

Modelos para la descripción de la naturaleza química de la desactivación de enzimas inmovilizadas

María Tomás Martínez, Gloria Villora Cano y Antonio López Cabanes
Departamento de Ingeniería Química
Universidad de Murcia

Recibido: 11-5-87
Aceptado: 16-11-87

Models to describe the chemical nature of immobilized enzyme deactivation

Summary. A general approximate solution which describes the chemical nature of deactivation of immobilized enzymes is provided, considering deactivation as a surface phenomenon in the absence of any diffusional intrusion, for different deactivation mechanisms (parallel, series and independent) and for various main kinetic rate expressions (Michaelis-Menten simple and with competitive, non-competitive and acompetitive inhibitions).

The knowledge of how the activity of the enzyme will vary with the operating conditions is of paramount importance for the successful design of the appropriate reactor.

Key-words: Enzyme, immobilized, deactivation, models.

INTRODUCCIÓN

Uno de los factores más influyentes en la viabilidad técnica y económica de los procesos que transcurren en presencia de enzimas inmovilizadas, y en general en cualquier proceso catalítico heterogéneo, es el fenómeno de la desactivación del catalizador, de ahí que haya de ser considerado a la hora de elaborar modelos de diseño para los reactores propios de estos sistemas.

De las diferentes definiciones de desactivación posibles (1), no siempre coincidentes, la que se va a utilizar en este trabajo es la dada por Wojciechowski y col. (2) que trata la desactivación como un término general que denota la pérdida de actividad catalítica, distinguiendo entre diferentes tipos, clasificados según su origen en la tabla 1.

Para abordar el estudio de este fenómeno y su influencia en análisis cinéticos y/o de diseño, se han postulado diversas teorías (3, 4, 5) que, si bien han sido aplicadas mayoritariamente a la desactivación de catalizadores sólidos inorgánicos, permiten la cuantificación de la desactivación

de enzimas inmovilizadas dada la gran similitud de estos biocatalizadores con los sistemas anteriores.

El estudio de la desactivación de enzimas inmovilizadas en soportes sólidos porosos e insolubles en agua implica, como para la mayor parte de los sistemas heterogéneos fluido-sólido, el análisis en tres niveles claramente diferenciados, pero sucesivos, y que conciernen a la naturaleza química de la desactivación, el comportamiento de una partícula de catalizador y el diseño del reactor.

En el trabajo que aquí se presenta, se propone un método general para el estudio de la primera etapa dejando para desarrollos posteriores el de las otras dos, es decir, se va a analizar la desactivación en ausencia de limitaciones difusionales considerando, por tanto, la desactivación como un proceso netamente superficial. En la práctica, sistemas que operan en estas condiciones se utilizan para realizar estudios cinéticos, los cuales han de realizarse necesariamente en ausencia de gradientes intraparticulares (6, 7).

TABLA 1
Tipos de desactivación y causas que la provocan

Tipo de desactivación	Causa de la desactivación
Ensuciamiento	Reacciones secundarias del sustrato (a), del producto (b) o ambos (c).
a. Paralelo b. Serie c. Triangular	
Inhibición	Adsorción fuerte del producto o sustrato produciendo usualmente una disminución de la actividad hasta un valor estacionario distinto de cero.
Envenenamiento	Quimiadsorción de una impureza de la alimentación.
Deterioro	Cambios estructurales o sinterización (disminución del área superficial activa).

ECUACIONES CINÉTICA Y DE DESACTIVACIÓN

Para un proceso enzimático general con desactivación y sin limitaciones difusionales, la ecuación cinética obedece a una ley general (8), tal como:

$$V_s = f_1(C_s, C_p) f_2(a) f_3(T, \text{pH}, C_{E,0}, \dots) \quad (1)$$

o bien, teniendo en cuenta que los procesos enzimáticos suelen ocurrir en condiciones constantes de temperatura, pH, concentración inicial de enzima y otros:

$$V_s = k \cdot f_1(C_s, C_p) f_2(a) \quad (2)$$

ecuación en la que la actividad, a , se define como la relación entre la velocidad de reacción sobre la enzima inmovilizada que está desactivándose y la velocidad sobre la enzima inmovilizada fresca.

