

Vladislav BLONSCHI
Angela LIS



Îndrumar

pentru lucrările practice și de laborator
la
Inginerie biochimică

$$C_wH_xO_yN_z + aO_2 + bNH_3 \rightarrow cCH_\alpha O_\beta N_\delta + fC_iH_kO_lN_m + dCO_2 + eH_2O$$



Chișinău 2025

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
Facultatea de Chimie și Tehnologie chimică
Departamentul Chimie industrială și ecologică
„Academician Gheorghe Duca”

Vladislav BLONSCHI, Angela LIS

Îndrumar
pentru lucrările practice și de laborator
la
Inginerie biochimică

Aprobat de
Consiliul Calității al USM
Proces verbal nr. 1 din 23 octombrie 2025

Chișinău 2025

CZU 606:577.1(076.5)

Recomandat
de Departamentul Chimie industrială și ecologică „Acad. Gheorghe Duca”
Proces verbal nr. 9 din 27 iunie 2025,
de Comisia de Asigurare a Calității a Facultății de Chimie și Tehnologie chimică
Proces verbal nr. 1 din 25 august 2025
și de Consiliul Facultății de Chimie și Tehnologie chimică
Proces verbal nr. 1 din 25 august 2025

Recenzenți:

***Liliana Cepoi**, dr. hab., conf. cercetător,* Director al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Universității Tehnice a Moldovei;

***Sergiu Calancea**, dr., conf. univ.,* Universitatea din Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Franța;

***Aliona Mereuța**, dr., conf. univ.,* Departamentul Chimie industrială și ecologică „Acad. Gheorghe Duca”, Universitatea de Stat din Moldova; Șef Direcția proiecte inovaționale, Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare.

DESCRIEREA CIP A CAMEREI NAŢIONALE A CĂRŢII DIN REPUBLICA MOLDOVA

Blonschi, Vladislav.

Îndrumar pentru lucrările practice şi de laborator la Inginerie biochimică / Vladislav Blonschi, Angela Lis ; Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Chimie şi Tehnologie Chimică, Departamentul Chimie Industrială şi Ecologică "Academician Gheorghe Duca". – Chişinău : Editura USM, 2025. – 150 p. : fig., tab.

Bibliogr.: p. 117-118 (22 tit.). – 20 ex.

ISBN 978-9975-62-932-4.

606:577.1(076.5)

B 58

ISBN 978-9975-62-932-4
© V. Blonschi, A. Lis, 2025
© Editura USM, 2025

Cuprins

1. BIOMOLECULE..... 6
Lucrare de laborator 1.1. Determinarea concentrației glucozei în substrat..... 7
Lucrare de laborator 1.2. Determinarea concentrației de amidon în substrat..... 8
Lucrare de laborator 1.3. Izolarea și determinarea cantitativă a ADN-ului..... 9
2. BIOCATALIZATORI ȘI CINETICA PROCESELOR ENZIMATICE..... 13
2.1. Particularități biologice ale microorganismelor..... 13
Lucrare de laborator 2.1. Controlul microbiologic al calității biocatalizatorului..... 22
2.2. Creșterea celulară și formarea produsului de interes..... 25
Lucrare practică 2.1. Probleme de calcul: viteza specifică de creștere a biocatalizatorului și stoechiometria ecuațiilor pseudochimice..... 34
2.3. Enzimele. Cinetica proceselor enzimatice..... 37
Lucrare de laborator 2.2. Compararea activității catalitice a enzimelor și a catalizatorilor anorganici..... 45
Lucrare de laborator 2.3. Studiul legităților cinetice ale hidrolizei enzimatice a proteinelor..... 45
3. PROIECTAREA UNUI PROCES BIOTEHNOLOGIC..... 50
3.1. Metabolismul celular – aspecte generale..... 50
Lucrare de laborator 3.1. Stabilirea parametrilor optimi ai procesului de fermentare alcoolică..... 54
Lucrare de laborator 3.2. Simularea și optimizarea fluxurilor metabolice..... 58
3.2. Indicatorii tehnici în operarea bioreactoarelor..... 60
Lucrare practică 3.1. Probleme de calcul: Stabilirea necesarului de putere, dispersiei gazului și a suspendării particulelor în bioamestec..... 69
3.3. Transfer de căldură și de masă în procese biotehnologice..... 76
Lucrare practică 3.2. Probleme de calcul: Transfer de căldură și de masă într-un proces biotehnologic..... 82
Lucrare de laborator 3.3. Simularea și optimizarea proceselor cu transfer de căldură în DWSIM..... 86

4. OPERAȚII UNITARE DE SEPARARE ȘI PURIFICARE A PRODUSULUI DE INTERES..... 90
Lucrare practică 4.1. Probleme de calcul: Operații de separare și purificare a produsului biotehnologic..... 101
Lucrare de laborator 4.1. Metode de separare și purificare a aminoacizilor dintr-un bioamestec..... 106
Lucrare de laborator 4.2. Analiza purității produsului biotehnologic de interes..... 109
Lucrare de laborator 4.3. Simularea proceselor de separare și purificare a produsului de interes în DWSIM..... 113
BIBLIOGRAFIE..... 117
ANEXE..... 119

PREFAȚĂ

Dezvoltarea economică rapidă la nivel global, industrializarea globală, resurse naturale epuizabile, poluarea mediului ambiant sunt doar câteva dintre problemele majore ale secolului XXI. Conservarea mediului și creșterea populației au impus schimbări majore în industria chimică clasică. Nevoia de materii prime sigure, ecologice și regenerabile a condus la dezvoltarea rapidă a biotehnologiei.

Biotehnologia substituie numeroase procese tehnologice clasice, cu obținerea unor produse de puritate înaltă și fără produse secundare toxice asupra mediului ambiant.

Biotehnologiile sunt constituite dintr-o succesiune de operații biochimice, mecanice, termice, fizico-chimice. Procesele biotehnologice trebuie minuțios proiectate de la scară de laborator la cea industrială, ceea ce constituie obiectul de studiu al *ingineriei biochimice.*

Îndrumarul de față are obiectivul de a prezenta și explica atât noțiunile teoretice fundamentale ale ingineriei biochimice, cât și de a realiza diverse calcule inginerești, inclusiv cu utilizarea software-urilor, la fiecare etapă a procesului biotehnologic în cadrul lucrărilor practice. De asemenea, sunt propuse o serie de lucrări de laborator vizând controlul calității materiei prime, biocatalizatori, studiul cineticii proceselor enzimatice și operațiile unitare de separare și purificare a produsului finit.

Îndrumarul contribuie la formarea competențelor viitorilor specialiști privind dezvoltarea și întreținerea proceselor inginerești în industria chimică și asigurarea calității și siguranței producției chimice. Materialul prezentat în lucrare este structurat în conformitate cu succesiunea etapelor unui proces biotehnologic și în baza curriculumului disciplinei la programele de studii *Tehnologie chimică industrială* și *Tehnologia produselor cosmetice și medicinale*, Ciclul I, licență, de la Facultatea de Chimie și Tehnologie chimică.

Acest îndrumar este prima lucrare publicată în domeniul ingineriei biochimice la departamentul Chimie industrială și ecologică „Acad. Gh. Duca”. Vom fi recunoscători specialiștilor pentru toate sugestiile spre ameliorarea prezentei ediții.

Autorii

1. BIOMOLECULE

Abilități:

- descrie proprietățile biologice și fizico-chimice ale biomoleculelor;

- determină corelația dintre structura și proprietățile fizico-chimice ale biomoleculelor;

- apreciază importanța biomoleculelor în calitate de materie primă și produs biotehnologic de interes;

- aplică metode analitice la determinarea concentrației componentelor în bioamestec.

Existența oricărui organism viu presupune biosinteza compușilor chimici rezultați din numeroase procese biochimice (metabolice), totalitatea cărora formează fenomenul vieții. Reieșind din specificul proceselor metabolice, compușii chimici naturali (de origine organică) pot fi clasificați în două categorii:

I. *Metaboliți primari* – compuși chimici naturali, polimerici și nepolimerici, care asigură realizarea proceselor biochimice fundamentale (respirația, înmulțirea, transmiterea informației ereditare, schimbul de energie și substanță cu mediul ambiant, acumularea biomasei).

II. *Metaboliți secundari* – compușii chimici sintetizați din metaboliții primari care au rol ecologic (atractanți, repelenți, adaptarea la condițiile nefavorabile de mediu ș.a.).

Grupul metaboliților primari este constituit din 4 clase fundamentale de substanțe:

1) hidrați de carbon (sau glucide, zaharuri, oze, carbohidrați);
2) proteine;
3) lipide;
4) acizi nucleici.

Grupul metaboliților secundari este cu mult mai vast; totuși, prin procese biotehnologice se obține o gamă restrânsă de acești compuși, cum ar fi flavonoide, carotenoizi, steroizi ș.a.

Rețineți!

În proiectarea unui proces biotehnologic biomoleculele pot avea rol de materie primă (substrat) și/sau produs de interes.

Notă!

Descrierea, răspândirea în biosferă, proprietățile biologice și fizico-chimice ale biomoleculelor pot fi consultate în anexele 1– 4. Noțiunile teoretice din anexele 1–4, propuse pentru **recapitulare**, sunt structurate astfel încât să fie scoase în evidență aspectele relevante în proiectarea proceselor biotehnologice.

Lucrare de laborator 1.1. Determinarea concentrației glucozei în substrat

Scopul lucrării constă în determinarea concentrației totale a glucidelor în proba de analizat cu utilizarea antronei.

Principiul metodei constă în hidroliza inițială a glucidelor până la monoglucide, care, în mediul acid, prin deshidratare intramoleculară formează furfuralaldehide. În mediul acid, furfuralaldehidele pot interacționa cu antrona prin reacția de condensare, cu formarea unui produs de culoare verde intensă ce prezintă o bandă de absorbție la lungimea de undă 630 nm. În cazul glucozei, prin deshidratare intramoleculară se formează 5-hidroxi-metilfurfuralul, care ulterior condensează cu antrona:

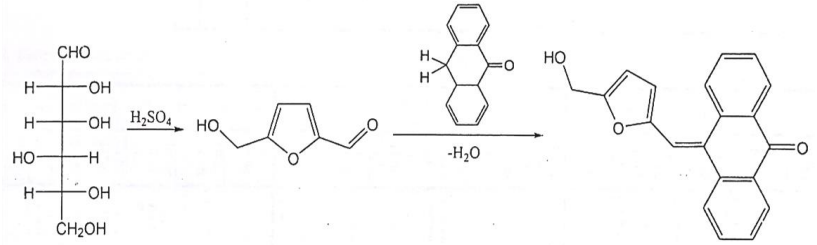


Figura 1.1. Ecuația reacției de formare a cromoforului verde la interacțiunea glucozei cu antrona

Modul de lucru:

Prepararea soluției de antronă: 200 mg antronă se dizolvă în 100 mL H_2SO_4 95%.

Prepararea soluției de glucoză: 100 mg glucoză se dizolvă în 100 mL apă distilată (*Soluția 1*). 10 mL din *Soluția 1* se diluează până la 100 mL cu apă distilată (*Soluția de lucru*).

- ✓ se prepară soluțiile de glucoză prin diluția din *Soluția de lucru*; se adaugă volumele indicate de apă distilată și antronă, conform tabelului 1.1;
- ✓ soluțiile obținute sunt încălzite pe o baie de apă (80-100^{0}C) timp de 8 minute, apoi se lasă să se răcească pe o baie de gheață;

- ✓ se înregistrează spectrele UV-Vis ale soluțiilor preparate în intervalul lungimii de undă a maximului de absorbție. Această lungime de undă se indică în tabelul 1.1 (A(λ, nm));

Tabelul 1.1. Volumele soluțiilor necesare pentru construirea curbei de calibrare

V_{sol}(glucoză), mL	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
V($H_2O_{dist.}$), mL	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
V(antronă), mL	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
C(glucoză), M										
A (λ, nm)										

- ✓ se înregistrează valorile absorbanței pentru soluțiile preparate la lungimea de undă de absorbție maximală înregistrată în raport cu *soluția de referință* (3 mL antronă și 1 mL apă distilată);
- ✓ se construiește curba de calibrare C(glucoză)= f(A) și se deduce ecuația dreptei;
- ✓ se înregistrează valoarea absorbanței pentru proba analizată (de concentrație necunoscută);
- ✓ se calculează concentrația glucozei.

Lucrare de laborator 1.2. Determinarea concentrației de amidon în substrat

Scopul lucrării constă în determinarea concentrației de amidon în amestecul analizat.

Modul de lucru:

Prepararea soluției de amidon: 1 g amidon se dizolvă la fierbere în 100 mL apă distilată (*Soluția 1*). 20 mL din *Soluția 1* se diluează până la 100 mL cu apă distilată (*Soluția de lucru*).

Prepararea soluției de I_2+KI: 1 g KI și 1,52 g I_2 se dizolvă în 100 mL apă distilată.

- ✓ conform tabelului 1.2, la un volum soluție de amidon se adaugă 2 mL soluție HCl 1 M, 0,2 mL soluție I_2+KI și un volum de apă distilată până la volumul final de 10 mL;

- ✓ se înregistrează spectrele UV-Vis ale soluțiilor preparate în intervalul lungimii de undă a maximului de absorbție (λ_{max}=610 nm). Această lungime de undă se indică în tabelul 1.2 (A(λ, nm);

Tabelul 1.2. Volumele soluțiilor necesare pentru construirea curbei de calibrare

V_{sol}(amidon), mL	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
V(I_2+KI), mL	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
V(HCl), mL	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
V($H_2O_{dist.}$), mL	7,6	7,4	7,2	7,0	6,8	6,6	6,4	6,2	6,0	5,8
C(amidon), mg/L										
A (λ, nm)										

- ✓ se înregistrează valorile absorbanței pentru soluțiile preparate la lungimea de undă de absorbție maximală înregistrată în raport cu *soluția de referință* (7,8 mL apă distilată, 2 mL HCl 1 M și 0,2 mL I_2+KI);
- ✓ se construiește curba de calibrare C(amidon)= f(A) și se deduce ecuația dreptei;
- ✓ se înregistrează valoarea absorbanței pentru proba analizată (de concentrație necunoscută);
- ✓ se calculează concentrația amidonului.

Lucrare de laborator 1.3. Izolarea și determinarea cantitativă a ADN-ului

Scopul lucrării constă în izolarea ADN-ului din surse biologice simple (ceapă, microorganisme), evaluarea calitativă și cantitativă prin spectrofotometria UV și în determinarea purității acestuia.

Reactivi specifici:

1. Soluție de extracție a ADN-ului din țesuturi vegetale: 1,5 g NaCl și 5 mL de dodecil sulfat de sodiu (SDS), sau detergent lichid de vase fără adaos de enzime și parfumuri, se dizolvă în 100 mL apă distilată.

2. Soluție de extracție a ADN-ului din microorganisme: se prepară volumul necesar de soluție, în care componentele vor avea următoarele concentrații finale: Tris-HCl – 10 mM, EDTA – 1 mM, SDS – 0,5%. Se măsoară pH-ul soluției și se ajustează, după caz, cu soluție de HCl 1 M sau de NaOH 1 M.

Modul de lucru:

1. Izolarea ADN-ului din țesuturi vegetale:

- ✓ 10 g ceapă se mărunțește, prin zdrobire, într-un mojar, în care se adaugă 10 mL soluție de extracție a ADN-ului din țesuturile vegetale;
- ✓ amestecul se filtrează prin tifon, filtratul se lasă 10 minute pentru ca surfactantul din soluția de extracție să producă liza membranelor celulare;
- ✓ într-un vas se adaugă 2-3 mL filtrat și un volum egal de etanol 96% rece; se observă formarea unui strat deasupra fazei apoase;
- ✓ peste 5-10 minute se observă apariția filamentelor de ADN la interfață;
- ✓ cu ajutorul unei anse sau pipete se colectează filamentele de ADN într-un vas, unde se adaugă o cantitate mică de apă distilată pentru solubilizarea ADN-ului colectat.

2. Izolarea ADN-ului din microorganisme:

- ✓ se centrifughează 1,5 mL de cultură lichidă de microorganisme la 8000 rpm timp de 2 minute sau se răzuiește un strat gros de pe plăcuța cu agar;
- ✓ supernatantul se elimină, iar la sediment se adaugă 200 µL soluție de extracție a ADN-ului din microorganisme;
- ✓ amestecul se incubează 5 minute la temperatura de 60^0C, sau 10 minute la temperatura camerei;
- ✓ se adaugă 100 µL soluție NaCl 5 M și 200 µL cloroform;
- ✓ amestecul se centrifughează la 10000 rpm timp de 5 minute și se colectează supernatantul;
- ✓ la fracția colectată se adaugă două volume de etanol 96% rece;
- ✓ se incubează timp de 10 minute la temperatura de -20^0C;
- ✓ amestecul se centrifughează la 10000 rpm timp de 5 minute;
- ✓ supernatantul se elimină, iar precipitatul se solubilizează în 50- 100 µL apă distilată.

3. Determinarea spectrofotometrică a ADN-ului izolat:

- ✓ se înregistrează spectrul UV al soluției apoase de ADN și se identifică maximul de absorbție;
- ✓ se înregistrează absorbanța la lungimile de undă λ= 230 nm, λ= 260 nm și λ= 280 nm;
- ✓ se calculează concentrația ADN-ului ținând cont că valoarea absorbanței egală cu 1 la lungimea de undă λ= 260 nm corespunde concentrației de 50 µg/mL ADN dublu catenar:

$C_{ADN}\left(\mu g/mL\right) = A_{260} \cdot 50 \cdot n$, unde: (1.1)

n – factorul de diluție.

- ✓ se stabilește gradul de contaminare proteică (sau cu ARN) a extractului prin calcularea raportului A_{260}/A_{280}. Raportul optim este cuprins în intervalul 1,8 - 2,0. Un raport mai mic de 1,8 indică contaminarea cu proteine, iar un raport mai mare de 2,0 – contaminarea cu ARN;
- ✓ se stabilește gradul de contaminare cu săruri, polizaharide și cu alte impurități decât cele proteice și ARN prin calcularea raportului A_{260}/A_{230}. Raportul optim este cuprins în intervalul 2,0 - 2,2. Un raport mai mic de 1,8 indică contaminarea probei.

Important!

Un raport scăzut A_{260}/A_{230} poate afecta reacțiile ulterioare cu utilizarea ADN-ului izolat. În acest caz este necesară o purificare suplimentară înainte de utilizare în aplicații moleculare sensibile.

Sarcini de evaluare și de autoevaluare

I. Hidrați de carbon

1. Numiți și explicați succint proprietățile biologice ale hidraților de carbon.

2. Scrieți ecuația reacției de formare a dizaharidelor la interacțiunea următoarelor monozaharide:

a) α-D-glucopiranoza și α -D-glucopiranoza, ordinea de legare (1→4)

b) α -D-glucopiranoza și α -D-glucopiranoza, ordinea de legare (1→1).

Numiți dizaharida ***a***. Dizaharida ***b*** se numește ***trehaloză*** și se conține în fungii (drojdie, mucegai), insecte, alge. Care din aceste dizaharide sunt reducătoare? Argumentați.

3. Explicați de ce în formularea mediului de cultură în procesele biotehnologice se folosesc aminoacizii ***L*** și hidrații de carbon ***D***.

4. Explicați diferențele structurale dintre amidon, glicogen și celuloză. Explicați particularitățile hidrolizei enzimatice a polizaharidelor.

5. Argumentați utilitatea metodelor chimice cantitative în cadrul unui proces biotehnologic.

II. Proteine

6. Numiți și explicați succint proprietățile biologice ale proteinelor.

7. Scrieți formulele de structură ale izomerilor ***L*** și ***D*** pentru alanină, valină, cisteină.

8. Scrieți ecuațiile reacțiilor ce reprezintă proprietățile acido-bazice ale fenilalaninei (Phe). Calculați și explicați valoarea pI pentru Phe dacă pK_{a1}(-COOH) 1,83 și pK_{a2} (-NH_2) 9,39.

9. Explicați noțiunea de denaturare proteică și utilitatea acestei proprietăți într-un proces biotehnologic dacă produsul de interes ar fi o proteină.

10. Argumentați necesitatea utilizării metodelor cantitative în monitorizarea unui proces biotehnologic de obținere a aminoacizilor.

III. Lipide

11. Numiți și explicați succint proprietățile biologice ale lipidelor.

12. Scrieți formulele de structură ale lipidelor:

a) 1-Oleoil-2,3-dipalmitoil-glicerol,
b) 1-Oleoil-2-palmitoil-fosfatidilserină,
c) 1-Oleoil-2-palmitoil-fosfatidilglicerol.

13. În baza proprietăților fizico-chimice ale lipidelor propuneți analize chimice pentru controlul calității lipidelor complexe utilizate într-un proces biotehnologic.

14. Explicați de ce natura chimică a lipidelor complexe este un factor decisiv la proiectarea unui proces biotehnologic în care produsul de interes este intracelular.

15. Argumentați importanța proceselor biotehnologice în producerea industrială a steroizilor.

IV. Acizi nucleici

16. Numiți și explicați succint proprietățile biologice ale nucleotidelor și ale acizilor nucleici.

17. Scrieți ecuațiile reacțiilor de formare a nucleotidelor:

a) guanozin-5'-fosfat,
b) deoxiadenozin-5'-fosfat,
c) citidin-5'-fosfat.

18. Comparați particularitățile structurale ale acizilor nucleici.

19. Argumentați necesitatea utilizării metodelor cantitative în monitorizarea unui proces biotehnologic de izolare a acizilor nucleici.

20. Explicați succint noțiunile de replicare a ADN-ului, transcripție și translație în cadrul biosintezei proteice.

2. BIOCATALIZATORI ŞI CINETICA PROCESELOR ENZIMATICE

Abilităţi:

- compară structura celulară a bacteriilor, fungiilor, celulelor animale şi vegetale;

- explică etapele creşterii celulare şi calculează viteza creşterii celulare;

- efectuează calcule conform ecuaţiilor stoechiometrice ale creşterii celulare şi formării produselor;

- enumeră particularităţile reacţiilor enzimatice;

- explică factorii care influenţează viteza reacţiilor enzimatice;

- compară şi explică tipurile de inhibiţie enzimatică.

Apariţia ingineriei biochimice se datorează dezvoltării cu paşi rapizi în ultimii ani a biotehnologiei, produsele căreia au o gamă largă de aplicare (Tab. 2.1).

Tabelul 2.1. Domenii de aplicare a unor produse biotehnologice

Domeniul de aplicare	**Produse biotehnologice**
industria farmaceutică	antibiotice, hormoni, vaccinuri, antigeni, vitamine, enzime
agricultură	pesticide biologice
industria chimică	acid acetic, acetonă, etanol, aminoacizi, enzime, lipide, biopolimeri
protecţia mediului	epurarea apelor reziduale, bioconcentrare, controlul poluării
bioelectronică	biosenzori, biocipuri
industria alimentară	vinuri, bere, produse lactate, panificaţie

Ingineria biochimică se ocupă de proiectarea proceselor biotehnologice cu utilizarea **microorganismelor** sau **enzimelor**, numite **biocatalizatori** (Fig. 2.1). Prin urmare, la etapa de proiectare a acestor procese este necesară cunoaşterea particularităţilor biocatalizatorilor.

2.1. Particularităţi biologice ale microorganismelor

Microorganismele pot fi *procariote* (celula este lipsită de nucleu, ADN-ul este dispus în citoplasmă) şi *eucariote* (ADN-ul se conţine în nucleul celular) (Fig. 2.1).

Microorganismele procariote. Dimensiunile procariotelor variază de la 0,5 la 3,0 μm şi pot avea diferite forme (Tab. 2.2).

Rețineți!

La etapa de proiectare a unui proces biotehnologic o atenție deosebită se acordă obținerii biocatalizatorilor eficienți și stabili în condițiile de scalare ale procesului. Uneori pentru a adapta și/sau a mări productivitatea biocatalizatorului acesta poate fi modificat genetic. În cazul utilizării unui microorganism modificat genetic se ține cont și de stabilitatea genetică a acestuia (se diminuează riscurile apariției mutațiilor genetice).

