



FKITMCMXIX

Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije



Reaktori i bioreaktori

Enzimaska kinetika

Prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Enzimski reakcijska kinetika (Enzimski kinetika)

Enzimski reakcijska kinetika je dio biokemijskog inženjerstva koji se bavi izučavanjem brzine enzimskih reakcija. Dijelimo ju na:

- **Kinetika enzimskih reakcija u homogenoj fazi**
- Kinetika enzimskih reakcija u heterogenoj fazi

Brzina enzimske reakcije

- Brzina enzimske reakcije je intenzivna veličina.
- Definirana je kao promjena broja molova tvari u jedinici vremena.
- Brzina enzimske reakcije je opisana kinetičkim modelom.

Brzina enzimske reakcije

KINETIČKI MODEL enzimske reakcije je matematički izraz koji opisuje vezu između brzine enzimske reakcije i veličina stanja reakcijskog sustava: koncentracije, temperature i/ili tlaka.

$$(-r_A) = f(C_A, C_B, \dots, C_C, C_D, T, p)$$

Kinetički model se postavlja na temelju eksperimentalnih kinetičkih istraživanja.

Kinetički Model

ZAŠTO SU POTREBNI KINETIČKI MODELI ?

- ⇒ zbog procjene konverzije u reaktoru
- ⇒ zbog procjene volumena reaktora
- ⇒ za poopćavanje fizičke slike procesa
- ⇒ za optimiranje procesnih uvjeta
- ⇒ za oponašanje (simulaciju procesa)
- ⇒ za procjenu procesnih varijabli i parametara

Kinetički Model

RAZVOJ MODELA:

- izbor modela
- ispitivanje valjanosti modela
- poopćavanje modela
- potvrda modela (procjena parametara)

Kinetički Model

IZBOR NAJBOLJEG MODELA

Analiza pogreške:

$$SD = \frac{1}{N} \sqrt{\sum_1^N (Y_{\text{exp.}} - Y_{\text{mod.}})^2}$$

$$SD^2 = \frac{1}{N - k} \sum_{i=1}^N (Y_{\text{exp.}} - Y_{\text{mod.}})^2$$

N – broj eksperimentalnih točaka

k – broj parametara koji se procjenjuju

Kinetički Model

IZBOR NAJBOLJEG MODELA

Kriteriji za izbor:

- ✓ najjednostavniji model uz prihvatljivu grešku
- ✓ najmanji broj parametara
- ✓ model izveden na temelju fizičke slike ili mehanizma reakcije
- ✓ model s najmanjim kvadratnim odstupanjem

Enzimaska reakcijska kinetika

Michaelis-Menteničina kinetika:



$$\frac{dc_S}{dt} = -k_1 \cdot c_E \cdot c_S + k_2 \cdot c_{ES}$$

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 \cdot c_E \cdot c_S - k_2 \cdot c_{ES} - k_3 \cdot c_{ES}$$

$$\frac{dc_P}{dt} = k_3 \cdot c_{ES}$$

Pretpostavljeni mehanizam enzimski katalizirane reakcije dan je reakcijskom shemom i pretpostavlja nastajanje međukompleksa u ravnotežnoj reakciji. Nastali međukompleks između enzima i supstrata se u slijednoj reakciji raspada na produkt i nepromijenjeni enzim, a reakciju karakterizira konstanta brzine reakcije k_3 .

PRETPOSTAVKA PSEUDOSTACIONARNOG STANJA – koncentracija međukompleksa je približno konstantna.

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = 0$$

$$k_1 \cdot c_E \cdot c_S - k_2 \cdot c_{ES} - k_3 \cdot c_{ES} = 0$$

$$k_2 \cdot c_{ES} + k_3 \cdot c_{ES} = k_1 \cdot c_E \cdot c_S$$

$$c_{ES} = \frac{k_1 \cdot c_E \cdot c_S}{k_2 + k_3}$$

$$c_{Eo} = c_E + c_{ES}$$

Jednadžba je izvedena na temelju mehanizma reakcije i određenih pretpostavki.

Enzimaska reakcijska kinetika

Michaelis-Menteničina kinetika:

$$c_{ES} = \frac{k_1 \cdot (c_{Eo} - c_{ES}) \cdot c_S}{k_2 + k_3}$$

$$(k_2 + k_3) \cdot c_{ES} = k_1 \cdot c_{Eo} \cdot c_S - k_1 \cdot c_{ES} \cdot c_S$$

$$k_2 \cdot c_{ES} + k_3 \cdot c_{ES} = k_1 \cdot c_{Eo} \cdot c_S - k_1 \cdot c_{ES} \cdot c_S$$

$$k_1 \cdot c_{ES} \cdot c_S + k_2 \cdot c_{ES} + k_3 \cdot c_{ES} = k_1 \cdot c_{Eo} \cdot c_S$$

$$c_{ES} (k_1 \cdot c_S + k_2 + k_3) = k_1 \cdot c_{Eo} \cdot c_S$$

$$c_{ES} = \frac{k_1 \cdot c_{Eo} \cdot c_S}{k_1 \cdot c_S + k_2 + k_3}$$

$$c_{ES} = \frac{c_{Eo} \cdot c_S}{c_S + \frac{k_2 + k_3}{k_1}}$$

$$\frac{dc_P}{dt} = k_3 \cdot \frac{c_{Eo} \cdot c_S}{c_S + \frac{k_2 + k_3}{k_1}}$$

