

Ireneusz GRUBECKI, Justyna MIŁEK, Ilona TRAWCZYŃSKA, Marek WÓJCIK

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

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

Optymalne sterowanie temperaturą w procesie rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę *Aspergillus niger* z uwzględnieniem termicznej dezaktywacji enzymu**Wstęp**

Temperatura jest jednym z najistotniejszych czynników wpływających na aktywność katalizatorów biologicznych prowadząc do ich dezaktywacji (dezaktywacja termiczna DT). Na proces ten składa się szereg reakcji nieodwracalnych (rozkład, agregacja i koagulacja) jak i odwracalnych (dysocjacja i denaturacja) [Mozhaev i Martinek, 1982]. Zatem proces dezaktywacji enzymu nie jest prostym procesem i może składać się z szeregu etapów prowadzących, od prostej formy aktywnej do końcowej (aktywnej lub nieaktywnej) przez szereg form pośrednich.

W wielu przypadkach aktywność enzymu jest jedynie eksponencjalną funkcją czasu, która uwzględnia całą złożoność tego procesu i mająca zastosowanie w przypadku wielu enzymów (Ricca i in., 2009; Mohaparta i in., 2008).

Należy zaznaczyć, że rozwiązania dotyczące optymalnego doboru temperatury w (bio)reaktorach z uwzględnieniem tego najprostszego modelu dezaktywacji są dość dobrze poznane, zarówno w odniesieniu do procesów chemicznych [Szwast i Sieniutycz, 2001] jak i procesów biotransformacji [Grubecki i Wójcik, 2012].

W literaturze można wskazać również takie enzymy, których dezaktywacja zależy nie tylko od temperatury, ale również od pH [Jurado i in., 2004], czy stężenia substratu. Szczególnie interesujący jest drugi z wymienionych mechanizmów dezaktywacji (dezaktywacja równoległa). Występuje on w procesie rozkładu nadtlenu wodoru zachodzącego w obecności katalazy [Horst i in., 2006]. Ten mechanizm dezaktywacji jest znacznie rzadziej spotykany w rozważaniach optymalizacyjnych. Natomiast brak jest w literaturze opracowań dotyczących optymalizacji procesów z uwzględnieniem zarówno dezaktywacji termicznej jak i dezaktywacji równoległej. Dezaktywacja termiczna nie powinna być pomijana w przypadku procesów z równoległą dezaktywacją biokatalizatora, przebiegających w zakresie niższych stężeń [Tse i Gough, 1987].

W niniejszej pracy, na podstawie procesu rozkładu nadtlenu wodoru przez natywną katalazę *Aspergillus Niger*, przeprowadzono analizę mającą na celu określenie optymalnego profilu temperatury z uwzględnieniem zarówno dezaktywacji substratem jak i dezaktywacji termicznej. Obliczenia przeprowadzono dla katalaz pozyskanych z *Sigma-Aldrich* (katalaza S-A) i *Novozymes* (katalaza N) (*Terminox Ultra 50L*).

Analizowany proces ma duże znaczenie praktyczne i zazwyczaj prowadzony jest izotermicznie w temperaturze powyżej 60°C, chociaż optymalną aktywność katalazy, podobnie jak dla większości enzymów, uzyskuje się w zakresie umiarkowanych temperatur (20÷50°C) [Horst i in., 2006].

Model matematyczny i jego rozwiązanie

Rozpatrzono reakcję rozkładu nadtlenu wodoru przez natywną katalazę *Aspergillus niger*, prowadzoną w reaktorze okresowym z idealnym wymieszaniem przy stężeniu substratu mniejszym od 0,02 kmol/m³. W takim przypadku stosowany enzym ulega dezaktywacji powodowanej zarówno przez substrat jak i przez temperaturę. W związku z tym model matematyczny procesu, po wprowadzeniu bezwymiarowych zmiennych stanu $\bar{C}_i = C_i/C_{i0}$ ($i = E, S$), można wyrazić za pomocą poniższych równań:

$$\frac{d\bar{C}_S}{dt} = -k_R^* \bar{C}_E \bar{C}_S = f(\bar{C}_E, \bar{C}_S, \Theta) \quad (1a)$$

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

$$\frac{d\bar{C}_E}{dt} = -k_{DS}^* \bar{C}_E \bar{C}_S - k_{DT} \bar{C}_E = g(\bar{C}_E, \bar{C}_S, \Theta) \quad (1b)$$

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

Wpływ temperatury na stałe szybkości reakcji k_R ($k_R^* = k_R C_{E0}$) oraz dezaktywacji k_{DS} ($k_{DS}^* = k_{DS} C_{S0}$) i k_{DT} opisuje równanie Arrheniusa

$$k_i = k_{i0} \exp\left(-\frac{E_i}{R} \Theta\right) \quad (i = DS, DT, R) \quad (2)$$

gdzie: $\Theta = T^{-1}$, natomiast E_{DT} , E_{DS} , E_R oznaczają odpowiednio energię aktywacji dezaktywacji termicznej, dezaktywacji substratem oraz reakcji.

