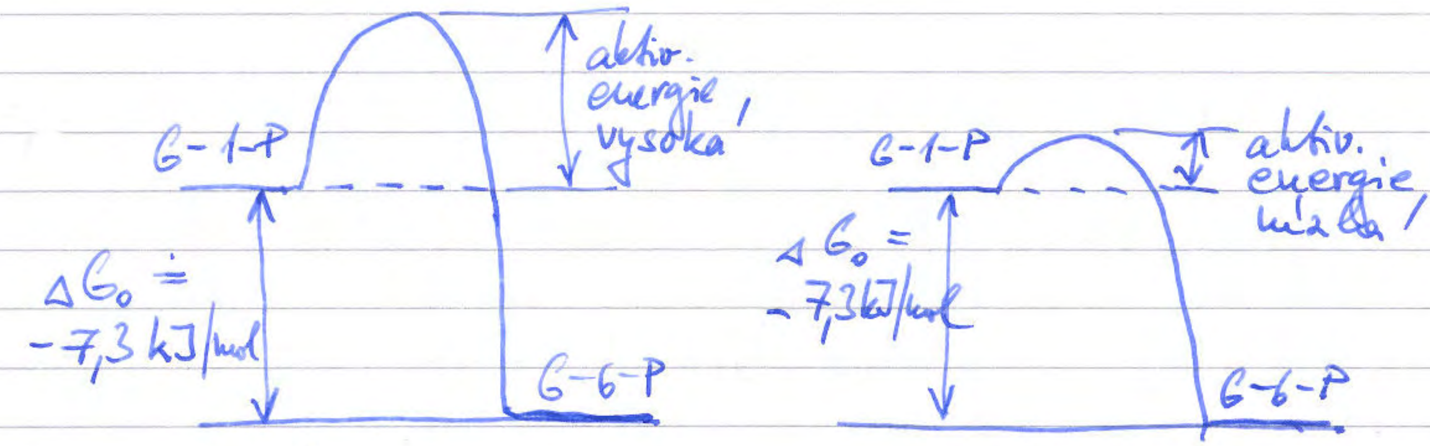
ENZYMOVÁ KATALÝZA

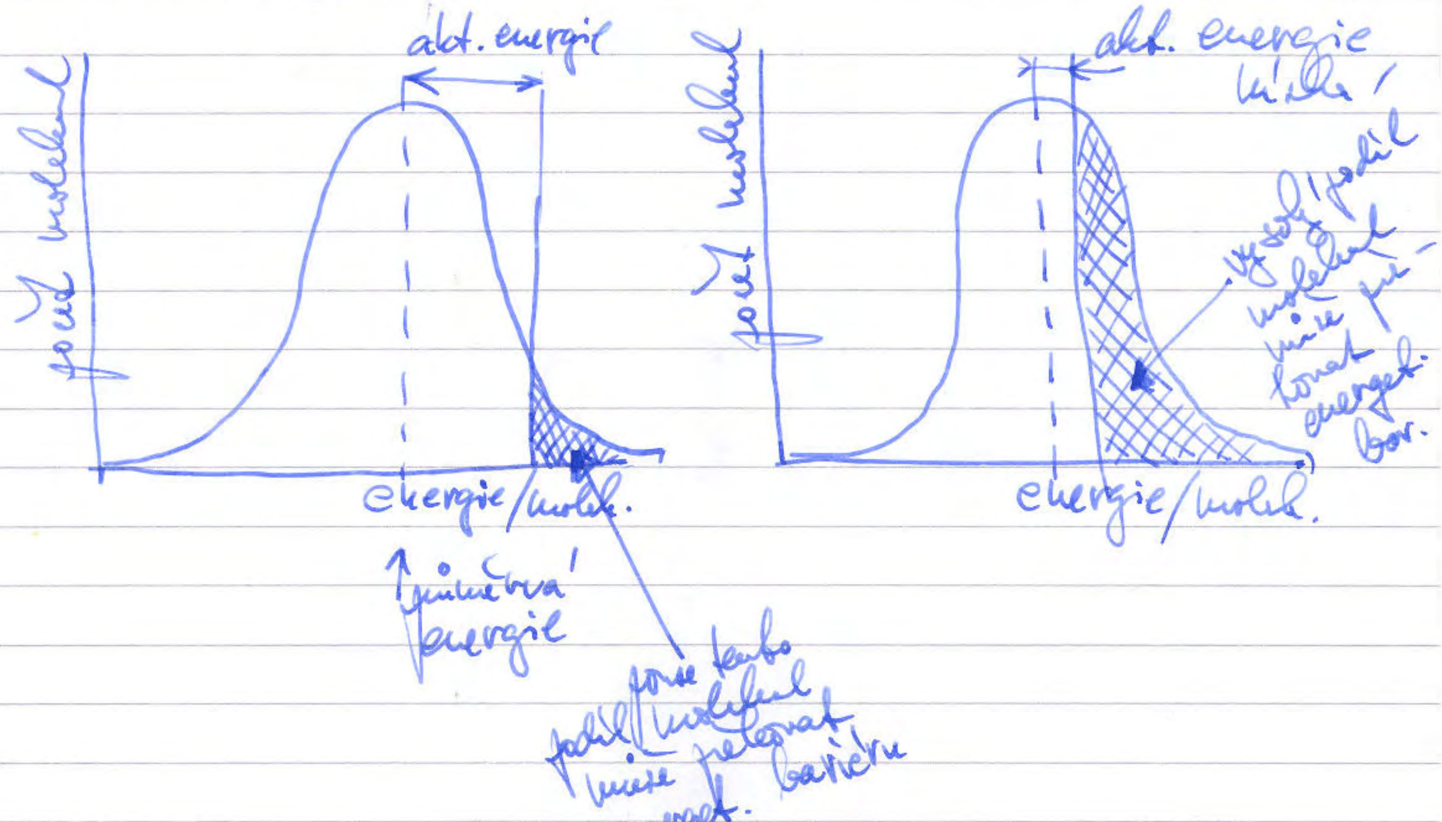
(opakování, doplnění, rozšíření)

Enzymy ≡ biochemické/biologické katalyzátory

snižují hodnotu aktivační energie katalyzované reakce



bez enzymu s enzymem



- specificita enzymového účinku!
- holoenzym = apoenzym + koenzym (kofaktor)

ionty kovů: Ca^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} ...

komplexní organické molekuly: NAD, FAD ...

<u>číslo obratu</u> („turnover number") = počet molekul substrátu, které zreagují v aktivním místě enz. molekuly za jednotku času

($0 \div 37\,°C$)

trypsin (hydrolýza peptidů)	2 - 2000
papain (— " —)	0,003 - 100
bromelain (— " —)	0,004 - 0,5
fumarát hydratasa	3000

číslo obratu pro enzymové reakce <u>bývá</u> velmi výrazně větší než u reakcí s „chemickými" katalyzátory

<u>obecná enzymová reakce:</u>

$$S \longrightarrow P$$

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} \qquad \left[\frac{mol}{dm^3}\right]$$

má vztah k číslu obratu, pokud je znám počet aktivních míst v objemové jednotce

- počáteční reakční rychlost

$$-\frac{dS}{dt}\Big|_{t=0} = \frac{dP}{dt}\Big|_{t=0} = v_0\Big|_{t=0}$$

pro $\underbrace{t=0:\ E=E_0,\ S=S_0 \text{ a } P=0}$

podmínky na počátku reakce jsou nejlépe definovány ⇒ při kinetických měřeních se počáteční rychlosti používají nejčastěji

Aktivita enzymu: množství enzymu, které zajistí za definovaných podmínek určitou rychlost enzymové reakce → [teplota, pH, S_0]

měří katalytický účinek enzymu

$= 1U$

nejčastěji: $1U = \dfrac{1\,\mu mol\ S(P)}{1\,minuta}$

(SI jednotka / téměř nepoužívaná: 1 katal

$$1\,katal = \frac{1\,mol}{1\,sec}$$

$$1\,katal = \frac{1\cdot 10^6\,\mu mol}{1/60\,min} = 60\cdot 10^6\,\frac{\mu mol}{min}$$

$$\Rightarrow\ 1U \equiv 1\,\frac{\mu mol}{min} = \frac{1}{60\cdot 10^6} \doteq 16{,}7\cdot 10^{-9}\,katal$$

$$1U \doteq 16{,}7\,nkat$$

v praxi: U/g, U/cm^3, nkat/g, nkat/cm^3 } specifická enzymová aktivita specifické aktivity slouží k porovnávání různých enzymových preparátů

• Kinetika Michaelise a Mentenové

Henri 1902, na základě empirických poznatků:

- enzymové reakce probíhají dle kinetiky 1. řádu při nízkých koncentracích ~~enzymu~~ substrátu,
- při zvyšování koncentrace substrátu přechází kinetika na reakci 0. řádu
- rychlost enzymové reakce je přímo úměrná koncentraci enzymu v reakční směsi

$$v = \frac{v_{max}\, S}{K_m + S}$$

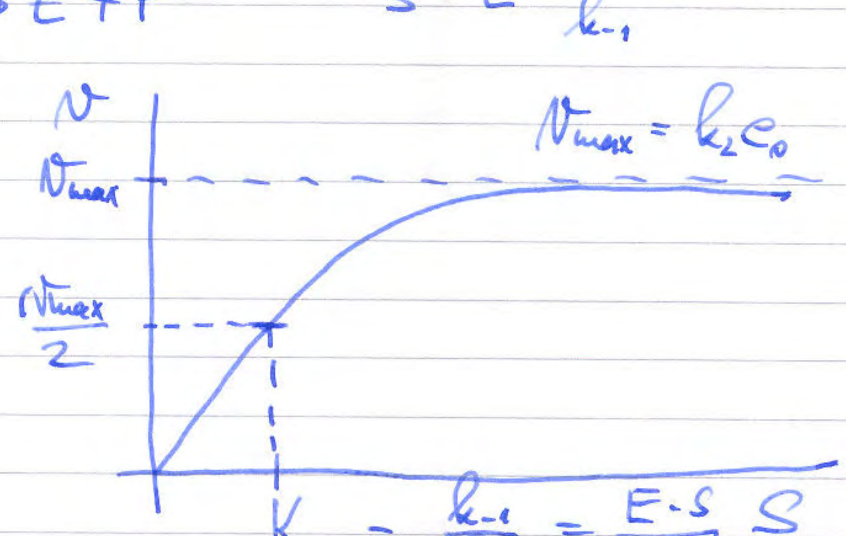
$v_{max} = \alpha e_0$

↑ konstanta úměrnosti

↑ $K_m = S_{1/2}$, tj. S při které $v = \frac{1}{2} v_{max}$

M. a M. později odvodili, že $\alpha \equiv k_2$

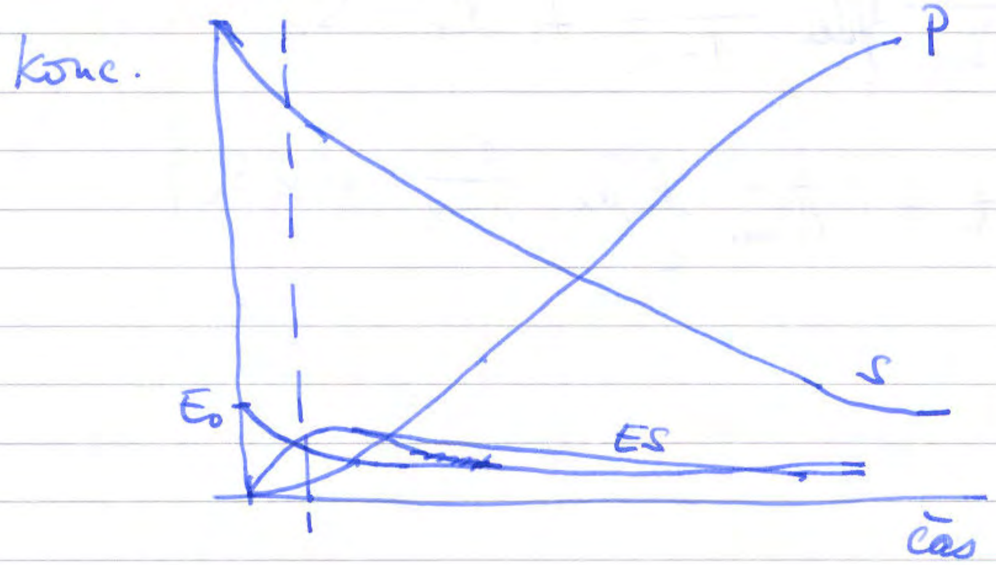
$$ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES$$



$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{E \cdot S}{ES}$$

Michaelisova konst.

předpoklady: – rychlého ustavení rovnováhy
– dosažení pseudoustáleného stavu



$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ Briggs a Haldane (takto definovaná konstanta nemá jednoduchý fyzikální smysl).

- Průběh reakce ve vsádkovém promíchávaném reaktoru:

$$\cancel{V} v = \cancel{V} \frac{dS}{dt}$$

$$-\frac{v_{max} S}{K_m + S} = \frac{dS}{dt}$$

$$-v_{max} S\, dt = (K_m + S)\, dS$$

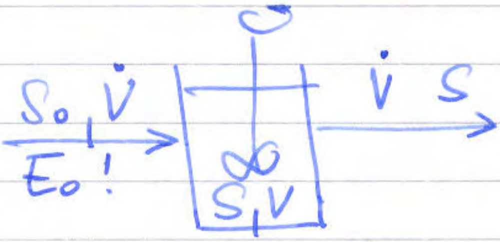
$$-v_{max}\, dt = \frac{K_m + S}{S} dS = \left(\frac{K_m}{S} + 1\right) dS$$

$$\left.\begin{array}{l} t = 0:\ S = S_0 \\ t = t:\ S = S \end{array}\right\} \quad -v_{max} t = K_m \left[\ln S\right]_{S_0}^{S} + \left[S\right]_{S_0}^{S}$$

$$-v_{max} t = K_m \ln \frac{S}{S_0} + (S - S_0)$$

$$\boxed{v_{max}\, t = K_m \ln \frac{S_0}{S} + (S_0 - S)}$$

- pro průtočný ideálně promíchávaný reaktor:



v ustáleném stavu :

$$\dot V S_0 + V v = \dot V S$$

$$\dot V (S_0 - S) = V \frac{v_{max} S}{K_m + S}$$

$$S_0 - S = \tau \frac{v_{max} S}{K_m + S}$$

$$\frac{1}{\tau}(S_0 - S) = \frac{v_{max} S}{K_m + S}$$

$$\frac{1}{\tau}(S_0 - S)(K_m + S) - v_{max} S = 0$$

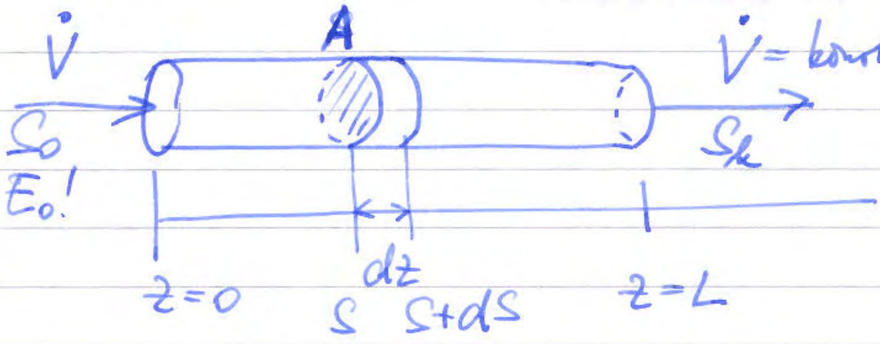
$$S_0 K_m + S S_0 - K_m S - S^2 - v_{max} S \tau = 0$$

$$\boxed{S^2 + (K_m - S_0 + v_{max}\tau) S - S_0 K_m = 0}$$

$$D = \frac{(K_m - S_0 + v_{max}\tau)^2 + 4 S_0 K_m}{2} > 0$$

$\Rightarrow$ vždy 2 reálné kořeny

• pro průtočný reaktor s pístovým tokem



$v = \frac{\dot V}{S}$ stř. rychlost

ustálený stav: $\dot V S \cancel{dt} + A\,dz\,v\,\cancel{dt} = \dot V (S+dS)\cancel{dt}$

$$\cancel{\dot V S} + A\,dz\left(-\frac{v_{max} S}{K_m + S}\right) = \cancel{\dot V S} + \dot V dS$$

$$\int_{S_0}^{S_k} \frac{K_m + S}{v_{max} S}\, dS = -\frac{A}{\dot V}\int_0^L dz$$

$$\frac{K_m}{v_{max}} \ln\frac{S_0}{S_k} + \frac{S_0 - S_k}{v_{max}} = \frac{A}{\dot V} L = \frac{V}{\dot V} = \bar\tau$$

$$\boxed{K_m \ln\frac{S_0}{S_k} + (S_0 - S_k) = \bar\tau\, v_{max}}$$

Produktivita/„výkon" reaktoru:

$$P_S = \frac{\text{moly } S}{1\,s \cdot 1\,m^3} = \begin{cases} \dfrac{\dot V (S_0 - S_k)}{V} \quad \text{průtočné} \\ \dfrac{\cancel{V}(S_0 - S_k)}{\cancel{V}(\tau_r + \tau_d)} = \dfrac{S_0 - S_k}{\tau_r + \tau_d} \end{cases}$$

$$\frac{\cancel{m^3} \cdot mol}{s \;\; \cancel{m^3}\; m^3}$$

měřeno substrátem

Určování hodnot konstant M.-M. rovnice

a) linearizace exp. dat:

$$\boxed{\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}}\,\frac{1}{S}}$$ Lineweaver-Burk

$$\boxed{\frac{S}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}}\,\frac{1}{S}}$$ Hannes-Woolf

$$\boxed{v = V_{max} - K_m\,\frac{v}{S}}$$ Eadie-Hofstee

linearizované proměnné

b) nelineární regrese / metoda nejmenších čtverců

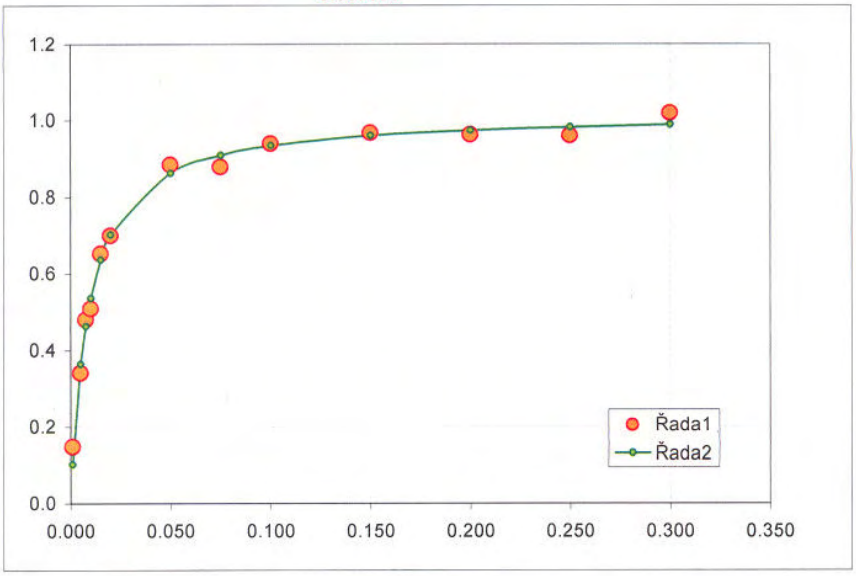
$$S = \sum_{i=1}^{n}\left(v_{i,exp} - v_{i,M.-M.}\right)^2 \equiv f(K_m, V_{max})$$

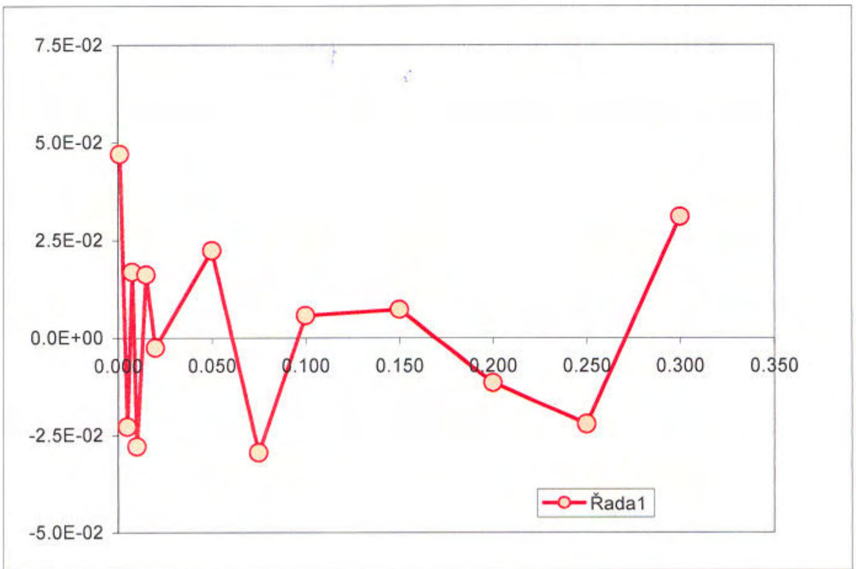
hledáme K_m, V_{max} pro která $S \to min.$
(např. Excel)

S	V-exp	V-vyp	delta^2	delta
0.001	0.14897	0.1019	0.0022	0.0470
0.005	0.34115	0.3640	0.0005	-0.0228
0.008	0.48000	0.4632	0.0003	0.0168
0.010	0.50842	0.5363	0.0008	-0.0278
0.015	0.65285	0.6367	0.0003	0.0161
0.020	0.70000	0.7026	0.0000	-0.0026
0.050	0.88547	0.8632	0.0005	0.0223
0.075	0.88000	0.9094	0.0009	-0.0294
0.100	0.94000	0.9344	0.0000	0.0056
0.150	0.96800	0.9608	0.0001	0.0072
0.200	0.96300	0.9746	0.0001	-0.0116
0.250	0.96087	0.9830	0.0005	-0.0222
0.300	1.01960	0.9887	0.0010	0.0309
			0.007076	

	odhad	exact	rel. rozdil
Km	0.008991	0.008	12.4
Vm	1.018379	1	1.8

0.07667
0.41330
0.48540
0.51816
0.65039
0.72254
0.85366
0.89989
0.88695
0.97929
0.96620
0.94673
0.94873





Další enzymové kinetiky

- vratná reakce:

$$S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$$

$$\boxed{v \equiv -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{(v_S/K_S)S - (v_P/K_P)P}{1 + S/K_S + P/K_P}}$$

$v_S \sim v_{max}$ $\qquad v_P = \dfrac{k_{-1} v_S}{k_2}$

$K_S \sim K_m$ $\qquad K_P = \dfrac{k_1 K_S}{k_{-2}}$ $\qquad P = S_0 - S$

- substrátová inhibice

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad K_1$$

$$ES + S \rightleftharpoons ES_2 \qquad K_2$$

K_1, K_2 disociační konstanty

$$ES \xrightarrow{k} E + P$$

$$\boxed{v = \frac{kE_0}{1 + K_1/S + S/K_2}} = \frac{kE_0 S}{S + K_1 + S^2/K_2}$$

$$\frac{dv}{dS} = 0 \Rightarrow S_{max} = \sqrt{K_1 K_2}$$

• v průtočném promíchávaném reaktoru:

ustálený stav!
$$\dot V S_0 - V \frac{k_2 E_0}{1 + K_1/S + S/K_2} = \dot V S$$

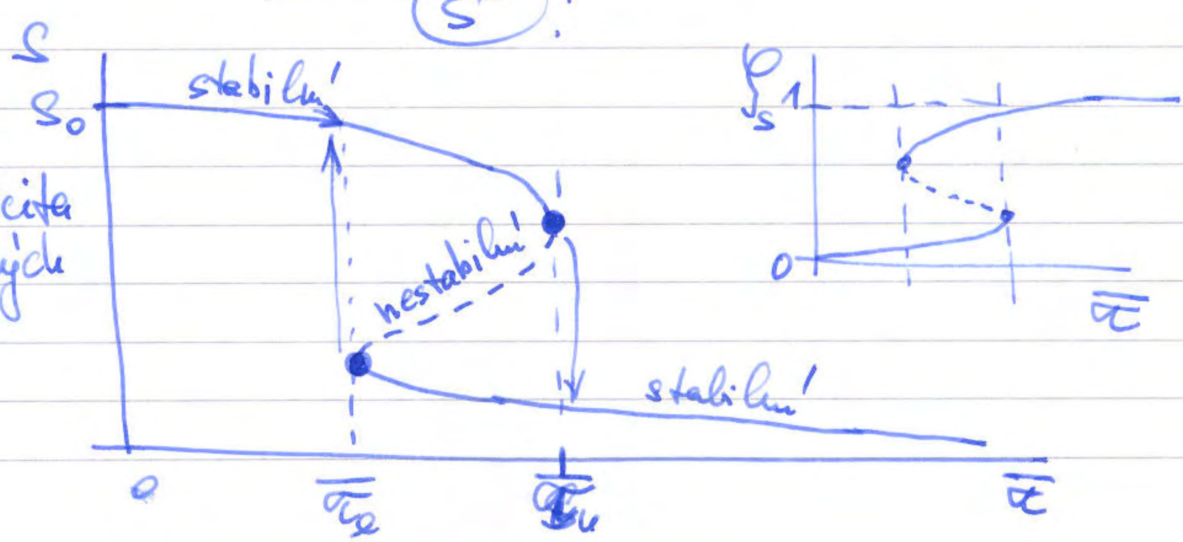
$$\frac{S_0 - S}{\tau} = \frac{k_2 E_0}{1 + K_1/S + S/K_2}$$

$$\frac{S_0 - S}{\tau} = \frac{k_2 E_0 S}{S + K_1 + S^2/K_2}$$

$$(S_0 - S)(S + K_1 + S^2/K_2) = \tau k E_0 S$$

S^3 !

multiplicita ustálených stavů



Inaktivace enzymů a její vliv na průběh reakce

inaktivace:
- nevratná $\quad E_{akt.} \rightarrow E_{inakt.}$
- vratná $\quad E_{akt.} \underset{k_{d2}}{\overset{k_{d1}}{\rightleftharpoons}} E_{inakt.}$

? $k_{d1} > k_{d2}$

Kinetika inaktivace:

$\boxed{\text{0. řádu:}}$

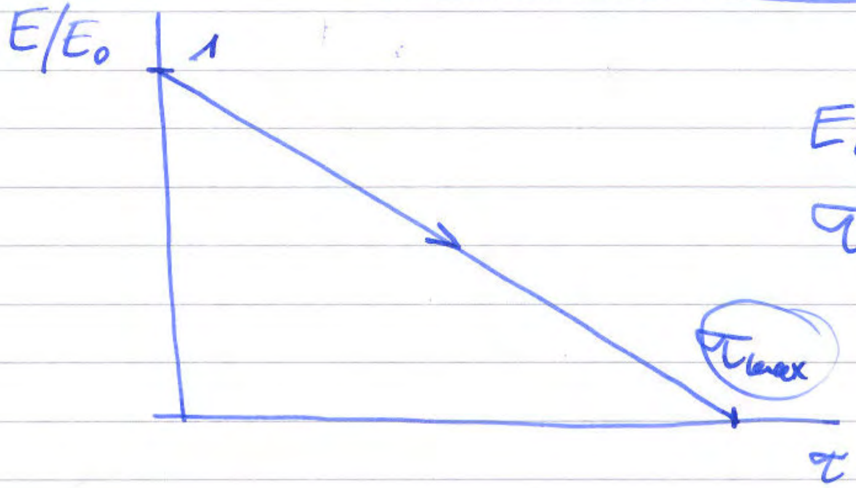
nepříliš častá

$$\frac{dE}{d\tau} = -k_d$$

$$dE = -k_d \, d\tau$$

$$E - E_0 = -k_d \tau$$

$$\boxed{E = E_0 - k_d \tau}$$



$$E_0 = k_d \tau_{max}$$

$$\tau_{max} = E_0 / k_d$$

jednotky?