Por ejemplo, para un mecanismo de Michaelis-Menten simple con desactivación, la ecuación anterior toma la forma:

$$- \frac{dC_s}{dt} = \frac{V_{\max} a}{1 + \frac{K_M}{C_s}} \quad (3)$$

o bien, en función de la conversión de sustrato X_s :

$$\frac{dX_s}{dt} = \frac{V_{\max} a}{C_{s,0} + \frac{K_M}{1-X_s}} \quad (\text{estado del catalizador}) \quad (4)$$

Para aquellos casos en que ocurra inhibición enzimática, competitiva y no competitiva por el producto y acompetitiva por el sustrato, las ecuaciones correspondientes son las reflejadas en la tabla 2.

En estas ecuaciones, la actividad no responde a un valor

constante, sino que va variando desde 1 hasta 0 —sus valores de contorno— conforme prosigue la reacción. La expresión que indica su variación es análoga a la dada por la ecuación (1) para la velocidad de reacción, pudiendo expresarse en su forma más general como:

$$V_d = f_1(T) f_2(C_D) f_3 \quad (5)$$

siendo D el agente desactivante, e incluyendo en la función f_3 la dependencia con la actividad del catalizador, teniendo en cuenta el efecto del grado de deterioro del mismo, su superficie activa, etc. Puesto que la temperatura de la corriente principal suele ser constante, la expresión (5) puede ponerse como:

$$V_d = k_d f_2(C_D) f_3(a) \quad (6)$$

donde se ha introducido la constante cinética de desactivación k_d .

Esta expresión se va a aplicar a los tres mecanismos de desactivación considerados como más frecuentes (9), desactivación en paralelo, en serie e independiente, obteniéndose las ecuaciones de desactivación que, en función de la conversión de sustrato, se exponen en la tabla 2.

Una vez establecidas las ecuaciones de velocidad de reacción y de velocidad de desactivación para los mecanismos considerados, es posible determinar la variación de la concentración de sustrato —o de la conversión— y de la actividad con el tiempo, resolviendo para cada caso particular el sistema de dos ecuaciones diferenciales correspondientes.

En este trabajo se ha optado por utilizar las ecuaciones anteriores en función de la conversión, por la ventaja que supone el hecho de que ésta sea una variable adimensional —perfectamente acotada también entre cero y uno—, y puesto que, al no considerar limitaciones difusionales, la

TABLE 2

A. Ecuación cinética en función de la conversión de sustrato para distintos mecanismos de inhibición. B. Ecuación de desactivación para mecanismos de pérdida de actividad en paralelo, serie e independiente.

A-Mecanismo de inhibición	Ecuación cinética	Ecuación de desactivación	B-Mecanismo de desactivación
Competitiva	$\frac{dX_s}{dt} = \frac{V_{max} \cdot a}{C_{s,o} + \frac{K_M}{1-X_s} (1 + \frac{C_{s,o} X_s}{K_p})}$	$-\frac{da}{dt} = k_d C_{s,o} (1-X_s)^n a^d$	Paralelo
No competitiva	$\frac{dX_s}{dt} = \frac{V_{max} \cdot a}{(1 + \frac{C_{s,o} X_s}{K_p}) (C_{s,o} + \frac{K_M}{1-X_s})}$	$-\frac{da}{dt} = k_d (C_{s,o} X_s)^n a^d$	Serie
Acompetitiva	$\frac{dX_s}{dt} = \frac{V_{max} \cdot a}{\frac{K_M}{1-X_s} + C_{s,o} (1 + \frac{C_{s,o} (1-X_s)}{K_i})}$	$-\frac{da}{dt} = k_d a^d$	Independiente

concentración de sustrato en el interior del poro y en el seno de la disolución responden al mismo valor. De este modo, dicho sistema de ecuaciones puede expresarse como:

$$\frac{dX_s}{dt} = \psi_s(X_s, a) \tag{7}$$

$$-\frac{da}{dt} = \psi_d(X_s, a) \tag{8}$$

para el que las condiciones de contorno son:

$$\begin{matrix} t=0 & X_s=0 & a=a_0=1 \\ t=t & X_s=X_s & a=a \end{matrix} \tag{9}$$

SOLUCIÓN GENERAL

Puesto que las condiciones iniciales de X_s y a son conocidas, se ha optado por resolver el sistema formado por las ecuaciones (7) y (8), para todos los casos, mediante un procedimiento clásico de valores iniciales, como es el método de Runge-Kutta.

