

**PRINCIPI DI INGEGNERIA BIOCHIMICA  
ESERCITAZIONI NUMERICHE A.A. 2015-2016**

**Cinetica enzimatica applicata**

- 1) Progettare un protocollo di prove sperimentali che, impiegando un reattore CSTR a membrana ultrafiltrante, consentano la determinazione dei parametri cinetici di un enzima che segua la legge di Michaelis e Menten. Dettagliare esplicitamente le equazioni che s'intendono utilizzare e la procedura sperimentale da seguire per determinare il valore delle costanti cinetiche. Discutere vantaggi e svantaggi della metodica individuata rispetto alle tradizionali tecniche impieganti reattori batch. Esistono due differenti metodi: riuscite a delinearli entrambi?
- 2) La gelatina ( $\rho = 1.28 \text{ g/cm}^3$ ) è impiegata per incapsulare i sali d'argento. La sostanza può essere considerata un alto polimero dell'amminoacido glicina (PM = 150) . Si pensa di recuperare il metallo da granuli sferici ( $D = 100 \text{ }\mu\text{m}$ ) con un processo batch di idrolisi con enzimi proteolitici che garantisca l'idrolisi totale del rivestimento. Precedenti prove condotte con sferette ( $D = 0.3 \text{ cm}$ ) di gelatina pura hanno dato i seguenti tempi di idrolisi totale in batch:

t, h	21	11	5	3	2	1,5	1.25	1
[E]t, $\mu\text{M}$	1	2	5	10	20	50	100	1000

Ammettendo che il nucleo metallico abbia diametro pari a  $10 \text{ }\mu\text{m}$  e disponendo di una soluzione enzimatica  $2.5 \text{ }\mu\text{M}$ , che tempo di idrolisi scegliereste? Sapreste stimare le proprietà di questo enzima?

**PRINCIPI DI INGEGNERIA BIOCHIMICA  
ESERCITAZIONI NUMERICHE A.A. 2015-2016**

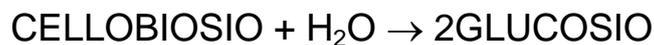
**Biocatalisi eterogenea**

3) La tripsina bovina (EC 3.4.21.4) è immobilizzata sulla superficie di particelle magnetiche. Avviene la catalisi dell'idrolisi dell'estere etilico della benzoil arginina (BAEE) producendosi benzoil-arginina (BA) ed alcol etilico (A). In condizioni per le quali le limitazioni diffusionali esterne sono trascurabili si ottengono i seguenti dati.

[BAEE] (mM)	V (mmol h <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> )	
	[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

Determinare i parametri cinetici intrinseci analizzando l'accuratezza dei risultati ottenuti. Se, sotto le vigenti condizioni, il coefficiente di trasporto interfase valesse 10 (cm min<sup>-1</sup>) e la concentrazione di bulk del BAEE fosse 120 mM, quale sarebbe la vostra stima dell'efficienza catalitica?

4) L'enzima β-glucosidasi (EC 3.2.1.21) catalizza la reazione:



Un biocatalizzatore termostabile da *Pyrococcus furiosus* è immobilizzato in particelle ceramiche a porosità controllata. Si hanno i seguenti dati a 70 °C:

[S], mM	20	50	100	250	400	500
-r <sub>S</sub> , μmol min <sup>-1</sup> g <sub>cat</sub> <sup>-1</sup>	62.9	118.7	180.5	250.6	282.8	293.5