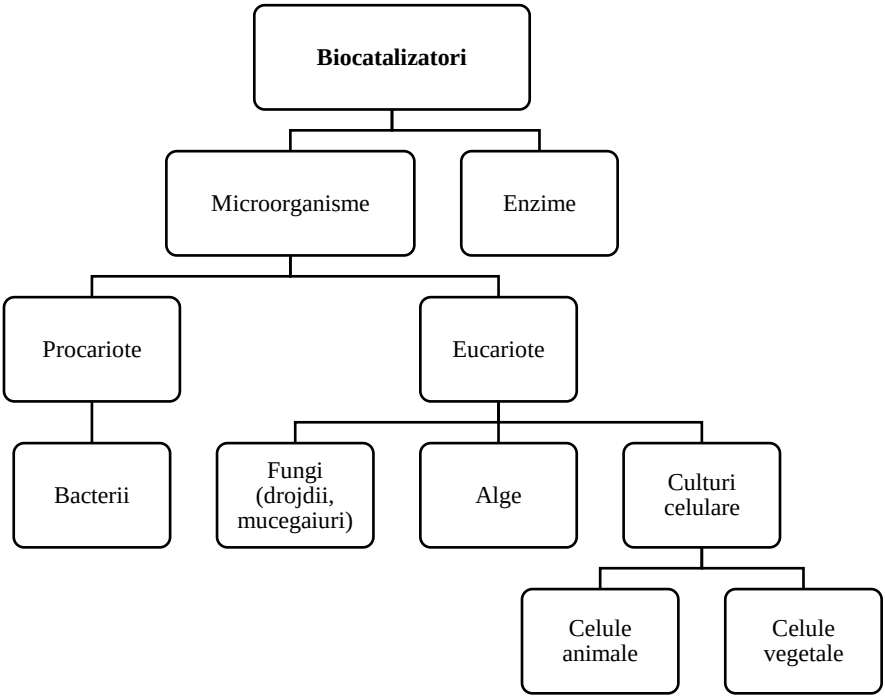
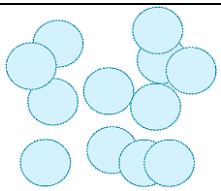
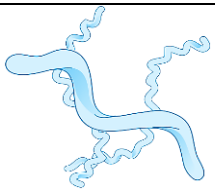


Figura 2.1. Tipuri de biocatalizatori utilizați în biotehnologie

Tabelul 2.2. Formele microorganismelor procariote

Forma	Reprezentarea schematică	Reprezentanți
sferică		*Cocci*
cilindrică (bacili)		*Bacilli*
spiralată		*Rhodospirillum*

Structura celulară a bacteriilor este prezentată de: flagel, capsulă, perete celular, membrană plasmatică, citoplasmă, ribozomi, acizi nucleici, pili (Fig. 2.2).

Important!

Componentele structurii celulare a bacteriilor:

1. **Capsula** este formată din polizaharide și are funcția de transport al substanțelor din și în interiorul celulei, protecție și de aderare la suprafață.
2. **Peretele celular** este format din membrana externă (strat bilipidic cu proteine și lipozaharide) și stratul de peptidoglican.
3. **Membrana plasmatică** reprezintă un strat bilipidic cu proteine integrate, semiintegrate și/sau periferice. Membrana conține 50% proteine, 30% lipide și 20% hidrați de carbon.
4. **Citoplasma** este mediul intern al celulei ce conține 70-80% apă, hidrați de carbon, ioni metalici, aminoacizi, acizi nucleici, ribozomi ș.a.
5. **Flagelul** este responsabil de motilitatea celulei. Bacteriile pot fi dotate cu unul sau mai mulți flageli.
6. **Pilii** au diverse funcții, dintre care atașare la suprafețe, motilitate, înmulțire.

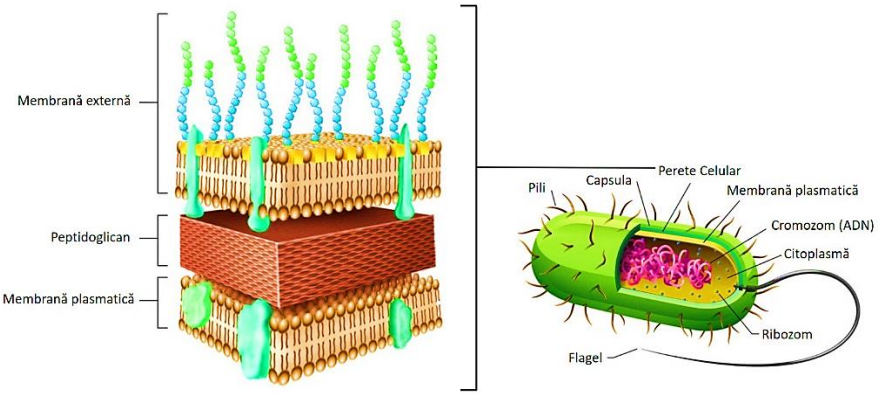
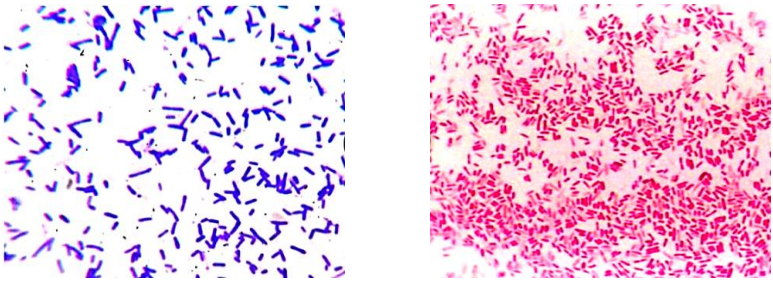


Figura 2.2. Structura celulară a bacteriilor Gram-negative

Bacteriile se clasifică în două clase după structura peretelui celular. Experimental, distincția se efectuează cu ajutorul *testului Gram*, respectiv se deosebesc bacterii **Gram-negative (G-)** și **Gram-pozitive (G+)** (Fig. 2.3). Diferența dintre aceste două tipuri de bacterii constă în prezența membranei externe a peretelui celular (Fig. 2.2) la bacteriile (**G-**) și în absența acesteia la cele (**G+**).



Bacterii Gram-pozitive **Bacterii Gram-negative**

Figura 2.3. Reprezentarea schematică a testului Gram

Important!

Grație lipsei membranei externe a peretelui celular, bacteriile (**G+**) elimină mai ușor proteinele, proprietate importantă la proiectarea etapelor de separare și purificare a produsului de interes (proteina).

Rețineți!

Bacteria *Mycoplasma* nu are membrana externă a peretelui celular, dar este (**G-**). Este un contaminant întâlnit în bioprocesele industriale ce decurg cu participarea celulelor animale. *Mycoplasma* provoacă diferite infecții în organismul uman, la nivelul: organelor genitale, plămânilor, pielii, tractului urinar.

În funcție de sursa de energie și nutrienți, bacteriile se clasifică în câteva grupe (Fig. 2.4), comun pentru toate fiind necesarul de azot, fosfor, sulf, ioni metalici ș.a.

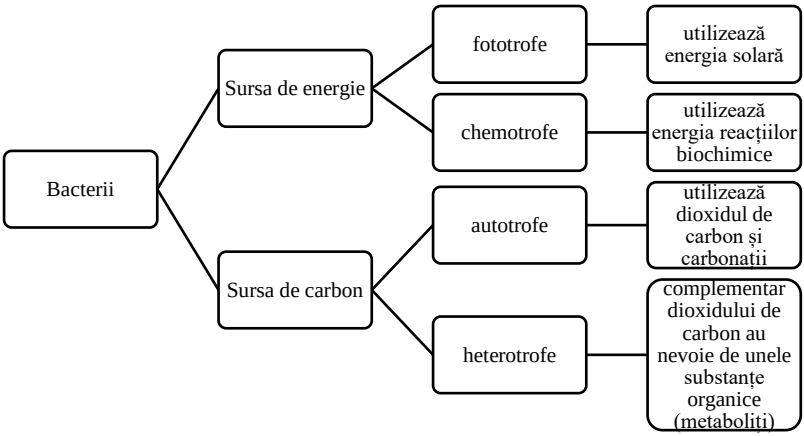


Figura 2.4. Clasificarea bacteriilor după necesarul de energie și nutrienți

O proprietate biologică importantă în proiectarea bioproceselor este dividerea bacteriilor, care determină cinetica proceselor biotehnologice. Dividerea celulelor bacteriene se numește ***dividere binară*** (Fig. 2.5) și cuprinde 4 etape:

1. Elongarea celulei și replicarea ADN-ului;
2. Constricția membranei plasmatice și începerea formării peretelui celular;
3. Terminarea formării peretului celular și separarea celor două copii de ADN;
4. Separarea celulelor bacteriene.

Prin *dividere binară* o celulă formează două celule, care, la rândul lor, vor forma patru celule ș.a.m.d. Timpul necesar pentru dividerea unei celule (sau ca populația celulară să se dubleze) se numește ***timp de dublare***.

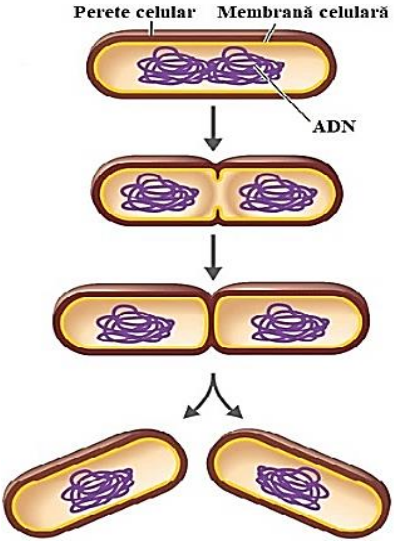


Figura 2.5. Dividerea binară a bacteriilor

Microorganismele eucariote. Dimensiunile eucariotelor variază de la 5 la 10 ori mai mari decât celulele procariotelor, dintre care celulele animale sunt de cca 10 µm și celulele vegetale de 20 µm. Microorganismele eucariote au nucleu și organite celulare (Fig. 2.6).

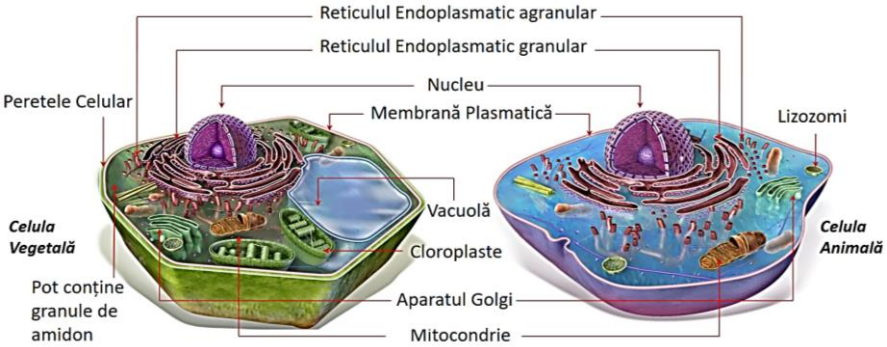


Figura 2.6. Structura celulei vegetale și a celei animale

Rețineți!

Caracteristicile organitelor celulare:

Nucleul este delimitat printr-o membrană poroasă ce conține ADN-ul și nucleolul implicat în sinteza ribozomilor.

Reticulul endoplasmatic granular este un sistem de canalicule ce conține ribozomi și care este situat în apropierea nucleului; este implicat în sinteza proteinelor.

Reticulul endoplasmatic agranular este un sistem de canalicule implicat în sinteza lipidelor.

Mitocondriile sunt responsabile de energia celulară (ATP) obținută în procesul de respirație celulară. Mitocondriile au propriul ADN și se reproduc independent de celulă.

Aparatul Golgi este un sistem membranar responsabil de secreția unor proteine. În aparatul Golgi are loc glicozilarea unor proteine.

Membrana plasmatică este un strat bilipidic cu proteine integrate, semiintegrate și periferice și cu steroli care conferă rigiditate membranei.

Vacuolele (*celula vegetală*) sunt implicate în digestia nutrienților, reglarea osmotică, stocarea substanțelor secundare; ocupă până la 90% din celula vegetală.

Cloroplastele (*celula vegetală*) conțin clorofilă și sunt responsabile de procesul de fotosinteză. Cloroplastele sunt formate din tilacoizi (membrane interne bilipidice). Cloroplastele au propriul ADN.

Peretele celular (*celula vegetală*) este format din celuloză și conferă rigiditate celulei.

Lizozomii (*celula animală*) conțin și eliberează enzime digestive.

Un grup numeros din microorganismele eucariote, utilizate în diferite procese biotehnologice, sunt ***drojdiile*** sau ***levurile***, care au forma ovală cu dimensiunile medii de 4-15 μm (Fig. 2.7). O cultură este formată din mai multe organisme monocelulare.

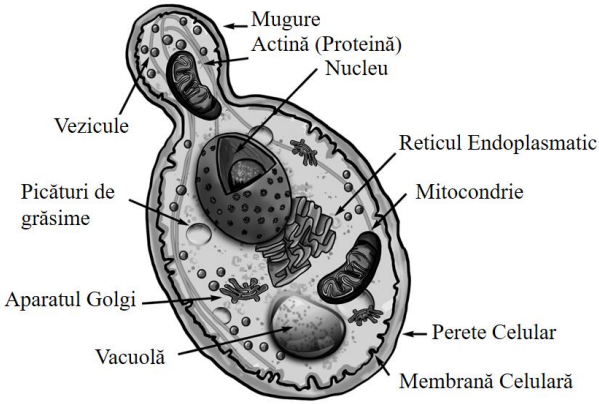


Figura 2.7. Structura celulei de drojdie

Drojdiile se pot înmulți *asexuat* și *sexuat*. Înmulțirea asexuată este numită și ***înmugurire***. Odată cu formarea mugurelui are loc duplicarea ADN-ului (16 cromozomi, haploid), înglobarea unor organite celulare și, la un moment dat, celula fiică se desprinde de celula-mamă (① Fig. 2.8). În acest caz înmulțirea este similară bacteriilor.

Înmulțirea sexuată presupune fuzionarea a două *celule haploide* (16 cromozomi). Celulele haploide (② Fig. 2.8) prin eliberare de feromoni devin distincte (a și α), ceea ce face posibilă fuzionarea și formarea unei *celule diploide* (32 cromozomi) numite *zigote.* Majoritatea drojdiilor în natură sunt diploide. Zigotele se pot înmulți prin înmugurire și pot forma celule diploide (① Fig. 2.8) sau *ascospori* (condiții de stres, ex: lipsa nutrienților) (③ Fig. 2.8). Pentru a forma ascospori nucleul zigotelui se înmulțește de mai multe ori. Ascosporul poate forma celule haploide care ulterior se vor divide prin înmugurire.

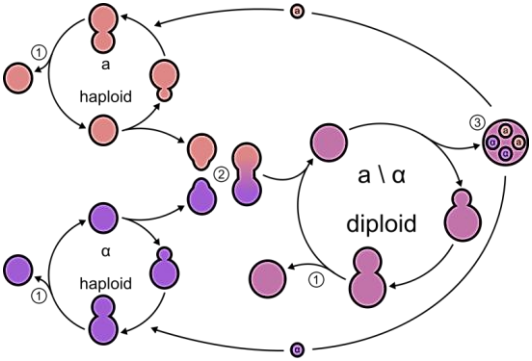


Figura 2.8. Reprezentarea schematică a înmulțirii asexuate și sexuate a drojdiilor

Al doilea grup numeros de microorganisme eucariote, valorificat în biotehnologie, este grupul ***mucegaiurilor.*** Mucegaiul este un organism saprofit, crește pe substraturi în descompunere (legume, fructe, carne).

Mucegaiul are structură de *miceliu*. Miceliul este format din numeroase tuburi lungi (hife) ce conțin citoplasmă și mai mulți nuclei. În majoritatea cazurilor hifele sunt compartimentate, *hife septate*. În unele cazuri hifele sunt lipsite de compartimente, *hife coenocite* (Fig. 2.9).

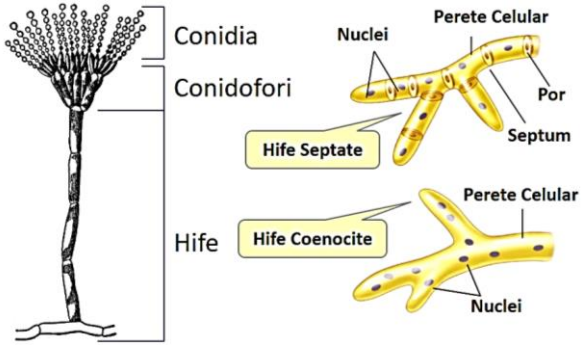


Figura 2.9 Structura celulei de mucegai

Porțiunea hifei care obține nutrienți se numește *vegetativă*. Porțiunea responsabilă de reproducere este cea aeriană, care formează sporii asexuați (*conidia*). Sporii sunt ulterior eliberați și, odată ajunși în condiții favorabile, germinează cu formarea unei noi hife. Hifele cresc și se dezvoltă formând miceliu (Fig. 2.10). Unele mucegaiuri se reproduc sexuat formând spori sexuați.

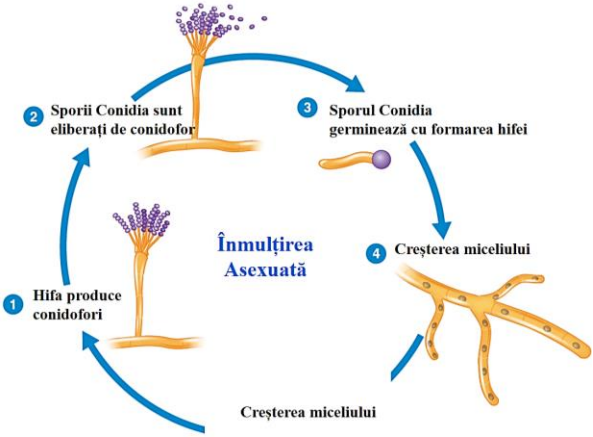


Figura 2.10. Reprezentarea schematică a înmulțirii asexuate a mucegaiului

Lucrare de laborator 2.1. Controlul microbiologic al calității biocatalizatorului

2.1.1. Determinarea stării morfologice a drojdiei

Scopul lucrării constă în determinarea calitativă la microscop a stării morfologice a drojdiilor *Saccharomyces Cerevisiae* în diferite procese biologice modelate.

Modul de lucru:

1. Pregătirea sistemelor model:

- ✓ în două baloane Erlenmeyer cu volumul 250 mL se adaugă câte 80 mL apă distilată încălzită la temperatura de 40^0C;
- ✓ într-un balon se adaugă 5 g zaharoză și se agită până la dizolvare;
- ✓ în ambele baloane se adaugă câte 4 g drojdie uscată și se agită.

2. Analiza stării morfologice la microscop:

- ✓ după prepararea sistemelor model pe două lame microscopice se adaugă, separat, câte o picătură de amestec obținut și se plasează lamela deasupra suspensiei. Excesul de apă este îndepărtat cu hârtie de filtru;
- ✓ se selectează obiectivul microscopului 40x, se plasează micropreparatul și se cercetează starea morfologică a drojdiei. Se acordă atenție formei, dimensiunii celulelor, grosimii membranelor, structurii citoplasmei, prezenței formării celulelor tinere;

Descrierea generală a structurii morfologice a drojdiilor. Celulele trebuie să fie uniforme ca mărime, cu o membrană subțire, citoplasmă omogenă sau cu granulație fină, fără vacuole mari. Prezența unui număr mare de celule modificate morfologic indică degenerarea culturii; citoplasma granulară, vacuolele mari și absența formării celulelor tinere caracterizează cultura veche.

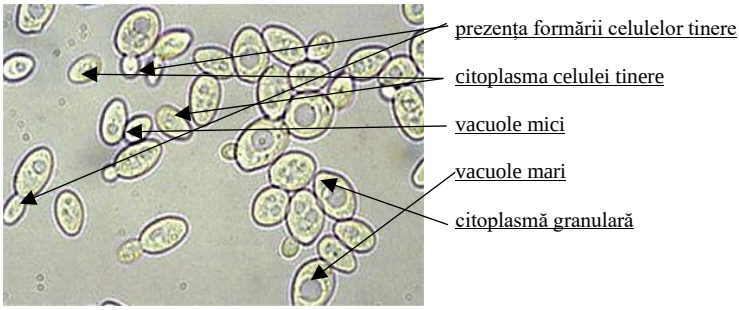


Figura 2.11. Imaginea la microscop a drojdiilor *Saccharomyces Cerevisiae*

- ✓ cercetarea la microscop a stării morfologice a drojdiilor din ambele sisteme modelate se repetă după 30 și 60 de minute, de fiecare dată obținând un micropreparat proaspăt;
- ✓ în baza observațiilor la microscop se fac concluzii referitor la starea morfologică în timp a drojdiilor în condiții optime de dezvoltare și în lipsa acestora (sistemul fără adăugare de zaharoză).

2.1.2. Determinarea conținutului procentual de celule moarte

Scopul lucrării constă în determinarea la microscop a conținutului procentual de celule moarte de *Saccharomyces Cerevisiae* în procesele biologice modelate.

Modul de lucru:

a) Utilizarea colorantului albastru de metilen (50 mg colorant se dizolvă în 250 mL apă distilată):

- ✓ o picătură de suspensie de drojdie diluată și o picătură de soluție de albastru de metilen se aplică pe o lamă de sticlă;
- ✓ după 2 minute preparatul se acoperă cu o lamelă, excesul de apă este îndepărtat cu hârtie de filtru;
- ✓ microscopia se efectuează în 5 câmpuri vizuale. În fiecare dintre câmpurile analizate se stabilește numărul tuturor celulelor de drojdii și separat numărul de celule moarte (de culoare albastră);
- ✓ se calculează conținutul procentual de celule moarte.

b) Utilizarea colorantului roșu neutru (25 mg colorant se dizolvă în 250 mL apă distilată):

- ✓ o picătură de suspensie de drojdie diluată și o picătură de soluție de roșu neutru se aplică pe o lamă de sticlă;
- ✓ după 15 minute preparatul se acoperă cu o lamelă, excesul de apă este îndepărtat cu hârtie de filtru;
- ✓ microscopia se efectuează în 5 câmpuri vizuale. În fiecare dintre câmpurile analizate se stabilește numărul tuturor celulelor de drojdii și separat numărul de celule moarte (de culoare roșie);
- ✓ se calculează conținutul procentual de celule moarte.

Atenție!

La utilizarea colorantului roșu neutru, în celulele vii *se colorează incluziunile citoplasmatice* (substanţele de rezervă: proteine, lipide, glucide, vitamine, minerale, produşi de elaborare: granule de zimogen, granule de pigment, hormoni etc). Utilizarea acestui colorant necesită o cercetare microscopică minuțioasă.

2.1.3. Determinarea substanțelor de rezervă în celulele de drojdie

Scopul lucrării constă în determinarea calitativă a prezenței glicogenului în celulele de drojdii și în evaluarea activității de fermentare a acestora.

Rețineți!

Glicogenul este polizaharida de stocare a celulei de drojdie. Dacă există puțin glicogen în drojdie, atunci acest fapt indică lipsa substratului nutritiv și, prin urmare, are o activitate de fermentare scăzută.

Modul de lucru:

- ✓ pentru a determina glicogenul, o picătură de suspensie de drojdie diluată și o picătură de soluție de iod 0,5% sunt aplicate pe o lamă de sticlă;
- ✓ după 2-3 minute citoplasma celulelor devine galbenă deschis, iar granulele de glicogen devin roșu-maroniu;
- ✓ preparatul este acoperit cu o lamelă și excesul de lichid este îndepărtat cu hârtie de filtru;
- ✓ preparatul se examinează la microscop cu obiectivul 40x.

2.1.4. Determinarea concentrației de celule viabile exprimate în unități formatoare de colonii

Scopul lucrării constă în determinarea concentrației de celule viabile dintr-o probă prin numărarea unităților formatoare de colonii (CFU) pentru evaluarea intensității fermentării unui bioproces.

Modul de lucru:

- ✓ proba de analizat (suspensia de drojdie) se omogenizează;
- ✓ se prepară, prin diluții zecimale în lanț (10^{-1}... 10^{-6}), probele de lucru, utilizând soluția de NaCl 0,9%. De exemplu, proba de lucru cu diluția 10^{-1} se prepară prin diluția a 1 mL probă de analizat cu 9 mL soluție NaCl 0,9%;

- ✓ se pipetează, separat, câte 100 µL din fiecare soluție de lucru pe cești Petri cu agar YPD sau alt mediu nutritiv specific pentru drojdii;
- ✓ se uniformizează soluția adăugată pe toată suprafața cești Petri;
- ✓ cești Petri se incubează la temperatura de 30^0C timp de 24-48 de ore (până la formarea coloniilor vizibile);
- ✓ se selectează cești care conțin 30-300 de colonii bine separate;
- ✓ manual sau cu ajutorul contorului de colonii se numără coloniile;
- ✓ se calculează numărul de unități formatoare de colonii:

$$CFU/_{mL} = \frac{numărul\ de\ colonii \cdot 10}{diluția\ efectuată}$$

2.2. Creșterea celulară și formarea produsului de interes

Creșterea celulară implică replicarea celulelor (dividerea celulelor) și mărirea dimensiunilor acestora, proces ce decurge în 4 faze (Fig. 2.12). Într-un mediu nutritiv echilibrat microorganismele vor converti nutrienții în *energie* (ATP), *procesele de biosinteză generale* și *de biosinteză a produsului de interes*.