No obstante, cuando la desactivación es independiente, es posible obtener la solución analítica de dicho sistema. Si se supone una cinética tipo Michaelis-Menten, la forma que toman las ecuaciones (7) y (8) es:

$$\frac{dX_s}{dt} = \frac{V_{max} a}{C_{s,o} + \frac{K_M}{1-X_s}} \tag{10}$$

$$-\frac{da}{dt} = k_d a^d \tag{11}$$

y su solución, para los órdenes de desactivación 0, 1 y 2, es:

—para $d=0$:

$$\frac{1}{V_{max}} (C_{s,o} X_s - K_M \ln(1-X_s)) = t (1 - \frac{k_d}{2} t) \tag{12}$$

—para $d=1$:

$$\frac{1}{V_{max}} (C_{s,o} X_s - K_M \ln(1-X_s)) = \frac{1}{k_d} (1 - \exp(-k_d t)) \tag{13}$$

—para $d=2$:

$$\frac{1}{V_{max}} (C_{s,o} X_s - K_M \ln(1-X_s)) = \frac{1}{k_d} \ln(1+k_d t) \tag{14}$$

Procediendo de modo similar con las ecuaciones de velocidad correspondientes a los mecanismos de inhibición enzimática (tabla 2), se obtienen las expresiones recogidas en la tabla 3.

En todos los casos, la solución analítica conduce a una ecuación algebraica de tipo no lineal que relaciona la conversión de sustrato con el tiempo de reacción, y que puede resolverse mediante un método iterativo, como el método de la memoria (10), utilizado por los autores de este trabajo (11).

Tanto este último método, como el procedimiento de Runge-Kutta, han sido incorporados al correspondiente programa de ordenador, siguiendo el diagrama de bloques de la figura 1, el cual proporciona la evolución de la conversión de sustrato y de la actividad enzimática con el tiempo de reacción para los distintos mecanismos considerados. Los programas han sido ejecutados en el Centro de Proceso de Datos de la Universidad de Murcia.

APLICACIÓN Y DISCUSIÓN

El método descrito anteriormente, se ha aplicado a una



Tabla 3
Relación entre la conversión y el tiempo de reacción para distintas cinéticas de inhibición y órdenes de desactivación independiente 0, 1 y 2.

Inhibición	Primer miembro	Segundo miembro	Orden
Competitiva	$\frac{1}{V_{max}K_p} \left[(K_p - K_M)C_{s_0}X_s - K_M(K_p + C_{s_0})\ln(1 - X_s) \right]$	$t(1 - \frac{k_d}{2})$	d=0
No competitiva	$\frac{1}{V_{max}K_p} \left[\frac{(C_{s_0}X_s)^2}{2} (K_M - K_p)C_{s_0}X_s - K_M(K_p + C_{s_0})\ln(1 - X_s) \right]$	$\frac{1}{k_d} [1 - \exp(-k_d t)]$	d=1
Acompetitiva	$\frac{1}{V_{max}} \left[\frac{(C_{s_0}X_s)^2}{2K_i} - \left[1 + \frac{C_{s_0}}{K_i} \right] C_{s_0}X_s + K_M\ln(1 - X_s) \right]$	$\frac{1}{k_d} \ln(1 + k_d t)$	d=2

reacción que obedece a una cinética tipo Michaelis-Menten simple con desactivación, considerando por separado cada uno de los tres mecanismos de desactivación expuestos.

Los valores de los parámetros cinéticos y de desactivación utilizados, para un valor de tiempo final de 2.500 segundos y valores de $\Delta t = 25$ segundos, son los siguientes:

$C_{s_0} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

$V_{max} = 42 \cdot 5 \cdot 10^{-7} \text{ M seg}^{-1}$

$K_M = 8 \cdot 3 \cdot 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$

$k_d = 8 \cdot 3 \cdot 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$

$n^* = 1$

Estos valores aunque no corresponden a un sistema concreto, si están en el rango habitual (12, 13) y permiten obtener unos resultados que ilustran las diferencias entre los distintos mecanismos de desactivación.

