

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

EQB738 - ENGENHARIA ENZIMÁTICA

Cinética Enzimática Heterogênea

Prof Bernardo Dias

Efeitos derivados da Imobilização

Características intrínsecas
(enzima solúvel)

Imobilização

Mudanças na molécula da
enzima e efeitos estéricos

Características intrínsecas
(enzima imobilizada)

Efeitos electrostáticos,
hidrofílicos ou
hidrofóbicos e de partição

Efeitos microambientais

Características inerentes
(enzima imobilizada-suporte)

Efeitos ambientais

Resistências difusionais

Características efetivas
observadas
experimentalmente
(derivado obtido)

Retenção da Atividade Enzimática

- Enzimas imobilizadas em uma configuração que impede completamente o acesso do substrato ao centro ativo;
- Grupo reativo do centro ativo pode estar envolvido a ligação ao suporte
→ Proteção do sítio ativo da enzima através de um inibidor reversível durante a ligação pode resultar em aumento na retenção da atividade;
- A enzima pode ter se ligado em uma configuração que a torne inativa;
- As condições de reação no processo de imobilização podem causar desnaturação ou inativação.

Efeitos derivados da Imobilização

Características intrínsecas
(enzima solúvel)

Imobilização

Mudanças na molécula da
enzima e efeitos estéricos

Características intrínsecas
(enzima imobilizada)

Efeitos Microambientais

A enzima ao ser imobilizada passa a ser circundada por um ambiente diferente do que quando estava livre, especialmente se a matriz ou suporte possui carga.

Os efeitos dependem da natureza física e química do suporte → Distribuição desigual do substrato, produtos e cofatores entre a região vizinha ao sistema imobilizado e o resto da solução.

Efeitos microambientais

Efeitos electrostáticos,
hidrofílicos ou
hidrofóbicos e de partição

Características inerentes
(enzima imobilizada-suporte)

Efeitos ambientais

Resistências difusionais

Características efetivas
observadas
experimentalmente
(derivado obtido)

Efeitos derivados da Imobilização

Características intrínsecas
(enzima solúvel)

Imobilização

Mudanças na molécula da
enzima e efeitos estéricos

Características intrínsecas
(enzima imobilizada)

Efeitos microambientais

Efeitos electrostáticos,
hidrofílicos ou
hidrofóbicos e de partição

Características inerentes
(enzima imobilizada-suporte)

Efeitos ambientais

Resistências difusionais

Características efetivas
observadas
experimentalmente
(derivado obtido)

Efeitos Estereoespecíficos

Existem situações onde a atividade da enzima frente a um substrato com elevado MM é reduzida durante o processo de imobilização, de uma forma mais extensa que frente a um substrato com menor MM → resultado de *impedimento estéreo, formado pelo suporte, ao acesso de moléculas grandes ao centro ativo da enzima (impedimento estérico)*.

Efeitos derivados da Imobilização

Características intrínsecas
(enzima solúvel)

Imobilização

Mudanças na molécula da
enzima e efeitos estéricos

Características intrínsecas
(enzima imobilizada)

Efeitos microambientais

Efeitos electrostáticos,
hidrofílicos ou
hidrofóbicos e de partição

**Em condições homogêneas: a taxa de conversão
de S → atividade catalítica**

**Frequência de colisão entre E e S >> limitações
transferência de massa**

- Em condições heterogêneas (imobilização
de enzimas em suportes) → limitações de
transferência de massa**

Características inerentes
(enzima imobilizada-suporte)

Efeitos ambientais

Resistências difusionais

Características efetivas
observadas
experimentalmente
(derivado obtido)

Efeitos conformacionais → alterações estruturais na enzima decorridas da imobilização, e também ao impedimento estérico devido a proximidade do sítio ativo da enzima a superfície do suporte

Efeitos microambientais → efeitos de partição e limitações de transferência de massa

