

Ireneusz GRUBECKI, Sylwia KWIATKOWSKA-MARKS

e-mail: igrubeck@utp.edu.pl

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

Optymalne sterowanie temperaturą w bioreaktorze okresowym z równoległą dezaktywacją enzymu

Wstęp

Reaktory okresowe z dezaktywującym się katalizatorem są powszechnie stosowane do otrzymywania wielu różnorodnych produktów w przemyśle chemicznym i biotechnologicznym. W tego typu reaktorach wysokie stopnie przemiany można osiągnąć nawet przy zastosowaniu warunków izotermicznych jednak zazwyczaj jest to związane ze zbyt długim czasem trwania procesu lub zużyciem znaczących ilości katalizatora na jednostkę masy przetwarzanego substratu. Stąd też w ostatnich latach wzrasta zainteresowanie doбором takiego sterowania temperaturą, które przy danych warunkach procesowych maksymalizuje zysk ekonomiczny, stopień przemiany lub minimalizuje czas niezbędny do ich uzyskania [1].

Większość procesów analizowanych w literaturze z punktu widzenia rozważań optymalizacyjnych uwzględnia najprostsz model dezaktywacji [2]. Znacznie rzadziej spotyka się opracowania optymalizacyjne dotyczące procesów prowadzonych w obecności katalizatora ulegającego dezaktywacji zależnej od stężenia substratu [3]. Propozycje równań opisujących szybkość tego rodzaju dezaktywacji biokatalizatora, na przykładzie procesu rozkładu nadtlenu wodoru w obecności katalazy jako pierwszy przedstawił George [4], a teoretycznie zweryfikowali Do i Weiland [5]. Dla przedstawionych jednak równań kinetycznych szybkości dezaktywacji nie spotkano opracowania dotyczącego doboru profilu temperatury. Wspomniany proces prowadzony jest zazwyczaj w warunkach izotermicznych w temperaturze powyżej 60°C, pomimo że optymalna aktywność katalazy, podobnie jak większości enzymów, osiągnięta jest w zakresie umiarkowanych temperatur (20–50°C) [6].

W niniejszej pracy zatem dla procesu rozkładu nadtlenu wodoru przez natywną katalazę drożdży *Saccharomyces cerevisiae* określono optymalne warunki przebiegu z punktu widzenia czasu jego trwania.

Model matematyczny i sformułowanie zadania optymalizacji

Model matematyczny rozważanego procesu – z równaniem szybkości dezaktywacji biokatalizatora zaproponowanym przez Do i Weiland – prowadzonego w idealnym reaktorze okresowym (rurowym), przyjmuje postać

$$\frac{d\bar{C}_S}{dt} = -k_R' \frac{\bar{C}_E \bar{C}_S}{\bar{K}_M(T) + \bar{C}_S} = f(\bar{C}_E, \bar{C}_S, \theta) \quad (1a)$$

$$\bar{C}_S(t = t_0) = \bar{C}_{S0}, \quad \bar{C}_S(t = t_f) = \bar{C}_{Sf}$$

$$\frac{d\bar{C}_E}{dt} = -k_D \frac{\bar{C}_E \bar{C}_S}{\bar{K}_M(T) + \bar{C}_S} = g(\bar{C}_E, \bar{C}_S, \theta) \quad (1b)$$

$$\bar{C}_E(t = t_0) = \bar{C}_{E0}, \quad \bar{C}_E(t = t_f) = \bar{C}_{Ef}$$

gdzie $\bar{C}_i = C_i/C_{i0}$ ($i = E, S$) oraz $\bar{K}_j = K_j/C_{S0}$ ($j = D, M$).

Zależność stałych szybkości reakcji k_R ($k_R' = k_R C_{E0}/C_{S0}$) i dezaktywacji k_D od temperatury, a dla uogólnienia rozważań i stałych *Leonor Michaelis* K_D, K_M opisuje równanie *Arrheniusa*.

Zadanie optymalizacji, w swej ogólnej postaci, polega na znalezieniu profilu temperatury $T_{opt}(t)$, który przy danych wartościach początkowych stężenia substratu \bar{C}_{S0} i aktywności biokatalizatora \bar{C}_{E0} oraz zadanych wartościach końcowych tych zmiennych stanu $\bar{C}_{Sf}, \bar{C}_{Ef}$ minimalizuje czas procesu $t_{f, opt}$.

