

Ireneusz GRUBECKI

e-mail: ireneusz.grubecki@utp.edu.pl

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

Wpływ błony komórkowej na optymalne profile temperatury w procesie biotransformacji z równoległą dezaktywacją wewnątrzkomórkowego enzymu

Wstęp

Dobór optymalnej metody sterowania jest jednym z najistotniejszych zagadnień praktycznych w procesach biotransformacji przebiegających w bioreaktorach zarówno okresowych jak i ciągłych. Szczególnie skomplikowane może okazać się sterowanie przebiegiem procesu w pierwszym z wymienionych typów bioreaktora, gdyż wiąże się ono z doбором takiego sterowania temperaturą, które przy danych warunkach procesowych maksymalizuje zysk ekonomiczny, stopień przemiany lub minimalizuje czas niezbędny do ich uzyskania [Aziz i Mujtaba, 2002].

Wspomniane procesy mogą być prowadzone w obecności enzymu natywnego lub całych komórek drobnoustrojów. Pomimo obniżonej selektywności szczególnie korzystny jest drugi z wymienionych sposobów biokatalizy, ponieważ naturalne środowisko zwiększa stabilność enzymu, spowalniając tym samym proces jego dezaktywacji. W takim jednak przypadku znacznie utrudnione są rozważania nad doбором warunków temperaturowych, gdyż zachodzi konieczność uwzględnienia zjawisk dyfuzyjnych podczas transportu substratu i produktu przez błonę komórkową. Szczególnie zaznacza się to podczas analizy procesu biotransformacji z dezaktywacją enzymu zależną od stężenia substratu (dezaktywacja równoległa). Przykładem takiego procesu jest rozkład nadtlenu wodoru w obecności komórek drobnoustrojów *Saccharomyces cerevisiae* [Grubecki, 2012].

Celem niniejszej pracy jest określenie optymalnego profilu temperatury oraz zmian współczynnika efektywności dla reakcji rozkładu nadtlenu wodoru przebiegającej w reaktorze okresowym w obecności wewnątrzkomórkowego enzymu ulegającego dezaktywacji równoległej i na tej podstawie dokonanie oceny wpływu błony komórkowej na przebieg procesu.

Model matematyczny

Przy formułowaniu modelu matematycznego dokonano identycznych założeń jak w pracy Grubeckiego [2012]. W sytuacji, gdy komórki mają ściany charakteryzujące się niską przepuszczalnością lub wykazują wysoką aktywność enzymu, po wprowadzeniu zmienionych bezwymiarowych $\bar{C}_i = C_i/C_{i0}$ ($i = E, S$) model matematyczny wraz z warunkami początkowym i końcowym przyjmuje postać

$$-\frac{d\bar{C}_S}{dt} = \eta(\bar{C}_E, Da) k'_R \bar{C}_E \bar{C}_S \quad (1a)$$

$$\bar{C}_S(t=0) = 1 \quad \bar{C}_S(t) = 0 = \bar{C}_{Sf}$$

$$-\frac{d\bar{C}_E}{dt} = \eta(\bar{C}_E, Da) k'_D \bar{C}_E \bar{C}_S \quad (1b)$$

$$\bar{C}_E(t=0) = 1 \quad \bar{C}_E(t=t_f) = \bar{C}_{Ef}$$

gdzie: v_R ($k'_R = v_R C_{E0}/K_M$), v_D ($k'_D = v_D C_{S0}/K_D$) oznaczają odpowiednio stałe szybkości reakcji i dezaktywacji, K_l oznacza stałą Michaelisa-Menten odpowiednio dla reakcji ($l = M$) i dezaktywacji ($l = D$), natomiast $\eta(\bar{C}_E, Da)$ oznacza współczynnik efektywności dla enzymu znajdującego się wewnątrz komórek [Illanes, 2008], który w tym wypadku wyraża następujący związek:

$$\eta(\bar{C}_E, Da) = (1 + Da(T) \cdot \bar{C}_E)^{-1} \quad (2)$$

przy czym $Da(T)$ oznacza zależną od temperatury liczbę Damkoehlera $Da(T) = k_R(T)C_{E0}/k_P(T)K_M$.