Dla przeprowadzenia podjętej analizy niezbędne jest wyznaczenie pewnej temperatury, przy której możliwy jest przebieg procesu od stanu początkowego do określonego stanu końcowego. W związku z tym w dalszej części przeanalizowano proces prowadzony w warunkach izotermicznych oraz przy stacjonarnie optymalnym profilu temperatury.

Proces izotermiczny

Temperatura w procesie izotermicznym jest niezależna od czasu. Zatem jego eliminacja z równań stanu (1a) i (1b) oraz stosowne przekształcenia prowadzą do następującego wyrażenia opisującego poszukiwaną temperaturę

$$\frac{k_{DS}(\Theta) C_{S0}}{k_R(\Theta) C_{E0}} (1 - \bar{C}_{Sf}) - \frac{k_{DT}(\Theta)}{k_R(\Theta) C_{E0}} \ln \bar{C}_{Sf} = 1 - \bar{C}_{Ef} \quad (3)$$

w którym \bar{C}_{Sf} i \bar{C}_{Ef} oznaczają odpowiednio końcowe wartości stężenia substratu i aktywności enzymu.

Proces prowadzony przy stacjonarnie optymalnym profilu temperatury

Analiza temperaturowych warunków stacjonarnych dla reakcji rozkładu nadtlenu wodoru przeprowadzona była w pracy [Grubecki i Wójcik, 2012]. Zatem w przypadku rozważanym w niniejszej pracy w rozwiązaniu problemu posłużono się zadaniem optymalizacyjnym sformułowanym w analogiczny sposób.

Aby rozwiązać podjęty powyżej problem zastosowano procedurę opartą na metodzie [Grubecki, 2010], która wprost prowadzi do równania różniczkowego wycyzajnego opisującego poszukiwane sterowanie stacjonarnie optymalne

$$\frac{d\Theta}{dt} = \left[\frac{\partial f}{\partial \bar{C}_E} + X_Z \left(\frac{\partial f}{\partial \bar{C}_S} - \frac{\partial g}{\partial \bar{C}_E} \right) - X_Z^2 \frac{\partial g}{\partial \bar{C}_S} + \right. \\ \left. - g \frac{\partial X_Z}{\partial \bar{C}_E} - f \frac{\partial X_Z}{\partial \bar{C}_S} - \frac{\partial X_Z}{\partial t} \right] \cdot \left(\frac{\partial X_Z}{\partial \Theta} \right)^{-1} \quad (4)$$

gdzie:

$$X_Z = \frac{\partial f}{\partial \Theta} / \frac{\partial g}{\partial \Theta} = \left(\frac{E_D}{E_R} \frac{k_{DS}^*}{k_R^*} + \frac{E_{DT}}{E_R} \frac{k_{DT}}{k_R^*} \bar{C}_S^{-1} \right)^{-1}$$

$$\frac{\partial f}{\partial \bar{C}_E} = -k_R^* \bar{C}_S \quad \frac{\partial f}{\partial \bar{C}_S} = -k_R^* \bar{C}_E$$

$$\frac{\partial g}{\partial \bar{C}_E} = -k_{DS}^* \bar{C}_S - k_{DT} \quad \frac{\partial g}{\partial \bar{C}_S} = -(k_{DS}^* - k_{DT}) \bar{C}_E$$

$$\frac{\partial X_Z}{\partial \Theta} = \frac{E_R k_R^* \bar{C}_S [E_D k_D^* \bar{C}_S (E_D - E_R) + E_{DT} k_{DT} (E_{DT} - E_R)]}{R (E_D k_{DS}^* \bar{C}_S + E_{DT} k_{DT})^2}$$

$$\frac{\partial X_Z}{\partial \bar{C}_S} = \frac{E_R k_R^* E_{DT} k_{DT}}{(E_D k_{DS}^* \bar{C}_S + E_{DT} k_{DT})^2}$$

$$\frac{\partial X_Z}{\partial \bar{C}_E} = 0 \quad \frac{\partial X_Z}{\partial t} = 0$$

