0,00512	0,104
50	0,0087	0,0088	0,00529	0,088
52	0,0079	0,0082	0,00564	0,062
56	0,0076	0,0075	0,00620	0,029
60	0,0074	0,0072	0,00655	0,013
72	0,0070	0,0069	0,00687	0,001

Tabela 3

Wyniki doświadczeń i obliczeń dla  $S_0 = 0,05 \text{ kmol/m}^3$ 

t h	$S_{\text{dośw.}}$ $\text{kmol/m}^3$	$S_{\text{obl.}}$ $\text{kmol/m}^3$	$S_k$ $\text{kmol/m}^3$	$\bar{E}$
0	0,0493	0,0493	0,00584	1,000
0,5	0,0468	0,0474	0,00611	0,910
1	0,0449	0,0456	0,00641	0,826
2	0,0414	0,0422	0,00711	0,673
4	0,0358	0,0366	0,00903	0,425
6	0,0317	0,0323	0,0118	0,247
8	0,0291	0,0292	0,0155	0,131
12	0,0260	0,0262	0,0222	0,029
24	0,0241	0,0253	0,0253	0,000
28	0,0242	0,0253	0,0253	0,000

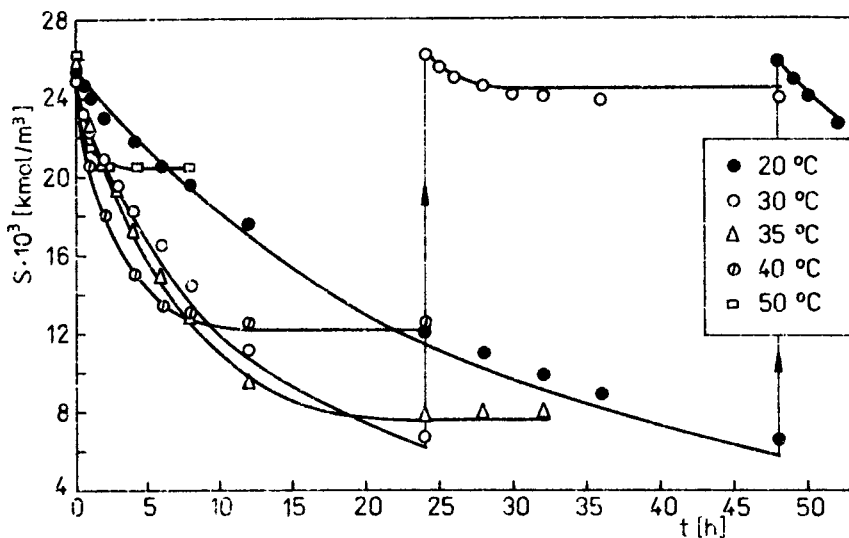
Tabela 4

Wyniki doświadczeń i obliczeń dla  $S_0 = 0,2 \text{ kmol/m}^3$ 

t h	$S_{\text{dośw.}}$ $\text{kmol/m}^3$	$S_{\text{obl.}}$ $\text{kmol/m}^3$	$S_k$ $\text{kmol/m}^3$	$\bar{E}$
0	0,201	0,201	0,0291	1,000
0,5	0,194	0,194	0,0357	0,794
1	0,186	0,187	0,0442	0,621
2	0,174	0,175	0,0675	0,364
4	0,162	0,162	0,118	0,112
6	0,159	0,157	0,144	0,033
8	0,159	0,156	0,152	0,009
12	0,158	0,156	0,155	0,001
24	0,158	0,156	0,156	0,000

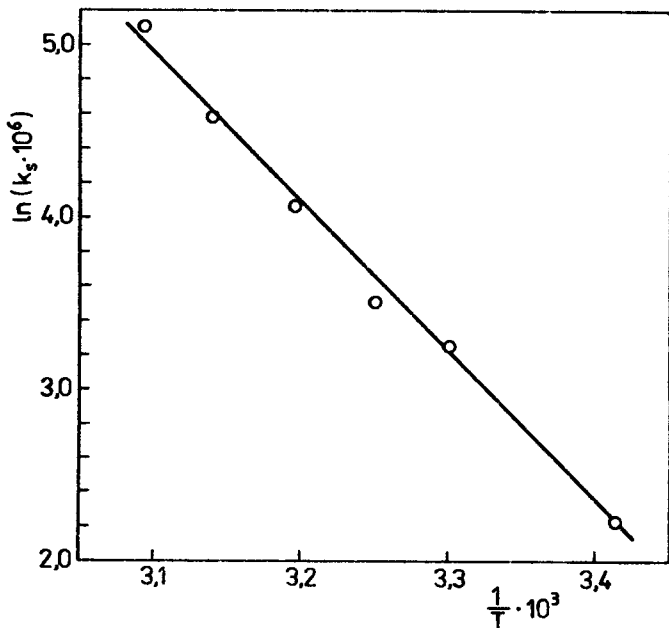


Wykonaną serię doświadczeń dla stężenia początkowego  $0,025 \text{ kmol/m}^3$  w temperaturach od  $20^\circ\text{C}$  do  $50^\circ\text{C}$  wykorzystano do wyznaczenia wpływu temperatury na współczynnik przenikania  $\text{H}_2\text{O}_2$  przez błonę komórkową oraz stałą szybkości dezaktywacji. W obliczeniach przyjęto, że stałe  $K_{mk}$  i  $K_{dk}$  nie zmieniają się z temperaturą, jak to stwierdzono dla enzymu uwolnionego z komórki. Dodatkowo założono, że stałą szybkości reakcji  $v_{mk}$  można przyjąć za niezmienną w badanym zakresie temperatur. W takim przypadku obliczenia zostają sprowadzone do wyznaczenia dwóch parametrów:  $k_s$  i  $v_{dk}$ . Na rys.19 przedstawiono wyniki doświadczeń oraz obliczeń.