Cinética intrínseca → apenas na ausência de dos efeitos microambientais

Cinética inerente → apenas na ausência das limitações de transferência de massa

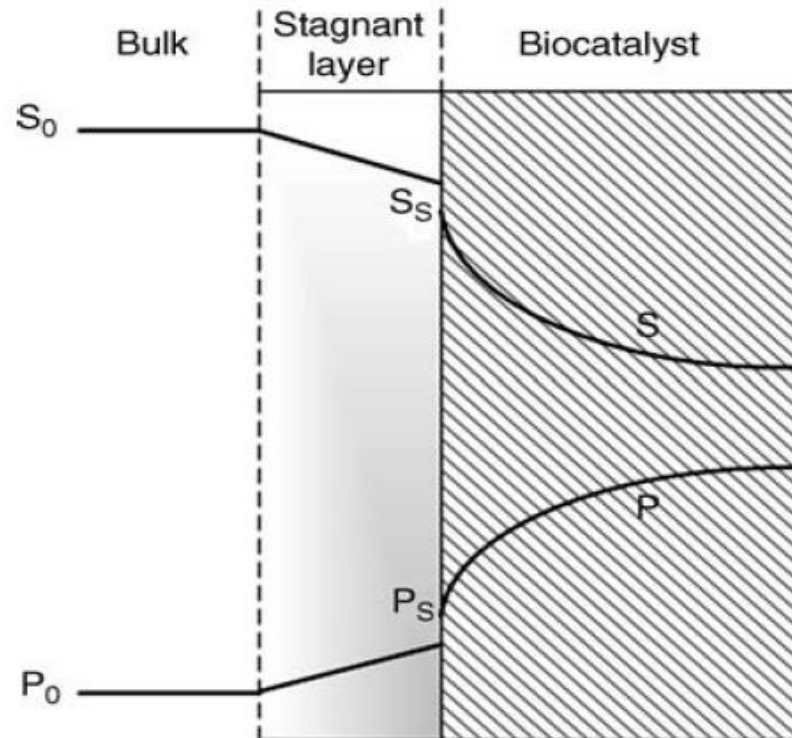


Figure 3.2 Schematic representation of external and internal diffusional restrictions.

Efeitos de Partição

São importantes se: propriedades fisicoquímicas do meio bulk e ambiente da enzima dentro do suporte forem significativamente diferentes. Ex. Suportes carregados eletricamente.

$$K_{P,S} = \frac{s}{s_0} = \exp\left(\frac{-Z \cdot e \cdot \Psi}{k_B \cdot T}\right)$$

$$K_{P,H^+} = \frac{h^+}{h_0^+} = \exp\left(\frac{-e \cdot \Psi}{k_B \cdot T}\right)$$

$K_{P,i}$ → coeficiente de partição do composto i

Z → valencia de espécies iônicas

e → carga electronica

Ψ → potencial eletrostático do suporte

T → temperature, K

k_B → constant de Boltzmann = $1,38064852 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$

Para o substrato, partição é favorável se a carga for oposta ao suporte, e desfavorável se tiverem a mesma carga. A cinética se torna:

$$v = \frac{V_{\max}}{\frac{K_M}{s_0 \cdot \exp\left(\frac{-Z \cdot e \cdot \Psi}{k_B \cdot T}\right)} + 1}$$

Então: $K_{MAP} = K_M \cdot \exp\left(\frac{Z \cdot e \cdot \Psi}{k_B \cdot T}\right)$

No caso da partição dos protons: $pH - pH_0 = \underbrace{0.43}_{\log_{10} e} \frac{e \cdot \Psi}{k_B \cdot T}$

Se a rede de cargas no suporte for positive, $pH > pH_0$; e se for negative, $pH < pH_0$.

Assim o perfil de pH da atividade enzimática é deslocada para a esquerda (menores pHs) para suportes cationicos ou para direita (maiores pHs) para suportes anionicos

A magnitude do deslocamento de pH é reduzida com o aumento da força ionica do meio, evitando os efeitos de partição e relevando o comportamento intrinseco da enzima

Restrições Difusionais Externas

- Biocatalisadores Impermeáveis (Não-porosos?)

Ocorrem na presença de camadas líquidas estagnantes ao redor da partícula catalisadora sólida

Em uma camada estagnante, em ausência de convecção, transporte de solutos ocorre apenas por difusão molecular. O perfil de S e P na camada limite será regido por sua difusão, e isso limitará a atividade enzimática.

No estado estacionário, a taxa de transferência de massa (J) é igual a taxa de reação na superfície do catalisador:

$$v' = \frac{V'_{\max} \cdot s_S}{K_M + s_S}$$

$$r' = v' = J$$

$$J = h(s_0 - s_S) = h' \cdot A_S(s_0 - s_S)$$

$$h(s_0 - s_S) = \frac{V'_{\max} \cdot s_S}{K_M + s_S}$$

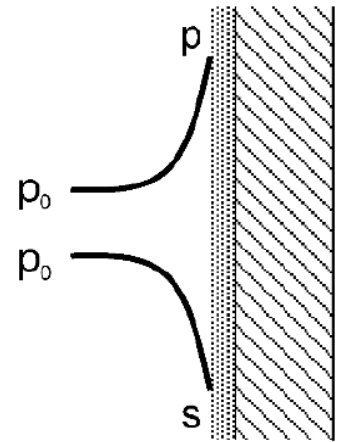
$s_S \rightarrow [S]$ na superfície

$s_0 \rightarrow [S]$ no meio bulk

$V'_{\max}, K_M \rightarrow$ parâmetros intrínsecos (sem efeitos de partição)

$h, h' \rightarrow$ coeficientes de transferência de massa do substrato (volumétrico, e por filme)

