

MAŁGORZATA M. JAWORSKA

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Modelowanie bioreaktora okresowego do enzymatycznej deacetylacji chitozanu

Wprowadzenie

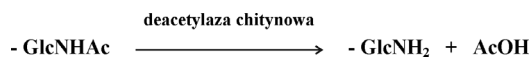
Reaktor okresowy jest wygodnym układem do prowadzenia reakcji z wykorzystaniem natywnych enzymów. Najczęściej, w przypadku prostych reakcji enzymatycznych opisywanych z wykorzystaniem modelu *Michaelis-Menten*, zmiany stężenia substratu w reaktorze przedstawiane są zależnością:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{k_{cat} E_0 S}{K_M + S} \quad (1)$$

która po scałkowaniu przyjmuje postać:

$$t = \frac{1}{k_{cat} E_0} \left[K_M \ln \frac{S_0}{S} + (S_0 - S) \right] \quad (2)$$

Stopień skomplikowania opisu zależności jednak będzie bardzo silnie od uwzględnienia dodatkowych efektów zachodzących w układzie takich jak np. inhibicja czy dezaktywacja termiczna enzymu.



Deacetylaza chitynowa jest enzymem, który hydrolizuje wiązania między grupą acetylową a grupą aminową w merach N-acetyloglukozaminy przekształcając je do glukozaminy.

Reakcja ta ma znaczenie w procesie enzymatycznej deacetylacji chitozanu. Daje ona możliwość modyfikowania stopnia acetylacji polimeru bez zmiany jego masy cząsteczkowej, co nie jest możliwe w przypadku deacetylacji chemicznej. Stwierdzono jednak, że uwalniany w procesie kwas octowy jest inhibitorem dla deacetylazy chitynowej [1, 2]; mechanizm tej inhibicji nie został dotychczas opisany. Dodatkowo wykazano także, że deacetylaza chitynowa może ulegać dezaktywacji termicznej w trakcie długotrwałego prowadzenia procesu [3–5].

Celem prezentowanej pracy było porównanie modelu enzymatycznej deacetylacji chitozanu przy i bez uwzględnienia inhibicji produktem oraz dezaktywacji termicznej z danymi doświadczalnymi uzyskanymi w reaktorze okresowym.

Materiały i metody

Deacetylaza chitynowa – grzyby strzępkowe *Absidia orchidis vel coerulea* NCAIM F 0642 namnażano w zmodyfikowanej pożywce YPG [6] w bioreaktorze *Biostat ED* (7.0 L podłoża, temp. 27°C), a następnie wydzielano z roztworu, przemywano wodą destylowaną i homogenizowano, stałą pozostałość odrzucono zaś roztwór wysycono siarczanem amonu (80%) i przechowywano przez noc w temperaturze 4–10°C. Po odwirowaniu wysolonych białek (6 000 obr/min, 15 min, 4°C), roztwór dializowano względem HCl (pH 4.0, moduł o *cut-off*

10 kDa) i zateżano przez ultrafiltrację (moduł o *cut-off* 10 kDa). Stężenie enzymu w roztworze HCl pH 4.0 wynosiło 41,09 mg/L

Chitozan – w doświadczeniu stosowano chitozan średnicząsteczkowy o stopniu acetylacji 39,7% stanowiący darowiznę *Mahtani-Gilett-Chitosan* (Indie). Stężenie chitozanu w roztworze wynosiło 5.0 g/L co odpowiadało stężeniu merów N-acetyloglukozaminy 11.13 mmol/L

Układ doświadczalny – Wszystkie doświadczenia prowadzono w termostатовanym reaktorze (1300 mL) wyposażonym w mieszadło magnetyczne. W reaktorze umieszczano 1000 mL roztworu chitozanu w HCl o pH 4.0 i mieszając (250–300 obr/min) termostатовano przez 30 min w temperaturze 50°C. Reakcję inicjowano dodając 50 mL roztworu enzymu preinkubowanego w 50°C przez 10 min. W odpowiednich odstępach czasu (co 10–20 min) pobierano próbki roztworu; reakcja enzymatyczna zatrzymywana była przez dodanie 0,1 mL 1 M NaOH. Wytrącony chitozan usuwano poprzez wirowanie, a w klarownym roztworze oznaczano stężenie kwasu octowego

Metody analityczne

Stężenie białka oznaczano kolorymetryczną metodą *Bradforda*.

Stężenie kwasu octowego oznaczano metodą chromatograficzną [7].

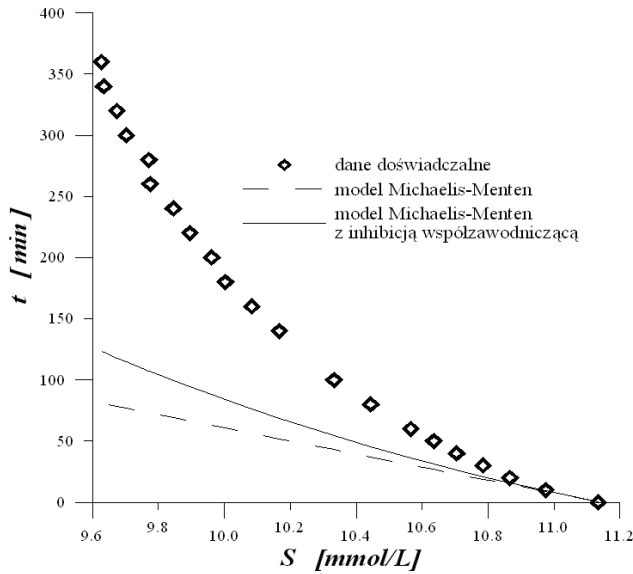
Wyniki doświadczeń

Doświadczenia prowadzono w reaktorze okresowym przez 6 godzin. Zmiany stężenia kwasu octowego przeliczono na zmiany stężenia merów N-acetyloglukozaminy (reakcja jest równomolowa), a następnie przedstawiono w postaci zależności *S od t*. Dane doświadczalne porównano następnie z modelem prostej reakcji enzymatycznej. Parametry w równaniu *Michaelis-Menten* wyznaczono w niezależnych doświadczeniach metodą szybkości początkowej: $k_{cat} = 11,21$ 1/min, $K_M = 2,45$ mmol/L, (Rys. 1).

