



FKITMCMXIX

Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije



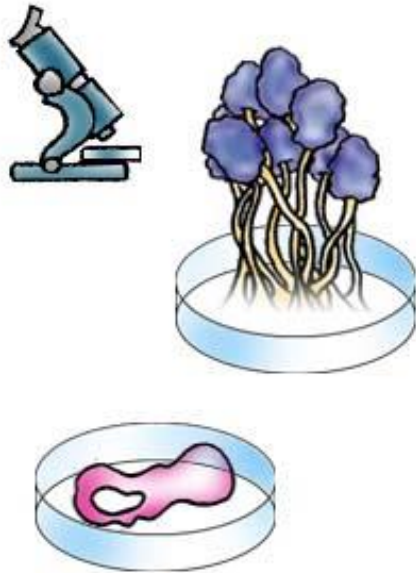
Reaktori i bioreaktori

Bioproces - mikrobiološka kinetika

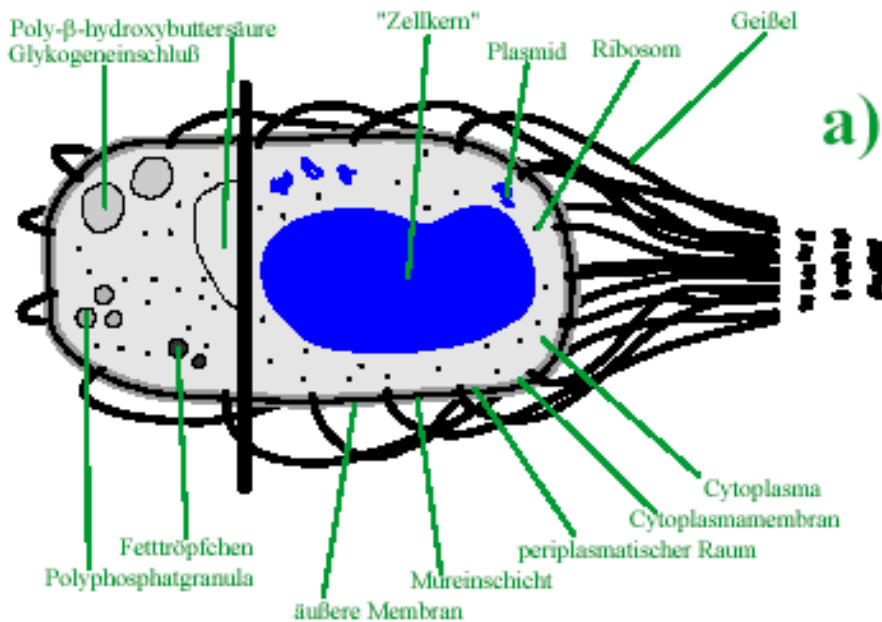
Prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

BIOPROCES

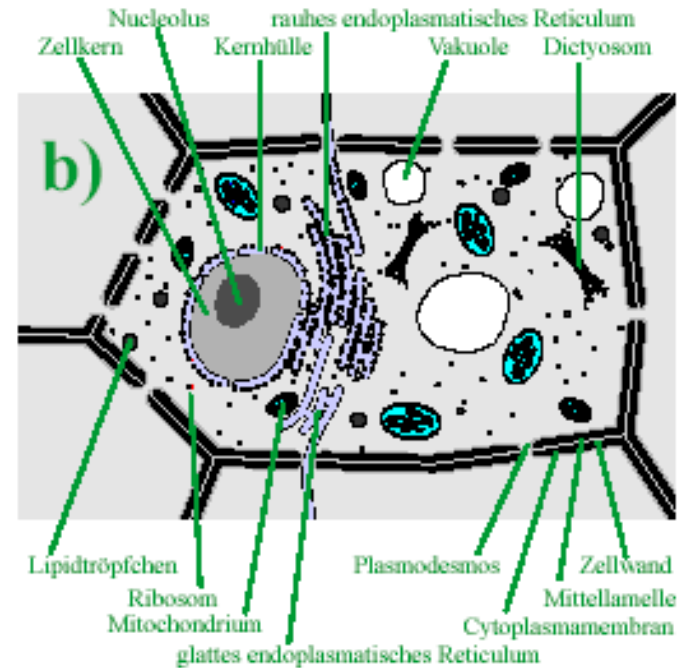
Bioproces je svaki proces u kojemu nastaje biološki materijal ili se pomoću tog materijala prerađuju druge tvari



BIOPROCES



a) Prokariotska stanica
bakterijska stanica
jednostavna (nema formiranu jezgru),
mala 0.5-3mm



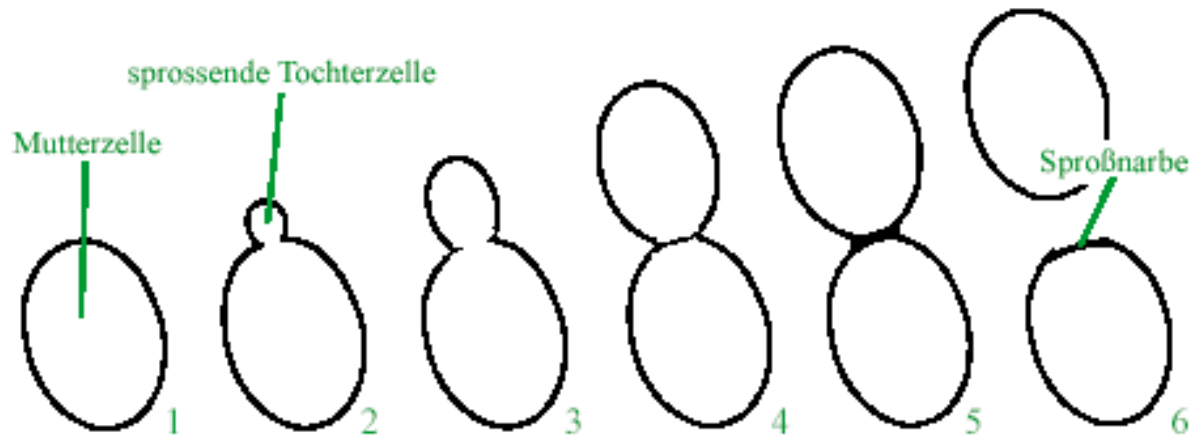
b) Eukariotska stanica
stanice gljiva, biljne i
životinjske stanica,
kompleksne građe, 1000
do 10 000 puta veća

