



PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA
DE VALPARAISO



ESCUELA DE
INGENIERÍA
BIOQUÍMICA



XCLAB
Curso Latinoamericano
de Biotecnología
24 al 29 de julio
2016
Valparaíso | Chile

Taller de Biocatálisis Enzimática

Lorena Wilson
Andrea Ruiz
Carlos Vera

Escuela de Ingeniería Bioquímica

*Tradición en Bioprocesos
desde 1970*



Valparaíso, julio 26, 2016

- ❖ **Caso de estudio**
- ❖ **Mecanismo de reacción**
- ❖ **Cinética enzimática**
- ❖ **Estimación de parámetros**
- ❖ **Reactores ideales**

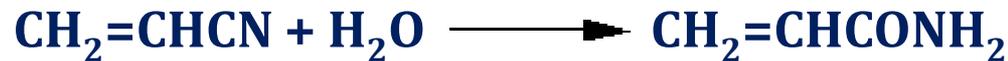


Caso de estudio



Situación actual

La acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$) es la materia prima para la producción de un amplio rango de materiales poliméricos. A escala industrial es producida por hidratación del acrilonitrilo ($\text{CH}_2=\text{CHCN}$):



Hasta hace algunas décadas, la reacción se llevaba a cabo utilizando un catalizador de cobre reducido (Cu^+). El rendimiento de este proceso era bajo, debido a la presencia de reacciones indeseadas de polimerización y la formación de ácido acrílico. Además, el proceso requería de temperaturas elevadas (80-140 °C) y la regeneración del catalizador era laboriosa.



Situación actual

A principios de la década 1990, estos problemas fueron superados por el uso de la enzima nitrilo hidratasa. Nitto Chemical Industry Co. Ltd comenzó a emplear células de *Rhodococcus sp.* inmovilizadas, porque poseen una alta actividad de nitrilo hidratasa y una baja actividad de amidasa, enzima que degrada la acrilamida a ácido acrílico. El catalizador es preparado por atrapamiento de las células en un gel de poliacrilamida/dimetilaminoetilmetacrilato (10 %). La reacción se lleva a cabo a 10 °C y valores de pH entre 8 y 8.5 en modalidad de lote alimentado, manteniendo la concentración de acrilonitrilo por debajo de 0.3 % (p/v) para reducir el impacto de la inhibición por sustrato. El biocatalizador se agrega a una concentración de 1% (p/v), que corresponde aproximadamente a 50000 UI/L. A las 24h de reacción, la concentración de acrilamida es de 20% (p/v), verificándose cantidades despreciables de sustrato y ácido acrílico en el producto. La producción de acrilamida por este método alcanzó las 4000 ton/año en 2005.



Dilema

La empresa desea evaluar la producción de acrilamida en reactores continuos de tanque agitado (RCTA) y de lecho empacado (RCLE) empleando el biocatalizador indicado anteriormente. Se le solicita a Ud. construir la curva de operación (Conversión versus tiempo adimensional) para ambos reactores. Determine la conversión alcanzada si cada reactor es cargado con 10000 kg del biocatalizador y debe procesar 100 m³/d de una solución de acrilonitrilo 500 mM, de igual manera que en el proceso existente por lote alimentado. ¿Qué masa de biocatalizador se requiere para alcanzar una tarea de producción anual de 1250 ton/año, manteniendo la alimentación antes señalada?

Dato: El biocatalizador posee inhibición competitiva por producto y incompetitiva por sustrato. Los siguientes experimentos fueron realizados para caracterizar cinéticamente el biocatalizador.



Datos

Acrilonitrilo (mM)	Velocidad inicial de reacción (mol·g⁻¹·h⁻¹)
2	0.093
4	0.186
6	0.258
8	0.262
10	0.308
15	0.345
20	0.397
30	0.387
60	0.397
90	0.287
100	0.276
150	0.237
200	0.186
300	0.139



Datos

Velocidad inicial de reacción ($\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)					
Acrilonitrilo (mM)	Acrilamida (mM)				
	0	40	80	120	160
2	0.093	0.076	0.058	0.047	0.039
4	0.186	0.149	0.118	0.086	0.075
6	0.258	0.190	0.151	0.125	0.107
8	0.262	0.234	0.189	0.158	0.136
10	0.308	0.270	0.221	0.187	0.162
15	0.345	0.313	0.281	0.243	0.205
20	0.397	0.369	0.321	0.283	0.264



Solución



Mecanismo de reacción



Mecanismo de reacción

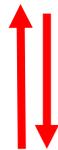


+

+

P

S



EP

ESS

Donde:

