

***макростехиометрические  
характеристики процесса***

**• Важное значение имеют  
макростехиометрические  
характеристики биотехнологического  
процесса.**

**• Они выражают взаимосвязь между  
приростом биомассы, продукта и  
расходом субстрата.**

**выход по субстрату, или  
экономический коэффициент (или  
коэффициент выхода).**

- определяют, сравнивая количество  
выросшей за весь цикл ферментации  
биомассы  $X_K$  к количеству загруженного  
субстрата  $S_0$  :**

$$Y_{XS} = X_K / S_0$$

**•Выход по продукту метаболизма:**

$$Y_{ps} = P_k / S_0$$

**•Различия в обозначении коэффициентов делают с помощью индексов: по биомассе обозначают как  $Y_{xs}$ , по продукту — как  $Y_{ps}$ .**

## • ДОПОЛНЕНИЯ

- коэффициент  $Y_{xs}$  определен не совсем точно. В начале процесса уже существует некоторое количество биомассы, определяемое ее концентрацией  $X_0$ , так что прирост ее за время ферментации меньше, чем  $X_K$ , и равен  $(X_K - X_0)$ .
- В то же время не весь субстрат до конца расходуется за время процесса; какая-то часть его, определяемая конечной концентрацией  $S_K$ , останется, так что потребление субстрата будет не « $S_0$ », а  $(S_0 - S_K)$ .

## Экономические коэффициенты:

$$Y_{xs} = (X_k - X_0) / (S_0 - S_k) = \Delta X / \Delta S$$

[г. биомассы / г. субстрата]

- Аналогичным образом для продукта метаболизма:

$$Y_{ps} = (P_k - P_0) / (S_0 - S_k) = \Delta P / \Delta S$$

[г. продукта / г. субстрата]

*Метаболические, или трофические,  
коэффициенты:*

$$Y_{sx} = 1/Y_{xs} = (S_0 - S_k) / (X_k - X_0) = \Delta S / \Delta X$$

[г. субстрата / г. биомассы]

$$Y_{sp} = 1/Y_{ps} = (S_0 - S_k) / (P_k - P_0) = \Delta S / \Delta P$$

[г. субстрата / г. продукта]

**. В пределе можно рассматривать промежуток  $\Delta t$  сколь угодно малым — вплоть до бесконечно малого  $dt$ , и ему будут соответствовать сколь угодно малые приросты  $dX$ ,  $dP$  и  $dS$ .**

**. Так же можно получить мгновенные текущие коэффициенты (относительные стехиометрические коэффициенты):**

**.  $Y_{xs} = dX/dS$ ;  $Y_{ps} = dP/dS$ ;**

**.  $Y_{sx} = dS/dX$ ;  $Y_{sp} = dS/dP$ , а также**

**относительных -  $Y_{px} = dP/dX$ ;  $Y_{xp} = dX/dP$**



# **Стехиометрия процессов культивирования микроорганизмов**

## ***Основные принципы стехиометрии***

- Экономический, метаболический коэффициент выхода продукта по субстрату и биомассе — это в простейшем виде стехиометрические коэффициенты.**
- Они нужны для того, чтобы по одной из известных величин (например,  $\Delta S$ ), рассчитать и другие характеристики процесса (например,  $\Delta X$ ,  $\Delta P$ ).**

- Если в результате взаимодействия реагентов  $A$  и  $B$  получаются продукты  $C$  и  $D$  и выделяется тепло  $\Delta H$ ,
- с помощью стехиометрических коэффициентов  $v_A$ ,  $v_B$ ,  $v_C$ ,  $v_D$  и  $v_n$  получится стехиометрическое уравнение:



**.Стехиометрические коэффициенты подбирают таким образом, чтобы выразить фундаментальный закон природы — закон сохранения материи.**

**•Количество атомов любого элемента, входящего в вещества  $A$ ,  $B$ ,  $C$  и  $D$ , не должно изменяться в процессе превращения веществ.**