Porównanie danych doświadczalnych z modelem wskazuje na wyraźne znaczne różnice wynikające z braku uwzględnienia inhibicji produktem. W niezależnych badaniach (metoda *Dixona*) stwierdzono, że kwas octowy jest inhibitorem współzawodniczącym, zaś stała inhibicji ma wartość $K_i = 0,286$ mmol/L. Scałkowana zależność bilansowa będzie zatem miała postać:

$$t = \frac{1}{k_{cat} E_0} \left[K_M \left(1 + \frac{S}{K_i} \right) \ln \frac{S_0}{S} + \left(1 - \frac{S}{K_i} \right) (S_0 - S) \right] \quad (3)$$

Dane modelowe wskazują na lepszą zgodność z danymi doświadczalnymi (Rys. 1), jednak i w tym przypadku nie jest ona zadowalająca. Przyczyną tego może być brak uwzględnie-



Rys. 1. Porównanie danych doświadczalnych z proponowanymi modelami

nia dodatkowo dezaktywacji termicznej deacetylazy chitynowej. Równanie bilansowe uwzględniające dezaktywację termiczną enzymu ma następującą postać:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{k_{cat}E(t)S}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S} \quad (4)$$

W niezależnych badaniach stwierdzono, że dezaktywacja termiczna nie jest zgodna z modelem pierwszorzędowym, lecz może być opisana modelem trójparametrycznym *Aymarda* i *Belarbi* [8]:

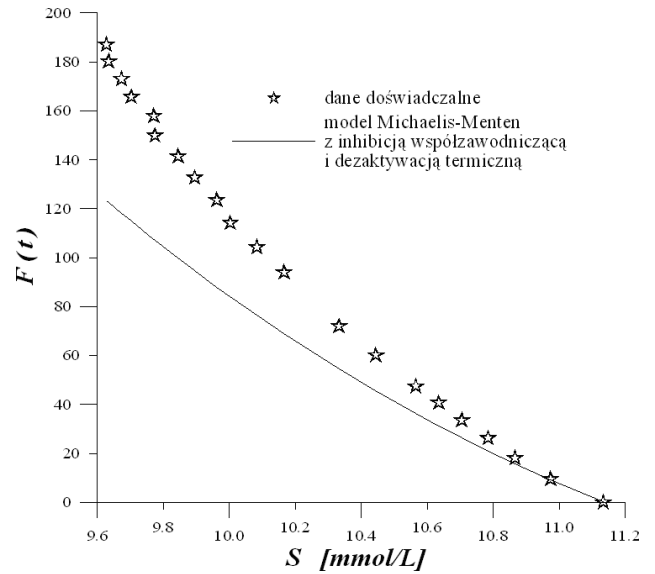
$$\frac{E(t)}{E_0} = 0,6862 \exp(-0,00197t) + (1 - 0,6862) \exp(-0,0309t) \quad (5)$$

Zatem scałkowane równanie bilansowe przyjmuje postać:

$$F(t) = \frac{1}{k_{cat}E_0} \left[K_M \left(1 + \frac{S}{K_i}\right) \ln \frac{S_0}{S} + \left(1 - \frac{K_M}{K_i}\right) (S_0 - S) \right] \quad (6)$$

gdzie:

$$F(t) = 358,47 - 348,31 \exp(0,00197t) - 10,16 \exp(-0,0309t) \quad (7)$$



Rys. 2. Porównanie danych doświadczalnych z zaproponowanym modelem

Wykreślając zależność $F(t)$ vs S możemy porównać dane doświadczalne z modelem uwzględniającym zarówno inhibicję produktem jak i dezaktywację termiczną enzymu, (Rys. 2). W tym przypadku uzyskano najlepszą zgodność danych doświadczalnych z danymi modelowymi. Przedstawione wyniki wskazują także, że wpływ dezaktywacji termicznej deacetylazy chitynowej na proces deacetylacji chitozanu jest istotniejszy niż wpływ inhibicji kwasem octowym.

LITERATURA

1. D. Kafetzopoulos, A. Martinou, V. Bouriotis: Proc Nat Acad Sci USA, **90**, 2564 (1993).
2. K. Tokuyasu, M. Ohnishi-Kameyama, K. Hayashi: Biosci Biotech Biochem, **30**, 239 (1996).
3. R.V.S. Amorim, W.M. Ledingham, K. Fukushima, G.M.J. Campos-Takaki: Ind. Microbiol. Biotechnol. **32**, 19 (2005).
4. I. Kołodziejska, M. Malesa-Ciećwierz, A. Lerska, Z. Sikorski: J Food Biochem. **23**, 45 (1999).
5. A. Martinou, D. Kafetzopoulos, V. Bouriotis: Carbohydrate Res., **273**, 235 (1995).
6. M.M. Jaworska, E. Konieczna: Appl. Microbiol. Biotechnol, **56**, 220 (2001).
7. M.M. Jaworska, J. Bryjak, J. Liesiene: Cellulose **16**, 261 (2009).
8. Ch. Aymard, A. Belarbi: Enz Microb Tech, **27**, 642 (2000).