

Priručnik za računske vježbe iz Biokemijskog inženjerstva

Rezić, Tonči

Authored book / Autorska knjiga

Publication status / Verzija rada: **Published version / Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Publication year / Godina izdavanja: **2023**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:050674>

Download date / Datum preuzimanja: **2023-11-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Priručnik za računske vježbe iz Biokemijskog inženjerstva



prof. dr. sc. Tonči Rezić

PRIRUČNICI SVEUČILIŠTA U ZAGREBU PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKOG
FAKULTETA

Manualia Universitatis studiorum Zagrebensis

PRIRUČNIK ZA RAČUNSKE VJEŽBE IZ BIOKEMIJSKOG INŽENJERSTVA

prof. dr. sc. Tonči Rezić



Zagreb, 2023.



prehrambeno
biotehnološki
fakultet

Sveučilište
u Zagrebu

Izdavač Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Pierottijeva 6, Zagreb

Za izdavača Jelena Viličić, dipl. bibl.

Autori prof. dr. sc. Tonči Rezić

Lektor: Jelena Crnek, prof. hrvatskog jezika i književnosti

Recenzenti: prof. dr. sc. Sandra Svilović
prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Vrsta djela Priručnik

Objavlivanje je odobrio *Senat* Sveučilišta u Zagrebu na 10. redovitoj sjednici održanoj 18. srpnja 2023.

Vrsta građe e-knjiga

Licencije Slobodan pristup. Sva prava pridržana.

Virtualna zbirka

Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Biotehničko područje

Manualia Universitatis studiorum Zagrabienensis

ISBN: 978-953-689-320-1

Sinu, najboljem prijatelju

Dragi biotecnolozi,

Priručnik koji se nalazi pred Vama namijenjen je studentima treće godine preddiplomskog studija Biotehnologije, Prehrambeno-biotecnološkog fakulteta (PBF-a), Sveučilišta u Zagrebu. Priručnik je nastao tijekom dvadesettrogodišnjega nastavnog i znanstveno-istraživačkog rada dr. sc. Tončija Rezića, redovitog profesora Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada (Laboratorij za BI, IM i TSP); Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, PBF, Sveučilišta u Zagrebu. Priručnik je napisan s namjerom da pripremi studente za uspješno polaganje ispita iz predmeta Biokemijsko inženjerstvo i Biotehnologija 3 na trećoj godini preddiplomskog studija Biotehnologije PBF-a. Također, on će studentima omogućiti uspješno razumijevanje biotecnoloških procesa i operacija tijekom proizvodnje mikrobnog biomase i proizvoda primarnog i sekundarnog metabolizma. U konačnici, njegovom će primjenom studenti uspješno povezati znanja usvojena na predmetima preddiplomskog studija Biotehnologije, a kao pripremu studenta za nastavak studija na diplomskom studiju Bioprocenog inženjerstva.

Primjeri riješenih zadataka koje ovaj Priručnik nudi obuhvaćaju sljedeće cjeline: Šaržni uzgoj i kinetika mikrobnih procesa; Kontinuirani uzgoj; Šaržni uzgoj s pritokom supstrata te procjena uspješnosti mikrobnih procesa.

Svaka od navedenih cjelina započinje s teorijskim uvodom u kojem su opisani osnovni pojmovi i jednadžbe koje se koriste u primjerima riješenih računskih zadataka. Jednadžbe su izvedene na temelju shematskih prikaza *fizičke slike*: šaržnog, kontinuiranog i šaržnog procesa s pritokom supstrata, a u računskim zadacima ove jednadžbe su primijenjene da bi se na temelju rezultata uspješno postavili navedeni procesi. Nadalje, prikazan je izvod za računanje brzine razrjeđenja kod koje se ostvaruje maksimalna produktivnost tijekom provođenja kontinuiranih procesa, a kao primjer optimiranja biotecnoloških procesa.

U prilogima je prikazan primjer procjene kinetičkih parametara korištenjem programskog paketa *Wolfram Mathematica* (Mathematica 2013) i rezultata laboratorijskih vježbi iz predmeta Biokemijsko inženjerstvo. Procjena kinetičkih parametara obuhvaća: prikaz eksperimentalnih podataka i regresijski model za kisik, biomasu, supstrat (glukozu), proizvod (mliječnu kiselinu) i aktivnost enzima, kinetički modeli za rast biomase mikrobnih stanica, nastajanje proizvoda, potrošnju supstrata i proizvodnju enzima te procjena kinetičkih parametara istih.

I na kraju, želim se zahvaliti svim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada koji su pomogli u

izradi ovog Priručnika. Također, koristim priliku i pozivam sve biotehnologe koji su koristili, ili koji će koristiti Priručnik, da daju sugestije, ideje i primjedbe koje će nam, na obostranu korist, pomoći u daljnjem oblikovanju predmetnog sadržaja u koristan i zanimljiv nastavni materijal.

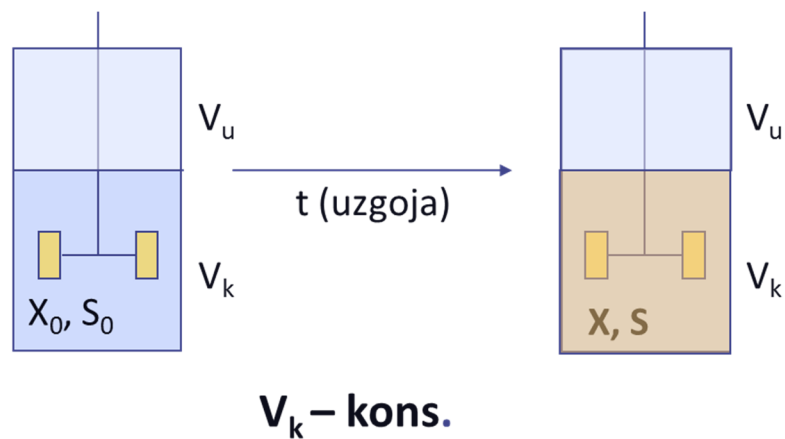
Zagreb 05. 02. 2022.

prof. dr. sc. Tonči Rezić

Sadržaj

1. Uzgoj mikroorganizama u bioreaktoru s miješalom	1
2. Kinetika rasta mikroorganizama	2
3. Krivulja rasta mikroorganizama i potrošnje supstrata tijekom šaržnog procesa.....	7
3.1. Monodov model mikrobnog rasta	8
4. Ocjena uspješnosti mikrobnih procesa.....	9
4.1. Prinos produkta.....	9
4.2. Koeficijent ili stupanj konverzije osnovnog supstrata	10
4.3. Produktivnost.....	10
4.4. Efikasnost.....	12
5. Kontinuirani uzgoj mikroorganizama.....	24
5.1. Bilanca tvari u kemostatu	25
5.1.1. Bilanca biomase	25
5.1.2. Bilanca supstrata.....	26
5.2. Produktivnost prilikom kontinuiranog uzgoja.....	27
5.2.1. Izračunavanje maksimalne produktivnosti	28
6. Šaržni procesi s pritokom supstrata (fed batch)	36
6.1. Krivulja rasta mikroorganizama tijekom šaržnog procesa s pritokom supstrata	37
7. Popis literature	47
P R I L O G.....	48

1. Uzgoj mikroorganizama u bioreaktoru s miješalom



Slika 1. Shematski prikaz promjena koncentracije mikrobnih stanica i supstrata u bioreaktoru s miješalom.

X_0 - koncentracija stanica na početku uzgoja (kg m^{-3})

X - koncentracija stanica na u vremenu t (kg m^{-3})

S_0 - koncentracija supstrata na početku uzgoja (kg m^{-3})

S - koncentracija supstrata na kraju uzgoja (kg m^{-3})

V_u - ukupni volumen bioreaktora (m^3)

V_k - korisni volumen bioreaktora (m^3)

Napomena: svaki uzgoj mikroorganizma započinje inokulacijom hranjive podloge s odgovarajućom masom inokuluma (brojem aktivnim mikrobnih stanica).

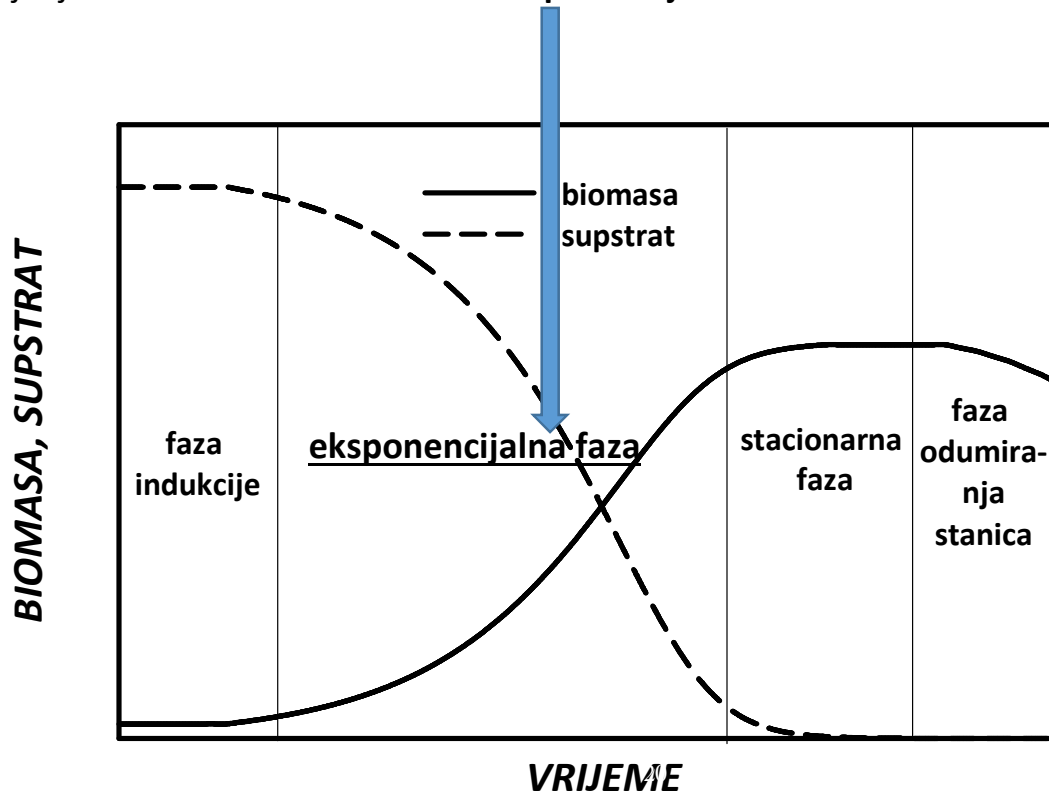
Promjena koncentracija stanica i produkta odvija se određenom brzinom koju opisuje **kinetika mikrobnih procesa** (Moser 1985; Liu 2020) a sastoji se od kinetike:

- rasta (umnožavanje) mikroorganizama
- potrošnje hranjivog supstrata (limitirajućeg supstrata; najčešće izvor ugljika)
- nastajanje produkta metabolizma u toku rasta stanica ili njihovog mirovanja.

2. Kinetika rasta mikroorganizama

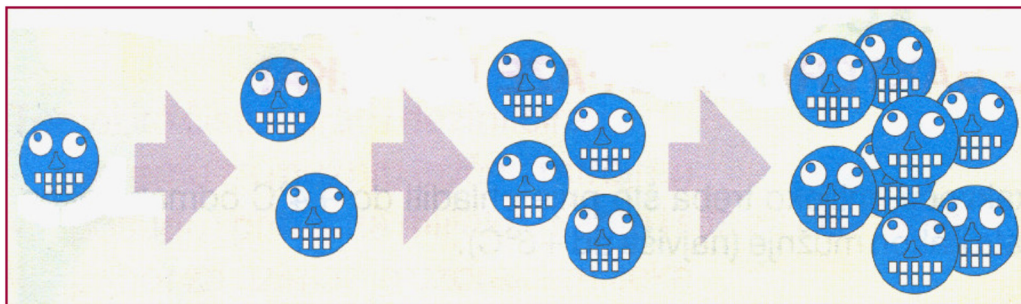
Brzina rasta mikro organizama ovisi o generacijskom vremenu.

Generacijsko vrijeme – vrijeme potrebno da se broj stanica udvostruči (ukoliko se ne mijenja s vremenom stanica raste **eksponencijalnom brzinom**).



Slika 2. Krivulja rasta jednostaničnih mikroorganizama (Marić i Šantek 2009).

Specifična brzina rasta se izvodi na osnovu razmatranja povećanja broja stanica u eksponencijalnoj fazi.



Slika 3. Karikaturni prikaz udvostručavanja broja mikrobnih stanica tijekom eksponencijalne faze rasta.

$$N \xrightarrow{t_g} 2N \xrightarrow{t_g} 4N \xrightarrow{t_g} 8N \xrightarrow{t_g} 16N \xrightarrow{t_g} 32N \dots$$

$$2^0 N \xrightarrow{t_g} 2^1 N \xrightarrow{t_g} 2^2 N \xrightarrow{t_g} 2^3 N \xrightarrow{t_g} 2^4 N \xrightarrow{t_g} \dots 2^n N$$

n - broj dioba

$$n = \frac{t}{t_g} = \frac{\text{vrijeme}}{\text{generacijsko vrijeme}}$$

$$N_t = N_0 \cdot 2^n = N_0 \cdot 2^{t/t_g} \implies \frac{N_t}{N_0} = 2^{t/t_g} \implies \ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = \ln 2 \cdot \frac{t}{t_g} \implies \ln N_t = \frac{0,639}{t_g} \cdot t + \ln N_0$$

μ - specific cell growth rate

$$\ln N_t = \mu \cdot t + \ln N_0$$

Specifična brzina rasta je stalni parametar rasta svakog mikroorganizma na podlozi stalnog sastava i pod konstantnim uvjetima. Njezina vrijednost ovisi o nasljednim svojstvima mikroorganizma, sastavu hranjive podloge i početnoj koncentraciji mikroorganizama u podlozi (Doran 1995).

Masa mikrobnih stanica se u pravilu lakše određuje nego broj stanica

$$\ln X_t = \mu \cdot t + \ln X_0$$

Eksponencijalna brzina rasta mikroorganizama:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{ili} \quad \frac{dN}{dt} = \mu_n \cdot N$$

X - koncentracija stanica

N – broj stanica

μ - specifična brzina rasta na bazi mase stanice

μ_n - specifična brzina rasta na bazi broja stanica

U eksponencijalnoj fazi broj stanica se udvostručuje konstantnom brzinom!