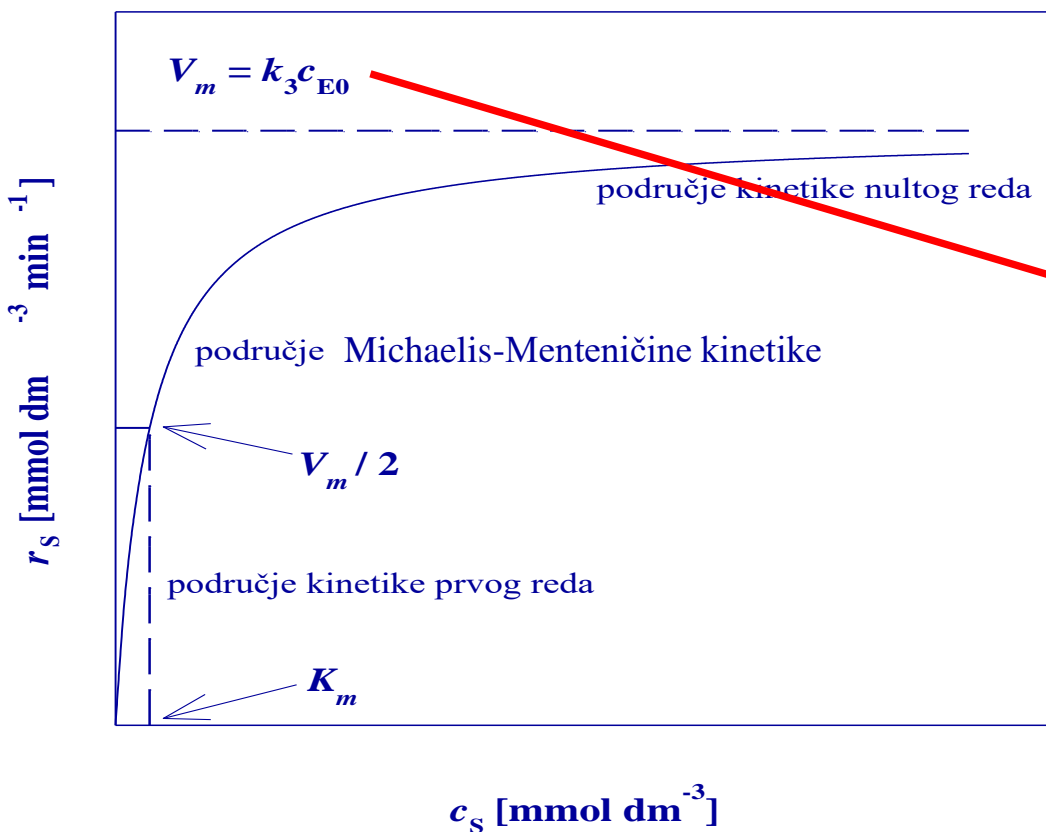
$$\frac{dc_P}{dt} = r_S;$$

$$k_3 \cdot c_{Eo} = V_m$$

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m$$

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m + c_S}$$

Enzimaska reakcijska kinetika



Katalitička konstanta enzima

$$V_m = k_3 \cdot c_{E1}$$

$$r_s = \frac{V_m c_s}{K_m + c_s}$$

Parametri modela :

V_m (ili V_m) i K_m

V_m – maksimalna reakcijska brzina

K_m – Michaelis-ova konstanta (koncentracija supstrata kod koje je reakcijska brzina jednaka polovini maksimalne)

Enzimaska reakcijska kinetika

$$r_s = \frac{V_m c_s}{K_m + c_s}$$

Parametri modela (kinetički parametri) :

V_m (ili V_m) i K_m

V_m – maksimalna reakcijska brzina

K_m – Michaelis-ova konstanta – govori o afinitetu enzima prema supstratu; što je niža vrijednost, to su enzim i supstrat kompatibilniji.

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m$$

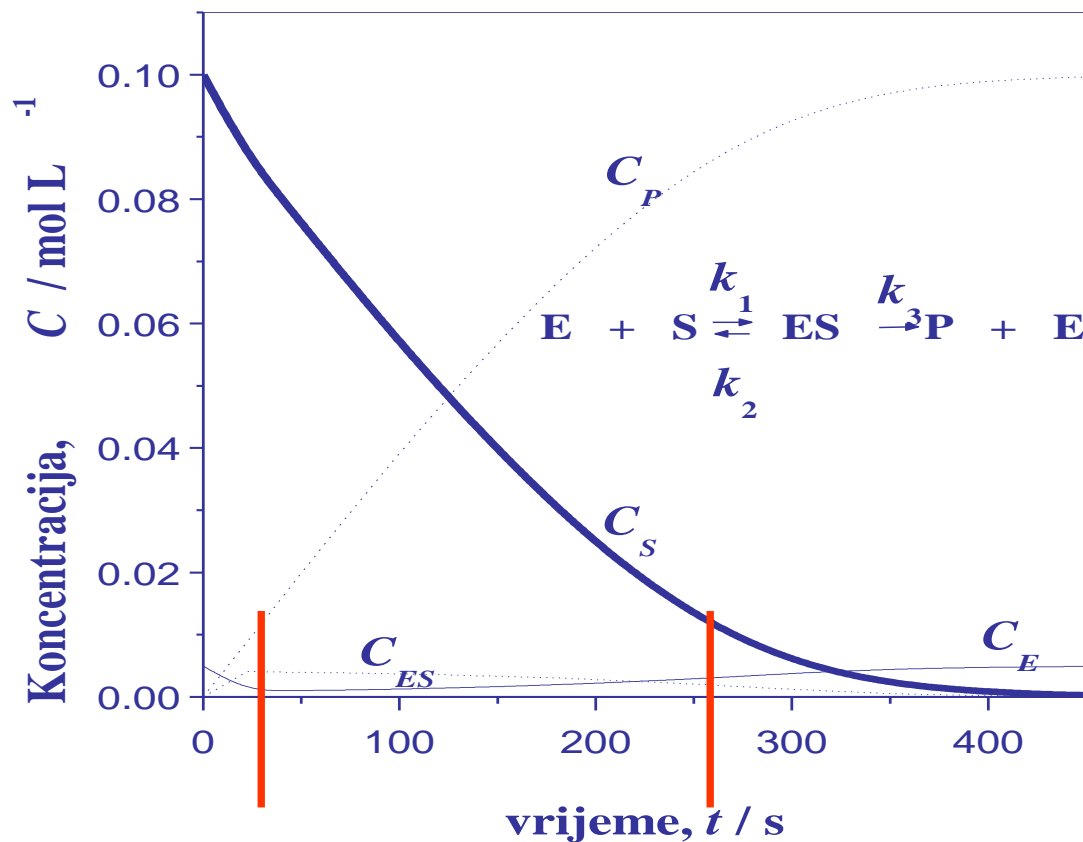
Što je k_1 veća vrijednost u odnosu na k_2+k_3 , to je K_m manji – iz toga slijedi da je reakcija nastajanja međukompleksa ES brža, a time i enzim ima dobar afinitet prema supstratu

Što je k_1 manja vrijednost u odnosu na k_2+k_3 , to je K_m veći, te je brzina nastajanja međukompleksa ES manja. Ovakav enzim ima loš afinitet prema supstratu.