Należy zauważyć, że w przypadku, w którym wpływ dezaktywacji termicznej jest znikomy ($k_{DT} = 0$) równ. (4) prowadzi do wyrażenia (28c) prezentowanego wcześniej [Grubecki, 2010]. Zależność (4) wraz z równaniami stanu (1) stanowią model matematyczny procesu rozkładu nadtlenu wodoru o obecności katalazy prowadzonego przy stacjonarnie optymalnych warunkach temperaturowych.

Wyznaczenie optymalnych profili temperatury

Struktura optymalnych profili temperatury oraz dyskusja wpływu parametrów kinetycznych oraz podstawowych parametrów procesowych na ich przebieg w procesie rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę zostały omówione wcześniej [Grubecki i Wójcik, 2012]. Dyskusję zarówno poprzednią jak i niniejszą przeprowadzono w oparciu o badania eksperymentalne nad rozważanym procesem [Miłek, 2011]. W ich wyniku wyznaczono wartości podstawowych parametrów kinetycznych charakteryzujących proces rozkładu nadtlenu wodoru w obecności katalazy i przedstawionych w tab. 1.

Tab. 1. Parametry kinetyczne stosowanych katalaz

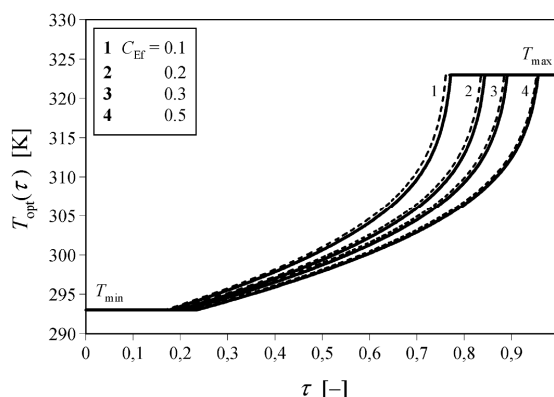
| Parametr | Wartość | |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Katalaza S-A | Katalaza N |
| C_{S0} [kmol·m ⁻³] | 0,015 | |
| E_R [kJ·mol ⁻¹] | 12,92 | 11,59 |
| E_{DS} [kJ·mol ⁻¹] | 152,7 | 44,83 |
| E_{DT} kJ·mol ⁻¹ | 116,0 | 140,9 |
| $k_{RO}C_{EO}$ [h ⁻¹] | $2,97 \cdot 10^3$ | $1,11 \cdot 10^3$ |
| k_{DS0} [m ³ ·kmol ⁻¹ ·h ⁻¹] | $2,27 \cdot 10^{27}$ | $8,06 \cdot 10^9$ |
| k_{DT0} [h ⁻¹] | $2,057 \cdot 10^{17}$ | $1,153 \cdot 10^{21}$ |
| T_{min} [K] | 293 | |
| T_{max} [K] | 323 | |

Na podstawie równań modelu matematycznego (1), (2) i (4) określono optymalne profile temperatury (Rys. 1-4) dla rozważanego procesu. Dodatkowo dla porównania zamieszczono w tab. 2 i 3 wartości funkcji celu $t_{f,opt}$ analizowanej w zadaniu optymalizacji z uwzględnieniem (Rys. 1-4, linia ciągła) i bez uwzględnienia (Rys. 1-4, linia przerywana) termicznej dezaktywacji katalazy S-A oraz katalazy N.

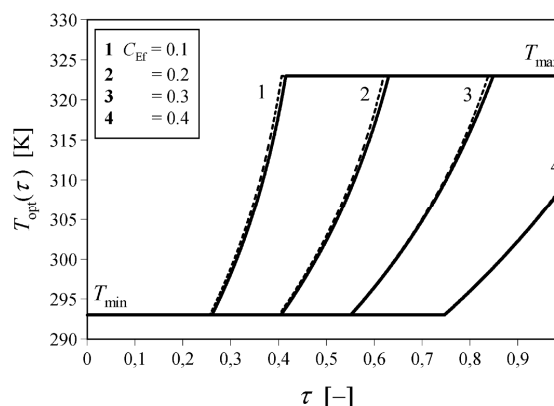
Ogólnie można stwierdzić, że przebiegi procesu zarówno do wyższych wartości końcowej aktywności enzymu \bar{C}_{Ef} (Rys. 1 i 2) jak i przy większej ilości użytego enzymu $k_{RO}C_{EO}$ (Rys. 3 i 4) powodują przebieg optymalnych profili temperatury w zakresie niższych wartości temperatur, tzn. skróceniu ulega przebieg procesu wzdłuż odcinka $T = T_{max}$, natomiast wydłużeniu część izotermiczna procesu w temperaturze $T = T_{min}$. Należy przy tym zauważyć, że różnice w przebiegach optymalnych profili temperatury dla obu rozważanych w pracy katalaz wynikają ze znacznej różnicy w wartościach energii aktywacji dla procesu ich dezaktywacji E_{DS} .