E: nitrilo hidratasa

S: acrilonitrilo

P: acrilamida

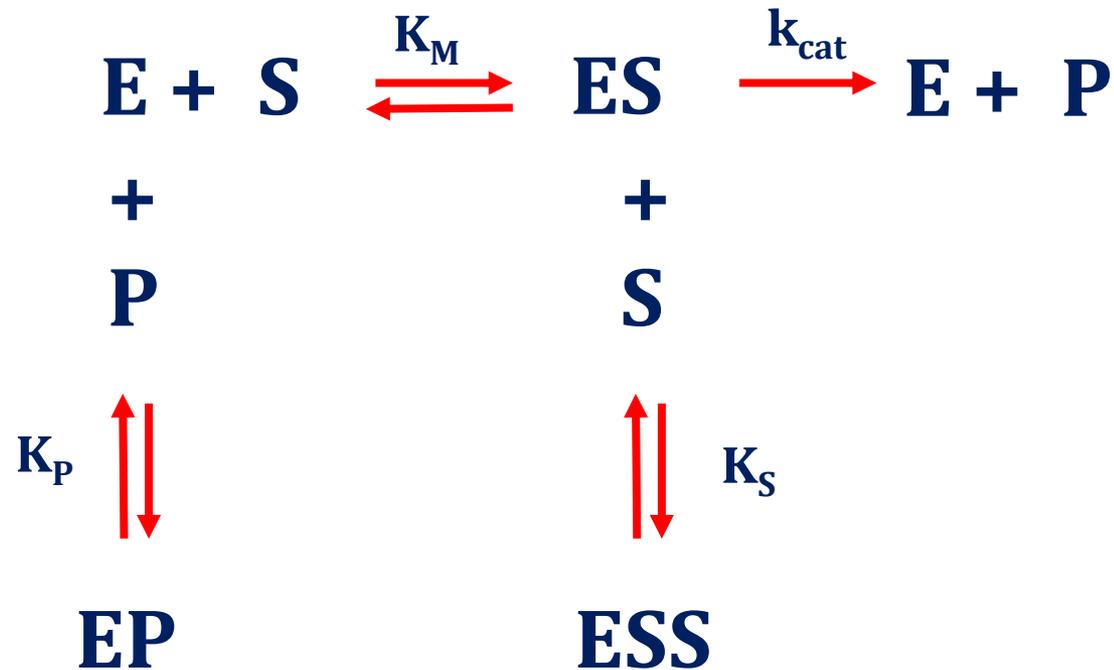
Inhibición
competitiva
total por P

Inhibición
Acompetitiva
total por S



Mecanismo de reacción

Asumiendo equilibrio rápido



Donde: $K_M = \frac{E \cdot S}{ES}$ $K_P = \frac{E \cdot P}{EP}$ $K_S = \frac{ES \cdot S}{ESS}$



Cinética enzimática



Cinética enzimática

Aplicando la ley de acción de masas

$$v = k_{\text{cat}} \cdot \text{ES} \quad (1)$$

Realizando un balance a las especies enzimáticas

$$E_T = E + \text{ES} + \text{EP} + \text{EP} \quad (2)$$

Utilizando la definición de las constantes K_M , K_P y K_S

$$E_T = \left(\frac{K_M}{S} + 1 + \frac{K_M}{S} \cdot \frac{P}{K_P} + \frac{S}{K_S} \right) \cdot \text{ES} \quad (3)$$



Cinética enzimática

Reemplazando (3) en (1)

$$v = \frac{k_{\text{cat}} \cdot E_T}{\left(\frac{K_M}{S} + 1 + \frac{K_M}{S} \cdot \frac{P}{K_P} + \frac{S}{K_S} \right)} \quad (4)$$

Reordenando

$$v = \frac{V_{\text{Max}} \cdot S}{K_M \cdot \left(1 + \frac{P}{K_P} \right) + S \cdot \left(1 + \frac{S}{K_S} \right)} \quad (5)$$

Donde $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} \cdot E_T$



Estimación de los parámetros cinéticos



Estimación de parámetros

Inhibición acompetitiva por S:

Para $P \ll K_p$ y $S \ll K_s$

$$v \approx \frac{V_{\text{Max}} \cdot S}{K_M + S} \quad (6)$$

Tomando el inverso de (6)

$$\frac{1}{v} \approx \frac{1}{V_{\text{Max}}} + \frac{K_M}{V_{\text{Max}}} \cdot \frac{1}{S} \quad (7)$$



Estimación de parámetros

Inhibición acompetitiva por S:

Para $P \ll K_p$ y $S \gg K_s$

$$v = \frac{V_{\text{Max}} \cdot S}{K_M + \frac{S}{K_S} + S^2} \quad (8)$$

Tomando el inverso de (8)