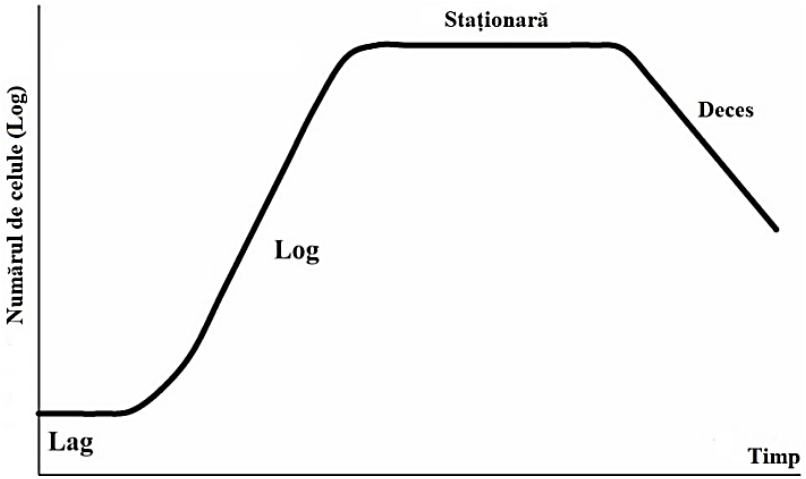


Figura 2.12. Fazele creșterii celulare a microorganismelor într-un proces discontinuu

Rețineți!

1. Faza lag reprezintă etapa de adaptare a celulelor la noile condiții;
2. Faza log – faza de creștere exponențială a celulelor adaptate. Are loc biosinteza metaboliților primari;
3. Faza staționară reprezintă o stare de echilibru, unde numărul celulelor formate este egal cu numărul celulelor moarte. Celulele mature pot să producă metaboliții secundari.
4. Faza de deces reprezintă etapa de deces al celulelor.
Faza log (creșterea exponențială) se numește **Trofofază** – metaboliții primari sunt produși în cele mai mari cantități.
Faza staționară se numește **Idiofază** – în procesele biochimice metaboliții secundari sunt produși în cele mai mari cantități.

Faza lag este faza imediată după inoculare și presupune adaptarea microorganismelor la noile condiții. În funcție de compoziția mediului, microorganismele vor activa biosinteza unor enzime (ex.: producerea unor enzime necesare metabolizării substratului) și stopa producerea altor enzime, care nu sunt necesare în condițiile date. Pentru a micșora durata fazei lag celulele trebuie să se adapteze compoziției mediului înainte de inoculare. Lipsa unor nutrienți sau factori necesari pentru creștere poate extinde faza lag. În acest caz compoziția mediului trebuie ajustată.

Odată ce celulele s-au adaptat la noul mediu, acestea intră în *faza log*. Dividerea celulară are loc cu o rată din ce în ce mai mare până la atingerea vitezei maxime de creștere (μ_{max}) pentru condițiile specifice fermentației discontinue. În acest moment începe creșterea exponențială și numărul de celule (biomasă) crește cu o viteză constantă. Pentru biomasa celulară, creșterea poate fi considerată o reacție autocatalitică. Prin urmare, viteza de creștere depinde de concentrația de biomasă, adică de catalizator, care este prezent la un moment dat. Acest proces poate fi descris în felul următor:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{net} x \text{ , unde:} \qquad (2.1)$$

x – concentrația biomasei, g/L;
μ_{net} – viteza specifică de creștere, h^{-1};
t – timpul, h.

Ecuația 2.1 poate fi rearanjată pentru a exprima viteza specifică de creștere:

$$\mu_{net} = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \qquad (2.2)$$

Ecuația 2.1 poate fi integrată:

$x_t = x_0 \cdot e^{\mu_{net} t}$, unde: (2.3)

x_t – concentrația biomasei la timpul t;

x_0 – concentrația biomasei la timpul t_0;

e – baza logaritmului natural.

După logaritmarea ecuației 2.3 se obține:

$$lnx_t = lnx_0 + \mu_{net} t \quad (2.4)$$

Din ecuația 2.4 se exprimă viteza specifică de creștere:

$$\boldsymbol{\mu_{net} t = ln \frac{x_t}{x_0}} \quad (2.5)$$

La creșterea exponențială, când toți nutrienții sunt în exces, există o legătură directă între numărul de celule și concentrația biomasei, presupunând că mărimea celulelor este constantă. Un astfel de proces este numit creștere echilibrată și reprezintă dependența directă dintre *viteza specifică de creștere* și *timpul de dublare* (timpul în care populația își dublează numărul).

Dacă se consideră cazul când la timpul t_0 concentrația biomasei este x_0, iar după un interval de timp (t) de creștere exponențială, echivalent cu *timpul de dublare* (τ_d), biomasa se va dubla la $2x_0$, adică $x_t = 2x_0$, când $t=\tau_d$. Substituind ecuațiile obținute în ecuația 2.3 se obține:

$$2x_0 = x_0 \cdot e^{\mu_{net} \tau_d} \quad (2.6)$$

După logaritmare, ecuația 2.6 ia forma:

$$ln\ 2x_0 = ln\ x_0 + \mu_{net} \tau_d \text{ sau } \mu_{net} \tau_d = ln2 \quad (2.7)$$

Prin urmare, ecuația ce caracterizează timpul de dublare a biomasei va fi:

$$\boldsymbol{\tau_d = \frac{0{,}693}{\mu_{net}}} \quad (2.8)$$

În momentul când unul dintre componentele nutritive necesare pentru creștere s-a epuizat sau se acumulează substanțe toxice pentru creștere, creșterea nu va fi echilibrată, compoziția chimică a celulelor și forma acestora nu va fi constantă. În acest moment, cultura de microorganisme va intra în *faza staționară*.

Faza staționară începe la sfârșitul fazei lag, când viteza de creștere celulară este zero sau când viteza de creștere este egală cu viteza de deces. Chiar dacă viteza de creștere este zero, celulele sunt metabolic active și produc metaboliți secundari.

În timpul fazei staționare pot avea loc unul sau mai multe dintre următoarele fenomene:

- ✓ concentrația totală a celulelor poate fi constantă, însă numărul celulelor active este în descreștere;

- ✓ poate avea loc lezarea celulelor și descreșterea numărului de celule active. Uneori poate avea loc un al doilea proces de creștere în baza compușilor obținuți din lezarea celulelor;
- ✓ celulele nu vor crește, dar vor produce metaboliți secundari ca rezultat al dereglării metabolice atunci când concentrația sursei de C, N și P este joasă.

Sfârșitul fazei staționare și a creșterii poate fi determinată de epuizarea substanțelor nutritive și/sau a acumulării produselor toxice (inhibitori). În acest caz începe ultima etapă, *faza de deces*.

Parametrii principali ce influențează creșterea celulară sunt:

1. *Temperatura*. După intervalul optim de temperatură microrganismele pot fi clasificate în trei categorii (Fig. 2.13):

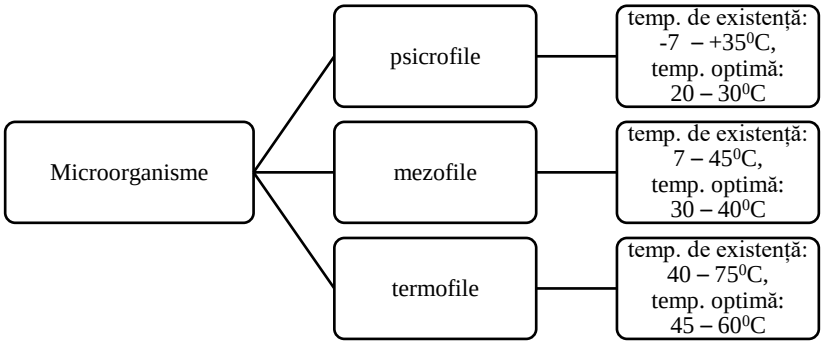


Figura 2.13. Clasificarea microorganismelor după intervalul optim de temperatură

2. *pH* – afectează activitatea enzimelor și, astfel, viteza de creștere a celulelor. pH-ul optim pentru bacterii se încadrează în intervalul 3–8, drojdii 3–6, mucegai 3–7, celulele vegetale 5–6 și pentru celulele animale 6,5–7,5.
3. *Concentrația oxigenului dizolvat*. La concentrații ridicate ale celulelor, viteza consumului de oxigen poate fi mai mare decât viteza de adiție a oxigenului. În acest caz, oxigenul devine factorul limitativ al creșterii microorganismelor.
4. *Concentrația substratului*. Dacă parametrii bioprocesului, precum pH-ul, compoziția mediului, viteza de adiție a aerului, se mențin constanți, atunci viteza de creștere celulară va fi influențată doar de concentrația substratului. În acest caz, dependența vitezei de creștere celulară este

reprezentată prin *ecuația Monod*, cea mai simplă ecuație empirică, similară ecuației Michaelis-Menten, utilizată în cinetica enzimatică:

$\mu = \frac{\mu_{max} C_S}{K_S + C_S}$, unde: (2.9)

C_s – concentrația substratului, g/L;

K_s – constanta de saturație; concentrația substratului la $^1/_2\mu_{max}$ (Fig. 2.14).

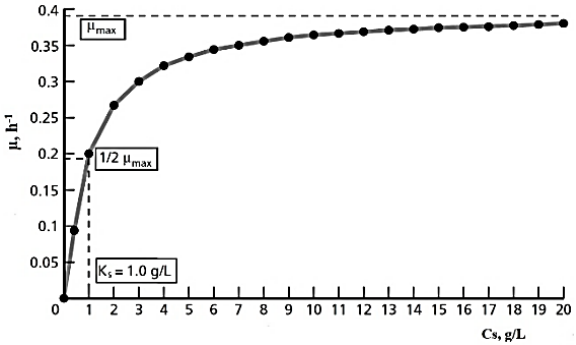


Figura 2.14. Dependența grafică dintre concentrația substratului și viteza specifică de creștere

Important!

Ecuația Monod descrie corect viteza de creștere a microorganismelor când concentrația substanțelor care inhibă creșterea este mică.

În proiectarea unui proces biotehnologic, la nivel cantitativ este important de apreciat randamentul de obținere a produsului de interes, un metabolit sau biomasa propriu-zisă. În domeniul biotehnologiilor se folosește noțiunea de ***randament celular***, care poate fi calculat după consumul substratului, oxigenului și formarea produsului.

Acest randament este aparent (nu este unul real), deoarece substratul se consumă și pentru producerea energiei (creștere și mentenanță), formarea produselor extracelulare, procese de biosinteză.

$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$, unde: (2.10)

$Y_{\frac{X}{S}}$ – randamentul celular după consumul substratului;

ΔX – variația concentrației biomasei;

ΔS – variația consumului substratului.

Pentru microorganismele aerobe care cresc pe substrat de glucoză randamentul celular are valori cuprinse în intervalul 0,4- 0,6 g/g (grame celule la 1 g substrat) (Tab. 2.3).

Tabelul 2.3. Valorile randamentului celular calculat după consumul de substrat pentru unele microorganisme la utilizarea diferitor substraturi

Microorganism	**Substrat**	$\mathbf{Y_{X/S}}$
Candida utilis	Glucoză	0,51
Penicillium chrysogenum	Glucoză	0,43
Pseudomonas fluorescens	Glucoză	0,38
Saccharomyces cerevisiae	Glucoză	0,50
Enterobacter aerogenes	Maltoză	0,46
	Fructoză	0,42
	Glucoză	0,40
	Riboză	0,35
	Succinat	0,25
	Glcerol	0,45
	Piruvat	0,20
	Acetat	0,18

Similar se calculează randamentul celular după consumul de oxigen (procese aerobe):

$$Y_{\frac{X}{O_2}} = \frac{\Delta X}{\Delta O_2} \qquad (2.11)$$

Trebuie de accentuat că valorile randamentului celular calculat după consumul de oxigen sunt mai înalte (Tab. 2.4).

Tabelul 2.4. Valorile randamentului celular calculat după consumul de oxigen pentru unele microorganisme la utilizarea diferitor substraturi

Microorganism	**Substrat**	$\mathbf{Y_{\frac{X}{O_2}}}$
Candida utilis	Glucoză	1,32
Penicillium chrysogenum	Glucoză	1,35
Pseudomonas fluorescens	Glucoză	0,85
Saccharomyces cerevisiae	Glucoză	0,97
Enterobacter aerogenes	Maltoză	1,50
	Fructoză	1,46
	Glucoză	1,11
	Riboză	0,98
	Succinat	0,62
	Glcerol	0,97
	Piruvat	0,48
	Acetat	0,31

În procesul de proiectare a producerilor biotehnologice trebuie să se cunoască stoechiometria procesului de conversie a substratului în produs, care este redată prin ***ecuații pseudochimice***. Acest tip de ecuații au la bază *legea conservării masei*.

Stoechiometria metabolică este utilizată pentru calcularea bilanțului masic și energetic al bioproceselor, compararea randamentului teoretic și practic al produsului, verificarea consistenței datelor experimentale și pentru formularea mediului nutritiv.

Ecuațiile pseudochimice sunt bazate pe faptul că atât substratul, cât și microorganismele sunt compuse predominant din 4 elemente chimice: C, H, O și N, care fie sunt „încorporate" în celule noi, fie eliminate ca produși (Fig. 2.15).

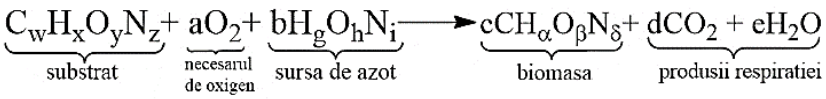


Figura 2.15. Ecuația reacției pseudochimice generale a unui proces de fermentare aerobă

Ecuația procesului de creștere a unor microorganisme utilizând ca substrat glucoza și sursă de azot, amoniacul, va avea forma:

$$C_6H_{12}O_6 + aO_2 + bNH_3 \rightarrow cCH_\alpha O_\beta N_\delta + dCO_2 + eH_2O \qquad (2.12)$$

Rețineți!

În ecuațiile pseudochimice se indică formula uscată a celulelor: $CH_\alpha O_\beta N_\delta$. Această formulă reprezintă numărul atomilor de H, O și N ce revin la 1 atom de carbon.

Formula generală a celulei cu compoziția chimică necunoscută este **$CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$.** Totuși, în majoritatea cazurilor sunt cunoscute formulele elementale ale biocatalizatorilor (Tab. 2.5).

Tabelul 2.5. Formulele elementale ale unor reprezentanți din clasa bacteriilor și fungiilor

Clasa de microorganisme	**Formula elementală**
Bacterii	
Acetobacter aerogens	$CH_{1.83}O_{0.55}N_{0.25}$
Escherichia coli	$CH_{1.77}O_{0.49}N_{0.24}$
Klebsiella aerogenes	$CH_{1.73}O_{0.43}N_{0.24}$

Paracoccus denitrificans	$CH_{1.81}O_{0.51}N_{0.20}$
Fungii	
Candida utilis	$CH_{1.83}O_{0.54}N_{0.10}$
	$CH_{1.87}O_{0.56}N_{0.20}$
Saccharomyces cerevisiae	$CH_{1.83}O_{0.56}N_{0.17}$
	$CH_{1.81}O_{0.51}N_{0.17}$

În scopul diminuării erorilor în calcule se adaugă și valoarea pentru *cenușa reziduală*, care variază de la 5 la 10%. Această valoare reprezintă elementele care nu sunt specificate în formulă (P, S, K, Na, Ca, Mg, Cl, Fe etc).

Dacă se cunoaște compoziția chimică a celulelor, coeficienții ***a***, ***b***, ***c***, ***d*** și ***e*** (Fig. 2.15) pot fi calculați prin operațiile matematice corespunzătoare. Conform ecuației egalate se determină necesarul de substrat, azot și de oxigen la proiectarea procesului tehnologic.

Se alcătuiesc ecuațiile matematice corespunzătoare (conform Fig. 2.15):

$$\begin{aligned} &C: \quad w = c + d \\ &H: \quad x + bg = c\alpha + 2e \\ &O: \quad y + 2a + bh = c\beta + 2d + e \\ &N: \quad z + bi = c\delta \end{aligned} \qquad (2.13)$$

Pentru a rezolva aceste ecuații sunt necesare informații experimentale suplimentare. Una dintre ele este *coeficientul respirator* (RQ), care reprezintă raportul dintre numărul de moli de dioxid de carbon formați (d) și numărul de moli de oxigen consumați (a):

$$RQ = \frac{d}{a} \qquad (2.14)$$

Un alt parametru utilizat pentru rezolvarea ecuațiilor pseudochimice este *randamentul celular,* raportat la consumul de substrat, care poate fi prezentat în felul următor:

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{c \cdot M(biomasă)}{M(substrat)} \qquad (2.15)$$

Din ecuația 2.15 se poate calcula coeficientul ***c***.

Important!

În calcule, masa moleculară a celulelor (biomasa) se va recalcula având în vedere conținutul procentual al cenușei.

În multe procese biotehnologice produsul de interes este eliberat în mediul de cultură (produs extracelular). În acest caz, în ecuația generală (Fig. 2.15) se va include și produsul, ($f C_jH_kO_lN_m$). Valoarea ***f*** reprezintă coeficientul stoechiometric pentru produs (ecuația 2.16).

$$C_wH_xO_yN_z + aO_2 + bH_gO_hN_i \rightarrow cCH_\alpha O_\beta N_\delta + fC_jH_kO_lN_m + dCO_2 + eH_2O \quad (2.16)$$

În cazul în care produsul este extracelular, se operează cu încă un tip de randament, numit ***randamentul în produs ($Y_{P/S}$)***:

$$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{f \cdot M(produs)}{M(substrat)} \quad (2.17)$$

În reacțiile biochimice complexe, cum sunt cele cu formarea produsului extracelular, în care apare încă un coeficient stoechiometric (*f*), este necesară mai multă informație pentru egalarea acestora. În acest scop se utilizează parametrul ***gradul de reducere (γ)***, care reprezintă numărul de electroni disponibili într-un gram atomi de carbon.

Rețineți!

Numărul de electroni disponibili (NED) pentru compușii organici corespunde gradului de oxidare al atomilor: C: 4; H: 1; O: -2; N: -3; P: 5; S: 6. Gradele de reducere pentru CO_2, NH_3, H_2O sunt egale cu 0.

Astfel, pentru substratul $C_wH_xO_yN_z$ numărul electronilor disponibili va fi:

$$NED = 4w + x - 2y - 3z \quad (2.18)$$

Gradul de reducere, conform ecuației 2.18, va avea forma:

$$\gamma = \frac{4w+x-2y-3z}{w} \quad (2.19)$$

Pentru ecuația 2.12, bilanțul electronic poate fi scris în felul următor:

$$NED_{substrat} + NED_{oxigen} \rightarrow NED_{biomasă} \quad (2.20)$$

sau: $$w\gamma_S - 4a = c\gamma_B \quad (2.21)$$

Pentru ecuația 2.16, bilanțul electronic va fi:

$$w\gamma_S - 4a = c\gamma_B + fj\gamma_P \quad (2.22)$$

Din ecuația 2.22 poate fi exprimat coeficientul *a*:

$$a = \frac{w\gamma_S - c\gamma_B - fj\gamma_P}{4} \quad (2.23)$$

Prin intermediul bilanțului electronic poate fi calculat randamentul celular în biomasă:

$$1 = \frac{4a}{w\gamma_S} + \frac{c\gamma_B}{w\gamma_S} + \frac{fj\gamma_P}{w\gamma_S} \quad (2.24)$$

Dacă se admite că electronii substratului se consumă doar pentru formarea biomasei, atunci termenul al doilea al ecuației 2.24 va fi egal cu o unitate. Din

expresia obținută se poate calcula coeficientul c_{max} (cantitatea maximă de biomasă ce se poate obține):

$1 = \frac{c\gamma_B}{w\gamma_S}$, de unde: $c_{max} = \frac{w\gamma_S}{\gamma_B}$ (2.25)

Analog se poate calcula cantitatea maximă de produs, dacă se admite că toți electronii se vor consuma pentru formarea produsului:

$1 = \frac{fj\gamma_P}{w\gamma_S}$, de unde: $f_{max} = \frac{w\gamma_S}{j\gamma_P}$ (2.26)

Lucrare practică 2.1. Probleme de calcul: viteza specifică de creștere a biocatalizatorului și stoechiometria ecuațiilor pseudochimice

1. *Escherichia coli* crește cu un timp de dublare de 0,5 h în faza de creștere exponențială. Calculați:

a) viteza specifică de creștere (h^{-1});

b) timpul necesar pentru creșterea *E. Coli* de la 0,1 kg/m^3 la 10,0 kg/m^3;

c) randamentul de creștere față de substrat pentru cazul b) dacă concentrația substratului scade de la 50 kg/m^3 la 2 kg/m^3.

Modul de rezolvare:

1. Se calculează viteza net specifică de creștere conform ecuației 2.8:

$$\mu_{net} = \frac{0{,}693}{0{,}5\ h} = 1{,}4\ h^{-1}$$

2. Se calculează timpul necesar pentru creșterea *E. coli* conform ecuației 2.5:

$$t = \frac{ln\left(\frac{10\ {}^{kg}/_{m^3}}{0{,}1\ {}^{kg}/_{m^3}}\right)}{1{,}4\ h^{-1}} = 3{,}3\ h$$

3. Se calculează randamentul de creștere față de substrat conform ecuației 2.10:

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{(10 - 0{,}1)\ {}^{kg}/_{m^3}}{(50 - 2)\ {}^{kg}/_{m^3}} = 0{,}2$$

Răspuns: μ_{net}=1,4 h^{-1}, t=3,3 h, $Y_{X/S}$=0,2

2. Determinați coeficienții bioreacției de producere a acidului citric de către *Aspergillus Niger* dacă randamentul biomasei și al produsului față de consumul de substrat constituie 0,123 și 0,664 g/g corespunzător, conținutul cenușii – 7.5%.

$$C_{12}H_{22}O_{11} + aO_2 + bNH_4NO_3 \rightarrow cCH_{1.72}O_{0.55}N_{0.17} + fC_6H_8O_7 + dCO_2 + eH_2O$$

Modul de rezolvare:

1. Se calculează coeficienții reacției biochimice *c* și *f* conform ecuațiilor 2.15 și 2.17. Inițial, se calculează masa molară a biomasei, ținându-se cont de conținutul cenușii:

M ($CH_{1.72}O_{0.55}N_{0.17}$) = 24,9 g/mol, ceea ce corespunde la 92,5%, respectiv M ($CH_{1.72}O_{0.55}N_{0.17}$) = 26,9 g/mol.

$$c = \frac{0{,}123 \cdot 342\ {}^{g}/_{mol}}{26{,}9\ {}^{g}/_{mol}} = 1{,}56$$

$$f = \frac{0{,}664 \cdot 342\ {}^{g}/_{mol}}{192\ {}^{g}/_{mol}} = 1{,}18$$

2. Se calculează coeficienții reacției biochimice prin alcătuirea ecuațiilor matematice, conform ecuației 2.13:

C : 12 = c + 6f + d

H : 22 + 4b = 1,72c + 8f + 2e

O : 11 + 2a + 3b = 0,55c + 7f + 2d + e

N : 2b = 0,17c

Valorile calculate sunt: a= 4,82, b= 0,13, d= 3,36, e= 5,20.

Răspuns: $C_{12}H_{22}O_{11} + 4{,}82O_2 + 0{,}13NH_4NO_3 \rightarrow 1{,}56CH_{1.72}O_{0.55}N_{0.17} + 1{,}18C_6H_8O_7 + 3{,}36CO_2 + 5{,}20H_2O$

Probleme pentru rezolvare individuală:

3. Populația unei culturi microbiene crește de la 1000 la un miliard timp de 5 ore. Calculați timpul de dublare (în minute).

Răspuns: $\tau_d = 15$ *min*

4. Calculați timpul de dublare (în minute) a unei populații de bacterii care crește în faza log de la $4{,}00 \cdot 10^6$ celule la $8{,}64 \cdot 10^6$ în 20 de minute.

Răspuns: $\tau_d = 18$ *min*

5. Timpul de dublare a unei culturi de bacterii este 20 de minute. Calculați timpul necesar pentru creșterea acestora de la 2500 la 40000 celule.