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

$\frac{dm_x}{dt} = \mu m_x$

$\frac{dN}{dt} = \mu N$

integracija \int_0^t ; antilog.

$X = X_0 e^{\mu t}$

$m_x = m_{x,0} e^{\mu t}$

$N = N_0 e^{\mu t}$

Primjer 1: Generacijsko vrijeme bakterije iznosi 20 minuta. Ukoliko se uzgoj započne s jednom stanicom, koliko će stanica nastati nakon 48 sati i kolika bi to bila masa stanica, ako 10^{14} stanica teži 1 gram?

$t_g = 20 \text{ min}$ $N_0 = 1$ $t = 48 \text{ h}$	\Rightarrow	$m_{\text{stanica}} = ?$
-----------------------------------------------------------	---------------	--------------------------

$$N = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_g} = \frac{0,6932}{20 \text{ min}} \cdot \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ h}} = 2,079 \text{ h}^{-1}$$

$$N = 1 \cdot e^{2,071 \text{ h}^{-1} \cdot 48 \text{ h}} = 2,23 \cdot 10^{43} \text{ stanica}$$

$$m_{\text{stanica}} = \frac{N}{10^{14} \text{ g}^{-1}} = 2,23 \cdot 10^{29} \text{ g} = \underline{2,23 \cdot 10^{23} \text{ tona}}$$

Primjer 2: U podlogu je inokulirano 10^6 stanica po mL. Ako je generacijsko vrijeme 20 minuta, za koliko će vremena koncentracija stanica porasti na 10^{10} stanica po mL?

$t_g = 20 \text{ min} = 0,3 \text{ h}$
$N_0 = 10^6 \text{ mL}^{-1}$
$N_t = 10^{10} \text{ mL}^{-1}$

→

$t = ?$

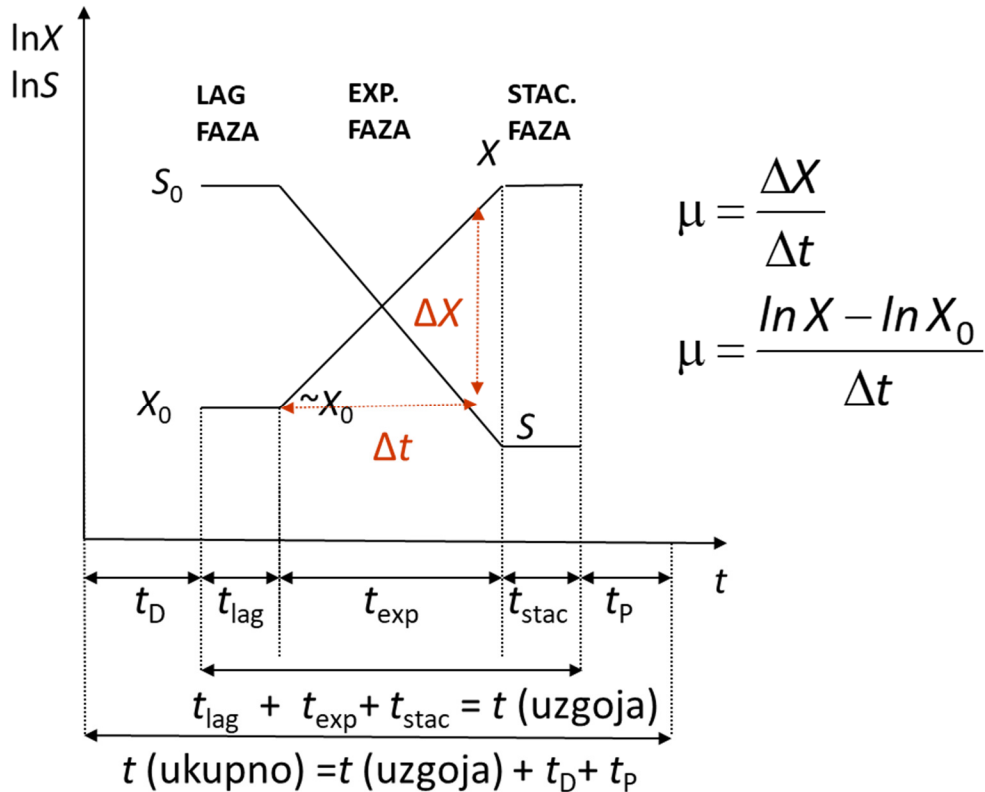
$$N = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_g} = \frac{0,6932}{0,3 \text{ h}} = 2,079 \text{ h}^{-1}$$

$$\frac{N}{N_0} = e^{\mu \cdot t} \quad / \ln \rightarrow \ln \frac{N}{N_0} = \mu \cdot t$$

$$t = \frac{\ln N / N_0}{\mu} = \frac{\ln (10^{10} / 10^6)}{2,079 \text{ h}^{-1}} = \underline{4,430 \text{ h}}$$

3. Krivulja rasta mikroorganizama i potrošnje supstrata tijekom šaržnog procesa



Slika 4. Ukupno vrijeme trajanja šaržnog procesa i krivulja rasta – ovisnost logaritma promjene koncentracije stanica o vremenu tijekom eksponencijalne faze.

Napomena: mjerenjem vremena trajanja eksponencijalne faze i promjene koncentracije stanica može se izračunati specifična brzina rasta mikroorganizma tijekom šaržnog procesa (Bailey i Olis 1986).

Vrijeme trajanja:

t_D – punjenje, sterilizacija, hlađenje

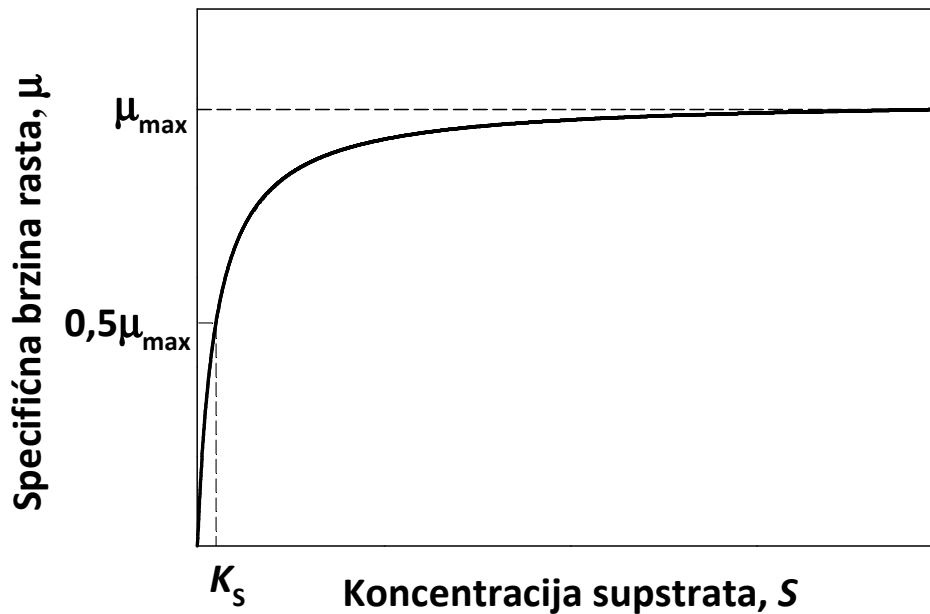
t_{lag} – faza prilagodbe (lag faza)

t_{exp} – eksponencijalna faza

t_{stac} – stacionarna faza

t_p – pražnjenje

3.1. Monodov model mikrobnog rasta



Slika 5. Monodov model mikrobnog rasta (Monod 1949; Marić i sur. 1991) - ovisnost specifične brzine rasta i koncentracije limitirajućeg supstrata (najčešće izvor C).

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

μ_{\max} – maksimalna specifična brzina rasta

S – koncentracija supstrata

K_s – konstanta zasićenja jednaka koncentraciji supstrata kada je $\mu = 0,5 \mu_{\max}$

4. Ocjena uspješnosti mikrobnih procesa

Uspješnost mikrobnih procesa i njihovo međusobno uspoređivanje u cilju tehnološkog i ekonomskog vrednovanje, može se procijeniti na osnovu slijedećih pokazatelja (Shuler 2002, Marić i Šantek 2009):

1. Prinos ili koeficijent prinosa
2. Koeficijent ili stupanj konverzije osnovnog supstrata (C-izvora) u produkt
3. Produktivnost ili volumna brzina nastajanja produkta
4. Efikasnost

4.1. Prinos produkta

Količina (masa) produkta dobivena u jedinici volumena hranjive podloge nakon završenog mikrobnog procesa, odnosno prije procesa separacije produkta.

Produkti:

1. Prinos mikrobna biomasa - Y_x – definira se kao masa mokre ili suhe tvari mikrobnih stanica na 1 dm^3 ili m^3 podloge; prirasle biomase:

$$Y_x = X - X_0$$

2. Prinos mikrobnih metabolita (produkti) - (Y_p) – definira se prema vrsti metabolita, a uobičajeno je izražavanje:

a) volumni ili težinski udio čiste supstance u komini izražen u postocima (npr. $w_p = 10 \text{ \% vol/vol}$ za proizvodnju etanola; $w_p = 9 \text{ \% tež/vol}$ za proizvodnju octene kiseline)

b) masena ili množinska koncentracija (P)

$$Y_p = P - P_0$$

P_0 – koncentracija produkta na početku uzgoja

P – koncentracija produkta na kraju uzgoja

- c) specifična aktivnost metabolita u jedinici volumena podloge – koristi se u proizvodnji enzima

4.2. Koeficijent ili stupanj konverzije osnovnog supstrata

Konverzija supstrata u biomasu

$Y_{X/S}$ – stupanj konverzije supstrata u biomasu - Masa biomase koja je proizvedena po jedinici mase osnovnog supstrata (C-izvora)

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

Konverzija supstrata u produkte metabolizma

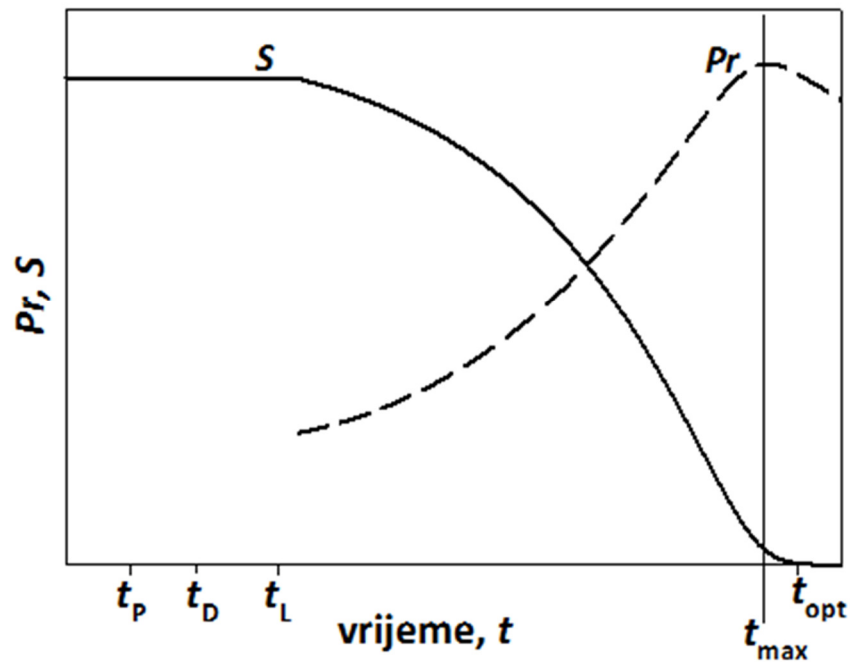
$Y_{P/S}$ – stupanj konverzije supstrata u produkt - Masa produkta koja je proizvedena po jedinici mase osnovnog supstrata (C-izvora)

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} = \frac{Y_P}{S_0 - S}$$

4.3. Produktivnost

Pr - opisuje brzinu sinteze produkta ili potrebu za sirovinama po jedinici radnog volumena reaktora

$$Pr = \frac{\text{Prinos}(c_x \text{ ili } c_p)}{\text{trajanje procesa}}$$



Slika 6. Promjena produktivnosti u ovisnosti o promjeni koncentracije supstrata tijekom šaržnog procesa (Marić i sur. 1991).

U vrijeme trajanja procesa je uključeno: čišćenje, punjenje, sterilizacija reaktora, inokulacija, vrijeme trajanja mikrobnog procesa u reaktoru i pražnjene reaktora.

$$t = \frac{1}{\mu_m} \cdot \ln \frac{X}{X_0} + t_p + t_L + t_D$$

t_p – pražnjenje i pranje bioreaktora

t_D – punjenje, sterilizacija, hlađenje

t_L – trajanje faze prilagodbe

$$Pr = \frac{X}{\frac{1}{\mu_m} \cdot \ln \frac{X}{X_0} + t_p + t_L + t_D}$$

Produktivnost šaržnog procesa raste sa skraćivanjem ukupnog trajanja procesa (Marić i sur. 1991).

Industrijski mikrobní procesi se zbog ekonomičnosti (potpunog iskorištenja supstrata) obično ne vode uz maksimalnu nego neku optimalnu produktivnost (potpuna potrošnja supstrata).