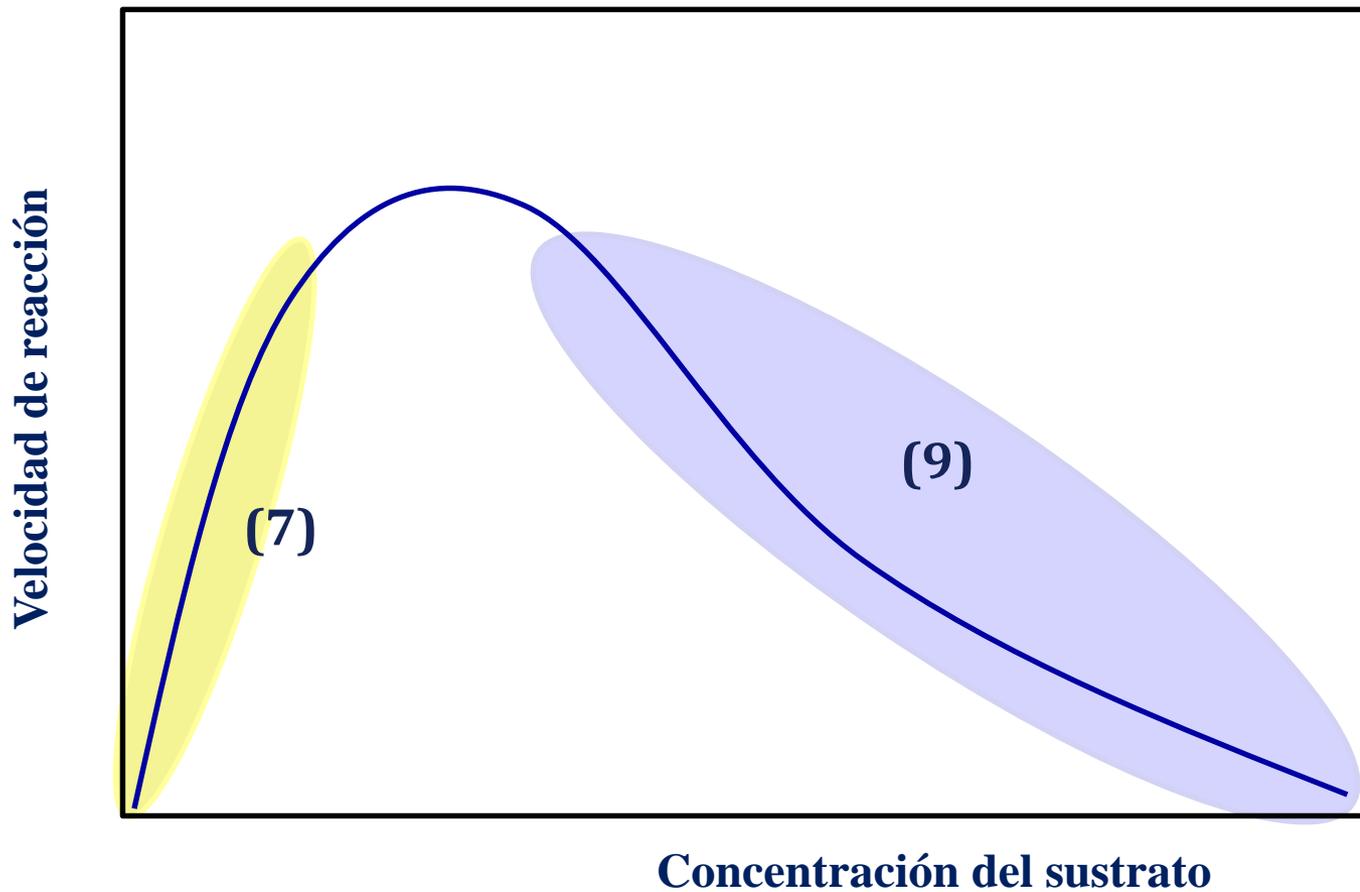
$$\frac{1}{v} \approx \frac{1}{V_{\text{Max}}} + \frac{K_M}{V_{\text{Max}}} \frac{1}{S} + \frac{S}{K_S \cdot V_{\text{Max}}}$$

$$\frac{1}{v} \approx \frac{1}{V_{\text{Max}}} + \frac{S}{K_S \cdot V_{\text{Max}}} \quad (9)$$



Estimación de parámetros

Inhibición acompetitiva por S:



Estimación de parámetros

Inhibición competitiva por P:

Asumiendo $S \ll K_s$

$$v \approx \frac{V_{\text{Max}} \cdot S}{K_M \cdot \left(1 + \frac{P}{K_P}\right) + S} \approx \frac{V_{\text{Max}} \cdot S}{K_{ap} + S} \quad (10)$$

Tomando el inverso de (10)

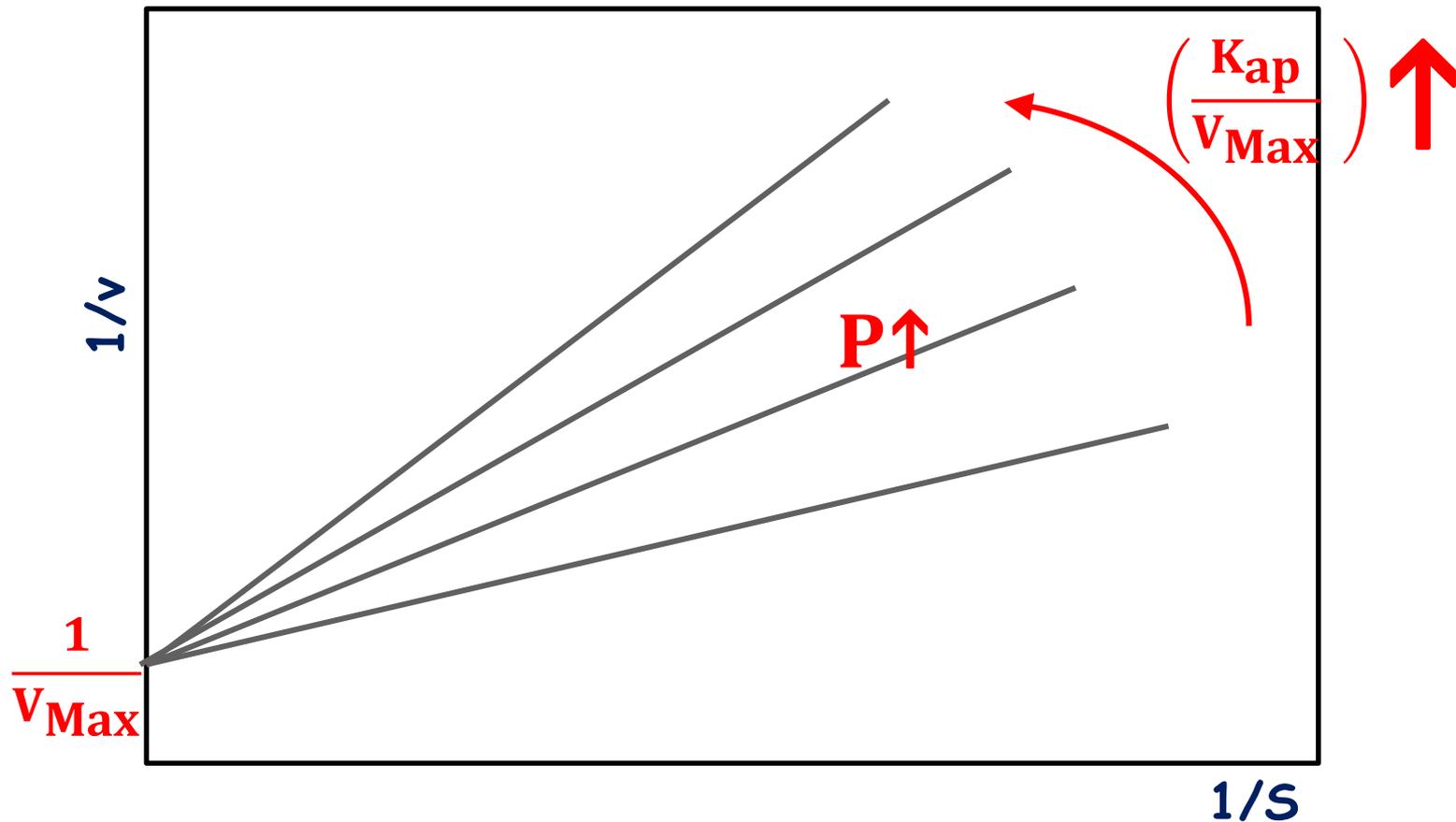
$$\frac{1}{v} \approx \frac{1}{V_{\text{Max}}} + \frac{K_{ap}}{V_{\text{Max}}} \cdot \frac{1}{S} \quad (11)$$