Operando con estos parámetros, se obtiene, para cada tipo de desactivación, una representación de la conversión y de la actividad frente al tiempo de reacción, representados en las figuras 2 a 7. En ellas se observa que, en todos los casos, la conversión final de sustrato es menor siempre que haya pérdida de actividad de la enzima, presentando una disminución más acusada cuando el mecanismo de desactivación es independiente (figura 4) y menos importante si el mecanismo es el de desactivación en serie (figura 3).

Por otra parte, y para cada tipo de desactivación, la conversión de sustrato es mayor cuanto mayor es el orden de desactivación, siendo la diferencia más acusada en la desactivación independiente que en serie y en ésta mayor que en paralelo.

Considerando la variación de la actividad con el tiempo de reacción puede observarse como, para el tiempo máximo de reacción considerado, se obtiene el valor más alto para el mayor orden de desactivación:

$a_{d=0} < a_{d=1} < a_{d=2}$

y que, por otra parte, la pérdida de actividad es mucho

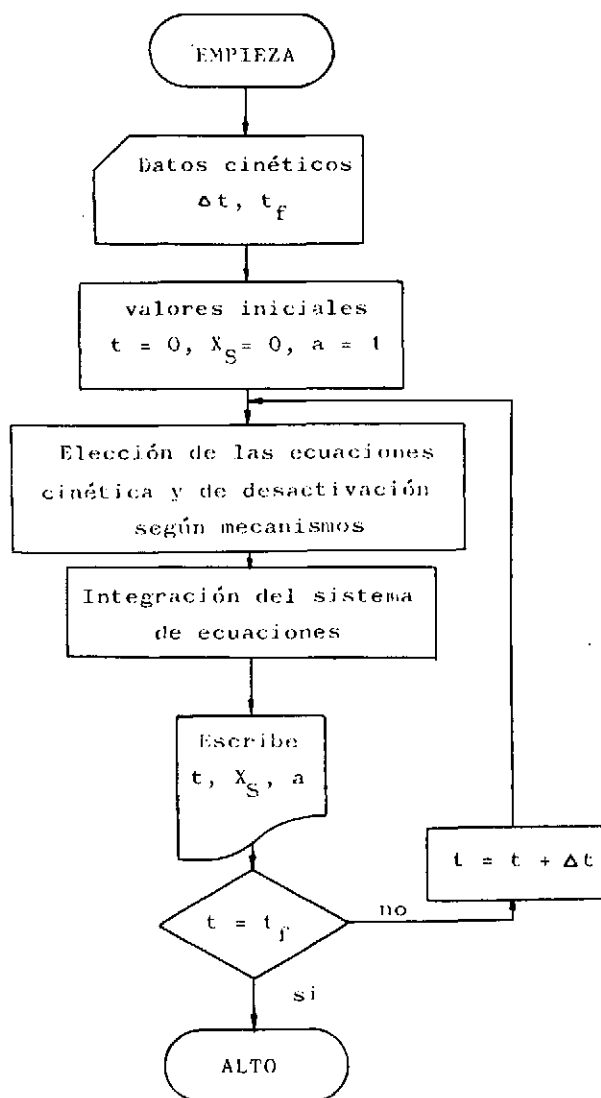


FIGURA 1. Diagrama de cálculo de la variación de la conversión de sustrato con el tiempo de reacción.