$\boxed{\text{1. řádu}}$

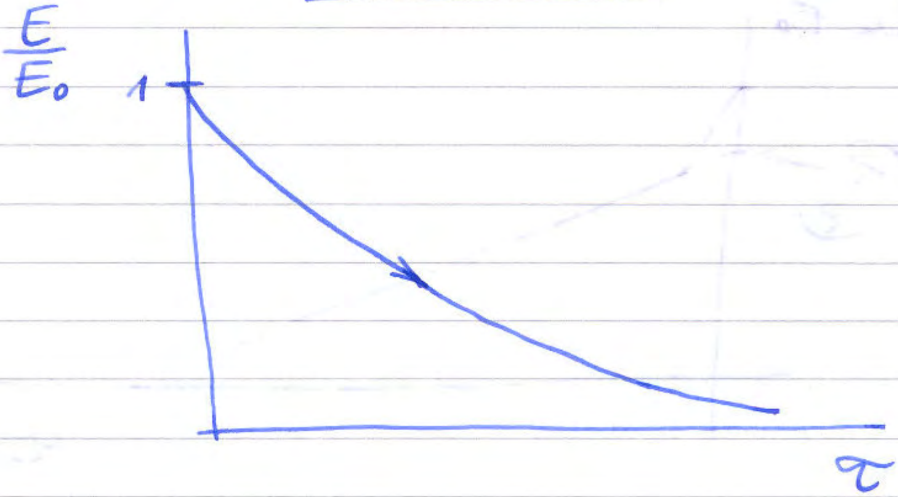
nejčastější (?)

$$\frac{dE}{d\tau} = -k_d E$$

$$\frac{dE}{E} = -k_d \, d\tau$$

$$\ln E = -k_d \tau + C$$

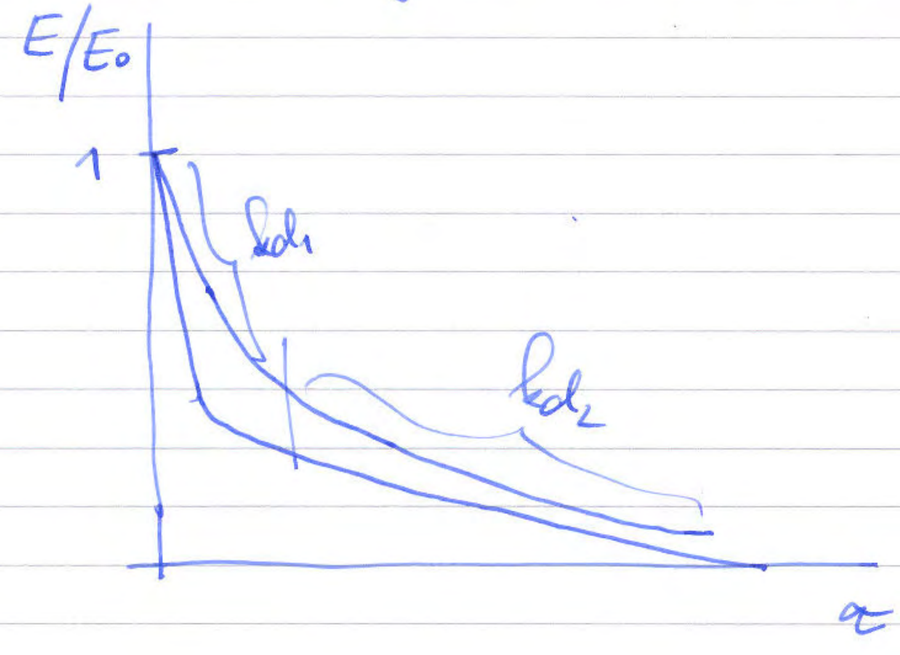
$$\boxed{E/E_0 = \exp(-k_d \tau)}$$



$\boxed{\text{smíšená inaktivace}}$

- např. v přítomnosti dvou isomerů enzymu s různou rychlostí inaktivace

$$\frac{E}{E_0} = \underbrace{a \exp(-k_{d1}\tau)}_{\text{rychlá inaktivace}} + \underbrace{(1-a)\exp(-k_{d2}\tau)}_{\text{pomalá inaktivace}}$$



./.

Enzymová reakce s inaktivací 1. řádu ve vsádkovém reaktoru

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{V_m S}{K_m + S}$$

$$V_m = k_2 E$$

$$E = E_0 e^{-k_d t}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{k_2 E_0 e^{-k_d t} S}{K_m + S}$$

$$\int_{S_0}^{S_k} \frac{K_m + S}{S} dS = \int_0^{t_k} - \underbrace{k_2 E_0}_{V_{m0}} e^{-k_d t} dt$$

$$K_m \ln \frac{S_k}{S_0} + (S_k - S_0) = + \frac{V_{m0}}{k_d} \left(e^{-k_d t_k} - 1 \right)$$

$$K_m \ln \frac{S_k}{S_0} + (S_k - S_0) = \frac{V_{m0}}{k_d} \left(-1 + e^{-k_d t_k} \right)$$

$$S_k = S_0 (1 - \xi_{sk})$$

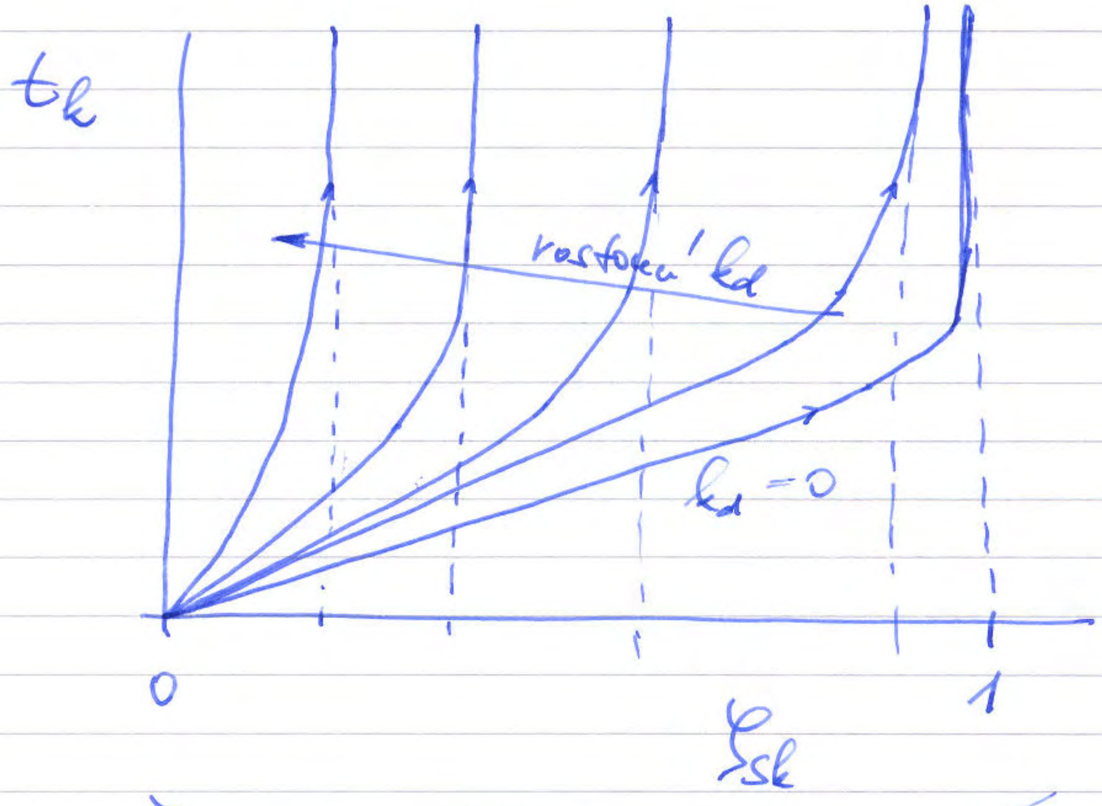
$$\frac{k_d}{V_{m0}} \left\{ K_m \ln \frac{S_0 (1 - \xi_{sk})}{S_0 \cancel{(1-\xi_{sk})}} - S_0 + S_0 (1 - \xi_{sk}) \right\} =$$

$$= -1 + e^{-k_d t_k}$$

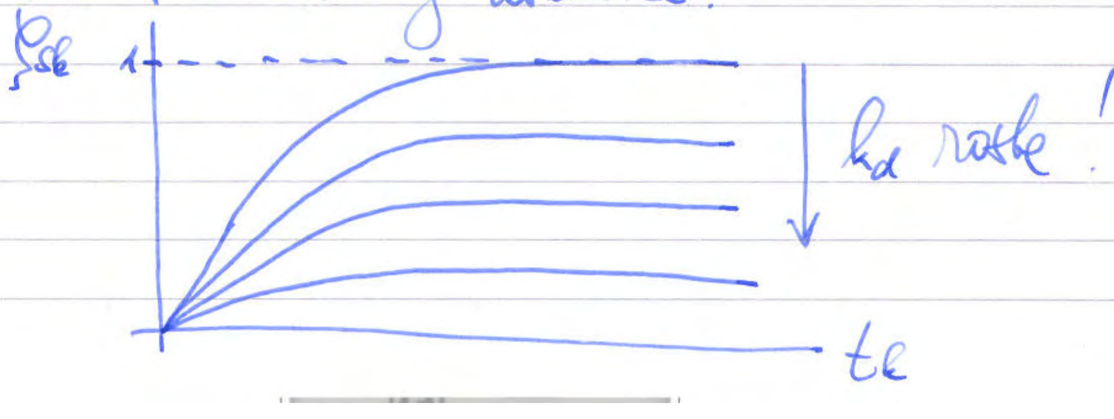
$$e^{-k_d t_k} = 1 + \frac{k_d}{V_{m0}} \left\{ K_m \ln \frac{1-\xi_{sk}}{1-\ldots} - S_0 \xi_{sk} \right\}$$

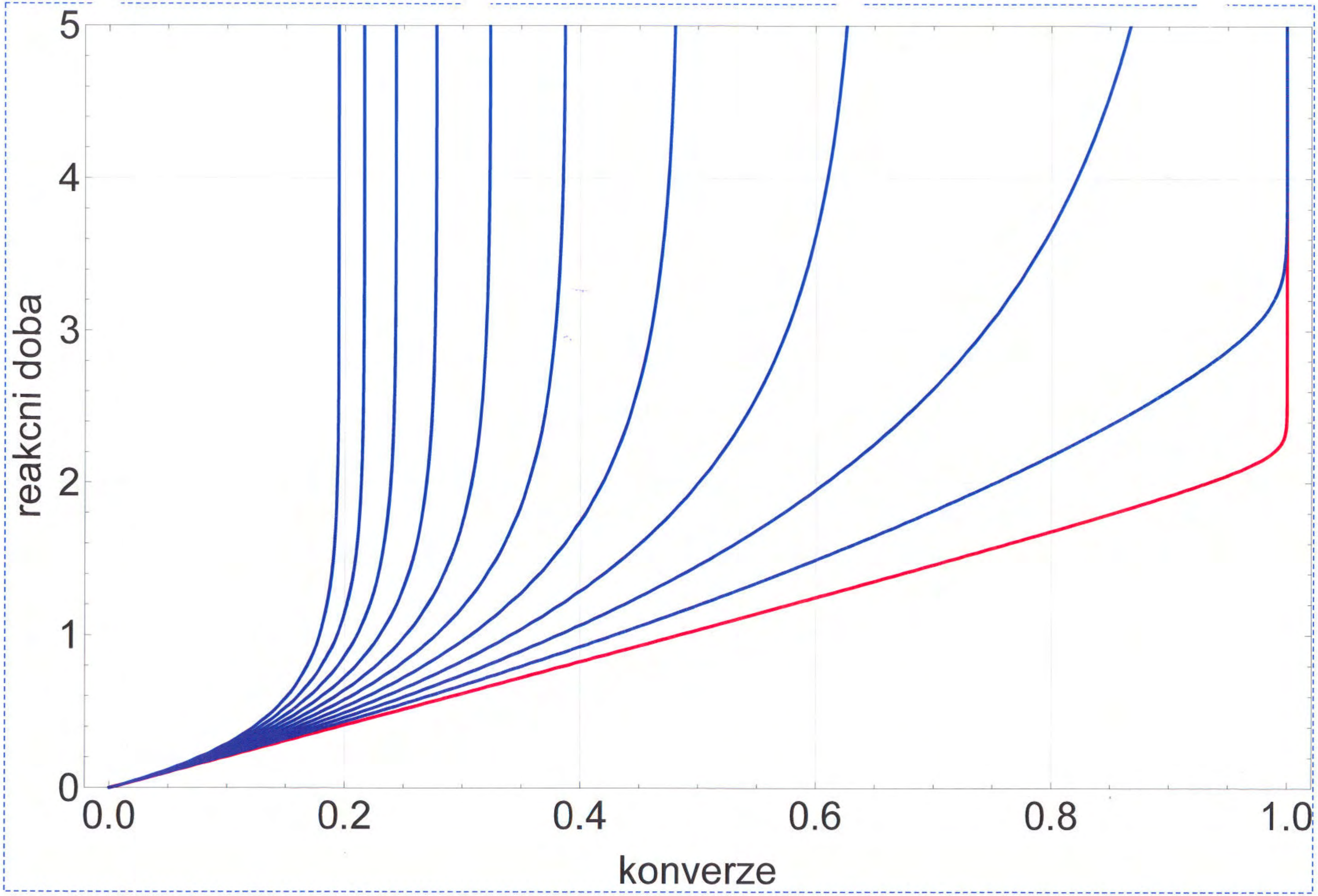
$$-k_d t_k = \ln \left\{ 1 + \frac{k_d}{V_{m0}} \left(K_m \ln \frac{1}{1-\xi_{sk}} - S_0 \xi_{sk} \right) \right\}$$

$$\boxed{t_k = -\frac{1}{k_d} \ln \left\{ 1 + \frac{k_d}{V_{m0}} \left(K_m \ln \left(\frac{1}{1-\xi_{sk}} \right) - S_0 \xi_{sk} \right) \right\}}$$



inaktivace enzymu způsobuje nárůst reakční doby nade všechny meze a limitní hodnotu konverze!



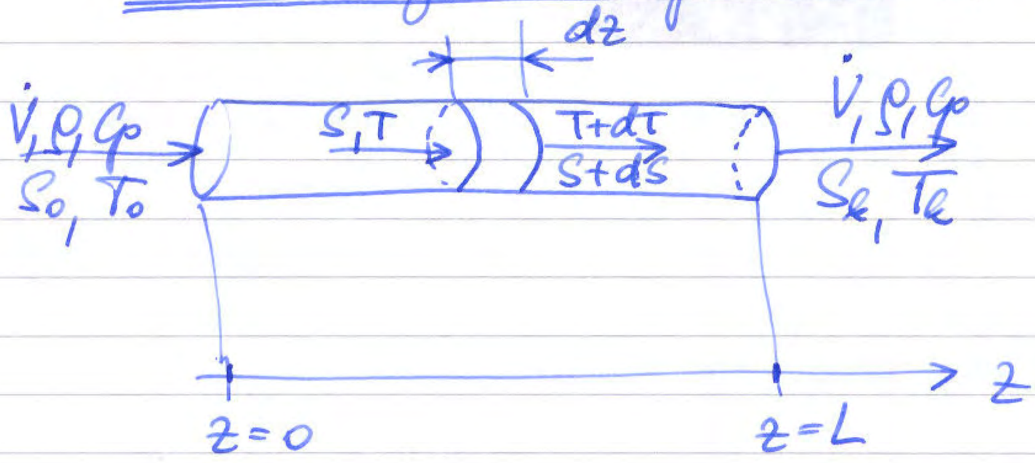

reakcni doba
konverze
0
1
2
3
4
5
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

limitní hodnotu konverse lze určit ~~z rovnice~~

$$\cancel{\frac{V_{mo}}{t_{ed}} = K_m \ln \frac{1}{1-\xi_{sk}} \to \xi_0 \xi_{sk}}$$

$\{\xi_{se}$ ustálen pro t_e, když $t_e \to \infty\}$

Adiabatický trubkový reaktor



$S \rightarrow P$

ρ = konst. / voda(?)
c_p = konst.

E = konst. / zanedbáme inaktivaci

$T_{ref.} = 0°C$

ustálený stav

$$\dot V \rho c_p T + \dot\xi(-\Delta H_r) = \dot V \rho c_p (T + dT)$$

$\dot\xi$ … rychlost změny rozsahu reakce v bilančním objemu

$$\dot\xi = r\,dV = r\,A\,dz$$

$$(-1 = \nu_s)$$

$$\dot V \rho c_p T + r\,dV(-\Delta H_r) = \dot V \rho c_p (T + dT)$$

$$\dot V \rho c_p\, dT = \frac{V_{max} S}{K_m + S}(-\Delta H_r) A\, dz$$

$$\boxed{\frac{dT}{dz} = \frac{V_{max} S}{K_m + S}(-\Delta H_r)\frac{A}{\dot V \rho c_p}}$$

$$\frac{K_m + S}{V_{max}\, S}\, dS = -\frac{A}{\dot{V}}\, dz$$

$$\boxed{\frac{dS}{dz} = -\frac{A}{\dot{V}}\,\frac{V_{max}\, S}{K_m + S}}$$

$$\frac{V_m(T)}{V_m(T_0)} = \frac{A \exp\left(-\frac{\Delta E_a}{RT}\right)}{A \exp\left(-\frac{\Delta E_a}{RT_0}\right)}$$

$$\boxed{V_{max}(T) = V_m(T_0) \exp\left[-\frac{\Delta E_a}{R}\left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right)\right]}$$

nutno řešit jako soustavu O.D.R.

$\Delta E_a = 36{,}2\ kJ/mol$

$-\Delta H_r \doteq 50\ kJ/mol$

$R = 8{,}314\ J/molK$

$T_0 = 300\ K$

$K_m \doteq 10^{+3}\ mol\,m^{-3}$

$V_{max}(T_0) \doteq 0{,}002\ mol/m^3s$?

$A = 2\,cm^2 = 2\cdot 10^{-4}\,m^2$

$\dot{V} = 2\,cm^3/min$ (?)

$\rho = 1000\ kg\,m^{-3}$

$c_p = 4187\ J/kgK$

$S_0 \doteq 1500\,mol\,m^{-3}$

Př: Substrátem inhibovaná enzymová reakce probíhá v průtočném izotermním promíchávaném reaktoru. Určete koncentrace substrátu ve výstupním proudu v ustáleném stavu, jestliže:

$K_1 = 0{,}1 \text{ mol dm}^{-3}$
$K_2 = 0{,}5 \text{ mol dm}^{-3}$
$\tau = 33 \text{ s}$
$S_0 = 2 \text{ mol dm}^{-3}$
$V_{max} = 0{,}1 \text{ mol dm}^{-3}\text{s}^{-1}$

Mathematica
$S = 0{,}276393$
$= 0{,}500000 \text{ mol dm}^{-3}$
$= 0{,}723607$

Newtonova metoda:

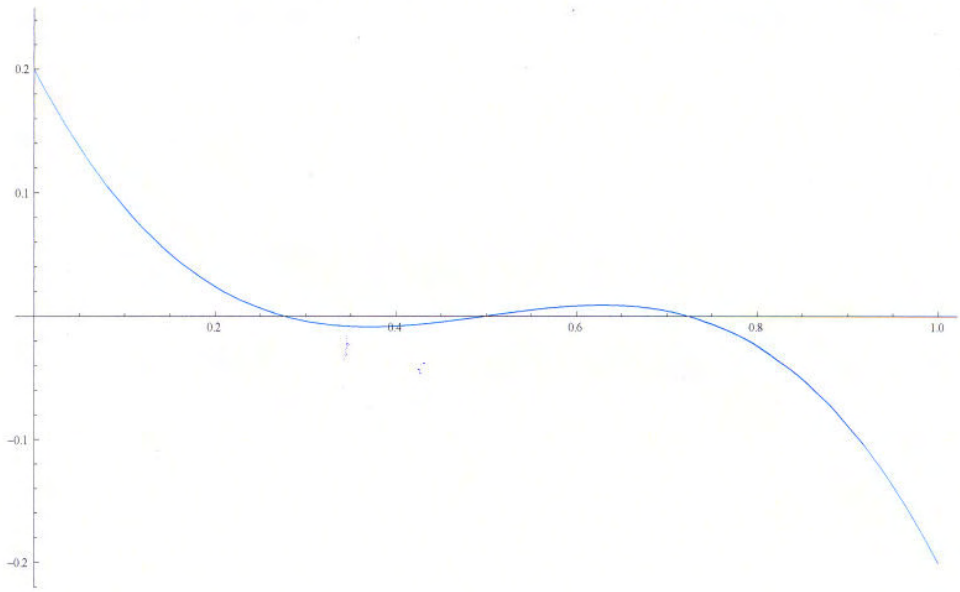
$$S_{n+1} = S_n - \frac{f(S_n)}{f'(S_n)}$$

$$f(S_n) = (S_0 - S)(S + K_1 + S^2/K_2) - \tau V_{max} S$$

$$f'(S_n) = -(S + K_1 + S^2/K_2) + (S_0 - S)(1 + 2S/K_2) - \tau V_{max}$$

```
Do[{xn=xs-((S0-xs)*(xs+K1+xs^2/K2)-τ*Vm*xs)/(-(xs+K1+xs^2/K2)+(S0-xs)*(1+2*xs/K2)-τ*Vm);
Print[xn];  xs=xn}, {i,1,15}]
0.491582
0.500024
0.5
0.5
0.5
0.5
0.5
0.5
0.5
0.5
0.5
0.5
0.5
0.5
0.5
```

```
Plot[(S0-xs)*(xs+K1+xs^2/K2)-τ*Vm*xs,{xs,0,S0/2},PlotRange→{-0.22,0.25}]
```

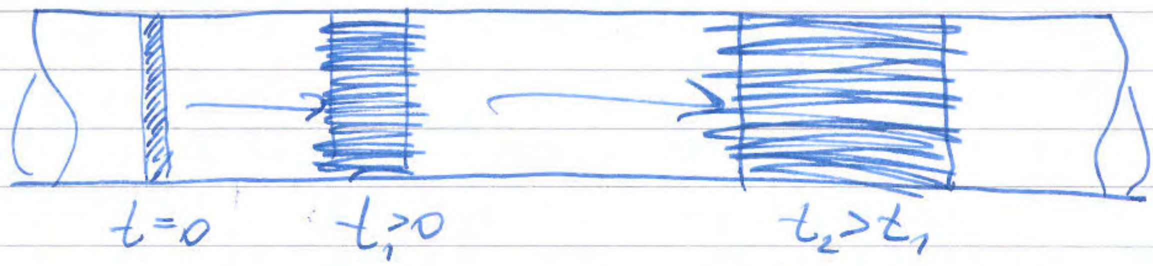


Trubkový reaktor s axiálním promícháváním

- axiální promíchávání / podélné promíchávání:
  - turbulence
  - tok mezi částicemi v loži nestejnou rychlostí
- intenzita podélného promíchávání:

  D_{ax} [m^2/s] ... analogie k difuzi

  koeficient axiální disperse

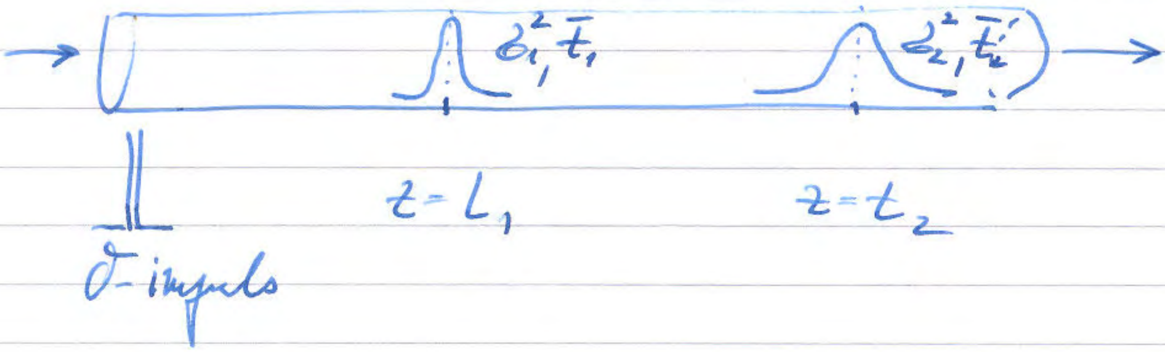


rozmývání původně úzkých zón (např. stopovací látky)