4.4. Efikasnost

E - omjer dobivene i teoretski moguće mase biomase/produkta.

$$E = \frac{Y_{X/S, \text{dobivena}}}{Y_{X/S, \text{teoretska}}}$$

$$E = \frac{Y_X}{Y_{X, \text{teoretska}}}$$

Primjer 3: 80 m³ medija koji sadrži 20 g/L glukoze steriliziran je u reaktoru. U reaktor je inokulirano 40 kg kvasca koji u optimalnim uvjetima raste maksimalnom specifičnom brzinom rasta od 0,45 h⁻¹. Na kraju uzgoja koncentracija biomase bila je 9,5 g/L, a koncentracija šećera 1,5 g/L. Treba izračunati:

- proizvedenu biomasu
- koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu
- učinkovitost procesa ako se teoretski iz 1 kg glukoze može dobiti 0,51 kg kvasca
- produktivnost procesa ako punjenje reaktora i sterilizacija traje 2 h, pražnjenje i pranje 1,5 h, eksponencijalna faza rasta traje 8 h, a faza prilagodbe je zanemariva
- kolika bi bila najveća moguća koncentracija proizvedenog kvasca i kolika bi bila koncentracija biomase na kraju uzgoja?

a) *Početna koncentracija stanica:*

$$X_0 = \frac{m_0}{V} = \frac{40 \text{ kg}}{80 \text{ m}^3} = 0,5 \text{ kg/m}^3$$

Proizvedena biomasa:

$$Y_X = X - X_0 = 9,5 \text{ kg/m}^3 - 0,5 \text{ kg/m}^3 = \underline{9 \text{ kg/m}^3}$$

b) *Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu:*

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} = \frac{9,5 \text{ kg/m}^3 - 0,5 \text{ kg/m}^3}{20 \text{ kg/m}^3 - 1,5 \text{ kg/m}^3} = \underline{0,49 \text{ kg/kg}}$$

c) *Efikasnost procesa:*

$$E = \frac{Y_{X/S, \text{ stvarni}}}{Y_{X/S, \text{ teoretski}}} = \frac{0,49 \text{ kg/kg}}{0,51 \text{ kg/kg}} = \underline{0,96}$$

ili

$$\begin{aligned} Y_{X, \text{ teoretski}} &= Y_{X/S, \text{ teoretski}} (S_0 - S) = \\ &= 0,51 (20 \text{ kg/m}^3 - 1,5 \text{ kg/m}^3) \\ &= 9,435 \text{ kg/m}^3 \end{aligned}$$

$$E = \frac{Y_{X, \text{ stvarni}}}{Y_{X, \text{ teoretski}}} = \frac{9 \text{ kg/m}^3}{9,435 \text{ kg/m}^3} = \underline{0,96}$$

d) *Produktivnost- brzina sinteze produkta po jedinici volumena reaktora:*

Kotlasti reaktor

$$\begin{aligned} Pr &= \frac{\text{proizvedena biomasa ili produkt}}{\text{trajanje procesa}} \\ &= \frac{Y_X \text{ (ili } Y_P)}{t_{\text{ukupno}}} = \frac{Y_X \text{ (ili } Y_P)}{t_{\text{exp}} + t_D + t_F + t_{\text{lag}}} \end{aligned}$$

t_D – pražnjenje i pranje reaktora
 t_F – punjenje i sterilizacija reaktora
 t_{lag} – trajanje faze prilagodbe
 t_{exp} – trajanje eksponencijalne faze

$$Pr = \frac{9,0 \text{ kg/m}^3}{8 \text{ h} + 2 \text{ h} + 1,5 \text{ h}} = \underline{0,783 \text{ kg/m}^3\text{h}}$$

e) *Najveća moguća koncentracija proizvedenog kvasca:*

$$\begin{aligned} Y_{X \text{ max, teoretska}} &= Y_{X/S, \text{ teoretska}} (S_0 - S) \\ &= 0,51(20 \text{ kg/m}^3 - 0 \text{ kg/m}^3) \\ &= \underline{10,2 \text{ kg/m}^3} \end{aligned}$$

$$X_{\text{max}} = Y_X + X_0 = 10,2 \text{ kg/m}^3 + 0,5 \text{ kg/m}^3$$

$$X_{\text{max}} = \underline{10,7 \text{ kg/m}^3}$$

Primjer 4: Ako je konstanta zasićenja supstratom kvasca iz prethodnog zadatka 0,3 g/L, treba izračunati:

- kolika bi bila specifična brzina rasta na početku uzgoja ako je faza prilagodbe zanemariva?
- pri kojim bi koncentracijama supstrata specifična brzina rasta pala na 90% maksimalne vrijednosti?
- koliko bi otprilike vremena prošlo do tada?
- dokazati da tvrdnja da mikroorganizmi rastu približno maksimalnom specifičnom brzinom rasta vrijedi ako je koncentracija supstrata veća od 20 K_S .
- kolika je specifična brzina rasta, ako je $S = 10 K_S$?

$$K_S = 0,3 \text{ g/L}$$

$$\mu_{\max} = 0,45 \text{ h}^{-1}$$

$$S_0 = 20 \text{ g/L}$$

a) μ - na početku uzgoja:

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

$$\mu = 0,45 \text{ h}^{-1} \frac{20 \text{ g/L}}{0,3 \text{ g/L} + 20 \text{ g/L}} = \underline{0,443 \text{ h}^{-1}}$$

b) $S = ?$; $\mu = 0,9 \mu_{\max}$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \Rightarrow S = \frac{\mu \cdot K_S}{\mu_{\max} - \mu}$$

$$S = \frac{0,9 \cdot \cancel{\mu_{\max}} \cdot K_S}{\cancel{\mu_{\max}} - 0,9 \cdot \cancel{\mu_{\max}}} = 9 \cdot K_S = 9 \cdot 0,3 \text{ g/L} = \underline{2,7 \text{ g/L}}$$

c) $t = ?$

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t} \rightarrow t = \frac{\ln X / X_0}{\mu}$$

$Y_{X/S} = 0,49 \text{ kg/kg}$
$S_0 = 20 \text{ g/L}$
$S = 2,7 \text{ g/L}$

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \rightarrow X = Y_{X/S} (S_0 - S) + X_0$$

$$X = 0,49 \text{ kg/kg} (20 \text{ kg/m}^3 - 2,7 \text{ kg/m}^3) + 0,5 \text{ kg/m}^3$$
$$= 8,98 \text{ kg/m}^3$$

Na početku uzgoja $\rightarrow \mu = 0,443 \text{ h}^{-1}$

$$t = \frac{\ln X / X_0}{\mu} = \frac{\ln (8,98 \text{ kg/m}^3 / 0,5 \text{ kg/m}^3)}{0,443 \text{ h}^{-1}} = 6,52 \text{ h} \quad \text{min. vrijeme}$$

At the $S = 2,7 \text{ g/L}$ $\rightarrow \mu = 0,9 \cdot \mu_{\max} = 0,405 \text{ h}^{-1}$

$$t = \frac{\ln X / X_0}{\mu} = \frac{\ln (8,98 \text{ kg/m}^3 / 0,5 \text{ kg/m}^3)}{0,405 \text{ h}^{-1}} = 7,13 \text{ h} \quad \text{max. vrijeme}$$

$$t \approx 6,52 - 7,13 \text{ h}$$

d) $S = 20 K_S ; \mu = ?$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} = \mu_{\max} \frac{20 \cdot K_S}{K_S + 20 \cdot K_S} = \mu_{\max} \frac{20}{21}$$


$$\mu = 0,95 \cdot \mu_{\max}$$

e) $S = 10 K_S ; \mu = ?$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} = \mu_{\max} \frac{10 \cdot K_S}{K_S + 10 \cdot K_S} = \mu_{\max} \frac{10}{11}$$

$$\mu = 0,91 \cdot \mu_{\max}$$

Primjer 5: Kolika je specifična brzina rasta mikroorganizma u šaržnom procesu ako je na početku uzgoja koncentracija biomase bila 20 kg/m^3 , a nakon 6 sati izmjerena koncentracija biomase je iznosila $50,7 \text{ kg/m}^3$?


$X_0 = 20 \text{ g/L}$ $X = 50,7 \text{ g/L}$ $t = 6 \text{ h}$		$\mu = ?$
-----------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-----------

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

$$\mu = \frac{\ln X / X_0}{t} = \frac{\ln (50,7 \text{ kg/m}^3 / 20 \text{ kg/m}^3)}{6 \text{ h}}$$

$$= \underline{0,155 \text{ h}^{-1}}$$

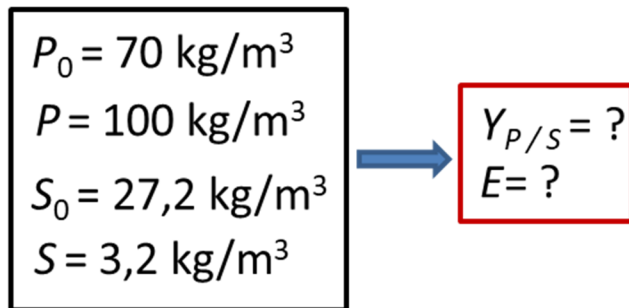
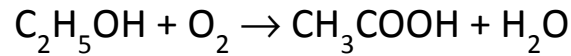
Primjer 6: Izračunajte koeficijent konverzije supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$) ako je početna koncentracija biomase 50 kg/m^3 , a konačna odnosno 400 kg/m^3 , pri čemu je početna koncentracija početna supstrata 800 kg/m^3 , a konačna 25 kg/m^3 .

$X_0 = 50 \text{ kg/m}^3$ $X = 400 \text{ kg/m}^3$ $S_0 = 800 \text{ kg/m}^3$ $S = 25 \text{ kg/m}^3$		$Y_{X/S} = ?$
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------	---------------

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} = \frac{400 \text{ kg/m}^3 - 50 \text{ kg/m}^3}{800 \text{ kg/m}^3 - 25 \text{ kg/m}^3}$$

$$= \underline{0,452 \text{ kg/kg}}$$

Primjer 7: Pri proizvodnji octene kiseline koncentracija produkta je porasla sa 70 kg/m³ na 100 kg/m³. Za to vrijeme koncentracija supstrata (etanola) je pala sa 27,2 kg/m³ na 3,2 kg/m³. Izračunajte koeficijent konverzije supstrata u produkt i učinkovitost procesa ako se teoretski pretvorba etanola u octenu kiselinu odvija prema jednadžbi:



$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} = \frac{100 \text{ kg/m}^3 - 70 \text{ kg/m}^3}{27,2 \text{ kg/m}^3 - 3,2 \text{ kg/m}^3} = \underline{1,25 \text{ kg/kg}}$$

$$Y_{P/S, \text{ teoretski}} = \frac{1 \text{ kmol CH}_3\text{COOH} \cdot 60 \text{ kg/kmol}}{1 \text{ kmol C}_2\text{H}_5\text{OH} \cdot 46 \text{ kg/kmol}} = \underline{1,3 \text{ kg/kg}}$$

$$E = \frac{Y_{P/S, \text{ stvarni}}}{Y_{P/S, \text{ teoretski}}} = \frac{1,25 \text{ kg/kg}}{1,3 \text{ kg/kg}} = \underline{0,958}$$

Primjer 8: U proizvodnji mliječne kiseline iz glukoze utrošeno je 100 m^3 medija koji je sadržavao 50 kg/m^3 glukoze. Dobiveno je 42 kg/m^3 mliječne kiseline. Izračunajte koeficijent konverzije supstrata u produkt i produktivnost ako je ukupno vrijeme trajanja procesa bilo 60 sati.

$V = 100 \text{ m}^3$ $S_0 = 50 \text{ kg/m}^3$ $P = 42 \text{ kg/m}^3$ $t = 60 \text{ h}$ $S = P_0 = 0 \text{ kg/m}^3$	\rightarrow	$Y_{P/S} = ?$ $Pr = ?$
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------	---------------------------

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} = \frac{42 \text{ kg/m}^3 - 0 \text{ kg/m}^3}{50 \text{ kg/m}^3 - 0 \text{ kg/m}^3} = \underline{0,84 \text{ kg/kg}}$$

$$Pr = \frac{Y_P}{t} = \frac{42 \text{ kg/m}^3}{60 \text{ h}} = \underline{0,7 \text{ kg/m}^3\text{h}}$$

Primjer 9: Početna koncentracija stanica u reaktoru je bila 10 kg/m^3 . Nakon 16 sati uzgoja postignuta je koncentracija stanica od 60 kg/m^3 . Lag faza je trajala 1 h, punjenje, sterilizacija i hlađenje (priprema) reaktora 2 h, a pražnjenje nakon završetka procesa 1 h. Početna koncentracija supstrata je bila 80 kg/m^3 , a konačna koncentracija supstrata 5 kg/m^3 . Izračunajte u ovom šaržnom procesu:

- specifičnu brzinu rasta
- stupanj konverzije supstrata u biomasu
- produktivnost.

$$\begin{array}{l}
 X_0 = 10 \text{ kg/m}^3 \\
 X = 60 \text{ kg/m}^3 \\
 t_{\text{uzgoja}} = 16 \text{ h} \\
 t_L = 1 \text{ h} \\
 t_D = 2 \text{ h} \\
 t_p = 1 \text{ h} \\
 S_0 = 80 \text{ kg/m}^3 \\
 S = 5 \text{ kg/m}^3
 \end{array}$$



$$\begin{array}{l}
 \mu = ? \\
 Y_{X/S} = ? \\
 Pr = ?
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 \text{a) } X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \longrightarrow \mu = \frac{\ln X / X_0}{t} \\
 \mu = \frac{\ln (60 \text{ kg/m}^3 / 10 \text{ kg/m}^3)}{16 \text{ h}} = \underline{0,12 \text{ h}^{-1}}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 \text{b) } Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \\
 Y_{X/S} = \frac{60 \text{ kg/m}^3 - 10 \text{ kg/m}^3}{80 \text{ kg/m}^3 - 5 \text{ kg/m}^3} = \underline{0,67 \text{ kg/kg}}
 \end{array}$$

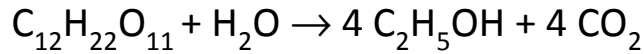
$$c) t_{uzgoja} = t_{exp} + t_L \Rightarrow t_{exp} = 16 \text{ h} - 1 \text{ h} = 15 \text{ h}$$

$$Y_X = X - X_0 = 60 \text{ kg/m}^3 - 10 \text{ kg/m}^3 = 50 \text{ kg/m}^3$$

$$Pr = \frac{Y_X}{t_{exp} + t_P + t_D + t_L}$$

$$Pr = \frac{50 \text{ kg/m}^3}{15 \text{ h} + 1 \text{ h} + 2 \text{ h} + 1 \text{ h}} = \underline{2.63 \text{ kg/m}^3\text{h}}$$

Primjer 10: Proizvodnja etanola iz melase (50 % saharoze) odvija se prema jednadžbi:



Zbog inhibicije etanolom, stanice proizvodnog mikroorganizma toleriraju maksimalnu koncentraciju produkta od 78,9 kg/ m³. Ako je radni volumen raspoloživog reaktora 80 m³:

- Koliko je melase potrebno u šaržnom procesu za postizanje limitirajuće koncentracije etanola, s obzirom da je ekonomski dopuštena koncentracija neizreagirane saharoze 10 kg/ m³?
- Kolika je efikasnost procesa ako je stvarna koncentracija etanola 74 kg/ m³? Rast biomase može se zanemariti.