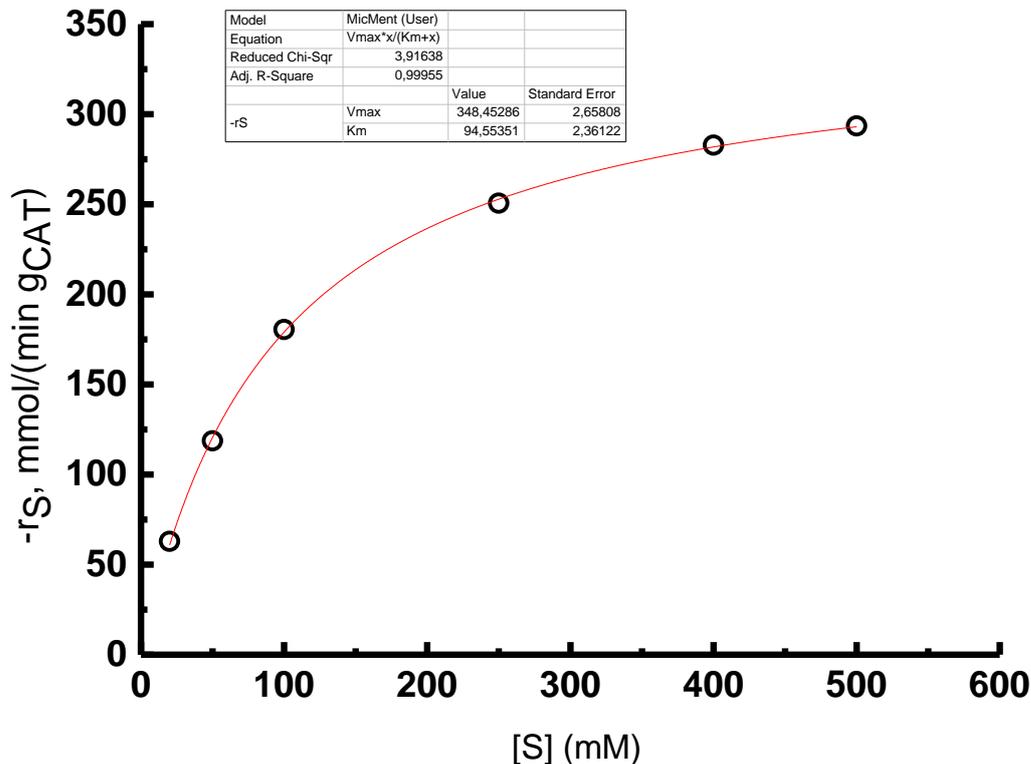
# PRINCIPI DI INGEGNERIA BIOCHIMICA

## ESERCITAZIONI NUMERICHE A.A. 2015-2016

Mediante regressione non lineare, determinare i parametri cinetici apparenti e discutere l'accuratezza dei risultati ottenuti.

Se la  $V_{\max}$  non fosse affetta dall'immobilizzazione ed il  $K_m$  fosse aumentato del 30% rispetto al valore intrinseco, determinare la massima dimensione di particella catalitica che si può utilizzare desiderando un'efficienza catalitica dell'80%. Il coefficiente di diffusione del cellobiosio è  $9 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ min}^{-1}$ , la densità del solido  $1.8 \text{ g cm}^3$ , il grado di vuoto 0.6 e la tortuosità dei pori 1.2.

Utilizzando la regressione non lineare si ottiene:



I valori dei parametri apparenti stimati sono:

$$V_{\max} = 348 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}_{\text{CAT}}^{-1}; K_m = 94.5 \text{ mM.}$$

In base al testo, la  $V_{\max}$  è da considerarsi intrinseca; per il  $K_m$ , si ha che il valore intrinseco è  $94.5/1.3 = 72.7 \text{ mM}$

$$\text{La diffusività effettiva è: } D_s = 9 \times 10^{-2} * (0.6/1.2) = 4.5 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ min}^{-1}$$

# PRINCIPI DI INGEGNERIA BIOCHIMICA

## ESERCITAZIONI NUMERICHE A.A. 2015-2016

Il modulo di Thiele vale:

$$\Phi = \frac{R_p}{3} \sqrt{\frac{V_{max}}{D_S K_m}} = \frac{R_p}{3} \sqrt{\frac{348 \times 1.8}{4.5 \times 10^{-2} \times 72.7}} = 4.61 R_p$$

L'efficienza catalitica risulta:

$$\eta = \frac{1}{\Phi} \left[ \frac{1}{\tanh(3\Phi)} - \frac{1}{3\Phi} \right] = \frac{1}{4.61 R_p} \left[ \frac{1}{\tanh(13.83 R_p)} - \frac{1}{13.83 R_p} \right]$$

Occorre che sia:

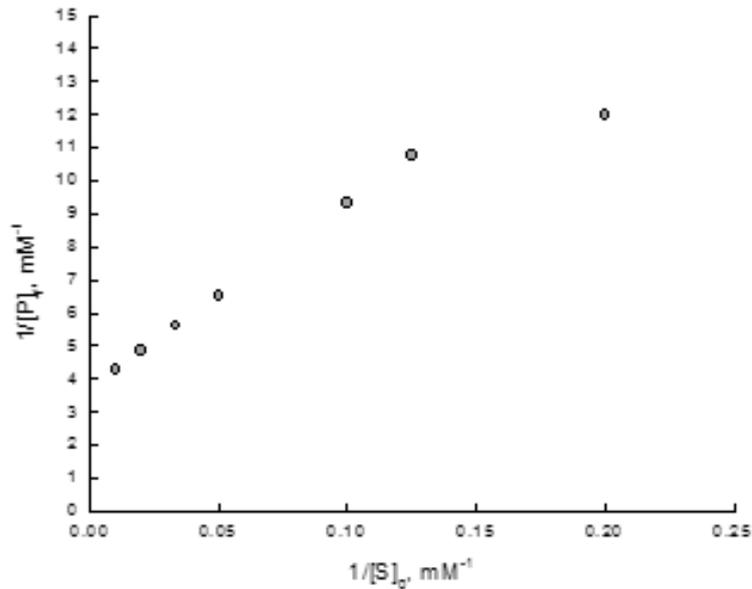
$$0.8 < \frac{1}{4.61 R_p} \left[ \frac{1}{\tanh(13.83 R_p)} - \frac{1}{13.83 R_p} \right]$$

Ovvero  $R_p < 0.148$  cm.