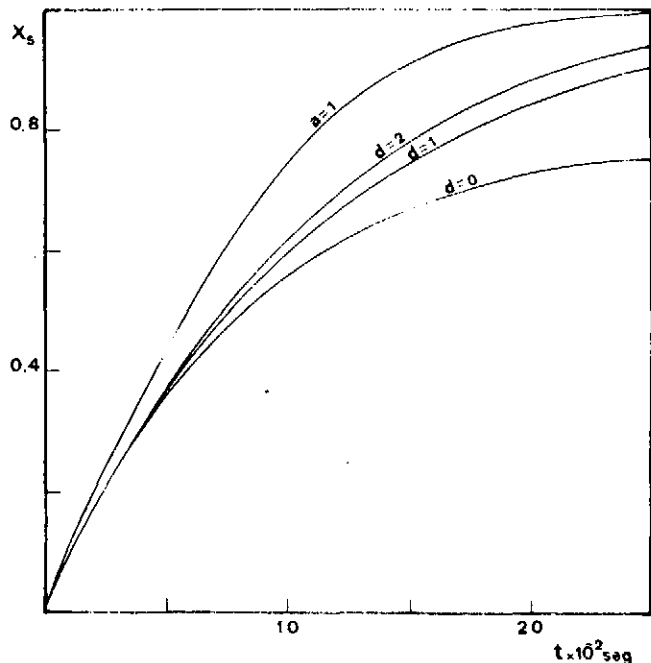


FIGURA 2. Variación de la conversión de sustrato con el tiempo de reacción para una cinética Michaelis-Menten simple y un mecanismo de desactivación en paralelo.

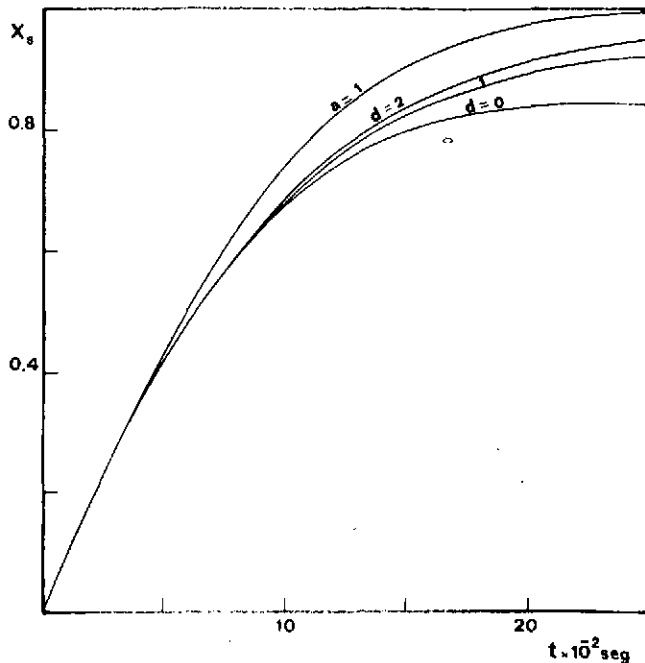


FIGURA 3. Variación de la conversión de sustrato con el tiempo de reacción para una cinética Michaelis-Menten simple y un mecanismo de desactivación en serie.

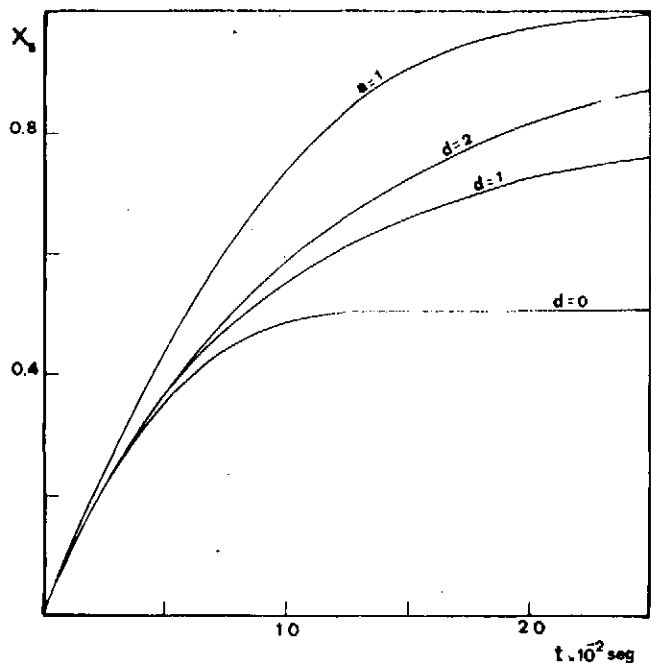


FIGURA 4. Variación de la conversión de sustrato con el tiempo de reacción para una cinética Michaelis-Menten simple y un mecanismo de desactivación independiente.