Răspuns: $t = 80$ *min*

6. Calculați numărul inițial de bacterii, dacă timpul de dublare a acestora constituie 2 ore, iar după 24 de ore cultura numără $4{,}1 \cdot 10^7$ celule.

Răspuns: $x_0 \approx 1 \cdot 10^4$ *celule*

7. *Escherichia coli* crește de la 0,1 kg/m^3 la 0,5 kg/m^3 în faza de creștere exponențială timp de 1h. Calculați:

a) viteza specifică de creștere (h^{-1});

b) timpul de dublare (h);

c) timpul necesar pentru creșterea *E. Coli* de la 0,1 kg/m^3 la 1,0 kg/m^3.

Răspuns: μ_{net}=1,6 h^{-1}, τ_d=0,4 h, t=1,4 h

8. Calculați cantitatea de sulfat de amoniu necesară pentru suplinirea mediului nutritiv în bioreactor, astfel încât concentrația finală să constituie 30 g/L, volumul bioreactorului este de 1000 L. În calcule se va ține cont că azotul din celulele biocatalizatorului constituie 12%.

Răspuns: m($(NH_4)_2SO_4$)=34,1 kg

9. Determinați coeficienții din bioreacția de mai jos, care prezintă procesul de creștere celulară, dacă valoarea coeficientului respirator este 0,43, conținutul cenușii – 5%. Calculați randamentul în biomasă în raport cu consumul de substrat.

$$C_6H_{12}O_6 + aO_2 + bNH_3 \rightarrow cCH_{1.66}O_{0.47}N_{0.27} + dCO_2 + eH_2O$$

Răspuns: a=1,68, b= 1,43, c= 5,28, d= 0,72, e= 3,76; $Y_{\frac{X}{S}} = 0{,}8$

10. Creșterea drojdiilor de panificație (*S. cerevisiae*) pe substratul de glucoză poate fi redată prin ecuația:

$$C_6H_{12}O_6 + 3O_2 + 0{,}48NH_3 \rightarrow 0{,}48C_6H_{10}NO_3 + 3{,}12CO_2 + 4{,}32H_2O$$

Volumul bioreactorului constituie 10^5 L, iar concentrația finală de drojdii trebuie să fie 50 g celule/L. Utilizând coeficienții stoechiometrici stabiliți:

a) cantitatea necesară de glucoză și de amoniac în mediul nutritiv;

b) randamentul celular după consumul de substrat și de oxigen.

Răspuns: m($C_6H_{12}O_6$)= 13 t, m(NH_3)= 590 kg; $Y_{\frac{X}{S}}$=0,38, $Y_{\frac{X}{O_2}} = 0{,}72$

11. Creșterea *S. cerevisiae* pe substratul de glucoză în condiții anaerobe poate fi redată prin reacția:

$$C_6H_{12}O_6 + \beta\ NH_3 \rightarrow cCH_{1.74}O_{0.45}N_{0.2} + 0{,}43C_3H_8O_3 + 1{,}54CO_2 + 1{,}3C_2H_5OH + 0{,}036H_2O$$

a) Calculați randamentul în biomasă.

b) Calculați randamentul în produs (pentru cele 3 produse).

c) Determinați coeficientul β.

Răspuns: $Y_{\frac{X}{S}} = 0{,}08,$; $Y_{\frac{X}{P}}(C_3H_8O_3) = 0{,}22,$

$Y_{\frac{X}{P}}(CO_2) = 0{,}38,\ Y_{\frac{X}{P}}(C_2H_5OH) = 0{,}33;\ \beta = 0{,}12$

12. Creșterea aerobă a *S. cerevisiae* pe substratul de etanol poate fi redată prin ecuația:

$$C_2H_5OH + aO_2 + bNH_3 \rightarrow cCH_{1,704}N_{0,149}O_{0,408} + dCO_2 + eH_2O$$

a) Determinați coeficienții stoechiometrici, dacă coeficientul respirator este 0,66.

b) Calculați randamentul celular după consumul de substrat și de oxigen.

Răspuns: a= 2,98, b= 0,004, c= 0,03, d= 1,97, e= 2,98; $Y_{\frac{X}{S}} = 0{,}01, Y_{\frac{X}{O_2}} = 0{,}007$

13. Degradarea aerobă a unui compus organic de către un biocatalizator mixt (mai multe culturi) în apele reziduale poate fi redată prin ecuația:

$$C_3H_6O_3 + aO_2 + bNH_3 \rightarrow cC_5H_7NO_2 + dCO_2 + eH_2O$$

a) Determinați coeficienții stoechiometrici, dacă randamentul celular după consumul de substrat constituie 0,4 g/g.

b) Calculați coeficientul respirator și randamentul celular după consumul de oxigen.

Răspuns: a=d= 1,4, b=c= 0,32, e=2,36; RQ=1; $Y_{\frac{X}{O_2}} = 0{,}81$

14. Calculați necesarul de oxigen pentru creșterea *Candidei utilis* conform reacției de mai jos, dacă randamentul în biomasă raportat la substrat este 0,5 g/g, conținutul cenușii constituie 5%. Calculați randamentul maxim de creștere al *Candidei utilis* pe substratul de glucoză și etanol.

$$C_6H_{12}O_6 + aO_2 + bNH_3 \rightarrow cCH_{1.84}O_{0.55}N_{0.2} + dCO_2 + eH_2O$$

Răspuns: a= 2,52 g O_2*/ mol glucoză;* c_{max} *(*$C_6H_{12}O_6$*)= 5,80;* c_{max} *(*C_2H_5OH*)= 2,90.*

15. Măsurările experimentale de monitorizare a activității unei culturi de microorganisme au demonstrat că celulele sunt susceptibile să convertească $^2/_3$ din substrat (alcan sau glucoză) în biomasă.

a) Calculați coeficienții stoechiometrici pentru următoarele reacții:

$$C_{16}H_{34} + aO_2 + bNH_3 \rightarrow cC_{4,4}H_{7,3}N_{0,86}O_{1,2} + dCO_2 + eH_2O$$

$$C_6H_{12}O_6 + aO_2 + bNH_3 \rightarrow cC_{4,4}H_{7,3}N_{0,86}O_{1,2} + dCO_2 + eH_2O$$

b) Calculați randamentul celular după consumul de substrat și de oxigen pentru reacțiile din punctul a).

Răspuns: coeficienții bioreacției pentru hexadecan: a= 12,43, b= 2,09, c= 2,42, d= 5,33, e= 12,43; coeficienții bioreacției pentru glucoză: a= 1,47, b= 0,78, c= 0,91, d= 2,00, e= 3,85; $Y_{\frac{X}{S}}(hexadecan) = 0{,}98, Y_{\frac{X}{O_2}}(hexadecan) = 0{,}56;$ $Y_{\frac{X}{S}}(glucoză) = 0{,}46, Y_{\frac{X}{O_2}}(glucoză) = 1{,}76.$

2.3. Enzimele. Cinetica proceselor enzimatice

Enzimele sunt molecule proteice cu masa moleculară mare (de la 15 000 până la câteva milioane u.a.m.) care acționează ca catalizatori. Acestea catalizează practic toate procesele biochimice care au loc în celulele vii. Deci, enzimele catalizează toate procesele biochimice care au loc în microorganisme, celule animale și vegetale.

Sunt cunoscute peste 2000 de enzime. Enzimele măresc considerabil viteza reacțiilor chimice în comparație cu reacțiile necatalitice, care au loc în condiții de presiune și temperatură ambiantă. În unele cazuri enzimele pot mări viteza reacției până la 10^{20} ori.

Enzimele sunt denumite prin adăugarea sufixului *-aza* la sfârșitul denumirii substratului, cum ar fi *ureaza*, sau la reacția catalizată, cum ar fi *alcool dehidrogenaza*. Denumirile sistematice sunt stabilite de Comisia de Enzime (Enzyme Commission, EC).

Unele enzime au o structură simplă, cum ar fi un lanț polipeptidic pliat (tipic pentru majoritatea enzimelor hidrolitice); multe enzime au mai mult de o subunitate. Unele enzime necesită o *grupă prostetică* pentru activitatea lor. Această grupă poate fi un *cofactor*, cum ar fi ionii metalici, Mg, Zn, Mn, Fe, o moleculă organică complexă (nicotinamid-adenin-dinucleotidă (NAD), flavin-adenin-dinucleotidă (FAD), coenzima A (CoA) sau unele vitamine). O enzimă care conține un cofactor se numește *holoenzimă*. Partea proteică a acestei enzime este *apoenzima* (holoenzima = apoenzima + cofactor). Enzimele au organizare moleculară diferită, dar cele care catalizează aceeași reacție se numesc *izoenzime*. Enzimele sunt specifice substratului și sunt clasificate în funcție de reacția pe care o catalizează. Principalele clase de enzime și reacțiile catalizate de acestea sunt prezentate în tabelul 2.6.

Tabelul 2.6. Clasificarea enzimelor funcție de reacțiile catalizate (conform *Enzyme Commission* (EC))

Codul EC	**Clasa**	**Tipul reacției catalizate**	**Reprezentanți**
EC1	Oxidoreductaze	Oxido-reducere	dehidrogenaza, oxidaza
EC2	Transferaze	Transferul unei grupe funcționale	transaminaza, kinaza
EC3	Hidrolaze	Hidroliză	lipaza, amilaza
EC4	Liaze	Adiția la legătura dublă sau reacția inversă	decarboxilaze
EC5	Izomeraze	Izomerizare	izomeraze, mutaza
EC6	Ligaze	Formarea legăturilor (cu consum de ATP)	sintetaze

Enzimele diminuează *energia de activare* (E_a) a reacției prin legarea de substrat (reactantul care urmează a fi transformat) (Fig. 2.16). Reacțiile au loc în condiții blânde: pH spre neutru, temperatură ambiantă, presiune atmosferică.

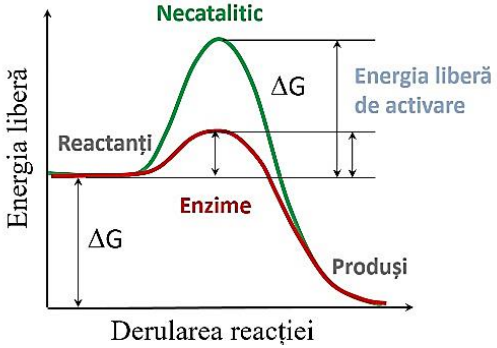


Figura 2.16. Energiile de activare a unui proces necatalitic și catalizat de enzime

Exemplu:

descompunerea peroxidului de hidrogen:

$$2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$$

Valorile ΔG la 20^0C pentru cazurile: reacție necatalitică (ΔG= 18 kcal/mol); cataliză chimică (Pt) (ΔG= 13 kcal/mol); cataliză enzimatică (ΔG = 7 kcal/mol).

Enzimele se caracterizează prin ***specificitate***, conform căreia acestea se clasifică în 3 grupe (Fig. 2.17).

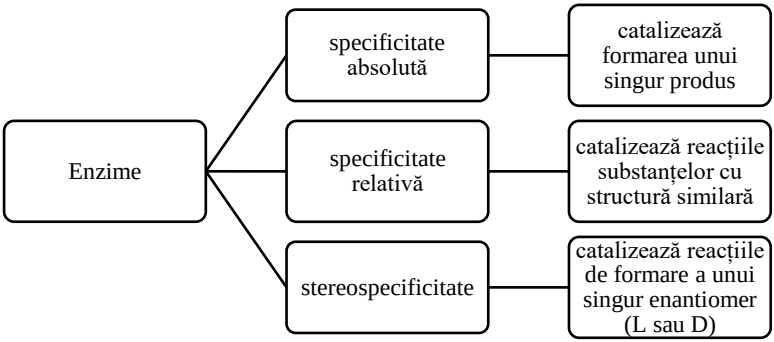


Figura 2.17. Tipurile de specificitate a enzimelor

În pofida organizării complexe a proteinelor (Fig. A.2.6), numai anumite fragmente moleculare pot interacționa cu substratul, numite ***centre active***.

Enzimele (E) se leagă chimic de substrat (S) cu formarea unui complex intermediar (ES) și doar după formarea ES are loc transformarea substratului în produs (P) și regenerarea enzimei. Cel mai simplu model al acestei interacțiuni este *mecanismul cheie-lacăt* (Fig. 2.18).



Figura 2.18. Mecanismul cheie-lacăt al interacțiunii enzimei cu substratul

Important!

Modelul cheie-lacăt explică specificitatea enzimei. Centrul activ va fi complementar substratului care are o anumită formă și dimensiune. Dezavantajul acestei teorii constă în faptul că conformația enzimei se consideră a fi rigidă (proteina are o anumită flexibilitate conformațională).

Un alt mecanism de interacțiune a enzimei cu substratul este *mecanismul centrului activ indus* (Fig. 2.19). În acest caz proteina are o conformație flexibilă. Centrul activ al enzimei se adaptează complementar formei și dimensiunii substratului în complexul intermediar, după legarea substratului de enzimă.



Figura 2.19. Mecanismul centrului activ indus de interacțiune a enzimei cu substratul

În calcule este necesară cuantificarea activității enzimei, care se realizează prin *numărul de conversie*. Activitatea enzimei se exprimă în ***U*** (enzyme international unit) și reprezintă cantitatea de enzimă necesară pentru a converti 1 µmol de substrat într-un minut.

Activitatea catalitică a enzimei este influențată în principal de 4 factori:

1. **Concentrația enzimei ([E])** – în reacție concentrația enzimei este mai mică decât concentrația substratului. Odată cu creșterea concentrației enzimei crește viteza de reacție.

2. **Concentrația substratului ([S])** – cu creșterea concentrației substratului viteza reacției crește până la un anumit moment, când viteza reacției devine constantă – *viteza maximă* (V_{max}). În acest caz, enzima este saturată cu substrat și nu poate converti substratul cu o viteză mai mare în condițiile date.
3. **Temperatura** – similar proceselor chimice, cu creșterea temperaturii crește viteza reacției enzimatice. Creșterea vitezei de reacție este optimă în intervalul 25–40^{0}C. La o temperatură superioară de 40^{0}C are loc denaturarea enzimei și viteza reacției scade sau procesul de bioconversie se stopează.
4. **Variația pH-ului –** la valori extreme de pH are loc denaturarea proteinei și viteza reacției scade. Viteza reacției este optimă spre pH-ul 7. Unele enzime au pH-ul optim acid, spre exemplu pepsina din stomac.

Proiectarea proceselor biotehnologice necesită, pe lângă calcularea randamentului celular și a stoechiometriei procesului, determinarea cineticii procesului. Astfel, pe larg este utilizat ***modelul matematic al cineticii enzimatice***. Acest model ține cont de reversibilitatea complexului intermediar dintre substrat și enzimă [ES] și de transformarea ireversibilă a acestuia în produs [P] cu regenerarea enzimei [E]. La concentrații mari ale substratului, enzima este saturată în substrat și viteza reacției enzimatice este constantă (V_{max}) (Fig. 2.20).

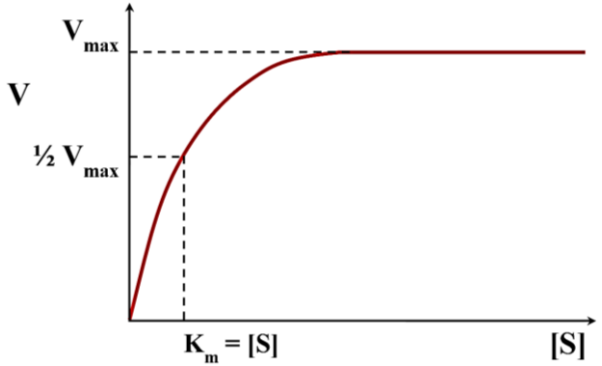


Figura 2.20. Efectul concentrației substratului asupra vitezei reacției enzimatice

Rețineți!

K_m – constanta Michaelis, reprezintă concentrația substratului în momentul când jumătate din centrele active ale enzimei sunt saturate cu substrat.

Un proces enzimatic poate fi reprezentat prin ecuația schematică:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \quad (2.27)$$

Se admite că prima etapă de formare a ES este rapidă, atunci viteza de formare a produsului (P) va fi egală cu produsul dintre constanta de descompunere a ES (k_2) și [ES] (ec. 2.28).

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (2.28)$$

Din ecuația 2.27 se poate exprima viteza de formare a complexului intermediar ES (ec. 2.29) și viteza de descompunere (ec. 2.30):

$$v_f[ES] = k_1[E][S] \quad (2.29)$$

$$v_d[ES] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (2.30)$$

După egalarea ecuațiilor 2.29 și 2.30 poate fi exprimată concentrația complexului intermediar ES:

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1}+k_2} \quad (2.31)$$

Dacă constantele reacțiilor de formare și de descompunere a [ES] se exprimă prin K_m, atunci ecuația 2.31 va avea forma:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (2.32)$$

Deoarece enzima nu este consumată (în a doua reacție se regenerează), se obține ecuația de conservare a enzimei:

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (2.33)$$

Ecuația 2.33 se introduce în ec. 2.32 și se obține formula pentru calcularea concentrației produsului intermediar:

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_m[S]} \quad (2.34)$$

Ecuația 2.34 se introduce în ec. 2.28:

$$v = k_2 \frac{[E_0][S]}{K_m+[S]} \quad (2.35)$$

La concentrații mari ale substratului viteza maximă poate fi exprimată:

$$V_{max} = k_2[E_0] \quad (2.36)$$

Dacă viteza maximă (ec. 2.36) se introduce în ec. 2.35, se obține ***ecuația ce caracterizează cinetica enzimatică***:

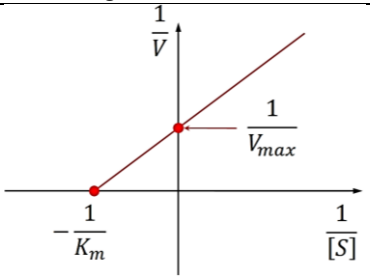
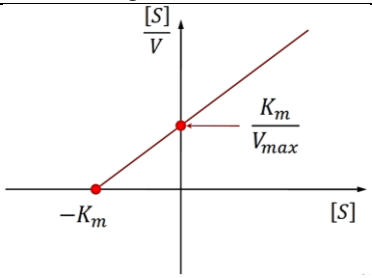
$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]} \quad (2.37)$$

Important!

Daca valoarea K_m este mică, atunci afinitatea enzimei față de substrat este mare, deci eficiență catalitică înaltă. O enzimă cu valoarea mare K_m, prezintă o afinitate mică față de substrat și va avea nevoie de o cantitate mai mare de substrat pentru a ajunge la V_{max}. Valoarea K_m variază în funcție de enzimă, substrat, pH și temperatură. Pentru majoritatea enzimelor K_m variază în intervalul 10^{-1}-10^{-7} mol/L.

Valoarea vitezei maxime (V_{max}) și cea a constantei Michaelis (K_m) se determină experimental din dependențele grafice ale vitezei de reacție funcție de concentrația substratului. În acest scop, cel mai des se utilizează *metoda Lineweaver-Burk* și *metoda Hanes-Woolf* (Tab. 2.7).

Tabelul 2.7. Metodele grafice Lineweaver-Burk și Hanes-Woolf utilizate la calcularea constantei Michaelis și a vitezei enzimatice maxime

Metoda grafică Lineweaver-Burk	Metoda grafică Hanes-Woolf
	
$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]}$	$\frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} [S]$
Din ecuația dreptei $y=\boldsymbol{m}x+\boldsymbol{b}$: $m = \frac{K_m}{V_{max}};\ b = \frac{1}{V_{max}}$	Din ecuația dreptei $y=\boldsymbol{m}x+\boldsymbol{b}$: $m = \frac{1}{V_{max}};\ b = \frac{K_m}{V_{max}}$

Un parametru important care trebuie considerat la determinarea parametrilor cinetici este ***inhibiția activității enzimatice***. Substanțele chimice care reduc activitatea enzimei se numesc *inhibitori*. Aceste substanțe pot fi produsele reacției, substratul, metaboliții intermediari, ionii metalelor grele, moleculele sintetice ș.a.

Procesul de inhibiție poate fi clasificat în două grupe (Fig. 2.21).

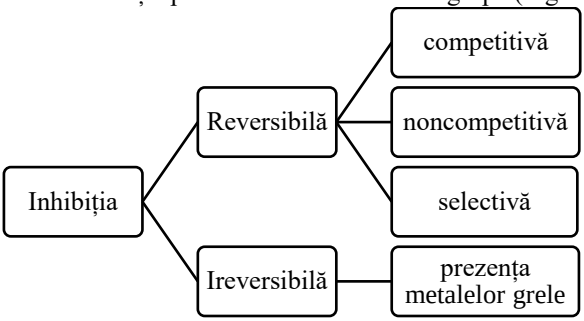


Figura 2.21. Tipurile de inhibiție a proceselor enzimatice

Inhibiția competitivă este determinată de substanțele ce prezintă un anumit grad de similitudine structurală cu substratul. Aceste substanțe concurează cu substratul pentru a se lega de centrul activ al enzimei și astfel diminuează concentrația produsului intermediar ES. Legarea inhibitorului (I) de enzimă este reversibilă și noncovalentă. Acest efect poate fi diminuat prin mărirea concentrației substratului.

În cazul *inhibiției noncompetitive* inhibitorul are o structură diferită de substrat și nu se leagă chimic de centrul activ al enzimei. Acest fapt schimbă conformația enzimei și, deci, organizarea spațială a centrului activ al acesteia, ceea ce reduce eficiența enzimei. Complexul enzimă-inhibitor (EI) se leagă de substrat și formează complexul ESI, care se poate converti în produs. Inhibitorul se poate lega inclusiv de complexul intermediar ES.

Inhibiția selectivă a complexului intermediar presupune că inhibitorul se leagă selectiv de complexul intermediar ES și nu de enzimă. Inhibitorul se leagă noncovalent și reversibil de o poziție inactivă în complexul intermediar ES. Prin blocarea complexului intermediar ES scade concentrația acestuia și, prin urmare, scade viteza maximă. Dacă concentrația ES scade (trece în formă inactivă EIS) și dacă reacția este reversibilă, echilibrul reacției se deplasează spre formarea EIS inactiv. În acest caz crește afinitatea enzimei față de substrat, deci valoarea K_m scade.

Lucrare de laborator 2.2. Compararea activității catalitice a enzimelor și a catalizatorilor anorganici

Scopul lucrării constă în compararea calitativă a activității catalitice a enzimelor și a catalizatorilor anorganici la descompunerea amidonului.

Reactivi specifici:

1. **Preparat de amilază salivară** (preparat enzimatic) – timp de 3-5 minute se clătește gura de 3-5 ori, utilizând 50 mL apă distilată; lichidul recoltat se filtrează prin vată.
2. **Substrat** – soluție de amidon solubil 0,5%.

Modul de lucru:

- ✓ în 3 eprubete se pipetează câte 20 de picături de soluție de amidon;
- ✓ se adaugă, separat, câte 5 picături: în prima eprubetă apă distilată, în a 2-a soluție de HCl (w=10%), iar în a 3-a eprubetă preparat de amilază salivară;
- ✓ după agitare, eprubetele 1 și 3 se introduc în termostat la 38^0C, iar eprubeta 2 – în baia de apă la fierbere;
- ✓ după 15-20 de minute toate eprubetele se aduc la temperatura camerei;
- ✓ pe 3 lame microscopice se adaugă, separat, câte 3 picături de reactiv Lugol și câte o picătură din conținutul fiecărei eprubete;
- ✓ se face concluzia referitor la gradul de hidroliză a amidonului în funcție de colorațiile obținute.

Lucrare de laborator 2.3. Studiul legităților cinetice ale hidrolizei enzimatice a proteinelor

Scopul lucrării constă în studiul cineticii reacției de hidroliză enzimatică a proteinelor pe sisteme model prin calcularea vitezei maxime și a constantei Michaelis.

Reactivi specifici:

1. **Soluție de pepsină 0,2%**: se dizolvă 0,2 g pepsină în 100 mL soluție HCl 0,075M.
2. **Soluție standard de gelatină 10 g/L**: se dizolvă 10 g gelatină în 1 L apă distilată caldă. Soluția se prepară înaintea efectuării analizei.
3. **Extract proteic**: se separă gălbenușul de ou de albuș și se măsoară volumul albușului de ou obținut. Se efectuează diluția: 1 parte albuș de ou se diluează în 9 părți soluție NaCl (w=0,9%). Se obține soluție proteică de aproximativ 1%.