BIOPROCES

STANIČNI METABOLIZAM

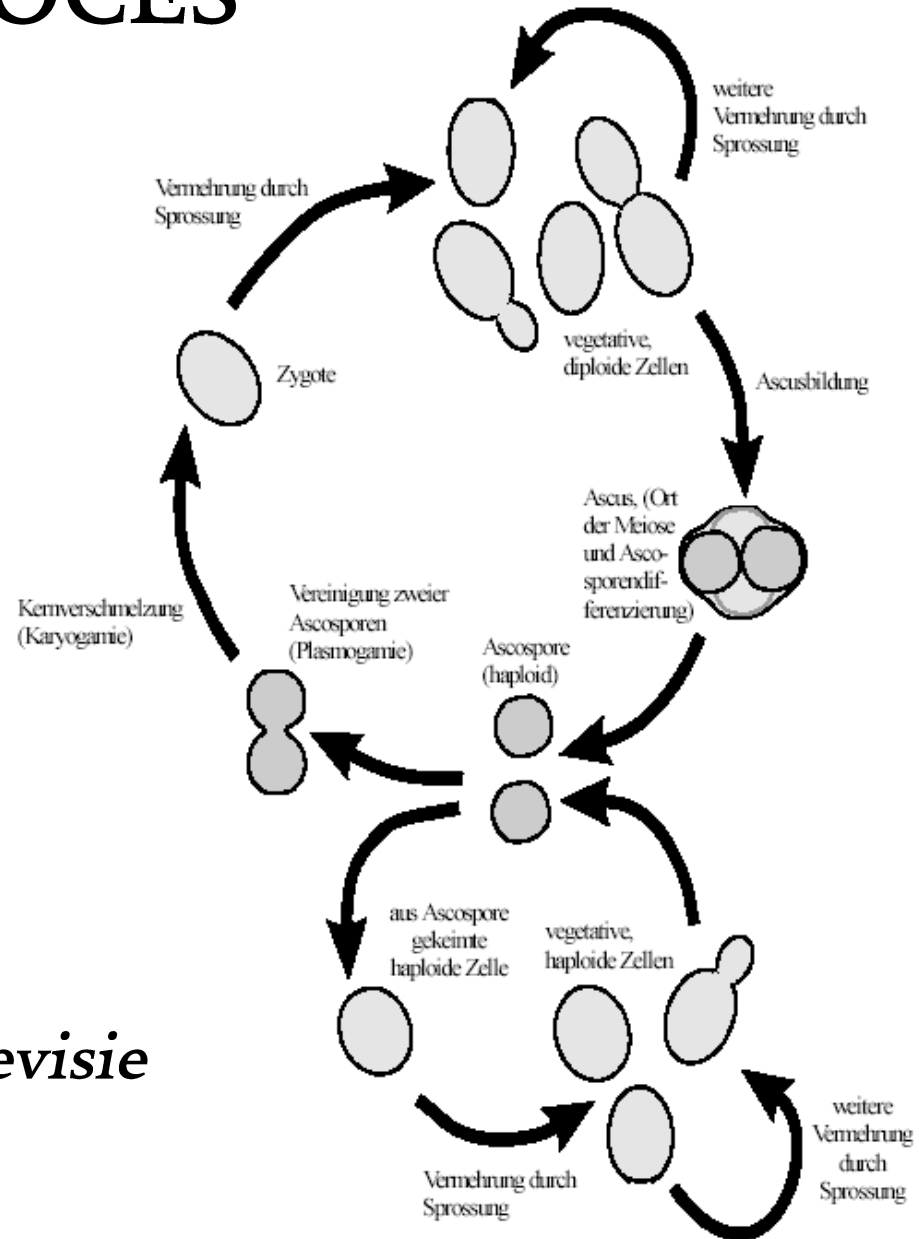
Set reakcija u stanici kojima stanica troši hranu (nutriente) koju nazivamo supstrat, za reprodukciju (rast i razmnožavanje) prilikom čega dolazi do stvaranja određenih produkata (primarni i sekundarni metaboliti).

BIOPROCES



Dijeljenje – razmnožavanje stanica na primjeru pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