Rozwiązanie sformułowanego zadania w wersji stacjonarnej można określić w oparciu o metodę rachunku wariacyjnego, prowadzącą bezpośrednio do równania dla poszukiwanej decyzji [7]:

$$\frac{dT}{dt} = -T^2 \left[\frac{\partial f}{\partial \bar{C}_E} + Z \left(\frac{\partial f}{\partial \bar{C}_S} - \frac{\partial g}{\partial \bar{C}_E} \right) - Z^2 \frac{\partial g}{\partial \bar{C}_S} - g \frac{\partial Z}{\partial \bar{C}_E} - f \frac{\partial Z}{\partial \bar{C}_S} - \frac{\partial Z}{\partial t} \right] \times \left(\frac{\partial Z}{\partial T} \right)^{-1} \quad (2)$$

Z określa zmienną *Horna* definiowaną jako

$$Z(t, \bar{C}_S, \bar{C}_E, T) = u(T)v(\bar{C}_S, T)w(\bar{C}_S, T) \quad (3)$$

$$\text{gdzie } u = \frac{k_R'}{k_D}, \quad v = \left(\frac{\bar{K}_D + \bar{C}_S}{\bar{K}_M + \bar{C}_S} \right)^2, \quad w = \frac{E_R(\bar{K}_M + \bar{C}_S) - E_{AM}\bar{K}_M}{E_D(\bar{K}_D + \bar{C}_S) - E_{AD}\bar{K}_D}$$

Pochodne zmiennej *Horna* Z względem decyzji T i stężenia substratu wynoszą odpowiednio ($\partial Z/\partial \bar{C}_E = 0$)

$$\frac{\partial Z}{\partial y} = v w \frac{\partial u}{\partial y} + u w \frac{\partial v}{\partial y} + u v \frac{\partial w}{\partial y} \quad (y = T, \bar{C}_S) \quad (4)$$

przy czym

$$\frac{\partial u}{\partial T} = -T^2 \frac{E_D - E_R}{R} u$$

$$\frac{\partial v}{\partial T} = -2T^2 \frac{v}{R} \left(E_{AM} \frac{\bar{K}_M}{\bar{K}_M + \bar{C}_S} - E_{AD} \frac{\bar{K}_D}{\bar{K}_D + \bar{C}_S} \right)$$

$$\frac{\partial v}{\partial \bar{C}_S} = 2v \frac{\bar{K}_M - \bar{K}_D}{(\bar{K}_D + \bar{C}_S)(\bar{K}_M + \bar{C}_S)}$$

$$\frac{\partial w}{\partial T} = -T^2 \bar{C}_S \frac{E_{AD}(E_D - E_{AD})\bar{K}_D E_R - E_{AM}(E_R - E_{AM})\bar{K}_M E_D}{R[E_D(\bar{K}_D + \bar{C}_S) - E_{AD}\bar{K}_D]^2}$$

$$\frac{\partial w}{\partial \bar{C}_S} = w \frac{E_R - w E_D}{[E_R(\bar{K}_M + \bar{C}_S) - E_{AM}\bar{K}_M]^2}$$

Obliczenie pozostałych wielkości występujących w (2) jest stosunkowo proste, zatem zostaną one pominięte.

Powyższe równanie (2) wraz z równaniami (1a,b) tworzy model matematyczny analizowanego procesu. Z punktu widzenia jego rozwiązalności stanowi on dwupunktowe zagadnienie brzegowe.

W sytuacji jednak, gdy stałe *Michaelis* dla reakcji K_M i dezaktywacji K_D są niezależne od temperatury, istnieje pełne rozwiązanie analityczne [8].

Analiza profili temperatury

Optymalne profile temperatury

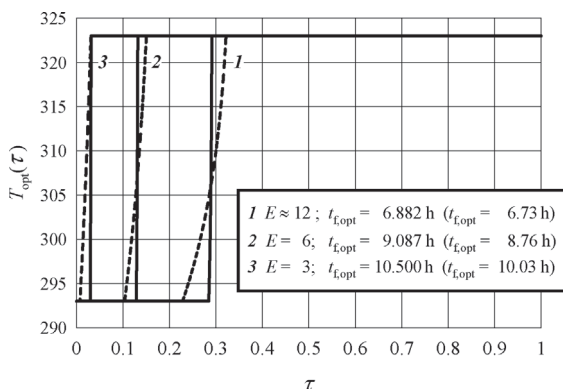
Powyżej rozważono stacjonarny proces optymalny bez ograniczeń temperaturowych. W rzeczywistości jednak, w większości procesów, konieczne jest uwzględnienie ograniczeń temperaturowych – dolnego T_{min} i górnego T_{max} – poniżej i powyżej których odpowiednio profil stacjonarny nie powinien przebiegać.