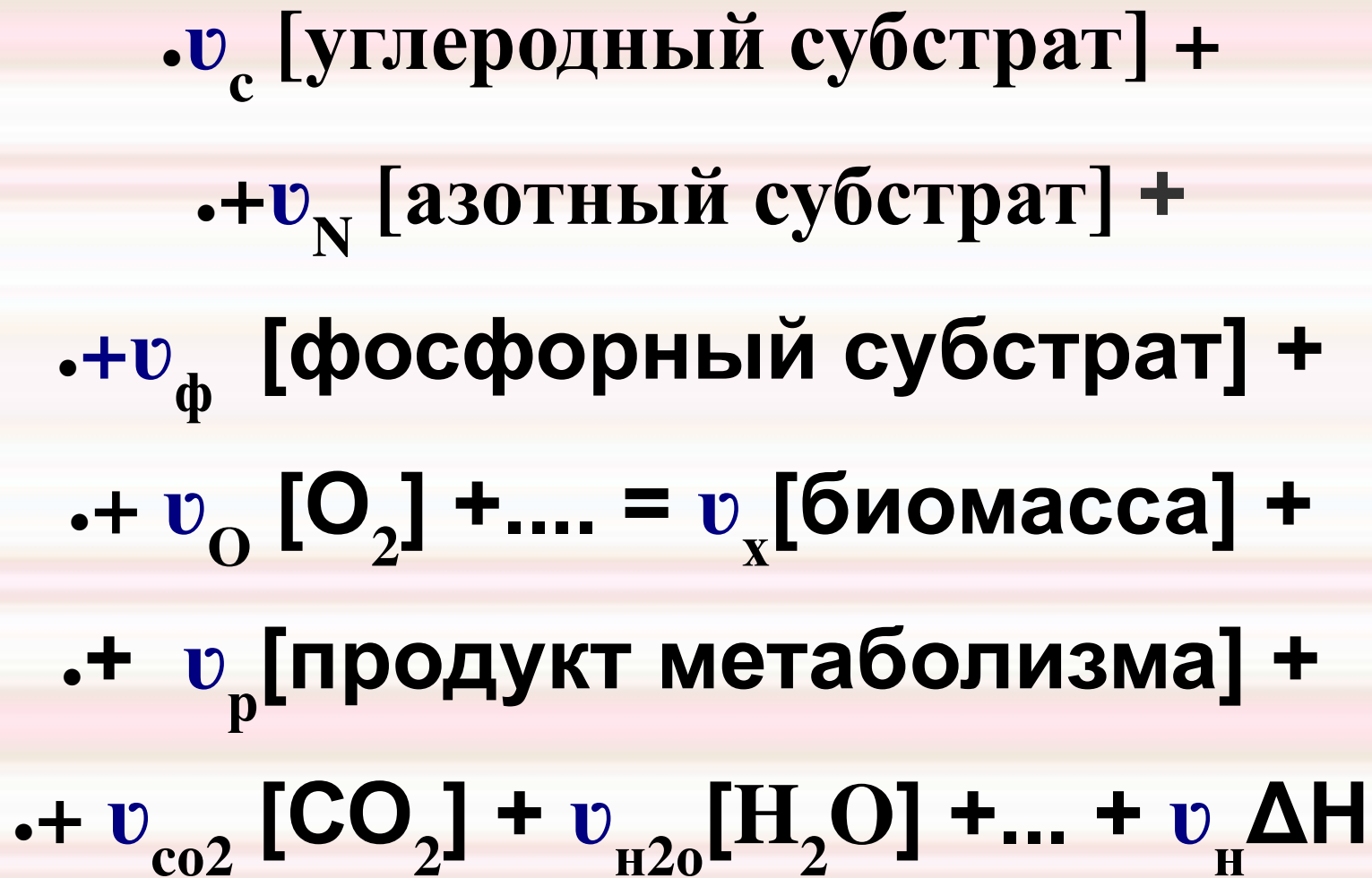
**• В биологии также действует закон сохранения материи.**

**• В ходе биологических превращений в клетке *перегруппировываются* атомы углерода, азота, фосфора, водорода, кислорода и других жизненно важных химических элементов.**

**• Но общее количество каждого из этих элементов, включенное в структуры клетки, в точности равно количеству, взятому клеткой из питательной среды.**

- **Процесс ферментации можно представить как систему, в которой происходит преобразование исходных реагентов (субстратов) в продукты (клетки и продукты метаболизма).**
- ◆ **В аэробных процессах в число субстратов входит кислород  $O_2$ , а в число продуктов — диоксид углерода  $CO_2$ .**
- ◆ **Другие субстраты и продукты в разных процессах различные, но стехиометрические соотношения между ними должны соблюдаться.**