Estimación de parámetros

Inhibición competitiva por P:

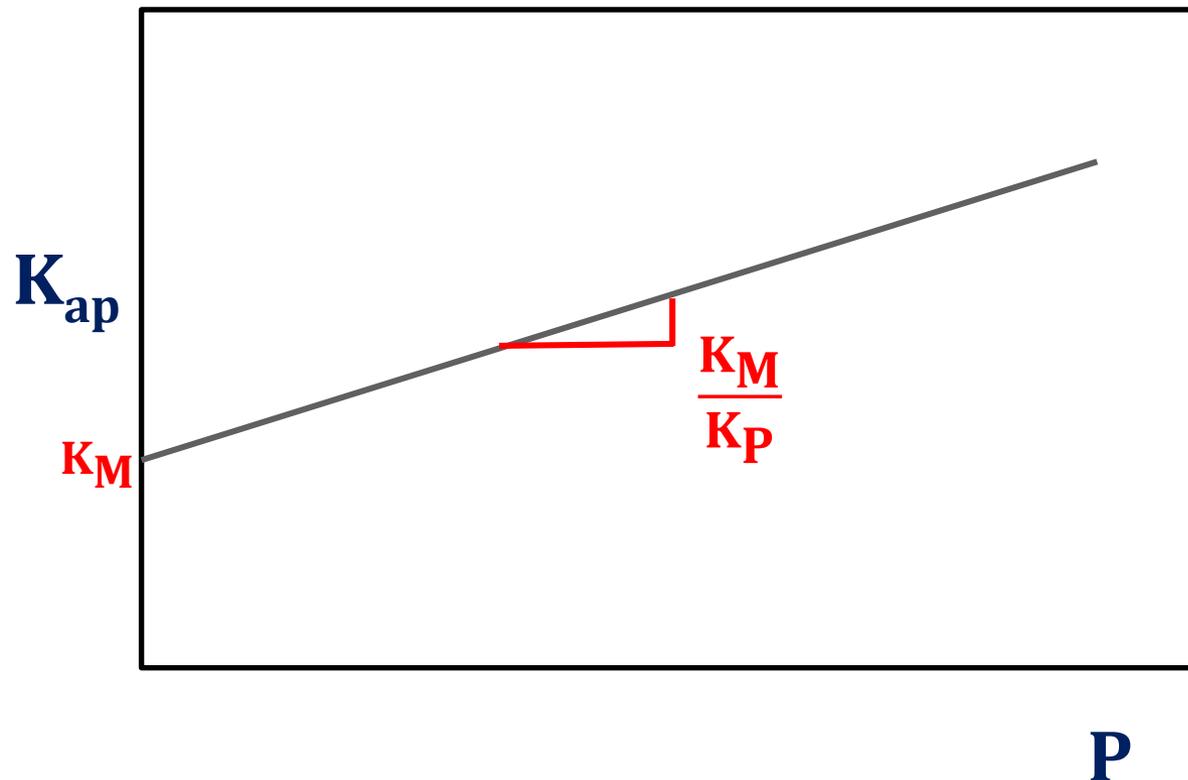
Para diferentes concentraciones iniciales de P



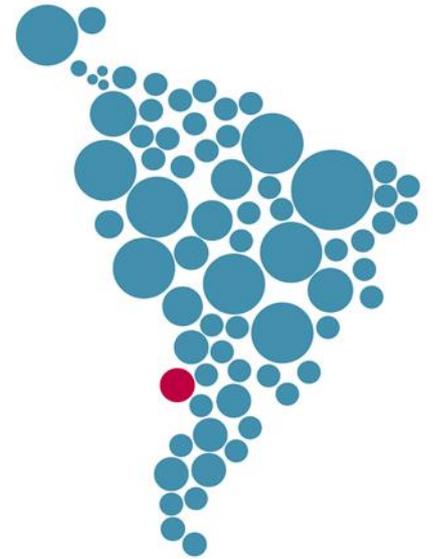
Estimación de parámetros

Inhibición competitiva por P:

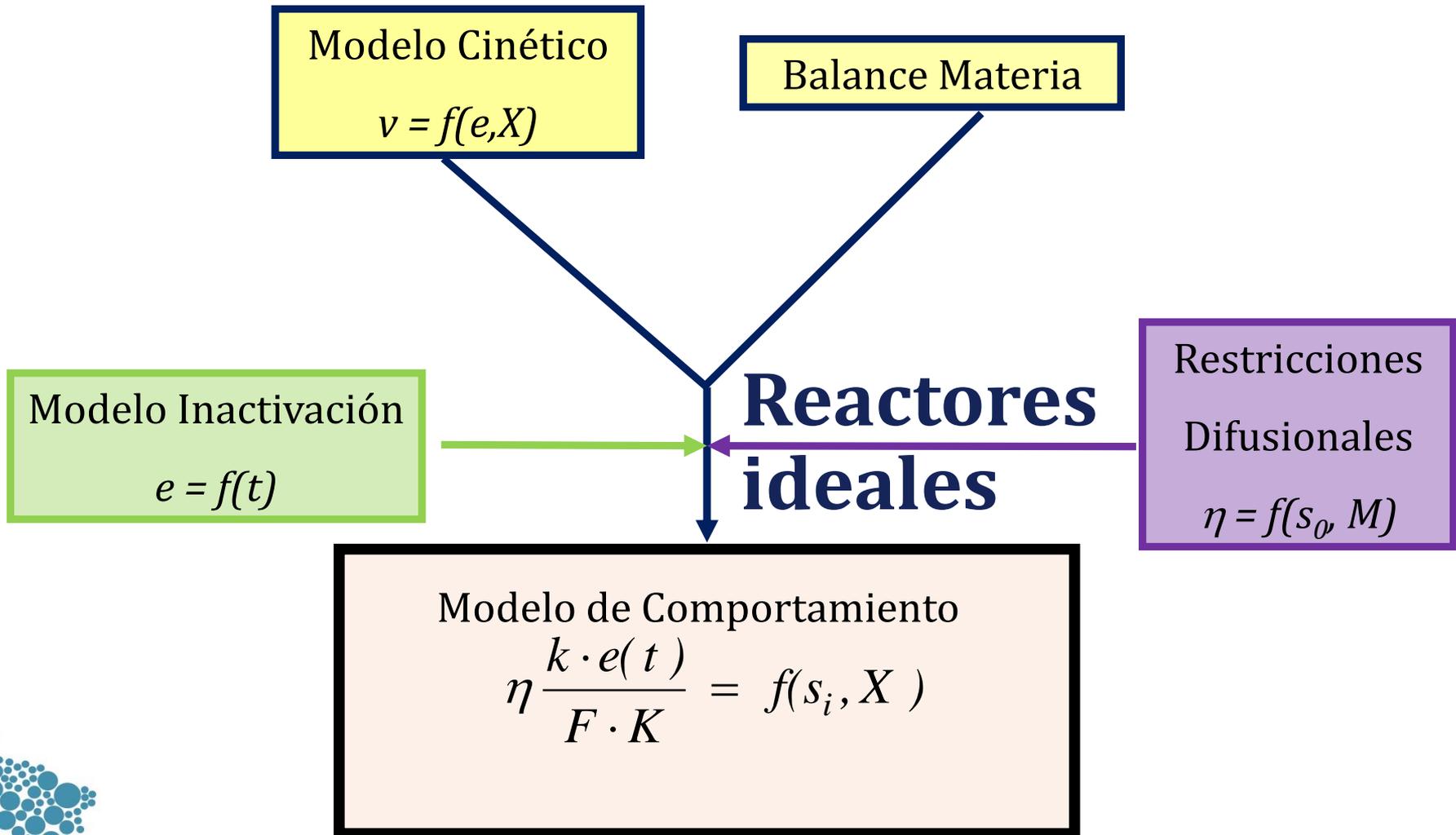
Dado que: $K_{ap} = K_M \cdot \left(1 + \frac{P}{K_P}\right) = K_M + \frac{K_M}{K_P} \cdot P$