$A_S \rightarrow$ área superficial do catalisador



EDR

Em termos adimensionais

$$\beta_0 - \beta_S = \frac{\alpha \cdot \beta_S}{1 + \beta_S} = \alpha \cdot v$$

Nº de Damkoehler

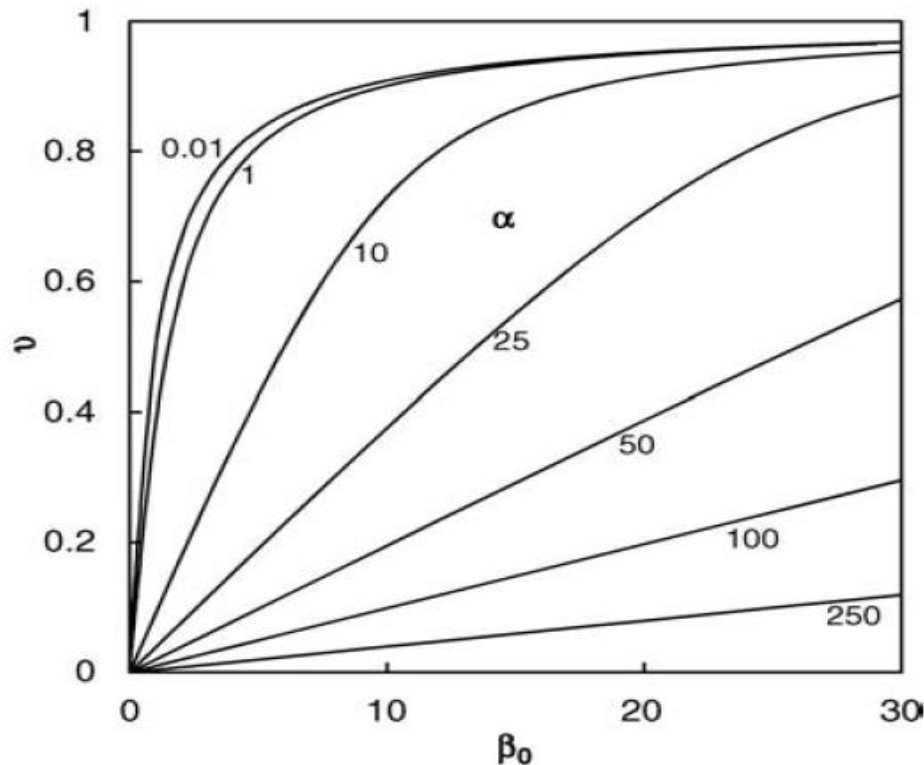
$$\alpha = \frac{V'_{\max}}{K_M \cdot h}$$

[S] adimensional

$$\beta_i = \frac{S_i}{K_M}$$

Taxa de reação inicial (v)
adimensional

$$v = \frac{\beta_S}{1 + \beta_S}$$



$\uparrow \alpha (>>1) \rightarrow$ Restrições difusionais externas relevantes

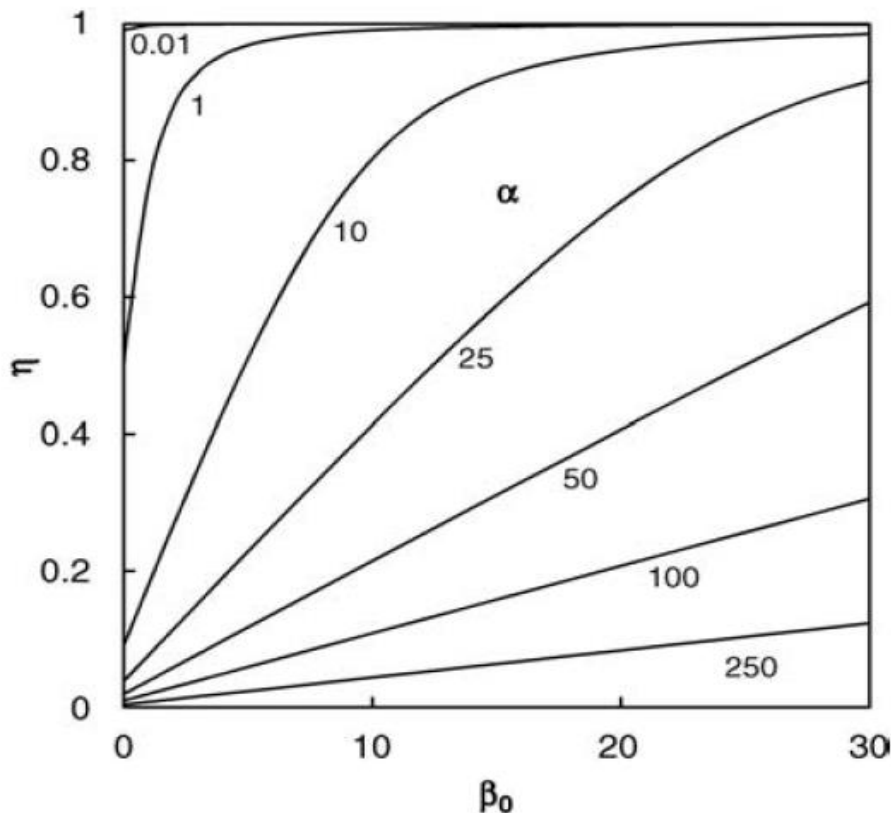
$h > V'_{\max} / K_M \rightarrow$ não há restrições