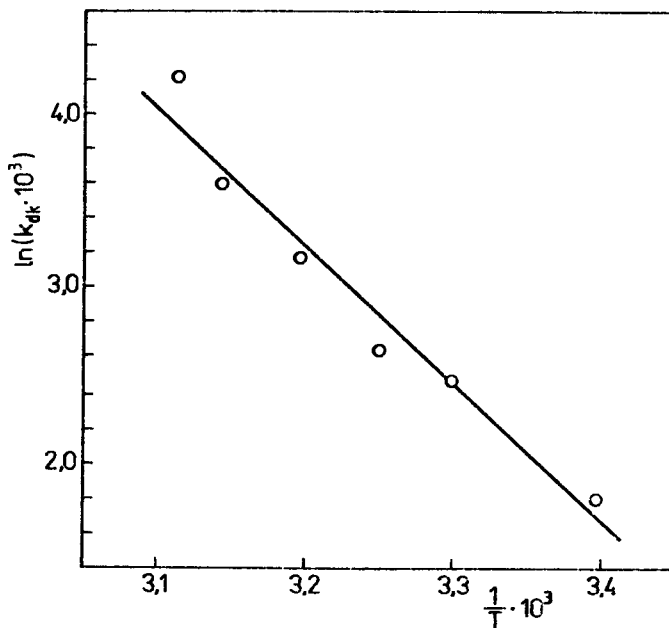


Rys.19. Wpływ temperatury na zmiany stężeń  $\text{H}_2\text{O}_2$  rozkładanego przez katalazę w komórce

Jak widać w zakresie temperatur od  $20^\circ\text{C}$  do  $50^\circ\text{C}$  występują bardzo wyraźne zmiany szybkości dezaktywacji oraz współczynnika przenikania masy  $k_s$ . W temperaturze  $50^\circ\text{C}$  praktycznie po około 1 godzinie następuje całkowita dezaktywacja katalazy, natomiast w temperaturze  $20^\circ\text{C}$  nawet po 48 godzinach obserwuje się jeszcze wyraźną aktywność enzymu. Na tak znaczne wydłużenie się okresu aktywności ze spadkiem temperatury mają wpływ dwa zjawiska: zmniejszanie się szybkości dezaktywacji oraz szybkości przenoszenia  $\text{H}_2\text{O}_2$  przez błonę komórkową. Przedstawiając zależność  $\ln k_s$  od  $1/T$  na wykresie (rys.20) wyznaczono energię aktywacji  $E_3 = 74,3 \text{ kJ/mol}$ . Podobnie, dla stałej szybkości dezaktywacji  $k_{dk} = v_{dk}/K_{dk}$  wyznaczono energię aktywacji  $E_4 = 61,7 \text{ kJ/mol}$  z wykresu Arrheniusa (rys.21). Ma ona wartość bliską energii wyznaczonej dla enzymu uwolnionego z komórki ( $58,6 \text{ kJ/mol}$ ).



Rys.20. Wpływ temperatury na współczynnik przenikania  $H_2O_2$  przez błonę komórkową



Rys.21. Wpływ temperatury na stałą szybkości dezaktywacji katalazy w komórce

## 6. DYSKUSJA

Podstawowym celem pracy było sprawdzenie, czy słuszna jest teza o zwiększeniu się szybkości dezaktywacji katalazy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* po uwolnieniu jej z komórki. Cel ten mógł zostać zrealizowany dopiero po opracowaniu matematycznego opisu zjawisk występujących w procesie rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę uwolnioną z komórki i znajdującą się w komórce. Dla enzymu uwolnionego z komórki model matematyczny aprowadza się do układu dwóch równań różniczkowych zwyczajnych: jedno opisuje szybkość enzymatycznej reakcji rozkładu  $H_2O_2$ , a drugie szybkość dezaktywacji katalazy. Zarówno szybkość reakcji, jak i szybkość dezaktywacji opisano równaniami kinetycznymi o postaci równania Michaelisa-Menten. Przeprowadzona przez autora niniejszej pracy analiza pozwoliła na wyznaczenie rozwiązania analitycznego układu równań różniczkowych, gdy  $K_m = K_d = K$ . Natomiast dla przypadku  $K_m \neq K_d$  równania można rozwiązać tylko metodami numerycznymi.

Dla ograniczonego zakresu stężeń ( $S \gg K_d$  i  $S \gg K_m$  oraz  $S \ll K_d$  i  $S \ll K_m$ ), po dokonaniu odpowiednich uproszczeń, uzyskano rozwiązania analityczne. Przeprowadzona analiza zależności między stężeniem substratu w reaktorze, a aktywnością enzymu wykazała, że wyznaczenie ilości rozłożonego substratu przez jednostkę enzymu dla dwóch różnych stężeń początkowych  $H_2O_2$  pozwala na jednoznaczny wybór między równaniem kinetycznym z  $K_m = K_d = K$  a równaniem z  $K_m \neq K_d$ . Wykonane doświadczenia w szerokim zakresie stężeń początkowych (od  $0,005 \text{ kmol/m}^3$  do  $0,4 \text{ kmol/m}^3$ ) zweryfikowały model ze stałymi  $K_m \neq K_d$ . Dla reakcji rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę (w zakresie temperatur od  $50^\circ\text{C}$  do  $30^\circ\text{C}$ ) uzyskano średnią wartość  $K_m = 0,143 \text{ kmol/m}^3$ , która jest zgodna z wartościami uzyskanymi za pomocą elektrody tlenowej. Należy podkreślić, że autor stosował całkiem odmienną metodę badań od dotychczas stosowanych, ponieważ uwzględnił w analizie wyników doświadczalnych obydwa występujące procesy: reakcję i dezaktywację. Za pomocą metody przepływu ciągłego uzyskano znacznie wyższe wartości stałej  $K_m = 1,1 \text{ kmol/m}^3$ . Dotychczas w literaturze brak było jednoznacznego rozstrzygnięcia, która z tych metod (metoda przepływu ciągłego czy zastosowania elektrody tlenowej) daje poprawne wyniki. Dla procesu dezaktywacji uzyskano średnią wartość stałej  $K_d = 0,054 \text{ kmol/m}^3$ , która jest wielokrotnie mniejsza od uzyskanej przez Jonesa i Suggetta [45] metodą ekstrapolacji wyników badań kinetycznych. Dysponując wynikami doświadczeń Jonesa i Suggetta autor wykonał obliczenia, aby sprawdzić, czy w warunkach prowadzenia przez nich doświadczeń możliwe jest dokładne oszacowanie stałych procesu dezaktywacji.