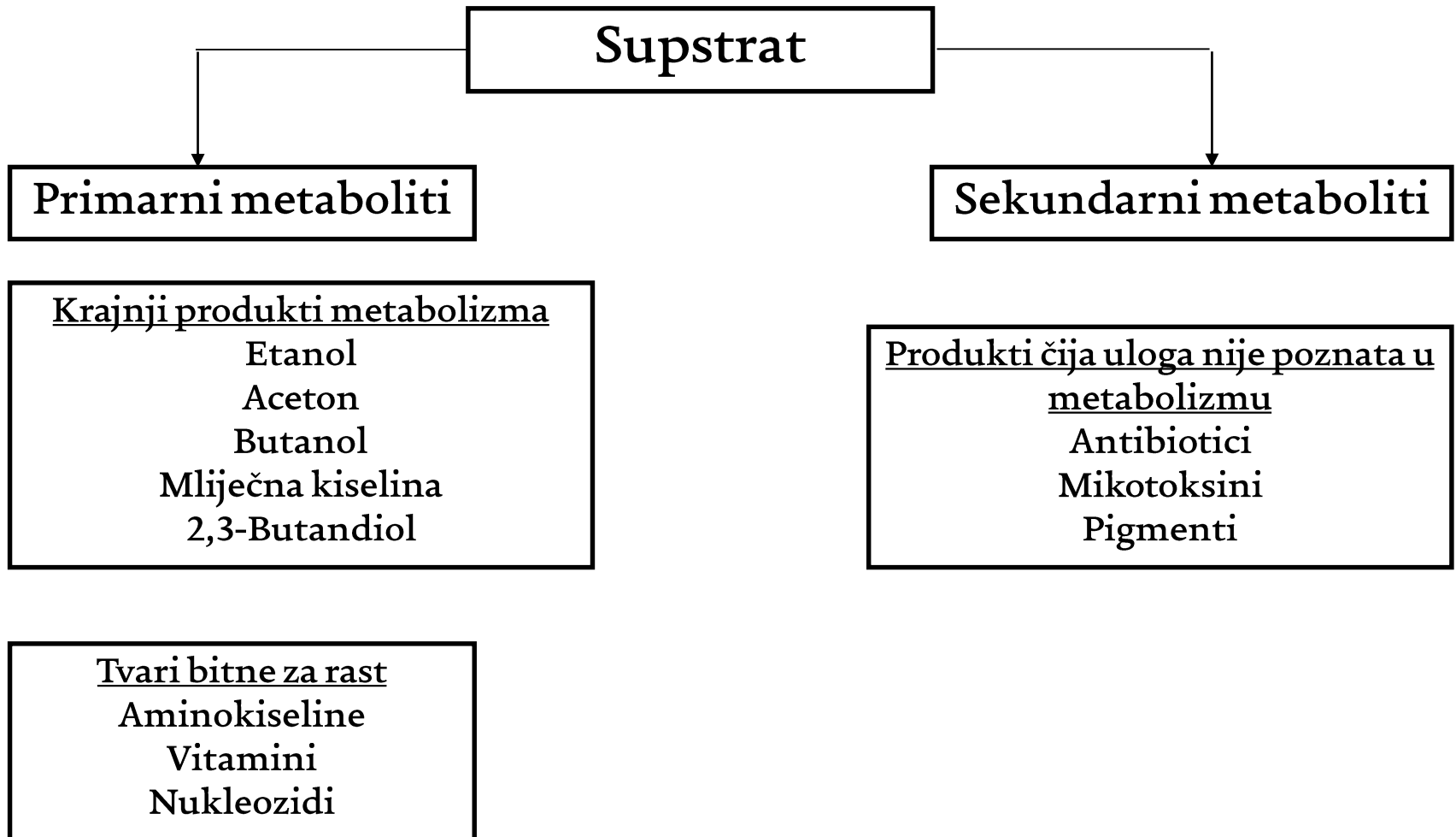
BIOPROCES



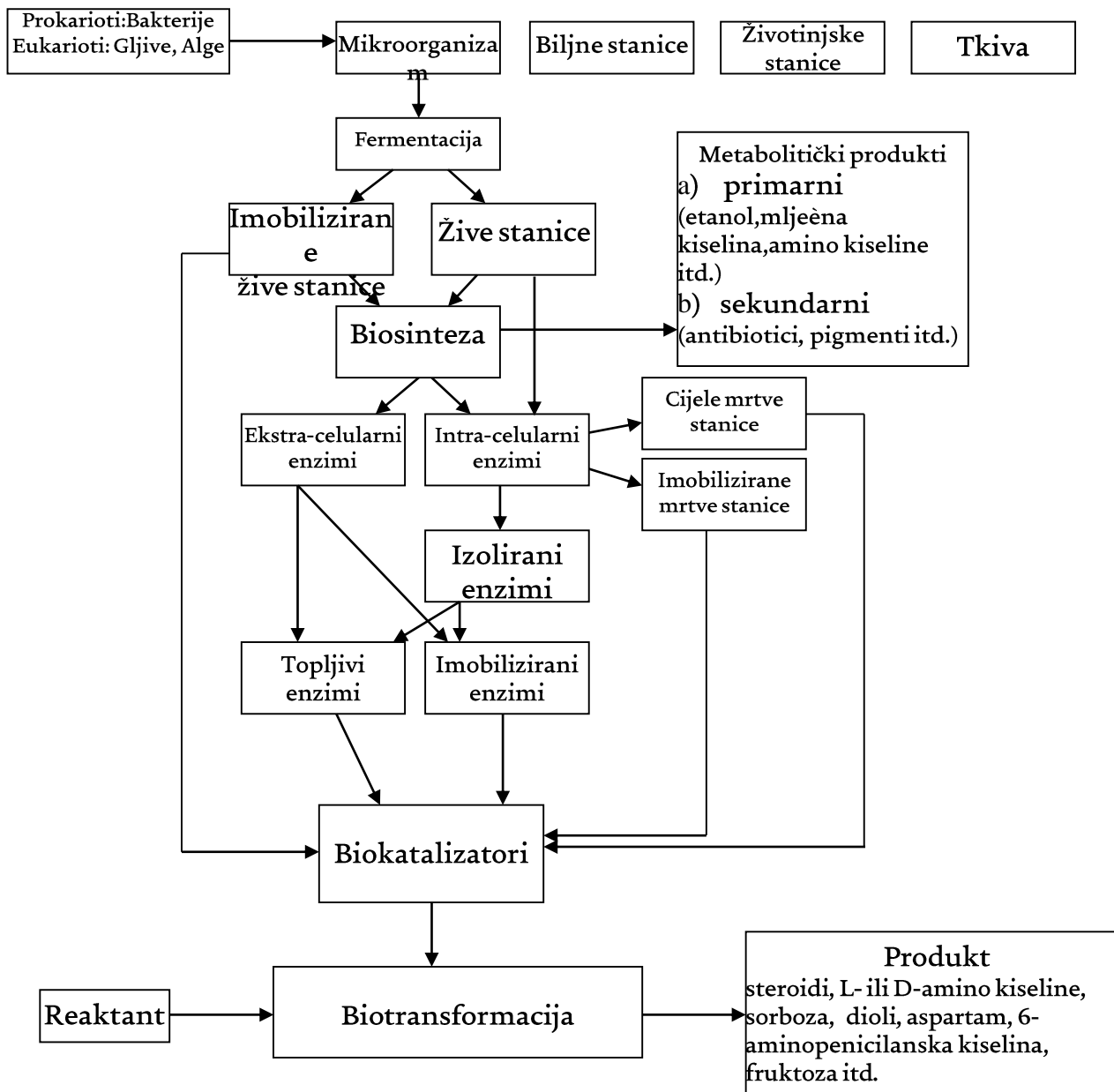
Razvojni ciklus
Saccharomyces cerevisie

BIOPROCES

STANIČNI METABOLIZAM



BIOPROCES



BIOPROCES

Fermentacija

- Anaerobni uzgoj biomase

Biomasa je sinonim za skup mikrobioloških stanica u nekom volumenu

Biosinteza

- Primarni metaboliti stanice
- Sekundarni metaboliti stanice

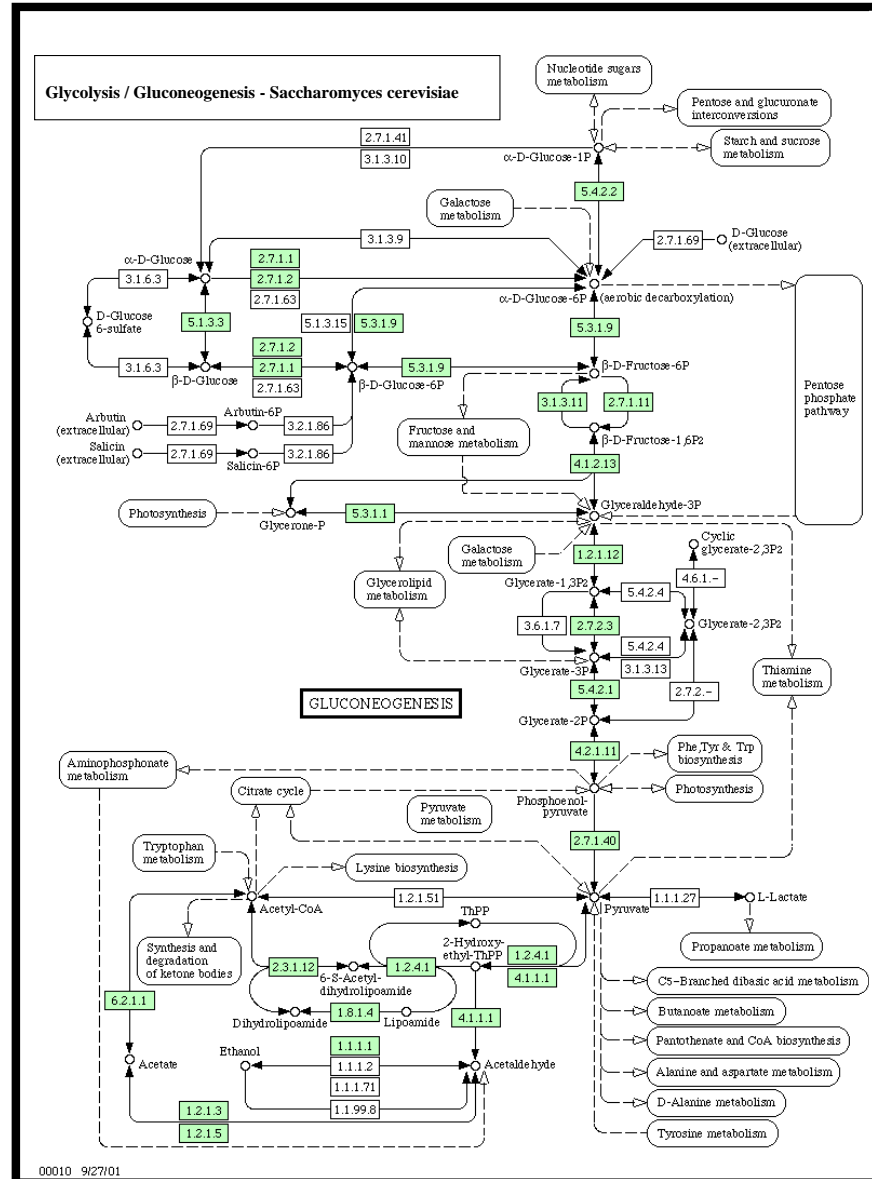
Biotransformacije

- Reakcije u jednom ili dva stupnja koje kataliziraju pročišćeni enzimi ili enzimi u cijelim stanicama neživih ili živih organizama.