Wpływ temperatury na przebieg procesu wyrażają stałe szybkości reakcji k_R , dezaktywacji k_D oraz współczynnik przenikania masy przez błonę komórkową k_P opisane równaniem Arrheniusa.

Należy zaznaczyć, że analizowany mechanizm dezaktywacji może zostać odniesiony do innych enzymów współcześnie stosowanych w praktyce przemysłowej [Nazari i in., 2005].

Rozwiązanie modelu matematycznego

W praktyce przemysłowej typową jest sytuacja, w której pożądany proces prowadzi się od danych wartości początkowych stężenia substratu $\bar{C}_S(t=0) = \bar{C}_{S0}$ i aktywności biokatalizatora $\bar{C}_E(t=0) = \bar{C}_{E0}$ do zadanych z góry końcowych wartości tych zmiennych stanu $\bar{C}_{Sf}, \bar{C}_{Ef}$. Podejmując się realizacji takiego problemu dąży się do osiągnięcia warunków optymalnych, które stanowią najkorzystniejsze rozwiązanie sterowania procesem z punktu widzenia analizowanej funkcji celu. W rozważanym przypadku zostały one określone w oparciu o realizację zadania optymalizacji, które – jak poprzednio [Grubecki, 2012] – polegało na poszukiwaniu profilu temperatury $T_{stat}(t)$, który przy danych wartościach początkowych stężenia substratu $\bar{C}_S(t=0) = \bar{C}_{S0}$ i aktywności enzymu $\bar{C}_E(t=0) = \bar{C}_{E0}$ oraz zadanych odpowiednio wartościach końcowych tych zmiennych stanu \bar{C}_{Sf} i \bar{C}_{Ef} minimalizuje czas przebiegu procesu t_f .

W rozwiązaniu sformułowanego zadania wykorzystano klasyczną metodę rachunku wariacyjnego [Grubecki, 2012] prowadzącą wprost do równania różniczkowego opisującego stacjonarny profil temperatury. Rezultatem jej zastosowania w odniesieniu do analizowanego zagadnienia jest poniższe równanie

$$\frac{dT_{stat}(t)}{dt} = T^2 k_D \frac{R}{E_R} \frac{[1 + Da \bar{C}_E (\beta_1 + \beta_2 \cdot Da \bar{C}_E)]}{\{1 + Da \bar{C}_E [\beta_3 + Da \bar{C}_E (\beta_4 + \beta_5 \cdot Da \bar{C}_E)]\}} \quad (3)$$

gdzie:

$$\beta_1 = 2 \frac{E_D - E_P}{E_D - E_R} \quad \beta_2 = \frac{1}{2} \beta_1 - \frac{E_P - E_R}{E_D - E_R}$$

$$\beta_3 = \beta_1 \left(1 + \frac{1}{2} \frac{E_P}{E_R} \right) - \frac{E_P}{E_R} (\beta_2 - 1)$$

$$\beta_4 = 1 - \beta_1 + 2\beta_2 + 2 \frac{E_P}{E_R} \quad \beta_5 = \frac{1}{2} \frac{E_P}{E_R} \beta_1$$

Równ. (3), wraz z równaniami stanu (1) stanowi model matematyczny procesu prowadzonego przy stacjonarnie optymalnym profilu temperatury w obecności komórek drobnoustrojów zawierających aktywny enzym ulegający dezaktywacji zależnej od stężenia substratu. Z matematycznego punktu widzenia sformułowany problem stanowi dwupunktowe zagadnienie, które w swej ogólnej postaci może być rozwiązane jedynie przy użyciu metod numerycznych.

Opisuje on stacjonarnie optymalne sterowanie temperaturą w procesie rozkładu nadtlenu wodoru w obecności katalazy zawartej w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*.