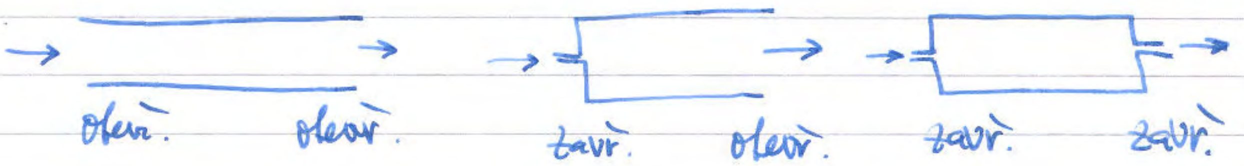
Pécletovo číslo: $$Pe = \frac{u\,l}{D_{ax}} \qquad \left[\frac{m\,m\,s}{s\,m^2} - 1\right]$$

$$\boxed{\begin{aligned} Pe \to 0 &\equiv D_{ax} \to \infty \Rightarrow \text{ideální mísič} \\ Pe \to \infty &\equiv D_{ax} \to 0 \Rightarrow \text{pístový tok} \end{aligned}}$$

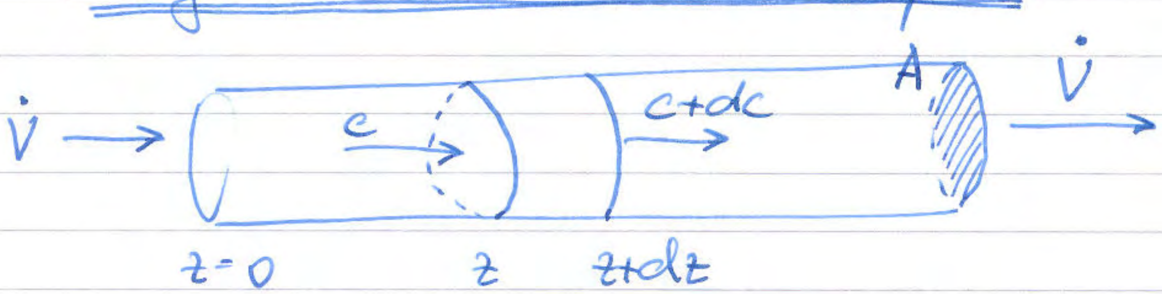
- hodnota D_{ax} (Pe) se určuje pomocí pokusů se stopovací látkou: fyzicky se měří rozptyl odezvy na δ-impuls ve dvou bodech ve směru toku:



	$\bar t$	σ^2
otevř. – otevř.:	$1 + 2/Pe$	$(2Pe+8)/Pe^2$
otevř. – zavř.:	$1 + 1/Pe$	$(2Pe+3)/Pe^2$
zavř. – otevř.:		
zavř. – zavř.:	1	$\{2Pe - 2[1 - e^{-Pe}]\}/Pe^2$



- Enzymová reakce s axiální disperzí



vstup + zdroj = výstup + akumulace

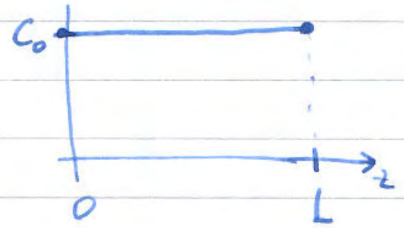
$$\dot V c - D_{ax}\frac{\partial c}{\partial z}A - \frac{V_m c}{K_m + c}A\,dz = \dot V(c+dc) - D_{ax}\frac{\partial (c+dc)}{\partial z}A + \frac{\partial c}{\partial t}A\,dz$$

$$-\frac{V_m c}{K_m + c}A\,dz = \dot V dc - D_{ax}\frac{\partial^2 c}{\partial z}A + \frac{\partial c}{\partial t}A\,dz$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_{ax}\frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - \dot{V}\frac{\partial c}{\partial z}\frac{1}{A} - \frac{V_m c}{K_m + c}$$

$$\boxed{\frac{\partial c}{\partial t} = D_{ax}\frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - u_z\frac{\partial c}{\partial z} - \frac{V_m c}{K_m + c}}$$

poč. podmínka: $c(z,0) = C_0$, $z \in \langle 0, L \rangle$

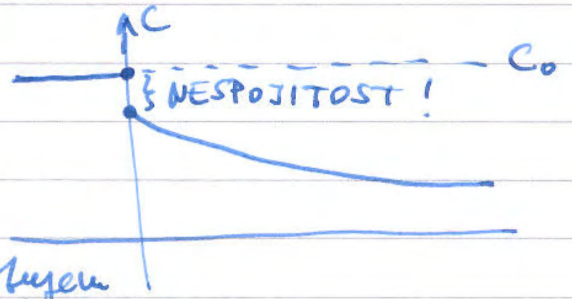


okrajové podmínky:

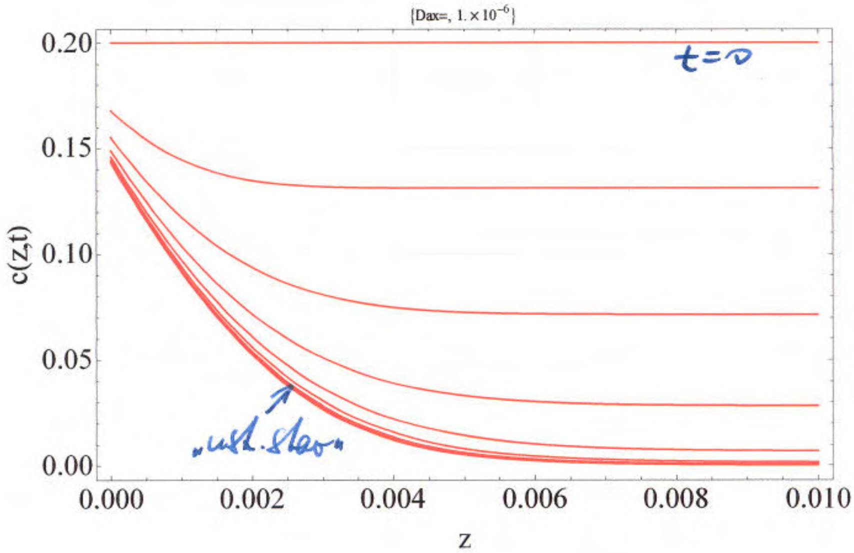
$z = 0$: $\quad u_z C_0 = u_z C(\overset{z\to 0+}{z=0}) - D_{ax}\underbrace{\frac{\partial c(z=0)}{\partial z}}_{z\to 0+}$

$z = L$: $\quad \left.\frac{\partial c}{\partial z}\right|_{z=L} = 0$

Danckwertsova o.p.

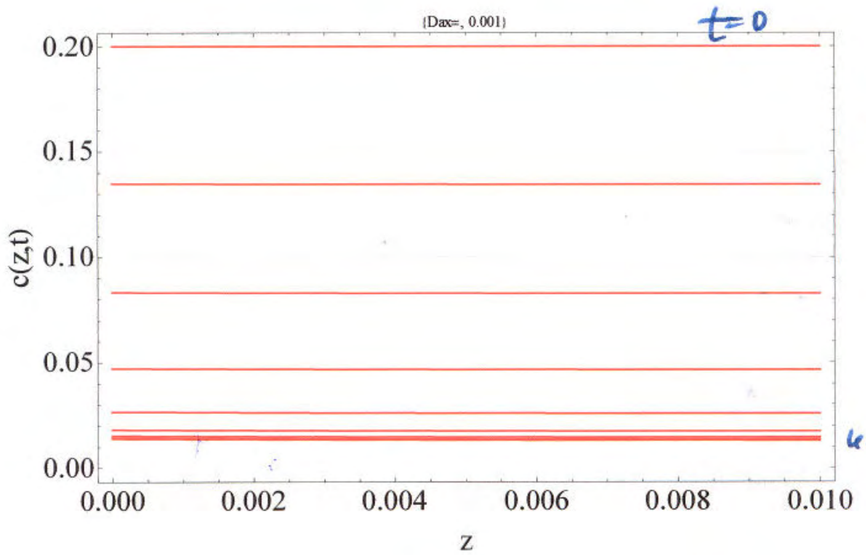


před vstupem do reaktoru $\quad z = 0$



D_{ax} ... střední!

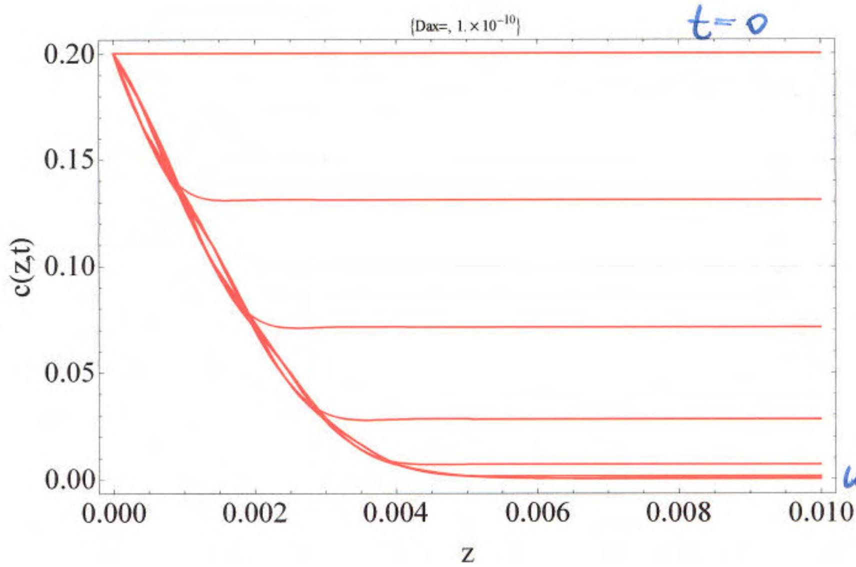
$1 \cdot 10^{-6}\ m^2 s^{-1}$



D_{ax} ... velké!

$1 \cdot 10^{-3}\ m^2 s^{-1}$

ust. stav



D_{ax} ... malé!

$1 \cdot 10^{-10}\ m^2 s^{-1}$

ust. stav

Transportní jevy v systémech s imob. enzymy

- enzymy imobilizovaní:
  a) na povrchu nosiče
  b) uvnitř nosiče

- geometrie nosiče:
  - planární
  - cylindrická
  - sférická
  - jiná (nepravidelná)

- **Vliv vnějšího transportu na enzymové reakce s imobil. enzymy (imobilizace na povrchu!)**

- tradiční model: Nernstova difúzní vrstva (biochemici)
  x
  vnější stagnantní film (inženýři)

- intenzita toku substrátu k povrchu:

$$\left(k_s = \frac{\mathcal{D}_s}{\delta}\right) \qquad N_s = k_s\,(S_0 - S)$$

jádro … S_0; povrch nosiče … S

součinitel přestupu hmoty ($m\,s^{-1}$) … kriteriální rovnice

$$\left(Sh = \frac{k_s\, l}{\mathcal{D}_s}\right)$$

- v ustáleném stavu:

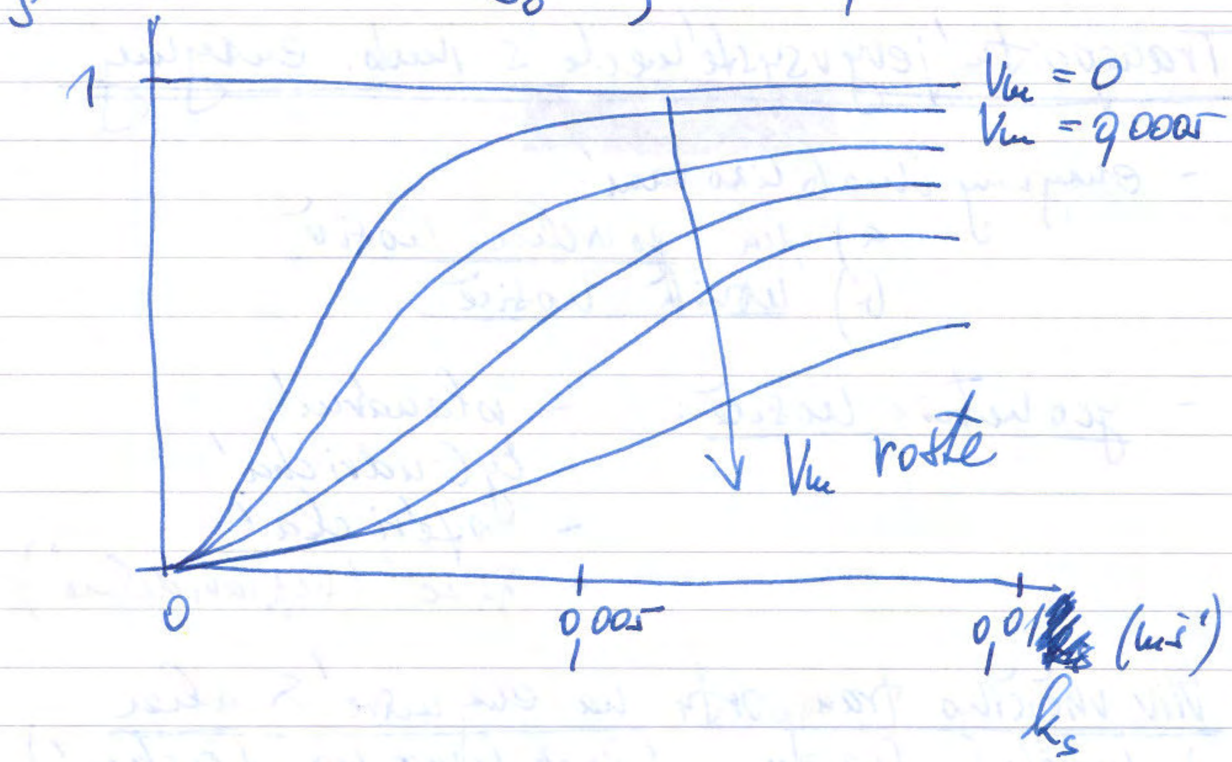
$$N_s = \bar{v}$$

$\bar{v}$ … rychlost reakce vztažená na jednotku povrchu nosiče ($mol\,m^{-2}\,s^{-1}$)

$$k_s\,(S_0 - S) = \frac{V_{max}\, S}{K_m + S}$$

%

$S_0 = 1,\ K_m = 0{,}05$



- zavedení bezrozměrových proměnných (=> snížení počtu parametrů):

$$x \equiv \frac{S}{S_0} \qquad Da = \frac{\bar{V}_{max}}{k_s S_0} \qquad \varkappa = \frac{K_m}{S_0}$$

Damköhlerovo kritérium

$$k_s (S_0 - x S_0) = \frac{\bar{V}_{max}\, x S_0}{K_m + x S_0}$$

$$k_s (1 - x) = \frac{\bar{V}_{max}\, x}{K_m + x S_0}$$

$$k_s (1 - x) = \frac{\bar{V}_{max}/S_0\, x}{\underbrace{K_m/S_0}_{\varkappa} + x}$$

$$\frac{k_s S_0}{\bar{V}_{max}} (1 - x) = \frac{x}{\varkappa + x}$$

$$\frac{1 - x}{Da} = \frac{x}{\varkappa + x}$$

kvadratická rovnice pro bezrozměrovou koncentraci substrátu na povrchu nosiče

$Da \gg 1$ => reakční rychlost je vysoká => transportní režim

$Da \ll 1$ => reakční rychlost nízká => kinetický režim

=> lze řešit analyticky.

$$x = \frac{\beta}{2}\left(\pm\sqrt{1 + \frac{4\varkappa}{\beta^2}} - 1\right)$$

$$\beta \equiv Da + \varkappa - 1$$

1-S přístup:

laminární mezní vrstva:

$$Sh \equiv \frac{kL}{D} = 0,664\, Re^{0,5}\, Sc^{1/3}$$

turbulentní mezní vrstva:

$$Sh = 0,036\, Re^{0,8}\, Sc^{1/3}$$

„vnější" faktor účinnosti

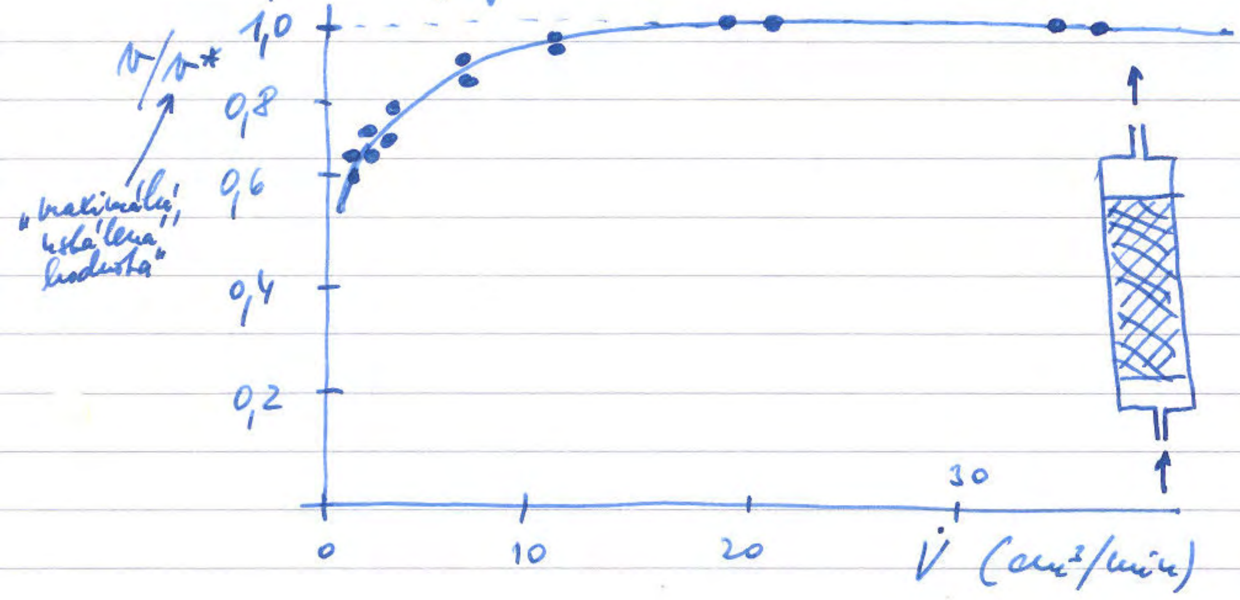
$$\eta = \frac{\dfrac{V_{max} S}{K_m + S}}{\dfrac{V_{max} S_0}{K_m + S_0}} = \frac{\dfrac{S}{K_m + S}}{\dfrac{S_0}{K_m + S_0}} =$$

$$= \frac{\dfrac{S/S_0}{K_m/S_0 + S/S_0}}{\dfrac{S_0/S_0}{K_m/S_0 + S_0/S_0}} = \frac{\dfrac{x}{\varkappa + x}}{\dfrac{1}{\varkappa + 1}} = \frac{x\,(\varkappa + 1)}{\varkappa + x}$$

pro $x \to 1, (S \to S_0) \Rightarrow \eta = 1$

$\varkappa \equiv \dfrac{K_m}{S_0}$, x... bezrozměrná proměnná konc.

experimentální test vlivu vnějšího transportu na reakční rychlost (reaktor s loží imob. enzymu; trypsin + D,L-N-benzoylarginin p-nitroanilid, 25°C, pH = 8):



• faktor účinnosti (tradiční inženýrská veličina):

$$\eta = \frac{\text{naměřená reakční rychlost}}{\text{rychlost při } S = S_0, \text{ tj. bez transportních odporů}}$$

$$\eta = \frac{x/(\varkappa + x)}{1/(\varkappa + 1)} \leq 1$$

pro Da → 0 (pomalá reakce – kinetický režim) je ~~...~~ $x \to 1$ a $\eta = 1$ a reakce „běží" maximální rychlostí

$$v = \frac{V_{max} S_0}{K_m + S_0}$$

Reakce a difuse v imobilizovaných biokatalyzátorech

enzym uvnitř matrice

efektivní difusní koeficient: difusivita substrátu v částicích imobilizovaných enzymů se liší od difusivity v roztocích:

i) určitý podíl při řezu částice je zaplněn pevnou fází (nosič, matrice) a není tedy přístupný pro substrát ⇒ porosita částice ε_p

ii) póry/kanálky v částici mají složitý tvar, křiví se, proplétají... ⇒ tortuosita τ

iii) omezení pohybu molekul v pórech, jejichž rozměry jsou blízké rozměrům molekul
parametr K_p/K_r

⇒ efektivní difusní koeficient (experimentálně)

$$D_e = D_0 \cdot \frac{\varepsilon_p}{\tau} \cdot \frac{K_p}{K_r}$$ „hindrance factor“

D_0 ↑ roztoku

$\tau \in \langle 1{,}4 - 7 \rangle$?

čím menší porosita, tím menší D_e

čím větší tortuosita, tím menší difusivita D_e (delší difusní dráha)

$$\frac{K_p}{K_r} \approx \left(1 - \frac{r_{substr.}}{r_{pór}}\right)^4$$

$\varepsilon_p, \tau, K_p/K_r$ ... vysoké nejistoty!
⇒ obtížné predikce

- další faktory: chemické či elektrostatické interakce mezi substrátem a matricí

Renkinova rovnice:

$$H(\mu) = (1-\mu)^2 (1 - 2{,}104\,\mu + 2{,}089\,\mu^3 - 0{,}948\,\mu^5)$$

$$\mu \equiv \frac{r_{solute}}{r_{pore}}$$

alternativní (téměř shodná) fce

$$H(\mu) = (1-\mu)^4$$

$$D_{eff} = \frac{\varepsilon}{a^2} D_0$$

a ← skutečná délka póru na jednotku vzdálenost ve směru difuse

$$D_{eff} = \frac{D}{\tau}$$

τ ← tortuosita

Rankinova rovnice

$$\frac{D}{D_0} = 1 + \frac{9}{8} \lambda \ln \lambda - 1{,}54\lambda$$

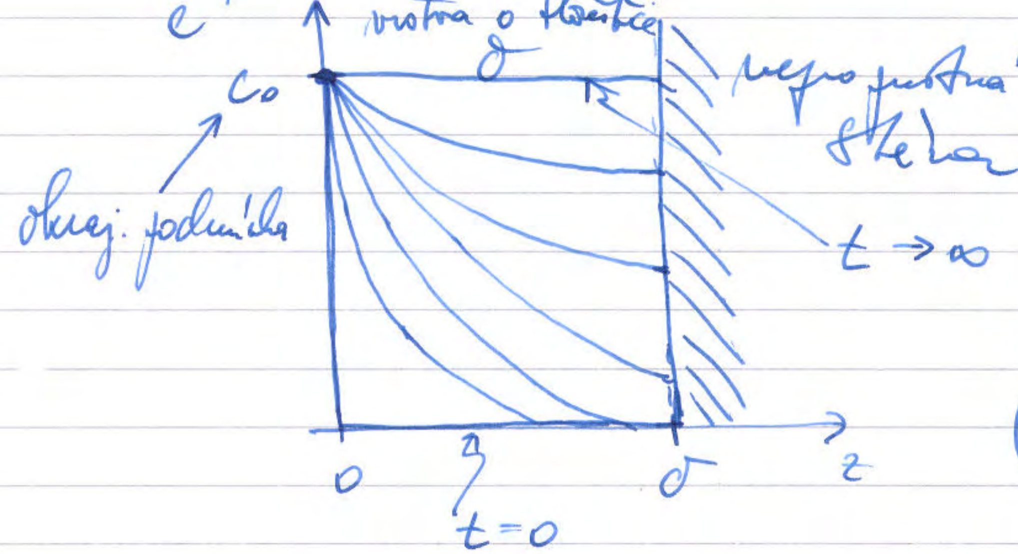
$$\lambda = \frac{2R_0}{d}$$

$2R_0$ ← solute diameter

d ← pore diameter

Difuzní čas

- doba potřebná k tomu, aby složka v pevné fázi difúzí prošla určitou vzdálenost



obecně: $\boxed{t_d \sim \frac{L^2}{D_{ef}}}$

? jak definovat okamžik, kdy složka „dorazila" na druhý okraj vrstvy

⇒ dohoda (např., když $c(\delta) = 90\% c_0$)

pak pro rovinnou vrstvu:

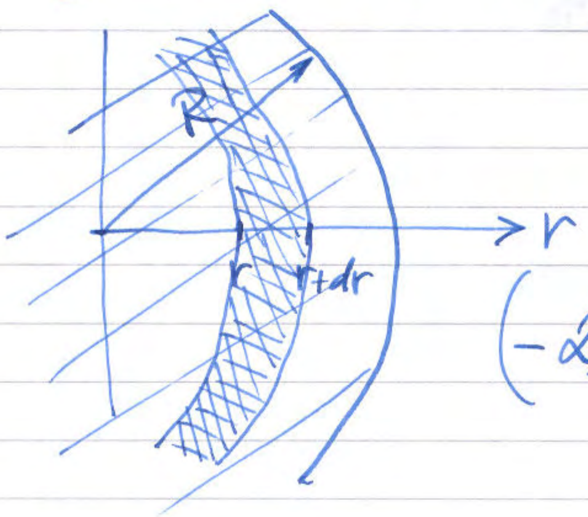
$$\boxed{t_{90} = 1{,}03 \frac{\delta^2}{D_{ef}}}$$

pro kulovou částici:

$$\boxed{t_{90} = 0{,}31 \frac{R^2}{D_{ef}}}$$

lze určit z analytického řešení nebo numerického řešení difuzní rovnice

• bilance substrátu v kulové částici



vstup + zdroj = výstup + akumul.

$$\left(-\mathcal{D}_s \frac{ds}{dr} 4\pi r^2\right)\Big|_r - v\, 4\pi r^2 dr =$$

$$= \left(-\mathcal{D}_s \frac{ds}{dr} 4\pi r^2\right)\Big|_{r+dr} = 4\pi r^2 dr \frac{ds}{d\tau}$$

vydělíme $4\pi dr$:

$$\underbrace{\frac{\mathcal{D}_s \left(r^2 \frac{\partial s}{\partial r}\Big|_{r+dr} - r^2 \frac{\partial s}{\partial r}\Big|_r \right)}{dr}}_{\lim\limits_{dr \to 0}} = r^2 v + r^2 \frac{\partial s}{\partial \tau}$$

$$\mathcal{D}_s \frac{\partial}{\partial r}\left(r^2 \frac{\partial s}{\partial r} \right) = r^2 \left(v + \frac{\partial s}{\partial \tau} \right)$$

$$\mathcal{D}_s \left(2r \frac{\partial s}{\partial r} + r^2 \frac{\partial^2 s}{\partial r^2} \right) = r^2 \left(v + \frac{\partial s}{\partial \tau} \right) \Bigg| \cdot \frac{1}{r^2}$$

$$\mathcal{D}_s \left(\frac{2}{r} \frac{\partial s}{\partial r} + \frac{\partial^2 s}{\partial r^2} \right) = v + \frac{\partial s}{\partial \tau}$$

$$\boxed{\frac{\partial s}{\partial \tau} = \mathcal{D}_s \left(\frac{\partial^2 s}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial s}{\partial r} \right) - v}$$

např.:

$$v = \frac{V_{max}\, S}{K_m + S}$$

$$V_{max} = \overset{c_E}{c_{imm.}}\ \overset{\rho_P}{\rho_P}\ \overset{a_E}{q_{E,imm.}}$$

koncentrace enzymu v částici: $\frac{\text{µmol enzymu}}{\text{g nosiče}}$

hustota nosiče

specifická aktivita enzymu $\frac{\text{µmol S}}{1\text{s} \cdot 1\,\text{µmol E}}$

pro řešení bilanční rovnice pro S potřebujeme:

PP: $S(r,0) = S_0 \quad r \in \langle 0; R\rangle$ (např.)