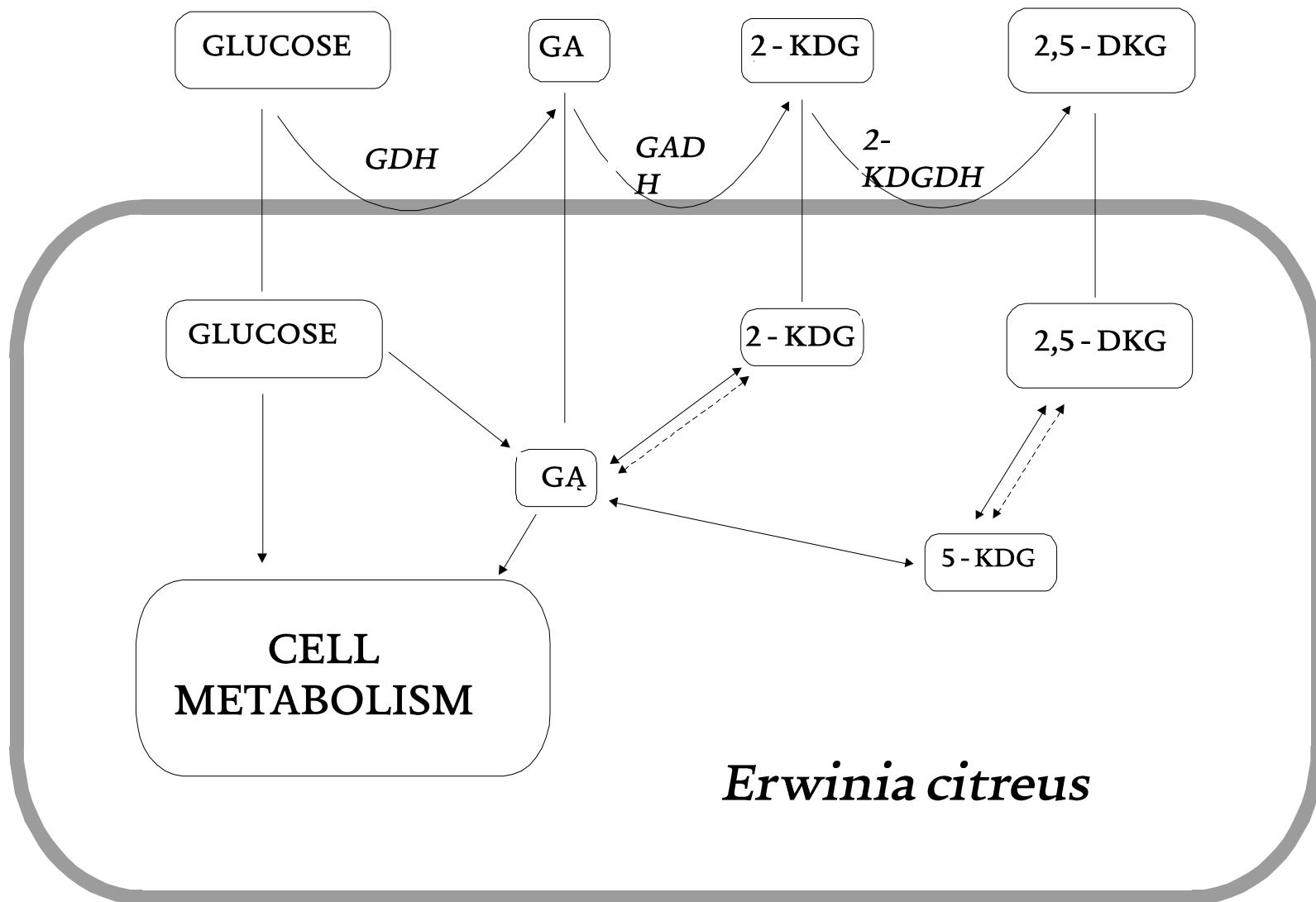
BIOPROCES - Fermentacija

Biomasa

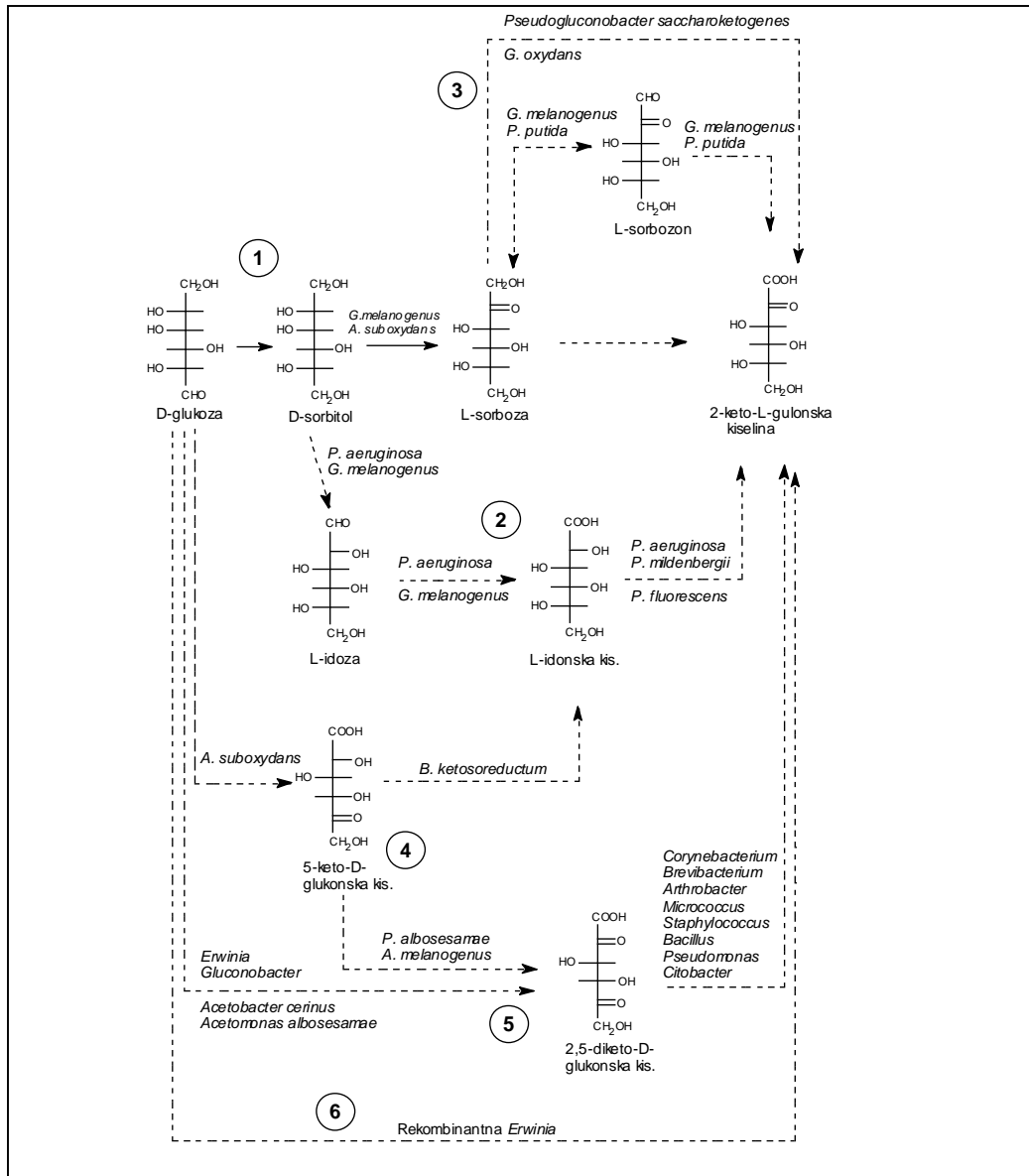
Saccharomyces cerevisiae



BIOPROCES - Biotransformacija



BIOPROCES - Biotransformacija



Putevi biosinteze vitamina C pomoću mikroorganizama²

1. Reichstein-Gruessner-ov put
2. L-idozni put
3. L-sorbozonski put
4. 5-keto-D-glukonski put
5. 2,5-diketo-D-glukonski put
6. direktni put pomoću genetički modificiranog mikroorganizma

BIOPROCES

Major Forces Driving Chemical Biotechnology

New Products (Societal Pressures)

- Health
 - Glucometer, Analysis
 - TPA, Epogen
- Commodity
 - Soaps and Detergents
 - Whey
 - Biodegradable plastics

"Discovery" or Basic Research (Technological Pressures)