a)

$$Y_{P/S, \text{ teoretska}} = \frac{4 \text{ kmol } C_2H_5OH}{1 \text{ kmol } C_{12}H_{22}O_{11}} \cdot \frac{46 \text{ kg/kmol}}{342 \text{ kg/kmol}}$$

$$Y_{P/S, \text{ teoretska}} = 0,54 \text{ kg/kg}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad \Rightarrow \quad S_0 = \frac{P - P_0}{Y_{P/S}} + S$$

$$m_S = 156,65 \text{ kg/m}^3 \cdot 80 \text{ m}^3 = 12532 \text{ kg}$$

$$m_{\text{melase}} = m_S / 0,5 = 12532 \text{ kg} / 0,5 = \underline{25 \text{ t}}$$

b)

$$Y_{P/S, \text{ stvarna}} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} = \frac{74 \text{ kg/m}^3 - 0 \text{ kg/m}^3}{156,65 \text{ kg/m}^3 - 10 \text{ kg/m}^3}$$

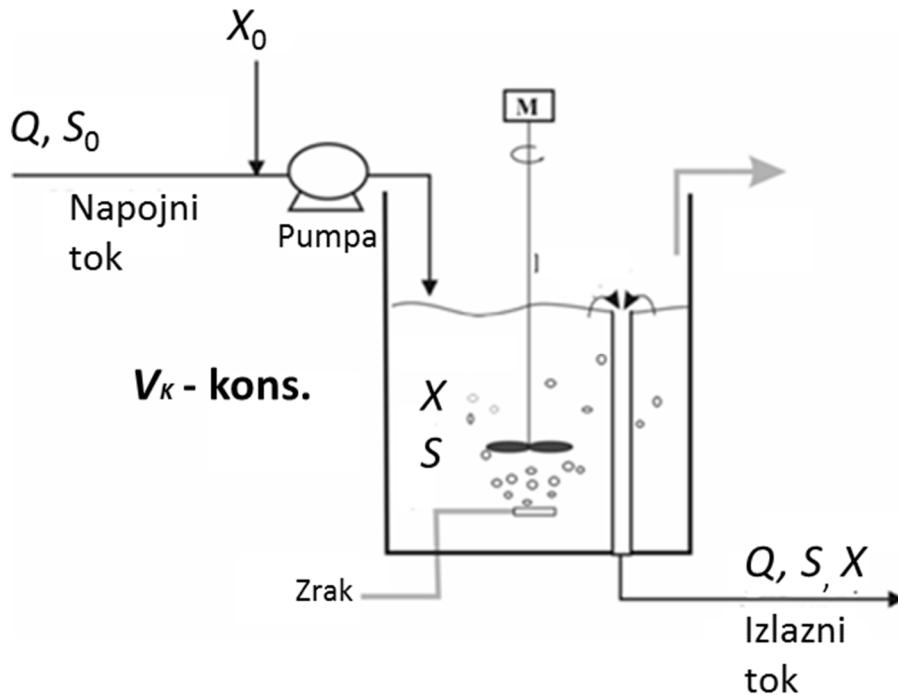
$$Y_{P/S, \text{ stvarna}} = 0,50 \text{ kg/kg}$$

$$E = \frac{Y_{P/S, \text{ stvarna}}}{Y_{P/S, \text{ teoretska}}} = \frac{0,50 \text{ kg/kg}}{0,54 \text{ kg/kg}} = \underline{0,938}$$

5. Kontinuirani uzgoj mikroorganizama

Reaktor za kontinuirani uzgoj mikroorganizama se sastoji od:

- reaktora s konstantnim volumenom hranjive podloge
- pumpe za dovod svježe podloge
- rezervoara svježe podloge.



Slika 7. Shema kemostata (Marić i sur. 1991).

U kontinuiranom uzgoju mikroorganizama se stalno održava u eksponencijalnoj fazi rasta. Dotok svježeg supstrata odgovara brzini rasta odnosno brzini potrošnje supstrata. Za kontinuirani uzgoj mikroorganizama hranjiva podloga je sastavljena tako da su sve hranjive tvari osim supstrata u suvišku. Na taj način se koncentracijom supstrata kontrolira koncentracija stanica u kulturi.

Pojam kemostat označava stalnost svojstava u stacionarnom stanju (Gomzi i Kurtanjek 2019).

5.1. Bilanca tvari u kemostatu

5.1.1. Bilanca biomase

Promjena koncentracije biomase = $\frac{\text{Ulaz biomase}}{V} - \frac{\text{Izlaz biomase}}{V} + \text{Prirast stanica} - \text{Gubitak zbog odumiranja}$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{Q}{V}X_0 - \frac{Q}{V}X + \mu \cdot X - \alpha \cdot X$$

$$X_0 = 0, \mu \gg \alpha \implies \frac{dX}{dt} = -\frac{Q}{V}X + \mu \cdot X$$

Stacionarno stanje $\implies \frac{dX}{dt} = 0 \implies -\frac{Q}{V}X + \mu \cdot X = 0 \implies \mu = \frac{Q}{V}$

Brzina razrijeđenja $\implies D = \frac{Q}{V} \implies \mu = D$

5.1.2. Bilanca supstrata

Promjena koncentracije supstrata = Ulaz supstrata - Izlaz supstrata - Utrošak supstrata za rast - Utrošak supstrata za održavanje - Utrošak supstrata za sintezu proizvoda

$$\frac{dS}{dt} = \frac{Q}{V} S_0 - \frac{Q}{V} S - \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} - m \cdot X - \frac{q_p \cdot X}{Y_{P/S}}$$

Stacionarno stanje $\Rightarrow \frac{dS}{dt} = 0, \frac{Q}{V} = D$

$m \cdot X, \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}}, q_p = 0$

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

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

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \xrightarrow[\text{uzgoj}]{\text{Kontinuirani}} D = D_K \frac{S}{K_s + S}$$

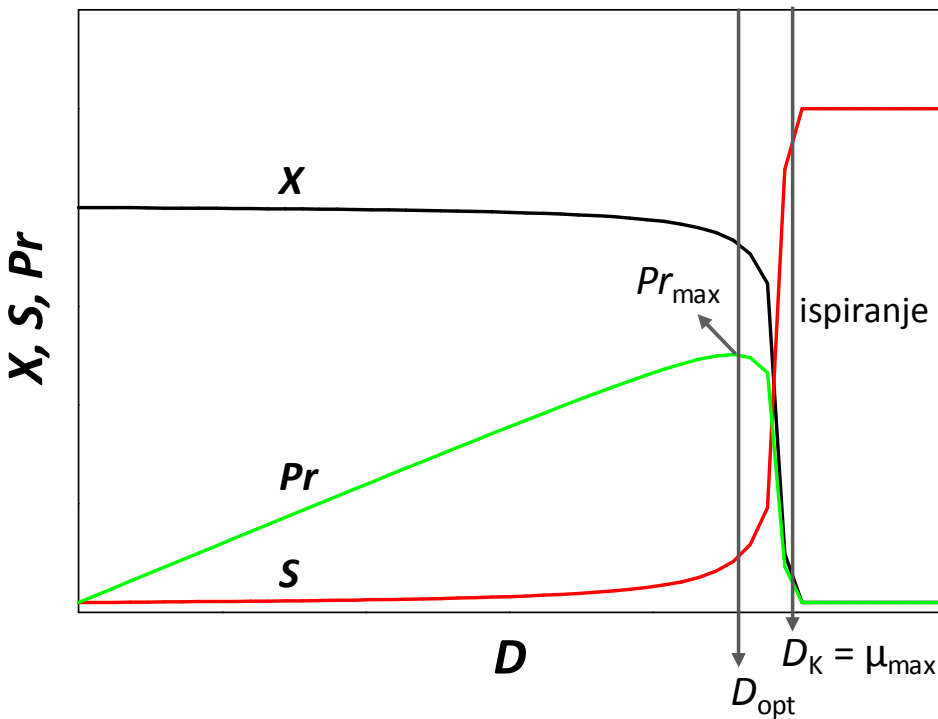
D_K – kritična brzina razrjeđenja, tj. maksimalna brzina kod koje kemostat još može raditi, a odgovara približno vrijednosti μ_{\max} mikroorganizma u šaržnoj kulturi.

$$S = \frac{D \cdot K_s}{D_K - D} \xrightarrow{\text{Uvrsti u}} X = Y_{X/S} (S_0 - S)$$

$$X = Y_{X/S} \left(S_0 - \frac{D \cdot K_s}{D_K - D} \right)$$

5.2. Produktivnost prilikom kontinuiranog uzgoja

$$Pr = \frac{Q}{V} X = D \cdot X$$



Slika 8. Ovisnost koncentracije mikroorganizama (X), koncentracije graničnog supstrata (S) i produktivnosti procesa (Pr) o brzini razrjeđenja (D) tijekom kontinuiranog uzgoja u kemostatu (Marić i Šantek 2009).

D_{opt} , D_m – brzina razrjeđenja kod koje je produktivnost maksimalna

5.2.1. Izračunavanje maksimalne produktivnosti

$$Pr = D \cdot X = D \cdot Y_{X/S} \cdot (S_0 - S) = D \cdot Y_{X/S} \cdot \left(S_0 - \frac{D - K_S}{D_K - D} \right)$$

Da bi se izračunala maksimalna produktivnost treba se prvo izračunati optimalna brzina razrjeđenja:

$$Pr = D \cdot Y_{X/S} \cdot S_0 - \frac{D^2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S}{D_K - D} \rightarrow \text{Max or min} \rightarrow \frac{dPr}{dD} = 0$$

$$\begin{aligned} \frac{dPr}{dD} &= Y_{X/S} \cdot S_0 - \left[\frac{2D \cdot Y_{X/S} \cdot K_S (D_K - D) - D^2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S (-1)}{(D_K - D)^2} \right] \\ &= Y_{X/S} \cdot S_0 - \frac{2D \cdot Y_{X/S} \cdot K_S \cdot D_K - D^2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S}{(D_K - D)^2} = 0 \end{aligned}$$

$$D^2 [Y_{X/S} \cdot (S_0 + K_S)] - D \cdot 2 \cdot Y_{X/S} \cdot D_K (S_0 + K_S) + Y_{X/S} \cdot S_0 \cdot D_K^2 = 0$$

$$D = \frac{2 \cdot Y_{X/S} \cdot D_K (S_0 + K_S)}{2 \cdot Y_{X/S} \cdot (S_0 + K_S)} \pm \frac{\sqrt{4 \cdot Y_{X/S}^2 \cdot D_K^2 (S_0 + K_S)^2 + 4 \cdot Y_{X/S} \cdot (S_0 + K_S) Y_{X/S} \cdot S_0 \cdot D_K^2}}{2 \cdot Y_{X/S} \cdot (S_0 + K_S)}$$

$$D = D_K \pm \sqrt{\frac{4 \cdot Y_{X/S}^2 \cdot D_K^2 [(S_0 + K_S)^2 - (S_0 + K_S) \cdot S_0]}{4 \cdot Y_{X/S}^2 \cdot (S_0 + K_S)^2}} = D_K \pm D_K \sqrt{\frac{S_0^2 + 2 \cdot S_0 \cdot K_S + K_S^2 - S_0^2 - S_0 \cdot K_S}{(S_0 + K_S)^2}}$$

$$D_1 = D_K + D_K \sqrt{\frac{K_S}{(S_0 + K_S)}} \quad D_2 = D_K - D_K \sqrt{\frac{K_S}{(S_0 + K_S)}}$$

Treba naći koje rješenje daje maksimalnu produktivnost. Za navedeno treba napraviti drugu derivaciju izraza za produktivnost:

$$\frac{dPr}{dD} = Y_{X/S} \cdot S_0 - \frac{2D \cdot Y_{X/S} \cdot K_S \cdot D_K - D^2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S}{(D_K - D)^2}$$

$$\frac{d^2 Pr}{dD^2} = - \frac{(2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S \cdot D_K - 2 \cdot D \cdot Y_{X/S} \cdot K_S)(D_K - D)^{-2} - (2 \cdot D \cdot Y_{X/S} \cdot K_S \cdot D_K - D^2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S) \cdot [-2(D_K - D)^{-3}]}{(D_K - D)^3}$$

$$\frac{d^2 Pr}{dD^2} = - \frac{2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S \cdot D_K^2 - 2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S \cdot D_K \cdot D - 2 \cdot D \cdot Y_{X/S} \cdot K_S \cdot D_K + 2 \cdot D^2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S + 4 \cdot D \cdot Y_{X/S} \cdot K_S \cdot D_K - 2 \cdot D^2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S}{(D_K - D)^3}$$

$$\frac{d^2 Pr}{dD^2} = -\frac{2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S \cdot D_K^2}{(D_K - D)^3}$$

$$\frac{d^2 Pr}{dD^2}(D_1) = -\frac{2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S \cdot D_K^2}{\left(D_K - D_K - D_K \sqrt{\frac{K_S}{S_0 + K_S}}\right)^3} > 0 \rightarrow \text{MIN } \frac{dPr}{dD}$$

$$\frac{d^2 Pr}{dD^2}(D_2) = -\frac{2 \cdot Y_{X/S} \cdot K_S \cdot D_K^2}{\left(D_K - D_K + D_K \sqrt{\frac{K_S}{S_0 + K_S}}\right)^3} < 0 \rightarrow \text{MAX } \frac{dPr}{dD}$$

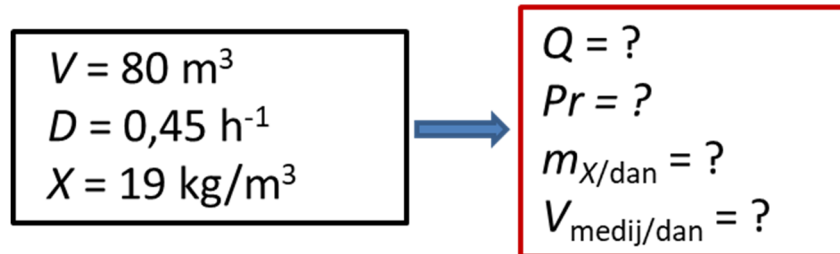
Optimalna brzina razrijeđenja

$$D_{\text{opt}} = D_K \left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{S_0 + K_S}}\right)$$

Maximalna produktivnost

$$Pr_{\text{max}} = D_K \left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{S_0 + K_S}}\right) \cdot Y_{X/S} \left(S_0 - \frac{D - K_S}{D_K - D}\right)$$

Primjer 11: Jednostupanjski kemostat radnog volumena 80 m^3 radi s brzinom razrjeđivanja od $D = 0,45 \text{ h}^{-1}$. Izračunajte protok i produktivnost procesa ako je koncentracija biomase na izlazu iz reaktora $X = 19 \text{ kg/m}^3$. Koliko se biomase proizvede u jednom danu i koliko svježeg medija treba pripremiti za dnevnu proizvodnju?