Z przebiegów optymalnych profili temperatury przedstawionych na rys. 1-4 wynika, że dezaktywacja termiczna zarówno katalazy S-A jak i katalazy N wywiera znikomy wpływ na ich przebieg. Stwierdzenie to potwierdzają wynikające stąd różnice w czasach przebiegu procesu $t_{f,opt}$ prowadzonego w warunkach optymalnych, które przyjmują wartości marginalne lub w ogóle nie występują (Tab. 1-3).

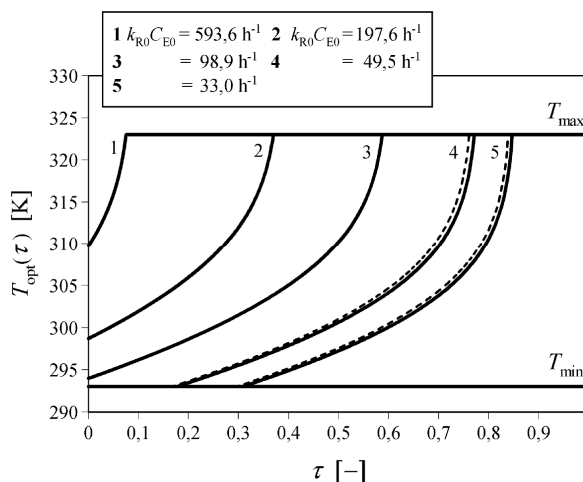
Pomijając dezaktywację termiczną katalazy wykazuje nieco wyższą aktywność w wyniku czego rozkład nadtlenu wodoru przebiega szybciej (krótszy czas $t_{f,opt}$).



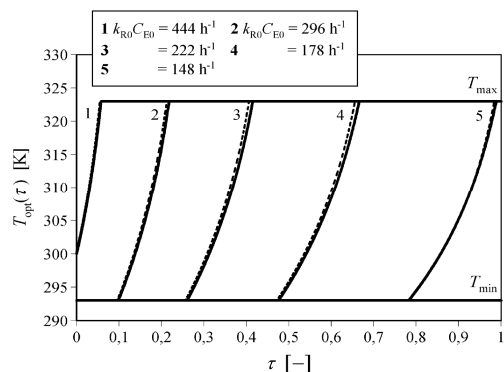
Rys. 1. Wpływ końcowej aktywności \bar{C}_{Ef} katalazy S-A na optymalne profile temperatury dla końcowego stężenia nadtlenu wodoru $\bar{C}_{Sf} = 0,1$ oraz $k_{RO}C_{EO} = 49,5 \text{ h}^{-1}$: linie ciągłe przedstawiają rozwiązanie modelu matematycznego (1) z uwzględnieniem termicznej dezaktywacji katalazy, natomiast linie przerywane z jej pominięciem ($k_{DT0} = 0$).



Rys. 2. Wpływ końcowej aktywności \bar{C}_{Ef} katalazy N na optymalne profile temperatury dla końcowego stężenia nadtlenu wodoru $\bar{C}_{Sf} = 0,1$ oraz $k_{RO}C_{EO} = 49,5 \text{ h}^{-1}$: linie ciągłe przedstawiają rozwiązanie modelu matematycznego (1) z uwzględnieniem termicznej dezaktywacji katalazy, natomiast linie przerywane z jej pominięciem ($k_{DT0} = 0$).



Rys. 3. Wpływ ilości dodanej katalazy S-A ($k_{RO}C_{EO}$) na optymalne profile temperatury dla końcowych wartości aktywności enzymu i stężenia nadtlenu wodoru wynoszących $\bar{C}_{Ef} = \bar{C}_{Sf} = 0,1$: linie ciągłe przedstawiają rozwiązanie modelu matematycznego (1) z uwzględnieniem termicznej dezaktywacji katalazy, natomiast linie przerywane z jej pominięciem ($k_{DT0} = 0$).