- 5) Un enzima catalizza una reazione irreversibile, stechiometria 1:1. In tabella dati ottenuti in reattori batch omogenei ( $V_R = 4 \text{ cm}^3$ ,  $t_R = 2 \text{ min}$ ,  $M_E = 1 \text{ } \mu\text{g}$ ). 1.1 mg di enzima sono immobilizzati sulla superficie esterna di 20 grammi di sferette in vetro ( $D = 0.2 \text{ cm}$ ,  $\rho = 2.4 \text{ g/cm}^3$ ) ottenendo recupero di attività  $RA = 15\%$  e resa di immobilizzazione  $RI = 65\%$ . L'enzima conserva invariata l'affinità per il substrato dopo l'immobilizzazione. Tutto il preparato è impiegato in un reattore batch contenente 1 L di substrato 6 mM. L'agitazione determina un  $k_L = 6.4 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ . Che tempo ci vorrà perché la conversione del substrato raggiunga il 70%? Quale sarebbe la risposta se la concentrazione iniziale di substrato fosse 60 mM? E se nei due casi ed a parità di ogni altro parametro si immobilizzasse un decimo dell'enzima?

**PRINCIPI DI INGEGNERIA BIOCHIMICA  
ESERCITAZIONI NUMERICHE A.A. 2015-2016**

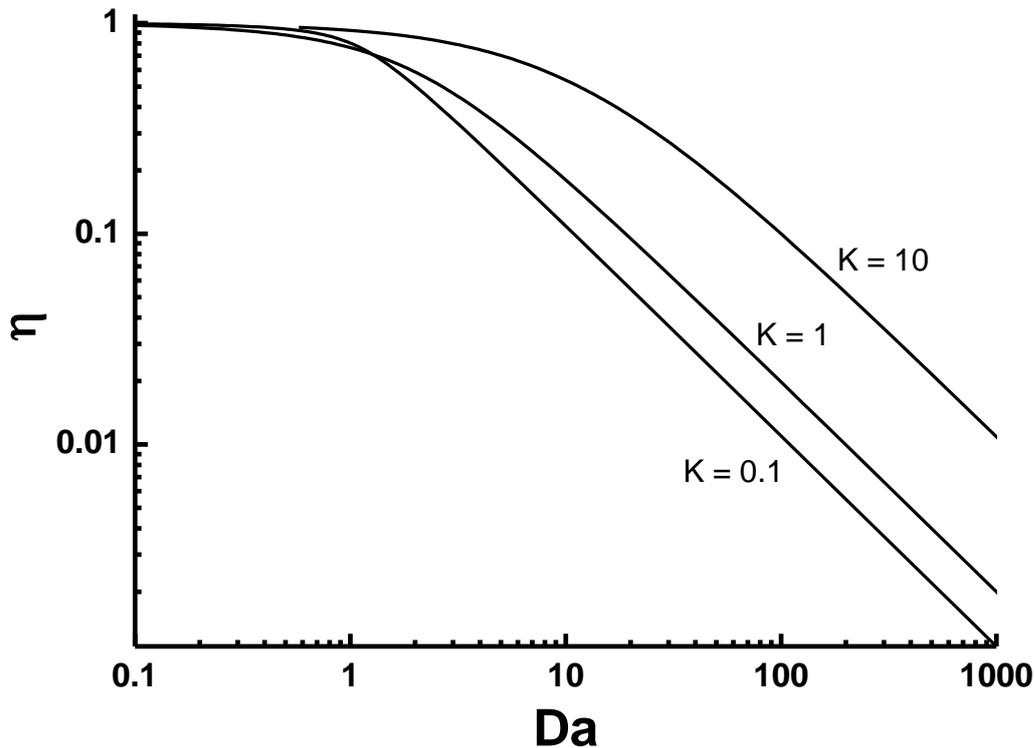
[S] <sub>0</sub> , mM	5	8	10	20	30	50	100
[P] <sub>f</sub> , mM	0.083	0.093	0.107	0.154	0.179	0.207	0.233



6) In un CSTR sono sospesi 10 g di palline di vetro ( $D = 0.1$  cm,  $\rho = 2.4$  g/cm<sup>3</sup>) con enzima adsorbito in superficie e fluiscono 0.05 L/min di soluzione di substrato 100 mM. Variando la velocità di agitazione, si ottengono i dati in regime stazionario riportati in tabella. Sapreste stimare la cinetica intrinseca?