Enzimaska reakcijska kinetika

Michaelis-Menteničina kinetika:

Koncentracijski profili u vremenu



$$c_{E_0} = 0,005 \text{ mol L}^{-1}$$

$$k_1 = 10 \text{ mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$$

$$k_2 = 0,1 \text{ s}^{-1}$$

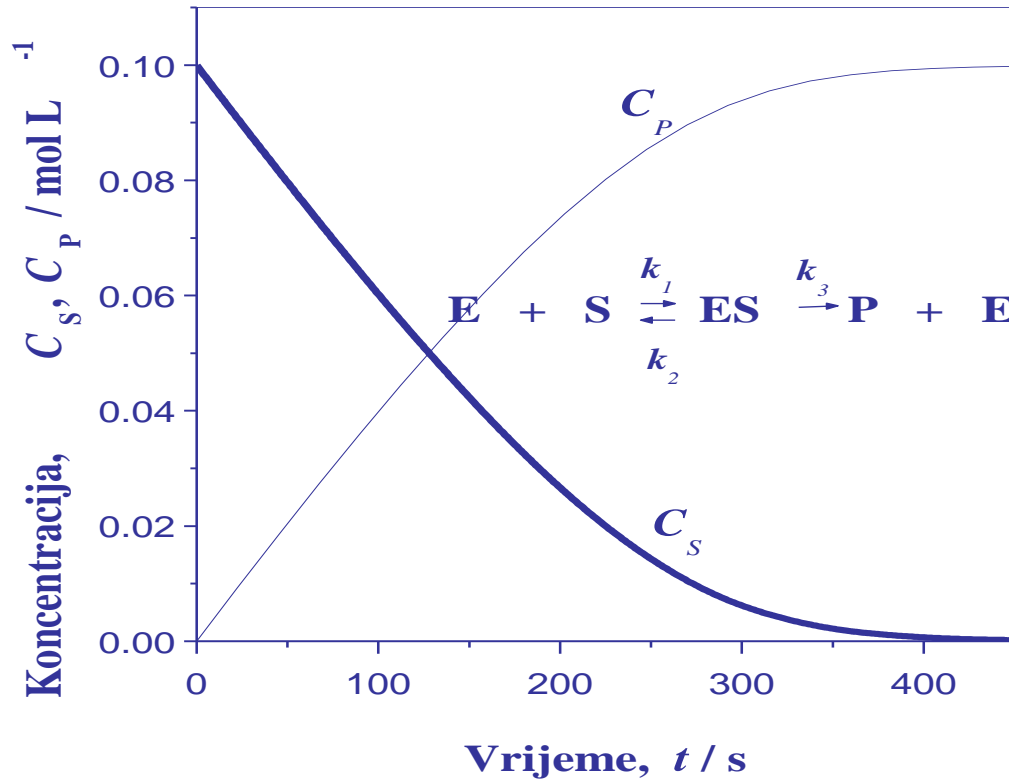
$$k_3 = 0,1 \text{ s}^{-1}$$

Pretpostavka pseudostacionarnog stanja prilično točna

Enzimaska reakcijska kinetika

Michaelis-Menteničina kinetika:

Ako eliminiramo bilancu za međuprodukt dobit ćemo ovakvu simulaciju



$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m + c_S}$$

$$V_m = k_3 \cdot c_{Eo}$$

$$V_m = 0,0005 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

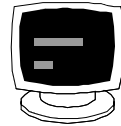
$$K_m = 0,02 \text{ mol L}^{-1}$$

Eksperimentalne metode procjene brzine reakcije

Kinetička mjerenja

$$r_o = f(C_A), C_A = f(t)$$

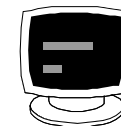
Procjena
parametara
nelinearna
regresija



*Kinetički
model*

$$V_m, K_m, K_i$$

Simulacija
metoda
Runge-Kutta



*Bilance
tvari*

Konverzija

Eksperimentalne metode procjene parametara

Integralna metoda procjene

Bit integralne metode procjene parametara je u analitičkom rješavanju diferencijalnih ili algebarskih jednadžbi koje se dobiju uvrštavanjem kinetičkog u reaktorski model. Rješenje jednadžbe uz odgovarajuće početne uvjete predstavlja model kojim se testiraju eksperimentalni podaci metodom linearne ili nelinearne regresije.

Diferencijalna metoda procjene

Postupak diferencijalnom metodom se razlikuje od integralne metode u tome što se pretpostavljeni kinetički model ne uvrštava u reaktorski model i ne rješava dobivena diferencijalna ili algebarska jednadžba, već se za svaki eksperimentalni rezultat određuje brojčana vrijednost brzine reakcije, a na osnovi reaktorskog modela. Na taj način izračunate brzine reakcije su eksperimentalni podatak kojim se ulazi u testiranje kinetičkog modela

Metoda početnih brzina

Brzina reakcije se mjeri samo s malom promjenom koncentracija ($X_A < 10\%$) tako da se eventualna povratna reakcija može zanemariti, kao i koncentracija nastalog produkta – koji eventualno može inhibirati reakciju.

Integralna metoda procjene parametara

POSTUPAK:

1. Pretpostavimo kinetički model

$$r_A = k \cdot f(c_i) = k \cdot c_a^A \cdot c_b^B \cdot c_c^C \dots$$

2. Kinetički model se uvrštava u reaktorski model eksperimentalnog reaktora

npr. kotlasti

$$r_A = -\frac{dc_A}{dt} \longrightarrow k \cdot f(c_A) = -\frac{dc_A}{dt}$$

ili protočno kotlasti

$$r_A = \frac{c_{A0} - c_A}{\tau} \longrightarrow k \cdot f(c_A) = \frac{c_{A0} - c_A}{\tau}$$

3. Dobivena diferencijalna, odnosno algebarska jednačba se rješava analitički
4. Eksperimentalni podaci, tj. parovi podataka c_A-t ili $c_A - \tau$ moraju zadovoljiti rješenja prethodnih jednačbi uz određeni kriterij točnosti. Usklađivanje ekperimentalnih podataka i modela se može provesti numeričkim metodama linearne i nelinearne regresije.