# по аналогии со стехиометрией в микробиологическом процессе



# **ВЫВОД «ФОРМУЛЫ» БИОМАССЫ МИКРООРГАНИЗМОВ**

- биомасса, состоящая из множества индивидуальных веществ — белков, нуклеиновых кислот, липидов и так далее, многие из которых даже не идентифицированы.**
- Все эти вещества записывают целой совокупностью, «связкой».**



*.какой-то существующей в природе истинной «формулы» биомассы нет.*

**• нужен фиктивный, эмпирический вид «формулы» биомассы**

**• За основу принят элементный состав биомассы (высушенной).**

## *элементный состав микроорганизмов*

### Элементный состав, %

Род микроорганизмов	C	H	O	N	P	S	зола
Дрожжи	47	6,5	30	7,5	1,5	1	6,5
Бактерии	53	7	20	12	3	1	4
«Усредненные»	50	8	20	14	3	1	4

**•Как теперь из этого элементного состава получить «формулу» биомассы?**

**•Если принять сухую массу биомассы равной 100 г, то состав, выраженный в таблице в процентах, будет отражать массу соответствующего элемента в граммах.**

**•Разделив эту массу на атомную массу соответствующего элемента, получаем количество грамм-атомов в 100 г сухой биомассы.**

## Расчет числа грамм-атомов элементов в 100 г сухой биомассы

◆ тип м/о	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>O</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>S</u>
◆	12	1	16	14	31	32
◆ Дрожжи	3,92	6,5	1,88	0,54	0,05	0,03
◆ Бактерии	4,42	7,0	1,25	0,86	0,1	0,03
◆ «Усред-						
◆ ненный»	4,17	8,0	1,25	1,0	0,1	0,03

• в первом приближении «формулу»  
дрожжей можно записать как



**• чтобы придать видимость правдоподобия «формуле», ее умножают на какое-то очень большое число, чтобы все коэффициенты оказались целыми числами.**

**• Самое простое в данном случае — умножить на 100**

- **в стехиометрических расчетах обычно пренебрегают элементами, составляющими малую часть состава биомассы.**
- **В «формуле» отбрасывают фосфор и серу, а иногда и азот.**

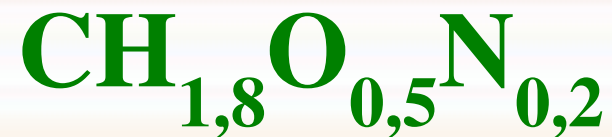
- **в стехиометрическом уравнении все члены можно умножить или разделить на одно и то же число.**
- **без ущерба для расчетов можно произвольно «принять» «молекулярную массу» для биомассы какой угодно с последующим пересчетом всех стехиометрических коэффициентов в уравнении.**



- **Удобно принимать такую «молекулярную массу», чтобы в ней оказался только один атом (грамм-атом) углерода.**
- **Для этого в ранее вычисленных «формулах» биомассы достаточно все индексы при атомах разделить на индекс при атоме углерода.**
- **Такой условный моль, приведенный к одному атому углерода, называют *C-моль*.**

- **дрожжи —  $\text{CH}_{1,66}\text{O}_{0,48}\text{N}_{0,14}$**
- **бактерии —  $\text{CH}_{1,58}\text{O}_{0,28}\text{N}_{0,19}$**
- **«усредненная» биомасса —  $\text{CH}_{1,92}\text{O}_{0,30}\text{N}_{0,24}$**

- для «усредненной» биомассы используется формула, предложенная Стоутхаммером для С-моля:



- Из-за простоты эту формулу применяют в расчетах.

## Расчет «молекулярной массы» С-моля:

$$M = 1 \cdot 12 + 1,8 \cdot 1 + 0,5 \cdot 16 + 0,2 \cdot 14 = 24,6$$

- по брутто-формуле биомассы, проводят стехиометрические расчеты, как в химических уравнениях.

## **РАСЧЕТ ВЫХОДА БИОМАССЫ НА УГЛЕРОДНЫЙ СУБСТРАТ**

- .наибольший интерес с учетом выхода составляет самый дорогой субстрат — углеродный.**
- в качестве углеродного субстрата могут использоваться разные вещества: глюкоза, крахмал, этанол, метанол, парафины нефти, метан и другие.**

- Эти вещества можно также пересчитать на С-моль (т.е. оставить в молекуле только один атом углерода).
- Например, для глюкозы с формулой  $C_6H_{12}O_6$  С-моль будет иметь формулу  $CH_2O$ ,
- для крахмала с формулой  $(C_6H_{12}O_6)_n$  - вид С-моля не изменится.