$$\beta_S = \frac{-(1 + \alpha - \beta_0) + \sqrt{[(1 + \alpha - \beta_0)^2 + 4\beta_0]}}{2}$$

Fator de Efetividade (η) $\rightarrow$ razão da taxa de reação aparente e intrínseca

$$\eta = \frac{\frac{V'_{\max} \cdot s_S}{K_M + s_S}}{\frac{V'_{\max} s_0}{K_M + s_0}} = \frac{\beta_S(1 + \beta_0)}{\beta_0(1 + \beta_S)}$$

Substituindo β_S na equação acima por valores mensuráveis como β_0 e α



$$\eta = \frac{(1 + \beta_0) \left[1 + \alpha + \beta_0 - \sqrt{(1 + \alpha - \beta_0)^2 + 4\beta_0} \right]}{2\beta_0\alpha}$$

$\downarrow \alpha \rightarrow$ insignificante EDR, comportamento Michaelis-Menten

Independentemente da magnitude de α , η se aproximará de 1, enquanto $\uparrow \beta_0$. Isto é limitado na prática pela solubilidade do substrato no meio reacional

Restrições Difusionais Internas

- Biocatalisadores Porosos

Matrizes em gel ou microporosas permitem altas cargas enzimáticas, mas sofrem altas limitações de transferencia de massa ($S_0 \rightarrow S_{\text{sup}} \rightarrow S_{\text{poro}}$)

Nesse caso, as condições ambientais em que a enzima estará exposta terá relação com sua posição no interior do suporte e da sua geometria $\rightarrow$ esfera e *slab* (como uma membrana)

Análise:

Equações diferenciais considerando cinética enzimática e taxa de tranferencia de massa $\rightarrow$ perfis de S e P no interior do suporte $\rightarrow$ Distribuição dos fatores de efetividade locais no interior do suporte $\rightarrow$ Fator de efetividade global $\rightarrow$ Comportamento do biocatalisador como todo

Catalyst Geometry	Differential Equation	Boundary Conditions
<i>Slab</i>	$D_{eff} \cdot \frac{d^2 s}{dx^2} - \frac{V''_{\max} \cdot s}{K_M + s} = 0$	(I) $x = 0$ $s = s_0$ $x = \frac{L}{2}$ (II) $\frac{ds}{dx} = 0$
<i>Sphere</i>	$D_{eff} \frac{d^2 s}{dr^2} + \frac{2D_{eff}}{r} \frac{ds}{dr} - \frac{V''_{\max} \cdot s}{K_M + s} = 0$	(I) $r = R_p$ $s = s_0$ $r = 0$ (II) $\frac{ds}{dr} = 0$

Em termos adimensionais

Catalyst Geometry	Differential Equation	Boundary Conditions
<i>Slab</i>	$\frac{d^2 \beta}{dz^2} - \Phi^2 \cdot \frac{\beta}{1 + \beta} = 0$	$\begin{array}{ll} \text{(I)} & z = 0 \\ & \beta = \beta_0 \\ & z = 0.5 \\ \text{(II)} & \frac{d\beta}{dz} = 0 \end{array}$
<i>Sphere</i>	$\frac{d^2 \beta}{d\rho^2} + \frac{2}{\rho} \frac{d\beta}{d\rho} - 9\Phi^2 \frac{\beta}{1 + \beta} = 0$	$\begin{array}{ll} \text{(I)} & \rho = 1 \\ & \beta = \beta_0 \\ & \rho = 0 \\ \text{(II)} & \frac{d\beta}{d\rho} = 0 \end{array}$

Módulo de Thiele

$$\Phi = L_{eq} \sqrt{\frac{V''_{\max}}{K_M \cdot D_{eff}}}$$

Comprimentos adimensionais

$$z = \frac{x}{L} \quad \rho = \frac{r}{R_P}$$

$L_{eq} \rightarrow$ comprimento equivalente da partícula
= Volume/Área

A condição de contorno I considera que restrições difusionais externas são negligenciáveis comparadas as internas