OP: $S(R,\tau) = S_0 \leftarrow$ R předpoklad (!)

$\left.\frac{\partial S}{\partial r}\right|_{r=0} = 0$ podmínka symetrie

celková rychlost spotřeby substrátu v částici se rovná rychlosti difuse substrátu povrchem částice

$$v_{obs.} = \frac{A_P\, D_S \left.\frac{dS}{dr}\right|_{r=R}}{V_P}$$

na jednotku objemu částice

faktor účinnosti:

$$\eta = \frac{v_{obs.}}{v(S_0)} \equiv \frac{\text{pozorovaná reakční rychlost}}{\text{reakční rychlost bez difusních odporů / žádný konc. gradient v částici}}$$

! hodnotu η lze vyčíslit pouze numericky, pokud $v(S)$ je nelineární funkcí S!

→ pro ustálený stav zavedeme bezrozměrné proměnné:

$$\bar{s} = \frac{S}{S_0} \quad a \quad \bar{r} = \frac{r}{R}$$

bilanční rovnice přejde na tvar:

pro M.-M. kinetiku

$$\mathcal{D}_s \frac{S_0}{R^2}\frac{\partial^2 \bar{s}}{\partial \bar{r}^2} + \frac{2}{\bar{r}R}\frac{S_0}{R}\frac{\partial \bar{s}}{\partial \bar{r}} = \frac{V_{max}\,\bar{s}S_0}{K_m + \bar{s}S_0}$$

$$\frac{\mathcal{D}_s S_0}{R^2}\left(\frac{d^2\bar{s}}{d\bar{r}^2} + \frac{2}{\bar{r}}\frac{d\bar{s}}{d\bar{r}}\right) = \frac{\frac{V_{max}S_0}{K_m}\,\bar{s}}{1+\bar{s}\frac{S_0}{K_m}}$$

$$\beta \equiv \frac{S_0}{K_m}$$

$$\frac{d^2\bar{s}}{d\bar{r}^2} + \frac{2}{\bar{r}}\frac{d\bar{s}}{d\bar{r}} = \frac{R^2 V_{max}\cancel{S_0}}{K_m\mathcal{D}_s\cancel{S_0}}\;\frac{\bar{s}}{1+\beta\bar{s}}$$

zavedeme Thieleův modul

$$\phi = \frac{R}{3}\sqrt{\frac{V_{max}}{K_m\mathcal{D}_s}}$$

(! existují i jiné definice)

tzv. zobecněný Thieleův modul

$$\boxed{\frac{d^2\bar{s}}{d\bar{r}^2} + \frac{2}{\bar{r}}\frac{d\bar{s}}{d\bar{r}} = 9\phi^2 \frac{\bar{s}}{1+\beta\bar{s}}}$$

okrajové podmínky:

$$\bar{s}\Big|_{\bar{r}=1} = 1 \; ; \quad \frac{d\bar{s}}{d\bar{r}}\Big|_{\bar{r}=0} = 0$$

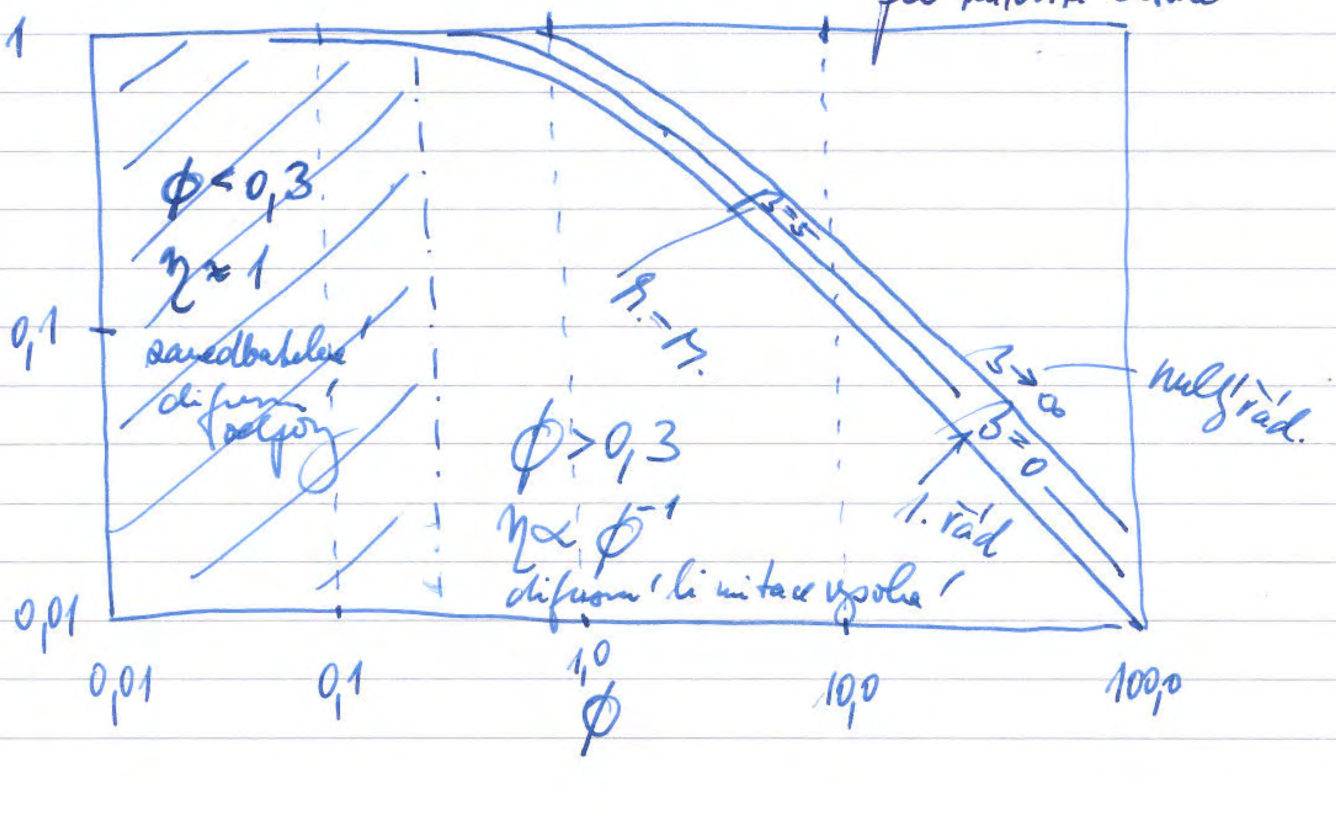
faktor účinnosti v bezrozm. proměnných:

$$\eta = \frac{\left.\frac{d\bar{s}}{d\bar{r}}\right|_{\bar{r}=1}}{\underbrace{3\phi^2 \frac{1}{1+\beta}}_{\text{maximální reakční rychlost}}}$$

povrchová difuze ≡ rychlost reakce

$$\eta = \eta(\phi, \beta)$$

pro kulovité částice



Mezní případy reakce a difuze v porézní kulové částici s imobilizovaným enzymem

výchozí rovnice pro kinetiku M–M:

$$\text{(A)} \quad \frac{d^2\bar{s}}{d\bar{r}^2} + \frac{2}{\bar{r}}\frac{d\bar{s}}{d\bar{r}} = 9\phi^2 \frac{\bar{s}}{1+\beta\bar{s}} \; ; \; \beta = \frac{s_0}{K_m} , \; \phi = \frac{R}{3}\sqrt{\frac{V_{max}}{K_m D_s}}$$

a) reakce s kinetikou 1. řádu:

$$r = kS \rightarrow \text{srovnání s M–M:} \; k \doteq \frac{V_{max}}{K_m}$$

$$S \ll K_m \rightarrow \beta \ll 1$$

Rovnice (A) pak přejde na

$$\frac{d^2\bar{s}}{d\bar{r}^2} + \frac{2}{\bar{r}}\frac{d\bar{s}}{d\bar{r}} = 9\phi^2 \bar{s} \; ; \quad \phi = \frac{R}{3}\sqrt{\frac{k}{D_s}}$$

analytické řešení je

$$\bar{s} = \frac{\sinh(3\phi\bar{r})}{\bar{r}\sinh(3\phi)}$$

a pro faktor účinnosti platí

$$\boxed{\eta = \frac{3\phi\coth(3\phi) - 1}{3\phi^2}}$$

b) reakce s kinetikou 0. řádu.

$v = k_0 \longrightarrow$ srovnání s M–M: $k_0 \doteq V_{max}$

$S >> K_m \rightarrow \beta$ je velké

Rovnice (A) pak přejde na

$$\frac{d^2\bar{s}}{d\bar{r}^2} + \frac{2}{\bar{r}}\frac{d\bar{s}}{d\bar{r}} = 9\phi^2/\beta = 9\phi'^2 ; \quad \phi' = \frac{R}{3}\sqrt{\frac{k_0}{S_0 D_s}}$$

analytické řešení je

$$\bar{s} = \frac{3}{2}\phi'^2\left[\bar{r}^2 - 1 - 2\bar{r}_c^2\left(\bar{r}_c - \frac{\bar{r}_c}{\bar{r}}\right)\right] + 1$$

Na rozdíl od kinetiky M–M nebo kinetiky 1. řádu může probíhat pouze v zóně mezi reakce může probíhat pouze v zóně mezi $r = R_c$ a $r = R$ (v bezrozměrném vyjádření mezi $\bar{r} = \bar{r}_c = \frac{R_c}{R}$ a $\bar{r} = 1$)

Tedy může existovat kritický poloměr R_c takový, že ve vnitřní zóně částice $(0 \leqq r \leqq R_c)$ reakce neprobíhá, protože všechen substrát byl spotřebován ve vnější zóně částice.

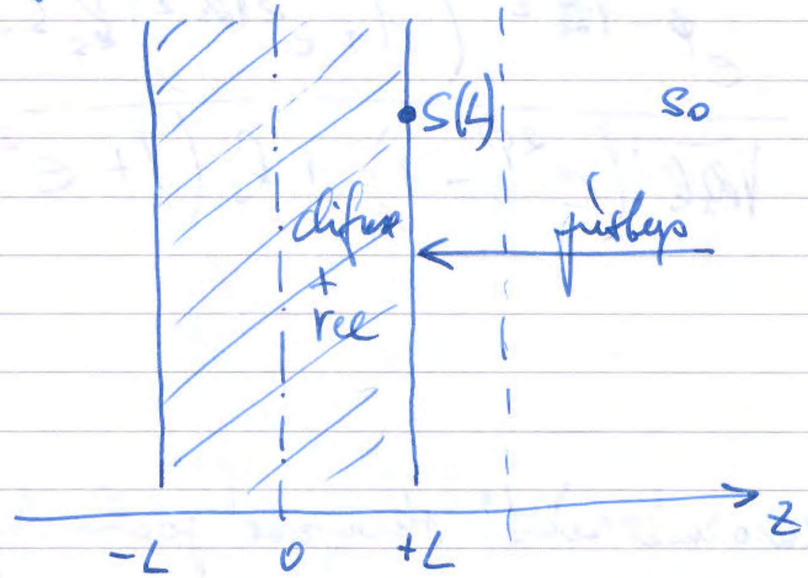
Pokud $R_c = 0$ je částice plně využita a $\boxed{\eta = 1}$

Pokud $R_c > 0$, faktor účinnosti je

$$\eta = \frac{\text{rychlost reakce v objemu, kde r. probíhá}}{\text{rychlost reakce v celém objemu}} = \frac{k_0 \frac{4}{3}\pi(R^3 - R_c^3)}{k_0 \frac{4}{3}\pi R^3} = \boxed{1 - \left(\frac{R_c}{R}\right)^3 = 1 - \bar{r}_c^3}$$

Současný přestup hmoty, difuse a reakce

planární geometrie



- pro jednoduchost: <u>kinetika 1. řádu</u>

ustálený stav: $D_s \frac{d^2 s}{dz^2} - k_* s = 0$

rychl. konst. 1. řádu

$$\frac{ds}{dz}\bigg|_{z=0} = 0 \quad \text{symetrie ve středu}$$

$$\underbrace{-D_s \frac{ds}{dz}\bigg|_{x=L} = k_s \left[s(L) - s_0\right]}$$

lze najít analytické řešení pro faktor účinnosti:

$$\eta_s = \frac{\tanh \phi}{\phi\left[1 + (\phi \tanh \phi)/Bi\right]}$$

$$s(z) = \frac{e^{\sqrt{\frac{k}{D_s}}L - \sqrt{\frac{k}{D_s}}z}\left(1 + e^{2\sqrt{\frac{k}{D_s}}z}\right)k_s s_0}{-\sqrt{D_s}\sqrt{k} + \sqrt{D_s}\,e^{2\sqrt{\frac{k}{D_s}}L}\sqrt{k} + k_s + e^{2\sqrt{\frac{k}{D_s}}L}k_s}$$

$$s(z) = \frac{e^{\phi - \sqrt{\frac{k}{D_s}}z}\left(1 + e^{2\sqrt{\frac{k}{D_s}}z}\right)k_s s_0}{\sqrt{D_s k}\left(e^{2\phi} - 1\right) + k_s\left(1 + e^{2\phi}\right)}$$

„zbezrozměrnění" okrajové podmínky:

$$\bar{s} = \frac{s}{s_0} \qquad \bar{z} = \frac{z}{L}$$

$$-D_s \frac{s_0\, d\bar{s}}{L\, d\bar{z}} = k_s\left(\bar{s} s_0 - s_0\right)$$

$$-\frac{D_s}{k_s L}\frac{d\bar{s}}{d\bar{z}} = \bar{s} - 1$$

$$-\frac{d\bar{s}}{d\bar{z}} = \underbrace{\frac{k_s L}{D_s}}_{Bi}(\bar{s} - 1)$$

$$\phi = L\sqrt{\frac{k}{\mathcal{D}_s}}$$ Thieliův modul pro planární geometrii a reakci 1. řádu

Biotovo číslo

$$Bi = \frac{k_s L}{\mathcal{D}_s} \equiv \frac{\text{charakteristická rychlost transportu ve vnějším filmu}}{\text{charakteristická rychlost vnitřní difuse}}$$

pro $k_s \to \infty$ (žádný vnější odpor) je/známe

$$\eta_s = \eta = \frac{\tanh\phi}{\phi}$$

$$\phi \tanh\phi = \phi^2 \frac{\tanh\phi}{\phi} = \phi^2 \eta$$

a

$$\eta_s = \frac{\eta}{1 + \phi^2 \eta / Bi}$$

neboli:

$$\frac{1}{\eta_s} = \frac{1}{\eta} + \frac{\cancel{\phi}^2 \cancel{\eta}}{\cancel{\eta} Bi}$$

$$\frac{1}{\eta_s} = \frac{1}{\eta} + \frac{\phi^2}{Bi}$$

„celkový odpor" „difusní odpor" „vnější odpor"

RŮST MIKROBIÁLNÍCH BUNĚK

? VIRY ?

růst ≡ základní životní projev

růst ≡ zvětšování hmotnosti buňky

→ změna velikosti

→ změna počtu bb

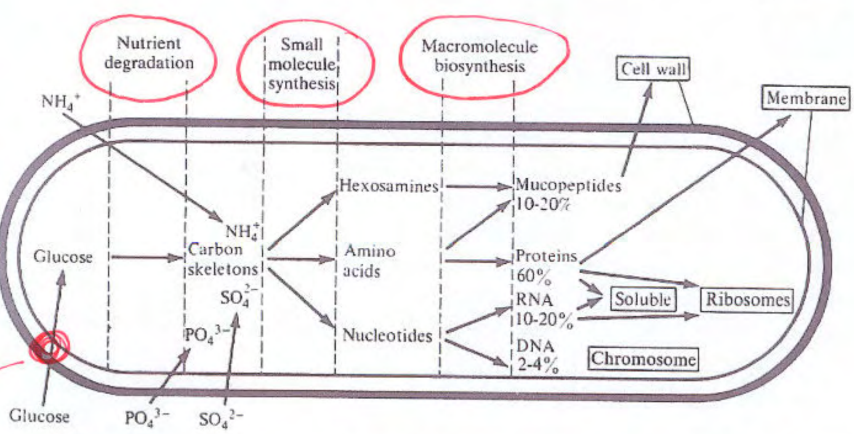
• růst bb možno formálně popsat jako autokatalytickou reakci

$$S + X \longrightarrow n X + P$$

$$n > 1$$

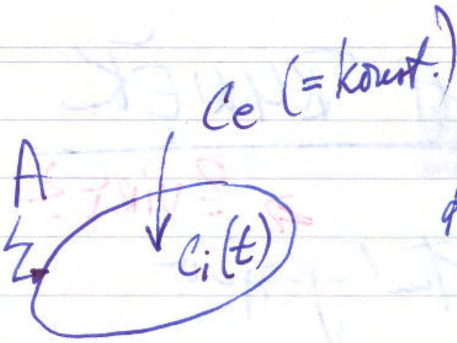
bb spotřebovávají substrát na tvorbu biomasy, energie a extracelulární produkty

ENERGIE!



1. krok ≡ transport b. membránou

Figure 5.2 Schematic diagram showing synthesis of biological macromolecules from simple nutrients in a bacterium. *(Reprinted by permission from J. Mandelstam and K. McQuillen (eds.), "Biochemistry of Bacterial Growth," 2d ed., p. 4, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973.)*



$$K\left(c_e - c_i(t)\right)A = V\frac{dc_i(t)}{dt}$$

$$\int_{c_{i0}}^{c_i} \frac{dc_i(t)}{c_e - c_i(t)} = \frac{KA}{V}\int_0^t dt$$

$$\Big[-\ln(c_e - c_i)\Big]_{c_{i0}}^{c_i} = \frac{KA}{V}t$$

$$\ln\frac{c_e - c_i(0)}{c_e - c(t)} = \frac{KA}{V}t$$

Transport látek buněčnou membránou:

- řízený transport látek mezi buňkou a okolím
  ≡ základní fundamentální podmínka pro buněčnou funkci
- selektivní permeabilita!
- permeabilitu lze určit z bilance (předpokládáme ovoidní buňky do prostředí se stálou koncentrací složek):

$$K = \frac{V}{At} \ln \frac{c_e - c_{i0}}{c_e - c_i(t)}$$

počáteční

V... objem b.
A... vnější povrch b.

c_e ... vnější koncentrace

$$[K] = \frac{m^3}{m^2 s} = m\,s^{-1}$$

jedná se o značně zjednodušený model reality

↑ jde vlastně o koeficient prostupu (rychlost)

Existují tři transportní mechanismy b. membránou

a) pasivní difuse: probíhá ve směru klesající koncentrace, rychlost je úměrná hybné síle, tj. koncentračnímu rozdílu

$$\Delta G^0 = RT \ln \frac{c_1}{c_2}$$

c_1 ← v buňce
c_2 ← mimo buňku

$$c_1 < c_2 \Rightarrow \Delta G^0 < 0$$

$\Rightarrow$ samovolný děj

pokud existuje potenciálový rozdíl $\Delta\psi$ mezi oběma
stranami membrány

$$\Delta G^0 = RT \ln \frac{c_1}{c_2} + z_i F \Delta\psi$$

$\Rightarrow$ vliv/účinek znaménka $\Delta\psi$! na směr transportu

- struktura a vlastnosti buněčných membrán jsou příčinou toho, že ne všechny látky mohou membránami procházet pasivní difuzí!!

b) <u>usnadněná difuse</u>: transport složky membránou je uskutečňován pomocí přenašečů, rychlost usnadněné difuse není přímo úměrná konc. rozdílu, ale dochází k saturaci ≡ vyčerpání molekul přenašeče!

[cf.: kapalné membrány]

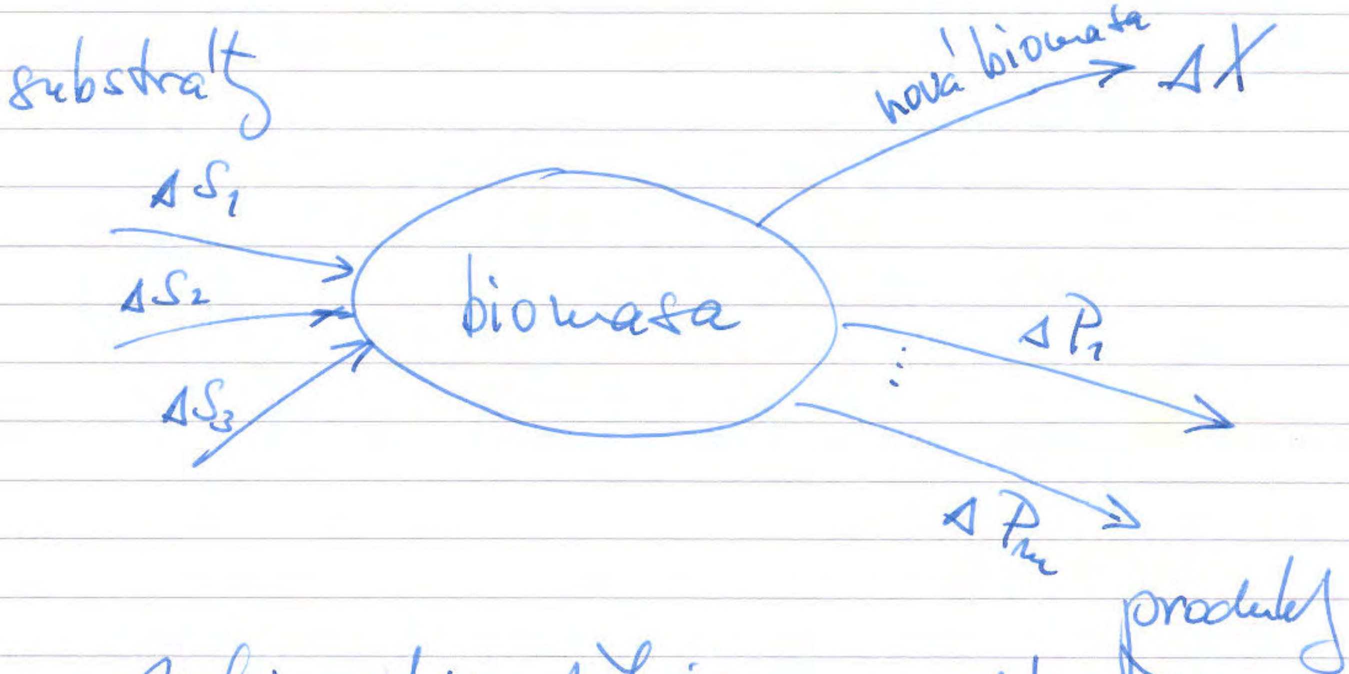
- usnadněná difuse je specifická (podmíněno interakcí přenašeče a transp. složky)

- přenašeče ≡ obvykle proteiny ≡ <u>permeasy</u>

c) <u>aktivní transport</u>: vyznačuje se dvěma výraznými rysy:
  - transport probíhá proti směru koncentračního nebo elektrochemického gradientu,
  - transport spotřebovává energii (metabolickou)

aktivní transport je uskutečňován transmembránovými proteiny (pumpami)

Celková stechiometrie růstu buněk



- stechiometrii potřebujeme pro výpočet složení kultivačních médií, resp. pro měření dosažitelných množství biomasy nebo produktů

Výtěžnostní koeficient (výtěžky)

např. $Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$

ΔX ← nárůst biomasy

ΔS ← spotřebovaný zdroj

? závislost Y na podmínkách

$$\Delta S = \Delta S_{\text{asimilace}} + \Delta S_{\substack{\text{energie}\\ \text{na růst}}} + \Delta S_{\substack{\text{udržovací}\\ \text{energie}}} \;\Big|\cdot \frac{1}{\Delta X}$$

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{\Delta S_{\text{asimil.}}}{\Delta X} + \frac{\Delta S_{\substack{\text{růst.}\\ \text{energie}}}}{\Delta X} + \frac{\Delta S_{\text{udržov.}}}{\Delta X}$$

mění se jen málo

větší proměnlivost

Bilancování prvků

- nutno znát elementární složení všech složek účastnících se růstu!

$C_\theta H_\alpha O_\beta N_\delta$

$\theta = 1$ (volí se, tj. vše se vztahuje na 1 atom uhlíku!)