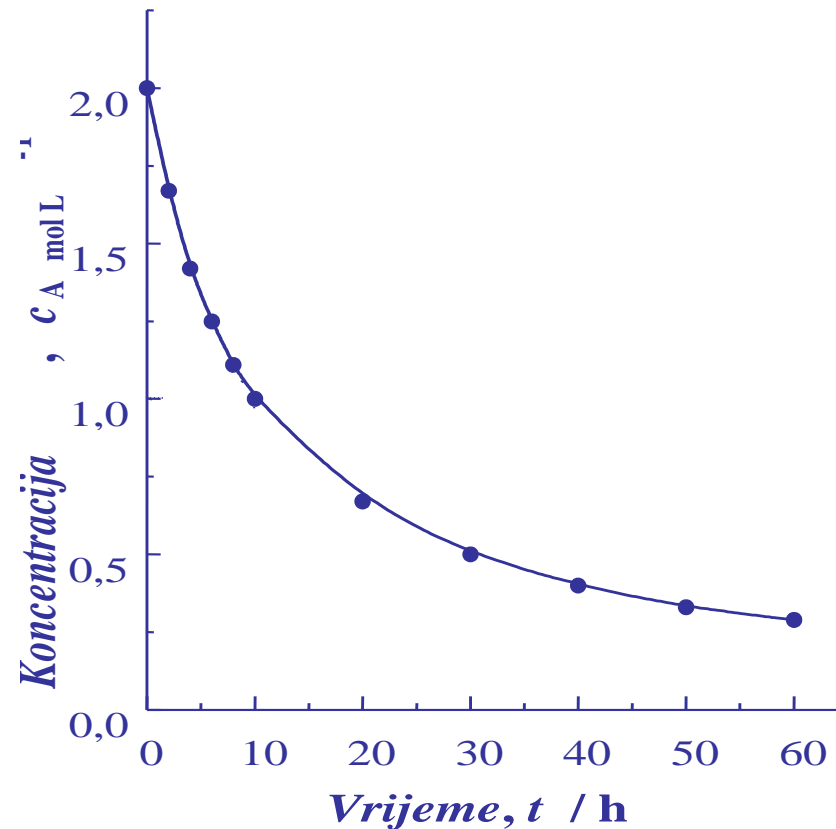
Integralna metoda procjene parametara

Primjer: Mjerenja u kotlastom reaktoru

Mjerne podatke ćemo testirati na kinetiku 1. reda $r_A = k \cdot c_A$

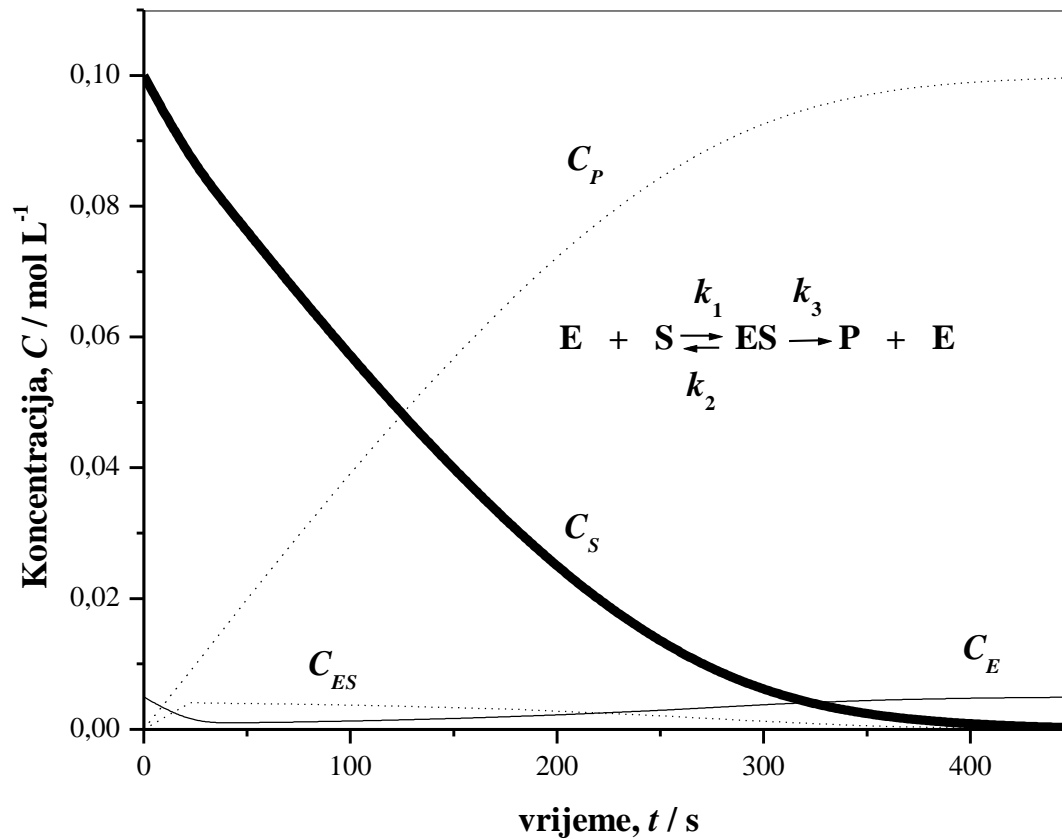
$$\frac{dc_A}{dt} = -r_A = -k \cdot c_A$$

t [h]	c_A [mol L ⁻¹]
0	2,00
2	1,67
4	1,42
6	1,25
8	1,11
10	1,00
20	0,67
30	0,50
40	0,40
50	0,33
60	0,29



Integralna metoda analize

Michaelis-Menteničina kinetika:



$$C_{E_0} = 0,005 \text{ mol L}^{-1}$$

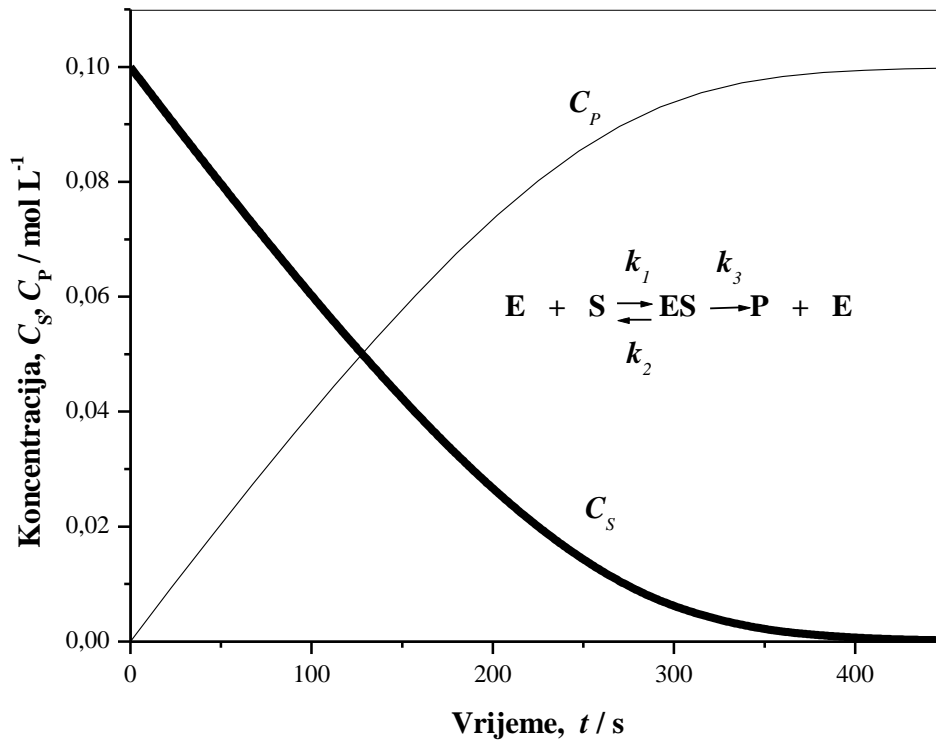
$$k_1 = 10 \text{ mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$$

$$k_2 = 0,1 \text{ s}^{-1}$$

$$k_3 = 0,1 \text{ s}^{-1}$$

Integralna metoda analize

Michaelis-Menteničina kinetika:



$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{V_m \cdot C_S}{K_m + C_S}$$

$$\frac{dC_P}{dt} = \frac{V_m \cdot C_S}{K_m + C_S}$$

$$V_m = k_3 \cdot C_{E0}$$
$$V_m = 0,0005 \text{ mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

$$K_m = 0,02 \text{ mol L}^{-1}$$

Integralna metoda analize

Michaelis-Menteničina kinetika:

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{V_m \cdot C_S}{K_m + C_S}$$

$$t_r = -\int_{C_{Ao}}^{C_A} \frac{K_m + C_A}{V_{max} \cdot C_A} dC_A$$

$$t_r = \frac{K_m}{V_m} \ln \frac{C_{Ao}}{C_A} + \frac{C_{Ao} - C_A}{V_m}$$

Diferencijalna metoda procjene parametara

Pretpostavljeni kinetički model se ne uvrštava u reaktorski model.

Za svaki mjerni rezultat se određuje brojčana vrijednost brzine reakcije, a na osnovi reaktorskog modela.

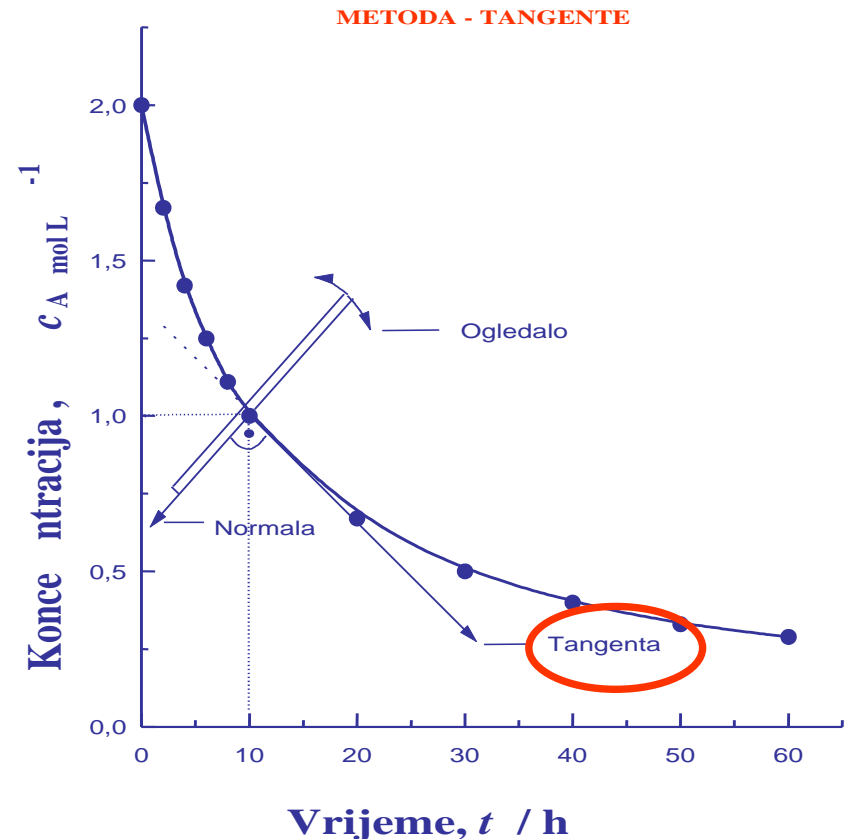
Brzine reakcije izračunate na taj način su mjerni podatak s kojim se ulazi u testiranje modela.

Na osnovi parova podataka $r_A - f(c_i)$ se procjenjuju konstante u modelu.

$$r_A = k \cdot f(c_i)$$

Tako se na primjeru kotlastog reaktora iz reaktorskog modela vidi da je brzina reakcije ustvari derivacija koncentracije po vremenu, odnosno nagib tangente povučene na krivulju u točki koja se dobije iz odnosa $c_A - t$

$$r_A = -\frac{dC_A}{dt}$$



Diferencijalna metoda procjene parametara

Mjerenja u protočnom kotlastom reaktoru omogućuju direktno računanje brzine reakcije iz reaktorskog modela – bilance tvari za reaktant ili produkt:

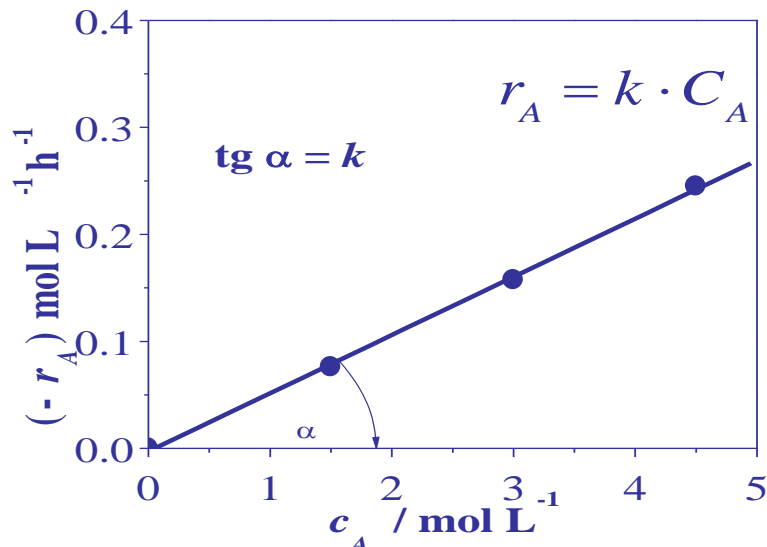
$$r_A = \frac{c_{A0} - c_A}{\tau}$$

U kotlastom reaktoru moramo diferencirati c - t krivulju kao što je bilo prikazano na prethodnom slide-u