Nieco dokładniejsza analiza wykazała, że podczas przebiegu rozważanego procesu biotransformacji powinny zostać uwzględnione ograniczenia temperaturowe: dolne T_{min} i górne T_{max} . W takiej sytuacji najistotniejszym etapem procedury optymalizacyjnej jest znalezienie wartości stężenia substratu $\bar{C}_{S,b1}$, aktywności biokatali-

zatora $\bar{C}_{E,b1}$ i odpowiadającego im czasu t_{b1} , przy których dolny odcinek izotermiczny $T = T_{\min}$ profilu ekstremalnego przechodzi w profil stacjonarny $T_{\text{stat}}(t)$ oraz analogicznych wartości $\bar{C}_{S,b2}, \bar{C}_{E,b2}, t_{b2}$, po osiągnięciu których profil stacjonarny przechodzi w górny odcinek izotermiczny $T = T_{\max}$. Procedurę wyznaczenia punktów przełączenia jak również konstrukcję optymalnego profilu temperatury omówiono wcześniej [Grubecki, 2012].

Analiza wyników

Jak już wspomniano warunki optymalne stanowią najkorzystniejsze rozwiązanie sterowania procesem z punktu widzenia czasu jego przebiegu. Zatem najistotniejszą częścią prowadzonych rozważań jest wyznaczenie optymalnego sterowania temperaturą, które zrealizuje sformułowany problem optymalizacyjny odniesiony do procesu rozkładu nadtlenu wodoru w obecności komórek mikroorganizmów *Saccharomyces cerevisiae* z aktywną katalazą. W tym celu wykorzystano dane eksperymentalne uzyskane podczas badań nad analizowanym procesem prowadzonych w temperaturze $T = 30^\circ\text{C}$ i przedstawione w tab. 1 [Grubecki, 2012].

Tab. 1. Parametry kinetyczne użyte w obliczeniach [Grubecki, 2012]

Parametr	Wartość
C_{S0}	0,01 kmol/m ³
E_R	4900 J/mol
E_D	61700 J/mol
E_P	74300 J/mol
$k_R C_{E0}$	$0.3 \cdot 10^{-4}$ kmol ² /(m ⁶ ·s)
k_D	$1.92 \cdot 10^{-4}$ 1/s
K_D	0,016 kmol/m ³
K_M	0,083 kmol/m ³

Obecność błony komórkowej wyraża współczynnik efektywności η (2) lub odpowiadająca mu liczba $Da(T)$ [Illanes, 2008]. Na podstawie jego definicji istnieje możliwość określenia współczynnika częstości k_{p0} , co prowadzi do następującego wyrażenia:

$$k_{p0} = \frac{\eta}{(1-\eta)} \frac{k_{R0} C_{E0}}{K_M} \bar{C}_E \exp\left(\frac{E_P - E_R}{RT^*}\right) \quad (4)$$

w którym T^* oznacza temperaturę standardową. Wartość $\eta \rightarrow 1$ ($Da \rightarrow 0$) odnosi się do przypadku, w którym opory dyfuzyjne nie wpływają na szybkość reakcji. Jest to równoważne sytuacji, w której zastosowano w procesie enzym natywny.