Najistotniejszą częścią prowadzonej analizy jest sporządzenie ekstremalnych profili temperatury minimalizujących całkowity czas przebiegu procesu biotransformacji z równoległą dezaktywacją enzymu, w szczególności rozkładu nadtlenu wodoru w obecności natywnej katalazy. W tym celu wykorzystano dane uzyskane z badań laboratoryjnych nad wspomnianym procesem [8].

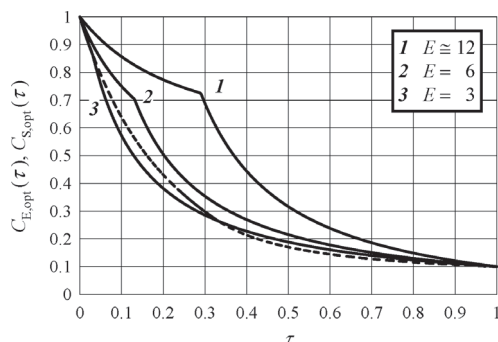
Jak wspomniano zmiany temperatury nie powodują dużych wahań w wartościach stałych *Michaelis* K_D i K_M . Ich uwzględnienie w niniej-

szej analizie ma charakter czysto modelowy z wartościami energii aktywacji zmian tych stałych wynoszących odpowiednio $E_{AD} = 0,25E_R$ i $E_{AM} = 0,5E_R$ [9].

Wyznaczone ekstremalne profile temperatury $T_{opt}(\tau)$ wraz z odpowiadającymi im zmianami aktywności biokatalizatora $\bar{C}_{E,opt}(\tau)$ przedstawiono na rys. 1, 2. Ze względu na niewielki wpływ parametru E na zmiany stężenia substratu w czasie dodatkowo na rys. 2 zamieszczono optymalny profil zmian stężenia $\bar{C}_{S,opt}(\tau)$ jedynie dla wybranej wartości E .



Rys. 1. Optymalne profile temperatury $T_{opt}(t)$ dla końcowych wartości stężenia substratu i aktywności biokatalizatora wynoszących odpowiednio $\bar{C}_{Sf} = \bar{C}_{Ef} = 0,1$. Linia przerywana opisuje przebiegi profili temperatury dla stałych wartości K_D i K_M [8]



Rys. 2. Wpływ parametru E na zmiany aktywności biokatalizatora $\bar{C}_{E,opt}(\tau)$ dla $\bar{C}_{Sf} = 0,1$. Linia przerywana opisuje zmiany stężenia substratu $\bar{C}_{S,opt}(\tau)$ dla wartości $E \cong 12$ i końcowej aktywności biokatalizatora $\bar{C}_{Ef} = 0,1$

Na początku optymalnego procesu z równoległą dezaktywacją biokatalizatora korzystne jest stosowanie możliwie niskich temperatur, faworyzujących przemianę substratu do około 70% oraz spadek aktywności enzymu do około 25%. W dalszej części procesu powinno się stosować profil stacjonarny, który jest tym krótszy im wyższe są wartości energii aktywacji E_{AD} i E_{AM} . Następuje wówczas dalszy wzrost konwersji do około 80% i spadek aktywności katalazy do około 30%. W końcowej fazie procesu wskazane jest utrzymanie temperatury na poziomie $T = T_{max}$, która bardziej sprzyja spadkowi aktywności biokatalizatora i zapewnia osiągnięcie wartości końcowych stężenia substratu \bar{C}_{Sf} i aktywności biokatalizatora \bar{C}_{Ef} .

Prowadzenie procesu do wyższych (niższych) końcowych wartości aktywności katalazy skraca (wydłuża) sumaryczny czas procesu, przy czym jego przebieg wzdłuż górnej temperatury dopuszczalnej $T = T_{max}$ ulega skróceniu (wydłużeniu), natomiast pozostałe odcinki profilu ekstremalnego wydłużają (skracają) się. Dodatkowo wzrostowi stopnia przemiany (spadkowi \bar{C}_{Sf}) towarzyszy wydłużenie wszystkich etapów procesu optymalnego.

Suboptymalne profile temperatury

Jak wynika z przedstawionych wykresów uwzględnienie zależności $K_D(T)$ i $K_M(T)$ od temperatury powoduje wydłużenie czasu trwania procesu oraz gwałtowniejszy skok temperatury wzdłuż odcinka stacjonar-

nego. Fakt ten nasuwa rozwiązanie suboptymalne polegające na prowadzeniu procesu przez ściśle określony przedział czasu wzdłuż odcinka izotermicznego na poziomie $T = T_{min}$ a po jego upływie na poziomie $T = T_{max}$. Należy zatem znaleźć taki czas t_b oddzielający wspomniane odcinki izotermiczne, po upływie którego prowadząc proces wzdłuż $T = T_{max}$ osiąga się założone wartości \bar{C}_{Ef} i \bar{C}_{Sf} . Procedura ta znacznie się upraszcza w przypadku stałych wartości K_D i K_M . W takiej sytuacji punkt przełączenia ($\bar{C}_{S,b}, \bar{C}_{E,b}$) uzyskuje się z poniższej zależności