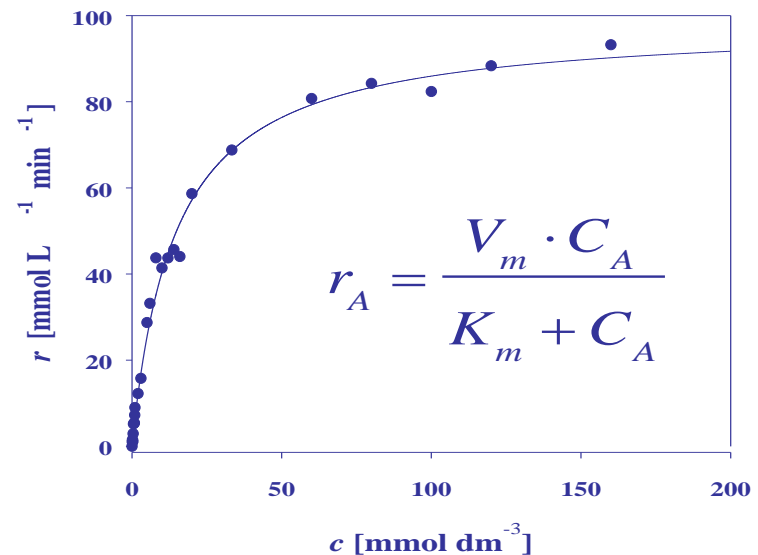
$$\frac{dc_A}{dt} = -r_A$$

Na temelju transformiranih podataka tj. ovisnosti reakcijske brzine o koncentraciji testiramo odabrani kinetički model kako slijedi na slici ispod:

Reakcija I reda:



Enzimaska reakcija:



Metoda početnih brzina – eksperimentalna metoda za određivanje brzina reakcije

Kinetički eksperimenti se trebaju voditi u eksperimentalnim reaktorima koji zadovoljavaju pretpostavke idealnih tipova reaktora. Tada su reaktorski modeli najjednostavniji, a brzina reakcije ovisi o malom broju parametara.

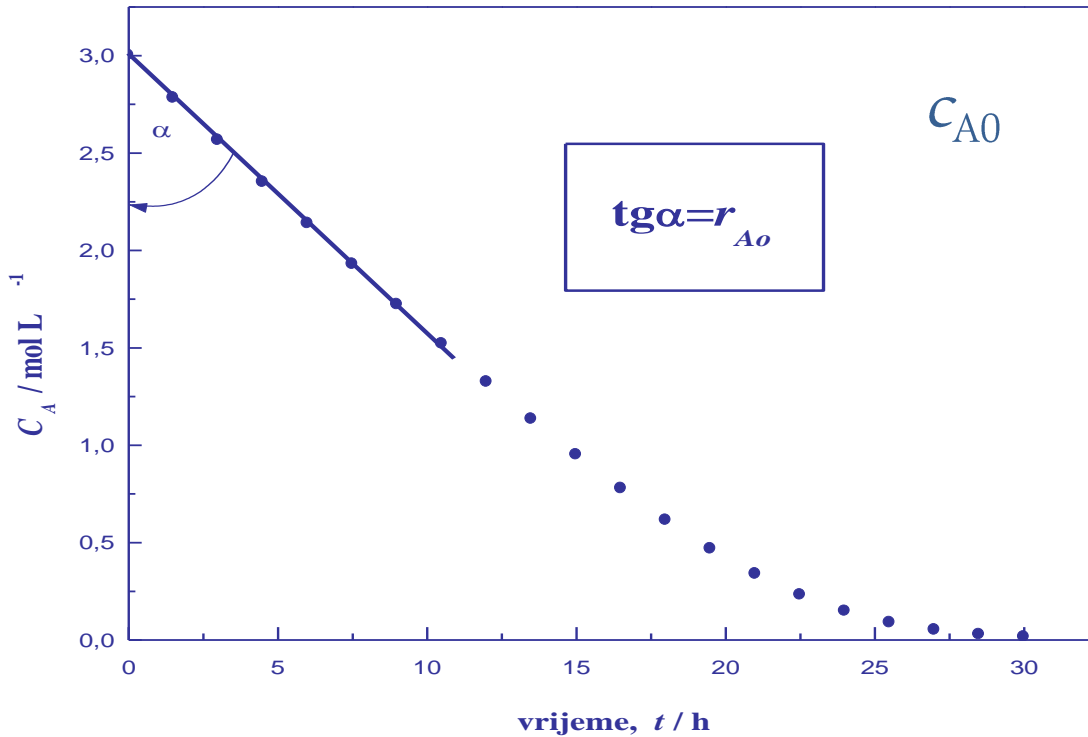
Isto je tako moguće podesiti sastav reakcijske otopine da se olakša naknadna računaska obrada podataka. Upravo to omogućuje metoda početnih brzina reakcije.

- ➔ Brzina se mjeri pri malim promjenama koncentracije konverzija $\leq 10\%$ jer se tada eventualna povratna reakcija, kao i utjecaj koncentracije nastalog produkta može zanemariti.
- ➔ Prema tome mjereći počenu brzinu možemo odrediti samo konstantu napredujuće reakcije. Da bi dobili više točaka potrebno je izvesti serije eksperimenata uz različite početne koncentracije reaktanata A.
- ➔ Ovo je pogodna metoda za određivanje brzine složenih i katalitičkih-biokatalitičkih reakcija
- ➔ Zahtijeva veliku točnost mjerenja koncentracija reaktanta.