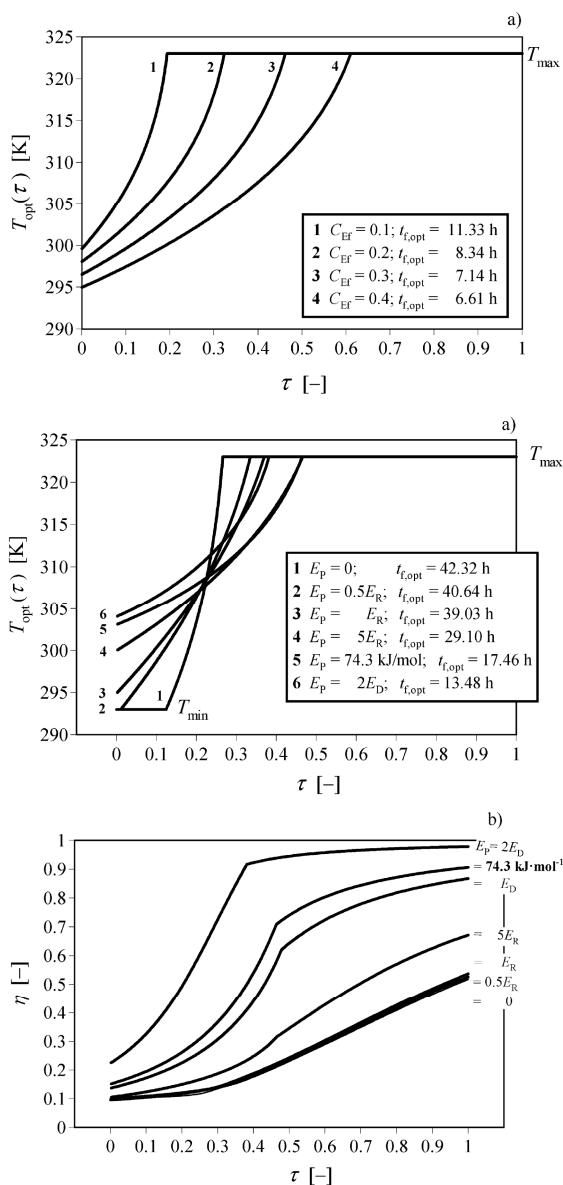
Jak wykazano [Grubecki, 2010], w procesach biotransformacji z równoległą dezaktywacją enzymu, w końcowej fazie procesu następują nagły wzrost temperatury, zazwyczaj znacznie przewyższający wartości dopuszczalne. W związku z tym do obliczeń wprowadzono typowy dla analizowanego układu zakres temperatur z dolną i górną jej wartością dopuszczalną równą odpowiednio:

$$T_{\min} = 293\text{ K} \quad \text{oraz} \quad T_{\max} = 323\text{ K}.$$

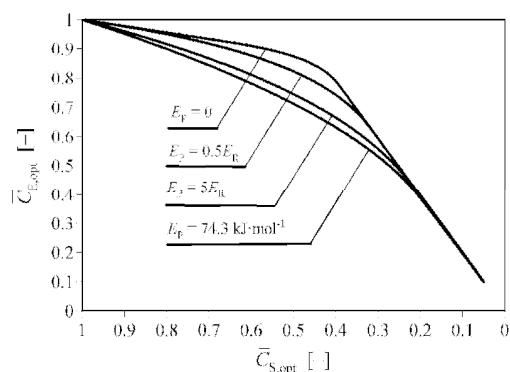
Rys. 1a i 1b obrazują odpowiednio optymalne profile temperatury oraz zmiany współczynnika efektywności dla wybranych wartości energii aktywacji przenikania przez błonę komórkową E_p . Wynika stąd, że im wyższa jest wartość energii aktywacji E_p , tym wyższa jest początkowa temperatura profilu optymalnego. W konsekwencji dolne ograniczenie temperaturowe staje się nieaktywne z jednoczesnym skróceniem części izotermicznej procesu na poziomie górnej temperatury dopuszczalnej $T = T_{\max}$ (Rys. 1a). Potwierdza to diagram fazowy przedstawiony na rysunku 2. Według niego, ze wzrostem E_p przebieg trajektorii $\bar{C}_{E,opt} = \bar{C}_E(\bar{C}_{S,opt}, E_p)$ zmierza do liniowego, co oznacza, że warunki temperaturowe dążą do izotermicznych.

Wraz ze zmianą temperatury zmianie ulega współczynnik efektywności η (Rys. 1b). Początkowo przyjmuje on stosunkowo niskie wartości. Zauważa się tutaj wpływ poszczególnych odcinków optymalnego profilu temperatury. Wzdłuż odcinka stacjonarnego, dla niższych wartości E_p , następuje łagodniejszy wzrost współczynnika η wzrastający coraz szybciej dla wartości wyższych. Wzdłuż odcinka izotermicznego zauważa się sytuację odwrotną. A mianowicie następuje szybszy wzrost wartości η w przypadku niższych wartości E_p oraz bardzo łagodny przebieg rosnący w przypadku niższych wartości E_p . Taka zmiana współczynnika efektywności jest konsekwencją spadku aktywności enzymu, w wyniku czego maleje szybkość reakcji dając w efekcie wyższe stężenie nadtlenu wodoru przy powierzchni komórek. W rezultacie współczynnik efektywności wzrasta.

