

JUSTYNA MIŁEK
MAREK WÓJCIK

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

Wyznaczanie parametrów termicznej dezaktywacji enzymów

Wprowadzenie

Publikowane wcześniej analizy wykazały [1, 2], że zastosowanie sterowania optymalnego lub suboptymalnego w bioreaktorach enzymatycznych pozwala na kilkukrotne skrócenia czasu reakcji w porównaniu z procesem okresowym. Do wyznaczenia rozwiązań optymalnych konieczna jest jednak znajomość energii aktywacji reakcji E_R i dezaktywacji E_D . Wielkości te często wyznacza się [3, 4] na podstawie zależności aktywności enzymu od temperatury, analizując oddzielnie część krzywej wznoszącej i opadającej.

Opublikowana analiza [5] wykazała, iż ta metodyka prowadzi generalnie do zaniżonych wartości E_R i E_D . Najwyższy błąd obserwuje się, gdy energie aktywacji dla reakcji i dezaktywacji nie różnią się znacznie. Przykładowo dla $E_D = 50$ kJ/mol i $E_R = 25$ kJ/mol błędy wynoszą odpowiednio 16 i 53%.

W związku z powyższym konieczne stało się opracowanie metody pozwalającej precyzyjnie określać parametry kinetyczne reakcji enzymatycznej.

Model matematyczny reakcji enzymatycznej z dezaktywującym się enzymem

Badania wpływu temperatury na aktywność enzymów prowadzi się bardzo często mierząc ilość powstającego produktu przy stałym czasie reakcji. Dla stężeń substratu znacznie większych niż stała *Michaelisa-Menten* szybkość wytwarzania produktu można opisać zależnością:

$$\frac{dC_P}{dt} = k_R C_E \quad (1)$$

Powyższą zależność można zastosować także w przypadku, gdy pomiary szybkości wytwarzania produktu są prowadzone w bardzo wąskim zakresie stężeń substratu.

Natomiast szybkość dezaktywacji enzymu dla prostego modelu dezaktywacji pierwszego rzędu ma następującą postać:

$$\frac{dC_E}{dt} = -k_D C_E \quad (2)$$

W równaniach (1) i (2) k_R oraz k_D są stałymi szybkości reakcji i dezaktywacji, opisanymi zależnością *Arrheniusa*:

$$k_R = k_{R_0} \exp\left(-\frac{E_R}{RT}\right) \quad (3)$$

$$k_D = k_{D_0} \exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right) \quad (4)$$

Po wprowadzeniu bezwymiarowej aktywności enzymu $\bar{C}_E = C_E / C_{E_0}$ oraz uwzględnieniu równań (3) i (4), otrzymuje następujące postaci równań (1) i (2):

$$\frac{dC_P}{dt} = k_{R_0} \exp\left(-\frac{E_R}{RT}\right) \bar{C}_E C_{E_0} \quad (5)$$

$$\frac{d\bar{C}_E}{dt} = -k_{D_0} \exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right) \bar{C}_E \quad (6)$$

z warunkami początkowymi:

$$C_P(t=0) = 0 \quad \bar{C}_E(t=0) = 1 \quad (7)$$

Całkowanie równania (6) prowadzi do zależności opisującej zmianę aktywności enzymu w czasie:

$$\bar{C}_E = \exp\left[-k_{D_0} t \exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right)\right] \quad (8)$$

Po podstawieniu równ. (8) do równ. (5) i wykonaniu ponownego całkowania otrzymuje się:

$$C_P = \frac{k_{R_0} C_{E_0}}{k_{D_0}} \exp\left(\frac{E_D - E_R}{RT}\right) \left\{1 - \exp\left[-\beta \exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right)\right]\right\} \quad (9)$$

gdzie:

$$\beta = k_{D_0} t \quad (10)$$

W literaturze naukowej aktywności enzymu A wyznacza się zwykle jako iloraz stężenia produktu C_P do maksymalnego stężenia produktu C_{Pmax} ($A = C_P / C_{Pmax}$).

Wartość maksymalną stężenia produktu C_{Pmax} uzyskuje się w temperaturze określaną jako temperatura optymalna T_{opt} .

Korzystając z równ. (9) bezwymiarową aktywność enzymu, można wyrazić następująco:

$$A = \frac{\exp\left[\frac{(E_D - E_R)(T_{opt} - T)}{RTT_{opt}}\right] \left\{1 - \exp\left[-\beta_1 \exp\left(\frac{E_D(T - T_{opt})}{RTT_{opt}}\right)\right]\right\}}{1 - \exp(-\beta_1)} \quad (11)$$

gdzie:

$$\beta_1 = k_{D_0} t \exp\left(-\frac{E_D}{RT_{opt}}\right) = (k_D)_{T_{opt}} t \quad (12)$$

Równanie (11) przedstawia zależność bezwymiarowej aktywności enzymu od temperatury T , w której dokonywany jest pomiar.

W tym równaniu występują cztery parametry: energia aktywacji reakcji E_R , energia aktywacji dezaktywacji E_D , temperatura optymalna T_{opt} , i parametr β_1 opisany zależnością (12).