$k_L$ , cm/s	$10^{-5}$	$10^{-2}$	$10^{-1}$
% $X_S$ , adim.	$5 \times 10^{-2}$	1.64	1.65

**PRINCIPI DI INGEGNERIA BIOCHIMICA  
ESERCITAZIONI NUMERICHE A.A. 2015-2016**



7) Si riportano dati di stato stazionario ottenuti in un CSTR e relativi all'idrolisi del cellobiosio a glucosio quando la reazione è catalizzata da una sospensione di particelle porose di idrogelo ad enzima immobilizzato:

mg <sub>CAT</sub> (secco)	500	500	200	50	50	10	10
[P], mM	2.74	4.90	1.42	0.50	0.88	0.16	0.28
10 <sup>3</sup> r, μmol/(h mg <sub>CAT</sub> )	97.5	97	129	190	160	312	273

Sapreste stimare il modulo di Thiele effettivo degli esperimenti?

Densità gelo umido	$\rho_{um}$	1.08 g/cm <sup>3</sup> ;
Rapporto di rigonfiamento		3.65;
Diametro particelle secche	$d_s$	0.0049 cm;
Diffusività substrato	$D_s$	5.8x10 <sup>-7</sup> cm <sup>2</sup> /s;
Concentrazione in ingresso al reattore	$[S]_0$	5 mM.

**PRINCIPI DI INGEGNERIA BIOCHIMICA**  
**ESERCITAZIONI NUMERICHE A.A. 2015-2016**

8) 3 mg di enzima ( $K_m = 3 \text{ mM}$ ,  $A_{sp} = 6 \times 10^{-1} \text{ UE/mg}_E$ ) sono immobilizzati all'interno di un idrogel (peso secco 50 mg) depositato su una delle superfici di una lamina piana ( $A = 3.7 \text{ cm}^2$ ). L'idrogel ( $\rho_s = 1.14 \text{ g/cm}^3$ ) contiene il 40% in peso d'acqua. Il sistema converte un substrato in grado di diffondere al suo interno ( $S_i = 0.5 \text{ mM}$ ,  $D_s = 5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ).

- A che efficienza sta lavorando il biocatalizzatore?
- Quanto vale la  $r_{oss}$ ?
- Quanto vale la concentrazione di substrato all'interfaccia solido-gel?
- Quale potrebbe essere un metodo pratico per migliorare il sistema?
- Se la concentrazione di substrato nel bulk fosse 1 mM, quanto varrebbe  $k_L$ ?
- Assumendo il  $k_L$  calcolato al punto precedente, con  $[S]_0$  pari a 0.5 mM, che efficienza avrebbe il biocatalizzatore?

**PRINCIPI DI INGEGNERIA BIOCHIMICA**  
**ESERCITAZIONI NUMERICHE A.A. 2015-2016**

**Apparecchiature areate**

- 9) Una fermentazione aerobica è condotta a 30 °C in un batch cilindrico areato contenente 15 litri di fase liquida assimilabile ad acqua e contenente in soluzione tutte le sostanze necessarie alla coltura in forte eccesso. Il recipiente è insufflato dal basso con 80 cm<sup>3</sup>/s di aria a 1.2 atm e si formano bolle concavo-convesse di 0.4 cm di diametro. Il gas esausto si svincola all'atmosfera alla sommità dell'apparecchiatura.
- 1) progettare la durata del processo necessaria a centuplicare la massa cellulare;
  - 2) effettuare lo scale-up dell'apparecchiatura sulla base dei criteri ritenuti i più opportuni per dimensionare un fermentatore da 15 m<sup>3</sup>.

DATI CINETICI DI LABORATORIO

<b>10<sup>3</sup>x[O<sub>2</sub>], moli/litro</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>60</b>
<b>μ, s<sup>-1</sup></b>	<b>1.24</b>	<b>2.26</b>	<b>3.65</b>	<b>4.12</b>	<b>5.33</b>	<b>5.84</b>	<b>6.28</b>	<b>6.82</b>	<b>7.40</b>	<b>8.13</b>	<b>9.05</b>

SPECIFICHE TECNICHE

Diametro recipiente	$D_R = 18 \text{ cm}$
Altezza recipiente	$h = 75 \text{ cm}$
Agitatore a pale piatte	
Diametro pale	$D_i = 14 \text{ cm}$
Velocità rotazione	$N_i = 300 \text{ rpm}$
Massa di inoculo	$M_0 = 15 \text{ g}$
Fattore di resa cellulare	$Y_{O_2} = 0.2 \text{ g}_{\text{cellule}}/\text{mole } O_2$