W tabeli 5 przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych uzyskanych przez zastosowanie metody Rungego-Kutty do rozwiązania równania kinetycznego reakcji i dezaktywacji. Obliczenia te wykonano dla stałej  $K_d = 1,1 \text{ kmol/m}^3$  podanej w pracy Jonesa i Suggetta oraz dla jedenastokrotnie mniejszej, stosując najwyższe i najniższe stężenie początkowe.

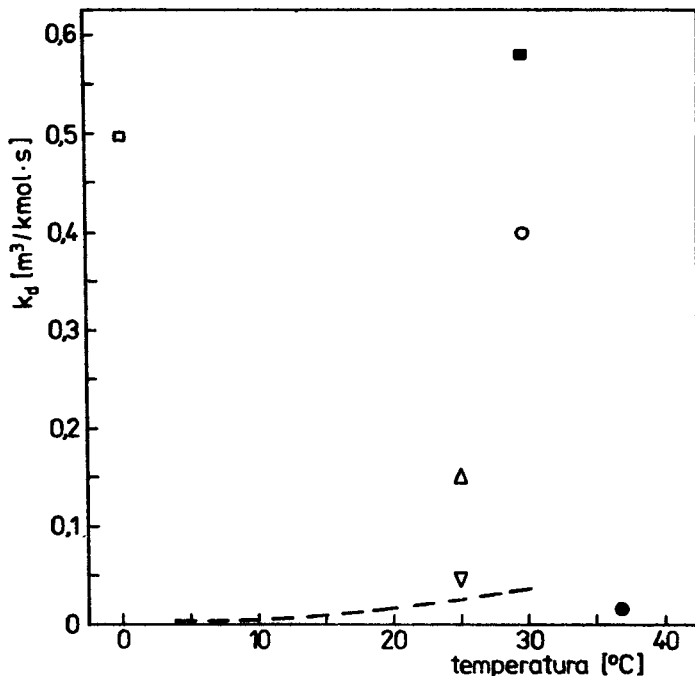
Obliczenia stężenia  $H_2O_2$  i aktywności katalazy  
wykonane na podstawie wyników doświadczeń Jonesa i Suggetta [45]

$K_m = 1,1 \text{ kmol/m}^3$ $K_d = 1,1 \text{ kmol/m}^3$			$K_m = 1,1 \text{ kmol/m}^3$ $K_d = 0,1 \text{ kmol/m}^3$		
t s	S kmol/m <sup>3</sup>	$\bar{E}$	t s	S kmol/m <sup>3</sup>	$\bar{E}$
0	0,3	1,000	0	0,3	1,000
0,1	0,275	0,987	0,1	0,275	0,983
0,2	0,252	0,974	0,2	0,252	0,966
0,3	0,230	0,963	0,3	0,231	0,951
0,4	0,211	0,953	0,4	0,212	0,936
0,5	0,193	0,943	0,5	0,194	0,921
0	0,74	1,000	0	0,74	1,000
0,1	0,716	0,980	0,1	0,716	0,980
0,2	0,693	0,950	0,2	0,692	0,959
0,3	0,670	0,927	0,3	0,670	0,940
0,4	0,649	0,905	0,4	0,649	0,921
0,5	0,629	0,883	0,5	0,628	0,902

Jak widać z przytoczonych obliczeń, wykonanie doświadczeń w wąskim zakresie stężeń początkowych i dla krótkich czasów reakcji prowadzi do nieznacznych zmian aktywności enzymu. W takich warunkach nie jest możliwe wyznaczenie dokładnej wartości parametrów kinetycznych procesu dezaktywacji. Zmniejszenie wartości stałej  $K_d$  z  $1,1 \text{ kmol/m}^3$  do  $0,1 \text{ kmol/m}^3$  nie doprowadziło do istotnej zmiany stężenia substratu (tabela 5).

Dla stężenia  $H_2O_2$  mniejszego od  $0,01 \text{ kmol/m}^3$  stwierdzono, że równanie kinetyczne procesu dezaktywacji można uprościć do równania kinetycznego pierwszego rzędu ze względu na substrat. Podobną postać zależności uzyskali również inni badacze [42, 65, 70, 75] i dlatego możliwe jest porównanie uzyskanych stałych. Na rys.22 przedstawiono linią przerywaną zależność  $k_d$  od temperatury, wyznaczoną dla zakresu temperatur od  $5^\circ\text{C}$  do  $30^\circ\text{C}$  oraz dane uzyskane przez innych autorów (tabela 6). Jak widać z rysunku, wyznaczone w niniejszej pracy wartości stałej  $k_d$  mieszczą się w zakresie wartości uzyskanych przez innych autorów. Z drugiej strony wydaje się, że wartości uzyskane przez Georga [65] oraz Jonesa i Suggetta [42] są znacznie zawyżone. Wykonane obliczenia wykazują, że dla tak dużych wartości stałych pro-

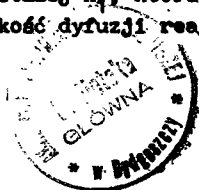
cesu dezaktywacji nie jest możliwe badanie kinetyki procesu z pominięciem dezaktywacji. Jest to sprzeczne z wynikami badań wielu autorów (np. [33, 34, 40, 46 - 48]) nad kinetyką reakcji rozkładu  $H_2O_2$  katalizowanej przez katalazę.



Rys.22. Porównanie stałej szybkości dezaktywacji katalazy wyznaczonej w niniejszej pracy z wynikami innych autorów:  
 (---) badania własne,  
 (■) Jones i Suggett [42], (□) George [65],  
 (○) obliczone przez Wójcika [68] na podstawie danych doświadczalnych Ibrahima i Schlegla [48],  
 (Δ), (∇) Tai i Greenfield [70], (●) Tse i Gough [75]

Analiza przedstawiona w podrozdziale 2.1 wykazała, że na podstawie pomiarów szybkości rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę nie jest możliwe wykluczenie żadnego z czterech proponowanych mechanizmów reakcji. Wykonane badania i obliczenia dostarczyły jednak dodatkowych informacji, z których wynika, że stała  $K_m$  nie zależy od temperatury, a energia aktywacji dla stałej szybkości  $k$  wynosi 4,9 kJ/mol.