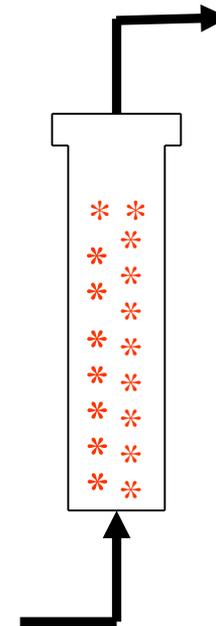
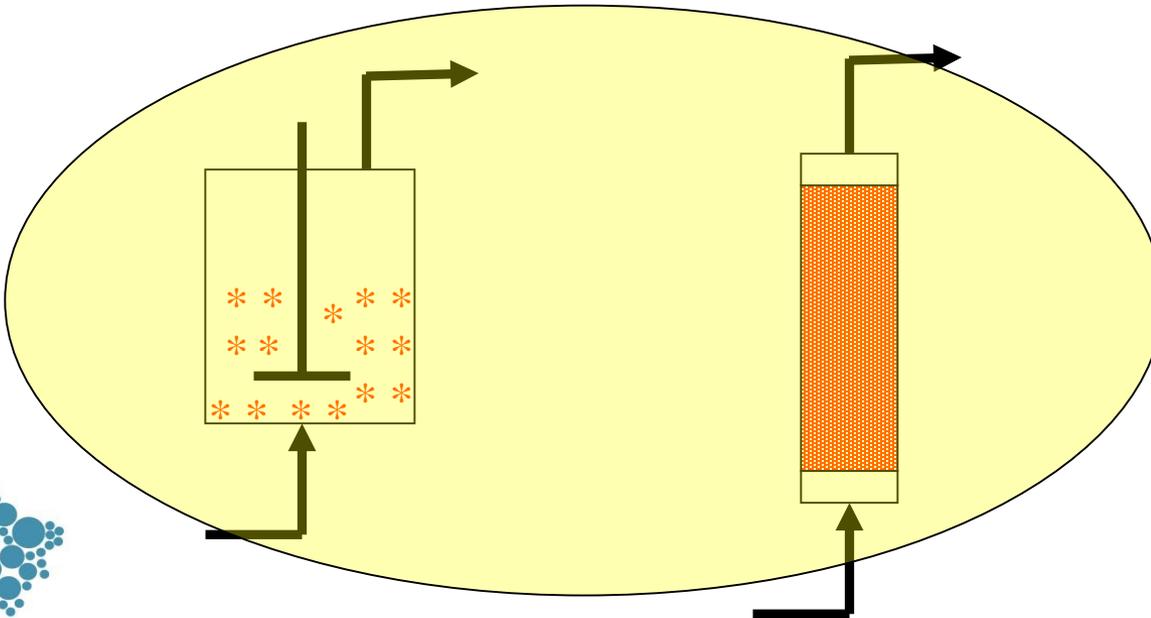
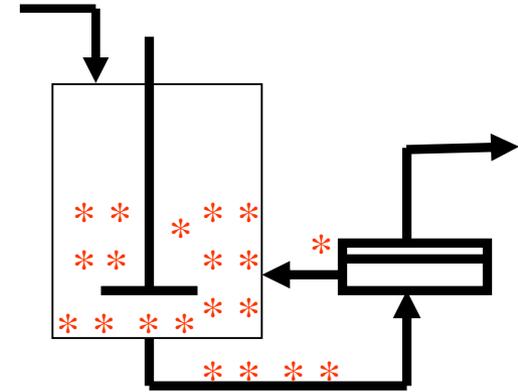
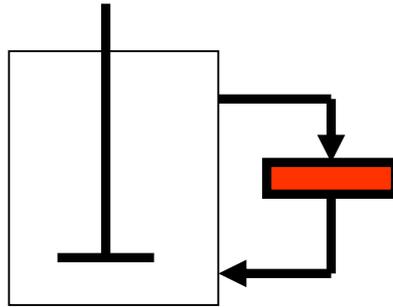
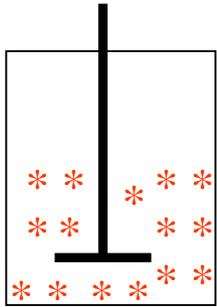
Reactores reales



Diseño y operación de reactores enzimáticos

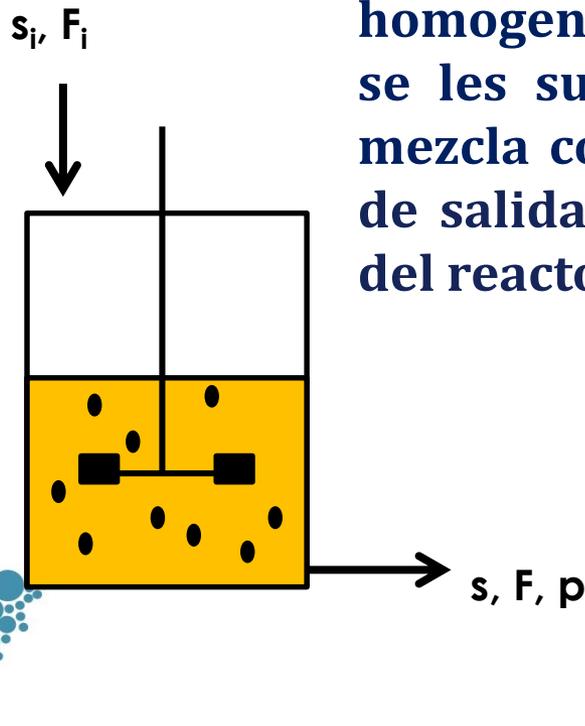


Tipos de reactores enzimáticos



Reactor continuo de tanque agitado

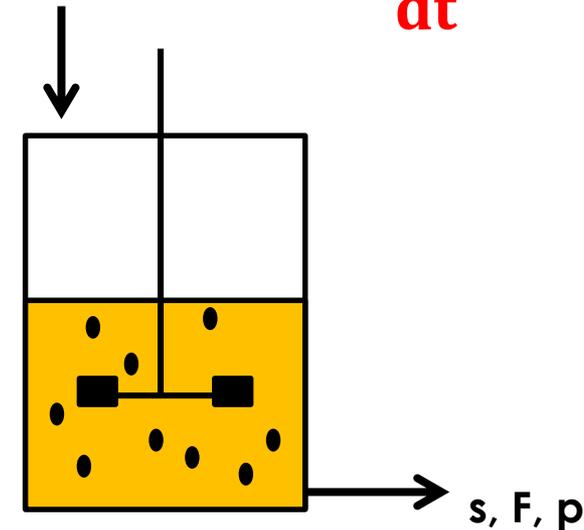
En un reactor continuo de tanque de agitado (RCTA) existe un ingreso y una salida continua de sustratos y productos. Estos reactores se caracterizan por la presencia una agitación vigorosa que permite alcanzar un alto grado de homogeneidad al interior reactor. Por este motivo se les suele denominar, reactores continuos de mezcla completa. Por este motivo, las condiciones de salida corresponden a las condiciones dentro del reactor.