$\uparrow \Phi \rightarrow V''_{\max}/K_M \gg D_{eff}$ ou L_{eq} é grande $\rightarrow$ efeitos de restrição internos altos
 $\downarrow \Phi \rightarrow V''_{\max}/K_M \ll D_{eff}$ ou L_{eq} é pequeno $\rightarrow$ sem efeitos de restrição internos

$$\begin{array}{ll} \text{Slab} & L_{eq} = L \\ \text{Sphere} & L_{eq} = \frac{R_P}{3} \end{array}$$

Solução das equações são por resolução numérica

$$\begin{array}{ll} \text{Slab} & \beta = f(\beta_0, z, \Phi) \\ \text{Sphere} & \beta = f(\beta_0, \rho, \Phi) \end{array}$$

Fator de Efetividade local (η) $\rightarrow \eta = \frac{\frac{V''_{\max} \cdot s}{K_M + s}}{\frac{V''_{\max} s_0}{K_M + s_0}} = \frac{\beta(1 + \beta_0)}{\beta_0(1 + \beta)}$

Substituindo β na equação acima
obteremos por resolução numérica a
distribuição de η no interior do suporte

Slab $\eta = f(\beta_0, z, \Phi)$

Sphere $\eta = f(\beta_0, \rho, \Phi)$

Fator de Efetividade Global (η_G)

Slab $\eta_G = \frac{\int_0^1 \eta \cdot A \cdot dz}{\int_0^1 A \cdot dz} = \int_0^1 \eta \cdot dz$

Sphere $\eta_G = \frac{\int_0^1 \eta \cdot \rho^2 d\rho}{\int_0^1 \rho^2 d\rho} = 3 \int_0^1 \eta \cdot \rho^2 d\rho$

$$\eta_G = f(\beta_0, \Phi)$$

η_G is a strong function of Φ ; however, the magnitude of Φ at which such dependence occurs strongly depends on the magnitude of β_0 .