Př.:

zdroj dusíku

$$a\,CH_xO_y + b\,O_2 + c\,H_lO_mN_n \longrightarrow CH_\alpha O_\beta N_\delta + d\,H_2O + e\,CO_2$$

zdroj uhlíku

biomasa

$C:\quad a = 1 + e$

$H:\quad ax + cl = \alpha + 2d$

$O:\quad ay + 2b + cm = \beta + d + 2e$

$N:\quad cn = \delta$

další vztah:

$$\text{resp. kvocient} = \frac{\text{mol produk. } CO_2}{\text{mol spotř. } O_2}$$

$$RQ = \frac{e}{b}$$ (měří se nezávislými pokusy)

Př.: Růst ~~mi~~ mikroorganismu (neznámého) na hexadekanu jakožto substrátu lze popsat stechiometrickou rovnicí

$$C_{16}H_{34} + 12{,}4\,O_2 + 2{,}09\,NH_3 \rightarrow$$

$$\rightarrow 2{,}42\,C_{4{,}4}H_{7{,}3}N_{0{,}86}O_{1{,}2} + \varepsilon\,H_2O + 5{,}33\,CO_2$$

Vypočítejte:

11,30 .. H
11,24 .. O

a) hodnotu koeficientu ε,

$RQ = 0{,}43$ b) hodnotu respiračního kvocientu,

c) hodnoty výtěžnostních koeficientů $\leftarrow Y_{X/S}$, $Y_{X/O}$. $Y'_{X/S} = 2{,}42$

Př.: Bakterie Clostridium acetobutylicum při anaerobním růstu zkvašují glukózu na aceton, butanol a menší množství butyrátu, acetátu... Měřením bylo zjištěno, že ze 100 molů glukózy a 11,2 molů NH_3 (zdroj dusíku) vzniklo:

%

$C_6H_{12}O_6$

	produkt	moly	
	buňky	13	
	butanol	56	C_4H_9OH
	aceton	22	$CH_3-CO-CH_3$
$C_4H_8O_2$	kys. máselná	0,4	$CH_3CH_2CH_2COOH$
	kys. octová	12	CH_3COOH
	CO_2	221	
	H_2	135	
	ethanol	0,7	C_2H_5-OH

Pomocí bilancování uhlíku, dusíku, vodíku a kyslíku určete elementární složení buněčné hmoty.

$$C_\alpha H_\beta N_\gamma O_\delta$$

$$100\, C_6H_{12}O_6 + 11{,}2\, NH_3 \longrightarrow$$

$$\rightarrow 13 \cdot C_\alpha H_\beta N_\gamma O_\delta + 56 \cdot C_4H_9OH +$$

$$+ 22 \cdot C_3H_6O + 0{,}4\, C_4H_8O_2 + 12\, C_2H_4O_2$$

$$+ 221\, CO_2 + 135\, H_2 + 0{,}7\, C_2H_6O$$

bilanční rovnice prvků:

$$C:\quad 100\cdot 6 = 13\alpha + 56\cdot 4 + 22\cdot 3 + 0{,}4\cdot 4 + 12\cdot 2 + 221\cdot 1 + 0{,}7\cdot 2$$

$$H:\quad 100\cdot 12 + 11{,}2\cdot 3 = 13\beta + 56\cdot 10 + 22\cdot 6 + 0{,}4\cdot 8 + 12\cdot 4 + 135\cdot 2 + 0{,}7\cdot 6$$

$$N:\quad 11{,}2\cdot 1 = 13\gamma$$

$$O:\quad 100\cdot 6 = 13\delta + 56\cdot 1 + 22\cdot 1 + 0{,}4\cdot 2 + 221\cdot 2 + 0{,}7\cdot 1 + 12\cdot 2$$ oprava!

$\alpha = 4{,}76923$ $\quad\beta = 14{,}9154$

$\gamma = 0{,}861538$ $\quad\delta = \cancel{6{,}03846}$ $4{,}19231$

$$\boxed{C\,H_{2{,}945}\,N_{0{,}181}\,O_{\cancel{1{,}266}\;0{,}879}}$$

• Bilancování elektronů – stupeň redukce

stupeň redukce sloučeniny (bioma_g) (γ): počet molů elektronů dostupných (na 1 mol uhlíku) pro přenos na kyslík při spálení sloučeniny na CO_2, H_2O a N_2

pro uhlík: 4 elektrony
pro vodík: 1 elektron
pro kyslík: −2 elektrony
pro dusík: −3 elektrony

$-NH_2$ (−3)

⇒ CO_2, H_2O, NH_3 mají stupeň redukce rovný nule

pro stechiom. rovnici:

$$\alpha\, CH_l O_m + \beta\, NH_3 + \gamma\, O_2 \rightarrow \underset{\text{biomasa}}{CH_a O_b N_c} + \underset{\text{extracel. prod.}}{\delta\, CH_p O_q N_r} + \varepsilon\, H_2O + \varkappa\, CO_2$$

zdroj uhlíku

pro biomasu:

$$\gamma_b = 4 + a - 2b - 3c$$

pro substrát:

$$\gamma_s = 4 + l - 2m$$

pro produkt:

$$\gamma_P = 4 + p - 2q - 3r$$

bilance elektronů:

$$\underbrace{\alpha\, \gamma_s - 4\gamma = \gamma_b + \delta\, \gamma_P}_{\text{rovnice pro stechiom. koff.}}$$

%

hodnoty γ_i se tabelují, např.:

organismus	zdroj uhlíku	γ_b
Candida tropicalis	n-alkan	4,385
bakterie	n-pentan	4,607
S. cerevisiae	glukosa	4,291
— II —	kys. octová	4,416
— II —	ethanol	4,469

„docela konstantní"

Produkce tepla při růstu buněk a metabolických procesech

- část chemické energie obsažené v substrátu/substrátech se při metabolických procesech přemění v teplo ⟹ dimenzování chladicích zařízení v kultivačních systémech

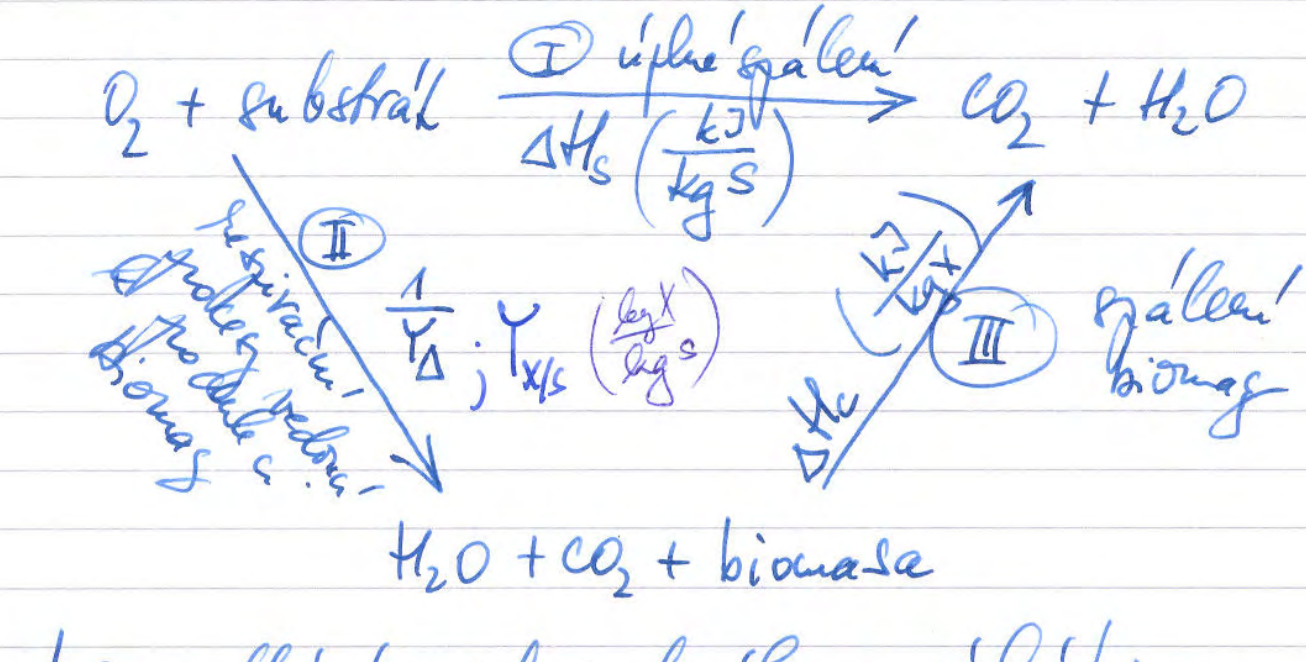
- v praxi se používá analogie k růstovému výtěžku:

$$(Y_H) \longleftrightarrow Y_\Delta \left(\frac{\text{kg biomasy}}{\text{kJ}}\right)$$

uvolněné teplo

množství biomasy připadající na jednotkové množství uvolněného tepla

- bilanční schéma pro určení Y_H:



! zanedbáváme zdroj dusíku: nízké koncentrace, neoxiduje se

spalná tepla bereme jako kladná

platí: $\Delta H_I = \Delta H_{II} + \Delta H_{III}$

$$\Delta H_S = Y_{X/S} \frac{1}{Y_\Delta} + Y_{X/S} \Delta H_C$$

$\left(\frac{kJ}{kg\,X}\right)$: $$\boxed{\frac{1}{Y_\Delta} = \frac{\Delta H_S}{Y_{X/S}} - \Delta H_C}$$

$$\boxed{Y_\Delta = \frac{Y_{X/S}}{\Delta H_S - Y_{X/S} \Delta H_C}}$$

např: kvasinky rostoucí na n-parafinech

$$\left.\begin{aligned} \Delta H_S &= 11{,}4 \text{ kcal/g} \\ \Delta H_C &= 4{,}7 \text{ kcal/g} \end{aligned}\right\} \text{ měření}$$

$Y_{X/S}$ (exper.)	$1/Y_\Delta$ (vyp.)	$1/Y_\Delta$ (exper.)
1,25	4400	4640
1,03	6400	6060
1,09	5800	5830

$\underbrace{\qquad\qquad\qquad}_{\text{rozumná shoda}}$ (cal/g)

$$1/Y_\Delta = \frac{1{,}25}{11{,}4 - 1{,}25 \cdot 4{,}7} = 4{,}42 \text{ kcal/g}$$

Udržovací energie, endogenní respirace

- v buňkách se spotřebovává energie obsažená v ATP (biosynt. procesy, opravy RNA, udržování chem. potenciálů...)

- ATP je syntetizována „ze substrátu" ≡ substrát je spotřebováván a přeměňován na CO_2 a meziprodukty

(endogenní udržovací metabolismus)

$$CH_eO_m + \lambda_1 O_2 \rightarrow \lambda_2 CO_2 + \lambda_3 CH_xO_y + \lambda_4 H_2O$$

• rychlost spotřeby substrátu pro produkci udržovací energie

udržovací koeficient $[h^{-1}]$

$$m \equiv \frac{\text{kg substrátu pro udržovací en.}}{\text{kg bb.} \times \text{hod}}$$

• celková rychlost spotřeby substrátu

$$\left(\frac{\text{kg } S}{m^3 \text{ hod}}\right) \longrightarrow r_S = \underbrace{\frac{r_X}{Y_{X/S}}}_{\text{růst}} + \underbrace{m X}_{\text{udrž. energie}} + \underbrace{\sum_i \frac{r_{Pi}}{Y_{Pi/S}}}_{\text{produkty}}$$

růst (tvorba nové biomasy)

udrž. energie (není závislá na rychlosti růstu!)

produkty extracelulární

$S \equiv$ {zdroj C / zdroj N / kyslík / elektrony}

hodnoty m jsou velmi variabilní

udržovací koeficient – příklady:

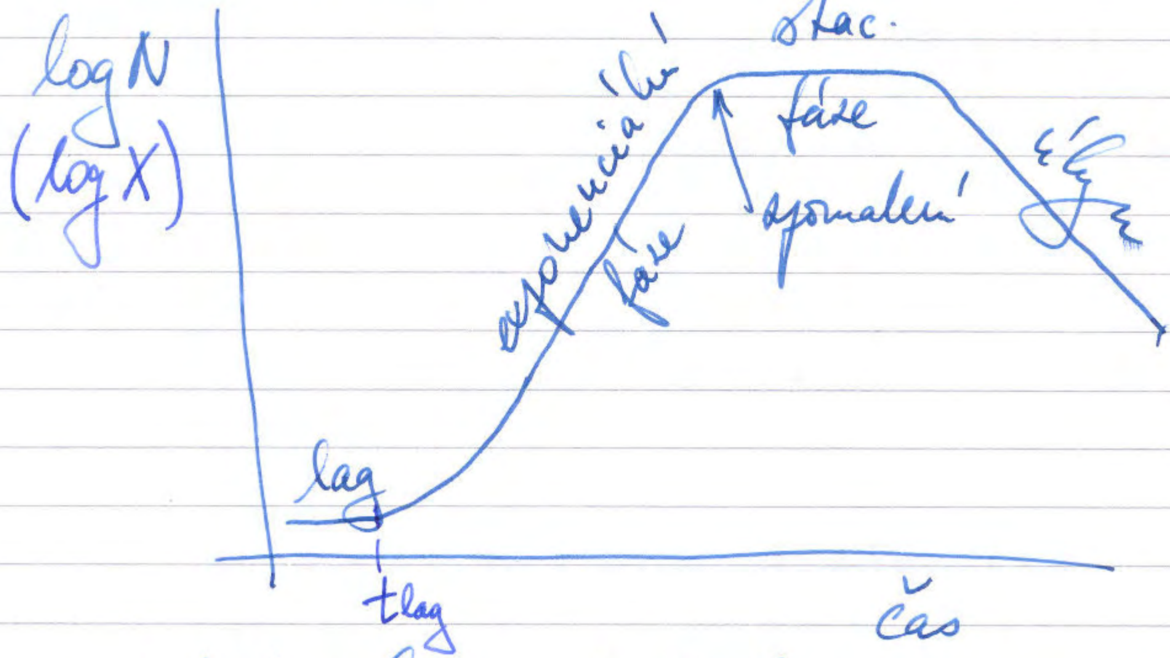
		m (h^{-1})	
Aerobacter aerogenes	glukosa	0,054	
	glycerin	0,076	max!
Saccharomyces cerev.	glukosa	0,018	min!
Escherichia coli	glukosa	0,054	
Penicillium chrysogenum	citrát	0,058	

typicky $\sim 10^{-2}$

Růst ve vsádkových systémech

$$\frac{dN}{dt} \text{ vs } \frac{dX}{dt}$$

růstová křivka



počet buněk není vhodný pro praktické inženýrské účely ⇒

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

X … kg/m³

μ … specifická růstová rychlost (h^{-1})

$$\mu = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt} \quad (h^{-1})$$

$$\nu = \frac{1}{N}\frac{dN}{dt}$$

když $\nu = \mu$ ⇒ vyvážený růst

t_{lag} ... konec fáze prodlevy

$$X = X_0 e^{\mu(t - t_{lag})}$$

v exponenciální fázi

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$ doba zdvojení biomasy

- pro fázi úhynu buněk:

$$\frac{dX}{dt} = -k_d X$$

? závislost μ na podmínkách ?

a) μ = konst.: Malthusův model

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad [\mu = \text{konst.}]$$

predikuje neomezený „malthusiánský" růst

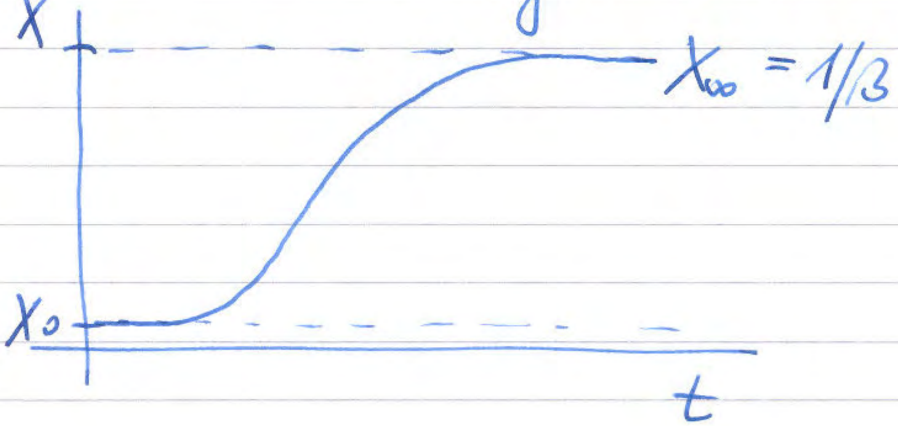
b) $\mu = k(1 - \beta X)$: Verhulst, 1844; Pearl, Reed, 1920

$$\frac{dX}{dt} = k(1 - \beta X)X$$

$$X = \frac{X_0 e^{kt}}{1 - \beta X_0 (1 - e^{kt})}$$

$t = t_0 : X = X_0$

logistická křivka



<u>Monodova rovnice</u> : závislost specifické růstové rychlosti na koncentraci limitujícího substrátu! (empirický vztah)

Jacques Monod, 1950

$$\mu(S) = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

<u>ve vsádkovém systému</u>:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} X$$

rychlost akumulace = rychlost růstu

bez dalších předpokladů nebo bez další bilanční rovnice pro S není rovnice řešitelná

1.) zavedení růstového výtěžku $Y_{X/S}$ = konst.

$$X - X_0 = Y_{XS}(S_0 - S)$$

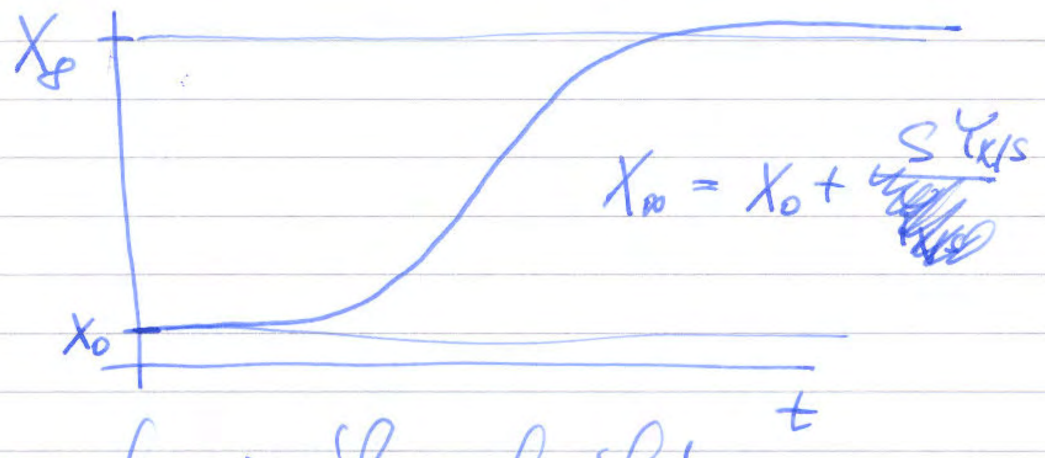
$$Y_{XS} S = Y_{XX} S_0 - (X - X_0)$$

$$S = S_0 - \frac{X - X_0}{Y_{X/S}}$$

$$\boxed{\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max}\left(S_0 - \frac{X - X_0}{Y_{XS}}\right)}{K_S + S_0 - \frac{X - X_0}{Y_{X/S}}} X}$$

? analytické řešení neexistuje

! numerické řešení poskytne logistickou křivku



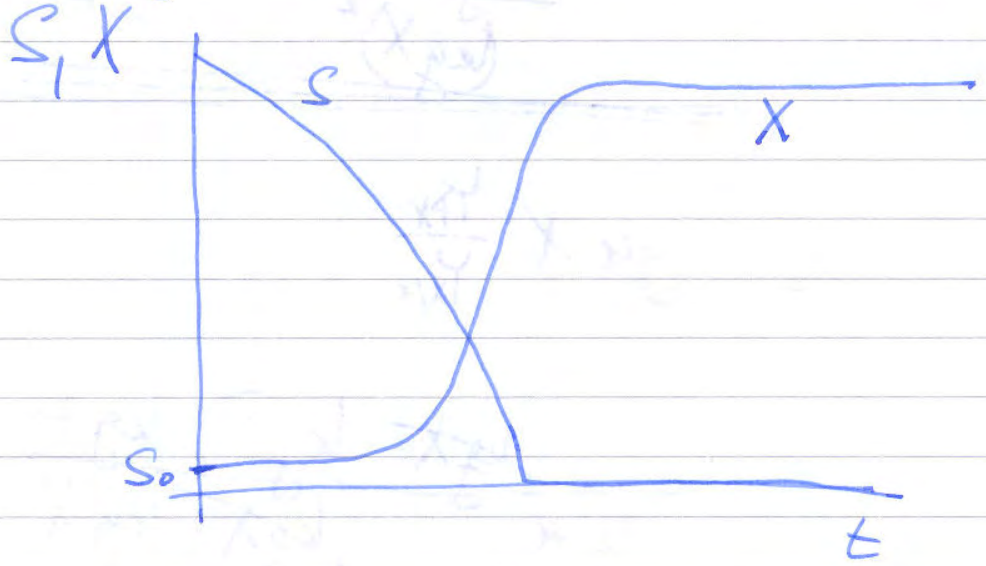
model nezahrnuje úhyn buněk!

2.) simultánní ~~spojená~~ bilance biomasy a substrátu

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} S}{K_m + S} X$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu X}{Y_{X/S}} = -\frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \frac{X}{Y_{X/S}}$$

Simultánním řešením (numerickým) najdeme logistickou závislost $X(t)$



Rychlost tvorby produktu:

specifická $\frac{1}{X}\frac{dP}{dt} = \underbrace{Y_{PX}\,\mu + \beta}_{\text{Luedeking \& Piret}}$ produkce nezávislá na růstu

produkce závislá na růstu

$$\frac{dP}{dt} = Y_{PX}\,\mu X + \beta X$$

Strukturované modely růstu

- **nestrukturované modely:**
  - popisují růst populace buněk jako celku pomocí jedné proměnné X;
  - neberou ohled na mnohosložkovou povahu buněčného prostředí;
  - nejsou schopny odlišit růst počtu buněk od růstu hmotnosti buněk, tj. předpokládá se vyvážený růst

$$\mu = \frac{1}{X}\frac{dX}{d\tau} = \nu = \frac{1}{N}\frac{dN}{d\tau}$$

X .... hmotnostní koncentrace

N ... početní konc. (počet buněk v jednotce objemu)

- **strukturované modely:**
  - člení buňku na oddíly (kompartmenty) s různou funkcí;
  - oddíly většinou sdružují více složek, které se podílí na určité funkci;
  - základní členění na tři oddíly:

    genetický systém → DNK a její změny – mutace epigenetický systém → transkripce DNK, translace, tvorba proteinů + enzymů

metabolický systém → zpracování živin

Obecný strukturovaný model ve vsádkovém reaktoru

místo jedné/celkové hmotnostní koncentrace biomasy X se zavádí hm. konc. oddílů ≡ "složky" $\hat{X}_i$, $i = 1, \dots, N$

(symbol $\hat{X}$ značí koncentraci vztaženou na objem buňky)

složky se účastní R reakcí s rychlostmi

r_{ij} $\left[\frac{\text{hmotnost složky } i}{\text{čas} \times \text{objem buňky}}\right]$, tj. r_{ij} je reakční rychlost reakce j vzhledem ke složce i

Bilance i-té "složky"

$$\frac{d\left(V_{cell}\hat{X}_i\right)}{d\tau} = V_{cell}\sum_{j=1}^{R} r_{ij}$$

kde objem buněk v reaktoru $V_{cell} = \dfrac{m}{\rho_{cell}}$

m … hmotnost buněk, ρ_{cell} … hustota b. → konst.