W równaniu (11) można zmniejszyć liczbę parametrów do wyznaczenia, korzystając z definicji temperatury optymalnej.

W tej temperaturze uzyskuje się aktywność maksymalną. Zatem po obliczeniu pochodnej aktywności względem temperatury i przyrównaniu do zera, otrzymuje się:

$$E_D - E_R = \frac{E_D \beta_1}{\exp \beta_1 - 1} \quad (13)$$

Po wyeliminowaniu E_R równ. (11) przyjmuje postać:

$$A = \frac{\exp \left[\frac{T_{opt} - T}{RTT_{opt}} \cdot \frac{E_D \beta_1}{\exp \beta_1 - 1} \right] \left\{ 1 - \exp \left[-\beta_1 \exp \left(\frac{E_D (T - T_{opt})}{RTT_{opt}} \right) \right] \right\}}{1 - \exp(-\beta_1)} \quad (14)$$

Wyznaczanie parametrów kinetycznych na podstawie krzywej aktywności oksydazy fenolowej

Bezpośrednie wyznaczenie parametrów kinetycznych z równania (14) będącego funkcją nieliniową jest niemożliwe. Z tego względu niezbędne stało się zastosowanie metody *quasi-Newtona* [6]. Wartości T_{opt} , β , E_D określono przy użyciu programu *Mathcad Professional 2000*.

Parametry kinetyczne zostały wyznaczone dla oksydazy fenolowej na podstawie doświadczalnie określonej aktywności enzymu otrzymanej przez *Setsushi* [7].

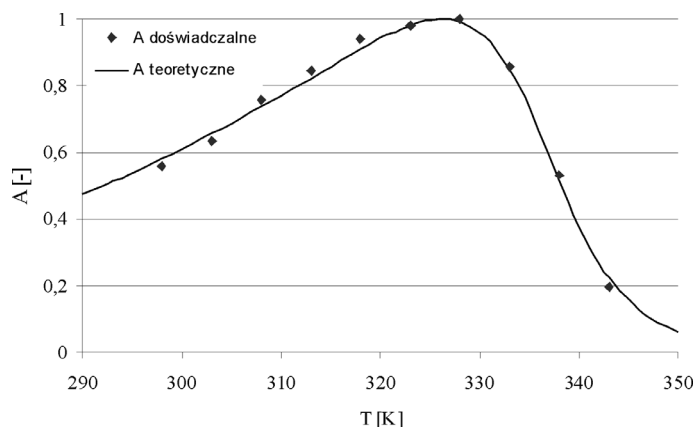
Na podstawie danych doświadczalnych obliczono wartości parametrów kinetycznych T_{opt} , β , E_D , ze współczynnikiem korelacji 0,998.

Podsumowanie

Zaproponowano metodę wyznaczania parametrów kinetycznych dla reakcji enzymatycznej z dezaktywującym się enzymem, opisaną równaniem pierwszego rzędu. Na podstawie otrzymanych parametrów kinetycznych sporządzono krzywą aktywności oksydazy fenolowej od zmiennej temperatury. Współczynnik korelacji pomiędzy otrzymaną krzywą a danymi doświadczalnymi świadczy o właściwym doborze modelu matematycznego oraz poprawności sformułowania algorytmu do obliczeń parametrów kinetycznych.

Oznaczenia

A – aktywność [–]



Rys. 1. Zmiana aktywności oksydazy fenolowej w zależności od temperatury. Wartości obliczonych parametrów kinetycznych: $T_{opt} = 326,2$ K, $\beta = 0,189$, $E_R = 18,28$ kJ/mol, $E_D = 199,2$ kJ/mol

- C_E – stężenie enzymu [mol/dm³]
- C_P – stężenie produktu [mol/dm³]
- $C_{P_{max}}$ – maksymalne stężenie produktu [mol/dm³]
- C_{E_0} – początkowe stężenie enzymu [mol/dm³]
- C_E – bezwymiarowa aktywność enzymu [–]
- k_R – stała szybkości reakcji [1/h]
- k_{R_0} – stała w równaniu *Arrheniusa* [1/h]
- k_D – stała szybkości dezaktywacji [1/h]
- k_{D_0} – stała w równaniu *Arrheniusa* [1/h]
- R – stała gazowa 8,314 [J/(K mol)]
- t – czas [h]
- T – temperatura [K]
- T_{opt} – temperatura optymalna, w której bezwymiarowa aktywność jest maksymalna [K]

LITERATURA

1. I. Grubecki, M. Wójcik: Chem. Eng. Sci., **55**, 5161 (2000).
2. I. Grubecki, M. Wójcik: J. Chem. Eng. Jap., **39**, 1065 (2006).
3. Z. Iqbal i inni: Biotechnol. Lett., **25**, 1667 (2003).
4. T. Saku i inni: J. Biosci. Bioeng., **93**, 599 (2002).
5. J. Milek, M. Wróblewski, M. Wójcik: Inż. Ap. Chem., **45** nr 6, 37 (2006).
6. E. Polak: Optimization – Algorithms and Consistent Approximations, New York, Springer-Verlag, 1997.
7. M. Setsushi: J. Biosci. Bioeng., **87**, 137 (1999).