$$(-r_A) = \frac{\Delta c_A}{\Delta t}$$

Metoda početnih brzina

Mjerenja u kotlastom reaktoru-diferenciranje



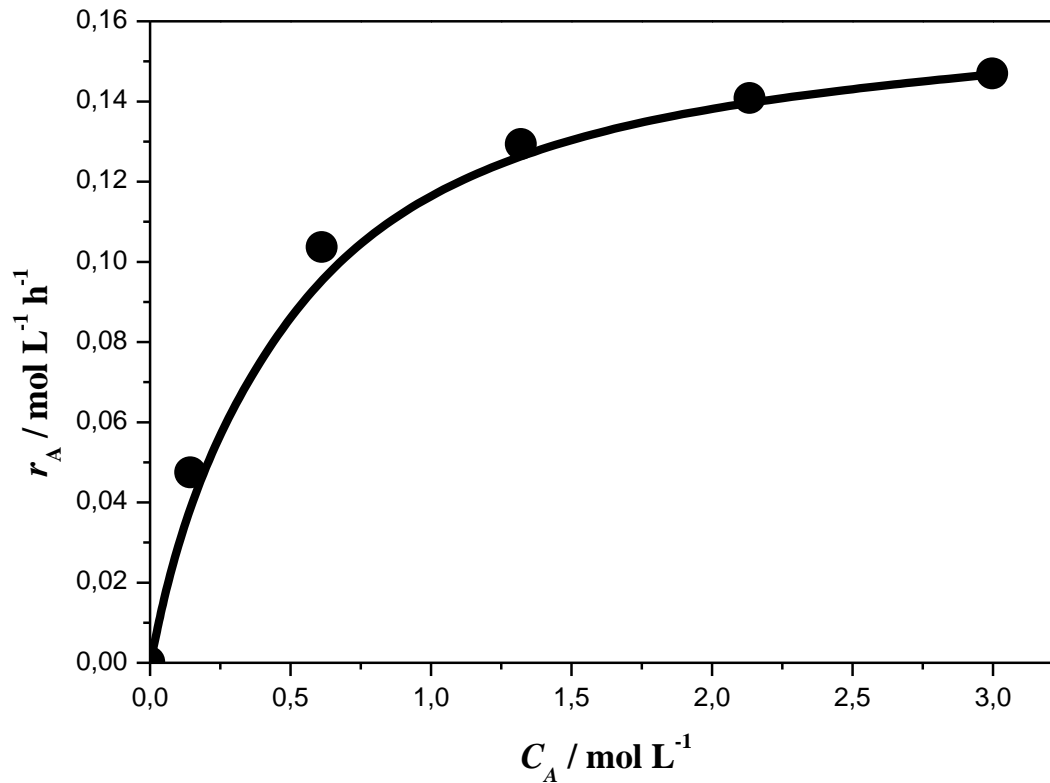
Povlači se tangenta u vremenu 0 čiji je nagib odgovara početnoj reakcijskoj brzini. Potrebno je provesti čitav niz eksperimenata kod različitih početnih koncentracija reaktanata, C_{A0} .

Da bi se dobila ovisnost brzine reakcije o koncentraciji, potrebno je provesti seriju ovakvih eksperimenata koje onda daju rezultat prikazan na slijedećem slide-u.

Metoda početnih brzina

Enzimaska reakcija:

$$(-r_A) = \frac{V_m \cdot C_A}{K_m + C_A}$$



Metoda početnih brzina

Mjerenja u kotlastom reaktoru

Enzimaska reakcija inhibicija sa supstratom:

$$r_A = \frac{V_m \cdot c_A}{K_m + c_A + \frac{c_A^2}{K_i}}$$

Eksperimentalni podaci:

c_A [mmol L ⁻¹]	r_A [mmol L ⁻¹ min ⁻¹]
0	0
0,05	18,5
0,1	32,5
0,2	35,5
0,3	41,4
0,4	49,6
0,5	50,3
0,6	51,8
1,0	52,5
2,0	49,6
4,0	41,4
6,0	35,5
8,0	31,0
10,0	28,1

Kinetički parametri modela

Procjena parametara:

Parametar	Početna vrijednost	Nelder-Mead metoda	Rosenbrock metoda	Gauss-Newton metoda	Marquardt metoda
V_m mmol L ⁻¹ min ⁻¹	80	65,8412098	65,8412564	-	65,8412835
	65	65,8412895	65,8411620	65,8412886	65,8412864
K_m mmol L ⁻¹	5	0,12906027	0,12910608	-	0,129060888
	0,1	0,12906076	0,12906011	0,129060925	0,129060909
K_i mmol L ⁻¹	15	7,3433771	7,3433363	-	7,343355753
	7	7,3433391	7,3434017	7,34335444	7,343355005

Različite metode procjene parametara daju bliske rezultate

Metoda početnih brzina

Enzimaska reakcija inhibicija sa supstratom:

$$r_A = \frac{V_m \cdot c_A}{K_m + c_A + \frac{c_A^2}{K_i}}$$

Vrijednosti parametara procjenjenih Neld-Mead-ovom metodom uz različitu pogrešku:

	$\varepsilon [-]$				
Parametar	0,0001	0,00001	0,000001	0,0000001	1E-12
V_m mmol L⁻¹min⁻¹	53,0176880	54,4235808	54,7997293	65,729992	65,8412098
K_m mmol L⁻¹	0,06260999	0,07033519	0,07380535	0,12863409	0,12906027
K_i mmol L⁻¹	18,1877399	17,7170726	17,5846576	7,37570399	7,34337705

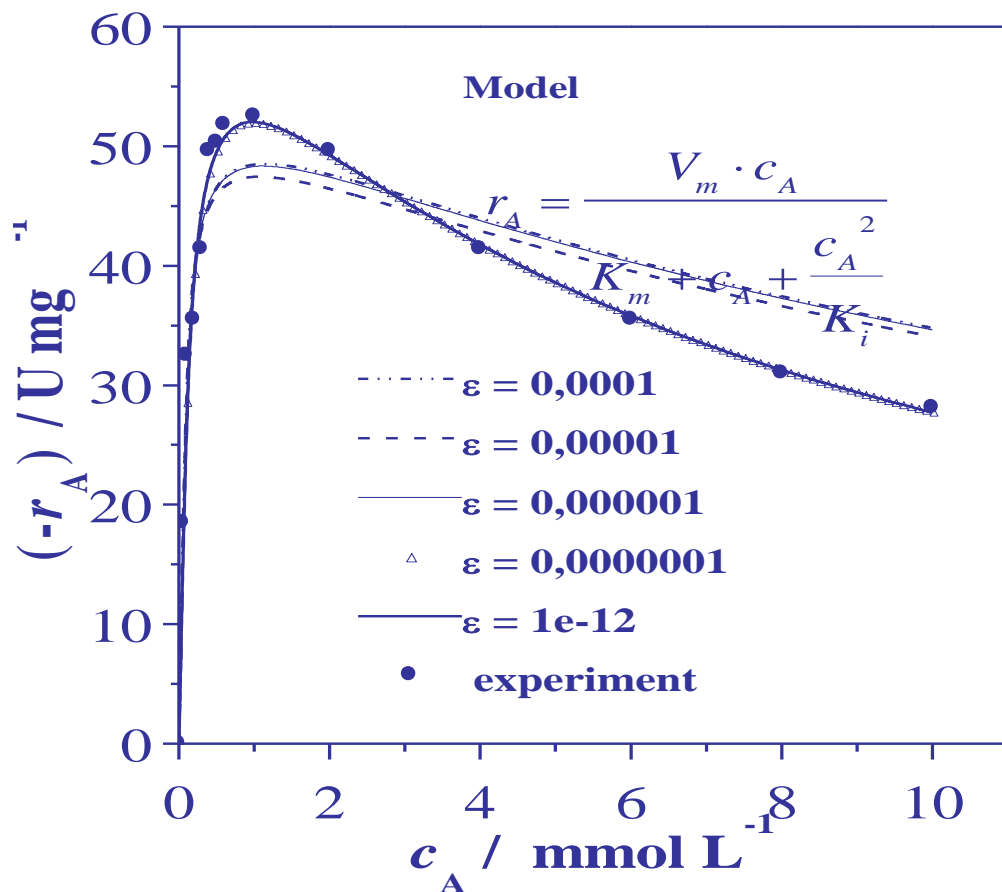
Različite vrijednosti zadane pogreške rezultiraju različitim vrijednostima kinetičkih parametara