Mechanizm zaproponowany przez Chanca [24] (równania (2) i (3)) prowadzi do równania kinetycznego  $r_s = kES$  ze stałą  $k = 2k_1k_4/(k_1 + k_4)$ . Kremer [22] wykazał, że pozorna energia aktywacji  $E_p$  dla stałej  $k$  nie może być mniejsza od energii aktywacji  $E_1$  dla stałej  $k_1$ , która ze względu na ograniczenie szybkości reakcji przez szybkość dyfuzji reagentów musi spełniać warunek  $E_1 \geq 16,7$  kJ/mol.



Stała dezaktywacji  $k_d$  dla katalazy

Autor i źródło	$k_d$ $\frac{\text{kmol}}{\text{m}^3 \cdot \text{s}}$	Tempera- tura °C	Charakterystyka warunków doświadczeń
Jones i Suggett [42]	0,58	30	Enzym pochodzenia mikrobiologicznego w roztworze. Pomiary metodą przepływu ciągłego.
George [65]	0,5	0	Enzym pochodzenia zwierzęcego w roztworze. Pomiary metodą manometryczną.
Wójcik [68]	0,4	30	Badania Ibrahima i Schlegla [48] z enzymem pochodzenia zwierzęcego w roztworze.
Tai i Greenfield [70]	0,15 0,047	25 25	Enzym pochodzenia zwierzęcego: - unieruchomiony na porowatym szkłe, - unieruchomiony na krzemionce.
Tse i Gough [75]	0,015	37	Enzym pochodzący z <i>Aspergillus niger</i> unieruchomiony w kolagenie.

Z powyższego wynika, że niskiej wartości energii aktywacji, wyznaczonej w tej pracy i potwierdzonej przez innych autorów [42, 51, 52], nie da się pogodzić z mechanizmem Chanca [24].

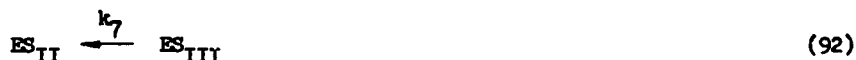
W podobny sposób można również wykazać, że obydwa mechanizmy zaproponowane przez Ogurę [44] prowadzą do sprzeczności z wynikami doświadczalnymi. Mechanizm I (równania (7a), (7b) i (7c)) jest dla  $S \ll K_m$  identyczny z „mechanizmem peroksydacyjnym” Chanca [24], którego niezgodność z danymi doświadczalnymi wykazano powyżej. Dla mechanizmu II (równania (8a), (8b) i (8c)) uzyskuje się w zakresie niskich stężeń substratu równanie kinetyczne  $r_p = kES$  ze stałą  $k = k_1$ , której energia aktywacji powinna być większa od 16,7 kJ/mol (doświadczalnie wyznaczone wartości wynosi 4,9 kJ/mol). Jedynie mechanizm reakcji zaproponowany przez Jonesa i Suggetta [45] (równania (9a), (9b) i (9c)) nie wykazuje sprzeczności z wynikami doświadczalnymi uzyskanymi w niniejszej pracy.

Przeprowadzone badania wykazały, że kinetykę reakcji i dezaktywacji katalazy uwolnionej z komórki można opisać równaniami Michaelisa-Menten ze stałymi  $K_m$  i  $K_d$  różniącymi się co do wartości. Występowanie różnic między  $K_m$  i  $K_d$  może być wynikiem bardziej skomplikowanego, wielostopniowego mechanizmu dezaktywacji, który sugerują badania spektrofotometryczne [57-59]. Opublikowane w ostatnich latach wyniki badań nad termiczną dezaktywacją enzymów [96-101] wykazały też, że jest to proces bardziej złożony (wielostopniowy), niż dotychczas sądzono.

Ze względu na brak innych przesłanek przyjęto hipotezę, że reakcja rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę przebiega według mechanizmu Jonesa i Suggesta [45]:



natomiast dezaktywacja równoległa enzymu jest procesem dwustopniowym:



Z badań spektrofotometrycznych wynika, że nieaktywny kompleks katalazy  $ES_{II}$  może przejść w kompleks aktywny, który bierze udział w reakcji chemicznej. Autor zakłada, iż takie przejście jest możliwe po kolizji z cząsteczką substratu i przebiega według schematu:



Po przyjęciu hipotezy o stanie quasi-ustalonym otrzymuje się dla  $k_8 \sim k_1$  oraz  $k_9 \sim k_2$  równania Michaelisa-Menten:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{k' E_a S}{K_m + S} \quad (94)$$

$$-\frac{dE_a}{dt} = \frac{k'_d E_a S}{K_d + S} \quad (95)$$

spełniające warunek  $K_m \neq K_d$ .

W szczególnym przypadku, gdy  $k_8 = k_1$  oraz  $k_9 = k_2$ , stałe w równaniach (94) i (95) zdefiniowane są następująco:

$$k' = 2 k_3$$

$$K_m = \frac{k_3}{k_4} + \frac{k_2}{k_1} + \frac{k_3}{k_1}$$

$$k'_d = \frac{k_5 k_7}{k_1 + k_5}$$

$$K_d = \frac{k_6 + k_7}{k_4 + k_5}$$

Z powyższych rozważań wynika, że przyjęty mechanizm reakcji i dezaktywacji potwierdza wyniki doświadczalne, które wykazały występowanie odmiennych wartości stałych  $K_m$  i  $K_d$  w równaniach kinetycznych.

Dla enzymu znajdującego się w komórce przedstawiono model matematyczny, który uwzględnia zjawisko dyfuzji przez błonę komórkową, a szybkość reakcji i dezaktywacji katalazy opisują równania Michaelisa-Menten [102]. Stwierdzono doświadczalnie, że enzym znajdujący się wewnątrz komórki zachowuje znacznie dłuższą aktywność, ale wpływ na to ma nie tylko zwolnienie procesu dezaktywacji, lecz również występowanie oporu przy dyfuzji substratu przez błonę komórkową. Stała kinetyczna reakcji rozkładu  $H_2O_2$  oraz dezaktywacji katalazy wyznaczone dla enzymu w komórce różnią się od wyznaczonych dla enzymu uwolnionego z komórki. Stała  $K_d = 0,026 \text{ kmol/m}^3$  jest ponad 3 razy mniejsza, a stała  $K_m = 0,083 \text{ kmol/m}^3$  o 35 % mniejsza niż dla enzymu uwolnionego z komórki.

