

***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 Δt 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, ΔS), рассчитать и другие характеристики процесса (например, ΔX , ΔP).**

- Если в результате взаимодействия реагентов A и B получаются продукты C и D и выделяется тепло ΔH ,
- 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.

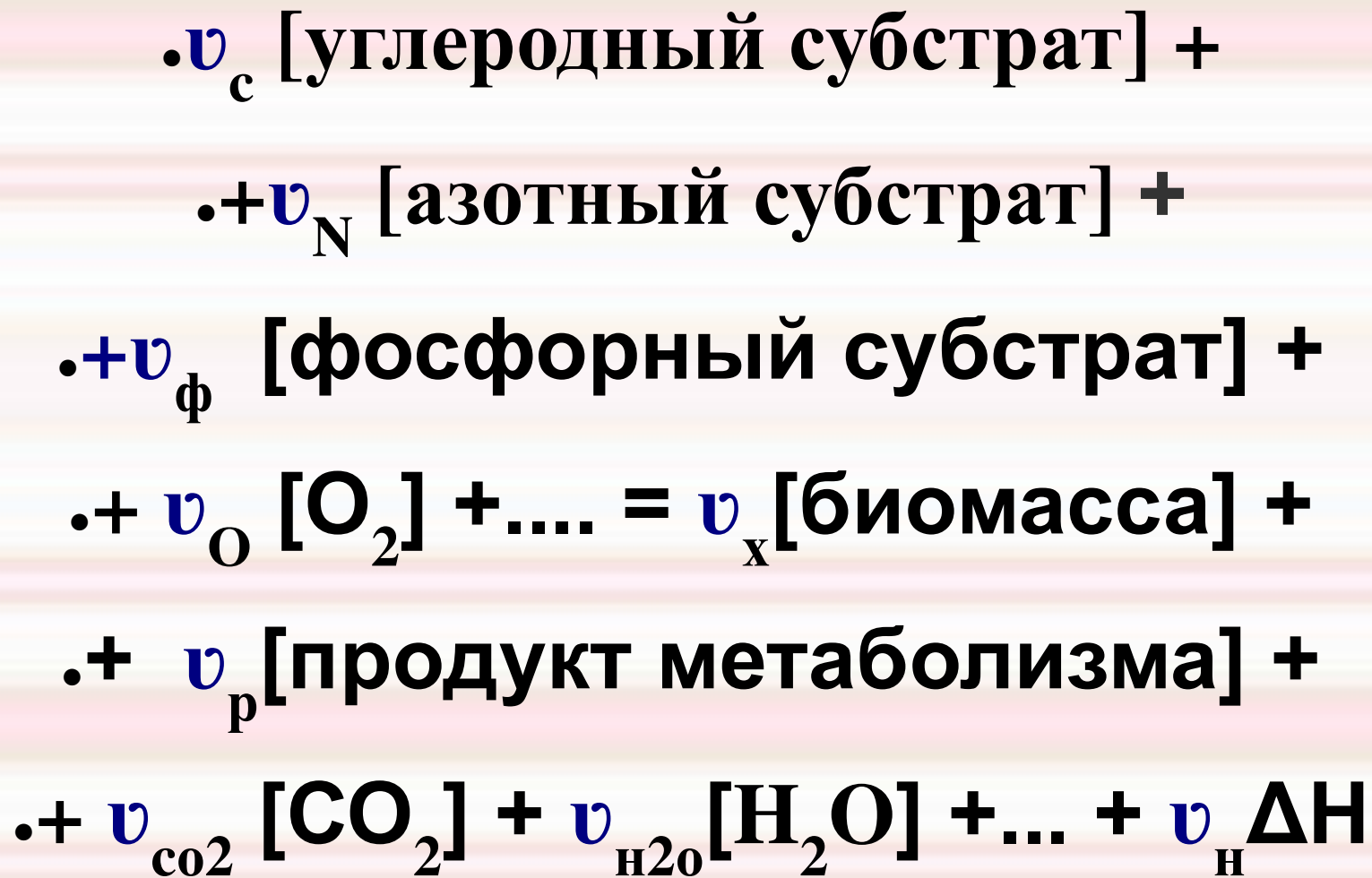
• В биологии также действует закон сохранения материи.