Metoda početnih brzina

Enzimaska reakcija inhibicija sa supstratom:

Slaganje podataka i modela s vrijednostima parametara procjenjenih Neld-Mead-ovom metodom uz različitu pogrešku:

...što rezultira različitim simulacijama kao što je pokazano na slici
...što je pogreška veća, to je i odstupanje modela od eksperimentalnih podataka veće



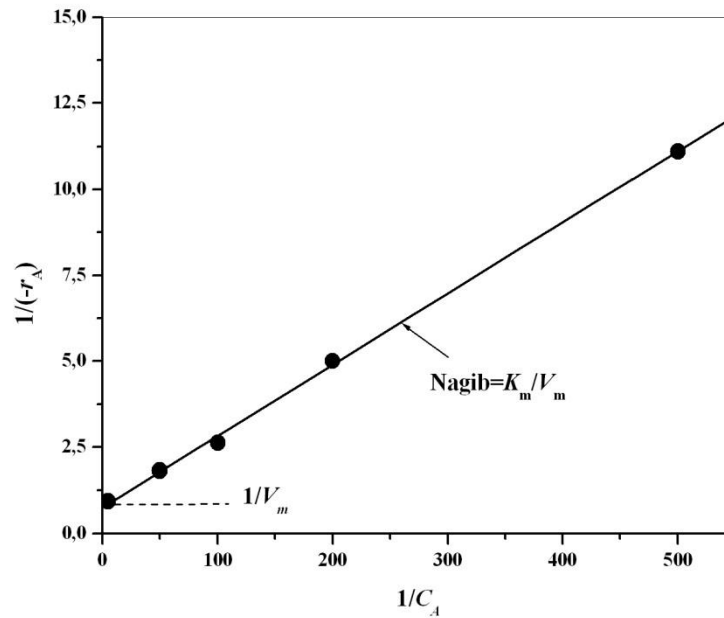
Metoda početnih brzina

Enzimaska reakcija:

$$(-r_A) = \frac{V_m \cdot C_A}{K_m + C_A}$$

Lineweaver-Burkov pravac:

$$\frac{1}{(-r_A)} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \left(\frac{1}{C_A} \right)$$



Metoda početnih brzina

Michaelis-Menteničina kinetika: $(-r_A) = \frac{V_m \cdot C_A}{K_m + C_A}$

Kompetitivna inhibicija: $(-r_A) = \frac{V_m \cdot C_A}{K_m \cdot \left(1 + \frac{C_P}{K_{i,P}}\right) + C_A}$

Antikompetitivna inhibicija: $(-r_A) = \frac{V_m \cdot C_A}{K_m + C_A \cdot \left(1 + \frac{C_I}{K_i}\right)}$

Inhibicija supstratom: $(-r_A) = \frac{V_m \cdot C_A}{K_m + C_A + \frac{C_A^2}{K_{i,A}}}$

Metoda procjene parametara

METODA NAJMANJIH KVADRATA

Kada se na temelju eksperimentalnih podataka želi dobiti matematički izraz koji povezuje dvije međusobno zavisne veličine, najčešće se upotrebljava **metoda najmanjih kvadrata**.

Metoda se sastoji u tome da se pretpostavi neka matematička funkcija koja bi mogla opisati mjerenjem određenu zavisnost dviju veličina, a zatim se u funkciji izračunaju (procjene) konstante (parametri). Nakon toga se izračunaju vrijednosti veličina pomoću funkcije koje se onda uspoređuju s eksperimentalnim podacima. Postupak se ponavlja tako dugo dok se ne zadovolji kriterij metode najmanjih kvadrata, a taj je da je kvadratno odstupanje eksperimentalnih i izračunatih vrijednosti veličina minimalno.

$$\sum_k [y_i - f(x_i)]^2 = \min$$

Numerička metoda rješavanja diferencijalne jednačbe

METODA RUNGE-KUTTA 4. REDA ZA RJEŠAVANJE OBIČNE
DIFERENCIJALNE JEDNADŽBE

$$y' = f(x, y)$$

s početnim uvjetima: $y(x_0) = y_0$

Ako je

$$x_n = x_0 + n \cdot h$$

gdje je h unaprijed zadani korak, onda između y_{n+1} , y_n i x_n postoji veza:

$$y_{n+1} = y_n + a_1 \cdot k_1 + a_2 \cdot k_2 + a_3 \cdot k_3 + a_4 \cdot k_4$$

gdje su

$$k_1 = h \cdot f(x_n, y_n)$$

$$k_2 = h \cdot f(x_n + \alpha_2 \cdot h, y_n + \beta_{21} \cdot k_1)$$

$$k_3 = h \cdot f(x_n + \alpha_3 \cdot h, y_n + \beta_{31} \cdot k_1 + \beta_{32} \cdot k_2)$$

$$k_4 = h \cdot f(x_n + \alpha_4 \cdot h, y_n + \beta_{41} \cdot k_1 + \beta_{42} \cdot k_2 + \beta_{43} \cdot k_3)$$

Numerička metoda rješavanja diferencijalne jednačbe

Jednom od metoda za rješavanje sustava linearnih jednačbi dobiju se vrijednosti parametara a i b , tako da je formula za rješavanje diferencijalne jednačbe slijedeća:

$$y_{n+1} = y_n + \frac{1}{6}(k_1 + 2 \cdot k_2 + 2 \cdot k_3 + k_4)$$

a koeficijenti k su ove vrijednosti

$$k_1 = h \cdot f(x_n, y_n)$$

$$k_2 = h \cdot f\left(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{1}{2} \cdot k_1\right)$$

$$k_3 = h \cdot f\left(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{1}{2} \cdot k_2\right)$$

$$k_4 = h \cdot f(x_n + h, y_n + k_3)$$