Stosunek szybkości dezaktywacji katalazy uwolnionej z komórki do szybkości dezaktywacji katalazy w komórce przedstawia następująca zależność:

$$\psi = \frac{r_d}{r_{dk}} = \frac{v_d (K_{dk} + S)}{(K_d + S) v_{dk}} \quad (96)$$

Wartość  $\psi$  dla parametrów kinetycznych wyznaczonych w temperaturze  $30^\circ\text{C}$  zmienia się od około 3 (dla  $S \ll K_d$  i  $S \ll K_{dk}$ ) do 10 (dla  $S \gg K_d$  i  $S \gg K_{dk}$ ). Potwierdza to tezę o znacznie wolniejszej dezaktywacji katalazy w komórce, niż po jej uwolnieniu z komórki. Powyższe stwierdzenia nie są jednak wystarczające, ponieważ wolniejszej dezaktywacji towarzyszy zmniejszenie się szybkości rozkładu  $H_2O_2$  na skutek istnienia błony komórkowej. Dlatego zagadnienie to przedstawiono w sposób, który jest bardziej interesujący z technologicznego punktu widzenia.

Jeżeli katalaza znajdująca się wewnątrz komórki dezaktywuje się wolniej, to wówczas ilość rozłożonego  $H_2O_2$  przez jednostkę enzymu powinna być większa, niż w przypadku enzymu uwolnionego.

Dysponując modelami matematycznymi obydwu procesów wykonano obliczenia ilości rozkładanego substratu dla całego badanego zakresu stężeń. Ilość rozłożonego  $H_2O_2$  przez katalazę uwolnioną z komórki i znajdującą się w roztworze reakcyjnym o stężeniu  $S$  określa zależność:

$$F_s = \frac{v_m S}{K_m + S} \int_0^\infty \bar{E}(t) dt \quad (97)$$

Aktywność katalazy  $\bar{E}$  zmienia się w czasie zgodnie z równaniem:

$$-\frac{d\bar{E}}{dt} = \frac{v_d \bar{E} S}{K_d + S} \quad (98)$$



Całkując równanie (98) w granicach  $(1, \bar{E})$  oraz  $(0, t)$  otrzymuje się dla stałego stężenia S:

$$\bar{E}(t) = \exp(-at) \quad (99)$$

gdzie:

$$a = \frac{v_d S}{K_d + S}$$

Po podstawieniu zależności (99) do równania (97) i soalkowaniu otrzymuje się ilość rozłożonego  $H_2O_2$  przez enzym uwolniony z komórki:

$$F_s = \frac{v_m (K_d + S)}{v_d (K_m + S)} \quad (100)$$

Ilość  $H_2O_2$  rozłożonego przez katalazę znajdującą się w komórce określa zależność:

$$F_{sk} = \int_0^{\infty} k_s (S - S_k) dt \quad (101)$$

Stężenie  $S_k$  wewnątrz komórki zmienia się w czasie na skutek postępującej dezaktywacji katalazy, której szybkość opisuje równanie:

$$-\frac{d\bar{E}}{dt} = \frac{v_{dk} \bar{E} S_k}{K_{dk} + S_k} \quad (102)$$

gdzie:

$$S_k = \frac{S - K_{mk} - \frac{v_{mk} \bar{E}}{k_s} - \sqrt{\left(K_{mk} \frac{v_{mk} \bar{E}}{k_s} - S\right)^2 + 4 K_{mk} S}}{2}$$

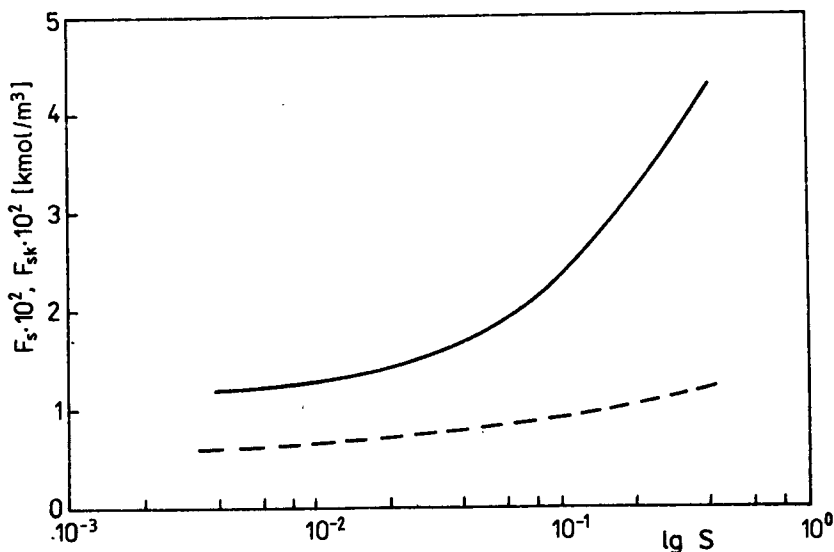
Równanie (102) rozwiązywano numerycznie metodą Rungego-Kutty, a wyznaczone wartości  $S_k$  stosowano następnie do obliczenia całki (101) metodą Simpsona.

Obliczenia wykonano dla parametrów kinetycznych  $v_m$  i  $v_{mk}$ , które wyznaczono dla tej samej ilości materiału biologicznego.

Na rys.23 przedstawiono wyniki obliczeń ilości rozłożonego  $H_2O_2$  jako funkcję  $\lg S$ . Dla enzymu znajdującego się w komórce uzyskano w całym zakresie stężeń (od  $0,004 \text{ kmol/m}^3$  do  $0,4 \text{ kmol/m}^3$ ) większą ilość rozłożonego  $H_2O_2$  niż dla enzymu uwolnionego z komórki. Dla niższych stężeń ilość ta jest dwukrotnie większa, a dla wyższych stężeń czterokrotnie większa.