• 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	$\frac{C}{12}$	$\frac{H}{1}$	$\frac{O}{16}$	$\frac{N}{14}$	$\frac{P}{31}$	$\frac{S}{32}$
◆ 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- неный»	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

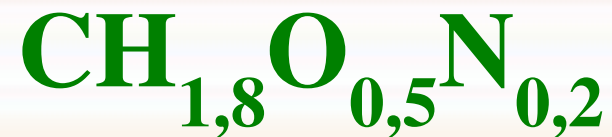
- **в стехиометрических расчетах обычно пренебрегают элементами, составляющими малую часть состава биомассы.**
- **В «формуле» отбрасывают фосфор и серу, а иногда и азот.**

- **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 γ_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 γ_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 CO_2 , воды H_2O и
аммиака NH_3 степень восстановленности γ_s
= 0.**

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

$$\cdot \eta = Y_s / Y_x$$

- Величина η 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 η 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.

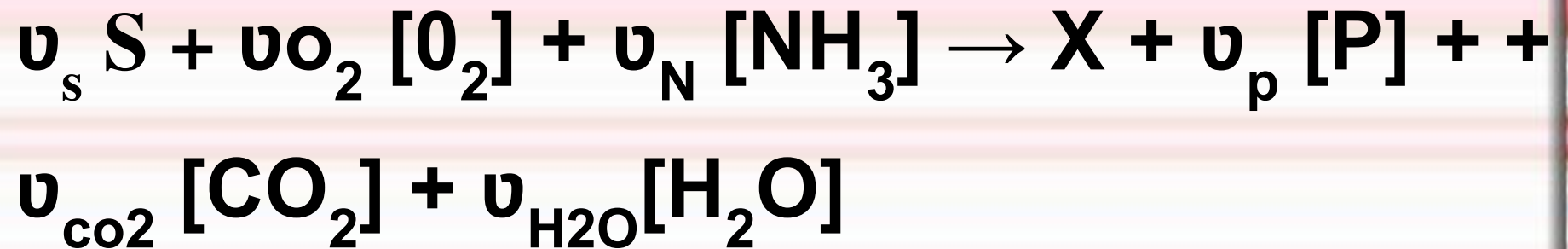
• Получается, что биомассы может быть даже больше, чем по стехио-метрическим расчетам, а это противоречит здравому смыслу.

• 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:**

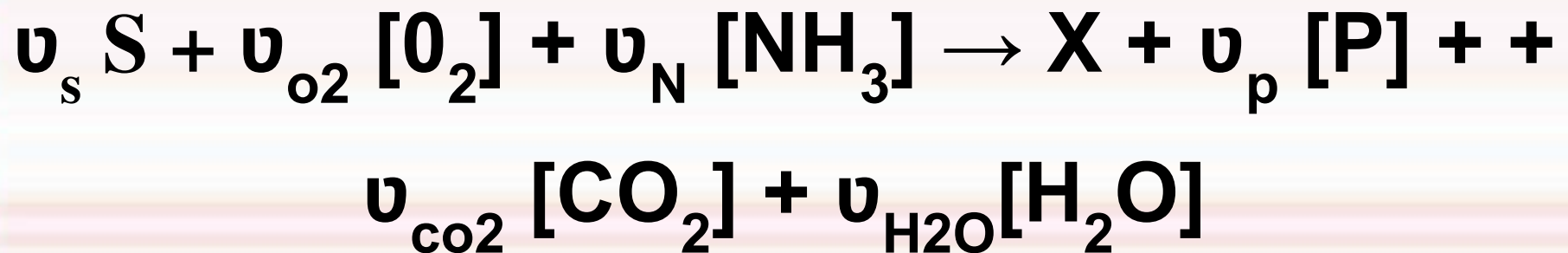


**•биомасса выражена в С-молях, а субстрат —
в обычных молях.**

- 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 ΔS , ΔX и ΔP .

• 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 ν_s и ν_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:**