4. **Reactivul biuret:**

A. În 500 mL apă proaspăt distilată se dizolvă 1,5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ și 6 g sare Seignette ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$),

B. La amestecul A se adaugă 300 mL soluție NaOH (w=10%) proaspăt preparată,

C. La amestectul B se adaugă 1 g KI (pentru prevenirea formării Cu_2O) și se completează cu apă proaspăt distilată până la volumul de 1 L. Soluția se păstrează într-un vas din plastic.

Modul de lucru:

1. Construirea curbei de calibrare:

- ✓ în 10 eprubete se adaugă volumele de soluție proteică indicate în tabelul 2.8;
- ✓ în fiecare eprubetă se adaugă 4 mL reactiv biuret și cu apă distilată se aduce la volumul de 5 mL; conținutul fiecărei eprubete se agită energic;
- ✓ proba martor se prepară fără adaos de soluție proteică;

Tabelul 2.8. Volumele necesare de reagenți pentru construirea curbei de calibrare

Nr. d/o	V(gelatină), mL	V(apă dis.), mL	V(r. biuret), mL	C(gelatină), g/L
1	0,1	0,9	4	0,2
2	0,2	0,8	4	0,4
3	0,3	0,7	4	0,6
4	0,4	0,6	4	0,8
5	0,5	0,5	4	1,0
6	0,6	0,4	4	1,2
7	0,7	0,3	4	1,4
8	0,8	0,2	4	1,6
9	0,9	0,1	4	1,8
10	1,0	0	4	2,0

- ✓ după 30 de minute se măsoară absorbanța la lungimea de undă λ= 570 nm;
- ✓ se construiește dependența grafică A=f(C(gelatină)) și se deduce ecuația dreptei.

2. Modelarea sistemelor și studiul cineticii enzimatice:

- ✓ se modelează sistemele conform tabelului 2.9, variind concentrația extractului proteic, volumul total constituind 100 mL;

Tabelul 2.9. Volumele necesare ale componentelor la modelarea sistemelor

Nr. d/o	V(sol. proteică), mL	V(sol. de pepsină), mL	V(apă dis.), mL
1	10	40	50
2	20	40	40
3	30	40	30
4	40	40	20
5	50	40	10
6	60	40	0

- ✓ imediat după amestecarea tuturor componentelor, din vasul de reacție se prelevează 1 mL amestec într-o eprubetă, în care se conține 4 mL reactiv biuret și după 30 de minute se măsoară absorbanța în raport cu proba martor la lungimea de undă 570 nm;
- ✓ pH-ul cu soluție de HCl 0,01 M (acidul clorhidric activează pepsina) se ajustează până la valoarea de ≤1,7 ($1,5<pH_{optim}<2,0$) și se pornește cronometrul;
- ✓ după expirarea a 5 minute iarăși se prelevează 1 mL amestec într-o eprubetă, în care se conțin 4 mL reactiv biuret și după 30 de minute se măsoară A_{570};
- ✓ modul de lucru se repetă cu intervalul de 5 minute pentru fiecare din sistemele modelate (Tab. 2.9) și rezultatele se notează în următorul tabel:

t, s	0	300	600	900	1200	1500	1800
A_{570}							
C(proteină), g/L							

Important!

Concentrația soluției de proteină (g/L) se calculează în baza absorbanței măsurate cu ajutorul ecuației dreptei obținute din curba de calibrare.

- ✓ cu ajutorul rezultatelor obținute se construiesc curbele cinetice C(proteină)=f(t) și se determină *viteza inițială* de hidroliză enzimatică a proteinei prin metoda tangentelor;
- ✓ se construiesc dependențele grafice Lineweaver-Burk ($\frac{1}{V} = f(\frac{1}{[S]})$ și Hanes-Woolf ($\frac{[S]}{V} = f([S])$;
- ✓ pentru fiecare metodă grafică se deduce ecuația dreptei și se determină valoarea V_{max} și a constantei Michaelis (K_m);

- ✓ în baza valorilor obținute ale K_m se fac concluzii referitor la afinitatea enzimei față de substratul proteic; se efectuează o analiză comparativă a valorilor parametrilor cinetici V_{max} și K_m calculate prin cele două metode.

Sarcini de evaluare și de autoevaluare

1. Enumerați principalele tipuri de biocatalizatori utilizați în biotehnologie.

2. Explicați principiul testului Gram și argumentați importanța acestui test în proiectarea unui proces biotehnologic.

3. Efectuați o analiză comparativă a structurii celulelor vegetală și animală.

4. Enumerați și explicați etapele creșterii celulare și parametrii ce cuantifică acest proces.

5. Explicați variația vitezei de creștere celulară funcție de temperatură, pH, concentrația substratului și gradul de oxigenare al bioamestecului.

6. Argumentați importanța controlului microbiologic în diferite etape ale desfășurării procesului biotehnologic.

7. Argumentați importanța ecuațiilor pseudochimice în proiectarea proceselor biotehnologice.

8. Explicați diferența dintre noțiunile randament celular și randamentul unui proces tehnologic.

9. Definiți noțiunea de enzimă și relatați despre particularitățile structurale ale acestor molecule.

10. Explicați nomenclatura și principiul de clasificare a enzimelor.

11. Explicați noțiunile de specificitate absolută, relativă și stereospecificitate.

12. Explicați mecanismul cheie-lacăt și al centrului activ indus prin interacțiunea enzimei cu substratul.

13. Explicați importanța parametrilor: numărul de conversie și activitatea enzimei U în studierea cantitativă a proceselor enzimatice.

14. Explicați cum este influențată viteza reacției enzimatice de următorii parametri: concentrația enzimei, concentrația substratului, temperatura și pH-ul.

15. Argumentați cum este apreciată activitatea enzimei funcție de valoarea constantei Michaelis (K_m).

16. Pornind de la ecuația generală a unui proces enzimatic deduceți formula de calcul a ecuației ce caracterizează cinetica enzimatică.

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

17. Estimați impactul inhibiției reversibile și ireversibile a activității enzimatice într-un proces biotehnologic.

18. Argumentați importanța metodelor grafice Linewaver-Burk și Hanes-Woolf la calcularea vitezei maxime a unui proces enzimatic și a constantei Michaelis.

19. Calculați valoarea vitezei maxime (V_{max}) și a constantei Michaelis (K_m), folosind metodele grafice Lineweaver-Burk și Hanes-Woolf pentru procesul enzimatic prezentat în tabelul de mai jos. Concentrația enzimei este 0,015 g/L.

V, g/L·min	[S] g/L
1,14	20,0
0,87	10,0
0,70	6,7
0,59	5,0
0,50	4,0
0,44	3,3
0,39	2,9
0,35	2,5

20. Calculați valoarea vitezei maxime (V_{max}) și a constantei Michaelis (K_m), folosind metoda grafică Lineweaver-Burk pentru procesul enzimatic prezentat în tabelul de mai jos, în absența și în prezența inhibitorului (I).

[E], mM	V, g/L·min (absența I)	V, g/L·min (prezența I)
0,25	1,02	0,73
0,33	1,39	0,87
0,40	1,67	1,09
0,50	1,89	1,30
0,60	2,08	1,41
0,75	2,44	1,82
1,00	2,50	2,17

3. PROIECTAREA UNUI PROCES BIOTEHNOLOGIC

Abilități:
- definește noțiunile de metabolism aerob și anaerob, anabolism și catabolism;
- apreciază importanța ATP-ului în procesele metabolice;
- explică mecanismele bioredox cu implicarea NADH și $FADH_2$;
- explică procesul de glicoliză, ciclul Krebs și de fosforilare oxidativă;
- clasifică bioreactoarele după natura biocatalizatorului, gradul de aerare și tipul de agitare;
- explică construcția și modul de operare al diferitor tipuri de bioreactoare;
- calculează puterea de consum pentru un bioreactor cu agitare mecanică;
- explică noțiunea și mecanismele de transfer de masă și căldură în cadrul procesului biotehnologic;
- calculează coeficientul general de transfer de căldură și coeficientul de transfer de masă în condiții experimentale determinate.

3.1. Metabolismul celular – aspecte generale

În proiectarea unui proces biotehnologic se ține cont de tipul materiei prime (compartimentul I), particularitățile catalizatorului, stoechiometria și cinetica procesului (compartimentul II) și, evident, de tipul *metabolismului celular*, aerob sau anaerob, de care depinde biosinteza produsului de interes.

Procesele metabolice ale microorganismelor, celulelor animale și vegetale au loc cu formarea inițială a metaboliților primari (substanțelor necesare pentru creștere, dezvoltare și reproducere), apoi a metaboliților secundari (anexele 1-4). Derularea proceselor metabolice este determinată de *informația genetică* a fiecărui organism. Procesele metabolice pot fi modificate prin manipularea genelor și/sau prin acțiunea factorilor externi. Procesele metabolice sunt catalizate de enzime. Biosinteza proteinelor (inclusiv a enzimelor) are loc în baza informației genetice codificate de ADN.

Diferența dintre procesele metabolice ale microorganismelor se datorează diferențelor genetice și/sau capacității diferite a acestora de a răspunde la factorii ambientali. Aceeași specie de microorganisme poate produce diferite substanțe în funcție de mediul nutritiv și de condițiile ambientale. Acești factori pot fi manipulați în scopul obținerii produsului de interes (*control metabolic*).

Metabolismul poate fi de două tipuri, funcție de consumul sau de eliberarea de energie:

1) ***catabolism*** – degradarea substanțelor complexe în compuși simpli. Prin catabolism se obține energie (ATP) și precursori pentru biosinteză;
2) ***anabolism*** – presupune biosinteza substanțelor complexe, procese care necesită energie (ATP).

Energia obținută în rezultatul proceselor catabolice este stocată inițial în ATP ce conține legături fosfoesterice. Energia eliberată la fiecare etapă de hidroliză a ATP-ului este de 7.3 kcal/mol. Aceeași cantitate de energie poate fi stocată în ATP în reacțiile inverse (Fig. A.4.2).

Analog ATP, alte nucleotide, precum GTP (guanozin-5'-trifosfat), UTP (uridin-5'-trifosfat) și CTP (citidin-5'-trifosfat), pot stoca energie, doar că acestea intervin în anumite procese metabolice.

În funcție de prezența sau absența oxigenului, metabolismul poate fi *aerob* sau *anaerob* (Fig. 3.1).

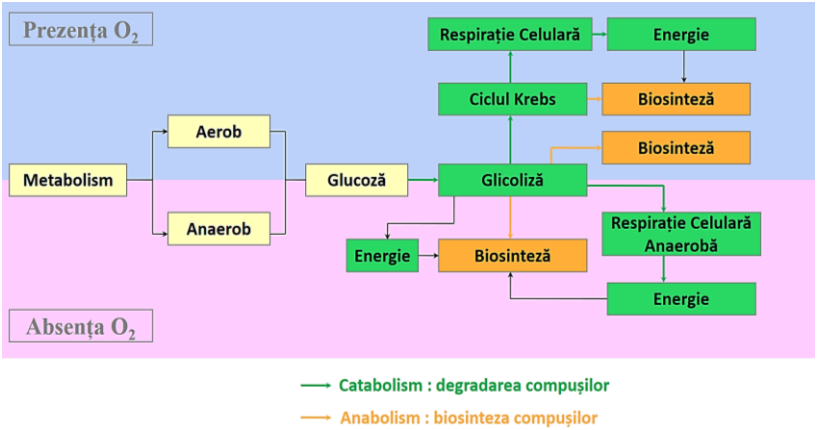


Figura 3.1. Reprezentarea schematică a metabolismului aerob și anaerob

Important!

Glicoliza are loc în citoplasmă, iar ciclul Krebs – în mitocondrii (eucariote) sau la nivelul membranei citoplasmatice interne (procariote).

Metabolismul aerob. Glicoliza presupune transformarea D-glucozei în *acid piruvic*, care în prezența oxigenului se include în ciclul Krebs (Fig. 3.2, 3.3).

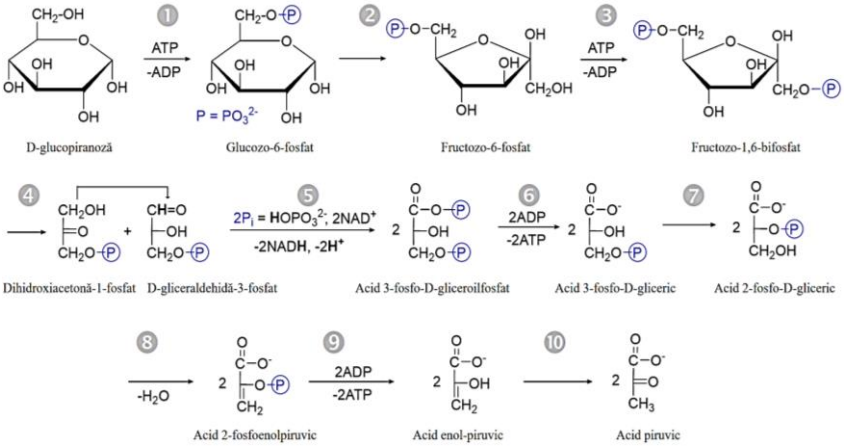


Figura 3.2. Mecanismul glicolizei

Important!

După formarea acidului piruvic acesta este activat prin transformarea în acetil-CoA. Acetil-CoA va trece în mitocondrii unde se va include în ciclul Krebs. Procesul de trecere a acetil-CoA în mitocondrii are loc cu consumul a 2 mol de NADH formate în glicoliză și care se transformă în $FADH_2$.

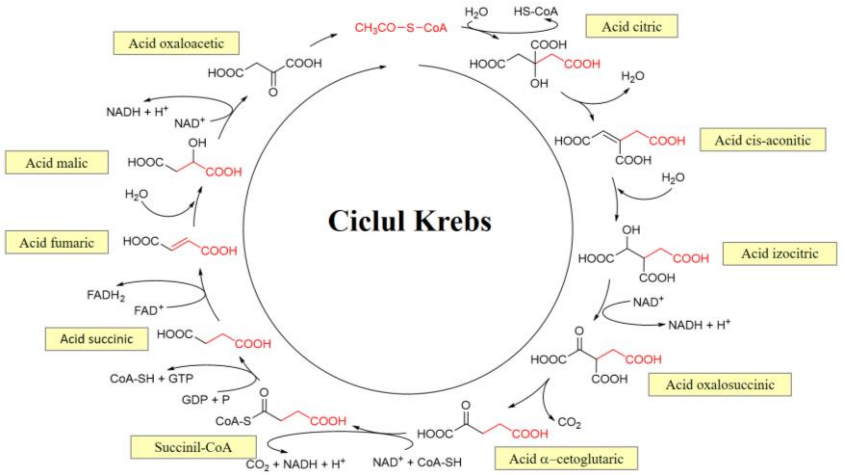


Figura 3.3. Reprezentarea schematică a ciclului Krebs

În rezultatul ciclului Krebs din 2 mol Acetil-S-CoA se formează 6 mol NADH și 2 mol $FADH_2$ care sunt utilizați pentru obținerea energiei (ATP) prin *fosforilare oxidativă*. În același timp, ciclul Krebs furnizează precursori pentru obținerea aminoacizilor și NADH, care sunt utilizate în diferite procese de biosinteză.

Important!

Din catabolizarea 1 mol de glucoză se obțin 38 mol ATP.

Glicoliza și ciclul Krebs nu sunt doar procese catabolice. Ambele furnizează precursori pentru procesele de biosinteză (anabolism) a acizilor nucleici, lipidelor, aminoacizilor, polizaharidelor, bazelor azotate, porfirinelor, acidului folic ș.a. (Fig. 3.4).

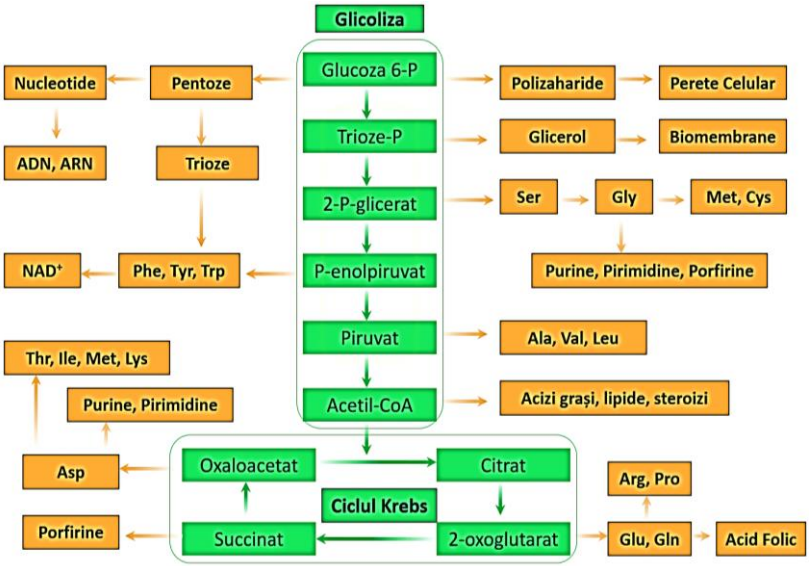


Figura 3.4. Metabolism aerob: reprezentarea schematică a procesului de glicoliză și a ciclului Krebs. Substanțele intermediare din ambele procese sunt precursori în biosinteza altor molecule

Metabolismul anaerob. În cazul lipsei oxigenului unele microorganisme vor obține energie în rezultatul *procesului de fosforilare* (respirație anaerobă) folosind ca acceptor de electroni nitrați, sulfați, sulful etc. În absența oxigenului,

unele microorganisme vor utiliza doar energia obținută din glicoliză. În acest caz se produce o cantitate mică de energie, ceea ce semnifică că pentru creșterea celulară este necesară o cantitate mai mare de substrat. Produsele de interes obținute în cadrul metabolismului anaerob (Fig. 3.5) depind de tipul microorganismului și de condițiile fizico-chimice de operare ale bioprocesului.

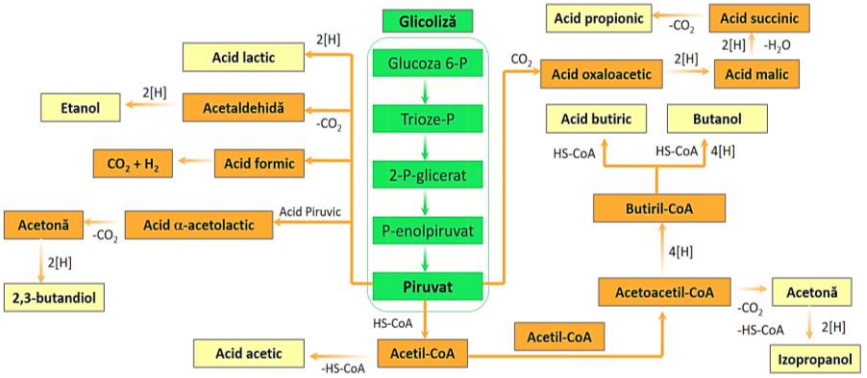


Figura 3.5. Reprezentarea schematică a formării diferitor produse de interes în cadrul metabolismului anaerob

Lucrare de laborator 3.1. Stabilirea parametrilor optimi ai procesului de fermentare alcoolică

Scopul lucrării constă în stabilirea influenței parametrilor fizici și chimici asupra procesului de fermentare alcoolică efectuat de *Saccharomyces Cerevisiae*: temperatura, tipul și concentrația substratului, pH-ul, tipul și concentrația unor săruri.

Modul de lucru:

1. Efectul temperaturii asupra intensității de fermentare:

- ✓ în trei baloane conice cu volumul de 250 mL (B1-3) se introduc câte 80 mL apă distilată încălzită la 40^0C și câte 5 g zaharoză; amestecul se agită până la dizolvarea substratului;
- ✓ în fiecare balon se adaugă câte 4 g drojdie și se fixează câte un balon de cauciuc;
- ✓ proba B1 se lasă la temperatura ambiantă, iar probele B2 și B3 se plasează în termostat la temperatura de 40^0C și 80^0C corespunzător, pentru 30-40 de minute;

- ✓ cu ajutorul unui metru se măsoară circumferința (C, cm) balonului și se calculează volumul (cm^3) acestuia cu ajutorul formulelor:

$V = \frac{4}{3}\pi r^3$, unde: (3.1)

V – volumul balonului de cauciuc, cm^3;

r – raza balonului de cauciuc, cm.

$r = \frac{C}{2\pi}$, unde: (3.2)

C – circumferința balonului de cauciuc, cm.

- ✓ rezultatele se notează în tabel:

Proba	**Conținut**	**Fermentare (intensitatea determinată vizual)**	**$V_{balonului}$, cm^3**
B1			
B2			
B3			

- ✓ în baza volumului maxim al balonului de cauciuc, în care s-a acumulat produsul secundar de fermentare – CO_2, se determină *temperatura optimă* a procesului de fermentare alcoolică.

2. Efectul concentrației substratului asupra intensității de fermentare:

- ✓ în patru baloane conice cu volumul de 250 mL (B1-4) se introduc câte 80 mL apă distilată încălzită la 40^0C;
- ✓ în baloanele B1-4 se dizolvă corespunzător 5, 15, 30, 50 g zaharoză;
- ✓ în fiecare balon se adaugă câte 4 g drojdie și se fixează baloanele de cauciuc;
- ✓ toate probele (B1-4) se plasează în termostat la temperatura de 40^0C timp de 30-40 de minute;
- ✓ cu ajutorul unui metru se măsoară circumferința (C, cm) balonului și se calculează volumul (cm^3) acestuia cu ajutorul formulelor 3.1 și 3.2;
- ✓ rezultatele se notează în tabel:

Proba	**Conținut**	**Fermentare (intensitatea determinată vizual)**	**$V_{balonului}$, cm^3**
B1			
B2			
B3			
B4			

- ✓ în baza volumului maxim al balonului de cauciuc, în care s-a acumulat CO_2, se determină *concentrația optimă* a substratului pentru procesul de fermentare alcoolică.

3. Efectul pH-ului mediului asupra intensității de fermentare:

- ✓ în patru baloane conice cu volumul de 250 mL (B1-4) se introduc câte 80 mL apă distilată încălzită la 40^0C;
- ✓ în baloanele B1 și B2 se ajustează pH-ul cu soluție de acid acetic la valorile 3 și 5 respectiv; în balonul B3 se ajustează pH-ul la valoarea 7, iar în B4 se ajustează pH-ul la valoarea 10 cu soluție de hidroxid de amoniu;
- ✓ în fiecare vas se adaugă 5 g zaharoză și 4 g drojdie și baloanele se introduc în termostat la temperatura de 40^0C timp de 30 de minute;
- ✓ cu ajutorul unui metru se măsoară circumferința (C, cm) balonului și se calculează volumul (cm^3) acestuia cu ajutorul formulelor 3.1 și 3.2;
- ✓ rezultatele se notează în tabel:

Proba	**Conținut**	**pH**	**Fermentare (intensitatea determinată vizual)**	**$V_{balonului}$, cm^3**
B1				
B2				
B3				
B4				

- ✓ în baza volumului maxim al balonului de cauciuc, în care s-a acumulat CO_2, se determină *valoarea optimă a pH-ului* pentru procesul de fermentare alcoolică.

4. Efectul naturii chimice a substratului asupra intensității de fermentare:

- ✓ în cinci baloane conice cu volumul de 250 mL (B1-5) se introduc câte 80 mL apă distilată încălzită la 40^0C;
- ✓ în baloanele B1-3 se dizolvă corespunzător câte 5 g fructoză, glucoză și zaharoză, în B4 se adaugă 50 mL soluție de amidon, iar în B5 – 50 mL lapte;
- ✓ în fiecare balon se adaugă câte 4 g drojdie și se fixează baloanele de cauciuc;
- ✓ toate probele (B1-5) se plasează în termostat la temperatura de 40^0C timp de 30-40 de minute;

- ✓ cu ajutorul unui metru se măsoară circumferința (C, cm) balonului și se calculează volumul (cm^3) acestuia cu ajutorul formulelor 3.1 și 3.2;
- ✓ rezultatele se notează în tabel:

Proba	**Conținut**	**Fermentare (intensitatea determinată vizual)**	**$V_{balonului}$, cm^3**
B1			
B2			
B3			
B4			
B5			

- ✓ în baza volumului maxim al balonului de cauciuc, în care s-a acumulat CO_2, se determină *substratul optim* pentru procesul de fermentare alcoolică.