Protok:

$$D = \frac{Q}{V} \rightarrow Q = D \cdot V = 0,45 \text{ h}^{-1} \cdot 80 \text{ m}^3 = \underline{36 \text{ m}^3/\text{h}}$$

Produktivnost:

$$Pr = D \cdot X = 0,45 \text{ h}^{-1} \cdot 19 \text{ kg/m}^3 = \underline{8,55 \text{ kg/m}^3\text{h}}$$

Potrebni volumen svježeg medija po danu:

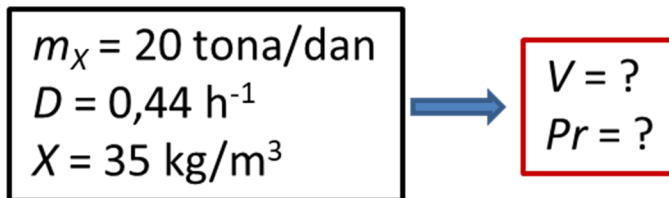
$$V_{\text{medij/dan}} = Q \cdot t = 36 \text{ m}^3/\text{h} \cdot 24 \text{ h} = \underline{864 \text{ m}^3/\text{dan}}$$

Proizvedena biomasa po danu:

$$m_{X/\text{dan}} = Q \cdot t \cdot X = 36 \text{ m}^3/\text{h} \cdot 24 \text{ h/day} \cdot 19 \text{ kg/m}^3$$

$$= 16416 \text{ kg/day} = \underline{16,4 \text{ t/dan}}$$

Primjer 12: U pogonu za proizvodnju jednostaničnih proteina planira se proizvodnja od 20 t biomase na dan. Proces se vodi na principu jednostepenog kemostata pri brzini razrjeđenja $D = 0,44 \text{ h}^{-1}$, a koncentracija biomase na izlazu je 35 kg/m^3 . Treba izračunati volumen reaktora koji je potrebno instalirati da se ostvari proizvodnja. Kolika je produktivnost procesa?



Protok

$$Q = \frac{m_{X/\text{dan}}}{X} = \frac{20000 \text{ kg/dan}}{35 \text{ kg/m}^3} = 571,4 \text{ m}^3/\text{dan}$$

$$Q = \frac{571,4 \text{ m}^3/\text{dan}}{24 \text{ h/dan}} = \underline{23,81 \text{ m}^3/\text{h}}$$

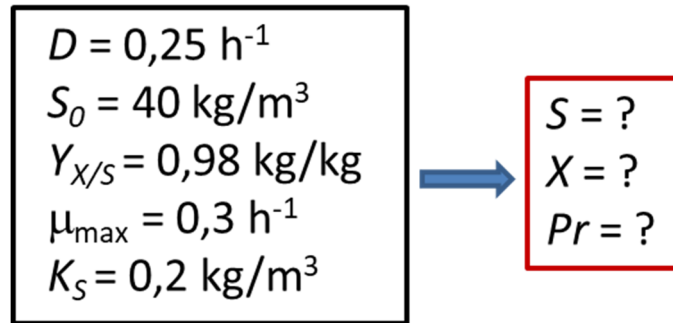
Volumen

$$V = \frac{Q}{D} = \frac{23,81 \text{ m}^3/\text{h}}{0,44 \text{ h}^{-1}} = \underline{24,11 \text{ m}^3}$$

Produktivnost

$$Pr = D \cdot X = 0,44 \text{ h}^{-1} \cdot 35 \text{ kg/m}^3 = \underline{154 \text{ kg/m}^3\text{h}}$$

Primjer 13: Kemostat radi pri brzini razrjeđenja $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ i pri početnoj koncentraciji supstrata od 40 kg/m^3 . Stupanj konverzije supstrata u biomasu iznosi $0,98 \text{ kg/kg}$. Radni mikroorganizam ima maksimalnu specifičnu brzinu rasta od $0,3 \text{ h}^{-1}$ a konstanta zasićenja supstratom iznosi $0,2 \text{ kg/m}^3$. Treba izračunati koncentraciju biomase i supstrata u reaktoru, te produktivnost.



PKR-koncentracija u reaktoru = koncentraciji u izlaznom toku

Koncentracija supstrata u izlaznom toku

$$D = \frac{D_K \cdot S}{K_S + S} \quad D_K = \mu_{\max} = 0,3 \text{ h}^{-1}$$

$$S = \frac{D \cdot K_S}{D_K - D} = \frac{0,25 \text{ h}^{-1} \cdot 0,2 \text{ kg/m}^3}{0,3 \text{ h}^{-1} - 0,25 \text{ h}^{-1}} = \underline{1,0 \text{ kg/m}^3}$$

Koncentracija biomase u izlaznom toku

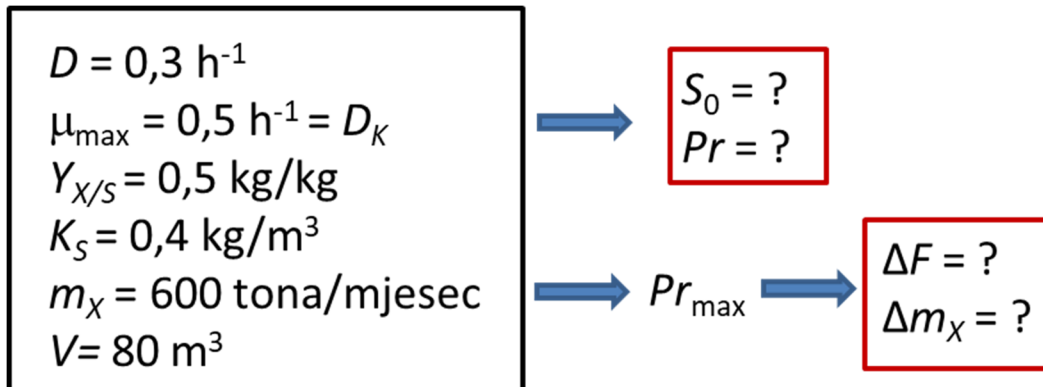
$$X = Y_{X/S} (S_0 - S)$$

$$X = 0,98 \text{ kg/kg} (40 \text{ kg/m}^3 - 1 \text{ kg/m}^3) = \underline{38,22 \text{ kg/m}^3}$$

Produktivnost

$$Pr = D \cdot X = 0,25 \text{ h}^{-1} \cdot 38,22 \text{ kg/m}^3 = \underline{9,56 \text{ kg/m}^3\text{h}}$$

Primjer 14: U kontinuiranoj proizvodnji biomase mikroorganizama proces se provodi pri brzini razrjeđenja $0,3 \text{ h}^{-1}$. Maksimalna specifična brzina rasta iznosi $0,5 \text{ h}^{-1}$. Stupanj konverzije supstrata u biomasu je $0,5 \text{ kg/kg}$, a konstanta zasićenja supstratom $0,4 \text{ kg/m}^3$. Treba izračunati kolika mora biti koncentracija supstrata u napojnom toku da se postigne mjesečna proizvodnja od 600 tona u reaktoru od 80 m^3 korisnog volumena, (1 mjesec = 30 dana) i kolika se produktivnost tada postiže. Koliko bi trebalo povećati protok pumpe da bi kemostat radio maksimalnom produktivnošću u danim uvjetima i koliko bi se tada povećala mjesečna proizvodnja biomase?



Koncentracija biomase u izlaznom toku

$$m_X = 600 \frac{\text{tona}}{\text{mjesec}} \cdot \frac{1000 \text{ kg}}{1 \text{ tona}} \cdot \frac{1 \text{ tona}}{30 \text{ dana}} \cdot \frac{24 \text{ h}}{1 \text{ mjesec}} \cdot \frac{1}{24 \text{ h}} = 833,33 \frac{\text{kg}}{\text{h}}$$

$$Q = D \cdot V = 0,30 \text{ h}^{-1} \cdot 80 \text{ m}^3 = 24 \text{ m}^3 / \text{h}$$

$$X = \frac{m_X}{Q} = \frac{833,33 \text{ kg/h}}{24 \text{ m}^3/\text{h}} = \underline{34,72 \text{ kg/m}^3}$$

Koncentracija supstrata u izlaznom toku

$$S = \frac{D \cdot K_S}{D_K - D} = \frac{0,3 \text{ h}^{-1} \cdot 0,4 \text{ kg/m}^3}{0,5 \text{ h}^{-1} - 0,3 \text{ h}^{-1}} = \underline{0,6 \text{ kg/m}^3}$$

Koncentracija supstrata u napojnom toku

$$X = Y_{X/S}(S_0 - S) \rightarrow S_0 = \frac{X}{Y_{X/S}} + S$$

$$S_0 = \frac{34,72 \text{ kg/m}^3}{0,5 \text{ kg/kg}} + 0,6 \text{ kg/m}^3 = \underline{70,044 \text{ kg/m}^3}$$

Produktivnost

$$Pr = D \cdot X = 0,3 \text{ h}^{-1} \cdot 34,72 \text{ kg/m}^3 = \underline{10,42 \text{ kg/m}^3\text{h}}$$

Optimalna produktivnost

$$\begin{aligned} D_{\text{opt}} &= D_K \left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{S_0 + K_S}} \right) \\ &= 0,50 \text{ h}^{-1} \left(1 - \sqrt{\frac{0,4 \text{ kg/m}^3}{70,044 \text{ kg/m}^3 + 0,4 \text{ kg/m}^3}} \right) \\ &= 0,46 \text{ h}^{-1} \end{aligned}$$

Povećanje pritoka supstrata za postizanje maksimalne produktivnosti

$$D = \frac{F}{V} \rightarrow \begin{aligned} F &= D \cdot V = 0,3 \text{ h}^{-1} \cdot 80 \text{ m}^3 = 24 \text{ m}^3\text{h}^{-1} \\ F_{\text{opt}} &= D_{\text{opt}} \cdot V = 0,46 \text{ h}^{-1} \cdot 80 \text{ m}^3 = 36,8 \text{ m}^3\text{h}^{-1} \end{aligned}$$

$$\Delta F = \frac{36,8 \text{ m}^3\text{h}^{-1} - 24 \text{ m}^3\text{h}^{-1}}{24 \text{ m}^3\text{h}^{-1}} = \underline{0,533}$$

Pritok supstrata se treba povećati za 53,3 %.

Povećanje mjesečne proizvodnje biomase pri maksimalnoj produktivnosti

$$S = \frac{D_{\text{opt}} \cdot K_S}{D_K - D_{\text{opt}}} = \frac{0,46 \text{ h}^{-1} \cdot 0,4 \text{ kg/m}^3}{0,5 \text{ h}^{-1} - 0,46 \text{ h}^{-1}} = 4,6 \text{ kg/m}^3$$

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

$$= 0,5 \frac{\text{kg}}{\text{kg}} \left(70,044 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} - 4,6 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right) = 32,72 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$$

$$Pr_{\text{max}} = D_{\text{opt}} \cdot X = 0,46 \text{ h}^{-1} \cdot 32,72 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} = 15,05 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3 \text{h}}$$

$$m_{X,\text{max}} = Pr_{\text{max}} \cdot V \cdot t$$

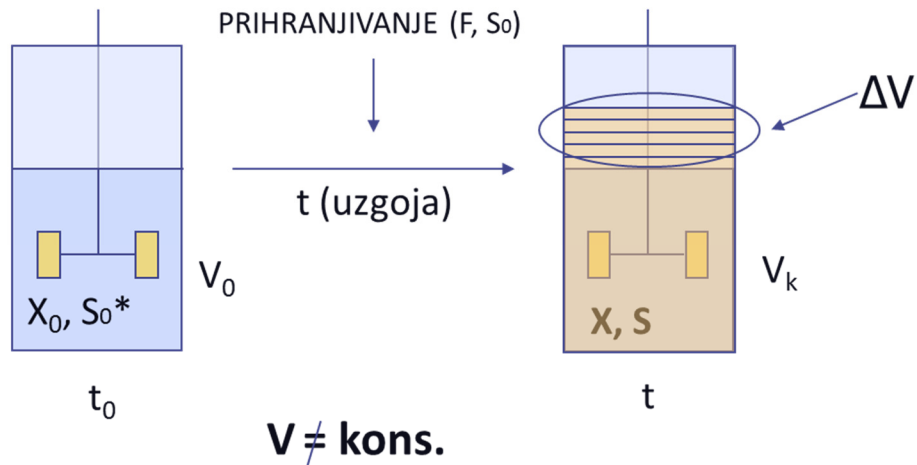
$$= 15,05 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3 \text{h}} \cdot 80 \text{ m}^3 \cdot 30 \text{ dan} \cdot \frac{24 \text{ h}}{1 \text{ dan}}$$

$$= 866800 \text{ kg} = 866,8 \text{ t}$$

$$\Delta m_x = 866,8 \text{ t} - 600 \text{ t} = \underline{266,8 \text{ t}}$$

Proizvodnja biomase će se povećati za 266,8 tona mjesečno.