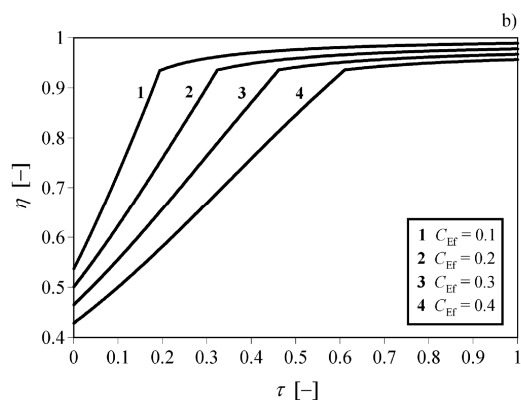
Przebieg procesu do osiągnięcia wyższych wartości końcowej aktywności enzymu \bar{C}_{E_f} skutkuje wydłużeniem odcinka stacjonarnego, co w efekcie daje redukcję czasu trwania $t_{f,opt}$ (Rys. 3a). W efekcie uzyskuje się łagodniejszy wzrost optymalnych profili temperatury (łagodniejszy spadek aktywności enzymu), a stąd wolniejszy wzrost współczynnika efektywności wzdłuż stacjonarnej części profilu optymalnego (Rys. 3b). Podobny efekt występuje w przypadku przebiegu procesu do osiągnięcia niższych stopni przemiany (Rys. 4).



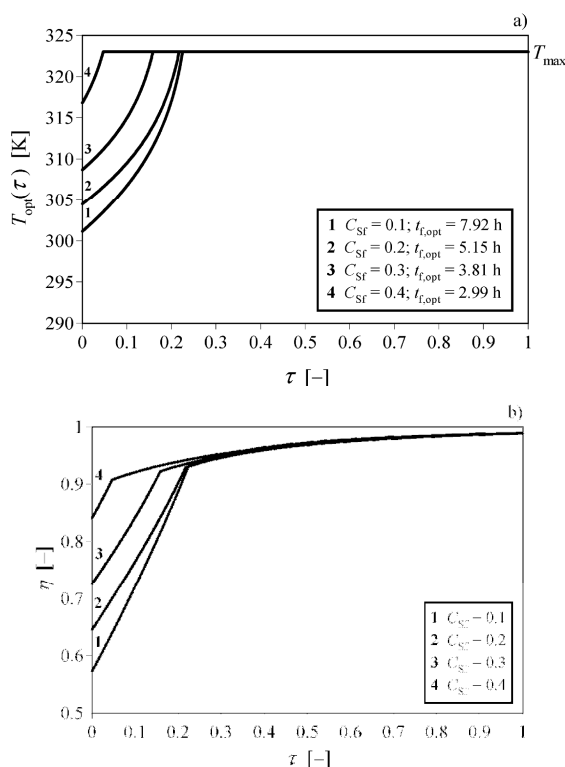
Rys. 1. Wpływ energii aktywacji przenikania przez błonę komórkową E_p na: a) optymalny profil temperatury, b) współczynnik efektywności biokatalizatora η dla ilorazu energii aktywacji $E = 12.6$ oraz dla $C_{E_f} = 0.1$ i $C_{S_f} = 0.05$.



Rys. 2. Diagram fazowy odpowiadający wybranym optymalnym profilom temperatury przedstawionym na rys. 1.



Rys. 3. Wpływ końcowej aktywności enzymu \bar{C}_{Ef} na a) optymalny profil temperatury, b) współczynnik efektywności biokatalizatora dla ilorazu energii aktywacji $E=12,6$, energii aktywacji przenikania przez błonę komórkową $E_p = 74,3 \text{ kJ/mol}$ oraz dla $\bar{C}_{Sf} = 0,05$.