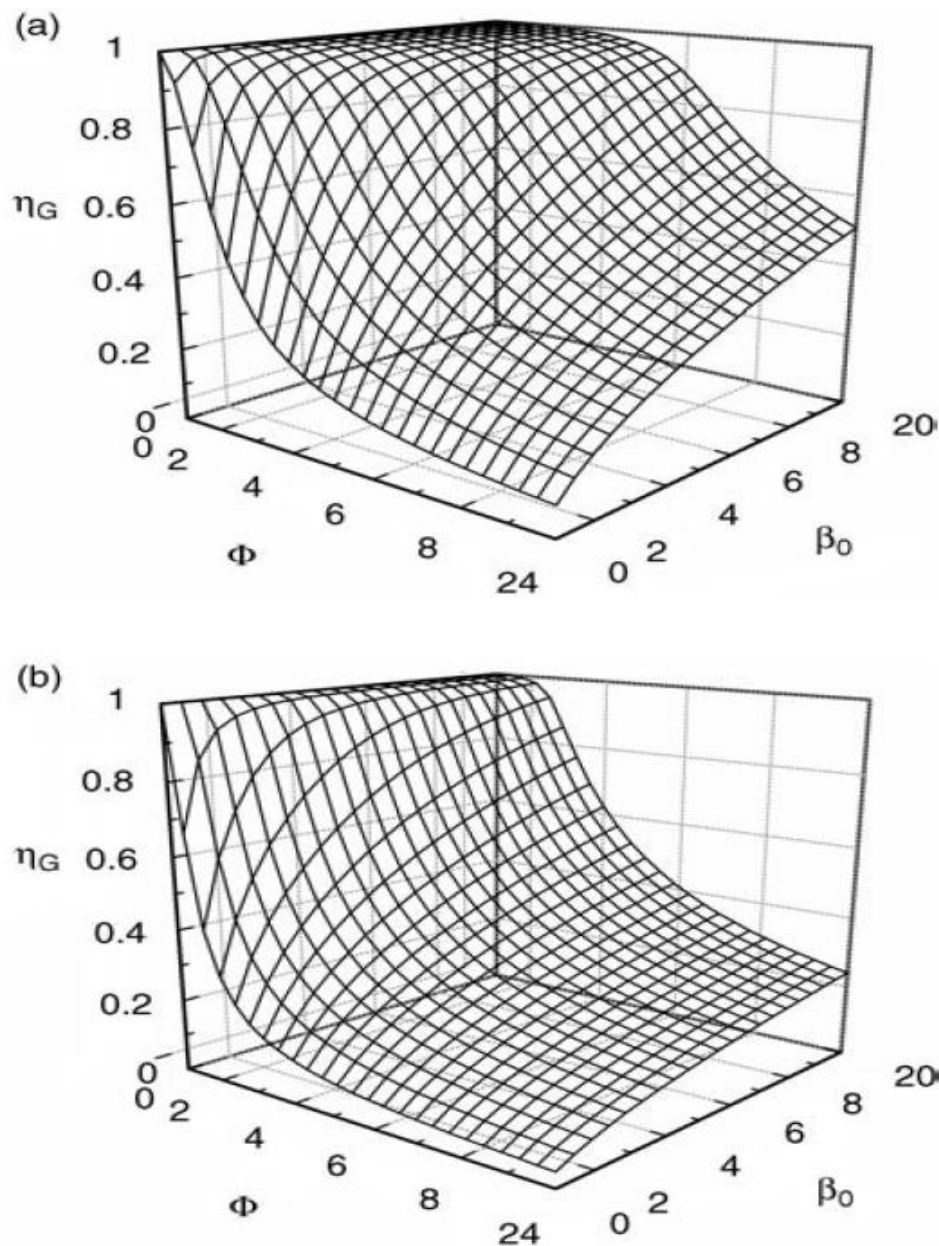


Figure 3.5 Global effectiveness factor (η_G) of an immobilized enzyme with intrinsic Michaelis–Menten kinetics under internal diffusional restrictions as a function of bulk substrate concentration (β_0) and Thiele modulus (Φ). (a) Catalytic slab. (b) Catalytic sphere.

Quando $s \ll K_M \rightarrow \beta \ll 1$, podendo simplificar:

$$v'' = \frac{V''_{\max}}{K_M} \cdot s \longrightarrow \begin{array}{l} \text{Slab} \quad \frac{d^2 \beta}{dz^2} - \Phi^2 \cdot \beta = 0 \\ \text{Sphere} \quad \frac{d^2 \beta}{d\rho^2} + \frac{2}{\rho} \frac{d\beta}{d\rho} - 9\Phi^2 \cdot \beta = 0 \end{array}$$

Nesse caso, há solução analítica

Slab

$$\begin{aligned} \beta &= \beta_0 \frac{\cosh[\Phi(z - 0.5)]}{\cosh[0.5\Phi]} \\ \eta &= \frac{\beta}{\beta_0} = \frac{\cosh[\Phi(z - 0.5)]}{\cosh[0.5\Phi]} \\ \eta_G &= \frac{\tanh \frac{\Phi}{2}}{\frac{\Phi}{2}} \end{aligned}$$

Esfera

$$\begin{aligned} \beta &= \beta_0 \frac{\sinh[3\Phi \cdot \rho]}{\rho \cdot \sinh[3\Phi]} \\ \eta &= \frac{\beta}{\beta_0} = \frac{\sinh[3\Phi \cdot \rho]}{\rho \cdot \sinh[3\Phi]} \\ \eta_G &= \frac{1}{\Phi} \cdot \left[\frac{1}{\tanh(3\Phi)} - \frac{1}{3\Phi} \right] \end{aligned}$$

Obs: Em um reator essa condição nunca acontece, S é geralmente da ordem de grandeza do K_M

Restrições Externa e Interna

Para geometrias complexas ou indefinidas, uma solução aproximada pode ser obtida, introduzindo o real L_{eq} da particular e resolvendo as equações derivadas da particular para as geometrias definidas (slab ou esfera), substituindo a condição de contorno I (agora a restrição diffusional externa é relevante) pela equação de continuidade na interface sólido (suporte)-líquido.

Particle geometry	Boundary Condition (I)
<i>Slab</i>	$h'(s_0 - s_s) = -D_{eff} \cdot \frac{ds}{dX} _{x=0}$ $Bi \cdot (\beta_0 - \beta_s) = -\frac{d\beta}{dz} _{z=0}$
<i>Sphere</i>	$h'(s_0 - s_s) = D_{eff} \cdot \frac{ds}{dr} _{r=R}$ $Bi \cdot (\beta_0 - \beta_s) = \frac{d\beta}{d\rho} _{\rho=1}$

Nº de Biot

$$Bi = \frac{h' \cdot L_{eq}}{D_{eff}}$$

$Bi \gg 1$, Restrições externas desprezíveis, pouco erro é introduzido por esta consideração

$Bi \ll 1$, restrições externas significantes, resolução numerica das equações.

Quando $s \ll KM \rightarrow \beta \ll 1$, há solução analítica

$$\text{Slab} \quad \eta_G = \frac{\tanh \frac{\Phi}{2}}{\frac{\Phi}{2} \left(1 + \frac{\Phi}{2} \cdot \tanh \frac{\frac{\Phi}{2}}{Bi} \right)}$$

$$\text{Sphere} \quad \eta_G = \frac{Bi \left(\frac{1}{\tanh(3\Phi)} - \frac{1}{3 \cdot \Phi} \right)}{\Phi \left(Bi - 1 + \frac{3\Phi}{\tanh(3\Phi)} \right)}$$