5. Efectul compoziției ionice a mediului nutritiv asupra intensității de fermentare:

- ✓ în două baloane conice cu volumul de 250 mL (B1-2) se introduc câte 5 g zaharoză, în B1 se adaugă 80 mL apă distilată încălzită la temperatura de 40^0C, iar în B2 – 80 mL soluție de 1-3% clorură de calciu, sulfat de magneziu și clorură de amoniu;
- ✓ în fiecare balon se adaugă câte 4 g drojdie și se fixează baloanele de cauciuc;
- ✓ ambele probe se plasează în termostat la temperatura de 40^0C timp de 30-40 de minute;
- ✓ cu ajutorul unui metru se măsoară circumferința (C, cm) balonului și se calculează volumul (cm^3) acestuia cu ajutorul formulelor 3.1 și 3.2;
- ✓ rezultatele se notează în tabel:

Proba	**Conținut**	**Fermentare (intensitatea determinată vizual)**	**$V_{balonului}$, cm^3**
B1			
B2			

- ✓ în baza volumului maxim al balonului de cauciuc, în care s-a acumulat CO_2, se determină *efectul compoziției ionice* asupra procesului de fermentare alcoolică.

6. Efectul clorurii de sodiu asupra intensității de fermentare:

- ✓ în trei baloane conice cu volumul de 250 mL (B1-3) se introduc câte 5 g zaharoză și 80 mL apă distilată încălzită la temperatura de 40^0C;
- ✓ în baloanele B1-3 se adaugă 1 g, 10 g, și 20 g corespunzător de clorură de sodiu;
- ✓ în fiecare balon se adaugă câte 4 g drojdie și se fixează baloanele de cauciuc;
- ✓ probele se plasează în termostat la temperatura de 40^0C timp de 30-40 de minute;
- ✓ cu ajutorul unui metru se măsoară circumferința (C, cm) balonului și se calculează volumul (cm^3) acestuia cu ajutorul formulelor 3.1 și 3.2;
- ✓ rezultatele se notează în tabel:

Proba	**Conținut**	**Fermentare (intensitatea determinată vizual)**	**$V_{balonului}$, cm^3**
B1			
B2			
B3			

- ✓ în baza volumului maxim al balonului de cauciuc, în care s-a acumulat CO_2, se determină *concentrația optimă de NaCl* pentru procesul de fermentare alcoolică.

Lucrare de laborator 3.2. Simularea și optimizarea fluxurilor metabolice

Programul **COPASI**
Disponibil: copasi.org

Scopul lucrării constă în familiarizarea studenților cu simularea și analiza fluxurilor metabolice relevante industrial, utilizând software-ul COPASI (Complex Pathway Simulator).

Modul de lucru:

- ✓ se deschide programul COPASI;
- ✓ se creează un proiect nou: *File* → *New*;
- ✓ se denumește proiectul creat și se setează unitățile de măsură pentru parametrii: timp, volum, conținut;
- ✓ se selectează modelul biochimic și se creează un nou compartiment: *Model* → *Biochemical* → *Compartments*;

- ✓ se adaugă metaboliții căii metabolice simulate: *Model → Species → New Species*;
- ✓ se setează concentrațiile inițiale ale metaboliților indicați. Se indică valoarea 0 pentru produșii de reacție;
- ✓ se scriu reacțiile fluxului metabolic: *Model → Reactions → New Reaction*;
- ✓ pentru fiecare reacție se indică ecuația cinetică (*Rate Law*);

Important!

Ecuația cinetică poate fi selectată din lista existentă sau poate fi creată: *Rate Law → Create a new rate law for this reaction*. La crearea ecuațiilor cinetice noi programul oferă acces la formulele pre-salvate (cca 100) pentru ghidare.

- ✓ se introduc valorile parametrilor cinetici (K_m, V_{max}, k_1 ș.a.), care diferă în funcție de ecuația cinetică selectată;
- ✓ se setează simularea dinamică a fluxului metabolic definit: *Model → Tasks → Time Course.* În acest compartiment se setează timpul total de simulare (*Duration*), pasul de eșantionare (*Intervals*) și metaboliții de interes (*Output Assistant*);
- ✓ se execută simularea prin tastarea comenzii *Run*;
- ✓ rezultatele simulării pot fi vizualizate grafic. Pentru aceasta se accesează compartimentul: *Output Specifications → Plots;*
- ✓ se construiește dependența grafică dorită: *New Plot → New Curve,* prin selectarea parametrilor pentru axele OX și OY;
- ✓ pentru vizualizarea grafică a rezultatelor se accesează repetat compartimentul *Model → Tasks → Time Course* și se tastează comanda *Run*;
- ✓ pentru optimizarea procesului se modifică parametrii selectați și se tastează din nou comanda *Run*.

Studii de caz:

1. Simulați un proces biochimic ireversibil descris de ecuația $v = k_1[S]$, constanta de viteză (k_1) este egală cu 0,1. Propuneți căi de optimizare a fluxului metabolic. Simulați și comparați scenariile.

2. Simulați procesul de fosforilare a glucozei (Glc) la glucozo-6-fosfat (G6P), proces catalizat de enzima hexokinaza, dacă se admite că este un proces ireversibil. Justificați importanța fosforilării glucozei pentru procesul de glicoliză.

3. Simulați procesul de hidroliză enzimatică a proteinelor având ca reper datele experimentale obținute la efectuarea lucrării de laborator nr. 2.3 Studiul legităților cinetice ale hidrolizei enzimatice a proteinelor.

3.2. Indicatorii tehnici în operarea bioreactoarelor

Într-un proces biotehnologic elementul–cheie este *bioreactorul*. Acesta trebuie să fie proiectat astfel încât să asigure condițiile optime ale fermentării. Principalele aspecte tehnice de care se ține cont la construcția bioreactorului sunt:

- ✓ *proces monoseptic* – un singur microorganism participă în biosinteză;
- ✓ *tipul de agitare* – mecanică, pneumatică sau mixtă;
- ✓ *aerarea* – asigurarea mediului nutritiv cu oxigen și evacuarea dioxidului de carbon;
- ✓ *dimensiunile optime ale bioreactorului* pentru un anumit proces;
- ✓ *modul de operare* – continuă sau discontinuă (în lot);
- ✓ *controlul termic și al forței de forfecare* – la utilizarea celulelor lipsite de perete celular;
- ✓ *parametrii procesului biologic* – temperatura, presiunea, pH-ul, viteza de agitare, viteza de aerare;
- ✓ *monitorizarea în timp real a parametrilor procesului* – dotarea bioreactorului cu senzori;
- ✓ *prevenirea contaminării* și *biosecuritatea*.

Rețineți!

Bioreactoarele sunt proiectate pentru un anumit proces biotehnologic. Astfel, volumul unui bioreactor poate varia de la 20 L până la 1000 m^3.

Bioreactoarele pot fi clasificate după modul de agitare, tipul procesului și tipul metabolismului biocatalizatorului (Fig. 3.6; 3.7).

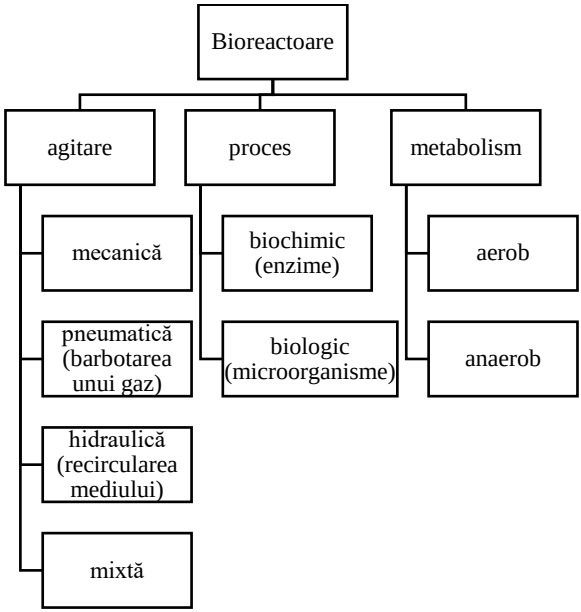
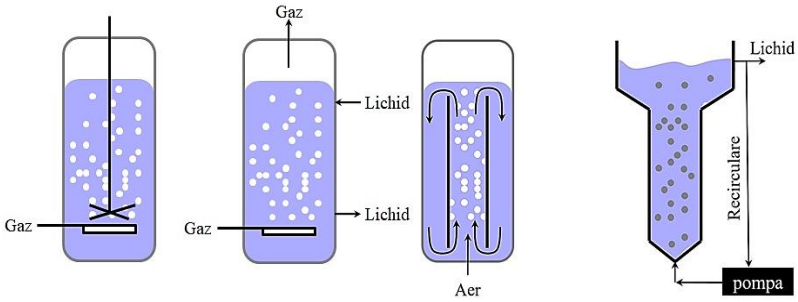


Figura 3.6. Clasificarea bioreactoarelor



Agitare mecanică *Agitare pneumatică* *Agitare hidraulică*

Figura 3.7. Reprezentarea schematică a bioreactoarelor cu diferite tipuri de agitare

Cele mai utilizate bioreactoare sunt cele cu agitare mecanică, dotate cu rotor. Elementele constitutive ale unui astfel de bioreactor sunt prezentate în figura 3.8a, precum și în figura 3.8b – imaginile bioreactorului industrial, din partea superioară.

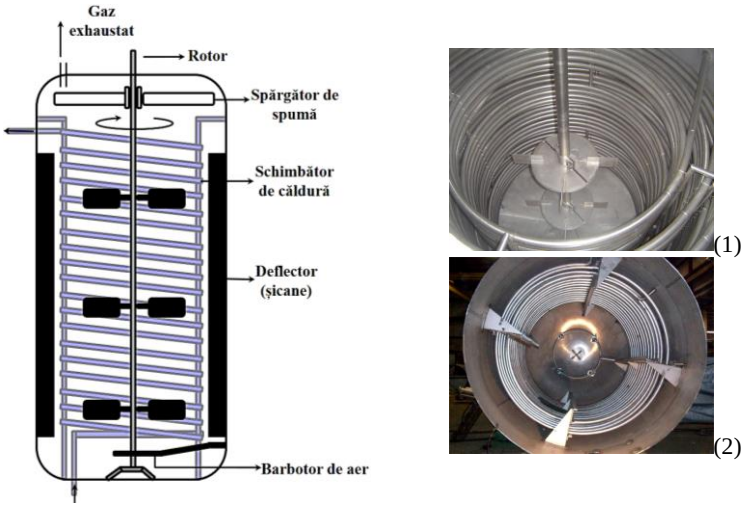


Figura 3.8. Schema bioreactorului cu agitare mecanică

a) părțile componente ale bioreactorului

b) partea superioară a bioreactoarelor cu shimbător de căldură (1) și șicane (2)

În bioreactoarele cu agitare mecanică agitarea amestecului asigură:

- ❖ concentrația uniformă a amestecului,
- ❖ suspendarea particulelor sau a celulelor în amestec,
- ❖ dispersarea bulelor de aer (dacă bioprocesul este aerob),
- ❖ transferul căldurii din amestec spre schimbătorul de căldură sau invers.

Pentru agitarea amestecului sunt utilizate mai multe tipuri de rotoare (Fig. 3.9).



turbina Rushton | turbina hydrofoil | turbina Smith (cu palete concave) | rotor elice

Figura 3.9. Tipuri de rotoare utilizate în bioreactoarele cu agitare mecanică

Important!

Rotoarele utilizate în bioreactoare nu produc o forță de forfecare înaltă, de aceea sunt folosite și în procesele de fermentare care implică culturi sensibile la forța de forfecare.

Majoritatea bioreactoarelor au raportul înălțime-diametru (H/D) de $^2/_3$. Pentru bioreactoarele ce utilizează culturi de celule animale acest raport tinde spre 1. Diametrul turbinei Rushton reprezintă 30-40% din diametrul bioreactorului (Fig. 3.10).

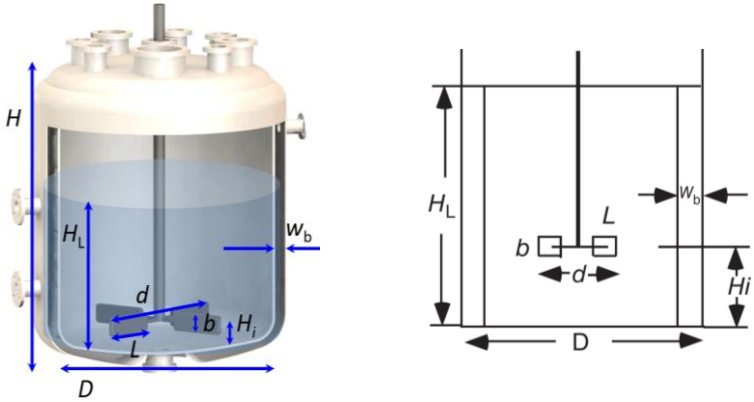


Figura 3.10. Reprezentarea schematică a dimensiunilor turbinei Rushton în raport cu cele ale bioreactorului:

H – înălțimea bioreactorului; *D* – diametrul bioreactorului; H_L – înălțimea bioamestecului; *d* – diametrul rotorului; H_i – distanța la care este poziționat rotorul în raport cu partea inferioară a bioreactorului; *b* – lățimea paletelor rotorului; *L* – lungimea paletelor rotorului.

Dimensiunile turbinei Rushton în raport cu cele ale bioreactorului trebuie să corespundă următoarelor rapoarte:

$$\frac{L}{d} = \frac{1}{4}; \frac{b}{d} = \frac{1}{5}; \frac{d}{D} = \frac{1}{3}; D = H_L; d = H_i \quad (3.3)$$

Puterea necesară pentru amestecarea lichidelor neaerate depinde de viteza de agitare, tipul și dimensiunea rotorului, geometria reactorului, densitatea și viscozitatea lichidului. Aceste variabile sunt exprimate prin numerele adimensionale: *numărul Reynolds (Re)* (ec. 3.4, 3.5) și *numărul putere* (N_p) (ec. 3.6).

$$Re = \frac{Nd^2\rho}{\eta}, \text{ unde:} \quad (3.4)$$

Re – numărul Reynolds;
N – viteza de rotație, Hz (cicluri per secundă);
d – diametrul rotorului, m;
ρ – densitatea lichidului, kg/m^3;
η – viscozitatea dinamică, kg/m·s.

Dacă se utilizează viscozitatea cinematică ($\nu = \frac{\eta}{\rho}$) în formula de calcul al numărului Reynolds, atunci ecuația 3.4 va avea forma:

$$Re = \frac{Nd^2}{\nu}, \text{ unde:} \quad (3.5)$$

ν – viscozitatea cinematică, m^2/s.

$$N_P = \frac{P}{\rho N^3 d^5}, \text{ unde:} \quad (3.6)$$

N_p – numărul putere;

P – puterea de agitare, W;

ρ – densitatea lichidului, kg/m^3;

N – viteza de rotație, Hz (cicluri per secundă);

d – diametrul rotorului, m.

Relația dintre numărul Reynolds și numărul putere a fost determinată experimental pentru mai multe tipuri de rotoare și pentru diferiți parametri geometrici ai bioreactorului (Fig. 3.11).

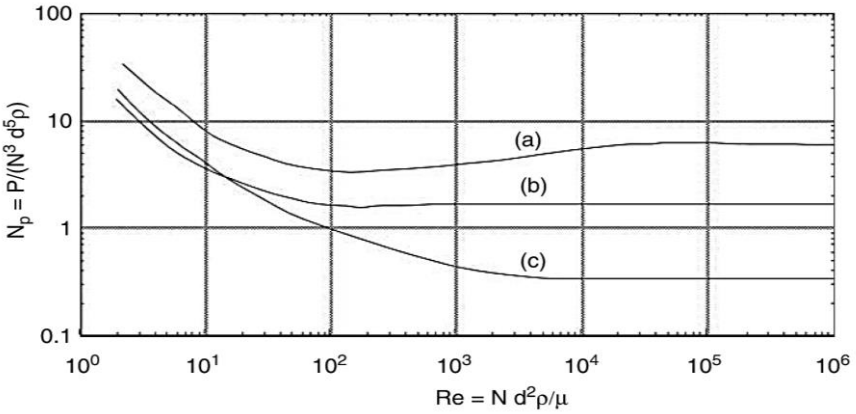


Figura 3.11. Dependența dintre consumul de putere (N_p) și numărul Reynolds (Re) pentru turbinele Rushton (**a**), Smith (**b**) și rotorul elice (**c**)

Puterea necesară pentru agitarea amestecului reprezintă *puterea mecanică* necesară pentru a pune în mișcare rotorul. În mod firesc, puterea de agitare variază în funcție de tipul agitatorului și de proprietățile amestecului.

Puterea consumată la agitarea unui amestec aerat este mai mică decât în cazul unui amestec neaerat. Aceasta se explică prin densitatea mai mică a amestecului aerat în vecinătatea rotorului.

Relația dintre puterea consumată la agitarea amestecului aerat (P_G) și a celui neaerat (P_0) este prezentată în ecuația 3.7.

$$\lg\left(\frac{P_G}{P_0}\right) = -192\left(\frac{d}{D}\right)^{4,38}\left(\frac{d^2N}{\nu}\right)^{0,115}\left(\frac{dN^2}{g}\right)^{1,96\left(\frac{d}{D}\right)}\left(\frac{Q}{Nd^3}\right), \text{ unde:} \qquad (3.7)$$

P_G – puterea consumată la agitarea amestecului aerat, W;
P_0 – puterea consumată la agitarea amestecului neaerat, W;
d – diametrul rotorului, m;
D – diametrul bioreactorului, m;
N – viteza de rotație, Hz;
ν – viscozitatea cinematică, m^2/s;
g – accelerația gravitațională, m/s^2;
Q – viteza de aerare a bioamestecului, m^3/s.

Timpul de agitare este un indicator al gradului de omogenizare a lichidului și este influențat de:

- ✓ dimensiunea și geometria reactorului;
- ✓ dimensiunea și geometria rotorului;
- ✓ proprietățile bioamestecului;
- ✓ viteza rotorului;
- ✓ viteza de aerare.

Rețineți!

Prezența particulelor suspendate mărește timpul de agitare, pe când aerarea micșorează timpul de agitare în cazul soluțiilor apoase.

Experimental a fost determinată dependența grafică între numărul Reynolds și produsul dintre viteza de rotație (N) și timpul de agitare (t_m) (Fig. 3.12).

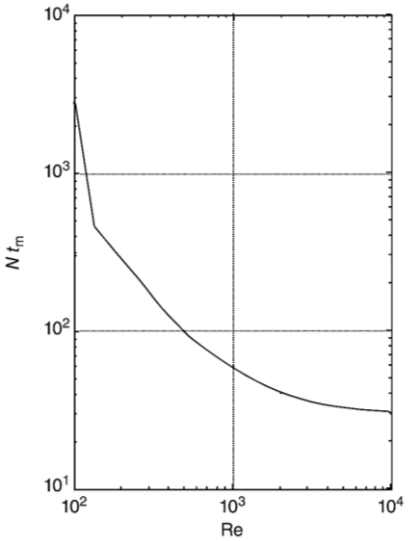
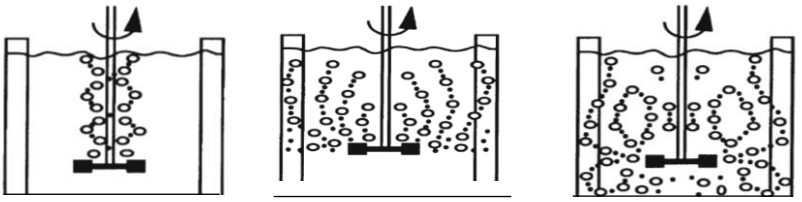


Figura 3.12. Dependența grafică dintre numărul Reynolds și produsul dintre viteza de rotație și timpul de agitare

Turbina Rushton este eficientă în *dispersarea particulelor gazului*. În funcție de viteza de adiție a gazului în reactor (Q) și viteza de agitare a rotorului (N) sunt posibile trei cazuri de dispersare a gazului (Fig. 3.13):

1. $Q >> N$, este cazul rotorului „inundat", dispersie slabă;
2. $Q > N$, este cazul rotorului „încărcat", dispersie eficientă în partea superioară a rotorului;
3. $Q < N$, dispersie completă a gazului, atât în partea superioară, cât și în partea inferioară a rotorului.



rotor inundat | rotor încărcat | dispersie completă a gazului

Figura 3.13. Cazuri posibile de dispersie a gazului în bioreactor

Corelația dintre viteza de adiție a gazului (Q) și viteza de rotație a rotorului (N) este exprimată prin două variabile adimensionale: ***numărul viteză-gaz*** (***Ql_g***) și ***numărul Froude*** (***Fr***) (ec. 3.8, 3.9).

$$Ql_g = \frac{Q_g}{Nd^3} \cdot Fr, \text{ unde:} \quad (3.8)$$

Ql_g – numărul viteză-gaz;
Q_g – viteza gazului ce poate fi complet dispersat de rotor, m^3/s;
d – diametrul rotorului, m;
N – viteza de rotație, Hz.

$$\mathrm{Fr} = \frac{\mathrm{N^2 d}}{\mathrm{g}}, \text{ unde:} \quad (3.9)$$

Fr – numărul Froude;
g – accelerația gravitațională, m/s^2.

Experimental, au fost adaptate formulele de calcul pentru numărul viteză-gaz pentru trecerea de la *cazul rotorului inundat la cazul rotorului încărcat* (ec. 3.10) și pentru *cazul dispersiei complete a gazului* (ec. 3.11).

$$Ql_g = 30\left(\frac{d}{D}\right)^{3,5} \cdot Fr \quad (3.10)$$

$$Ql_g = 0{,}2\left(\frac{d}{D}\right)^{0,5} \cdot Fr^{0,5} \quad (3.11)$$

Suspendarea componentelor bioamestecului (celulelor, enzimelor imobilizate, a unor componente nutritive) este importantă pentru asigurarea condițiilor optime de desfășurare a proceselor biochimice. În acest caz este necesară estimarea dimensiunii rotorului și a vitezei de operare a acestuia, importante pentru suspendarea componentelor bioamestecului.

Lichidele neaerate. Viteza necesară pentru agitarea amestecului în lipsa aerării se calculează conform *ecuației Zwietering* (ec. 3.12).

$$N_{JS} = \frac{S \cdot \nu_L^{0,1} \cdot D_p^{0,2} \cdot \left[g \cdot \frac{(\rho_p - \rho_L)}{\rho_L}\right]^{0,45} \cdot X^{0,13}}{d^{0,85}}, \text{ unde:} \quad (3.12)$$

N_{JS} – viteza de agitare a amestecului neaerat, Hz;
S – coeficient geometric adimensional dependent de geometria rotorului și a bioreactorului;
ν_L – viscozitatea cinematică, m^2/s;
g – accelerația gravitațională, m/s^2;
ρ_P – densitatea particulelor, kg/m^3;
ρ_L – densitatea lichidului, kg/m^3;
X – conținutul procentual al particulelor suspendate în bioamestec, %;
d – diametrul rotorului, m.

Pentru fiecare tip de rotor este determinată valoarea experimentală a coeficientului geometric *S* (Tab. 3.1).

Tabelul 3.1. Valorile coeficientului geometric S pentru diferite rotoare

Rotor	**Raporturile dintre dimensiunile rotorului și ale bioreactorului**		
	$\frac{d^*}{D}$	$\frac{H_i{}^*}{D}$	S^*
turbina Rushton	0,25	0,25	12,00
	0,33	0,17	5,80
	0,33	0,25	6,70
	0,33	0,50	8,00
	0,50	0,25	4,25
	0,50	0,17	3,90
elice	0,33	0,25	6,60
turbina PBT (cu lamă înclinată)	0,33	0,20	5,70

* *vezi figura 3.10*

Lichidele aerate. La calcularea vitezei pentru agitarea amestecului aerat, în ecuația 3.12 se include viteza de adiție a gazului ținându-se cont și de parametrii geometrici ai bioreactorului (ec. 3.13).

$$N_{JSG} = \frac{S \cdot \nu_L^{0,1} \cdot D_p^{0,2} \cdot \left[g \cdot \frac{(\rho_p - \rho_L)}{\rho_L} \right]^{0,45} \cdot X^{0,13}}{d^{0,85}} + aQ, \text{ unde:} \quad (3.13)$$

$$a = 2{,}4 \; pentru \; \frac{d}{D} = 0{,}33 \text{ sau } a = 0{,}94 \; pentru \; \frac{d}{D} = 0{,}5 \quad (3.14)$$

Q – viteza de adiție a gazului, vvm (volum gaz per volum de lichid per minut).

Important!

Această ecuație nu poate fi aplicată pentru particulele cu densitate înaltă (diferența dintre densitatea particulelor și a lichidului este mai mică de 50 kg/m^3) și în cazul vitezei mici de adiție a gazului.