$$1 - \frac{k_D(T_{min})}{k_R(T_{min})} \left[1 - \bar{C}_{S,b} - (\bar{K}_M - \bar{K}_D) \ln \left(\frac{\bar{K}_D + 1}{\bar{K}_D + \bar{C}_{S,b}} \right) \right] = \bar{C}_{Ef} + \frac{k_D(T_{max})}{k_R(T_{max})} \left[\bar{C}_{S,b} - \bar{C}_{Sf} - (\bar{K}_M - \bar{K}_D) \ln \left(\frac{\bar{K}_D + \bar{C}_{S,b}}{\bar{K}_D + \bar{C}_{Sf}} \right) \right] \quad (5)$$

Graniczna aktywność biokatalizatora $\bar{C}_{E,b}$ jest określona przez lewą lub prawą stronę równ. (7). Mając dane $\bar{C}_{S,b}$ i $\bar{C}_{E,b}$, z równań stanu, można określić czas przełączenia t_b . Okazało się, że uzyskane w tych warunkach profile aktywności enzymu $\bar{C}_{E,sopt}(\tau)$ i stężenia substratu $\bar{C}_{S,sopt}(\tau)$ przebiegają identycznie jak w warunkach optymalnych (Rys. 2). Występuje jedynie nieznaczna różnica w czasach t_{opt} i t_{sopt} przebiegu procesu w porównywanych warunkach (Tab. 1), co nie zawsze jest możliwe do przedstawienia, ale w każdym przypadku $t_{opt} < t_{sopt}$.

Tab. 1. Czasy procesu [h] w rozważanych warunkach temperaturowych dla wybranych wartości E oraz \bar{C}_{Ef} i \bar{C}_{Sf}

	$E = 12$		$E = 6$		$E = 3$	
	\bar{C}_{Ef}		\bar{C}_{Ef}		\bar{C}_{Ef}	
	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05
t_{opt}	6,882	8,720	9,087	12,354	10,500	14,800
t_b	1,997	1,889	1,190	1,000	0,322	0,085
t_{sopt}	6,883	8,721	9,087	12,354	10,500	14,800
t_{isot}	11,410	15,728	11,298	15,531	11,020	15,045

Podsumowanie i wnioski

Na przykładzie rozkładu nadtlenu wodoru w obecności natywnej katalazy określono optymalne warunki prowadzenia procesu biotransformacji z równoległą dezaktywacją biokatalizatora opisaną nieliniowym modelem *Do* i *Weilanda*. Uwzględniono przy tym zależność stałych *Michaelis* $K_D(T)$ i $K_M(T)$ od temperatury.

Okazało się, że realizacja procesu musi przebiegać przynajmniej przy aktywnym górnym $T = T_{max}$ ograniczeniu temperaturowym, przy czym długość odcinka stacjonarnego jest tym krótsza im wyższe są wartości energii aktywacji E_{AM} i E_{AD} .

Stwierdzono, że spadek ilorazu energii aktywacji E i końcowej aktywności biokatalizatora \bar{C}_{Ef} oraz wzrost stopnia przemiany $\alpha_f = 1 - \bar{C}_{Sf}$ powodują wzrost sumarycznego czasu procesu.

Dla przypadków, których realizacja sprawiłaby trudność zaproponowano rozwiązanie suboptymalne, proste w realizacji, nieznacznie jedynie dłuższe od optymalnego.

LITERATURA

[1] A. Arpornwicheanop, P. Kittisupakorn, I.M. Mujtaba: Chem. Eng. Process. **44**, 101 (2005).
 [2] Z. Szwaś, S. Sieniutycz: Chem. Eng. J. **103**, 45 (2004).
 [3] N.M. Faqir, M.M. Attarakih: Biotechnol. Bioeng. **77**, 163 (2002).
 [4] P. George: Nature **160**, 41 (1947).
 [5] D. Do, R.H. Weiland: Biotechnol. Bioeng. **22**, 1087 (1980).
 [6] F. Horst, E.H. Rueda, M.L. Ferreira: Enzyme Microb. Technol. **38**, 1005 (2006).
 [7] F. Horn: Chem. Eng. Sci. **14**, 77 (1961).
 [8] J. Grubecki: J. Process Control (przyjęte do druku).
 [9] E. Ricca, V. Calabro, S. Curcio, G. Iorio: Biochem. Eng. J. **48**, 81 (2009).