- **разные субстраты дают различный стехиометрический выход по биомассе.**
- **фактически измеренные данные выхода биомассы отличаются от теоретически рассчитанных: максимальный выход — на парафинах, минимальный — на углеводах.**
- **фактический выход «не дотягивает» до стехиометрического.**

- Чтобы объяснить эти расхождения, ввели понятие *«энергетический выход» биомассы.*
- - в каждом субстрате заключена энергия, которая зависит от степени восстановленности субстрата  $\gamma_s$ , которую легко определить, если известна формула вещества.
- При этом, как и в биомассе, учитывают основные элементы — углерод, водород, кислород и азот.
- Обобщенная формула субстрата —





**.Степень восстановленности зависит от числа так называемых «доступных электронов», или «редоксонов».**

**Принимают, что один атом углерода имеет 4 доступных электрона, один атом водорода - 1 доступный электрон.**

**Кислород доступных электронов не имеет, а наоборот, как бы забирает на себя 2 электрона, т.е. имеет отрицательное число (-2) доступных электронов.**

**То же и с азотом, который забирает 3 (-3) доступных электрона.**

**степень восстановленности субстрата**  
 **$C_m H_n O_p N_q$  рассчитывают по формуле:**

$$Y_s = 4m + n - 2p - 3q$$

**Оценка биомассы по степени  
восстановленности (обозначение  $\gamma_x$ )**

**Биомасса ( $\text{C}\text{H}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$ ):**

$$\gamma_x = 4 \times 1 + 1,8 - 2 \times 0,5 - 3 \times 0,2 = 4,2.$$

**для диоксида углерода  $\text{CO}_2$ , воды  $\text{H}_2\text{O}$  и  
аммиака  $\text{NH}_3$  степень восстановленности  $\gamma_s$   
= 0.**

- В.К. Ерошиным введено понятие *энергетический выход биомассы*, представляющий собой отношение энергии в субстрате к энергии, заключенной в биомассе:

$$\bullet \eta = Y_s / Y_x$$

- Величина  $\eta$  показывает, какое количество С-молей биомассы можно получить из одного С-моля субстрата исходя из соотношения энергий.

- ◆ метан  $\eta = 8,0/4,2 = 1,9$  С-моль биомассы/С-моль субстрата;
- ◆ гексан  $\eta = 6,3/4,2 = 1,5$
- ◆ метанол  $\eta = 6,0/4,2 = 1,43$ ;
- ◆ глюкоза  $\eta = 4,0/4,2 = 0,95$ ;
- ◆ этанол  $\eta = 6,0/4,2 = 1,43$ ;
- ◆ н-алканы  $\eta = 6,0/4,2 = 1,43$ ;
- ◆ щавелевая кислота  $\eta = 1,0/4,2 = 0,24$

- В формуле для  $\eta$  выход выражен в С-молях биомассы на С-моль субстрата. От него можно перейти и к обычному массовому выходу:

$$\bullet Y_{XS} = \eta M_x / M_s$$

- ◆ где  $M_x$  и  $M_s$  — молекулярные массы С-молей биомассы и субстрата соответственно.

- ◆ метан  $Y_{XS} = 1,9 \times 24,6/16 = 2,92$  г биомассы/ г субстрата;
- ◆ гексан  $Y_{XS} = 1,5 \times 24,6/14,3 = 1,72$
- ◆ метанол  $Y_{XS} = 1,43 \times 24,6/32 = 1,1$
- ◆ глюкоза  $Y_{XS} = 0,95 \times 24,6/30 = 0,78$
- ◆ этанол  $Y_{XS} = 1,43 \times 24,6/23 = 1,53$  г
- ◆ н-алканы  $Y_{XS} = 1,43 \times 24,6/14 = 2,51$

**• для глюкозы энергетический выход биомассы дает значения чуть ниже стехиометрического (0,78 против 0,82), но при этом отличие от фактического (0,5) все еще велико.**

**• Получается, что биомассы может быть даже больше, чем по стехио-метрическим расчетам, а это противоречит здравому смыслу.**