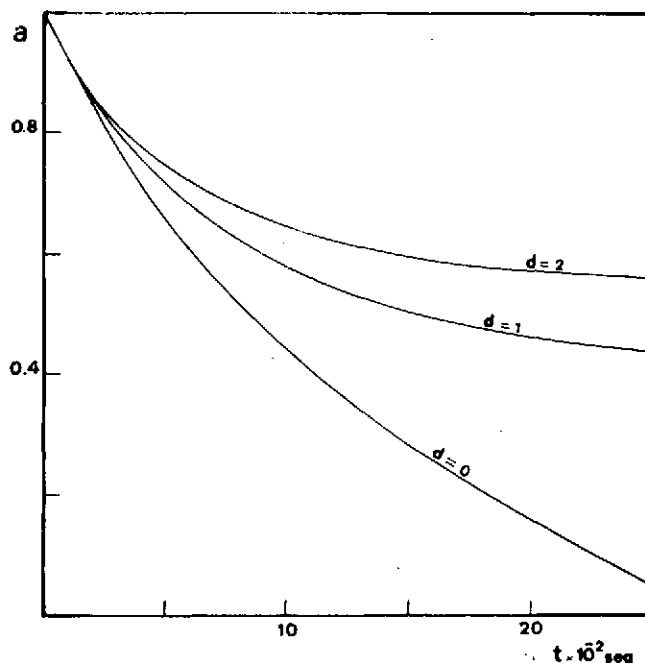


FIGURA 5. Variación de la actividad con el tiempo de reacción para un mecanismo de desactivación en paralelo y distintos órdenes de desactivación.



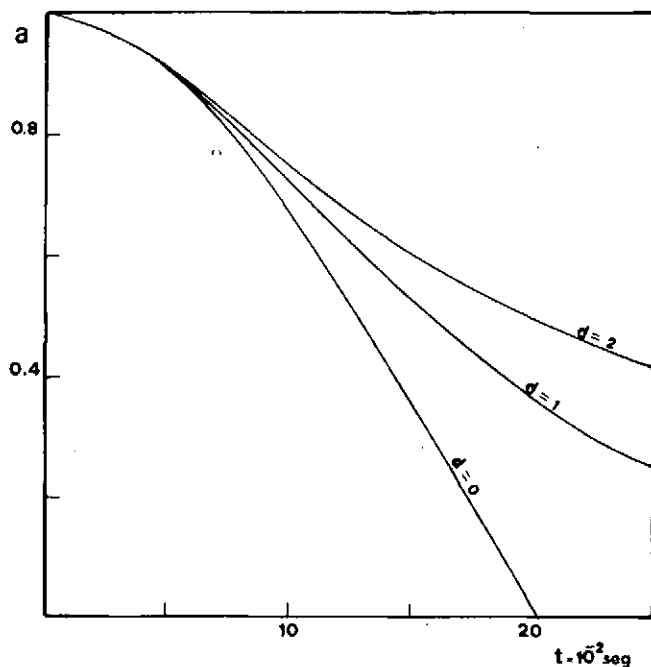


FIGURA 6. Variación de la actividad con el tiempo de reacción para un mecanismo de desactivación en serie y distintos órdenes de desactivación.