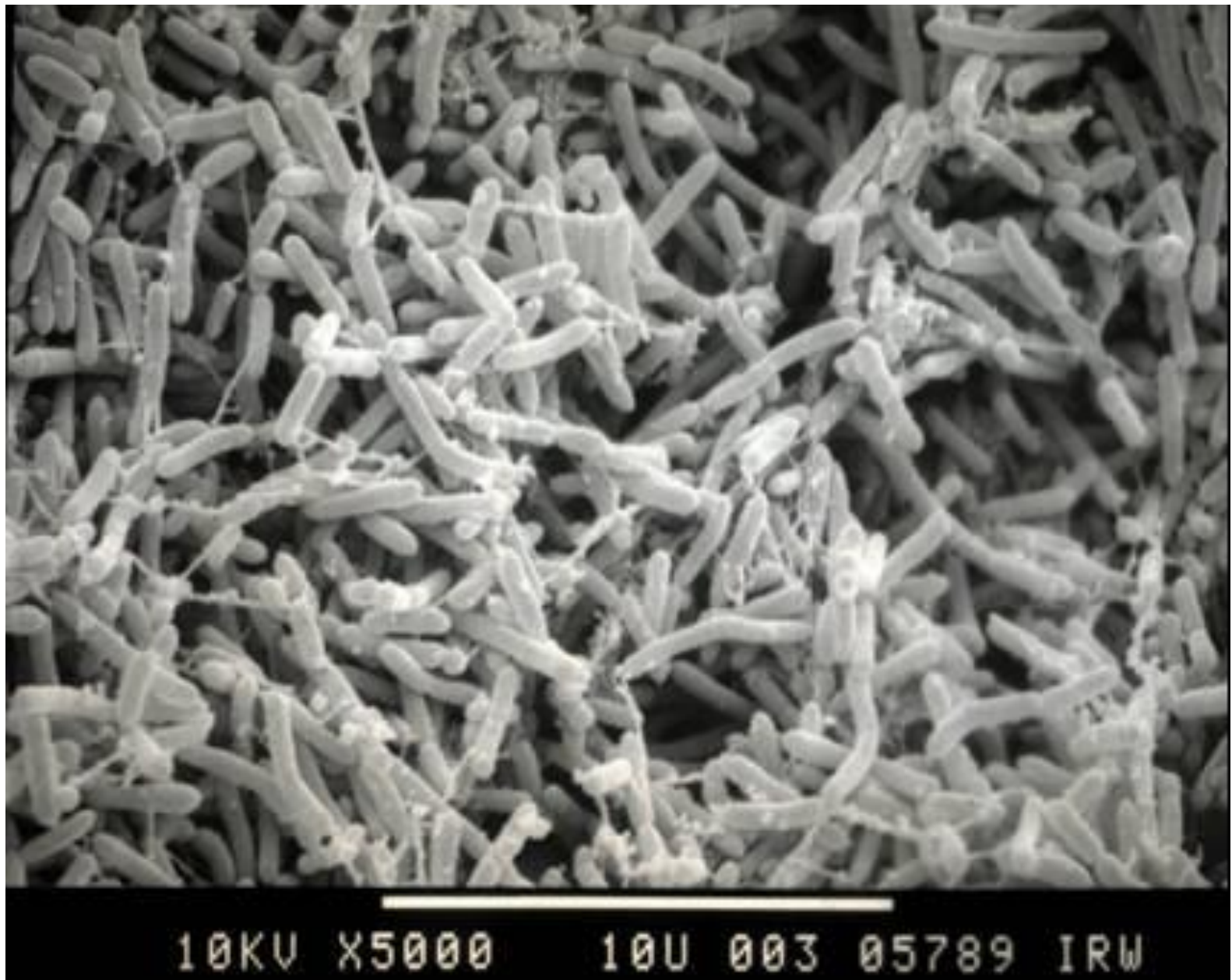
- Genetic Engineering
- Site-directed Mutagenesis
 - Combinatorial / Phage Display
 - Combinatorial Chemistry and Biocatalysis
 - PCR
 - Fusion Proteins
 - Synzymes / Abzymes / Newzymes
 - Metabolic Engineering

Environmental (Regulatory & Legal Pressures)

- "Green Chemistry"
- Energy
- Greenhouse Effect

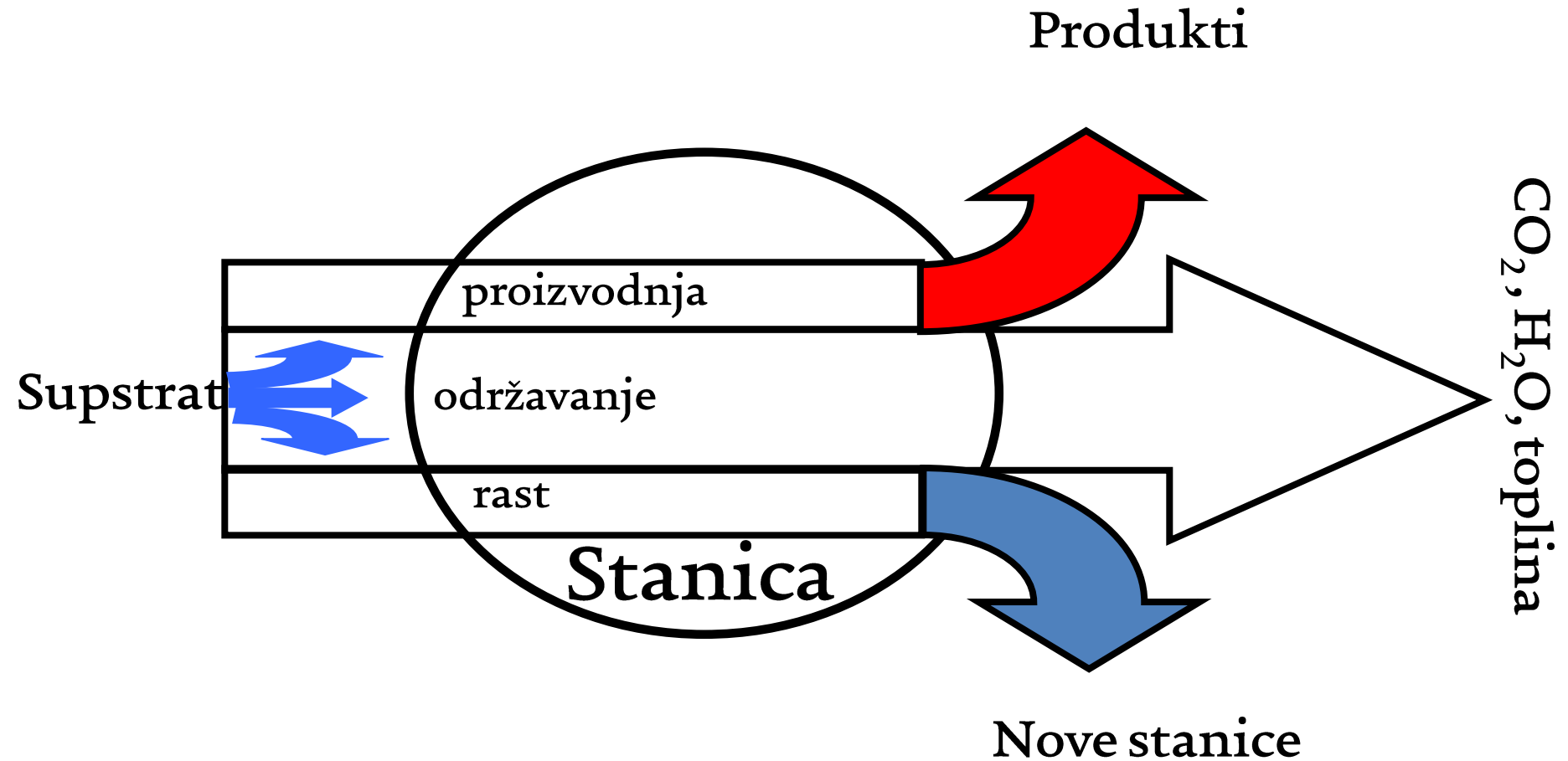
Profits/Cost Reduction (Business Pressures)