6. Šaržni procesi s pritokom supstrata (fed batch)



Slika 9. Shematski prikaz promjena koncentracije mikrobnih stanica i supstrata u bioreaktoru s miješalom tijekom šaržnog procesa s pritokom supstrata.

$$V = f(t)$$

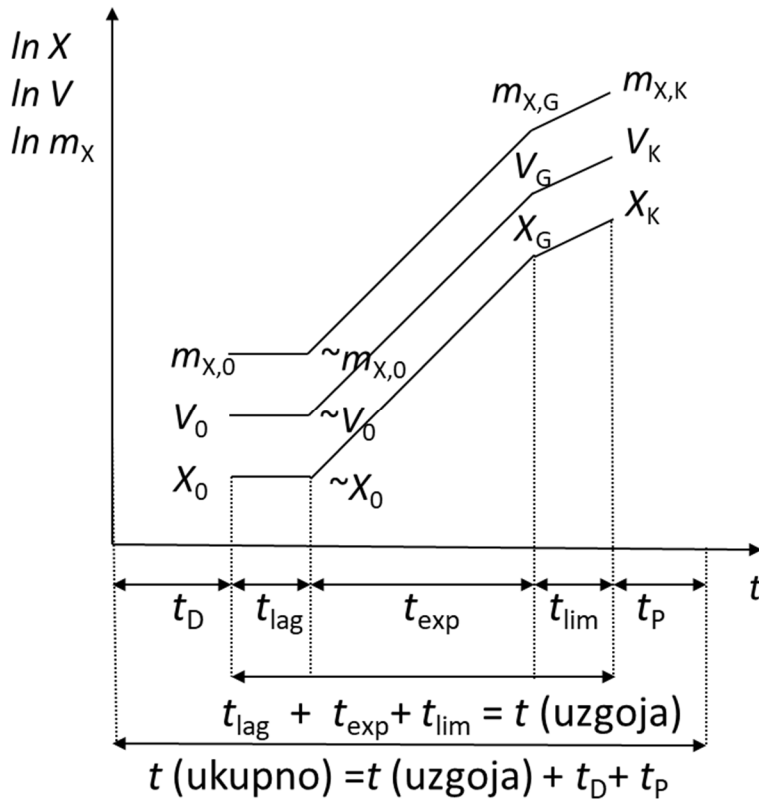
$$X = f(t, V)$$

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

$$m_x = m_0 e^{\mu t}$$

Napomena: Tijekom šaržnog procesa s pritokom supstrata dolazi do promjene volumena hranjive podloge. Stoga je tijekom računanja potrebno zasebno izračunati promjenu mase i onda promjenu volumena da bi se iz izračunatih vrijednosti mogla izračunati točna promjena koncentracije mikrobnih stanica (Marić i Šantek 2009).

6.1. Krivulja rasta mikroorganizama tijekom šaržnog procesa s pritokom supstrata



Slika 10. Krivulja rasta i vrijeme trajanja šaržnog procesa s pritokom supstrata.

Vrijeme trajanja:

t_D – punjenje, sterilizacija, hlađenje

t_{lag} – faza prilagodbe (lag faza)

t_{exp} – eksponencijalna faza

t_{lim} – faza limitacije

t_p – pražnjenje

Primjer 15: U šaržnom procesu s pritokom supstrata koristi se melasa s 40 % (tež/tež) suhe tvari i 62,5 % (tež/tež) šećera (saharoze) u suhoj tvari. Gustoća melase iznosi 1210 kg/m^3 . Ukupni volumen reaktora iznosi 80 m^3 , koristan volumen iznosi 70 % ukupnog volumena. Konstrukcija reaktora omogućava da se postigne koncentracija stanica 60 kg/m^3 bez bitne promjene viskoziteta koji bi utjecao na prijenos kisika. Topivost kisika iznosi $7,8 \text{ g/m}^3$, koncentracija otopljenog kisika ispod koje je rast ograničen iznosi $0,8 \text{ g/m}^3$. Specifična brzina potrošnje kisika iznosi $0,25 \text{ kg/kg h}$. Izračunajte $k_L a$ vrijednost. Izračunajte koju se koncentraciju inokuluma i koji početni volumen mora postaviti na početku procesa, a da $k_L a$ reaktora omogući maksimalnu produktivnost od $2 \text{ kg/m}^3\text{h}$ ukupnog volumena. Stupanj konverzije supstrata u biomasu iznosi $0,5 \text{ kg/kg}$. U eksponencijalnoj fazi specifična brzina rasta iznosi $0,2 \text{ h}^{-1}$. Traži se da trajanje procesa u reaktoru bude 18 h, lag faza traje 2 h, priprema reaktora 2 h, pražnjenje 2 h, a da ograničenje rasta kisikom traje maksimalno 5 h. Koja je produktivnost procesa?

$$w_{\text{ST/melase}} = 0,4$$

$$w_{\text{saharoze/ST}} = 0,625$$

$$\rho_{\text{melase}} = 1210 \text{ kg/m}^3$$

$$V_u = 80 \text{ m}^3$$

$$V_k = 0,7 \cdot 80 \text{ m}^3 = 56 \text{ m}^3$$

$$c_{x,\text{max}} = 60 \text{ kg/m}^3$$

$$c_{\text{O}_2,\text{zas}} = 7,8 \text{ g/m}^3$$

$$c_{\text{O}_2,\text{lim}} = 0,8 \text{ g/m}^3$$

$$q_{\text{O}_2} = 0,25 \text{ kg/kg h}$$

$$Pr = 2 \text{ kg/m}^3\text{h (faza limitacije)}$$

$$Y_{X/S} = 0,5 \text{ kg/kg}$$

$$\mu = 0,2 \text{ h}^{-1} \text{ (exp. faza)}$$

$$t_{\text{uzgoja}} = 18 \text{ h}$$

$$t_{\text{lag}} = 2 \text{ h}$$

$$t_D = 2 \text{ h}$$

$$t_p = 2 \text{ h}$$

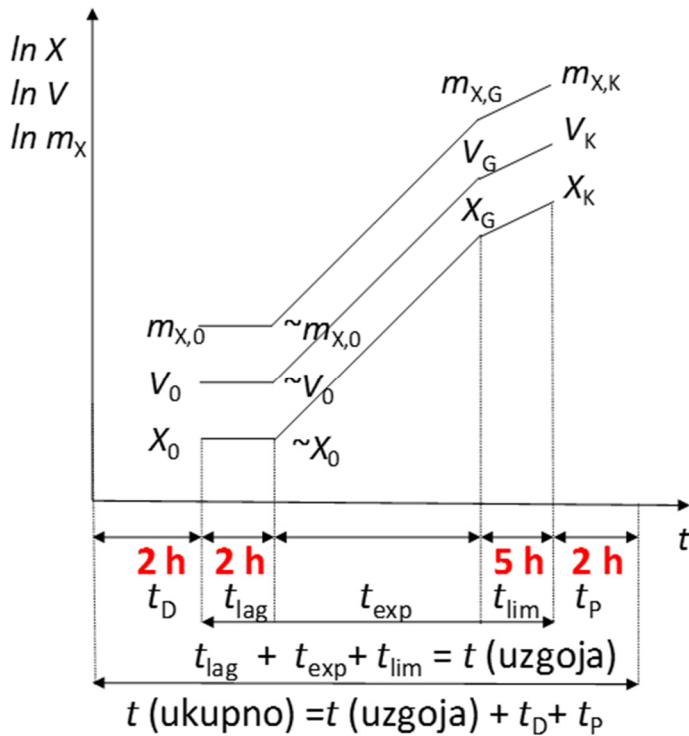
$$t_{\text{lim}} = 5 \text{ h}$$

$$k_L a = ?$$

$$V_0 = ?$$

$$c_{X0} = ?$$

$$Pr = ?$$



Masa biomase na kraju uzgoja:

$$m_{x,K} = c_{x,\max} \cdot V_K = 60 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \cdot 56 \text{ m}^3 = 3360 \text{ kg}$$

Volumni koeficijent prijenosa kisika

$$\begin{aligned}
 k_L a &= \frac{q_{O_2} \cdot X_G}{c_{O_2,\text{zas}} - c_{O_2,\text{lim}}} \\
 &= \frac{0,25 \text{ kg/kg h} \cdot 50,4821 \text{ kg/m}^3}{(7,8 \text{ g/m}^3 - 0,8 \text{ g/m}^3) \cdot \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}}} = \underline{\underline{1802,93 \text{ h}^{-1}}}
 \end{aligned}$$

Biomasa i volumen dodane melase u limitiranoj fazi

masa biomase:

$$\Delta m_{X,\text{lim}} = Pr_{\text{lim}} \cdot V_U \cdot t_{\text{lim}} = 2 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3 \text{h}} \cdot 80 \text{ m}^3 \cdot 5 \text{ h} = 800 \text{ kg}$$

masa saharoze:

$$\Delta m_{S,\text{lim}} = \Delta m_{X,\text{lim}} \cdot \frac{1}{Y_{X/S}} = 800 \text{ kg} \cdot \frac{1}{0,5 \text{ kg/kg}} = 1600 \text{ kg}$$

masa suhe stvari melase:

$$\Delta m_{M,\text{ST},\text{lim}} = \Delta m_{S,\text{lim}} \cdot \frac{1}{w_{\text{saharoze/ST}}} = \frac{1600 \text{ kg}}{0,625} = 2560 \text{ kg}$$

volumen melase:

$$\begin{aligned} \Delta V_{M,\text{lim}} &= \Delta m_{M,\text{ST},\text{lim}} \frac{1}{w_{\text{ST/melase}}} \frac{1}{\rho_{\text{melase}}} \\ &= \frac{2560 \text{ kg}}{0,4} \cdot \frac{1}{1210 \text{ kg/m}^3} = 5,289 \text{ m}^3 \end{aligned}$$

Biomasa i volumen radnog medija do limitirane faze

masa biomase:

$$m_{X,G} = m_{X,K} - \Delta m_{X,\text{lim}}$$

$$m_{X,G} = 3360 \text{ kg} - 800 \text{ kg} = 2560 \text{ kg}$$

volumen :

$$V_G = V_k - \Delta V_{M,\text{lim}} = 56 \text{ m}^3 - 5,284 \text{ m}^3 = 50,711 \text{ m}^3$$

koncentracija biomase :

$$X_G = \frac{m_{X,G}}{V_G} = \frac{2560 \text{ kg}}{50,711 \text{ m}^3} = 50,4821 \text{ kg/m}^3$$

Biomasa i volumen radnog medija na početku procesa

$$V_G = V_0 + \Delta V_{M,\text{exp}} \quad (\text{početni volumen} + \text{prirast zbog dotoka melase})$$

prirast volumena zbog dotoka melase:

$$\Delta V_{M,\text{exp}} = K(m_{X,G} - m_{X,0})$$

K = faktor preračunavanja mase biomase u volumen potrebne melase u konkretnom slučaju

$$K = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{1}{w_{\text{saharoze/ST}}} \cdot \frac{1}{w_{\text{ST/melase}}} \cdot \frac{1}{\rho_{\text{melase}}} = \frac{1}{0,5 \text{ kg/kg}} \cdot \frac{1}{0,625} \cdot \frac{1}{0,4} \cdot \frac{1}{1210} = 6,6115 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}^3}{\text{kg}}$$

masa biomase na početku uzgoja:

$$m_{X,G} = m_{X,0} \cdot e^{\mu \cdot t_{\text{exp}}}$$

vrijeme eksponencijalnog uzgoja:

$$t_{\text{uzgoja}} = t_{\text{lag}} + t_{\text{exp}} + t_{\text{lim}} \Rightarrow t_{\text{exp}} = 18 \text{ h} - 5 \text{ h} - 2 \text{ h} = 11 \text{ h}$$

$$m_{X,0} = \frac{m_{X,G}}{e^{\mu \cdot t_{\text{exp}}}} = \frac{2560 \text{ kg}}{e^{0,2 \text{ h}^{-1} \cdot 11 \text{ h}}} = 283,656 \text{ kg}$$

$$\Delta V_{M,\text{exp}} = 6,6115 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}^3}{\text{kg}} (2560 \text{ kg} - 283,656 \text{ kg}) \\ = 15,05 \text{ m}^3$$

početni volumen :

$$V_0 = V_G - \Delta V_{M,\text{exp}} = 50,711 \text{ m}^3 - 15,05 \text{ m}^3 = \underline{\underline{35,66 \text{ m}^3}}$$

početna koncentracija biomase:

$$X_0 = \frac{m_{X,0}}{V_0} = \frac{283,656 \text{ kg}}{35,66 \text{ m}^3} = \underline{\underline{7,954 \text{ kg/m}^3}}$$

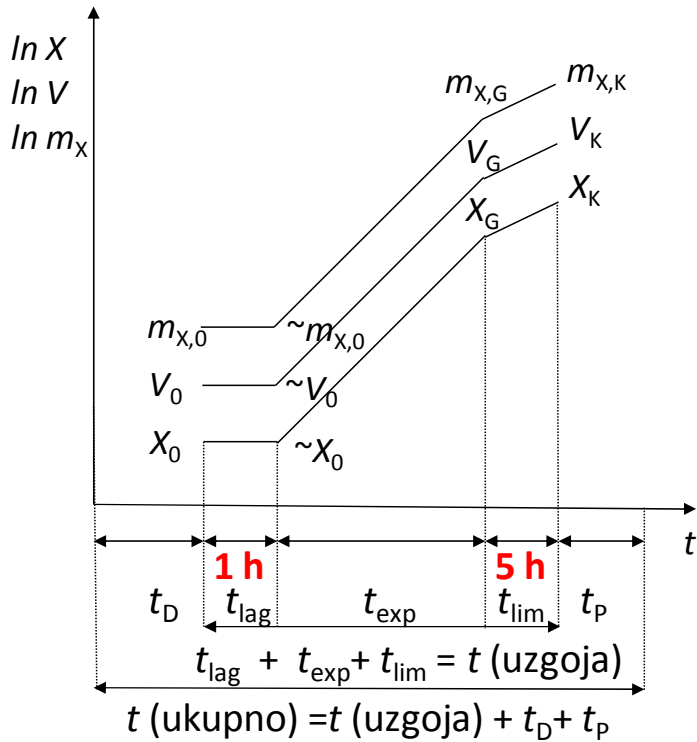
Produktivnost procesa

$$Pr = \frac{m_{X,K} - m_{X,0}}{V_k \cdot t_{\text{ukupno}}} \\ = \frac{3360 \text{ kg} - 283,656 \text{ kg}}{56 \text{ m}^3 (18 \text{ h} + 4 \text{ h})} = \underline{\underline{2,497 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3 \text{h}}}}$$