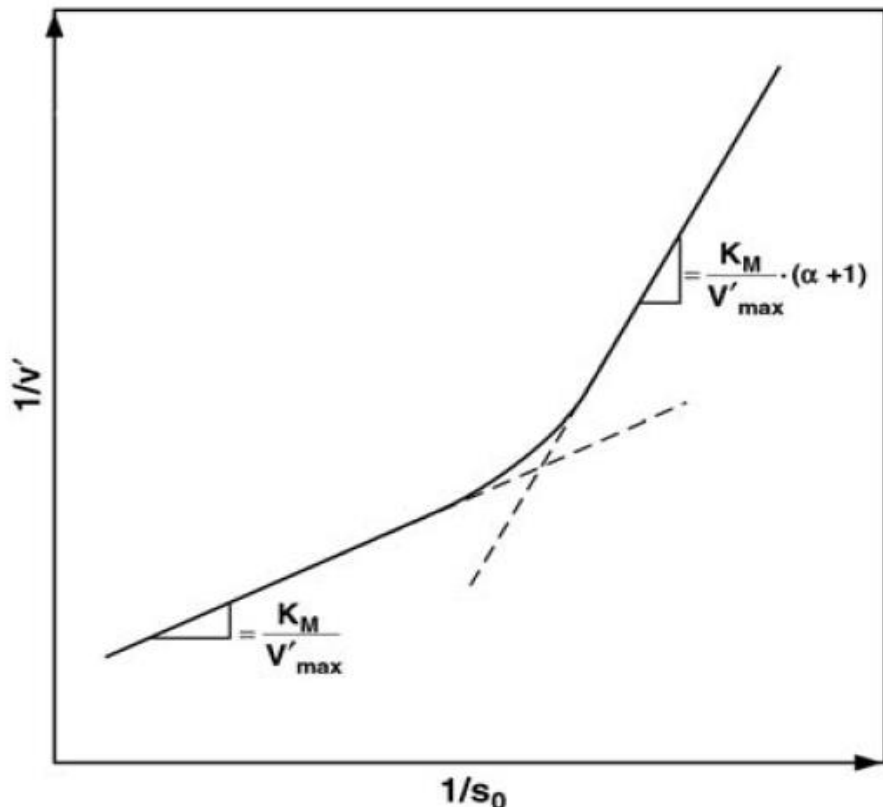
Determinação de Parametros Intrinsecos

1) Plote um grafico de $1/v \times 1/S_0 \rightarrow$ Se linhas retas forem obtidas $\rightarrow$ limitações de transferencia de massa desprezíveis

$\rightarrow$ Se curva monotônica de inclinação progressivamente crescente $\rightarrow$ restrição externa relevante

$\rightarrow$ Curva com ponto de inflexão $\rightarrow$ restrição interna tb é relevante

Restrições Difusionais Externas



Zone of s_0

Equation

(1) $s_0 \gg K_M$

$$\frac{1}{v'} = \frac{K_M}{V'_{\max}} \cdot \frac{1}{s_0} + \frac{1}{V'_{\max}}$$

(2) $s_0 \ll K_M$

$$\frac{1}{v'} = \frac{K_M}{V'_{\max}} \cdot (\alpha + 1) \cdot \frac{1}{s_0}$$

V'_m e K_M são obtidos por intercessão nos eixos da reta da zona 1 ($s_0 \gg K_M$), enquanto α é obtido:

$$\alpha = \frac{\text{Slope zone 2}}{\text{Slope zone 1}} - 1$$

Coeficiente de transferencia de massa (h)

$$Sh = cRe^a Sc^b$$

Sh → nº de Sherwood

Re → nº de Reynolds

Sc → nº de Schmidt

$$Sh = \frac{hd_p}{D_s}$$

$$Re = \frac{vd_p\rho}{\mu}$$

$$Sc = \frac{D_s\rho}{\mu}$$

d_p → diâmetro da partícula

D_s → coeficiente de difusão

v → velocidade do líquido

ρ → densidade

μ → viscosidade dinâmica

Obs. Método deve ser usado com cuidado.

- As faixas de valores de $[S]$ são suscetíveis a erros (baixos valores de $[S]$ e de $[v]$, necessário baixíssimo desvio padrão).
- $[S]$ é limitada pela sua solubilidade no meio, o que pode dificultar a obtenção de dados
- O regime de escoamento deve ser controlado, especialmente a taxa de agitação

Restrições Difusionais Internas

Intrinsic kinetic parameters (V''_{max} , K_m) and effective substrate diffusion coefficients within the catalyst matrix (D_{eff}).