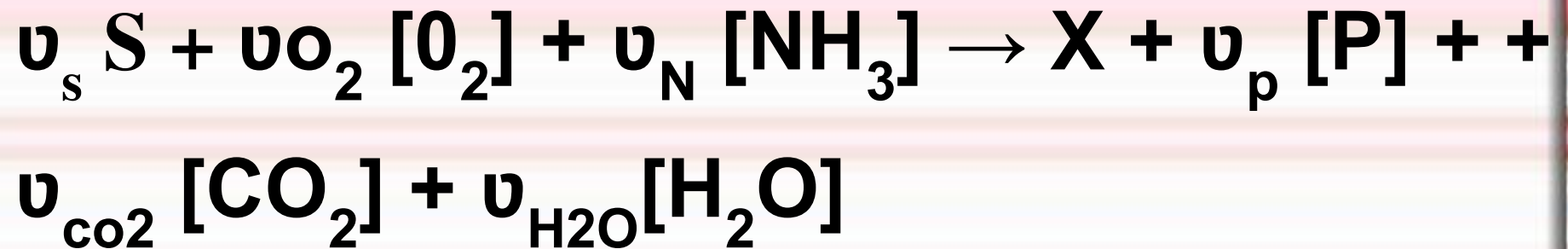
**• Ведь из одного атома углерода не может получиться два, как это предсказывает, например, энергетический выход по метану.**



# ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕХИОМЕТРИЧЕСКИХ СООТНОШЕНИЙ В РЕАЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ ФЕРМЕНТАЦИИ

- исходные предпосылки «энергетической» теории материального баланса неверны.
- Они не учитывают того, что в клетке одновременно протекают как бы два процесса.
- 1. *Кatabолизм.*
  2. *Анаболизм.*

**общее стехиометрическое соотношение для  
объединенного процесса:**

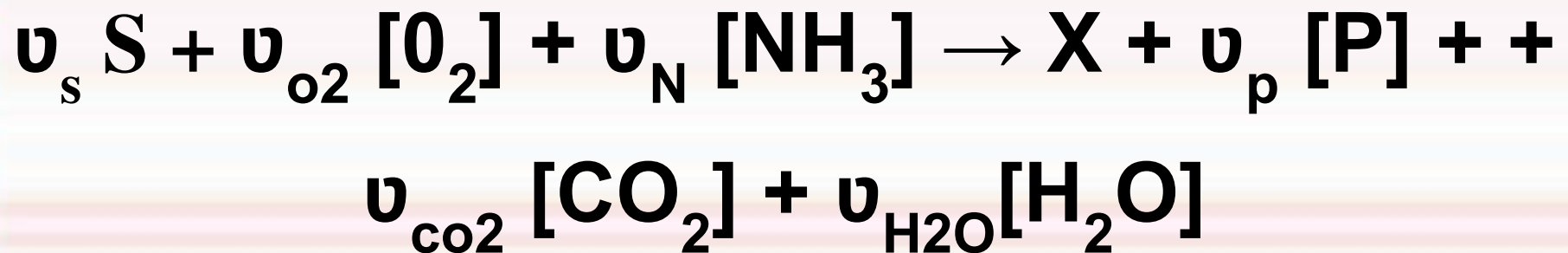


**•биомасса выражена в С-молях, а субстрат —  
в обычных молях.**

- Необходимо знать, количество израсходованного субстрата (в реальных мерах — граммы, килограммы и т. д.) и количество образовавшейся биомассы микроорганизмов или продукта метаболизма — соответственно  $G_s$ ,  $G_x$  и  $G_p$  (в пересчете на весь аппарат) или для периодического процесса приращения их концентраций — соответственно  $\Delta S$ ,  $\Delta X$  и  $\Delta P$ .

**• Разделив эти величины на молекулярные массы соответственно субстрата, биомассы или продукта, получаем для этих веществ количества  $g$  молей (или  $kg \cdot moles$ ), которые и являются основой для последующих стехиометрических расчетов.**

- Первый из этих расчетов — приведение всех количеств к одному С-молю биомассы.
- обычно находят такие стехиометрические коэффициенты, которые дают стехиометрический коэффициент при биомассе, выраженной в С-молях, равным 1,



- Таким образом сразу находим  $\nu_s$  и  $\nu_p$
- Для определения коэффициентов по другим веществам ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$  и  $H_2O$ ) необходимо **составить и решить систему уравнений элементного баланса**
- каждое вещество (субстрат, биомасса, продукт, вода, кислород, диоксид углерода) может быть описано общей элементной формулой  $C_m H_n O_p N_q$ .

- При этом индексы в формуле субстрата обозначим как  $t_s, n_s, p_s, q_s$
- в формуле продукта — соответственно  $t_p, n_p, p_p, q_p$
- Для биомассы соответствующие индексы  $t_x = 1, n_x = 1,8, P_x = 0,5, q_x = 0,2$ .