Primjer 16: U reaktor ukupnog volumena 120 m^3 naci jepljeno je 420 kg inokuluma. Početni volumen iznosi $52,5 \text{ m}^3$, $k_L a$ reaktora 1800 h^{-1} , a specifična potrošnja kisika $0,2 \text{ kg/kg h}$. Postupak je šaržni s pritokom supstrata a kao sirovina se koristi melasa sa 40% suhe tvari (tež/tež) i 60% saharoze u suhoj tvari (tež/tež) gustoće 1210 kg/m^3 . Specifična brzina rasta mikroorganizama iznosi $0,2 \text{ h}^{-1}$, koeficijent konverzije supstrata u biomasu iznosi $0,5 \text{ kg/kg}$. Izračunajte koliko će trajati proces ako je tvornički podatak da spomenuti reaktor omogućava maksimalnu produktivnost od $2 \text{ kg/m}^3 \text{ h}$ (ukupnog volumena) a lag-faza traje 1 h . Koncentracija zasićenja kisikom iznosi $7,8 \text{ g/m}^3$, a minimalna koncentracija otopljenog kisika kod koje još ne postoji ograničenje rasta je $0,8 \text{ g/m}^3$. Ako je sadržaj ugljika u biomasu 45% (tež/tež) koliko je CO_2 nastalo tijekom procesa? Produkt je zadovoljavajući ako raste maksimalno 5 h u uvjetima ograničene koncentracije kisika.

$$\begin{aligned}
 V_u &= 120 \text{ m}^3 \\
 m_{X,0} &= 420 \text{ kg} \\
 V_0 &= 52,5 \text{ m}^3 \\
 k_L a &= 1800 \text{ h}^{-1} \\
 q_{\text{O}_2} &= 0,2 \text{ kg/kg h} \\
 w_{\text{ST/melase}} &= 0,4 \\
 w_{\text{saharoze/ST}} &= 0,6 \\
 \rho_{\text{melase}} &= 1210 \text{ kg/m}^3 \\
 Y_{X/S} &= 0,5 \text{ kg/kg} \\
 \mu &= 0,2 \text{ h}^{-1} \text{ (exp. faza)} \\
 Pr &= 2 \text{ kg/m}^3 \text{ h (ukupni} \\
 &\text{volumen)} \\
 t_{\text{lag}} &= 1 \text{ h} \\
 c_{\text{O}_2, \text{zas}} &= 7,8 \text{ g/m}^3 \\
 c_{\text{O}_2, \text{lim}} &= 0,8 \text{ kg/m}^3 \\
 w_{\text{C/X}} &= 0,45 \\
 t_{\text{lim}} &= 5 \text{ h}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 t_{\text{ukupno}} &= ? \\
 m_{\text{CO}_2} &= ?
 \end{aligned}$$



Biomasa do limitirane faze

$$k_L a = \frac{q_{O_2} \cdot X_G}{c_{O_2, \text{zas}} - c_{O_2, \text{lim}}} \rightarrow X_G = k_L a \frac{c_{O_2, \text{zas}} - c_{O_2, \text{lim}}}{q_{O_2}}$$

$$X_G = 1800 \text{ h}^{-1} \frac{(7,8 \text{ g/m}^3 - 0,8 \text{ g/m}^3) \cdot \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}}}{0,25 \text{ kg/kg h}}$$

$$= 63 \text{ kg/m}^3$$

Vrijeme

izvod za izračunavanje vremena trajanja

eksponencijalne faze:

$$m_{X,G} = X_G \cdot V_G = m_{X,0} \cdot e^{\mu \cdot t_{\text{exp}}}$$

$$V_G = V_0 + \Delta V_{M,\text{exp}}$$

$$\Delta V_{M,\text{exp}} = K(m_{X,G} - m_{X,0}) = K \cdot m_{X,0} (e^{\mu \cdot t_{\text{exp}}} - 1)$$

$$K = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{1}{w_{\text{saharoze/ST}}} \frac{1}{w_{\text{ST/melase}}} \frac{1}{\rho_{\text{melase}}} = \frac{1}{0,5 \text{ kg/kg}} \cdot \frac{1}{0,6} \cdot \frac{1}{0,4} \cdot \frac{1}{1210} = 6,887 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}^3}{\text{kg}}$$

$$X_G = \frac{m_{X,0} \cdot e^{\mu \cdot t_{\text{exp}}}}{V_0 + K \cdot m_{X,0} (e^{\mu \cdot t_{\text{exp}}} - 1)}$$

$$X_G \cdot V_0 + X_G \cdot K \cdot m_{X,0} \cdot e^{\mu \cdot t_{\text{exp}}} - X_G \cdot K \cdot m_{X,0} - m_{X,0} \cdot e^{\mu \cdot t_{\text{exp}}} = 0$$

$$e^{\mu \cdot t_{\text{exp}}} (X_G \cdot K \cdot m_{X,0} - m_{X,0}) = X_G \cdot K \cdot m_{X,0} - X_G \cdot V_0$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{1}{\mu} \ln \left(\frac{X_G \cdot K \cdot m_{X,0} - X_G \cdot V_0}{X_G \cdot K \cdot m_{X,0} - m_{X,0}} \right)$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{1}{0,2 \text{ h}^{-1}} \ln \left(\frac{63 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \cdot 6,887 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}^3}{\text{kg}} \cdot 420 \text{ kg} - 63 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \cdot 52,5 \text{ m}^3}{63 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \cdot 6,887 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}^3}{\text{kg}} \cdot 420 \text{ kg} - 420 \text{ kg}} \right)$$

$$t_{\text{exp}} = 12,88 \text{ h}$$

trajanje uzgoja ukupno od trenutka inokulacije:

$$t_{\text{uzgoja}} = t_{\text{lag}} + t_{\text{exp}} + t_{\text{lim}} = 1 \text{ h} + 12,88 \text{ h} + 5 \text{ h}$$

$$t_{\text{uzgoja}} = \underline{18,88 \text{ h} \approx 19 \text{ h}}$$

Biomasa

Masa biomase do limitirane faze:

$$m_{X,G} = m_{X,0} \cdot e^{\mu \cdot t_{\text{exp}}}$$

$$m_{X,G} = 420 \text{ kg} \cdot e^{0,2 \text{ h}^{-1} \cdot 12,88 \text{ h}} = 5520,52 \text{ kg}$$

Masa biomase nastala u limitiranoj fazi:

$$\Delta m_{X,\text{lim}} = Pr_{\text{lim}} \cdot V_U \cdot t_{\text{lim}} = 1200 \text{ kg}$$

$$\Delta m_{X,\text{lim}} = 2 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3 \text{h}} \cdot 120 \text{ m}^3 \cdot 5 \text{ h} = 1200 \text{ kg}$$

Konačna masa biomase :

$$m_{X,K} = m_{X,G} + \Delta m_{X,\text{lim}}$$

$$m_{X,K} = 5520,52 \text{ kg} + 1200 \text{ kg} = 6720,52 \text{ kg}$$

Ukupni prirast biomase :

$$\Delta m_{X,\text{prirast}} = m_{X,K} - m_{X,0}$$

$$\Delta m_{X,\text{prirast}} = 6720,52 \text{ kg} - 420 \text{ kg} = 6300,52 \text{ kg}$$

Ugljik

Masa ugljika u nastaloj biomasi :

$$m_{C/X} = \Delta m_{X,\text{prirast}} \cdot w_{C/X}$$

$$m_{C/X} = 6300,52 \text{ kg} \cdot 0,45 = 2835,23 \text{ kg}$$

Masa ugljika u potrošenoj saharozi :

$$m_{C/SAH} = \frac{\Delta m_{X,\text{prirast}}}{Y_{X/S}} \cdot \frac{12 \cdot M_C}{M_{SAH}}$$

$$m_{C/SAH} = \frac{6300,52 \text{ kg}}{0,5} \cdot \frac{12 \cdot 12 \text{ kg/kmol}}{342 \text{ kg/kmol}} = 5305,70 \text{ kg}$$

Masa ugljika u CO₂:

$$m_{C/CO_2} = m_{C/SAH} - m_{C/X}$$

$$m_{C/CO_2} = 5305,70 \text{ kg} - 2835,23 \text{ kg} = 2470,27 \text{ kg}$$

Masa CO₂:

$$m_{CO_2} = m_{C/CO_2} \cdot \frac{M_{CO_2}}{M_C}$$

$$m_{CO_2} = 2470,27 \text{ kg} \cdot \frac{44 \text{ kg/kmol}}{12 \text{ kg/kmol}} = \underline{\underline{9058,39 \text{ kg}}}$$

Popis literature

Bailey J., Ollis D.F., (1986) Biochemical engineering fundamentals, 2nd edn. McGraw Hill Chemical Engineering Series, New York.

Doran P.M., (1995) Bioprocess engineering principles, Academic press, London.

Gomzi Z., Kurtanjek Ž., (2019) Modeliranje u kemijskom inženjerstvu, Hrvatsko društvo *kemijskih* inženjera i tehnologa, Zagreb.

Liu S., (2020) Bioprocess Engineering. Kinetics, Sustainability, and Reactor Design, 3rd edn. Elsevier, London.

Marić V., Novak S., Horvat P., (1991) Biokemijsko inženjerstvo, Interna skripta, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Marić V., Šantek B., (2009) Biokemijsko inženjerstvo, Golden Marketing-Tehnička knjiga, Zagreb.

Mathematica (2013) Wolfram Research, <https://www.wolframalpha.com/>

Monod J., (1949) The growth of bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol* 3(1):371–394.

Moser A., (1985) Kinetics of batch fermentations, U: Biotechnology, Rehm HJ, Reed G (ur.) VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Shuler M.L., Kargi F., (2002) Biochemical Engineering - Basic Concepts 2nd edn. Prentice Hall PTR, New Jersey.

PRILOG

Primjer 1

Povedeno je laboratorijsko istraživanje **šaržnog uzgoja** bakterija mliječne kiseline u bioreaktoru s miješalom, pa su eksperimentalni rezultati uzgoja iskorišteni za procjenu kinetičkih parametara korištenjem programskog paketa Wolfram Mathematica (Mathematica 2013).

U primjeru 1 prikazana je procjena kinetičkih parametara na način da su:

- a) prikazani eksperimentalni podaci i regresijski model za kisik, biomasu, supstrat (glukozu), proizvod (mliječnu kiselinu) i aktivnost enzima
- b) grafički prikaz eksperimentalnih podataka (točke) i regresijskog modela (krivulje)
- c) kinetički modeli za rast biomase mikrobnih stanica, nastajanje proizvoda, potrošnju supstrata i nastajanje enzima
- d) bilance za biomasu i procjena kinetičkih parametara
- e) bilance za proizvod (mliječnu kiselinu) i procjena kinetičkih parametara
- f) bilanca za supstrat (glukozu) i procjena kinetičkih parametara
- g) bilanca za enzim NADH oksidazu i procjena kinetičkih parametara
- h) bilanca za enzim ADH i procjena kinetičkih parametara.

Na temelju primjera prikazanog u primjeru 1 i eksperimentalnih rezultata uzgoja bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus delbrueckii* u bioreaktoru s miješalom (rezultati s vježbi iz Biokemijskog inženjerstva; vježba šaržni uzgoj u bioreaktoru s miješalom), potrebno je korištenjem programskog paketa Wolfram Mathematica procjeniti kinetičke parametre procesa šaržnog uzgoja bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus delbrueckii* na sljedeći način:

- korištenjem eksperimentalnih podataka i regresijskih modela grafički prikazati promjenu koncentracije biomase, supstrata i proizvoda
- odabrati kinetičke izraze za rast biomase, potrošnju supstrata i nastajanje proizvoda
- napisati bilance za rast biomase, potrošnju supstrata i nastajanje proizvoda tijekom šaržnog uzgoja

- procijeniti kinetičke parametre za rast biomase, potrošnju supstrata i nastajanje proizvoda
- raspraviti dobivene rezultate i predložiti koji bi se kinetički modeli još mogli koristiti
- Primijeniti rezultate procjene kinetičkih parametara na uzgoj s pritokom supstrata (napišite bilance za šaržni uzgoj s pritokom supstrata i prikažite krivulje promjene koncentracije biomase, supstrata i proizvoda te usporedite dobivene krivulje s eksperimentalnim rezultatima izmjenjenim na vježbama iz biokemijskog inženjerstva - vježba šaržni uzgoj s pritokom supstrata)
- primijeniti rezultate procjene kinetičkih parametara na kontinuirani uzgoj (napišite bilance za kontinuirani uzgoj i prikažite krivulje promjene koncentracije biomase, supstrata i proizvoda te usporedite dobivene krivulje s eksperimentalnim rezultatima izmjenjenim na vježbama iz biokemijskog inženjerstva - vježba kontinuirani uzgoj)

Matematički model rasta stanica *Lactobacillus delbrueckii* temelji se na nekoliko pretpostavki:

- u reaktoru postoje dvije faze; plin i kapljevina, a mikroorganizmi se ne tretiraju kao posebna faza zbog svojih malih dimenzija i gustoće koja je bliska onoj vode
- sadržaj reaktora je homogen i u radijalnom i u aksijalnom smjeru
- bilance topline nisu razmatrane u ovom modelu jer je temperatura u reaktoru kontrolirana.