Rys. 4. Wpływ ilości dodanej katalazy N ($k_{R0}C_{E0}$) na optymalne profile temperatury dla końcowych wartości aktywności enzymu i stężenia nadtlenu wodoru wynoszących $\bar{C}_{Ef} = \bar{C}_{Sf} = 0,1$: linie ciągłe przedstawiają rozwiązanie modelu matematycznego (1) z uwzględnieniem termicznej dezaktywacji katalazy, natomiast linie przerywane z jej pominięciem ($k_{DT0} = 0$).

Znaczące różnice w czasach pomiędzy procesami prowadzonymi w obecności katalazy S-A oraz katalazy N wynikają ze znacznie słabszej aktywności katalazy N w porównaniu z katalazą S-A, która może zostać zrekompenzowana poprzez użycie tej pierwszej w zwiększonej ilości (wyższa wartość $k_{R0}C_{E0}$).

Tab. 2. Temperatura izotermicznego procesu rozkładu nadtlenu wodoru przez natywną katalazę w zależności od końcowej aktywności enzymu \bar{C}_{Ef} z uwzględnieniem i bez uwzględnienia dezaktywacji termicznej (DT) dla końcowego stężenia nadtlenu wodoru $\bar{C}_{Sf} = 0,1$.

| \bar{C}_{Ef} | Temperatura procesu izotermicznego T_{isot} (Równ. (3)) | | | |
|----------------|-----------------------------------------------------------|--------|------------|--------|
| | Katalaza S-A | | Katalaza N | |
| | DT | bez DT | DT | bez DT |
| 0,1 | 306,3 | | 302,6 | |
| 0,2 | 305,6 | | 300,0 | |
| 0,3 | 304,9 | | 297,0 | |
| 0,4 | 304,0 | | 293,6 | |
| 0,5 | 303,0 | | 289,7 | |

Tab. 3. Wartość czasu optymalnego w procesie rozkładu nadtlenu wodoru przez natywną katalazę w zależności od końcowej aktywności enzymu \bar{C}_{Ef} z uwzględnieniem i bez uwzględnienia dezaktywacji termicznej dla końcowego stężenia nadtlenu wodoru $\bar{C}_{Sf} = 0,1$.

| \bar{C}_{Ef} | Czas przebiegu procesu optymalnego $t_{f,opt}$, [h] | | | |
|----------------|------------------------------------------------------|--------|----------------------------------------|--------|
| | Katalaza S-A | | Katalaza N | |
| | DT | bez DT | DT | bez DT |
| 0,1 | 10,47 | 10,44 | 2,51 | 2,50 |
| 0,2 | 9,75 | 9,74 | 2,06 | 2,06 |
| 0,3 | 9,44 | 9,41 | 1,96 | 1,95 |
| 0,4 | 9,27 | 9,24 | 2,07 | 2,06 |
| 0,5 | 9,19 | 9,15 | proces izotermiczny przy $T = T_{min}$ | |

Tab. 4. Wartość czasu optymalnego w procesie rozkładu nadtlenu wodoru przez natywną katalazę w zależności od ilości użytego enzymu $k_{R0}C_{E0}$ z uwzględnieniem i bez uwzględnienia dezaktywacji termicznej dla końcowych wartości aktywności katalazy i stężenia nadtlenu wodoru wynoszących $\bar{C}_{Ef} = \bar{C}_{Sf} = 0,1$.

| $k_{R0}C_{E0}$ [h ⁻¹] | Czas przebiegu procesu optymalnego, [h] | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------------|--------|------------|--------|
| | Katalaza S-A | | Katalaza N | |
| | DT | bez DT | DT | bez DT |
| 593,6 | 1.60 | 1.59 | 444 | 1,44 |
| 197,6 | 3.26 | 3.24 | 296 | 1,92 |
| 98,9 | 5.61 | 5,58 | 222 | 2,51 |
| 49,5 | 10,47 | 10,44 | 178 | 3,48 |
| 33,0 | 15,64 | 15,63 | 148 | 6,11 |

Podsumowanie i wnioski

Podjęto próbę określenia optymalnego sterowania temperaturą w procesie rozkładu nadtlenu wodoru prowadzonego w obecności natywnej katalazy *Aspergillus niger*. Przeanalizowano przy tym katalazę pozyskaną z *Sigma-Aldrich* (katalaza S-A) oraz znacznie mniej aktywną pozyskaną z *Novozymes* (katalaza N, *Terminox ultra*). Dla obu rodzajów katalaz przeanalizowano optymalne sterowanie zarówno z uwzględnieniem ich termicznej dezaktywacji jak i bez jej uwzględnienia.