- Se aproximar de uma condição com $\downarrow\downarrow\Phi \rightarrow$ parâmetros intrínsecos
 - Minimizar a matriz para obter partículas de tamanho muito reduzido $\rightarrow$ problema: pode alterar a configuração enzimática
 - Reduzir a carga enzimática para se ter um a_{sp} baixo
- Os experimentos devem ocorrer com agitação baixa para que os efeitos de restrição externa sejam desprezíveis
- Também pode-se utilizar mesmo procedimento da restrição difusional externa, sendo que η_G pode ser estimado pela intersecção do eixo y com linha extrapolada da zona 2, obtendo $1/(V''_{max} \cdot \eta_G)$

Coeficiente de difusão efetivo (Deff)

$D_0 \rightarrow$ coeficiente de difusão em água do substrato

$\varepsilon \rightarrow$ porosidade do suporte

$Z \rightarrow$ tortuosidade

$$D_{eff} = D_0 \frac{\varepsilon}{Z}$$

$D_{eff} \sim 20 - 80\% D_0$, $\rightarrow$ pode ser determinado quimicamente ou por substrato marcado com isotopos radioativos

For spherical particles of radius R_p , the following simplified expression is deduced:

$$\ln\left(\frac{s_{\infty} - s_t}{s_{\infty}}\right) = -\frac{\pi^2 \cdot D_{eff}}{R_p^2} \cdot t + constant$$

$s_{\infty} \rightarrow$ Concentração de substrato com saturação máxima no interior do suporte

Exercício 1

Bovine trypsin (EC 3.4.21.4) is immobilized in the surface of magnetic particles. The enzyme catalyzes the hydrolysis of benzoyl arginine ethyl ester (BAEE) into benzoyl arginine (BA) and ethyl alcohol (A) and the following kinetic data are gathered under conditions at which external diffusional restrictions are negligible:

[BAEE] (mM)	v (mmol · h ⁻¹ · cm ⁻²)	
	[A] = 0 mM	[A] = 30 mM
15	27.78	24.19
30	35.71	32.61
45	39.47	36.89
60	41.67	39.47
90	44.12	42.45

Determine the intrinsic kinetic parameters of the enzyme and analyze the accuracy of the results obtained. If under the conditions of use, the film transport coefficient of BAEE is 10 cm · min⁻¹ and the concentration of BAEE in the bulk liquid medium is 120 mM, determine the effectiveness factor of the catalyst (assume that inhibition by A is negligible).

Exercício 2

The intrinsic kinetic parameters of an immobilized β -galactosidase (EC 3.2.1.23) from *Aspergillus oryzae* in polyacrylamide gel are: $V''_{\max} = 250 \mu\text{moles of hydrolyzed lactose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{catalyst}}^{-1}$ and $K_M = 58 \text{ mM}$. The diffusion coefficient of lactose in the gel is $5.1 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$. Determine the maximum size of catalyst particle that can be used to obtain a global effectiveness factor greater than 90%. The density of the polyacrylamide gel is $1.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Assume first-order kinetics.

Exercício 3

An enzyme electrode, designed for the determination of penicillin during fermentation, is constructed based on penicillinase (penicillin amido- β -lactamhydrolase, EC 3.5.2.6) from *Bacillus cereus* immobilized in a polypropylene membrane of dimensions $1 \times 0.5 \times 0.1$ cm coupled to a glass electrode (the enzyme catalyzes the hydrolysis of penicillin to penicilloic acid). The $V''_{\max}$ and K_M obtained with this enzyme are $1 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and 50 mM, respectively. The diffusion coefficient for penicillin in the membrane is $10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Determine the global effectiveness factor, assuming first-order kinetics for penicillin hydrolysis. Make any other assumptions explicit.

Exercício 4

The enzyme succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) catalyzes the reduction of succinate into fumarate and is inhibited competitively by malonate. For the production of fumarate, whole cells of *Escherichia coli* immobilized in the outer layer of spherical polyacrylamide-coated ceramic particles are used. Determine the expression of the effectiveness factor as a function of the Damkoehler number for a system in which the concentrations of succinate and malonate in the bulk liquid are equal to the respective dissociation constants of their enzyme secondary complexes.

Exercício 5

A β -galactosidase of *Aspergillus oryzae* is immobilized in glyoxyl agarose spherical gel particles. In order to evaluate the immobilization process, catalysts are characterized in terms of their hydrolytic activity on the artificial substrate *o*-nitrophenyl-galactoside (*o*-NPG), measured at 15 mM *o*-NPG, pH 4.5, and 40 °C. The catalyst has 3000 IU $\cdot$ g⁻¹ of support (where 1 IU is the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μ mole of *o*-NPG under these conditions), a density of 0.96 g $\cdot$ cm⁻³, and an average particle size of 150 μ m. The soluble β -galactosidase has a $V_{\max}$ of 196 000 μ mol $\cdot$ g⁻¹ $\cdot$ min⁻¹ and a K_M of 1.5 mM. It is suspected that the results are influenced by the presence of IDR. Estimate the catalyst's global effectiveness factor.