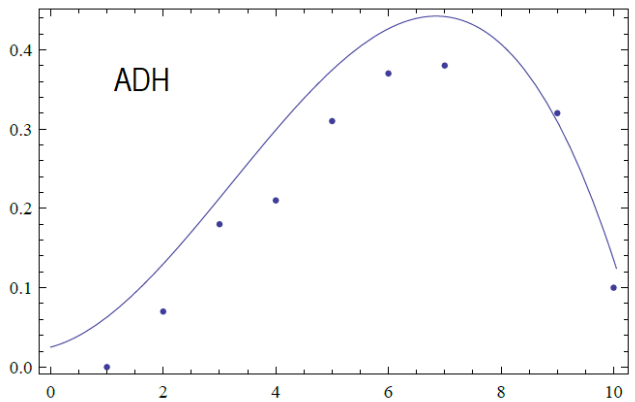
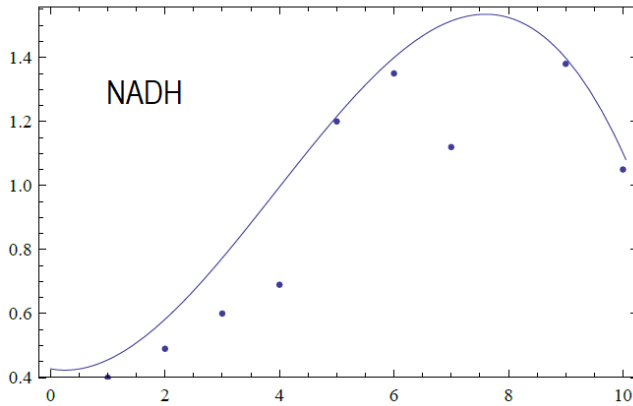
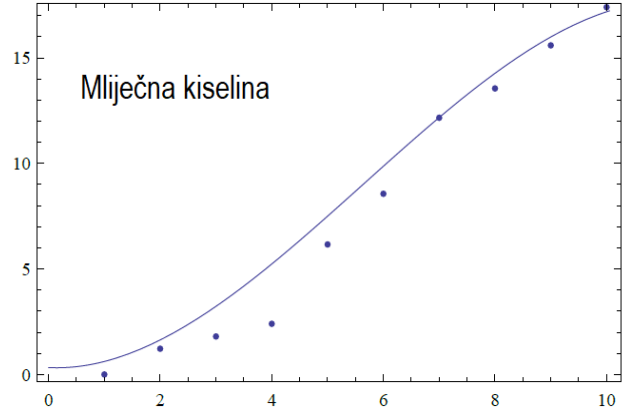
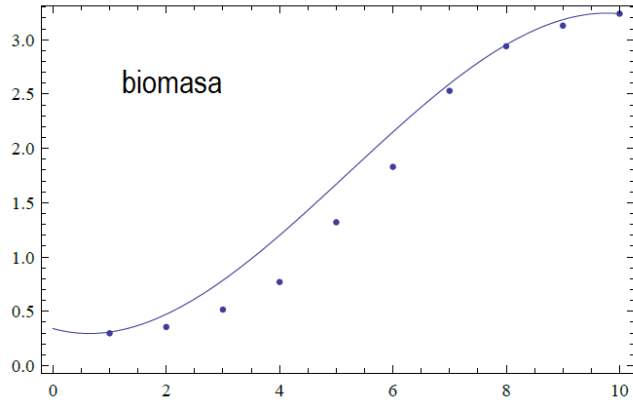
Specifične brzine rasta biomase o koncentraciji supstrata opisana je Monodovim modelom (Monod 1949).

a) Eksperimentalni podaci i regresijski model

```
time = {0.00, 0.95, 1.97, 3.05, 4.32, 5.47, 6.70, 7.79, 8.94, 10.05};
tmax = 10.05;
O2 = {96.4, 97.9, 94.2, 88.7, 72, 56.1, 48.2, 46.1, 41.9, 74};
xm = {0.298, 0.356, 0.5161, 0.77, 1.32, 1.83, 2.53, 2.94, 3.13, 3.24};
g = {19.7, 17.44, 16.17, 17.19, 11.88, 10.44, 8.32, 4.64, 1.11, 0.01};
cm = {0, 1.22, 1.8, 2.4, 6.16, 8.56, 12.16, 13.55, 15.59, 17.4};
nadhm = {0.4, 0.49, 0.6, 0.69, 1.2, 1.35, 1.12, 1.85, 1.38, 1.05};
adhm = {0, 0.07, 0.18, 0.21, 0.31, 0.37, 0.38, 0.52, 0.32, 0.1};

a0 = 94.77474; a1 = 9.41395; a2 = -5.12185; a3 = 0.39242;
b0 = 19.6017; b1 = -0.57410; b2 = -0.24314; b3 = 0.0105;
O2r[t_] := a0 + a1 * t + a2 * t * t + a3 * t * t * t
gr[t_] := b0 + b1 * t + b2 * t * t + b3 * t * t * t
c0 = 0.327596; c1 = -0.130057; c2 = 0.444161; c3 = -0.026262;
mr[t_] := c0 + c1 * t + c2 * t * t + c3 * t * t * t
d0 = 0.3413247; d1 = -0.1449602; d2 = 0.1208504; d3 = -0.0077373;
xr[t_] := d0 + d1 * t + d2 * t * t + d3 * t * t * t
e0 = 0.427352; e1 = -0.032538; e2 = 0.066092; e3 = -0.005610;
nadhr[t_] := e0 + e1 * t + e2 * t * t + e3 * t * t * t
f0 = 0.0251230; f1 = 0.0187414; f2 = 0.0212159; f3 = -0.0021988;
adhr[t_] := f0 + f1 * t + f2 * t * t + f3 * t * t * t
```

b) Grafički prikaz eksperimentalnih podataka (točke) i regresijskog modela (krivulje)



c) Kinetički modeli

rast biomase $r_x = v_{max} \frac{c_g}{K_g + c_g} \frac{c_o}{K_o + c_o} c_x$

proizvodnja mliječne kiseline $r_m = \beta_{1m} r_x + \beta_{2m} c_x$

potrošnja glukoze $r_s = \frac{1}{Y_{X/S}} r_x + \frac{1}{Y_{m/S}} r_m$

aktivnost NADH oksidaze $a_{NADH} = \beta_{1NADH} r_x + \beta_{2NADH} c_x$

aktivnost ADH $a_{ADH} = \beta_{1ADH} r_x + \beta_{2ADH} c_x$

d) Bilance za biomasu i procjena kinetičkih parametara

$v_{max} = 0.312$; $K_g = 2.8$; $K_o = 3.2$;

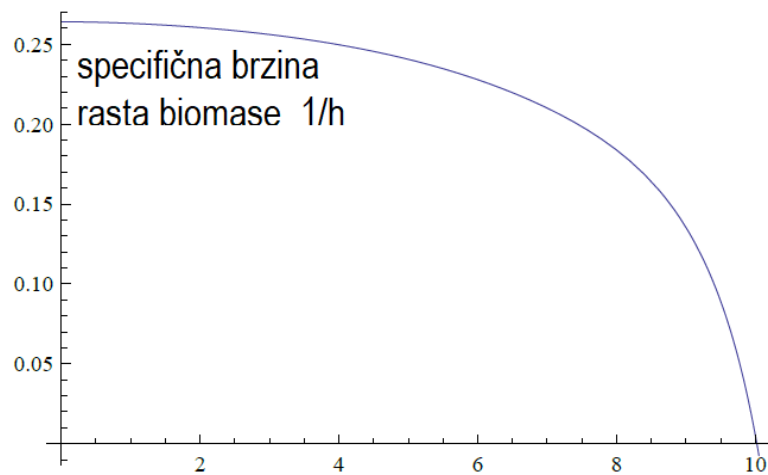
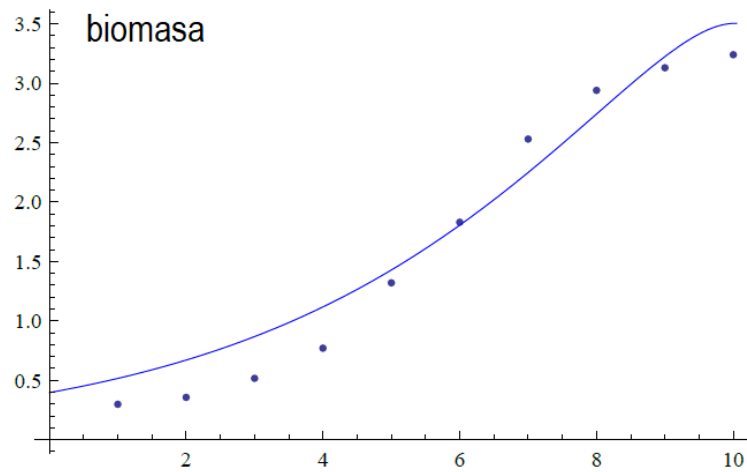
modelx =

```
NDSolve[{sx'[t] == vmax * gr[t] / (Kg + gr[t]) * O2r[t] / (Ko + O2r[t]) * sx[t], sx[0] == 0.396},  
{sx}, {t, 0, tmax}]
```

$y[t_] = sx[t] /. modelx$;

```
Show[ListPlot[xm], Plot[y[t], {t, 0, tmax}, PlotStyle -> Blue]]
```

	Estimate	Standard Error	t Statistic	P-Value
v_{max}	0.329483	0.0814531	4.04507	0.00370954
K_g	4.45571	4.03546	1.10414	0.301633



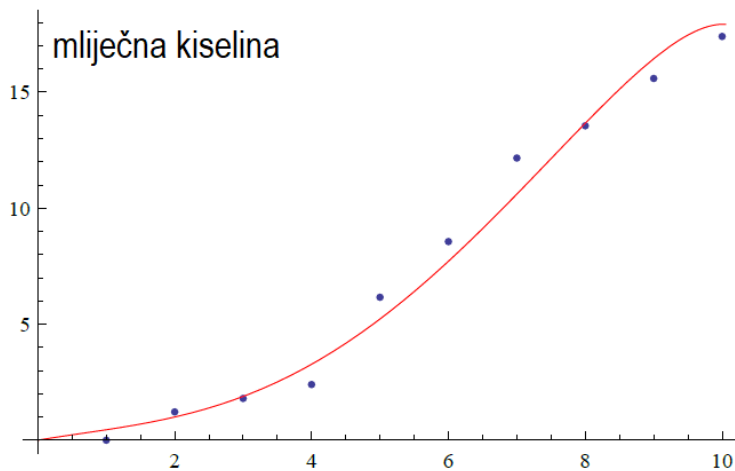
e) Bilance za proizvod (mliječnu kiselinu) i procjena kinetičkih parametara

```
modelM[am_?NumberQ, bm_?NumberQ] := (modelM[am, bm] = Module[{m, t},  
  First[m /. NDSolve[{m'[t] == am * mix[t] * xr[t] + bm * xr[t], m[0] == 0}, m, {t, 0, tmax}]]];
```

```
Clear[am, bm]
```

```
nlmM = NonlinearModelFit[cm, {modelM[am, bm][t], am > 0, bm > 0}, {am, bm}, t]
```

	Estimate	Standard Error	t Statistic	P-Value
am	5.55534	1.56581	3.54791	0.00753237
bm	4.09702×10^{-9}	0.331252	1.23683×10^{-8}	1



f) Bilanca za supstrat (glukoza) i procjena kinetičkih parametara

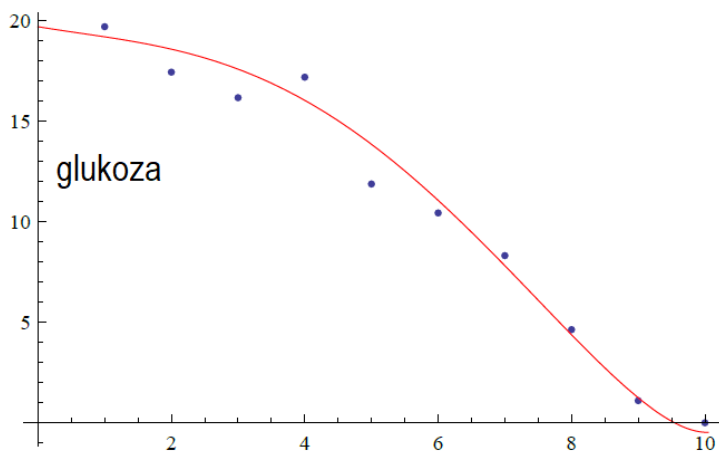
```
modelGlu[Yxg_?NumberQ, Ymg_?NumberQ] :=
  (modelGlu[Yxg, Ymg] = Module[{glu, t}, First[glu /. NDSolve[{glu'[t] ==
    -1/Yxg * mix[t] * xr[t] - 1/Ymg * mrate[t], glu[0] == 19.7}, glu, {t, 0, tmax}]]])
```

```
Clear[Yxg, Ymg]
```

```
nlmG = NonlinearModelFit[g, {modelGlu[Yxg, Ymg][t]}, {Yxg, Ymg}, t]
```

```
FittedModel [ InterpolatingFunction[{{0., 10.05}}, <>][t] ]
```

	Estimate	Standard Error	t Statistic	P-Value
Yxg	0.207736	0.011681	17.7841	1.02305×10^{-7}
Ymg	4.2718	0.974666	4.38283	0.0023399



g) Bilanca za enzim NADH oksidazu i procjena kinetičkih parametara

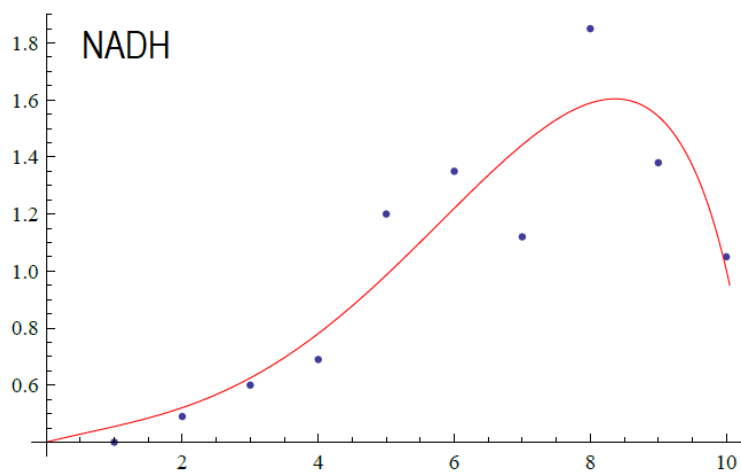
```
In[61]:= modelNADH[A_?NumberQ, B_?NumberQ] :=
  (modelNADH[A, B] = Module[{nadh, t}, First[nadh /. NDSolve[
    {nadh'[t] == A * mix[t] * xr[t] + B * xr[t], nadh[0] == 0.4}, nadh, {t, 0, tmax}]]])
```

```
nlmNADH = NonlinearModelFit[nadhm, {modelNADH[A, B][t]}, {A, B}, t]
```

```
FittedModel[ InterpolatingFunction[{{0., 10.05}}, <>][t] ]
```

```
nlmNADH["ParameterTable"]
```

	Estimate	Standard Error	t Statistic	P-Value
A	1.90969	0.33466	5.70634	0.000451071
B	-0.324919	0.070797	-4.58945	0.00177986



h) Bilanca za enzim ADH i procjena kinetičkih parametara

```
modelADH[A_?NumberQ, B_?NumberQ] := (modelADH[A, B] = Module[{adh, t}, First[  
  adh /. NDSolve[{adh'[t] == A * mix[t] * xr[t] + B * xr[t], adh[0] == 0}, adh, {t, 0, tmax}]]])
```

```
nlmADH = NonlinearModelFit[adhm, {modelADH[A, B][t]}, {A, B}, t]
```

```
FittedModel[ InterpolatingFunction[{{0., 10.05}}, <>][t] ]
```

```
nlmADH["ParameterTable"]
```

	Estimate	Standard Error	t Statistic	P-Value
A	1.02524	0.114946	8.91935	0.0000197981
B	-0.189683	0.0245925	-7.71303	0.0000567472