Doświadczenia przeprowadzone z katalazą znajdującą się w komórkach drożdży wykazały, że współczynnik przenikania  $H_2O_2$  przez błonę komórkową  $k_s$  znacznie się zmienia ze zmianą temperatury (energia aktywacji  $E_3 = 74,3 \text{ kJ/mol}$ ). Zgodnie z równaniem (63) współczynnik przenikania masy przez błonę komórkową jest wyrażony w postaci  $k_s = \frac{k_p D_m a}{1}$ . Współczynnik

podziału  $K_p$ , grubość błony komórkowej  $l$  i powierzchnia błony komórkowej  $n$  jednostkę objętości układu a praktycznie nie zmieniają się z temperaturą [103, 104]. Z powyższego wynika, że o zmianach  $k_s$  decydują zmiany współczynnika dyfuzji  $D_m$ . Proces dyfuzji fizycznej w cieczach charakteryzuje się znacznie niższymi wartościami energii aktywacji, niż uzyskane w niniejszej pracy i mogłoby to sugerować inny, niż dyfuzyjny, charakter procesu przenoszenia  $H_2O_2$  przez błonę komórkową. Należy jednak uwzględnić, że wyznaczona tutaj energia aktywacji odnosi się do dyfuzji w błonie komórkowej, której podstawową strukturę stanowi podwójna warstwa lipidowa występująca w postaci ciekłego kryształu lub żelu [105]. Liczne badania nad dyfuzją w błonach komórkowych [104, 106 - 108] i układach modelowych (błony zastępcze, błony czarne, liposomy) [109 - 114] wykazały, że typowe wartości energii aktywacji mieszczą się w zakresie od 40 kJ/mol do 100 kJ/mol i są zbliżone do energii aktywacji procesu dyfuzji w polimerach [104, 113]. Uzyskana przez autora wartość energii aktywacji ( $E_3 = 74,3$  kJ/mol) mieści się w tym zakresie.



Rys.23. Zależność ilości rozłożonego  $H_2O_2$  od  $\lg S$ :  
 (—) katalaza w komórce,  
 (- - -) katalaza uwolniona z komórki

## 7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Opracowano metodę badania kinetyki rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę uwolnioną z komórki, polegającą na jednoczesnej analizie obydwu występujących procesów: reakcji enzymatycznej i dezaktywacji enzymu substratem.

2. Wykonano doświadczenia w reaktorze okresowym dla szerokiego zakresu stężeń początkowych  $H_2O_2$  (od  $0,005 \text{ kmol/m}^3$  do  $0,4 \text{ kmol/m}^3$ ) i stwierdzono, że reakcja rozkładu  $H_2O_2$  oraz towarzysząca jej dezaktywacja katalazy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przebiegają według równań kinetycznych o postaci równania Michaelisa-Menten ze stałymi  $K_m$  i  $K_d$ , których wartości różnią się między sobą. Uzyskano bardzo dobrą zgodność wartości  $K_m$  z danymi literaturowymi określonymi przy zastosowaniu elektrody tlenowej.

3. Przeprowadzono analizę opisanych w literaturze mechanizmów reakcji rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę i stwierdzono, że jedynie mechanizm Jonesa i Suggesta [45] jest zgodny z wynikami doświadczalnymi.

4. Zaproponowano dwustopniowy mechanizm dezaktywacji katalazy substratem, który prowadzi do równań kinetycznych reakcji i dezaktywacji o postaci równania Michaelisa-Menten ze stałymi spełniającymi warunek  $K_m \neq K_d$ .

5. Stwierdzono, że dla stężeń  $H_2O_2$  mniejszych od  $0,01 \text{ kmol/m}^3$  można stosować dla obydwóch procesów równania kinetyczne pierwszego rzędu w odniesieniu do stężenia substratu i enzymu. Opracowano metodę analizy danych kinetycznych dla tego zakresu, która pozwala na wyznaczenie stałej szybkości reakcji i stałej szybkości dezaktywacji na podstawie jednego doświadczenia.

6. Zaproponowano i sprawdzono doświadczalnie model matematyczny opisujący rozkład  $H_2O_2$  przez katalazę znajdującą się w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Model matematyczny ujmuje następujące procesy: reakcję enzymatyczną, dezaktywację enzymu i dyfuzję substratu przez błonę komórkową.

7. Stwierdzono, że szybkość dezaktywacji katalazy w komórkach przebiega od okóło trzech (dla  $S \ll K_{dk}$ ) do dziesięciu (dla  $S \gg K_{dk}$ ) razy wolniej, niż katalazy uwolnionej z komórek. Natomiast ilość  $H_2O_2$  rozłożonego przez jednostkę enzymu w komórkach jest od dwóch do czterech razy większa od ilości  $H_2O_2$  rozłożonego przez jednostkę enzymu, który uwolniono z komórek.



## 8. LITERATURA

- [1] Danehy J.P., Wolnak B. (red.): *Enzymes the Interface between Technology and Economics*, Marcal Dekker Inc., New York 1980
- [2] Poulsen P.B.: *Biochem. Genet. Eng. Rev.*, 1, 121 (1984)
- [3] Chibata I., Tosa T., Fujimura M.: *Annu. Rep. Ferment. Processes*, 6, 1 (1983)
- [4] Wójcik M.: *Problemy reaktorów do prowadzenia procesów z unieruchomionymi mikroorganizmami. Mat. Ogólnokrajowej Sesji Naukowej Postępy w Inżynierii Bioreaktorowej*, Łódź 1983, s. 161
- [5] Waetall H.W., Pitcher W.H.: *Science*, 232, 1396 (1986)
- [6] Wójcik M.: *Deactivation of Biological Catalyst: A Method for Determining the Intrinsic Deactivation Rate Constant. 4th Symposium of Socialist Countries on Biotechnology*, Warna 1986
- [7] Wójcik M.: *AIChE J.*, 34, 692 (1988)
- [8] Wójcik M.: *Wyznaczenie współczynnika dyfuzji efektywnej w katalizatorze biologicznym. Mat. III Ogólnokrajowej Sesji Naukowej Postępy w Inżynierii Bioreaktorowej*, Łódź 1987, s. 186
- [9] Furusaki S., Seki M.: *J. Chem. Eng. Japan*, 18, 389 (1985)
- [10] Schmid R.D.: *Proc. Biochem.*, 14, 2 (1979)
- [11] Reed G. (red.): *Enzymes in Food Processing*, Academic Press, New York 1975
- [12] Hartmeier W., Tegge G.: *Starch/Staerke*, 31, 348 (1979)
- [13] Hartmeier W.: *Starch/Staerke*, 33, 97 (1981)
- [14] Pat. jap. 60 083 579 (1985)
- [15] Pat. jap. 58 101 690 (1983)
- [16] Doepfner T., Hartmeier W.: *Starch/Staerke*, 36, 283 (1984)
- [17] Hartmeier W., Doepfner T.: *Biochem. Lett.*, 5, 743 (1983)
- [18] Coudero R., Baratti J.: *Biochem. Biophys. Acta*, 22, 1155 (1980)
- [19] Deisseroth A., Dounce A.L.: *Physiol. Rev.*, 50, 319 (1970)
- [20] Boyer P.L. (red.): *The Enzymes. T. 13*. Academic Press, New York 1976
- [21] Chance B., Sieh M., Boveris A.: *Physiol. Rev.*, 59, 527 (1979)
- [22] Kremer M.L.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 79, 2125 (1983)
- [23] Jonea P., Dumford H.B.: *J. Theor. Biol.*, 69, 457 (1983)