Po dosazení a úpravě

zředění složky v důsledku růstu biomasy

$$\frac{d\hat{X}_i}{d\tau} = \sum_{j=1}^{R} r_{ij} - \frac{1}{m}\frac{dm}{d\tau}\hat{X}_i = \sum r_{ij} - \underbrace{\frac{1}{X}\frac{dX}{d\tau}}_{\mu}\hat{X}_i$$

Součet hmotn. koncentrací = hustota buněk

$$\sum \hat{X}_i = \rho_{cell} = konst$$

Pozn.: 1) jiné značení pro ρ_{cell} je $\hat{X}$ ≡ celková hmotn. konc. buněk vztažená na objem buněk

2) koncentrace vztažené na objem buněk lze přepočítat na koncentrace vztažené na objem reaktoru V:

$$X_i = \frac{V_{cell}}{V}\hat{X}_i = \frac{m}{V}\frac{\hat{X}_i}{\rho_{cell}} = X\frac{\hat{X}_i}{\rho_{cell}}$$

Williamsův model se dvěma oddíly

Oddíl A ... syntetická část (metabolity + RNK)

Oddíl B ... strukturální část (DNK + proteiny)

(v obou oddílech je určitá část epigenetického systému)

Doplňkový oddíl: roztok substrátu S v reakčním objemu

Kinetika: oddíl A přijímá substrát S a umožňuje funkci oddílu B

$$S \xrightarrow{r_1} A \xrightarrow{r_2} B$$

$r_1 = k_1 S \hat{X}$, S je vztaženo na V, rychlost první reakce závisí na součtené koncentraci v obou oddílech

$$r_2 = k_2 \hat{X}_A \hat{X}_B$$

Bilance biomasy v A:

$$\frac{d\hat{X}_A}{d\tau} = k_1 S \hat{X} - k_2 \hat{X}_A \hat{X}_B - \frac{1}{X}\frac{dX}{d\tau}\hat{X}_A$$

Bilance biomasy v B:

$$\frac{d\hat{X}_B}{d\tau} = k_2 \hat{X}_A \hat{X}_B - \frac{1}{X}\frac{dX}{d\tau}\hat{X}_B$$

Bilance S:

$$\frac{dS}{d\tau} = -\frac{1}{Y_{X/S}} k_1 S X$$

Součet hmotn. koncentrací:

$$\hat{X}_A + \hat{X}_B = \hat{X}$$

Rovnice tvoří soustavu pro proměnné $\hat{X}_A, \hat{X}_B, S$ a X; řešením získáme jejich časový vývoj

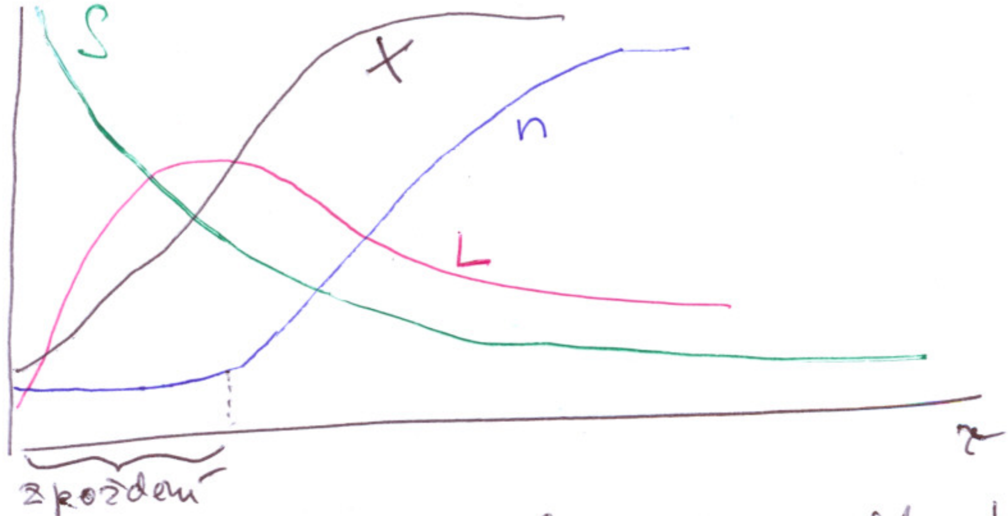
Interpretace:

počet buněk n je úměrný hmotnosti oddílu B (strukt. část):

$$n \propto V_{cell} \hat{X}_B$$

velikost buněk L je úměrná podílu hmotnosti buněk a počtu buněk:

$$L \propto \frac{m}{n} \propto \frac{XV}{V_{cell}\hat{X}_B}$$



- je vidět zpoždění růstu počtu buněk oproti hmotnosti biomasy
- existuje maximum velikosti b. → růst velikosti ve fázi zpoždění (=prodlení), později b. nerostou, ale zvyšuje se jejich počet

NEVYVÁŽENÝ RŮST

- Růst v přítomnosti dvou substrátů

a) diauxie (jeden ze substrátů působí jako katabolický represor utilizace druhého substrátu (např. glukosa - laktát) ⇒ druhý substrát se začne utilizovat až po vyčerpání substrátu prvního

odvození stejné jako rychlosti růstu vychází se zjednodušeného schématu

$$X + a_1 S_1 \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} X' \xrightarrow[k_3]{} 2X$$

$$X + a_2 S_2 \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} X'' \xrightarrow[k_4]{} 2X$$

$$dX' = k_1 X S_1 - k_{-1} X' - k_3 X'$$

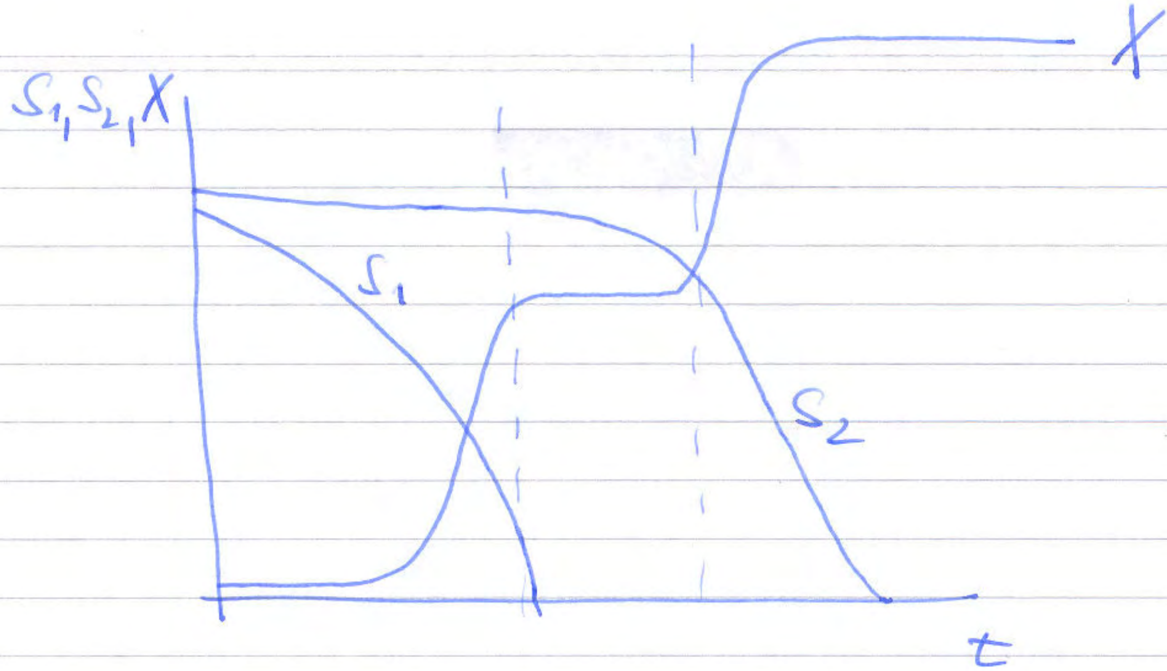
$$dX'' = k_2 X S_2 - k_{-2} X'' - k_4 X''$$

} dlouhé odvození

$$\mu = \frac{\mu_{max1} S_1}{K_1 + S_1 + \alpha_2 S_2} + \frac{\mu_{max2} S_2}{K_2 + S_2 + \alpha_1 S_1}$$

represe represe

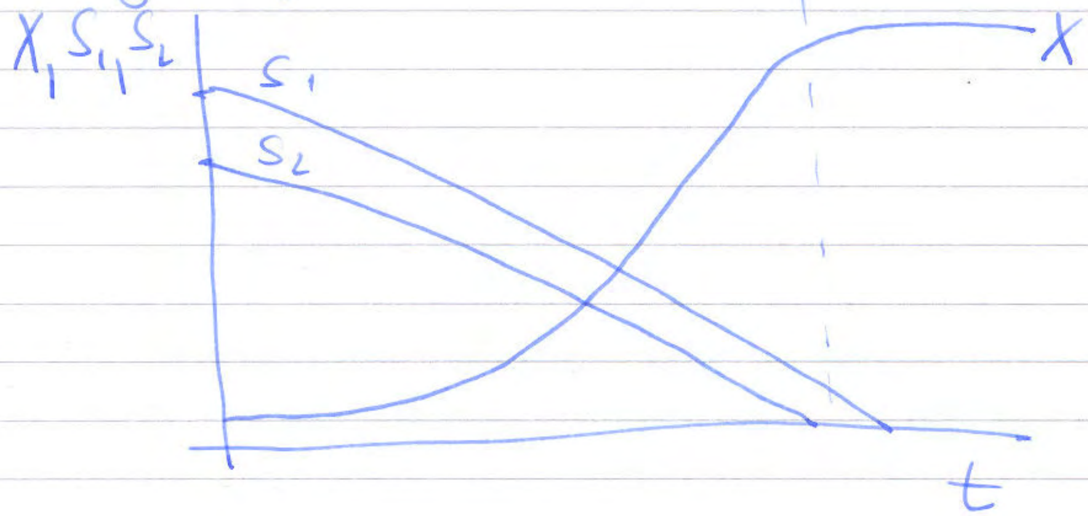
diauxické chování se plně projeví když $\alpha_1 \gg \alpha_2$ nebo $\alpha_1 \ll \alpha_2$



b) <u>aditivní kinetika:</u>

$$\mu = \frac{\mu_{max1} S_1}{K_1 + S_1} + \frac{\mu_{max2} S_2}{K_2 + S_2}$$

oba substráty se utilizují současně,
různými rychlostmi!



e) Multiplikativní kinetika

$$\mu = \mu_{max} \frac{S_1}{K_{S1} + S_1} \cdot \frac{S_2}{K_{S2} + S_2}$$

4.2 Continuous Stirred Tank Bioreactors

4.2.1 The Chemostat: the Ideal CSTR

The use of a continuous stirred tank reactor to extend the duration of culture of microbes was developed in the 1950s by Novick and Szilard[1] and Monod[2]. The realization that a CSTR could be used to maintain microbial growth at a steady state value, which could be varied from any growth rate up to the maximum μ_{max}, was an important advance, as it broke the traditional thinking at the time that stable microbial growth was only possible at the maximum rate, corresponding to the minimum doubling time found in batch cultures. Subsequently, the use of a well-mixed continuous microbial reactor to study microbial physiology led to important advances in understanding the cell cycle, metabolic regulation and microbial product formation.

The configuration of a typical well-mixed continuous reactor is shown in Figure 4.2. Agitation may be provided by an impeller or by the motion imparted to the liquid phase by rising gas bubbles. In aerobic systems, supply of oxygen to the organism generally occurs via air sparging. In the ideal case, the liquid phase is completely mixed, i.e., the liquid phase composition is uniform throughout the vessel. Similarly, temperature is maintained constant and uniform by circulation of cooling water through coils in the vessel or in a jacket surrounding the vessel. Typically the pH of the culture medium is controlled by the addition of acid or base.

We may write material balance equations for each of the important variables in the CSTR. We shall first consider the case where only one substrate (S) limits the growth rate of the organism, and that the volumetric rate of growth is given by μX. The balance equations are:

---

(1) Novick, A. and L. Szilard, *Science*, **112**, 715 (1950).

(2) Monod, J. *Ann. Inst. Past.*, **79**, 390 (1950).

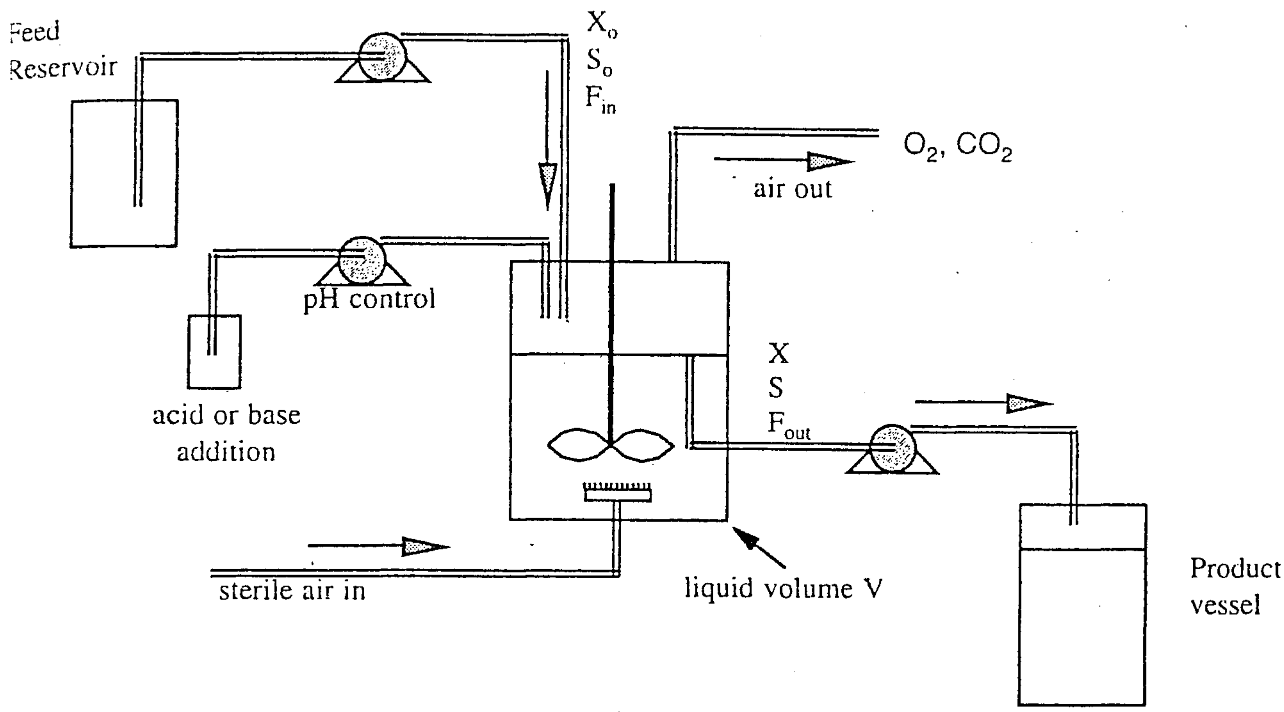


Figure 4.2. A schematic of a continuous stirred tank bioreactor. Typically the pH and temperature are controlled, as are the flow rates of nutrients into the vessel. The notation used to model CSTR systems is indicated; X is the dry cell weight, S is the substrate concentration and F is the flow rate of nutrients into the vessel.

$$\frac{dXV}{dt} = F_{in}X_o - F_{out}X + \mu X V \tag{4.19a}$$

$$\frac{dSV}{dt} = F_{in}S_o - F_{out}S - \frac{1}{Y_{X/S}}\mu X V \tag{4.19b}$$

$$\frac{dV}{dt} = F_{in} - F_{out} \tag{4.19c}$$

When the volumetric feed rates, F_{in}, F_{out}, into and from the vessel are maintained constant and equal (F), the equations simplify to (note that dX/dt no longer equals μX, as it does during batch growth)

$$\frac{dX}{dt} = \frac{F}{V}(X_o - X) + \mu X \tag{4.20a}$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V}(S_o - S) - \frac{1}{Y_{X/S}}\mu X \tag{4.20b}$$

The ratio F/V is generally referred to as the *dilution rate*, denoted as D, with units of reciprocal time. It is the inverse of the average residence time τ. It equals the number of reactor volumes that pass through the reactor per unit time. At steady state, the time derivatives are set to zero and the equation for cell concentration has the solution

$$DX_o = (D - \mu)X \tag{4.21}$$

When the feed stream is sterile (generally the case), X_0 is zero and two solutions to the above equation are possible:

$$X_{ss} = 0 \qquad \text{or} \qquad \mu = D \tag{4.22}$$

In the unusual case that the specific growth rate of the culture ($\mu(S)$) is independent of substrate concentration and is constant, the steady-state concentration of cells that results when the dilution rate is set equal to μ is indeterminate. Solution of the second mass balance shows that the steady state substrate concentration is also indeterminate, although both X_{ss} and S_{ss} must satisfy

$$S_{ss} = S_o - \frac{1}{Y_{X/S}} X_{ss} \tag{4.23}$$

Thus a range of values of cell and substrate concentrations is possible. Experimentally, this can be occasionally seen at very low inlet substrate concentrations. Time-varying cell mass and substrate concentrations are observed.

Generally however, the specific growth rate is a function of substrate concentration. When the Monod relationship between μ and S is employed, the mass balance equations are no longer indeterminate and we find

$$D = \mu = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \tag{4.24}$$

which can be solved for S:

$$S_{ss} = \frac{DK_S}{\mu_{max} - D} \qquad \text{provided} \qquad X_{ss} \neq 0 \tag{4.25}$$

and from the substrate balance equation we see

$$D(S_o - S_{ss}) - \frac{1}{Y_{X/S}} \mu X_{ss} = 0 \tag{4.26}$$

and noting $D = \mu$, we obtain

$$X_{ss} = Y_{X/S} \left(S_o - \frac{DK_S}{\mu_{max} - D} \right) \tag{4.27}$$

The second steady state solution occurs when $X_{ss} = 0$. The corresponding value of the substrate concentration is $S_{ss} = S_0$. This steady state is referred to as *washout*, as cells are no longer present in the reactor. The dilution rate at which washout occurs can be found by examining equation (4.24). When S_{ss} equals the feed concentration S_0, the corresponding dilution rate is

$$D_{max} = \frac{\mu_{max} S_o}{K_S + S_o} \tag{4.28}$$

The maximum dilution rate is thus slightly smaller than the maximum specific growth rate. If the dilution rate is greater than this value, the system moves to the second steady state solution $X_{ss} = 0$. This can be seen from the behavior of S_{ss}; as $D \rightarrow \mu_{max}$, S_{ss} becomes indeterminate.

Summary of Steady State Solutions

$D < \mu_{max}$	$D > \mu_{max}$
$S_{ss} = \dfrac{DK_S}{\mu_{max} - D}$ provided $S_0 > \dfrac{DK_S}{\mu_{max} - D}$	$S_{ss} = S_o$
S_{ss} is indeterminant if $S_0 < \dfrac{DK_S}{\mu_{max} - D}$	
$X_{ss} = Y_{X/S}\left(S_o - \dfrac{DK_S}{\mu_{max} - D}\right)$	$X_{ss} = 0$

As we saw in Chapter 3, values of K_S are usually small, particularly when compared to the inlet substrate concentration S_o. Thus the steady state substrate concentration is quite small, and, remarkably, is *independent of the inlet substrate concentration.* The non-trivial solutions can only apply in the case where the inlet substrate concentration is greater than S_{ss}. If $S_o < S_{ss}$, then the specific growth rate μ is constant, the equations are indeterminate, and a variety of steady states could be observed.

The cell concentration is approximately $Y_{X/S}S_o$ for dilution rates up to values approaching μ_{max}. The behavior of the steady state solutions X_{ss} and S_{ss} as a function of the dilution rate is shown in Figure 4.3. The operation of a CSTR under conditions where only one substrate is growth-limiting gives rise to an almost constant value of the substrate concentration over a wide range of dilution rates. Other substrates which are consumed at rates proportional to the specific growth rate of the cells will also have steady state concentrations that are independent of D and are constant. For this reason, this type of bioreactor operation is referred to as *chemostat* operation (i.e., the *chem*ical environment is *stat*ic).

As the dilution rate approaches μ_{max}, the cell concentration decreases very-rapidly. Operating the chemostat at dilution rates close to μ_{max} is experimentally difficult due to this sensitivity. Small variations in inlet substrate concentration, feed flow rate or small variations in the growth rate of the organism may result in washout of the cells.

The volumetric productivity of cells in the chemostat is given by DX_{ss} (typically expressed as gm cells per liter reactor volume per hr). The dilution rate at which the maximum productivity occurs can be found from:

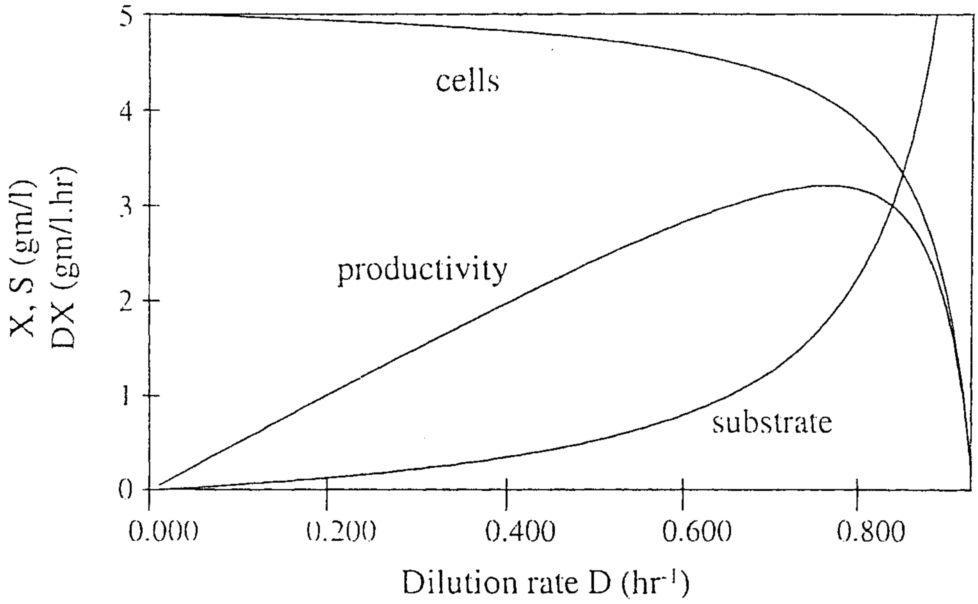


***Figure 4.3**. The dependence of the steady state cell and substrate concentrations on the dilution rate D. The values of the constants in the Monod model are μ_{max} = 1.0 hr^{-1}, K_S = 0.5 gm/l, $Y_{X/S}$ = 0.5 gm cells/gm substrate with S_o = 10 gm/l. Also shown is the cell productivity, DX_{ss}, in gm/(liter-hr).*

$$\frac{dDX_{ss}}{dD}=0 \qquad \text{thus} \qquad D_{max}=\mu_{max}\left(1-\sqrt{\frac{K_S}{K_S+S_o}}\right) \tag{4.29}$$

The corresponding cell concentration is

$$X_{ss,max}=Y_{X/S}(S_o+K_S-\sqrt{K_S(S_o+K_S)}) \tag{4.30}$$

If $K_S << S_o$, then the volumetric productivity becomes $Y_{X/S}\mu_{max}S_0$.

P.M. Doran: Example 13.6 str. 367

Konverse substrátu a produkce biomasy v chemostatu

Fermentor o objemu 5 m^3 je provozován v průtočném režimu se vstupní koncentrací substrátu 20 $kg\,m^{-3}$. Mikroorganismus kultivovaný ve fermentoru má tyto růstové parametry:

$\mu_{max} = 0{,}45\ h^{-1}$, $K_S = 0{,}8\ kg\,m^{-3}$, $Y_{XS} \doteq 0{,}55\ \frac{kg}{kg}$

a) Jakou hodnotu musí mít ředící rychlost, aby konverse substrátu byla 90%?

b) Jaká bude produktivita biomasy při této ředící rychlosti a jaká je maximální produktivita?

ad a): pro 90% konverzi

$$S = 0{,}1 S_0 = 2\ kg\,m^{-3}$$

$$D = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} = \frac{0{,}45 \cdot 2}{0{,}8 + 2} = \underline{\underline{0{,}3214\ h^{-1}}}$$

$$F = DV = 0{,}3214 \cdot 5 = \underline{\underline{1{,}607\ m^3 h^{-1}}}$$

ad b): koncentrace biomasy v ustáleném stavu

$$X = Y_{XS}(S_0 - S) = 0{,}55(20 - 2) = 9{,}9\ kg\,m^{-3}$$

produktivita: $Pr_X = DX = \overset{0{,}3214}{\cancel{1{,}607}} \cdot 9{,}9 = 3{,}1818{,}6$

$$\underline{\underline{Pr_X \doteq 3{,}18\ kg\,m^{-3}\,h^{-1}}}$$

./.

• D_{opt} pro maximální produktivitu:

$$D_{opt} = \mu_{max}\left[1-\sqrt{\frac{K_S}{K_S+S_0}}\right] =$$

$$= 0{,}45\left(1-\sqrt{\frac{0{,}8}{0{,}8+20}}\right) = 0{,}36175$$

$$\underline{\underline{D_{opt} \doteq 0{,}362\ h^{-1}}}$$

• koncentrace biomasy při D_{opt}:

$$X_{opt} = Y_{XS}\left(S_0 + K_S - \sqrt{K_S(S_0+K_S)}\right)$$

$$X_{opt} = 0{,}55\left(20 + 0{,}8 - \sqrt{0{,}8(20+0{,}8)}\right)$$

$$\underline{\underline{X_{opt} = 9{,}196\ kg\,m^{-3}}}$$

• produktivita:

$$Pr_{X,opt} = D_{opt}X_{opt} = 0{,}362 \cdot 9{,}196 = 3{,}329$$

$$\underline{\underline{Pr_{X,opt} \doteq 3{,}33\ kg\,m^{-3}h^{-1}}}$$

$$0{,}55\left(20 - \frac{0{,}8 \cdot 0{,}362}{0{,}45 - 0{,}362}\right) = 9{,}19\ kg\,m^{-3}$$

ODVOZENÍ VZTAHU PRO D_{opt}

$$\left(\frac{u}{v}\right)' = \frac{u'v - uv'}{v^2}$$

$$P_r = D\,Y_{xs}\left(S_0 - \frac{K_s D}{\mu_m - D}\right) =$$

$$= D\,Y_{xs} S_0 - \frac{K_s D^2 Y_{xs}}{\mu_m - D}$$

$$\frac{\partial P_r}{\partial D} = 0 \;:\Rightarrow D_{opt}$$

$$\frac{\partial P_r}{\partial D} = Y_{xs} S_0 - \frac{2 D K_s Y_{xs}(\mu_m - D) - K_s D^2 Y_{xs}\cdot(-1)}{(\mu_m - D)^2}$$

$$= Y_{xs} S_0 - \frac{2 D K_s Y_{xs}(\mu_m - D) + K_s D^2 Y_{xs}}{(\mu_m - D)^2}$$

$$Y_{xs} S_0 (\mu_m - D)^2 - 2 D K_s Y_{xs} (\mu_m - D) - K_s D^2 Y_{xs} = 0$$

$$Y_{xs} S_0 (\mu_m^2 - 2D\mu_m + D^2) - 2 K_s Y_{xs} \mu_m D + 2 K_s Y_{xs} D^2 - K_s Y_{xs} D^2 = 0$$

$$Y_{xs} S_0 \mu_m^2 - 2 Y_{xs} S_0 \mu_m D + Y_{xs} S_0 D^2 - 2 K_s Y_{xs} \mu_m D + 2 K_s Y_{xs} D^2 - K_s Y_{xs} D^2 = 0$$

$$(K_s \cancel{Y_{xs}} + \cancel{Y_{xs}} S_0) D^2 - (2 \cancel{Y_{xs}} S_0 \mu_m + 2 K_s \cancel{Y_{xs}} \mu_m) D + \cancel{Y_{xs}} S_0 \mu_m^2 = 0$$

$\rightarrow$ #

$\rightarrow$ Řešení a Mathematica:

$$D_{opt} = \frac{K_s \mu_m + \mu_m S_0 \pm \sqrt{K_s^2 \mu_m^2 + K_s \mu_m^2 S_0}}{K_s + S_0}$$

$$D_{opt} = \frac{\mu_m (K_s + S_0) \pm \sqrt{K_s \mu_m^2 (K_s + \cancel{\mu_m} S_0)}}{K_s + S_0}$$

$$\boxed{D_{opt} = \mu_m \left(1 \cancel{\pm} \underbrace{\sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_0}}}_{\text{kladné}}\right)}$$

$D_{opt} < \mu_{max}$

$$\# \quad \underbrace{(K_s+S_0)}_{\text{„}a\text{"}}D^2 - \underbrace{2\mu_m(S_0+K_s)}_{\text{„}b\text{"}}D + \underbrace{S_0\mu_m^2}_{\text{„}c\text{"}} = 0$$

$$\boxed{D_{opt} = \frac{\cancel{2}\mu_m(K_s+S_0) \pm \sqrt{\cancel{4}\mu_m^2(S_0+K_s)^2 - \cancel{4}(K_s+S_0)S_0\mu_m^2}}{\cancel{2}(K_s+S_0)}} =$$

$$= \frac{\mu_m(K_s+S_0) \pm \mu_m\sqrt{(K_s+S_0)^2 - (K_s+S_0)S_0}}{K_s+S_0} =$$

$$= \frac{\mu_m(K_s+S_0) \pm \mu_m\sqrt{K_s^2 + \cancel{2}K_sS_0 + \cancel{S_0^2} - \cancel{K_sS_0} - \cancel{S_0^2}}}{K_s+S_0} =$$

$$= \frac{\mu_m(K_s+S_0) \pm \mu_m\sqrt{K_s^2 + K_sS_0}}{K_s+S_0} =$$

$$\boxed{= \frac{\mu_m(K_s+S_0) \pm \mu_m\sqrt{K_s(K_s+S_0)}}{K_s+S_0}}$$

$\Longrightarrow$ výsledek totožný s Natlie maticou!