Lucrare practică 3.1. Probleme de calcul: Stabilirea necesarului de putere, dispersiei gazului și a suspendării particulelor în bioamestec

1. Calculați necesarul de putere cu și fără aerare pentru un bioreactor cu diametrul de 1,5 m, echipat cu turbina Rushton, dacă profunzimea bioamestecului este de 1,5 m, diametrul rotorului – 0,5 m, lățimea paletelor – 0,25 m și lungimea – 0,20 m, operat la o viteză de 180 rpm. Viteza de aerare a bioreactorului este de 0,6 m^3/min. Temperatura de operare este temperatura ambiantă. Viscozitatea dinamică constituie 0,001 kg/m·s și densitatea – 1000 kg/m^3.

Modul de rezolvare:

1. Se convertește viteza de rotație din rpm (rotații per minut) în cicluri per secundă (cps sau s^{-1}):

1 rpm= 60 cps, respectiv 180 rpm= 60 cps, de unde $N = \frac{180}{60} = 3\ cps$

2. Se calculează numărul Reynolds conform ecuației 3.5:

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} = \frac{0{,}001\ {}^{kg}/_{m\cdot s}}{1000\ {}^{kg}/_{m^3}} = 1\cdot 10^{-6}\ {}^{m^2}/_{s};\ Re = (0{,}5m)^2\frac{3\ s^{-1}}{10^{-6}\ {}^{m^2}/_{s}} = 7{,}5\cdot 10^5$$

3. Se determină numărul putere (N_p) pentru turbina Rushton, prin extrapolare, din dependența grafică (Fig. 3.11): pentru Re= $7{,}5\cdot 10^5$, N_p= 6.

4. Se calculează consumul de putere (P_0) la agitare conform ecuației 3.6:

$$P_0 = N_p\rho N^3 d^5 = 6\cdot 1000\ {}^{kg}/_{m^3}\cdot (3s^{-1})^3\cdot (0{,}5m)^5 = 5060\ W$$

5. Se calculează consumul de putere la aerarea bioamestecului (P_G) (ec. 3.7), ținându-se cont că raportul $\frac{d}{D}$ pentru turbina Rushton este $\frac{1}{3}$. Se recalculează viteza de aerare în m^3/s:

$$1\ {}^{m^3}/_{s} \ldots\ldots\ldots\ldots 60\ {}^{m^3}/_{min}$$
$$x\ {}^{m^3}/_{s} \ldots\ldots\ldots\ldots 0{,}6\ {}^{m^3}/_{min},\ Q = 0{,}01\ {}^{m^3}/_{s}$$

$$\lg\left(\frac{P_G}{P_0}\right) = -192\left(\frac{1}{3}\right)^{4{,}38}\left(\frac{0{,}5^2\cdot 3}{10^{-6}}\right)^{0{,}115}\left(\frac{0{,}5\cdot 3^2}{9{,}8}\right)^{1{,}96\left(\frac{1}{3}\right)}\left(\frac{0{,}01}{3\cdot 0{,}5^3}\right)$$

$\lg\left(\frac{P_G}{P_0}\right) = -0{,}119$, deci: $\frac{P_G}{P_0} = 0{,}76$, de unde: $P_G = 5060\ W\cdot 0{,}76 = 3850\ W$.

Răspuns: P_0= 5060 W, P_G= 3850 W.

2. Un bioreactor echipat cu turbina Rushton conține un lichid cu densitatea 1,0 g/cm^3 și viscozitatea 0,013 g/cm·s, diametrul biorectorului este de 2,4 m, profunzimea lichidului – 24 m, diametrul turbinei – 0,8 m, volumul lichidului –

10,85 m^3. Calculați timpul de agitare și consumul de putere dacă viteza de rotație este de 90 rpm.

Modul de rezolvare:

1. Se calculează numărul Reynolds conform ecuației 3.5:

$$N = \frac{90}{60} = 1{,}5\ cps;\ Re = \frac{1{,}5\ s^{-1} \cdot (80cm)^2 \cdot 1\ {}^{g}/_{cm^3}}{0{,}013\ {}^{g}/_{cm \cdot s}} = 7{,}38 \cdot 10^5$$

2. Se determină valoarea produsului $N \cdot t_m$ din dependența grafică (Fig. 3.12) și se calculează timpul de agitare din figura 3.12: $N \cdot t_m = 30$, respectiv $t_m = \frac{30}{1{,}5} = 20\ s$

3. Se determină numărul putere (N_p) pentru turbina Rushton, prin extrapolare, din dependența grafică (Fig. 3.11), pentru $Re = 7{,}38 \cdot 10^5$, $N_p = 6$

4. Se calculează consumul de putere (P) la agitare conform ecuației 3.6:

$$P = 1000\ {}^{kg}/_{m^3} \cdot 6 \cdot (1{,}5 s^{-1})^3 \cdot (0{,}8m)^5 = 6{,}64\ kW$$

Răspuns: t_m=20 s; P= 6,64 kW.

3. Înălțimea bioamestecului într-un bioreactor dotat cu turbina Rushton, operată cu o viteză de 75 rpm, este de 1,4 m. Diametrul turbinei este de 0,5 m, fiind poziționată la o distanță de 0,35 m în raport cu partea inferioară a bioreactorului, viteza de adiție a aerului în bioreactor constituie 0,28 m^3/min.

a) Determinați dacă în aceste condiții gazul va fi complet dispersat.
b) Determinați dacă rotorul va fi „inundat" sau „încărcat", dacă viteza rotorului se va reduce de la 75 rpm la 45 rpm.

Modul de rezolvare:

a) Determinați dacă în aceste condiții gazul va fi complet dispersat.

1. Se convertește viteza de rotație din rpm (rotații per minut) în cicluri per secundă (cps sau s^{-1}):

$$N = \frac{75}{60} = 1{,}25\ s^{-1}$$

2. Se calculează numărul Froude (ec. 3.9):

$$Fr = \frac{(1{,}25 s^{-1})^2 \cdot 0{,}5m}{9{,}8\ {}^{m}/_{s^2}} = 0{,}0797$$

3. Se calculează numărul viteză-gaz pentru cazul gazului complet dispersat (ec. 3.11):

$Ql_g = 0{,}2 \cdot \left(\frac{0{,}5m}{1{,}4m}\right)^{0{,}5} \cdot 0{,}0797^{0{,}5} = 0{,}0337$. D=$H_L$ în cazul dotării bioreactorului cu turbina Rushton.

4. Se calculează viteza gazului (Q_g) ce poate fi complet dispersat de rotor în condițiile date (ec. 3.8):

$$Q_g = 0{,}0337 \cdot 1{,}25 s^{-1} \cdot (0{,}5m)^3 = 5{,}27 \cdot 10^{-3}\, {}^{m^3}/_{s}\ sau\ 0{,}32\, {}^{m^3}/_{min}$$

Viteza gazului care poate fi complet dispersat de rotor este de 0,32 m^3/min, valoare superioară vitezei de adiție a gazului în bioreactor (Q= 0,28 m^3/min). Deci, gazul va fi complet dispersat în condițiile date de operare a turbinei Rushton.

b) Determinați dacă rotorul va fi „inundat" sau „încărcat", dacă viteza rotorului se va reduce de la 75 rpm la 45 rpm.

1. Se convertește viteza de rotație din rpm (rotații per minut) în cicluri per secundă (cps sau s^{-1}):

$$N = \frac{45}{60} = 0{,}75\ s^{-1}$$

2. Se calculează numărul Froude (ec. 3.9):

$$Fr = \frac{(0{,}75 s^{-1})^2 \cdot 0{,}5m}{9{,}8\, {}^{m}/_{s^2}} = 0{,}0287$$

3. Se calculează numărul viteză-gaz pentru trecerea de la cazul rotor inundat la rotor încărcat (ec. 3.10):

$$Ql_g = 30 \cdot \left(\frac{0{,}5}{1{,}4}\right)^{3{,}5} \cdot 0{,}0287 = 0{,}0234$$

4. Se calculează viteza gazului (Q_g) dispersat de rotor în condițiile date (ec. 3.8):

$$Q_g = 0{,}0234 \cdot 0{,}75 s^{-1} \cdot (0{,}5m)^3 = 2{,}19 \cdot 10^{-3}\, {}^{m^3}/_{s}\ sau\ 0{,}13\ {}^{m^3}/_{min}$$

Viteza gazului care poate fi complet dispersat de rotor în condițiile date este de 0,13 m^3/min, valoare inferioară vitezei de aerare a bioreactorului (Q= 0,28 m^3/min). Deci, gazul nu va fi dispersat, iar rotorul va fi inundat.

Răspuns: a) Q_g= 0,32 m^3/min, gaz complet dispersat; b) Q_g= 0,13 m^3/min, rotor inundat.

4. Celulele unor fungii sunt cultivate într-un bioreactor cu capacitatea de 10 m^3 și diametrul de 2,4 m, echipat cu turbina Rushton. Diametrul turbinei constituie 1,2 m, iar viteza de operare 50 rpm. Turbina este poziționată la o distanță de 0,6 m față de partea inferioară a bioreactorului. Densitatea bioamestecului constituie 1000 kg/m^3 iar viscozitatea – 0,055 kg/m·s. Densitatea și diametrul culturilor celulare sunt 1035 kg/m^3 și 600 μm corespunzător, concentrația celulelor în bioreactor este de 40%. Argumentați prin calcule dacă celulele sunt suspendate în aceste condiții.

Modul de rezolvare:

1. Se calculează raporturile dintre dimensiunile rotorului și ale bioreactorului:

$\frac{d}{D} = \frac{1,2}{2,4} = 0,5$; $\frac{H_i}{D} = \frac{0,6}{2,4} = 0,25$. Conform tabelului 3.1, valoarea coeficientului geometric S va fi 4,25.

2. Se calculează viscozitatea cinematică:

$$\nu = \frac{0,055\ {}^{kg}/_{m \cdot s}}{1000\ {}^{kg}/_{m^3}} = 5,5 \cdot 10^{-5}\ {}^{m^2}/_{s}$$

3. Se calculează viteza necesară pentru agitarea amestecului în lipsa aerării (ec. 3.12):

$$N_{JS} = \frac{4,25 \cdot \left(5,5 \cdot 10^{-5}\ {}^{m^2}/_{s}\right)^{0,1} \cdot (600 \cdot 10^{-6} m)^{0,2} \cdot \left[9,8\ {}^{m}/_{s^2} \cdot \frac{(1035 - 1000)\ {}^{kg}/_{m^3}}{1000\ {}^{kg}/_{m^3}}\right]^{0,45} \cdot 40^{0,13}}{(1,2m)^{0,85}} = 0,20 s^{-1}$$

N_{JS}= 0,20 s^{-1} sau 12 rpm.

Rotorul este operat la viteza de 50 rpm, viteză superioară valorii calculate (12 rpm). Deci, celulele vor fi suspendate.

Răspuns: N_{JS}= 12 rpm, celulele vor fi suspendate.

5. În cadrul unui proces biotehnologic celulele sunt cultivate într-un bioreactor cu volumul și diametrul de 400 L și 0,8 m corespunzător. Diametrul turbinii Rushton și profunzimea bioamestecului constituie $^1/_3$ și profunzimea bioamestecului – $^1/_4$ din diametrul bioreactorului. Densitatea și viscozitatea bioamestecului constituie 1000 kg/m^3 și 0,0008 kg/m·s corespunzător. Diametrul mediu al particulelor este de 250 mm, densitatea – 1,9 g/cm^3 și concentrația particulelor – 15%. Viteza de adiție a gazului este de 0,5 vvm. Calculați dacă gazul va fi complet dispersat în condiția în care particulele sunt suspendate.

Modul de rezolvare:

1. Se calculează viscozitatea cinematică:

$$\nu = \frac{0,0008\ {}^{kg}/_{m \cdot s}}{1000\ {}^{kg}/_{m^3}} = 8 \cdot 10^{-7}\ {}^{m^2}/_{s}$$

2. Se calculează diametrul rotorului și coeficientul geometric S (Tab. 3.1):

în cazul turbinei Rushton $\frac{d}{D} = \frac{1}{3} = 0,33, d = 0,33 \cdot 0,8\ m = 0,267\ m$

$\frac{H_i}{D} = \frac{1}{4} = 0,25, H_i = 0,25 \cdot 0,8\ m = 0,2\ m$. Deci, S= 6,7

3. Se calculează viteza necesară pentru agitarea amestecului în lipsa aerării (ec. 3.12):

$$N_{JS} = \frac{6,7 \cdot \left(8 \cdot 10^{-7} {}^{m^2}/_{s}\right)^{0,1} \cdot (250 \cdot 10^{-6} m)^{0,2} \cdot \left[9,8 {}^{m}/_{s^2} \cdot \frac{(1900 - 1000)\ {}^{kg}/_{m^3}}{1000\ {}^{kg}/_{m^3}}\right]^{0,45} \cdot 15^{0,13}}{(0,267m)^{0,85}} = 3,65\ s^{-1}$$

4. Se calculează viteza necesară pentru agitarea amestecului aerat:

reieșind din formulele 3.12 și 3.13, viteza pentru agitarea amestecului aerat poate fi exprimată astfel: $N_{JSG} = N_{JS} + aQ$. Deoarece $\frac{d}{D} = \frac{1}{3}$, rezultă că a= 2,4.

$$N_{JSG} = 3{,}65\ s^{-1} + (2{,}4 \cdot 0{,}5) = 4{,}85\ s^{-1}$$

5. Se calculează numărul Froude (ec. 3.9):

$$Fr = \frac{(4{,}85\ s^{-1})^2 \cdot 0{,}267\ m}{9{,}8\ {}^{m}/_{s^2}} = 0{,}64$$

6. Se calculează numărul viteză-gaz, ținându-se cont că gazul este complet dispersat (ec. 3.11):

$$Ql_g = 0{,}2 \cdot \left(\frac{0{,}267\ m}{0{,}8\ m}\right)^{0{,}5} \cdot 0{,}64^{0{,}5} = 0{,}092$$

7. Se calculează viteza gazului (Q_g) dispersat de rotor în condițiile date (ec. 3.8):

$$Q_g = 0{,}092 \cdot 4{,}85 s^{-1} \cdot (0{,}267\ m)^3 = 0{,}00849\ {}^{m^3}/_{s} = 0{,}51\ {}^{m^3}/_{min}$$

8. Pentru compararea vitezelor se recalculează viteza de adiție a gazului în bioreactor:

$$Q = 0{,}5\ vvm = 0{,}5\frac{L}{min} = 0{,}5\frac{0{,}4 m^3}{60\ s} = 3{,}33 \cdot 10^{-3}\ {}^{m^3}/_{s}$$

Viteza gazului care poate fi complet dispersat de rotor este de $8{,}49 \cdot 10^{-3}$ m^3/s, valoare superioară vitezei de adiție a gazului în bioreactor ($3{,}33 \cdot 10^{-3}$ m^3/s). Deci, gazul va fi complet dispersat în condițiile date.

Răspuns: Q_g= 0,51 m^3/min, gazul va fi complet dispersat.

Probleme pentru rezolvare individuală:

1. Calculați necesarul de putere cu și fără aerare pentru un bioreactor echipat cu turbina Rushton dacă parametrii bioreactorului și condițiile de operare sunt următoarele:

a) diametrul bioreactorului – 2,4 m;
b) profunzimea bioamestecului – 2,4 m;
c) diametrul rotorului – 0,8 m;
d) viteza de rotație a rotorului - 160 rpm;
e) viteza de aerare a bioreactorului – 0,5 m^3/min;
f) viscozitatea apei – 0,001 kg/ms și densitatea – 1000 kg/m^3.

Răspuns: P_0= 53 kW, P_G= 49 kW.

2. Calculați parametrii tubinei Rushton în raport cu parametrii bioreactorului dacă diametrul acestuia constituie 0,6 m. Calculați profunzimea bioamestecului și distanța la care este plasat rotorul în raport cu partea inferioară a bioreactorului.

Răspuns: d= 0,2 m, L= 0,05 m, b= 0,04 m, H_L= 0,6 m, H_i= 0,2 m.

3. Calculați puterea de consum și timpul de agitare pentru un bioreactor echipat cu turbina Rushton, dacă viteza de rotație este 135 rpm. Densitatea și viscozitatea lichidului constituie, respectiv, 1,5 g/cm^3 și 0,0195 g/cm·s. Diametrul biorectorului constituie 3,6 m, profunziumea lichidului – 3,6 m, diametrul turbinei – 1,2 m și volumul lichidului – 16,3 m^3.

Răspuns: P= 255 kW, t_m= 13,3 s.

4. Calculați necesarul de putere pentru agitarea bioamestecului cu un rotor de tip elice, dacă viteza de rotație este 4 cps. Viscozitatea și densitatea bioamestecului este 0,01 kg/m·s și 1000 kg/m^3 corespunzător. Diametrul rotorului este de 1,3 m, volumul reactorului – 50 m^3.

Răspuns: P= 95 kW.

5. Determinați dacă gazul va fi complet dispersat într-un bioreactor cu agitarea mecanică operat cu turbina Rushton, dacă înălțimea bioamestecului este de 1,2 m, turbina este operată cu o viteză de 90 rpm, diametrul turbinei și înălțimea la care este poziționată constituie $^1/_3$ și $^1/_4$, corespunzător, din diametrul bioreactorului, viteza de adiție a gazului este de 0,15 m^3/min.

Răspuns: Q_g= 0,216 m^3/min, gazul va fi complet dispersat.

6. Celulele unor fungii sunt cultivate într-un bioreactor cu capacitatea de 6 m^3 și diametrul de 2,4 m. Diametrul turbinei Rushton constituie 0,8 m, iar viteza de operare 90 rpm. Turbina este poziționată la o distanță de 0,6 m față de partea inferioară a bioreactorului. Densitatea bioamestecului constituie 1000 kg/m^3, iar viscozitatea 0,08 kg/m·s, corespunzător. Densitatea și diametrul culturilor celulare sunt 1035 kg/m^3 și, respectiv, 450 μm. Concentrația celulelor în bioreactor este de 48%. Argumentați prin calcule dacă celulele vor fi suspendate.

Răspuns: N_{JS}= 41,4 rpm, celulele vor fi suspendate.

7. Densitatea și viscozitatea bioamestecului este de 1000 kg/m^3 și 0,0009 kg/m·s corespunzător. Volumul și diametrul bioreactorului constituie 350 L și, respectiv, 1,2 m. Reactorul este operat cu turbina Rushton cu diametrul și distanța față de partea inferioară a bioreactorului de $^1/_3$ și, respectiv, de $^1/_4$ din diametrul bioreactorului. Diametrul mediu al particulelor este de 400 μm, densitatea – 1,6 g/cm^3 și concentrația particulelor – 20%. Viteza de adiție a gazului este de 0,4 vvm. Calculați dacă gazul va fi complet dispersat în aceste condiții.

Răspuns: Q_g= 0,018 m^3/s, gazul va fi dispersat.

8. Calculați viteza rotorului în cps și rpm și consumul de putere necesară pentru dispersia completă a gazului, având în vedere că puterea consumată constituie 50% din puterea necesară de agitare în absența aerului. Procesul de biosinteză are loc într-un bioreactor cu înălțimea și diametrul de 1,1 m. Densitatea și viscozitatea

bioamestecului sunt de 1000 kg/m^3 și 0,0015 kg/m·s, corespunzător. Diametrul turbinei Rushton este $^1/_2$ din diametrul bioreactorului. Viteza de adiție a gazului este de 0,66 vvm. Formula pentru calcularea volumului lichidului din bioreactor: $V_L = \pi \left(\frac{D}{2}\right)^2 \cdot H_L$.

Răspuns: N= 1,44 s^{-1}, P_G= 443 W.

9. Calculați viteza maximă a rotorului și timpul de agitare dacă consumul de putere nu trebuie să depășească 1,5 kW/m^3. Diametrul și înălțimea reactorului constituie 2 m. Viscozitatea și densitatea bioamestecului sunt de 0,004 kg/m·s și 1000 kg/m^3, corespunzător.

Răspuns: N= 146 rpm, t_m= 12,3 s.

10. Calculați viteza rotorului necesară pentru suspendarea celulelor, dacă concentrația acestora în bioreactor constituie 40%, dimensiunea celulor – 10 μm și densitatea – 1040 kg/m^3. Pentru agitarea bioamestecului este folosit rotorul elice cu diametrul de 30 cm. Densitatea și viscozitatea bioamestecului sunt cele specifice pentru apă. Diametrul bioreactorului constituie 75 cm. Calculați puterea necesară pentru suspendarea celulelor.

Notă: Dacă raportul $\frac{d}{D} \neq 0{,}33$ pentru rotorul elice, se recalculează valoarea coeficientului geometric cu ajutorul formulei: $\frac{S_2}{S_1} = \left(\frac{\left(\frac{D}{d}\right)_2}{\left(\frac{D}{d}\right)_1}\right)^a, a = 0{,}82,$ S_1 – coeficientul S din tabelul 3.1.

Răspuns: N_{JS}= 25,3 rpm, P= 0,063 W.

3.3. Transfer de căldură și de masă în procese biotehnologice

În procesele biotehnologice, cel mai des bioreactoarele sunt echipate cu două tipuri de schimbătoare de căldură: cu serpentine și cu manta (Fig. 3.14).

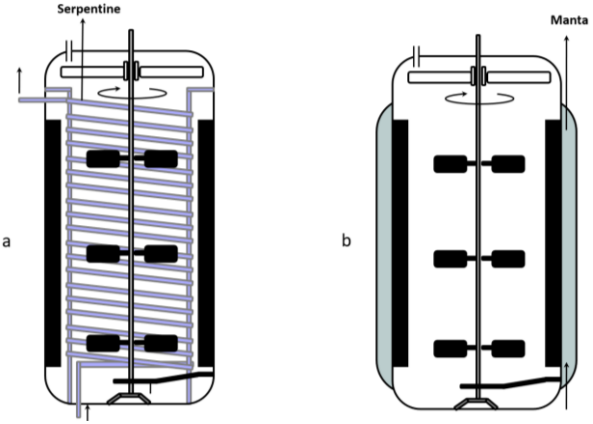


Figura 3.14. Bioreactoare echipate cu serpentine (**a**) și cu manta (**b**)

În orice proces tehnologic, funcționarea schimbătoarelor de căldură are la bază principiul al doilea al termodinamicii, care este explicat de către postulatul lui R. Clausius: „Nu este posibilă o transformare care să aibă ca rezultat trecerea de la sine a căldurii de la un corp cu temperatură mai joasă la un alt corp cu temperatura mai ridicată”:

$\Delta S = \frac{\Delta Q}{T} > 0$, unde: (3.15)

ΔS – variația entropiei;

ΔQ – variația de căldură;

T – temperatura.

Transferul termic (Q) dintre două lichide cu temperaturi diferite, printr-un perete metalic (cu grosimea x), este influențat de (Fig. 3.15):

- ✓ temperatura lichidului fierbinte, t_1;
- ✓ coeficientul de transfer de căldură la interfața peretelui metalic (h_1) în regiunea lichidului fierbinte;
- ✓ temperatura la suprafața peretelui metalic (t_{w1}) în regiunea lichidului fierbinte;
- ✓ temperatura lichidului rece, t_2;
- ✓ coeficientul de transfer de căldură la interfața peretelui metalic (h_2), în regiunea lichidului rece;
- ✓ temperatura la suprafața peretelui metalic (t_{w2}) în regiunea lichidului rece;
- ✓ aria suprafeței de contact, A.

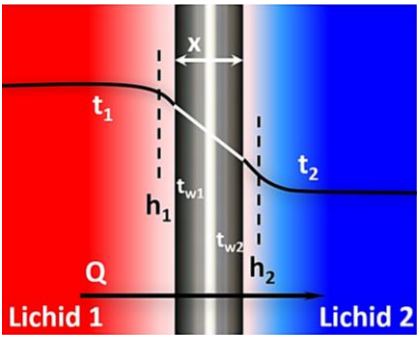


Figura 3.15. Reprezentarea schematică a transferului termic dintre două lichide cu temperaturi diferite, printr-un perete metalic

Fiind dificilă determinarea valorilor temperaturilor la suprafața peretelui metalic (t_{w1} *și* t_{w2}), se ține cont doar de temperaturile t_1 și t_2 și de coeficientul de transfer de căldura total (U), care ia în considerare valorile h_1, h_2, conductivitatea termică (k) și grosimea peretelui metalic (x):

$Q = U \cdot A \cdot \Delta T$, unde: (3.16)

U – coeficientul de transfer de căldură general (coeficientul termic total), W/m^2·K;

Q – fluxul de căldură, W;

A – aria suprafeței de contact, m^2.

Diferența temperaturii lichidelor este proporțională cu fluxul termic (Q) și cu rezistența (R) (ec. 3.17).