Rys. 4. Wpływ końcowego stężenia substratu \bar{C}_{Sf} na a) optymalny profil temperatury, b) współczynnik efektywności biokatalizatora dla ilorazu energii aktywacji $E=12,6$, energii aktywacji przenikania przez błonę komórkową $E_p = 74,3 \text{ kJ/mol}$ oraz dla $\bar{C}_{Ef} = 0,1$.

Podsumowanie

Na przykładzie procesu rozkładu nadtlenu wodoru w obecności komórek *Saccharomyces cerevisiae* zawierających aktywną katalazę zaprezentowano analizę mającą na celu określenie optymalnego sterowania temperaturą ze szczególnym uwzględnieniem wpływu błony komórkowej. Wykazano przy tym, że podczas realizacji procesu konieczne jest uwzględnienie przynajmniej górnego ograniczenia temperaturowego $T = T_{max}$.

Zastosowanie mikroorganizmów w procesie biotransformacji spowalnia szybkość reakcji i sprawia, że początkowa temperatura procesu optymalnego zmierza ku wyższym wartościom, przez co nieaktywne staje się dolne ograniczenie temperaturowe. Wzrost początkowej temperatury jest tym bardziej znaczący im niższa jest przenikalność błony komórkowej. W konsekwencji czas przebiegu procesu wydłuża się.

OZNACZENIA

- C_i – aktywność enzymu ($i = E$),
stężenie substratu ($i = S$), $[\text{kmol}\cdot\text{m}^{-3}]$
- $\bar{C}_i = C_i / C_{i0}$ – bezwymiarowa aktywność enzymu ($i = E$),
bezwymiarowe stężenie substratu ($i = S$), [-]
- E_j – energia aktywacji dla dezaktywacji ($j = D$), reakcji ($j = R$)
i przenikania przez błonę komórkową ($j = P$), $[\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}]$
- $E = E_D / E_R$ – iloraz energii aktywacji, [-]
- k_j – stała szybkości dla dezaktywacji ($j = D$)
i dla reakcji ($j = R$), $[\text{m}^3 \cdot \text{kmol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
- k_{j0} – współczynnik częstości dla dezaktywacji ($j = D$)
i dla reakcji ($j = R$), $[\text{m}^3 \cdot \text{kmol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
- k_p – stała szybkości reakcji przenikania przez błonę kom., $[\text{h}^{-1}]$
- k_{p0} – współczynnik częstości dla przenikania przez błonę kom., $[\text{h}^{-1}]$
- t – czas chronologiczny, [h]
- T – temperatura, [K]
- $\tau = t / t_f$ – czas bezwymiarowy, [-]
- η – współczynnik efektywności enzymu w komórkach, [-]

INDEKSY DOLNE

- f – stan końcowy
- 0 – stan początkowy
- opt – optymalny
- $stat$ – stacjonarny

LITERATURA

- Aziz N., Mujtaba I. M., 2002. Optimal operation policies in batch reactors. *Chem. Eng. J.*, **85**, 313-325. DOI: 10.1016/S1385-8947(01)00169-3
- Faqir N. M., 2004. Optimization of operating temperature for a continuous immobilized glucose isomerase reactor with pseudo linear kinetics. *Eng. Life Sci.*, **4**, 450-459. DOI: 10.1002/elsc.200402079
- Grubecki, I., 2012. Analytical determination of the optimal temperature profiles for the reactions with parallel deactivation of enzyme encapsulated inside microorganisms cells. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **26**(1), 31-43
- Grubecki I., 2010. Optimal temperature control in a batch bioreactor with parallel deactivation of enzyme. *J. Process Contr.*, **20**, 573-584. DOI: 10.1016/j.jprocont.2010.02.009
- Illanes, A., 2008. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*, 1st ed., Springer Science+Business Media, Germany
- Nazari K., Mahmoudi A., Shahrooz M., Khodafarin R., Moosavi-Movahedi A.A., 2005. Suicide-peroxide inactivation of horseradish peroxidase in the presence of Sodium n-Dodecyl Sulphate: A study of the enzyme deactivation kinetics. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **20**, 285-292. DOI: 10.1080/14756360500042846