Lze snadno ukázat, že

$$\cancel{X}_{opt} = Y_{X/S}\left(S_0 + K_s - \sqrt{K_s(K_s+S_0)}\right)$$

(výstupní/~~[illegible]~~ konc. ~~[illegible]~~ biomasy)

Modifikace základních typů reaktorů:

stabilizace prac. bodu do oblasti $D > \mu_{max}$!

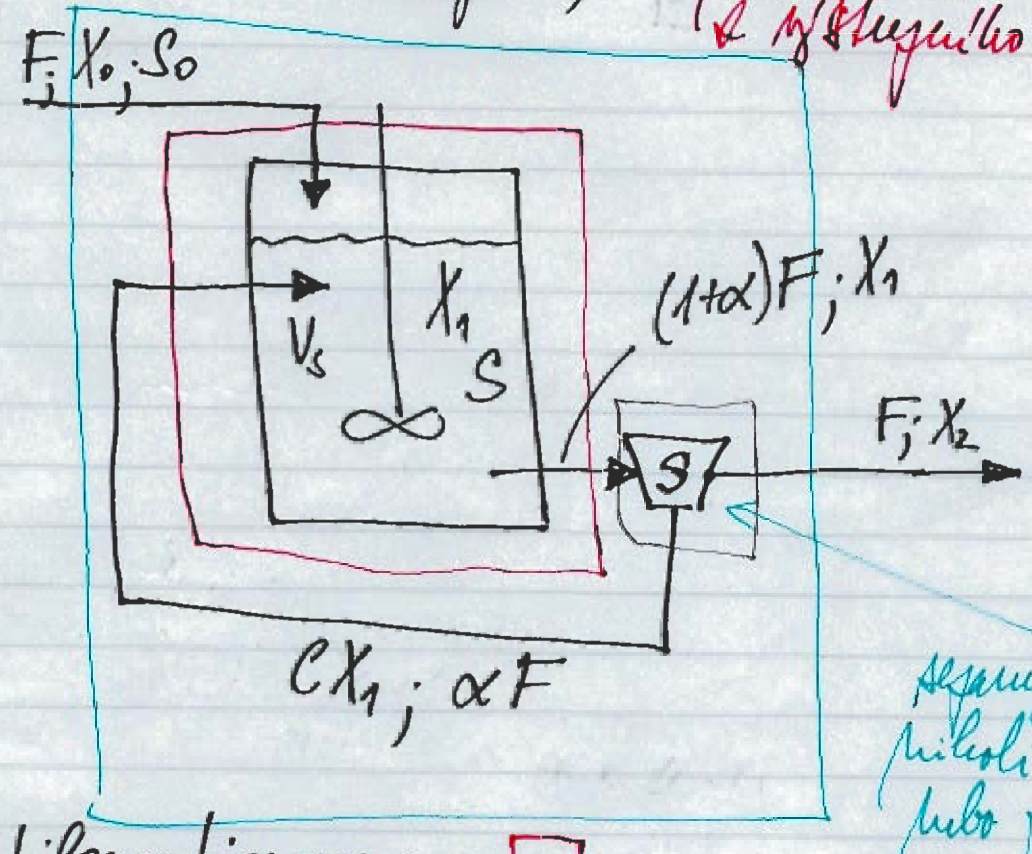
CHEMOSTAT S RECYKLEM BIOMASY:

- rychlost biotransformací závisí na koncentraci biomasy v systému ⇒ zvýšení koncentrace buněk zvyšuje produktivitu systému ~~stabil~~

- zvýšení koncentrace biomasy: recyklace biomasy z výstupu na vstup reaktoru:
  - centrifugace
  - filtrace (často membránová)
  - sedimentace (kónické nádoby)

  → metody oddělení buněk z výstupního proudu

recyklace zlepšuje i stabilitu systému (např. výkyvy na vstupu...)



zde se separují pouze buňky, nikoli substrát nebo produkty!

- bilance biomasy: $\square$

$$\underbrace{FX_0 + \alpha F C X_1}_{\text{vstupy}} - \underbrace{(1+\alpha) F X_1}_{\text{výstup}} + \underset{\text{růst}}{V\mu X_1} = V\frac{dX_1}{dt}$$

α ... recyklační poměr (poměr objemových toků)

C ... koncentrační faktor (konc. biomasy v recyklu ku koncentraci v reaktoru).

- v ustáleném stavu a pro $X_0 = 0$:

$$\mu = (1+\alpha - \alpha C)D = [1+\alpha(1-C)]D \qquad D = \frac{F}{V_s}$$

protože $C > 1$ a $\alpha(1-C) < 0$ je $\mu < D$!!!

! chemostat s recyklem může být provozován při ředicí rychlosti vyšší než je specifická růstová rychlost

- bilance limitujícího substrátu: (bez tvorby produktu)

$$FS_0 + \alpha FS - V\mu \frac{1}{Y_{X/S}} X_1 - (1+\alpha)FS = V\frac{dS}{dt}$$

v ustáleném stavu:

$$X_1 = \frac{D}{\mu} Y_{X/S}(S_0 - S)$$

$$\boxed{X_1 = \frac{D\, Y_{X/S}(S_0 - S)}{[1+\alpha(1-C)]D} = \frac{Y_{X/S}(S_0 - S)}{1+\alpha(1-C)}}$$

koncentrace biomasy v chemostatu s recyklem v ustáleném stavu.

$$\mu = \underbrace{\frac{\mu_{max} S}{K_s + S}}_{\text{Monodova rce.}} = [1 + \alpha(1-C)]D$$

$$\mu_{max} S = (K_s + S)[1 + \alpha(1-C)]D$$

$$\{\mu_{max} - [1+\alpha(1-C)]D\} S = K_S[1+\alpha(1-C)]D$$

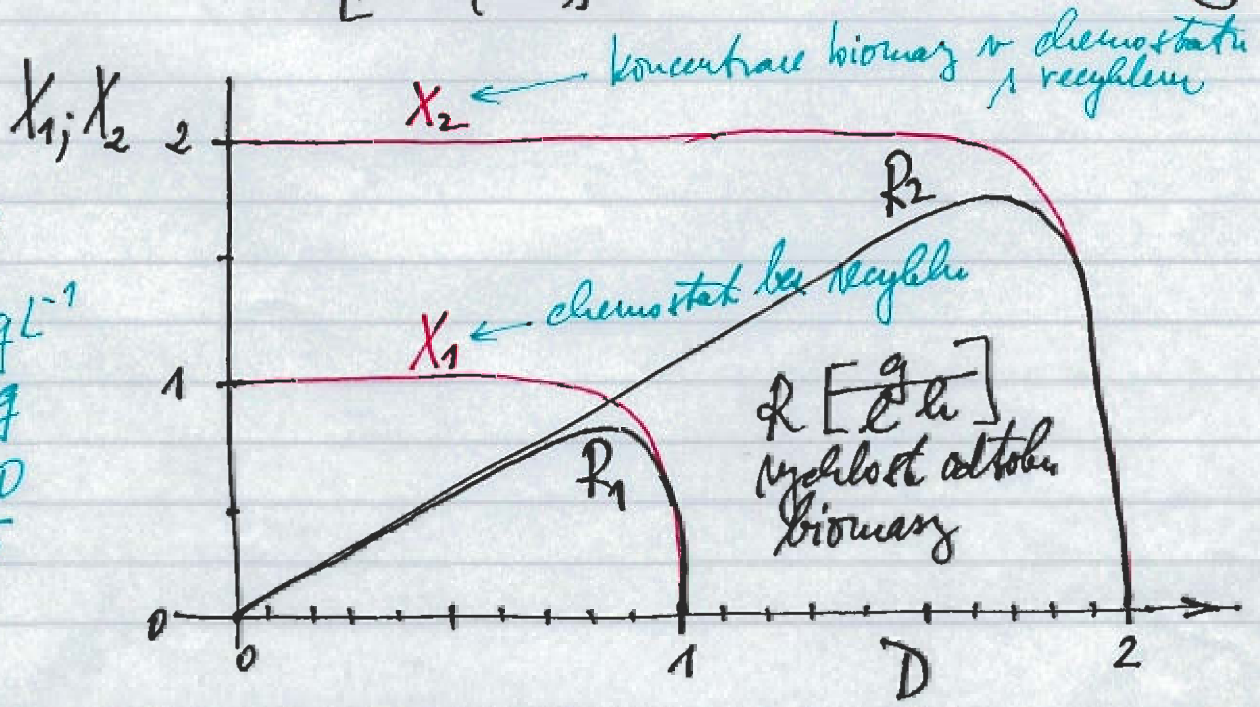
$$\boxed{S = \frac{K_s[1+\alpha(1-C)]D}{\mu_{max} - [1+\alpha(1-C)]D}}$$

koncentrace substrátu v chemostatu s recyklem v ustáleném stavu

Výraz pro S je možno dosadit do rovnice pro X_1:

$$X_1 = \frac{Y_{X/S}}{[1+\alpha(1-C)]}\left\{S_0 - \frac{K_S D[1+\alpha(1-C)]}{\mu_{max} - [1+\alpha(1-C)]D}\right\}$$

$\mu_{max} = 1\,h^{-1}$
$S_0 = 2\,g\,L^{-1}$
$K_S = 0{,}010\,g\,L^{-1}$
$Y_{X/S} = 0{,}5\,g/g$
$C = 2{,}0$
$\alpha = 0{,}5$



Ex. 9.1 Chemostat s recyklem má objem $V = 1000\,cm^3$ a objemový přítok na hodinu $F = 100\,cm^3/h$. Systém funguje za limitace glukózou; výtěžnostní koeficient $Y_{X/S} = 0{,}5$ g sušiny/g substrátu. Koncentrace glukózy ve vstupním proudu je $S_0 = 10$ g glukózy/L. Kinetické konstanty růstu jsou $\mu_{max} = 0{,}2\,h^{-1}$ a $K_s = 1\,g/L$. Hodnota koncentračního faktoru je $C = 1{,}5$ a recyklační poměr $\alpha = 0{,}7$. Systém se nachází v ustáleném stavu.

a) Určete koncentraci substrátu v recyklovém proudu.
b) Určete specifickou růstovou rychlost organismu.
c) Určete koncentraci biomasy v recyklovém proudu.
d) Určete koncentraci buněk ve výstupním proudu ze separátoru (≡ systému).

$$\mu = [1+\alpha(1-C)]D = [1+0{,}7(1-1{,}5)]\frac{100}{1000} =$$

$$= \underline{\underline{0{,}065\,h^{-1}}} \Rightarrow b)$$

$$S = \frac{K_s[1+\alpha(1-C)]D}{\mu_{max} - [1+\alpha(1-C)]D} = \frac{K_s\mu}{\mu_{max}-\mu} =$$

$$= \frac{1\cdot 0{,}065}{0{,}2-0{,}065} = \underline{\underline{0{,}48\,g\,L^{-1}}} \Rightarrow a)$$

$$X_1 = \frac{D}{\mu}Y_{X/S}(S_0 - S) = \frac{0{,}1}{0{,}065}\cdot 0{,}5\cdot(10-0{,}48) =$$

$$= 7{,}32\,g\,L^{-1}$$

$$CX_1 = 1{,}5\cdot 7{,}32 = \underline{\underline{10{,}98\,g\,L^{-1}}} \Rightarrow c)$$

9.

bilance biomasy v separátoru :

$$(1+\alpha)FX_1 = \alpha FCX_1 + FX_2$$

$$X_2 = (1+\alpha)X_1 - \alpha C X_1$$

$$X_2 = [(1+\alpha)\cancel{X_1} - \alpha C]X_1 \Rightarrow$$

$$X_2 = [1+\alpha(1-C)]X_1$$

$$X_2 = [1+0{,}7(1-1{,}5)]7{,}32 = 4{,}758$$

$$\underline{\underline{X_2 = 4{,}758\,g\,L^{-1}}} \quad \Rightarrow d)$$

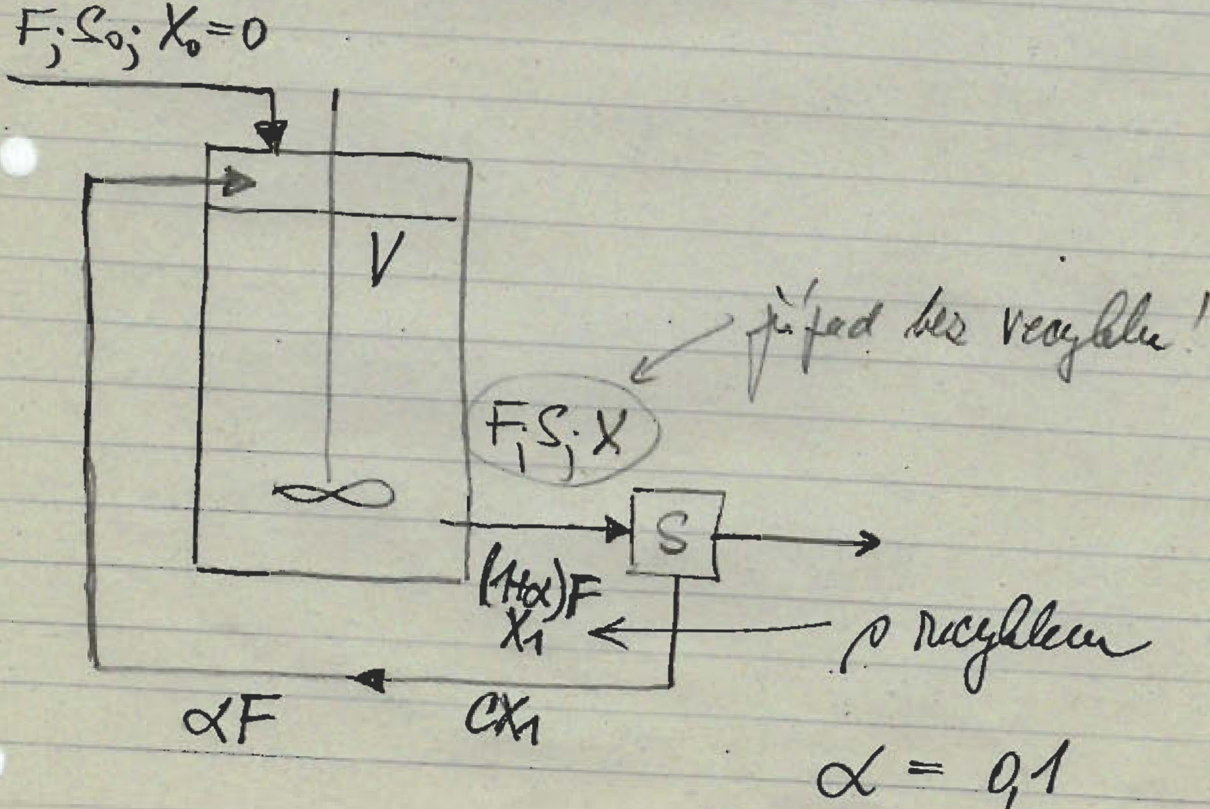
(Probl. 9.1)

V průtočném reaktoru o objemu 1000 dm^3 je produkována biomasa s použitím glukózy jako substrátu. Růstová kinetika se řídí Monodovým vztahem s $\mu_{max} = 0{,}4$ hod^{-1} a $K_S = 1{,}5$ g dm^{-3}. Růstový výtěžek $Y_{X/S} = 0{,}5$ g biomasy / g glukózy. Vstupní proud neobsahuje biomasu. Vstupní koncentrace glukózy je 10 g dm^{-3} a objemový průtok na vstupu 100 dm^3/h.

a) Jaká je rychlost produkce biomasy (g dm^{-3} h^{-1}) v ustáleném stavu?

b) Jestliže se použije recykl s obj. průtokem recyklového proudu 10 dm^3/h a jestliže koncentrace biomasy v recyklovém proudu je 5-násobkem koncentrace na výstupu z reaktoru, jaká potom bude rychlost produkce biomasy?

c) Vysvětlete rozdíl mezi hodnotami vypočtenými v bodech a) a b).



$\alpha = 0{,}1$

$C = 5$

ad a) ustál. stav v chemostatu:

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} = D$$

$$S = \frac{D K_s}{\mu_{max} - D}$$

bilance substrátu: (ust. stav)

$$FS_0 - FS - V\frac{\mu}{Y_{X/S}} X = 0$$

$$D(S_0 - S) = \frac{\mu}{Y_{X/S}} X$$

$$X = \frac{\cancel{D}(S_0 - S) Y_{X/S}}{\cancel{\mu}}$$

koncentrace biomasy v ustál. stavu v jednoduchém chemostatu

$$X_a = Y_{X/S}(S_0 - S) = Y_{XS}\left(S_0 - \frac{D K_s}{\mu_{max} - D}\right)$$

$$X_a = 0{,}5\left(10 - \frac{\frac{100}{1000} \cdot 1{,}5}{0{,}4 - \frac{100}{1000}}\right) = 0{,}5\left(10 - \frac{0{,}1 \cdot 1{,}5}{0{,}4 - 0{,}1}\right)$$

$$\underline{X_a = 4{,}75 \text{ g dm}^{-3}}$$

$$Pr_a = D X_a = \frac{100}{1000} \cdot 4{,}75 = \underline{\underline{0{,}475 \text{ g dm}^{-3} \text{h}^{-1}}}$$

ad b)

$$X_1 = \frac{Y_{X/S}(S_0 - S)}{1 + \alpha(1 - C)}$$

$$S = \frac{K_S[1 + \alpha(1 - C)]D}{\mu_{max} - [1 + \alpha(1 - C)]D}$$

$$S = \frac{1{,}5[1 + 0{,}1(1 - 5)]0{,}1}{0{,}4 - [1 + 0{,}1(1 - 5)] \cdot 0{,}1} = \frac{0{,}09}{0{,}34}$$

$$S \doteq 0{,}265 \ g\,dm^{-3}$$

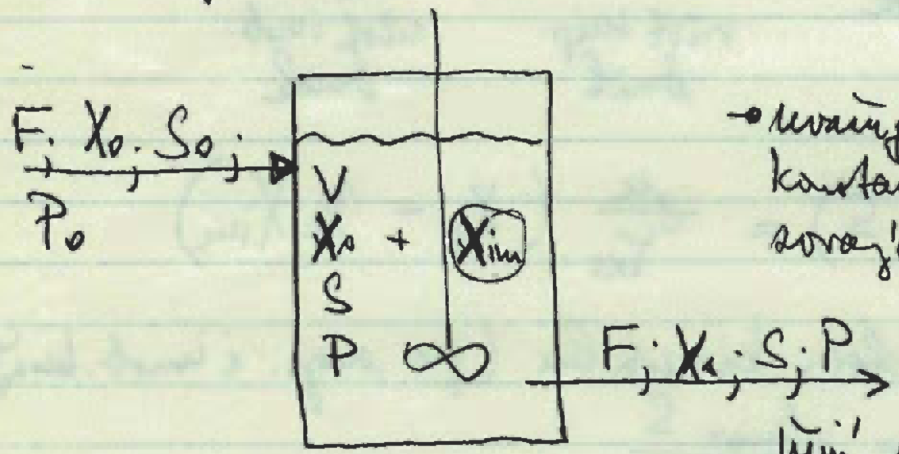
$$X_1 = \frac{0{,}5(10 - 0{,}265)}{1 + 0{,}1(1 - 5)} = 8{,}113$$

$$X_1 = 8{,}113 \ g\,dm^{-3}$$

$$\underline{\underline{DX_1 = 0{,}811 \ g\,dm^{-3}\,h^{-1}}}$$

Chemostat s imobilizovanými buňkami

=> stabilizace pracovního režimu = vyplavení až při velmi vysoké ředící rychlosti



- uvažujeme, že ve fermentoru je konstantní koncentrace imobilizovaných buněk X_{im} (např. na povrchu nosiče) které rostou a uvolňují dceřinné buňky do média (X_s); suspendované buňky jsou vyplavovány
- imobil. buňky jsou zadržovány v systému

- předpokládáme stejné parametry růstu a produkce u suspendovaných i imobilizovaných buněk (pro jednoduchost!)

<u>bilance biomasy</u> (v ustáleném stavu):

sterilní vstupní proud

$$\underbrace{-FX_s}_{\text{odtok}} + \underbrace{\mu X_s V}_{\text{růst susp. buněk}} + \underbrace{\mu X_{im} V}_{\text{růst imob. buněk}} = 0 \qquad \Big| \cdot \frac{1}{V}$$

$\eta_t \mu X_{im} V$

celkový ("total") faktor účinnosti, pokud jsou významné transportní limitace růstu

$$DX_s = \mu\,(X_s + \eta_t X_{im})$$

$$\boxed{D = \mu\left(1 + \frac{\eta_T X_{im}}{X_s}\right)} \quad \frac{\eta_T X_{im}}{X_s} > 0 \;\Rightarrow\; D > \mu\,!$$

%

• bilance substrátu (limitujícího), ust. stav, sádky / produkt

$$FS_0 - FS - \frac{\mu X_s}{Y_{XS}} V - \frac{\eta_t \mu X_{im}}{Y_{XS}} V = 0 \;\Big|\; \frac{1}{V}$$

přítok — odtok — růst susp. buněk — růst imob. buněk

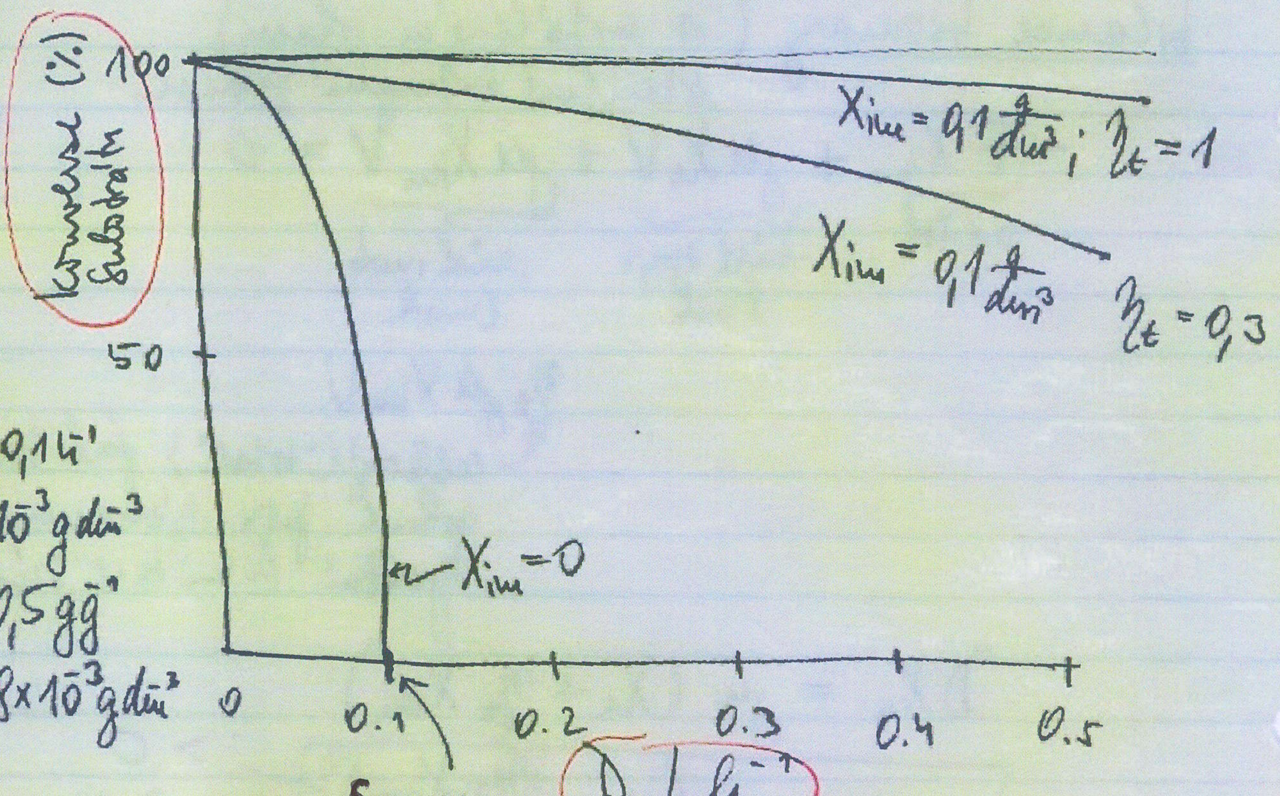
$$D(S_0 - S) = \frac{\mu}{Y_{XS}} \left(X_s + \eta_t X_{im} \right)$$

použijeme Monodovu kinetiku (pro susp. i imob. buňky)

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S}$$

a po úpravách (s užitím $Y_{XS} = \dfrac{X_S}{S_0 - S}$)

$$\frac{\mu_{max} S}{K_s + S} = \frac{D(S_0 - S) Y_{XS}}{(S_0 - S) Y_{XS} + \eta_t X_{im}}$$