- Bioseparations

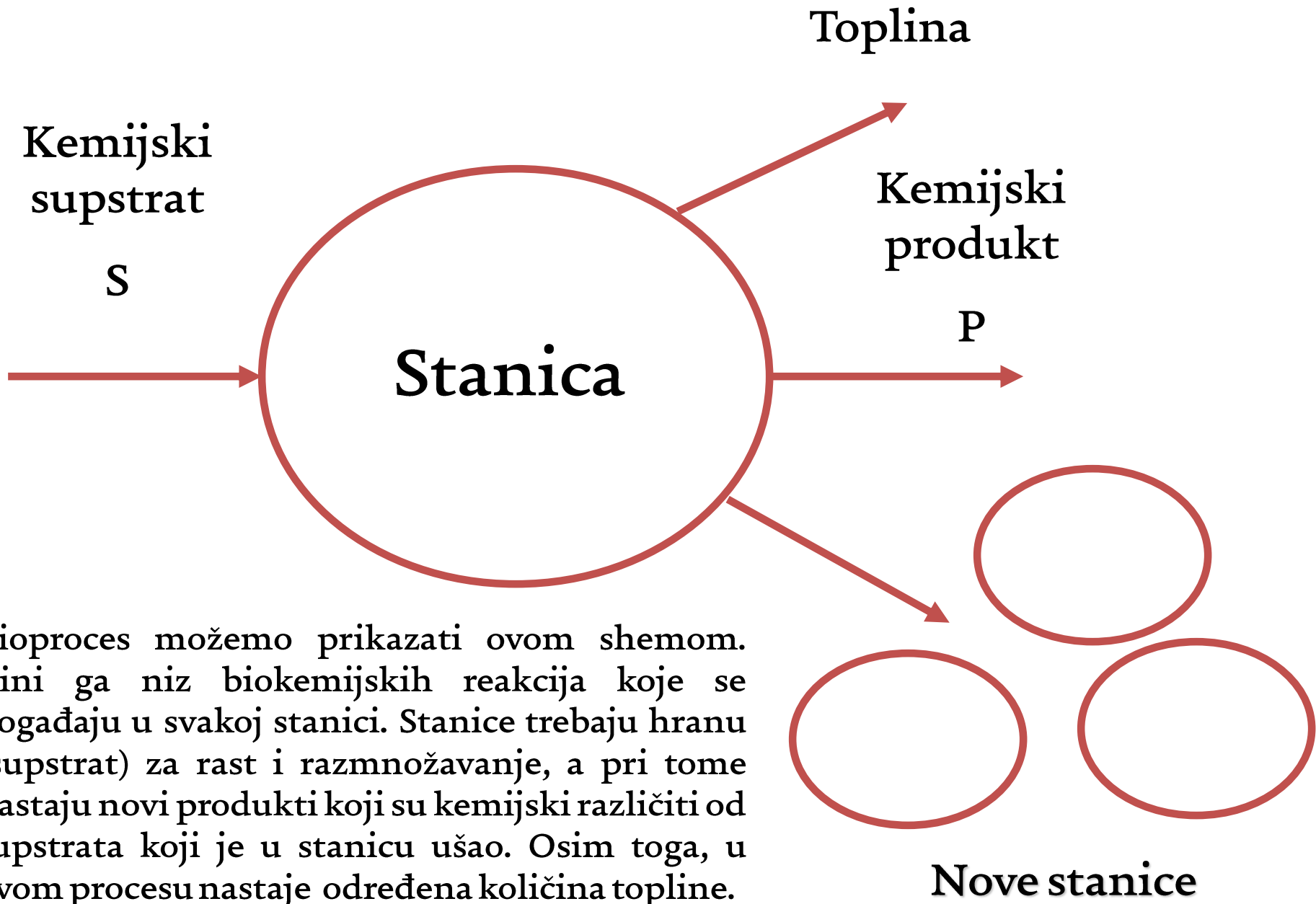


Bakterija *Acetogenium kivui* (Povećanje 5000 puta)

Protok supstrata kroz stanicu



BIOPROCES



Bioprocen možemo prikazati ovom shemom. Čini ga niz biokemijskih reakcija koje se događaju u svakoj stanici. Stanice trebaju hranu (supstrat) za rast i razmnožavanje, a pri tome nastaju novi produkti koji su kemijski različiti od supstrata koji je u stanicu ušao. Osim toga, u ovom procesu nastaje određena količina topline.

KEMIJSKA REAKCIJA

Kod kemijske reakcije imamo stehiometrijske koeficijente koji nam omogućuju proračun; kod bioprocesa definiramo iskorištenja (Y)



Kod kemijske reakcije nastajanja epoksida imamo iskorištenje mol nastalog produkta po molu izreagiralog reaktanta

$$Y_{P/S} = 1 \text{ mol mol}^{-1} = 1,57 \text{ kg kg}^{-1}$$

Kod bioprocesa je iskorištenje na supstratu manje jer se dio troši na rast, održavanje i razmnožavanje, a tek dio na nastajanje epoksida.

BIOPROCES

Kod bioprocasa nemamo jednoznačnih stehiometrijskih koeficijenata, pa definiramo iskorištenja u pojedinim reakcijama. U prikazanom bioprocasu nastaje epoksid u mikroorganizmu.

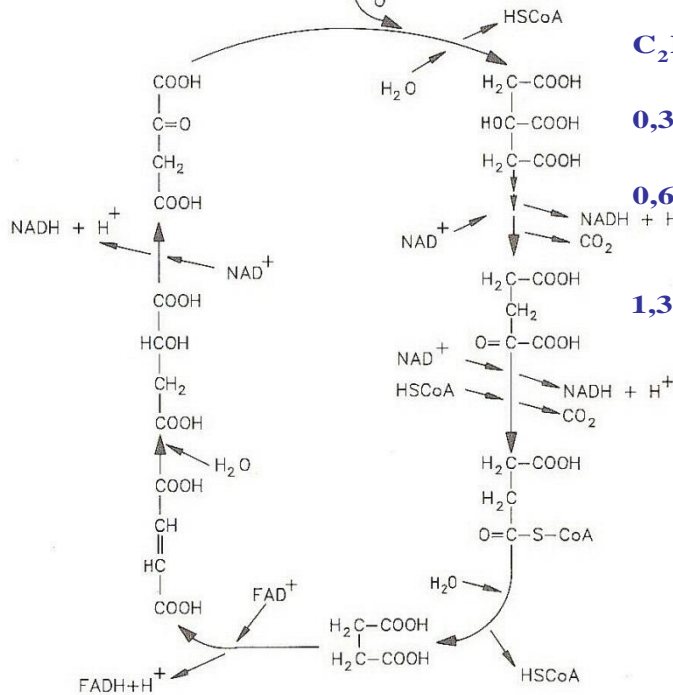
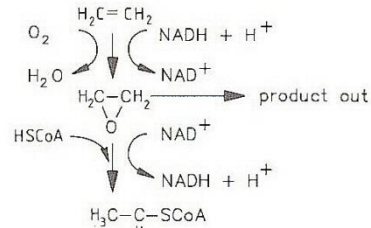
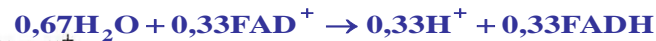
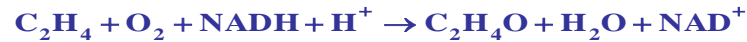


Fig. 3.2 The epoxidation pathway.



$$Y_{P/S} = 0,75 \text{ mol mol}^{-1} = 1,18 \text{ kg kg}^{-1}$$

Iskorištenje na supstratu je manje od onog u kemijskoj reakciji. Dio supstrata je stanica iskoristila za rast i razmnožavanje, pa stoga iskorištenje ne može biti kao u kemijskoj reakciji.

Mikrobiološka Kinetika

Stehiometrija:

Biomasa + Supstrat \longrightarrow Više biomase + Produkt



Iskorištenja

$$Y_{X/S} = \frac{\text{nastala biomasa}}{\text{potrosen supstrat za nastanak biomase}}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\text{nastali produkt}}{\text{potrosen supstrat za nastanak produkta}}$$

Reakcijska stehiometrija prikazana iznad je temelj za definiranje različitih koeficijenata iskorištenja. Dakle, u bioprocesima sa mikroorganizmima ne možemo govoriti o uobičajenoj stehiometriji kao kod kemijske reakcije. Ne možemo napisati stehiometrijske koeficijente uz ovdje navedenu jednadžbu reakcije. Oni povezuju masu produkata i stanica koje su nastale po jedinici supstrata. Poznavanje ovih koeficijenata omogućuje dizajn medija za rast mikroorganizama koji će osigurati sve potrebne nutrijente u uravnoteženim koncentracijama

Mikrobiološka Kinetika

Stanično održavanje-maintenance

$$m = \frac{\text{masa supstrata potrosena na održavanje}}{\text{masa stanica} \bullet \text{vrijeme}}$$

Uobičajena vrijednost:

$$m = 0,5 \frac{\text{g supstrata}}{\text{g suhe stanicne masa} \bullet \text{h}} = 0,5 \frac{1}{\text{h}}$$

Brzina potrošnje supstrata za održavanje :

$$r_{sm} = m \bullet C_X$$

Mikrobiološka kinetika

- **Kinetika rasta mikroorganizama**
 - Mikroorganizam mora narasti – raste određenom brzinom, pri tome troši supstrat – hranu, te stvara određene produkte
- **Kinetika potrošnje supstrata**
 - Mikroorganizam za svoj rast mora imati dostupan supstrat – hranu, te ga troši određenom brzinom
- **Kinetika nastajanja produkta**
 - Tijekom rasta i razvoja, mikroorganizmi stvaraju određene produkte metabolizma; brzina njihovog nastanka se također može mjeriti