Reactor continuo de tanque agitado

Realizando un BM al sustrato: $S \xrightarrow{E} P$

$$\frac{dS \cdot V_R}{dt} = \text{Entrada} - \text{Salida} + \text{Generación} - \text{Consumo}$$



$$\frac{dS \cdot V_R}{dt} = F_i \cdot S_i - F \cdot S - v \cdot V_R$$

Suponiendo :

- Operación en estado estacionario
- Volumen de reacción constante
- Operación isotérmica
- Igual densidad de las corrientes de entrada y salida



Reactor continuo de tanque agitado

Se tiene

$$V_R \frac{dS}{dt} = 0 = F \cdot (S_i - S) - v \cdot V_R$$

$$\tau = \frac{V_R}{F} = \frac{(S_i - S)}{v}$$

Expresando S en función del grado

$$S = S_i \cdot (1 - X)$$



Reactor continuo de tanque agitado

Se obtiene que el comportamiento del reactor esta determinado por

$$\frac{\tau}{S_i} = \frac{X}{v} \quad (12)$$

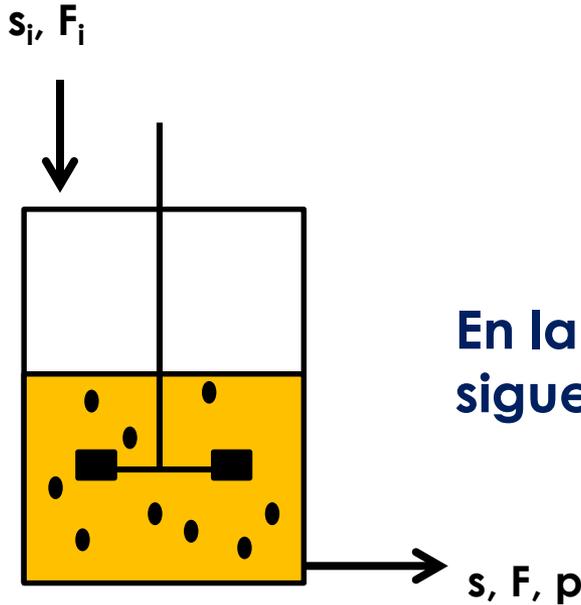
Reemplazando en (12) la expresión cinética correspondiente para la nitrilo hidratasa

$$\frac{S_i}{K_M} \cdot X + \frac{X}{1-X} + \frac{S_i}{K_P} \cdot \frac{X^2}{1-X} + \frac{S_i^2}{K_M \cdot K_S} \cdot X \cdot (1-X) = \frac{V_{Max}}{K_M} \tau$$

(13)



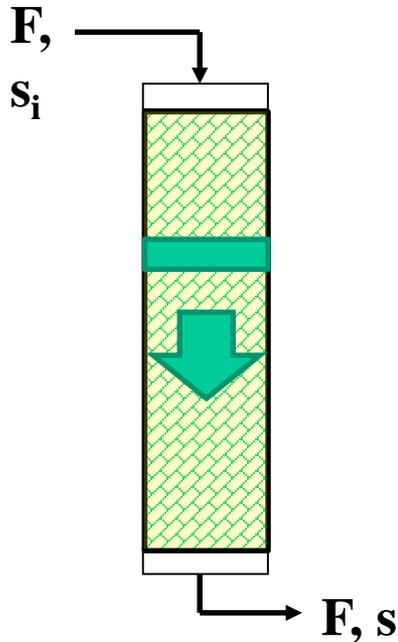
Reactor continuo de tanque agitado



En la practica, resulta útil expresar (13) como sigue:

$$\frac{S_i}{K_M} \cdot X + \frac{X}{1-X} + \frac{S_i}{K_P} \cdot \frac{X^2}{1-X} + \frac{S_i^2}{K_M \cdot K_S} \cdot X \cdot (1-X) = \frac{M_{cat} \cdot a_{sp}}{K_M \cdot F} \quad (14)$$

Reactor continuo de lecho empacado



En un reactor continuo de lecho empacado (RCLE) el sustrato se consume a medida que avanza por el reactor, por lo que la concentración de sustratos y productos varia a lo largo del reactor.

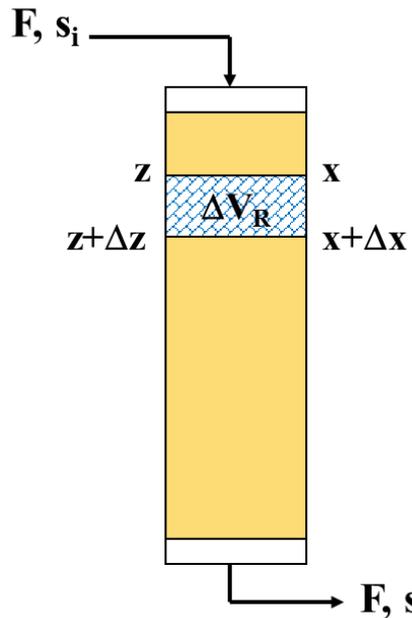
Este tipo de reactor, recibe su nombre debido que en él se ha se dispuesto un lecho fijo de catalizador (enzima inmovilizada).