- [24] Chance B.: *Acta Chem. Scand.*, 1, 236 (1947)
- [25] Chance B., Greenstein D.S., Roughton F.J.W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 37, 301 (1952)
- [26] Zidoni E., Kremer M.L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 161, 658 (1974)
- [27] Kremer M.L., Baer S.: *J. Phys. Chem.*, 78, 1919 (1974)
- [28] Maehly A.C., Chance B.: *Methods Biochem. Anal.*, 1, 357 (1952)
- [29] Chance B., Maehly A.C.: *Methods Enzymol.*, 2, 764 (1955)
- [30] Kaplan J.G.: *J. Colloid Sci.*, 7, 382 (1952)
- [31] Beers R.F., Sizer I.W.: *Science*, 117, 710 (1955)
- [32] Rorth M., Jensen P.K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 171 (1967)
- [33] Ibrahim M.: *Praca doktorska, Uniwersytet w Getyndze, Getynga 1979*
- [34] Beers R.F., Sizer I.W.: *Anal. Chem.*, 25, 1137 (1953)
- [35] Bergmeyer H.V.: *Biochem. Z.*, 327, 255 (1955)
- [36] Cohen G., Dembiec D., Marcus J.: *Anal. Biochem.*, 34, 30 (1970)
- [37] Warburg O., Krippahl G.: *Z. Naturforschung*, 186, 340 (1963)
- [38] Pilz W., Johann J.: *Z. Anal. Chem.*, 210, 358 (1965)
- [39] Keston A.S., Brandt R.: *Anal. Biochem.*, 11, 1 (1965)
- [40] Bonnichsen R.K., Chance B., Theorell H.: *Acta Chem. Scand.*, 1, 685 (1947)
- [41] Brill A.S., Williams R.J.P.: *Biochem. J.*, 78, 253 (1961)
- [42] Jones P., Suggett A.: *Biochem. J.*, 108, 833 (1968)
- [43] Aebi H.: *Methods Enzymol.*, 105, 121 (1984)
- [44] Ogura Y.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 57, 288 (1955)
- [45] Jones P., Suggett A.: *Biochem. J.*, 110, 617 (1968)
- [46] Goldstein D.B.: *Anal. Biochem.*, 24, 431 (1968)
- [47] Rio L.A.D. i inni: *Anal. Biochem.*, 80, 409 (1977)
- [48] Ibrahim M., Schlegel H.G.: *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1895 (1980)
- [49] Chance B.: *J. Biol. Chem.*, 194, 471 (1952)
- [50] Strother G.K., Ackerman E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 317 (1961)
- [51] Chance B., Herbert B.: *Biochem. J.*, 46, 402 (1950)
- [52] Beers R.F., Sizer I.W.: *J. Biol. Chem.*, 195, 133 (1952)
- [53] Cyperowicz A.S.: *Enzymy Podstawy Chemii i Technologii*, WNT, Warszawa 1974
- [54] Alba S., Humphrey E.A., Millis N.F.: *Inżynieria biochemiczna*, WNT, Warszawa 1977
- [55] Filipowicz B., Więckowski J.: *Biochemia. T. 1.* PWN, Warszawa 1983

- [56] Sizer I.W.: J. Biol. Chem., 154, 461 (1944)
- [57] Chance B.: Biochem. J., 46, 387 (1950)
- [58] Keilin D., Hartree E.F.: Biochem. J., 49, 88 (1951)
- [59] Chance B.: Arch. Biochem. Biophys., 41, 404 (1952)
- [60] Scott D., Hammer F.: Enzymology, 22, 229 (1960)
- [61] Altomare R.E., Greenfield P.F., Kittrell J.R.: Biotechnol. Bioeng., 16, 1675 (1974)
- [62] Balcon J. i inni: Proc. Biochem., 6, 42 (1971)
- [63] Wang S.S. i inni: J. Food Sci., 39, 338 (1974)
- [64] Chu H.D., Leeder J.G., Gilbert S.G.: J. Food Sci., 40, 641 (1975)
- [65] Geerge P.: Nature, 160, 41 (1947)
- [66] O'Neill S.P.: Biotechnol. Bioeng., 14, 201 (1972)
- [67] Wójcik M.: Enzymatyczny rozkład nadtlenu wodoru. Mat. IV Seminarium Inżynieria Reaktorów Chemicznych, Warszawa 1983, s. 386
- [68] Wójcik M.: Inż. Chem. i Proc., 8, 149 (1987)
- [69] Altomare R.E. i inni: Biotechnol. Bioeng., 16, 1659 (1974)
- [70] Tai N.M., Greenfield P.F.: Biotechnol. Bioeng., 23, 805 (1981)
- [71] Tai N.M., Greenfield P.F.: Chem. Eng. J., 16, 89 (1978)
- [72] Do D.D., Greenfield P.F.: Chem. Eng. J., 27, 99 (1983)
- [73] Do D.D.: Chem. Eng. J., 28, B51 (1984)
- [74] Do D.D., Hossain M.M.: Biotechnol. Bioeng., 28, 486 (1986)
- [75] Tse P.H.S., Gough D.A.: Biotechnol. Bioeng., 29, 705 (1987)
- [76] Lück H.: Biochem. Z., 329, 165 (1957)
- [77] Miller H.: Biochem. J., 68, 275 (1958)
- [78] Boyer P.D., Lardy H., Myrback K. (red.): The Enzymes. T. 8. Academic Press, New York 1963
- [79] Do D.D., Weiland R.H.: Biotechnol. Bioeng., 22, 1087 (1980)
- [80] Few A.V., Fraser M.J., Gilby A.R.: Biochim. Biophys. Acta, 24, 306 (1957)
- [81] Clayton R.K.: Biochim. Biophys. Acta, 36, 35 (1959)
- [82] Bhuvaneshwaran C., Sreenivasan A., Rege D.V.: Enzymologia, 23, 185 (1961)
- [83] Sulebe G.A., Rege D.V.: Enzymologia, 33, 345 (1967)
- [84] D'Souza S.F., Nadkarni G.B.: Biotechnol. Bioeng., 22, 2191 (1980)
- [85] Sels A.A., Brygier J.: Eur. J. Biochem., 112, 283 (1980)