$\mu_{max} = 0{,}1\ h^{-1}$

$K_s = 10^{-3}\ g\,dm^{-3}$

$Y_{XS} = 0{,}5\ g\,g^{-1}$

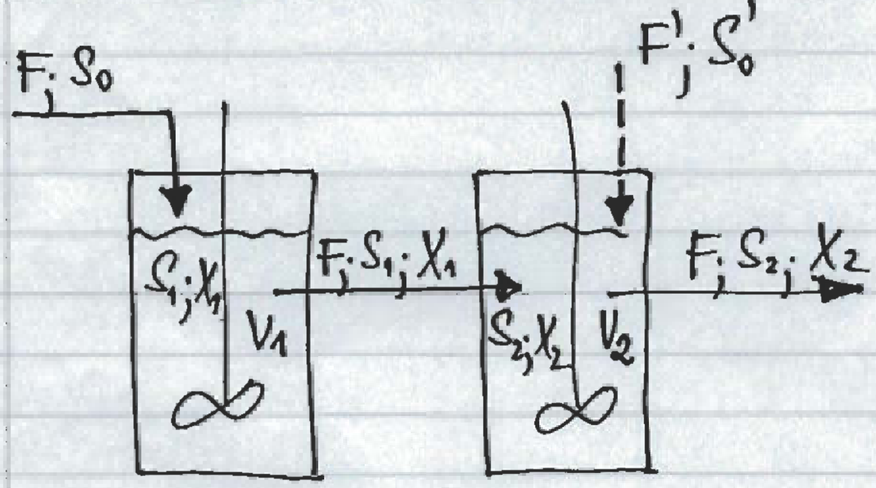
$S_0 = 8 \times 10^{-3}\ g\,dm^{-3}$

$$\frac{\mu_{max} S_0}{K_s + S_0} = D_{max}$$

Vícestupňový chemostat:

- např. pro produkci sekundárních metabolitů ⇒ rozdělení systému na 2 stupně umožňuje oddělit růstovou a produkční fázi
- ve vícestupňových systémech lze kultivační podmínky nastavit v každém stupni separátně (pH, teplota ...)
- série průtočných chemostatů ⇒ pístový tok; v každém se mění fyziologický stav populace

• Dvoustupňový chemostat:



• bilance pro první stupeň:

$$S_1 = \frac{K_s D_1}{\mu_m - D_1}$$

$$X_1 = Y_{X/S}(S_0 - S_1)$$

• bilance biomasy pro druhý stupeň:

$$FX_1 - FX_2 + V_2 \mu_2 X_2 = V_2 \frac{dX_2}{dt}$$

v ustál. stavu

$$\mu_2 = D_2 \left(1 - \frac{X_1}{X_2}\right)$$

$$\frac{X_1}{X_2} < 1 \Rightarrow \mu_2 < D_2$$

bilance substrátu ve druhém stupni:

$$FS_1 - FS_2 - \frac{\mu_2}{Y_{X/S}} X_2 V_2 = V_2 \frac{dS_2}{dt}$$

v ustáleném stavu:

$$S_2 = S_1 - \frac{\mu_2}{D_2} \frac{X_2}{Y_{X/S}}$$

kde $D_2 = \frac{F}{V_2}$ a $\mu_2 = \frac{\mu_{max} S_2}{K_s + S_2}$

– pro případ přítoku do 2. stupně:

• bilance biomasy:

$$F X_1 + F' X' - (F + F') X_2 + V_2 \mu_2 X_2 = V_2 \frac{dX_2}{dt}$$

pro ustálený stav a $X' = 0$ (sterilní přítok):

$$\mu_2 = D_2' - \frac{F}{X_2} \frac{X_1}{V_2}$$

$$D_2' = \frac{F + F'}{V_2} \quad ; \quad \mu_2 = \frac{\mu_{max} S_2}{K_2 + S_2}$$

• bilance substrátu:

$$FS_1 + F'S_0' - (F + F') S_2 - V_2 \frac{\mu_2}{Y_{X/S}} X_2 = V_2 \frac{dS_2}{dt}$$

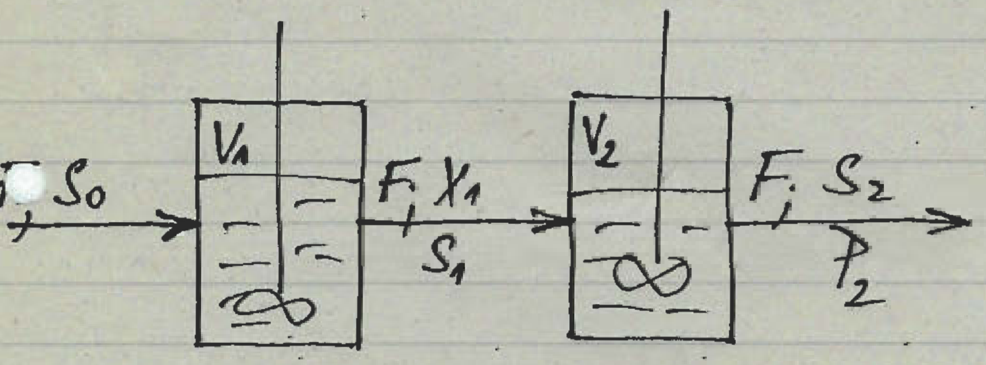
soustavy rovnic pro vícestupňové systémy lze řešit numericky nebo graficky!

$\boxed{\text{Probl. 9.2}}$

V kaskádě dvou chemostatů má první člen objem $V_1 = 500\ dm^3$ a druhý $V_2 = 300\ dm^3$. První člen slouží k růstu biomasy a druhý k produkci sekundárního metabolitu. Objemový tok na vstupu do prvního členu je $F = 100\ dm^3 h^{-1}$ a vstupní koncentrace glukózy je $S_0 = 5\ g\,dm^{-3}$. Konstanty růstové kinetiky jsou $\mu_{max} = 0{,}3\ h^{-1}$, $K_S = 0{,}1\ g\,dm^{-3}$ a $Y_{X/S} = 0{,}4\ g/g$.

a) Určete koncentraci biomasy a substrátu na výstupu z prvního členu.

b) Za předpokladu, že růst ve 2. členu je zanedbatelný, a že specifická rychlost produkce $q_P = 0{,}02\ gP\ g^{-1}$ biomasy h^{-1} a že $Y_{P/S} = 0{,}6\ gP/gS$ určete koncentrace ~~biomasy a~~ produktu a substrátu na výstupu z 2. členu.



konc. substrátu na výstupu z 1. členu:

$$S_1 = \frac{D_1 K_S}{\mu_{max} - D_1} = \frac{\frac{100}{500}\cdot 0{,}1}{0{,}3 - \frac{100}{500}} = \frac{0{,}02}{0{,}3 - 0{,}2}$$

$$S_1 = \frac{0{,}02}{0{,}1} = 0{,}2\ g\,dm^{-3}$$

koncentrace biomasy:

$$X_1 = Y_{X/S}(S_0 - S_1) = 0{,}4(5 - 0{,}2)$$

$$\underline{\underline{X_1 = 1{,}92\ g\,dm^{-3}}}$$

ad b)

<u>bilance produktu ve 2. členu:</u>

$$FP_1 - FP_2 + V_2 q_P X_2 = 0$$

$P_1 = 0$

$$P_2 = \frac{V_2 q_P X_2}{F} = \frac{V_2 q_P X_1}{F}$$

$$X_2 \equiv X_1 \text{ (žádný růst ve 2. členu).}$$

$$P_2 = \frac{300 \cdot 0{,}02 \cdot 1{,}92}{100} = \underline{\underline{0{,}1152\ g\,dm^{-3}}}$$

<u>bilance substrátu ve 2. členu:</u>

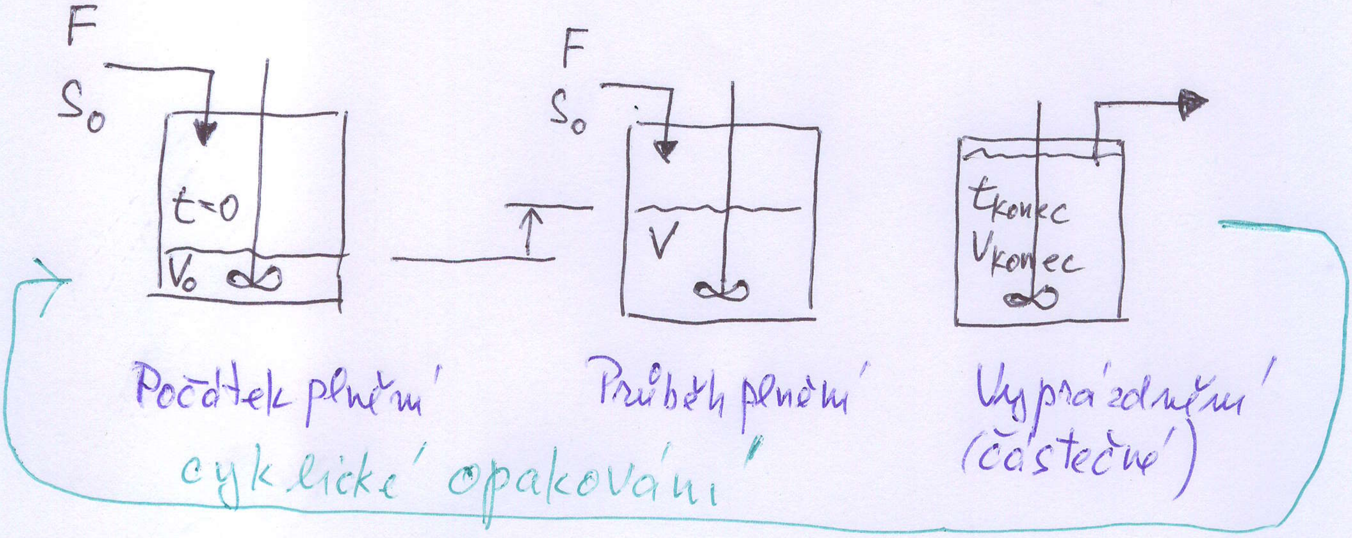
$$FS_1 - FS_2 - V_2 q_P X_2 \cdot \frac{1}{Y_{P/S}} = 0$$

$$S_2 = S_1 - \frac{V_2 q_P X_2}{F Y_{P/S}} \quad X_2 \equiv X_1$$

$$S_2 = 0{,}2 - \frac{300 \cdot 0{,}02 \cdot 1{,}92}{100 \cdot 0{,}6} = \underline{\underline{8 \cdot 10^{-3}\ g\,dm^{-3}}}$$

Polovsádkový reaktor (fed-batch reactor)

- substrát se přidává kontinuálně
- systém se vyprazdňuje periodicky



- výhoda: koncentrace S je nízká v celém průběhu → potlačení inhibičních účinků

Bilance objemu:

$$\frac{dV}{dt} = F \longrightarrow V = V_0 + Ft$$

Bilance biomasy (m_X = množství biomasy v reaktoru = VX)

$$\frac{dm_X}{dt} = \frac{d(VX)}{dt} = \mu VX$$

$$V\frac{dX}{dt} + X\underbrace{\frac{dV}{dt}}_{F} = \mu VX \quad \Big/ \cdot \frac{1}{V}$$

$$\frac{dX}{dt} + XD = \mu X \longrightarrow \boxed{\frac{dX}{dt} = (\mu - D)X}$$

Během plnění přibývá biomasa, ale také roste objem → $X \approx$ konst. a tedy

$$\underbrace{\frac{dX}{dt} \approx 0}_{\text{kvazistacionární stav pro } X} \rightarrow \boxed{\begin{aligned} \mu &= \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} = D \\ S &= \frac{K_s D}{\mu_{max} - D} \end{aligned}}$$

Bilance substrátu (m_s = hmotnost substrátu)

$$\frac{dm_s}{dt} = \frac{d(VS)}{dt} = FS_0 - \frac{\mu V X}{Y_{X/S}}$$

V roste, S klesá → $VS \approx$ konst → $\underbrace{\frac{dm_s}{dt} \approx 0}_{\text{kvazistac. stav pro } m_s}$

Tedy: $\boxed{FS_0 Y_{X/S} = \mu V X}$

$$X = \frac{F S_0 Y_{X/S}}{\underbrace{V}_{D}\mu} = \underbrace{\frac{D}{\mu}}_{=1 \text{ z bilance biomasy}} S_0 Y_{X/S} = S_0 Y_{X/S}$$

Přírůstek biomasy:

$$\frac{dm_X}{dt} = \mu V X = FS_0 Y_{X/S} \rightarrow \boxed{m_X = m_{X_0} + FS_0 Y_{X/S}\, t}$$

nebo $\boxed{m_X = VX = S_0 Y_{X/S}(V_0 + Ft)}$

Bilance produktu (pokud vzniká)

$$\frac{dm_P}{dt} = \frac{d(VP)}{dt} = q_P X V = q_P S_0 Y_{X/S} (V_0 + Ft)$$

$q_P = \frac{1}{X}\frac{dP}{dX}$ ... specifická rychlost tvorby P

předp. že $q_P = konst$ (sekundární metabolit)

Po integraci:

$$\boxed{m_P = m_{P0} + q_P S_0 Y_{X/S} \left(V_0 + \frac{Ft}{2}\right) t}$$

Příklad: Polovsádkový ~~fer~~ fermentor pracuje v cyklu 2 h s přívodem 200 l/h roztoku glukózy o koncentraci $S_0 = 100 g/l$. Po naplnění reaktor obsahuje 1000 l směsi. Parametry mikroorganismu jsou: $K_S = 1 g/l$, $\mu_{max} = 0{,}35 h^{-1}$, $Y_{X/S} = 0{,}5$ g buněk/g glukózy.

Určete:

a) počáteční objem V_0

b) koncentraci glukózy na začátku a konci cyklu

c) koncentraci biomasy a její hmotnost na zač. a konci cyklu ad a) $V = V_0 + Ft \rightarrow V_0 = V - Ft =$

$= 1000 - 200 \cdot 2 = \underline{600\,l}$

ad b) $S = \dfrac{K_S D}{\mu_{max} - D}$

na začátku cyklu je $D = \dfrac{F}{V_0} = \dfrac{200}{600} = 0{,}3\ h^{-1}$

a $S = \dfrac{1 \cdot 0{,}3}{0{,}35 - 0{,}3} = \underline{6\ g/l}$

na konci cyklu je $D = \dfrac{F}{V_{konec}} = \dfrac{200}{1000} = 0{,}2\ h^{-1}$

a $S = \dfrac{1 \cdot 0{,}2}{0{,}35 - 0{,}2} = \underline{2\ g/l}$

ad c) $X = S_0 Y_{X/S} = 100 \cdot 0{,}5 = 50\ g/l \approx konst$

$m_X = XV = S_0 Y_{X/S} (V_0 + Ft)$

začátek: $t = 0$: $m_X = S_0 Y_{X/S} V_0 = 100 \cdot 0{,}5 \cdot 600 = 3 \cdot 10^4\ g$

$= \underline{30\ kg}$

konec: $t = t_{konec} = 2h$: $m_X = 100 \cdot 0{,}5 \cdot 1000 = 5 \cdot 10^4\ g =$

$V = V_{konec} = 1000\ l$ $\qquad = \underline{50\ kg}$

Smíšené kultury

→ mnoho průmyslových procesů: (průběh/výsledek procesu je závislý na zastoupení subpopulací)
- potravinářství (sýry)
- čištění odpadních vod
- organismy s rekombinantní DNK (stejný mikroorganismus ale odlišné vlastnosti)

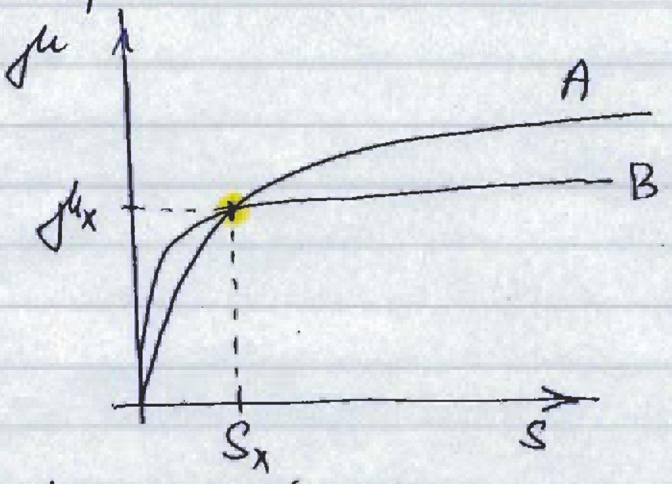
→ přírodní prostředí: smíšené kultury jsou typické

ZÁKLADNÍ TYPY INTERAKCÍ mezi populacemi

i) kompetice
ii) neutralismus
iii) komensalismus
iv) amensalismus
v) dravec – kořist
vi) mutualismus

	Účinek přítomnosti B na růstovou rychlost A	Účinek přít. A na růstovou rychlost B		Název interakce
NEPŘÍMÉ INTERAKCE	− −	− 0	negativní působení díky soutěži o zdroje	KOMPETICE
	− −	− 0	negativní působení produkcí toxinů	ANTAGONISMUS AMENSALISMUS
	+	0	B produkuje faktor stimulující růst A nebo odstraňuje inhibitory růstu	KOMENSALISMUS
	+	+	–"–	MUTUALISMUS
	−	+	B se živí A	DRAVEC-KOŘIST

2 průběžení závislosti $\mu = \mu(S)$:



rychleji rostoucí populace je v tomto případě určena ředicí rychlostí

tři možné případy:

i) v průsečíku růstových rychlostí $D_x = \mu_x$ a $S = S_x$; v tomto případě mohou být v ustáleném stavu udrženy obě populace, ale tento stav je nestabilní!!

ii) při $D > \mu_x$ je $\mu_A > \mu_B$ a populace A tedy převládne nad populací B, která bude vymyta

iii) při $D < \mu_x$ je $\mu_B > \mu_A$ a populace B převládne nad populací A, která bude vymyta

- VE VSÁDKOVÉM SYSTÉMU: koexistují obě populace; poměr jejich koncentrací je dán poměrem růstových rychlostí a počátečními koncentracemi

PŘÍMÉ INTERAKCE

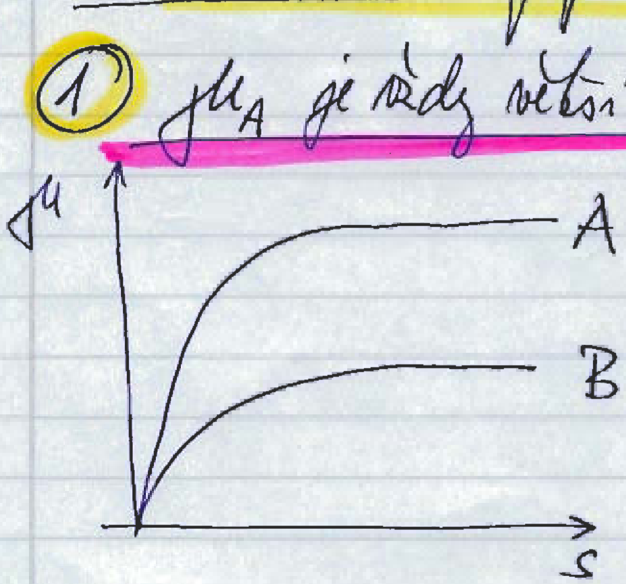
−	+	parazit (B) vstupuje do těla hostitele (A) a využívá jeho biomateriál / aktivity ve svůj prospěch	**PARASITISMUS**
+	+	(A) a (B) jsou ve fyzickém kontaktu	**SYMBIOSA**
−	−	kompetice o prostor	**VYTĚSŇOVÁNÍ**

KOMPETICE – negativní interakce mezi dvěma populacemi, která negativně ovlivňuje obě; všechny populace soutěží o stejný substrát

– výsledek kompetice dvou druhů o jeden substrát v otevřeném systému (např. chemostatu) je určen vztahem mezi specifickými růstovými rychlostmi, které jsou dány koncentrací limitujícího substrátu

– ex. dva odlišné případy:

(1) μ_A je vždy větší než μ_B:



organismus/populace s vyšší růstovou rychlostí vytěsní pomaleji rostoucí populace = vylučovací princip

NEUTRALISMUS: žádná z populací není ovlivněna žádnou z ostatních populací ≡ nemění se růstová rychlost jednotlivých populací. Jde o poměrně vzácný jev.

MUTUALISMUS: přítomnost jedné populace pozitivně ovlivňuje druhou a naopak. Např. vzájemnou výměnou substrátů nebo odstraňováním toxických metabolitů ⇒ metabolické mechanismy obou populací musí být komplementární. Jde o poměrně častý způsob koexistence dvou populací.

! mutualismus ≢ symbióza (symbióza předpokládá fyzický kontakt/spolužití obou organismů). Symbiotické vztahy mohou být mutualistické, neutralistické ...

KOMENSALISMUS: jedna populace je pozitivně ovlivňována přítomností druhé, ALE druhá není přítomností první ovlivněna:

(i) druhá populace produkuje živinu nebo růstový faktor vyžadovaný první populací,

(ii) druhá populace odstraňuje substanci, která je toxická pro první populaci.

AMENSALISMUS: (opak ke komensalismu): populace A je negativně ovlivňována přítomností populace B, ale populace B není ovlivňována populací A. Dva ~~...~~ časté mechanismy vzniku amensalistické interakce

(i) populace B produkuje toxickou substanci, která inhibuje růst populace A,

← nikoli substrát!

(ii) populace B spotřebovává esenciální živiny a tak ovlivňuje růst populace A

(např. produkce antibiotik plísněmi, která brzdí růst bakterií).

Různé typy interakcí mezi organismy/populace se často vyskytují současně ⇒ vysoká složitost chování smíšených populací:
- násobné stacionární stavy
- oscilace

⋮

Matematický popis: nutno zapsat bilanční rovnice pro každý organismus, růst limitující substrát a/nebo produkt → pak se hledají stacionární stavy nebo dynamický vývoj

Př. 1 Kompetice dvou populací o společný růst limitující substrát. Obě populace se řídí Monodovou kinetikou.

chemostat se sterilním nástřikem

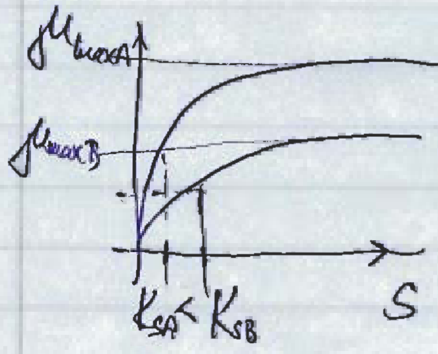
$$\begin{cases} \dfrac{dX_A}{dt} = -DX_A + \dfrac{\mu_{maxA} S}{K_{SA} + S} X_A \\[2ex] \dfrac{dX_B}{dt} = -DX_B + \dfrac{\mu_{maxB} S}{K_{SB} + S} X_B \\[2ex] \dfrac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \dfrac{1}{Y_{X_A/S}} \dfrac{\mu_{maxA} S X_A}{K_{SA} + S} - \dfrac{1}{Y_{X_B/S}} \dfrac{\mu_{maxB} S X_B}{K_{SB} + S} \end{cases}$$

pokud mají obě populace trvale koexistovat, musí platit

$$D = \frac{\mu_{maxA}\, S}{K_{SA} + S} = \frac{\mu_{maxB}\, S}{K_{SB} + S} \qquad (A)$$

a z toho lze určit S:

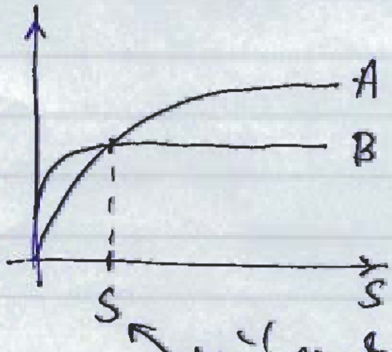
$$S = \frac{\mu_{maxB} K_{SA} - \mu_{maxA} K_{SB}}{\mu_{maxA} - \mu_{maxB}} \overset{!}{\geq} 0$$



$\Rightarrow$ $\mu_{maxA} > \mu_{maxB}$

$\mu_{maxA} K_{SB} > \mu_{maxB} K_{SA}$

$\Rightarrow$ stabilní koexistence není možná!! (protože $S < 0$!!!)



koexistence je možná „v průsečíku", ale je nestabilní

určí se z rovnice (A)

Př. 2 Mutualistická interakce v chemostatu.

A produkuje P_A jako vedlejší produkt vázaný na růst, a B produkuje P_B. Organismus B vyžaduje pro růst P_A. Vstupní proud obsahuje všechny esenciální živiny (kromě P_A a P_B) a A a B soutěží o substrát S přítomný ve vstupním proudu.

Model:

$$\frac{dX_A}{dt} = -DX_A + \mu_A X_A$$

$$\frac{dX_B}{dt} = -DX_B + \mu_B X_B$$

$$\frac{dP_A}{dt} = -DP_A + Y_{P_A}\mu_A X_A - \frac{1}{Y_{X_B/P_A}}\mu_B X_B$$

$$\frac{dP_B}{dt} = -DP_B + Y_{P_B}\mu_B X_B - \frac{1}{Y_{X_A/P_B}}\mu_A X_A$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{1}{Y_{X_A/S}}\mu_A X_A - \frac{1}{Y_{X_B/S}}\mu_B X_B$$

5 rovnic ⇒ obecná analýza je složitá!! Výsledek:
Existuje ust. stav → nestabilní (bez bilance S)
→ stabilní (s bilancí S)

Pr. 3 „DRAVEC – KOŘIST": růst prvoka a bakterie v chemostatu; bakterie představuje „substrát" pro prvoka; bakterie spotřebovává substrát ze vstupního proudu chemostatu.

S: $$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{1}{Y_{X_B/S}}\frac{\mu_{maxB} S}{K_{SB} + S} X_B$$

B (kořist – bakterie):

$$\frac{dX_B}{dt} = -DX_B + \frac{\mu_{maxB} S}{K_{SB} + S} X_B - \overbrace{\frac{1}{Y_{P/B}}\frac{\mu_{maxP} X_B X_P}{K_{SP} + X_B}}^{\text{spotřeba bakterií prvokem}}$$

P (dravec):

$$\frac{dX_P}{dt} = -DX_P + \frac{\mu_{maxP} X_B}{K_{SP} + X_B} X_P$$

např. Dictyostelium discoideum + E. coli   <u>OSCILACE</u>!

Dynamické chování modelu dravec (Dictyostelium) - kořist (Escherichia) (př. 3)