Mikrobiološka kinetika

Kinetika rasta mikroorganizama (biomase):

- podsjeća na kinetiku prvoga reda, uz važnu napomenu da μ nije konstanta, već specifična brzina rasta biomase (h^{-1})
- brzina rasta biomase ovisi o koncentraciji biomase, te o specifičnoj brzini rasta biomase

$$r_X = \mu \cdot c_X$$

Specifična brzina rasta biomase - Monodova kinetika:

- specifična brzina rasta biomase ovisi o maksimalnoj specifičnoj brzini rasta biomase, koncentraciji supstrata i konstanti zasićenja supstratom, K_S
- maksimalna specifična brzina rasta biomase ovisi o vrsti mikroorganizma, te o supstratu na kojem mikroorganizam raste
- konstanta zasićenja supstratom također ovisi o vrsti mikroorganizma i o supstratu

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot c_S}{K_S + c_S}$$

c_X – koncentracija biomase, g L^{-1}

c_S – koncentracija supstrata, g L^{-1}

K_S – konstanta zasićenja supstratom, g L^{-1}

μ – specifična brzina rasta biomase, h^{-1}

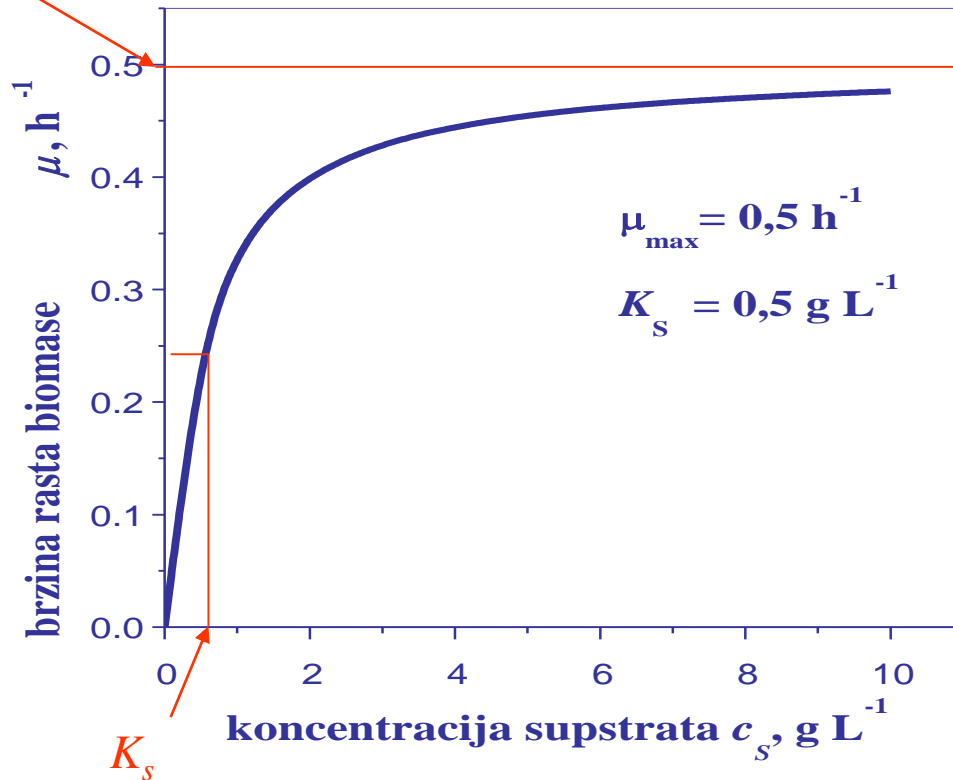
μ_{\max} – maksimalna specifična brzina rasta biomase, h^{-1}

Mikrobiološka kinetika

Monodova kinetika:

Ovisnost specifične brzine rasta biomase o koncentraciji supstrata

μ_{\max}



$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot c_S}{K_S + c_S}$$

Mikrobiološka kinetika

Kotlasti bioreaktor:

Brzina rasta biomase

$$r_X = \frac{dc_X}{dt}$$

$$\frac{dc_X}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot c_S}{K_S + c_S} \cdot c_X$$

$$r_X = \mu \cdot c_X \quad \mu = \frac{\mu_{\max} \cdot c_S}{K_S + c_S}$$

Uvrštavamo Monodovu kinetiku u izraz za brzinu rasta biomase

Uvrštavamo dobivenu jednadžbu za brzinu rasta biomase u bilancu za kotlasti bioreaktor

Iz navedene jednadžbe proizlazi da promjena koncentracije biomase u kotlastom bioreaktoru ovisi o vrsti mikroorganizma, koncentraciji supstrata, te o koncentraciji biomase.

Mikrobiološka kinetika

Kotlasti bioreaktor:

Brzina potrošnje supstrata

$$\frac{dc_s}{dt} = -r_s$$

$$\frac{dc_s}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dc_x}{dt}$$

Brzina nastajanja produkta

$$\frac{dc_p}{dt} = \alpha \cdot \frac{dc_x}{dt} + \beta \cdot c_x$$

Jedan dio supstrata se troši na rast biomase, a jedan na nastajanje produkta. Brzina potrošnje supstrata ovisi o brzini rasta biomase i tu je još faktor iskorištenja koji govori koji dio supstrata se troši na nastajanje biomase, a koji na nastanak novih stanica. Taj faktor govori o tipu mikroorganizma i o njegovoj mogućnosti da iskoriste supstrat za svoj rast.

Brzina nastajanja produkata nije proporcionalna brzini potrošnje supstrata već ovisi o brzini rasta biomase te o koncentraciji biomase.

Kod nekih mikroorganizama ovisi samo o brzini rasta biomase, a nekih koncentraciji biomase, pa se dio navedenog izraza gubi (individualno za svaki mikroorganizam).

Mikrobiološka Kinetika

Brzina potrošnje supstrata

$$r_S = -\frac{1}{Y_{X/S}} \bullet r_X - \frac{1}{Y_{P/S}} \bullet r_P - r_{sm}$$

$$\frac{dc_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \bullet \frac{dc_X}{dt} - \frac{1}{Y_{P/S}} \bullet \frac{dc_P}{dt} - m \bullet c_X$$

Mikrobiološka kinetika

Growth Associated Product Formation

$$\frac{dc_P}{dt} = \alpha \bullet \frac{dc_X}{dt} \quad \text{The production of gluconic acid}$$

Non- Growth Associated Product Formation

$$\frac{dc_P}{dt} = \beta \bullet c_X \quad \text{The production penicillin}$$

Mikrobiološka kinetika

Inhibicija supstratom

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S + \frac{c_S^2}{K_i}}$$

Inhibicija produktom

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{c_P}{c_{P_m}} \right) \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S}$$

Mikrobiološka kinetika

Kotlasti bioreaktor:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S}$$

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \cdot c_X$$

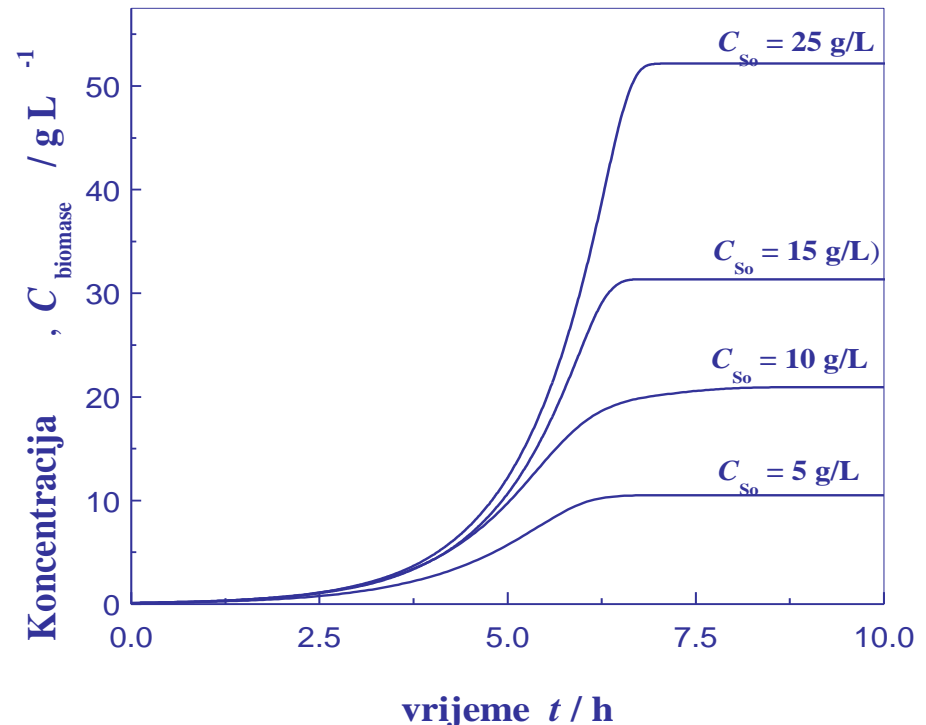
$$\frac{dc_S}{dt} = -Y_G \cdot \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \cdot c_X$$