- [86] Stein W.D.: *The Movement of Molecules Across Cell Membranes*, Academic Press, New York 1967
- [87] Kotyk A., Janacek K.: *Cell Membrane Transport: Principles and Technique*, Plenum Press, New York 1975
- [88] Bailey J.E., Ollis D.F.: *Biochemical Engineering Fundamentals*, Mc Graw Hill Inc., New York 1977
- [89] Ota A.: *Int. J. Biochem.*, 14, 111 (1982)
- [90] Kaplan J.G.: *Nature*, 196, 950 (1962)
- [91] Nikclskaja E.A., Sinjavskaja O.I.: *Mikrobiol. žur. (Kijów)*, 46, 83 (1984)
- [92] Beveridge G.S.G., Schechter R.S.: *Optimization: Theory and Practice*. Mc Graw Hill Inc., New York 1970
- [93] Wójcik M.: *Deactivation of Yeast Catalase by Hydrogen Peroxide*. 8th International Congress ChISA, Praga 1984
- [94] Wójcik M.: *Dezaktywacja katalazy drożdży przez nadtlenuk wodoru*. Mat. II Ogólnokrajowej Sesji Naukowej Postępy w Inżynierii Bioreakcyjnej, Łódź 1985, s. 277
- [95] Nelder J.A., Mead R.: *Computer J.*, 7, 308 (1965)
- [96] Mansfeld J., Schellenberger A.: *Acta Biotechnol.*, 6, 89 (1986)
- [97] Sadana A., Henley J.P.: *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 256 (1986)
- [98] Ulbrich R., Schellenberger A., Damereu W.: *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 511 (1986)
- [99] Gianfreda L. i inni: *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 877 (1985)
- [100] Rakitzis E.T.: *Biochem. J.*, 223, 259 (1984)
- [101] Zale S.E., Klibancv A.M.: *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2221 (1983)
- [102] Wójcik M.: *Kinetics of Yeast Catalase Deactivation by Hydrogen Peroxide*. Proc. 4th European Congress on Biotechnology, Elsevier Science Publishers BV., Amsterdam 1987, t. 2, s. 84
- [103] Sada E., Katoh S., Terashima M.: *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 317 (1983)
- [104] Stein W.D.: *New Comprehensive Biochemistry*. T. 2. Elsevier, Amsterdam 1981
- [105] Aloia R.C. (red.): *Membrane Fluidity in Biology*, Academic Press, New York 1983
- [106] De Bruijne A.W., van Steveninck J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 211, 555 (1970)
- [107] Mc Elhaney R.N., De Gier J., van der Neut - Kok E.C.M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 298, 500 (1973)
- [108] Mild K.H., Lovtrup S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 822, 155 (1985)

- [109] De Gier J., Mandersloot J.G., van Deenen L.L.M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 150, 666 (1968)
- [110] Papahadjopoulos D., Nir S., Ohki S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 266, 561 (1971)
- [111] De Gier J. i inni: *Biochim. Biophys. Acta*, 233, 610 (1971)
- [112] Inoue K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 339, 390 (1974)
- [113] Haran N., Shoper M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 426, 638 (1976)
- [114] Sado E. i inni: *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1 (1986)
- [115] Fox D., Labes M.M., Weissberger A. (red.): *Physics and Chemistry of the Organic Solid State*. John Wiley, New York 1965



KINETICS OF CATALASE DEACTIVATION OF YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE  
BY HYDROGEN PEROXIDE

Summary

Decomposition of hydrogen peroxide by catalase in yeast cells and isolated from them was studied. A mathematical model has been developed. The model considers chemical reaction and deactivation of the enzyme by substrate in a system containing isolated catalase. It was found experimentally that both chemical reaction and deactivation followed Michaelis-Menten rate equation but constants  $K_m$  and  $K_d$  were not of the same values.

Decomposition of hydrogen peroxide by catalase in yeast cells was described by a mathematical model which incorporated the following processes: diffusion of substrate by the cell wall, chemical reaction and deactivation of the enzyme. The model was verified experimentally for a wide range of hydrogen peroxide concentration (from  $0.005 \text{ kmol/m}^3$  to  $0.8 \text{ kmol/m}^3$ ). It was found that deactivation rate of catalase in the cells was from 3 to 10 times slower than that for isolated enzyme.

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ДЕЗАКТИВАЦИИ КАТАЛАЗЫ ДРОЖЖЕЙ  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА

Резюме

Исследовали разложение перекиси водорода каталазой, находящейся внутри клеток дрожжей, а также после её освобождения. Процесс с участием освобождённой из клеток каталазы был представлен в виде математической модели, которая выражает химическую реакцию и дезактивацию фермента исходным веществом. Экспериментально было доказано, что химическая реакция как и дезактивация протекают по кинетическим уравнениям, похожим на уравнение Михаэлиса-Ментен с постоянными  $K_m$  и  $K_d$ , разными по значениям.

Разложение перекиси водорода каталазой, находящейся в клетках дрожжей, было представлено в виде математической модели, включающей следующие процессы: диффузию исходного вещества через плёнку клетки, химическую реакцию и дезактивацию фермента. Была проведена экспериментальная проверка модели в широких пределах концентраций перекиси водорода /от  $0,005 \text{ кмоль/м}^3$  до  $0,8 \text{ кмоль/м}^3$ /. Доказано, что дезактивация каталазы внутри клеток дрожжей проходит от трёх до десяти раз медленнее, чем после её освобождения.



Biblioteka Główna ATF  
w Bydgoszczy

73079

ISSN 0209-0597