Na tej podstawie jednoznacznie można stwierdzić, że przy projektowaniu bioreaktora okresowego do prowadzenia procesu rozkładu nadtlenu wodoru w obecności natywnej katalazy, dla analizowanej wartości stężenia nadtlenu wodoru, w modelu matematycznym proces termicznej dezaktywacji enzymu może zostać pominięty.

OZNACZENIA

- C_E – stężenie katalazy, [kmol·m⁻³]
- $\bar{C}_E = C_E / C_{E0}$ – bezwymiarowe stężenie katalazy, [-]
- C_S – stężenie nadtlenu wodoru, [kmol·m⁻³], [mg·cm⁻³]
- $\bar{C}_S = C_S / C_{S0}$ – bezwymiarowe stężenie katalazy, [-]
- $E = E_{DS} / E_R$ – iloraz energii aktywacji dezaktywacji i reakcji, [-]
- E_{DS}, E_{DT}, E_R – energia aktywacji odpowiednio dla dezaktywacji substratem, dezaktywacji termicznej oraz dla reakcji, [J·mol⁻¹]
- k_{DS} – stała szybkości dezaktywacji substratem, [m³·kmol⁻¹·h⁻¹]
- k_{DS0} – współcz. częstości dla dezaktywacji substratem, [m³·kmol⁻¹·h⁻¹]
- k_R – stała szybkości reakcji, [h⁻¹]
- k_{R0} – współczynnik częstości dla reakcji, [h⁻¹]
- R – uniwersalna stała gazowa (8.314 J·mol⁻¹·K⁻¹)
- t – czas chronologiczny, [h]
- T – temperatura, [K]
- T_{min}, T_{max} – dolne i górne ograniczenie temperaturowe, [K]
- $\tau = t/t_f$ – bezwymiarowy czas chronologiczny, [-]

LITERATURA

- Grubecki I., 2010. Optimal temperature control in a batch bioreactor with parallel deactivation of enzyme. *J. Proc. Contr.*, **20**, 573–584. DOI: 10.1016/j.jprocont.2010.02.009
- Grubecki I., Wójcik M., 2012. Optymalne sterowanie temperaturą w procesie rozkładu H₂O₂ przez katalazę *Aspergillus Niger*. *Inż. Ap. Chem.*, **51**, nr 4, 125–127
- Horst F., Rueda E. H., Ferreira M. L., 2006. Activity of magnetic – immobilized catalase in hydrogen peroxide decomposition. *Enzyme Microb. Technol.*, **38**, 1005–1012. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.08.035
- Jurado E., Camacho F., Luzón G., Vicaria J. M., 2004. Kinetic models of activity for K-galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme Microb. Technol.*, **34**, 33–40. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2003.07.004
- Milek J., 2011. *Badanie i modelowanie dezaktywacji katalazy*. Praca doktorska. ZUT, Szczecin
- Mohaparta, B. R., Gould W. D., Dinardo O., Papavinasam S., Koren D. W., Revie R. W., 2008. Effect of immobilization on kinetic and thermodynamic characteristics of sulfide oxidase from *Arthrobacter* species. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **38**, 61–73. DOI: 10.1080/10826060701774361
- Mozhaev V.V., Martinek K., 1982. Inactivation and reactivation of proteins (enzymes). *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 299–309. DOI: 10.1016/0141-0229(82)90050-3
- Ricca, E., Calabro V., Curcio S., Iorion G., 2009. Optimization of inulin hydrolysis by inulinase accounting for enzyme time- and temperature - dependent deactivation. *Biochem. Eng. J.*, **48**, 81–86. DOI: 10.1016/j.bej.2009.08.009
- Szwast Z., Sieniutycz S., 2001. Optimal temperature profiles for parallel-consecutive reactions with deactivating catalyst, *Catal. Today*, **66**, 461–466. DOI: 10.1016/S0920-5861(00)00656-8
- Tse P. H. S., Gough D., 1987. Time-dependent inactivation of immobilized glucose oxidase and catalase. *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 705–713. DOI: 10.1002/bit.260290607