уравнение баланса по углероду:

$$v_S m_S = 1 + v_P m_P + v_{CO_2}$$

То же для *водорода*:

$$v_S n_S + v_{NH_3} \cdot 3 = 1,8 + v_P n_P + v_{H_2O} \cdot 2$$



**.Уравнение баланса по кислороду:**

$$\mathbf{v_s p_s + v_{O_2} \cdot 2 = 0,5 + v_p P_p + v_{CO_2} \cdot 2 + v_{H_2O} \cdot 1}$$

**.Уравнение баланса по азоту:**

$$\mathbf{\cdot v_s q_s + v_{NH_3} = 0,2 + v_p q_p}$$

**.Решение системы уравнений позволит найти все стехиометрические коэффициенты для данного процесса ферментации.**

- Для примера рассмотрим конкретный процесс производства лимонной кислоты.**
- Известно, что в процессе ферментации на 1 кг потребленной сахарозы получается 0,6 кг лимонной кислоты и 0,3 кг сухой биомассы. Рассчитайте стехиометрические коэффициенты уравнения**

• **Переведем все величины в г моли соответствующих веществ**

• **Молекулярная масса (г/моль): сахарозы ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) равна 342, лимонной кислоты ( $C_6H_8O_7$ ) — 192, С-моль биомассы — 24,6.**

**Отсюда в молях:**

$$1000/342 [C_{12}H_{22}O_{11}] \rightarrow 300 /24,6 [X] +$$

$$+ 600 /192 [C_6H_8O_7]$$

$$2,92[C_{12}H_{22}O_{11}] \rightarrow 12,20 [X] + 3,13 [C_6H_8O_7].$$

- Пересчитаем все стехиометрические коэффициенты на С-моль биомассы, т.е. разделим обе части равенства на 12,2.



для полного уравнения есть:

$$\nu_s = 0,24 \text{ и } \nu_p = 0,26.$$

Для нахождения оставшихся коэффициентов записываем систему уравнений элементарного баланса для данного процесса

При этом для субстрата (сахарозы) значения индексов:

$$m_s = 12, \quad n_s = 22, \quad p_s = 11, \quad q_s = 0$$

Для продукта (лимонной кислоты):

$$m_p = 6, \quad n_p = 8, \quad p_p = 7, \quad q_p = 0.$$

Баланс по углероду:  $v_s m_s = 1 + v_p m_p + v_{CO_2}$

$$0,24 \cdot 12 = 1 + 0,26 \cdot 6 + v_{CO_2},$$

$$v_{CO_2} = 0,32.$$

**.Баланс по водороду:  $\nu_S n_S + \nu_{\text{NH}_3} \cdot 3 =$**   
 **$1,8 + \nu_p n_p + \nu_{\text{H}_2\text{O}} \cdot 2$**

**$0,24 \cdot 22 + \nu_{\text{NH}_3} \cdot 3 = 1,8 + 0,26 \cdot 8 + 2 \cdot$**

**$\nu_{\text{H}_2\text{O}},$**

**ИЛИ**

**$2\nu_{\text{H}_2\text{O}} - 3\nu_{\text{NH}_3} = 1,4.$**

**.Баланс по кислороду:  $\nu_{S}P_S + \nu_{O_2} \cdot 2 = 0,5$**   
**+  $\nu_{P_p}P_p + \nu_{CO_2} \cdot 2 + \nu_{H_2O}$**

**$0,24 \cdot 11 + 2 \nu_{O_2} = 0,5 + 7 \cdot 0,26 + 2 \cdot$**   
 **$0,32 + \nu_{H_2O},$**

**ИЛИ**

**$2 \nu_{O_2} - \nu_{H_2O} = 0,32$**

.Баланс по азоту:  $\nu_s q_s + \nu_{NH_3} = 0,2 + \nu_p q_p$

$$.0 + \nu_{NH_3} = 0,2 + 0$$

• откуда  $\nu_{NH_3} = 0,2$

$$\text{из } 2 \nu_{H_2O} - 3 \nu_{NH_3} = 1,4,$$
$$\nu_{H_2O} = 1,0$$

$$\text{из } 2 \nu_{O_2} - \nu_{H_2O} = 0,32;$$
$$\nu_{O_2} = 0,66$$



◆ **стехиометрическое уравнение для данного процесса можно записать следующим образом:**