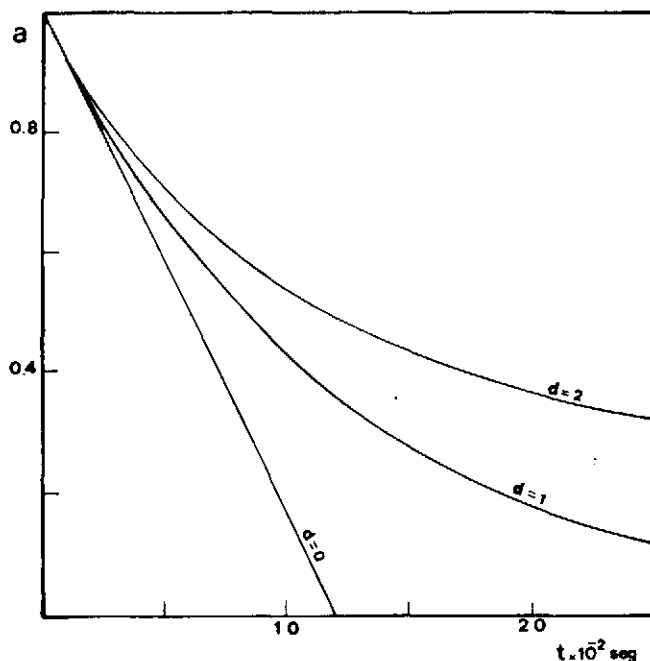


FIGURA 7. Variación de la actividad con el tiempo de reacción para un mecanismo de desactivación independiente y distintos órdenes de desactivación.

más rápida en un mecanismo de desactivación independiente (figura 7) que en serie (figura 6) y que en paralelo (figura 5).

CONCLUSIONES

Puede concluirse que se ha estudiado de forma generalizada la influencia de la pérdida de actividad sobre la ecuación cinética de la reacción principal en ausencia de limitaciones difusionales, planteando los sistemas de ecuaciones correspondientes, cuya resolución ha permitido establecer los perfiles de conversión y actividad enzimática a lo largo del tiempo de reacción, para diversos mecanismos típicos y representativos.

Este trabajo presenta la utilidad de permitir la aplicación del planteamiento de los modelos cinéticos globales a la estimación de parámetros cinéticos y de desactivación intrínsecos, haciendo uso de las adecuadas técnicas de optimización.

NOMENCLATURA

- a : Actividad de la partícula catalítica.
- a_0 : Actividad de la partícula catalítica en $t=0$.
- $C_{E,0}$: Concentración inicial de enzima.
- C_D : Concentración de la especie desactivante D.
- C_p : Concentración del producto P.
- C_s : Concentración del sustrato S.

- $C_{s,0}$: Concentración inicial del sustrato.
- d : Orden de la velocidad de desactivación.
- k : Constante cinética de la reacción.
- k_d : Constante cinética para la reacción de desactivación.
- K_M : Constante de Michaelis intrínseca.
- K_p : Constante de inhibición del producto P.
- K_s : Constante de inhibición del sustrato S.
- n' : Orden de desactivación con respecto a la especie desactivante.
- V_d : Velocidad de la reacción de desactivación.
- V_s : Velocidad de desaparición de sustrato.
- V_{max} : Velocidad máxima intrínseca de reacción.
- t : Tiempo de reacción.
- T : Temperatura.
- X_s : Conversión del sustrato.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 DORAISWAMY, L. K. y SHARMA, M. H.: *Heterogeneous Reactions*, vol. 1, John Wiley and Sons, New York (1985).
- 2 WOJCIECHOWSKI, B. W.; JUUSOLA, J. A. y DOWNIE, J.: *Can. J. Chem. Eng.* 47, 338 (1969).
- 3 WOJCIECHOWSKI, B. W.: *Catal. Rev. Eng.* 9, 79 (1974).
- 4 CARBERRY, J. J. y GORRING, R. L.: *J. Catal.* 5, 529 (1966).
- 5 DO, D. D. y WHEILAND, R. H.: *Ind. Eng. Chem. Fundam.* 20, 48 (1981).
- 6 CARDOSO, J. P. y EMERY, A. N.: *Biotechnol. Bioeng.* 20, 1.471 (1978).

- 7 SADANA, A.: *Enzyme. Microb. Technol.* 4, 44 (1982).
- 8 LEVENSPIEL, O.: *Ingeniería de las Reacciones Químicas*, Reverté, Barcelona (1974).
- 9 HUGHES, R.: *Desactivation of Catalysts*, Academic Press, London (1984).
- 10 SHACHAM, M. y KEHAT, E.: *Chem. Eng. Sci.* 27, 2.099 (1972).
- 11 TOMÁS MARTÍNEZ, M.: *Tesis de Licenciatura*. Universidad de Murcia (1986).
- 12 LIN, S. H.: *Chem. Eng. J. (Lausanne)*. 14, 129 (1977).
- 13 SADANA, A.: *J. Chem. Techn. Biotechnol.* 31, 553 (1981).