Se asumirá que el reactor opera isotérmicamente, en ausencia de dispersión axial



Reactor continuo de lecho empacado

Realizando un balance de masa a una porción infinitesimal del reactor



$$\frac{dS \cdot V_R}{dt} = F \cdot S|_z - F \cdot S|_{z+\Delta z} - v \cdot V_R$$

Asumiendo estado estacionario

$$V_R \frac{dS}{dt} = 0 = F \cdot S|_z - F \cdot S|_{z+\Delta z} - v \cdot V_R$$



Reactor continuo de lecho empacado

Considerando que

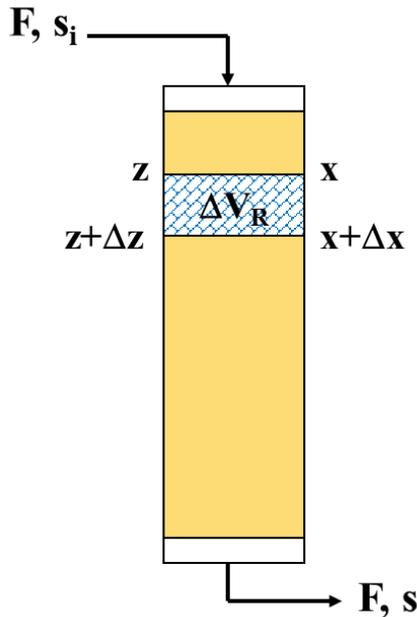
$$V_R = A \cdot \Delta z \cdot \varepsilon$$

Se obtiene

$$\frac{F \cdot S|_z - F \cdot S|_{z+\Delta z}}{\Delta z} = v \cdot A \cdot \varepsilon$$

Tomando el limite cuando Δz tiende a cero

$$-F \cdot \frac{dS}{dz} = v \cdot A \cdot \varepsilon$$



Reactor continuo de lecho empacado

Expresando S en función de X

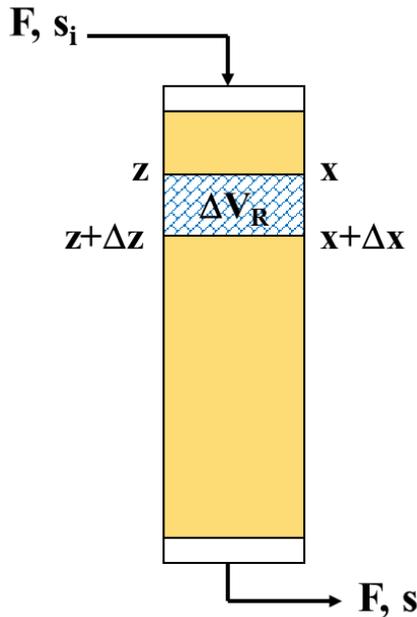
$$S = S_i \cdot (1 - X) \quad \frac{dS}{dZ} = - S_i \cdot \frac{dX}{dZ}$$

Se obtiene

$$F \cdot S_i \cdot \frac{dX}{dz} = v \cdot A \cdot \epsilon$$

Reordenando

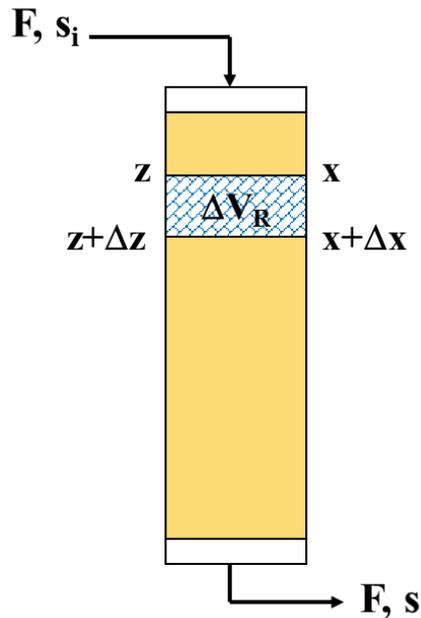
$$\frac{dX}{v} = \frac{A \cdot \epsilon}{S_i \cdot F} dz$$



Reactor continuo de lecho empacado

Integrando

$$\int \frac{dX}{v} = \int \frac{A \cdot \varepsilon}{S_i \cdot F} dz = \frac{V_R}{S_i \cdot F} = \frac{\tau}{S_i}$$



Se obtiene la ecuación (15) que describe el comportamiento de un reactor ideal de lecho empacado

$$\int \frac{dX}{v} = \frac{\tau}{S_i} \quad (15)$$

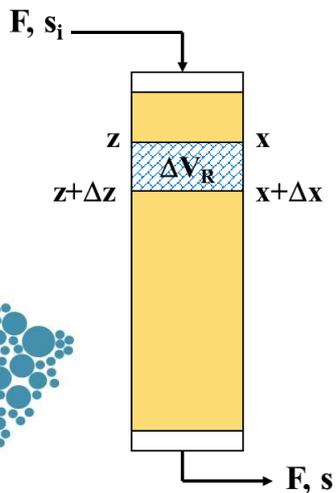


Reactor continuo de lecho empacado

Reemplazando en (15) la expresión cinética correspondiente para la nitrilo hidratasa

$$S_i \cdot X \cdot \left(\frac{1}{K_M} - \frac{1}{K_P} \right) - \left(1 + \frac{S_i}{K_P} \right) \cdot \ln(1-X) + \frac{S_i^2 \cdot X}{K_M \cdot K_S} \cdot (1-0.5 \cdot X) = \frac{M_{cat} \cdot a_{sp}}{F \cdot K_M}$$

(16)





PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA
DE VALPARAISO



ESCUELA DE
INGENIERÍA
BIOQUÍMICA



XCLAB
Curso Latinoamericano
de Biotecnología
24 al 29 de julio
2016
Valparaíso | Chile

Taller de Biocatálisis Enzimática

Lorena Wilson
Andrea Ruiz
Carlos Vera

Escuela de Ingeniería Bioquímica

*Tradición en Bioprocesos
desde 1970*



Valparaíso, julio 26, 2016