Kad pogledamo jednadžbu i simulacije na slici ispod, vidimo da koncentracija biomase za različite koncentracije supstrata različita. Ovisi o iskorištenju supstrata za rast biomase.

Parametar	Vrijed.
c_{X_0} [g L ⁻¹]	0,1
μ_{\max} [h ⁻¹]	1
K_S [g L ⁻¹]	1
Y_G [-]	0,48

t [h]	c_X [g L ⁻¹]			
	$c_{so} = 5$ [g L ⁻¹]	$c_{so} = 10$ [g L ⁻¹]	$c_{so} = 15$ [g L ⁻¹]	$c_{so} = 25$ [g L ⁻¹]
0	0,100	0,100	0,100	0,100
1	0,229	0,297	0,307	0,317
2	0,527	0,883	0,756	0,797
3	1,200	1,521	4,543	2,006
4	2,688	4,463	10,986	5,037
5	5,712	12,511	25,107	12,596
6	9,739	18,944	31,350	30,957
7	10,511	19,806	31,350	52,183
8	10,516	19,806	31,350	52,183
9	10,516	19,806	31,350	52,183
10	10,516	19,806	31,350	52,183

Utjecaj koncentracije supstrata



Mikrobiološka kinetika

Kotlasti bioreaktor:

Parametar	Vrijed.
c_{x_0} [g L ⁻¹]	0,1
c_{s_0} [g L ⁻¹]	10
K_S [g L ⁻¹]	1
Y_G [-]	0,48

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S}$$

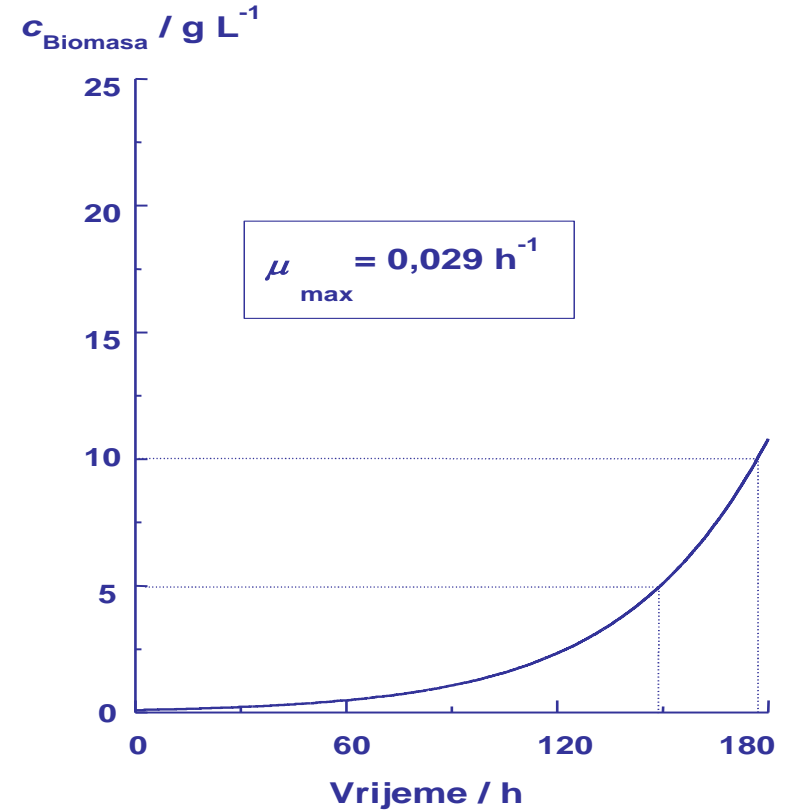
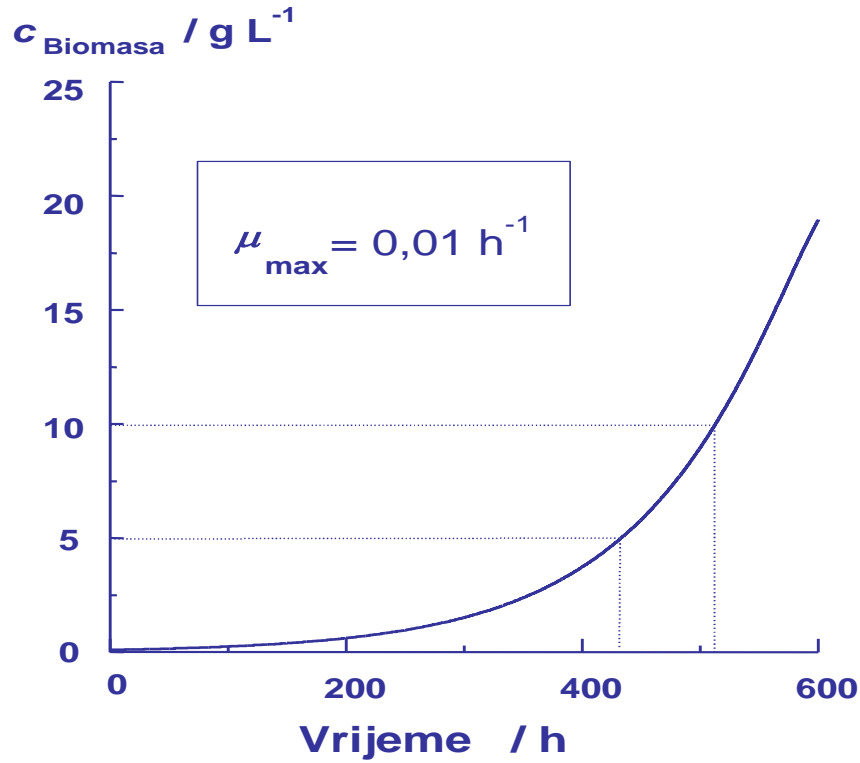
$$\frac{dc_X}{dt} = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \cdot c_X$$

$$\frac{dc_S}{dt} = -Y_G \cdot \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \cdot c_X$$

$\mu_{\max} = 0,010$ h		$\mu_{\max} = 0,029$ h		$\mu_{\max} = 0,327$ h		$\mu_{\max} = 1,000$ h	
t [h]	c^{Biomasse} [g L ⁻¹]	t [h]	c^{Biomasse} [g L ⁻¹]	t [h]	c^{Biomasse} [g L ⁻¹]	t [h]	c^{Biomass} [g L ⁻¹]
0	0,100	0	0,100	0	0,100	0	0,100
100	0,248	30	0,220	3	0,243	1	0,297
200	0,615	60	0,485	6	0,594	2	0,883
300	1,521	90	1,069	9	1,444	3	1,521
400	3,735	120	2,344	12	3,490	4	4,463
500	8,976	150	5,098	15	8,275	5	12,511
600	18,946	180	10,801	18	17,799	6	18,944

Utjecaj maksimalne specifične brzine rasta biomase na vrijeme trajanja uzgoja u bioreaktoru će biti prikazano na nekoliko slijedećih simulacija.

Mikrobiološka kinetika



Mikrobiološka kinetika