$\Delta T = Q \cdot R$ (3.17)

Se exprimă rezistența termică din ecuația 3.17:

$R = \frac{\Delta T}{Q}$ (3.18)

Se introduce ecuația 3.16 în ec. 3.17 și se obține formula de calcul al *rezistenței totale* (3.19).

$R = \frac{1}{U \cdot A}$ (3.19)

Rezistența totală este constituită din (Fig. 3.16):

- ✓ rezistența filmului la interfața peretelui metalic în zona lichidului fierbinte (R_h);
- ✓ rezistența stratului metalic (R_w);
- ✓ rezistența filmului la interfața peretelui metalic în zona lichidului rece (R_c);
- ✓ rezistența provocată de impurități în zona lichidului fierbinte (R_{fh}) și în zona lichidului rece (R_{fc}).

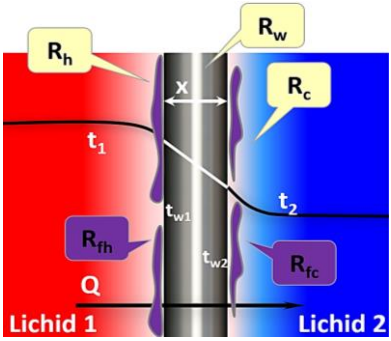


Figura 3.16. Reprezentarea schematică a tipurilor de rezistență termică ce apar la transferul termic dintre două lichide printr-un perete metalic

Rezistența totală poate fi scrisă sub forma:

$$R = R_h + R_w + R_c + R_{fh} + R_{fc} \quad (3.20)$$

Ținându-se cont că:

$$R_h = \frac{1}{h_1 A};\ R_w = \frac{x}{kA};\ R_c = \frac{1}{h_2 A};\ R_{fh} = \frac{1}{h_{fh} A};\ R_{fc} = \frac{1}{h_{fc} A} \quad (3.21)$$

Pentru simplitatea efectuării calculelor, aria suprafeței de contact (A) se reduce din formula fiecărei rezistențe, iar ecuația 3.20 poate fi scrisă sub forma:

$$\frac{1}{U} = \frac{1}{h_1} + \frac{x}{k} + \frac{1}{h_2} + \frac{1}{h_{fh}} + \frac{1}{h_{fc}} \quad (3.22)$$

Având în vedere că temperatura nu este aceeași atât în volumul lichidului rece, cât și în volumul lichidului fierbinte, se operează cu valori ale temperaturilor medii pentru ambele lichide. Astfel, în cazul bioreactorului, unde procesul de biosinteză are loc la o temperatură constantă (T_F), diferența de temperatură (ΔT) se calculează conform:

$$\Delta T = \frac{T_{co} - T_{ci}}{ln\left(\frac{T_F - T_{ci}}{T_F - T_{co}}\right)}, \text{ unde:} \quad (3.23)$$

T_{co} – temperatura agentului termic la ieșirea din schimbătorul de căldură, K;
T_{ci} – temperatura agentului termic la intrarea în schimbătorul de căldură, K.

Transferul de masă are loc conform gradientului de concentrație. În procesele biotehnologice sunt 3 tipuri de transfer de masă:

1) lichid – solid (L – S),
2) lichid – lichid (L – L),
3) gaz – lichid (G – L).

1. Transferul de masă L – S. Se referă la transportul nutrienților solubilizați în lichid (substrat, oxigen, microelemente etc.) spre celule (faza solidă). Fiind

consumate, concentrația substanțelor la suprafața celulelor (C_{Ai}) va fi mai mică decât concentrația acestora în restul lichidului (C_{Ab}) (Fig. 3.17).

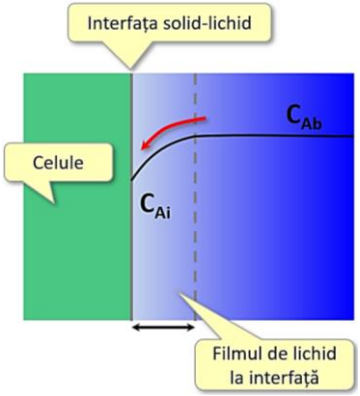


Figura 3.17. Reprezentarea schematică a transferului de masă L – S

Prin urmare, *viteza volumetrică a transferului de masă* (N_A) va fi:

$$N_A = k_L \cdot a(C_{A_b} - C_{A_i}), \text{ unde:} \quad (3.24)$$

N_A – viteza volumetrică a transferului de masă, g/m^3·s;
k_L – coeficientul de transfer de masă în faza lichidă, m/s;
a – aria pe unitate de volum la interfața solid-lichid, m^2/m^3;
C_{Ab} – concentrația nutrienților (A) în lichid, g/m^3;
C_{Ai} – concentrația nutrienților (A) la interfață, g/m^3.

2. Transferul de masă L – L. Acest transfer de masă este utilizat atât în biosinteza unor produse unde în calitate de substrat se folosesc alcanii (ex., hexadecanul), cât și în etapele de separare a produsului de biosinteză (ex., extracția antibioticelor, steroizilor și alcaloizilor cu solvenți organici).

Concentrația substanței în faza apoasă de la interfața (C_{A1i}) va fi mai mică decât în restul lichidului (C_{A1}). Contrar, la interfața filmului organic concentrația substanței (C_{A2i}) va fi mai mare decât în restul fazei organice (C_{A2}), deoarece are loc extracția acesteia din faza apoasă (Fig. 3.18).

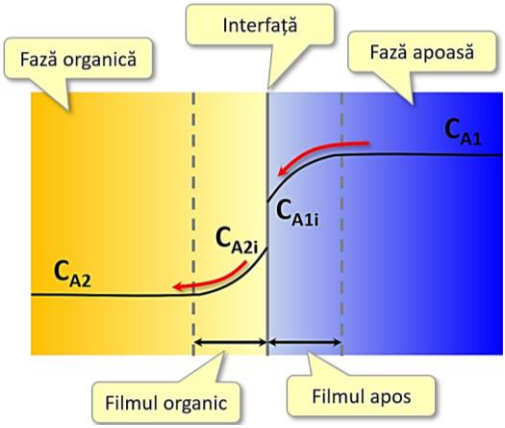


Figura 3.18. Reprezentarea schematică a transferului de masă L – L

Vitezele volumetrice ale transferului de masă L – L vor fi:

$$N_{A1} = k_L \cdot a(C_{A1} - C_{A1i}) \quad (3.25)$$

$$N_{A2} = k_L \cdot a(C_{A2i} - C_{A2}), \text{ unde:} \quad (3.26)$$

N_A – viteza volumetrică a transferului de masă, g/m^3·s;
k_L – coeficientul de transfer de masă în faza lichidă, m/s;
a – aria pe unitate de volum la interfața lichid-lichid, m^2/m^3;
C_{A1} – concentrația substanței A în faza apoasă, g/m^3;
C_{A1i} – concentrația substanței A în faza apoasă de la interfață, g/m^3;
C_{A2i} – concentrația substanței A în faza organică de la interfață, g/m^3;
C_{A2} – concentrația substanței A în faza organică, g/m^3.

3. Transferul de masă G – L este fundamental în procesele de biosinteză aerobă. Concentrația gazului în faza gazoasă la interfața filmului gazos (C_{AGi}) va fi mai mică decât în restul gazului (C_{AG}). Contrar, la interfața filmului lichid, concentrația gazului dizolvat (C_{ALi}) va fi mai mare decât în restul fazei lichide (C_{AL}), deoarece are loc solubilizarea gazului în faza lichidă (Fig. 3.19).

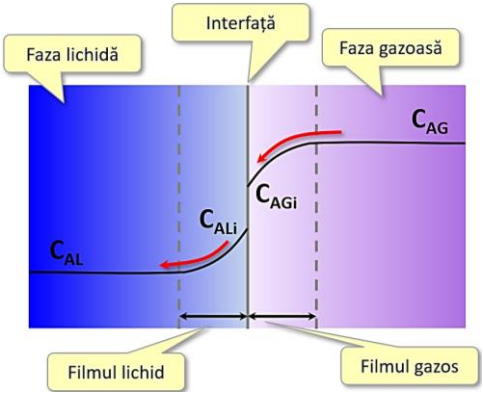


Figura 3.19. Reprezentarea schematică a transferului de masă G – L

Transferul de masă pentru substanța A din faza gazoasă în faza lichidă se poate reprezenta prin ecuațiile 3.27 și 3.28.

$$N_{AG} = k_L \cdot a(C_{AG} - C_{AGi}) \quad (3.27)$$

$$N_{AG} = k_L \cdot a(C_{ALi} - C_{AL}), \text{ unde:} \quad (3.28)$$

N_{AG} – viteza volumetrică a transferului de masă, g/m^3·s;
k_L – coeficientul de transfer de masă în faza lichidă, m/s;
a – aria pe unitate de volum la interfața gaz-lichid, m^2/m^3;
C_{AG} – concentrația substanței A în faza gazoasă, g/m^3;
C_{AGi} – concentrația substanței A în faza gazoasă de la interfață, g/m^3;
C_{ALi} – concentrația substanței A în faza lichidă de la interfață, g/m^3;
C_{AL} – concentrația substanței A în faza lichidă, g/m^3.

Ecuația utilizată pentru exprimarea transferului de oxigen este:

$$N_A = k_L \cdot a(C^*_{AL} - C_{AL}), \text{ unde:} \quad (3.29)$$

N_A – viteza transferului de oxigen per unitate de volum de lichid, g/m^3·s;
k_L – coeficientul de transfer de masă în faza lichidă, m/s;
a – aria la interfața de contact gaz-lichid per unitate de volum de lichid, m^2/m^3;
C_{AL} – concentrația oxigenului în bioamestec, g/m^3;
C_{AL}^* – concentrația maximă de oxigen care poate trece în faza lichidă în condițiile date de presiune și temperatură, g/m^3.

Important!

Factorii care influențează transferul de oxigen în bioreactor:

- dimensiunea bulelor de aer: pentru un volum de gaz aria la interfață va fi cu atât mai mare cu cât gazul va fi dispersat în bule mai mici;
- viscozitatea bioamestecului: cu creșterea viscozității lichidului se reduce eficiența dispersiei gazului;
- mărirea vitezei de adiție a gazului și a vitezei de agitare duce la creșterea dispersiei gazului;
- mărirea temperaturii scade solubilitatea oxigenului în bioamestec.

Viteza cu care oxigenul este consumat de celule determină viteza cu care oxigenul trebuie transferat în bioreactor. Consumul de oxigen de către celule reprezintă consumul specific de oxigen (q_o, g/g·s). Dacă Q_o (g/L·s) este consumul de oxigen per volum bioamestesc și x concentrația celulelor, se poate scrie:

$$Q_0 = q_0 \cdot x, \text{ de unde: } q_0 = \frac{Q_0}{x} \quad (3.30)$$

Pentru cazul în care viteza transferului de oxigen din faza gazoasă în faza lichidă este egală cu viteza consumului de oxigen de către celule, atunci se poate scrie:

$$k_L \cdot a(C_{AL}^* - C_{AL}) = q_0 \cdot x \quad (3.31)$$

Din ecuația 3.31 se poate determina concentrația maximă de celule care poate beneficia de oxigenul transferat în bioreactor, dacă se admite că oxigenul trece integral din faza gazoasă în faza lichidă (ec. 3.32).

$$x_{max} = \frac{k_L \cdot a \cdot C_{AL}^*}{q_0} \quad (3.32)$$

Lucrare practică 3.2. Probleme de calcul: Transfer de căldură și de masă într-un proces biotehnologic

1. Calculați coeficientul termic total U, dacă coeficienții transferului de căldură la interfața peretelui metalic sunt 1,2 și 1,7 kW/m^2·K, corespunzător. Grosimea peretelui metalic este de 6 mm și conductivitatea termică de 19 W/m·K. Pe una dintre fețele peretelui metalic sunt depuse impurități care determină o rezistență suplimentară de 830 W/m^2·K.

Modul de rezolvare:

1. Se calculează coeficientul termic total (U) cu ajutorul formulei:

$$\frac{1}{U}=\frac{1}{h_1}+\frac{x}{k}+\frac{1}{h_2}+\frac{1}{h_{fh}}+\frac{1}{h_{fc}}$$

Reieșind din condițiile problemei, că doar pe o parte a peretului metalic se depun impurități, ecuația va avea forma:

$$\frac{1}{U}=\frac{1}{h_1}+\frac{x}{k}+\frac{1}{h_2}+\frac{1}{h_{fh}}$$

2. Se substituie datele din condiția problemei:

$$\frac{1}{U}=\frac{1}{1200\,{}^{W}/_{m^2\cdot K}}+\frac{0{,}006\ m}{19\,{}^{W}/_{m\cdot K}}+\frac{1}{1700\,{}^{W}/_{m^2\cdot K}}+\frac{1}{830\,{}^{W}/_{m^2\cdot K}};$$

$$\frac{1}{U}=0{,}00294, \text{ respectiv: } U=340\ {}^{W}/_{m^2\cdot K}$$

Răspuns: U= 340 W/m²·K.

2. Temperatura bioreactorului unde are loc biosinteza unui antibiotic trebuie menținută la valoarea de 35^0C. Fluxul maxim al transferului de căldură (Q) este 550 kW. Temperatura apei la intrarea în sistemul de răcire este de 10^0C, iar la ieșire de 25^0C. Coeficienții transferului de căldură la interfața peretelui metalic sunt 2150 W/m$^{2\cdot 0}$C și 1400 W/m$^{2\cdot 0}$C. Diametrul exterior al tubului sistemului de răcire este 8 de cm, grosimea peretelui metalic – 5 mm, conductivitatea termică de 60 W/m$^{2\cdot 0}$C. Coeficientul termic determinat de prezența impurităților doar pe suprafața internă a tubului este 8500 W/m$^{2\cdot 0}$C. Calculați lungimea țevei schimbătorului de căldură.

Modul de rezolvare:

1. Se calculează diferența de temperatură, conform ec. 3.23:

$$\Delta T=\frac{(25-10)^0C}{ln\left(\frac{35-10}{35-25}\right)}=16,4^0C$$

2. Se calculează coeficientul termic total, ținându-se cont că impurități sunt doar pe o parte a schimbătorului de căldură:

$$\frac{1}{U}=\frac{1}{2150\,{}^{W}/_{m^{2}\cdot{}^{0}C}}+\frac{0{,}005\ m}{60\,{}^{W}/_{m^{2}\cdot{}^{0}C}}+\frac{1}{1400\,{}^{W}/_{m^{2}\cdot{}^{0}C}}+\frac{1}{8500\,{}^{W}/_{m^{2}\cdot{}^{0}C}};$$

$$\frac{1}{U}=0{,}000138, \text{ respectiv U=725 } {}^{W}/_{m^{2}\cdot{}^{0}C}$$

3. Se calculează aria suprafeței de contact conform ecuației 3.16:

$$A=\frac{Q}{U\cdot\Delta T},\ A=\frac{550\cdot10^3W}{725\,{}^{W}/_{m^{2}.{}^{0}C}\cdot16{,}4^0C}=46{,}3\ m^2$$

4. Se calculează diametrul intern al tubului schimbătorului de căldură, dacă diametrul extern este de 8 cm:

$$d_{intern}=d_{extern}-2\cdot x,\ d_{intern}=8cm-2\cdot\ 0{,}5\ cm=7\ cm$$

5. Se calculează lungimea totală a țevei schimbătorului de căldură cu ajutorul formulei:

$$A = L \cdot 2\pi \cdot R, \text{ de unde } L = \frac{A}{2\pi \cdot R}, \text{ unde:}$$

A – aria suprafeței de contact, m^2;

L – lungimea țevei schimbătorului de căldură, m;

R – raza țevei schimbătorului de căldură, m.

$$L = \frac{46{,}3\ m^2}{2 \cdot 3{,}14 \cdot \left(\frac{0{,}5(0{,}08 + 0{,}07)}{2}\right) m} = 197\ m$$

Răspuns: L= 197 m.

3. În sinteza treoninei se folosesc bacteriile *Serratia Marcescens*. Viteza specifică a consumului de oxigen (q_o) de către celule este de $4{,}44 \cdot 10^{-5}$ g/g·s. Pentru biosinteză este necesar ca concentrația celulelor (x) să ajungă la 40 g/L. În condițiile de biosinteză, solubilitatea oxigenului (C_{AL}^*) în lichid este de 0,008 kg/m^3. La o anumită viteză de transfer a oxigenului, produsul $k_L \cdot a$, este de 0,15 s^{-1}. În aceste condiții, metabolismul celulelor va fi influențat de transferul de masă?

Modul de rezolvare:

1. Se calculează consumul de oxigen (Q_0) conform ecuației 3.30:

$$Q_0 = 4{,}44 \cdot 10^{-5}\ {}^{g}/_{g \cdot s} \cdot 40\ {}^{g}/_{L} = 1{,}78 \cdot 10^{-3}\ {}^{g}/_{L \cdot s} = 1{,}78 \cdot 10^{-3}\ {}^{kg}/_{m^3 \cdot s}$$

2. Se calculează viteza transferului de oxigen per unitate de volum de lichid (N_A) conform ecuației 3.29:

$$N_A = 0{,}15 s^{-1} \cdot 0{,}008\ {}^{kg}/_{m^3} = 1{,}2 \cdot 10^{-3}\ {}^{kg}/_{m^3 \cdot s}$$

3. Se compară valorile consumului de oxigen de către bacterii și viteza transferului în bioamestec al oxigenului:

$Q_0 > N_A$, deci metabolismul celulelor va fi influențat de transferul de masă.

Răspuns: Metabolismul celulelor va fi influențat de transferul de masă.

Probleme pentru rezolvare individuală:

1. Coeficienții transferului de căldură la interfața peretelui metalic sunt 1,3 și 1,8 kW/m^2·K, corespunzător. Grosimea peretelui metalic este de 7 mm și conductivitatea termică de 25 W/m·K. Pe una dintre fețele peretelui metalic sunt depuse impurități care determină o rezistență suplimentară de 730 W/m^2·K. Calculați coeficientul termic total.

Răspuns: U= 336,7 W/m^2·K.

2. Temperatura bioreactorului unde are loc biosinteza unui antibiotic trebuie menținută la valoarea de 38^0C. Fluxul maxim al transferului de căldură este 650 kW. Temperatura apei la intrarea în sistemul de răcire este de 10^0C, iar la

ieșire de 25^0C. Coeficienții transferului de căldură la interfața peretelui metalic sunt de 2260 W/m$^{2\cdot 0}$C și 1600 W/m$^{2\cdot 0}$C. Diametrul exterior al țevei schimbătorului de căldură este de 9 cm, grosimea peretelui metalic – 6 mm și conductivitatea termică – 70 W/m$^{2\cdot 0}$C. Coeficientul termic determinat de prezența impurităților doar pe suprafața internă a tubului este de 7300 W/m$^{2\cdot 0}$C. Calculați lungimea țevei schimbătorului de căldură.

Răspuns: L= 162,2 m.

3. În sinteza unui aminoacid se folosesc bacteriile *E. Coli*. Viteza specifică a consumului de oxigen de către celule este $5.8\cdot10^{-5}$ g/g·s. Pentru biosinteză este necesar ca concentrația celulelor (x) să ajungă la 35 g/l. În condițiile de biosinteză, solubilitatea oxigenului (C_{AL}^*) în lichid este de 0,009 kg/m^3. La o anumită viteză de transfer a oxigenului, produsul $k_L\cdot a$ este de 0,25 s^{-1}. În aceste condiții, transferul de oxigen va fi suficient pentru creșterea celulelor?

Răspuns: Pentru condițiile date ale bioprocesului, transferul de oxigen va fi suficient pentru creșterea celulelor.

4. O cultură de microorganisme este folosită pentru producerea unei substanțe de interes farmaceutic într-un reactor cu capacitatea de 15 m^3. În condițiile de operare, coeficientul de transfer al oxigenului $k_L\cdot a$ este 0,17 s^{-1}. Solubilitatea oxigenului în bioamestec este de 0,0083 kg/m^3. Viteza specifică de consum a oxigenului de către celule este de 0,00011 g/g·s. Calculați concentrația maximă a celulelor care va fi asigurată de transferul de oxigen în aceste condiții.

Răspuns: x_{max}=12,83 g/L.

5. Valorile vitezei specifice a consumului de oxigen și concentrația critică de oxigen pentru diferite celule sunt:

Celule	**q_0, mmol/g·h**	**Ccritică (O_2), mmol/L**
E. coli	8,5	0,0082
Vitis vinifera	0,6	0,0550
CHO	$3\cdot10^{-10}$	0,0200

Calculați valoarea produsului $k_L\cdot a$ necesară pentru a asigura obținerea a 25 g/L celule de *E. Coli* și *Vitis Vinifera* și a $3\cdot10^9$ celule/L de *CHO*. Solubilitatea oxigenului în mediul de bioreacție este de 0,255 mmol/L.

Răspuns: $k_L\cdot a$ (*E. coli*)= 861 h^{-1}; $k_L\cdot a$ (*Vitis vinifera*)= 75 h^{-1}; $k_L\cdot a$ (*CHO*)= 3,8 h^{-1}.

Lucrare de laborator 3.3. Simularea și optimizarea proceselor cu transfer de căldură în DWSIM

Programul **DWSIM**
Disponibil: dwsim.org

Scopul lucrării constă în familiarizarea studenților cu simularea și optimizarea proceselor cu transfer de căldură specifice proceselor biotehnologice, utilizând software-ul DWSIM.

Modul de lucru:

- ✓ se deschide programul DWSIM și se creează un proiect nou;
- ✓ se selectează compușii chimici necesari pentru simulare: n-butanol (*1-butanol*) și apă (*Water*);
- ✓ se selectează modelul termodinamic pentru compușii chimici selectați (cu suportul profesorului sau personalului tehnic);
- ✓ se selectează unitățile de măsură *SI Engineering*;
- ✓ se definește fluxul materiei prime (*Material Stream*) din panoul *Flowsheet Objects* prin tragerea și plasarea pictogramei pe diagrama de proces (ecranul de lucru);
- ✓ se selectează fluxul materiei prime adăugate (în partea stângă se deschide panoul corespunzător), care se denumește *Butanol in*, și se setează parametrii indicați de profesor în compartimentul *Input Data → Stream Conditions:* temperatură, presiune, debit, iar în compartimentul *Input Data → Compound Amounts:* cantitățile de compuși;
- ✓ se repetă operația de mai sus pentru alt flux cu denumirea *Water in*;
- ✓ se selectează schimbătorul de căldură (*Heat Exchanger*) din panoul *Flowsheet Objects → Exchangers* prin tragerea și plasarea pictogramei pe diagrama de proces;
- ✓ se creează două căi de evacuare din schimbătorul de căldură pentru butanol și apă prin tragerea și plasarea a două pictograme *Material Stream*, denumite *Butanol out* și *Water out;*
- ✓ se selectează schimbătorul de căldură și se setează conexiunile: *Inlet Stream 1 → Water in; Outlet Stream 1 → Water out; Inlet Stream 2 → Butanol in; Outlet Stream 2 → Butanol out;*
- ✓ la indicația profesorului se selectează parametrul ce urmează a fi calculat în compartimentul *Calculation Parameters*;

- ✓ cu ajutorul parametrilor setați, indicați de profesor, se calculează coeficientul de transfer de căldură general, valoarea căruia se introduce în compartimentul *Heat Exchanger Properties*;

> ***Rețineți!***
>
> Diferența de temperatură ΔT în software-ul DWSIM este notat ca *Log Mean Temperature Difference* (LMTD).

- ✓ pentru a simula schema tehnologică construită, se utilizează pictograma *Solve* situată în bara de instrumente;
- ✓ pentru optimizarea procesului se modifică parametrii selectați și se tastează din nou pictograma *Solve;*
- ✓ pe diagrama de proces se afișează datele referitoare la parametrii setați și calculați, prin selectarea comenzii *Insert → Master Property Table*.

Sarcini de evaluare și de autoevaluare

1. Definiți metabolismul celular și enumerați factorii ce determină derularea acestuia în organismele vii.

2. Explicați particularitățile metabolismului în funcție de utilizarea energiei și a consumului de oxigen.

3. Argumentați prin reacții biochimice formarea acidului piruvic în procesul de glicoliză.

4. Efectuați o analiză comparativă a metabolismului aerob și anaerob utilizând ca reper cantitatea formată de ATP.

5. Scrieți secvențele de ARN_m ce corespund următoarei peptide:Val-Phe-Pro-His-Asn utilizând codul genetic prezentat mai jos.

	U	C	A	G	
U	UUU, UUC Phe UUA, UUG Leu	UCU, UCC, UCA, UCG Ser	UAU, UAC Tyr UAA Stop UAG Stop	UGU, UGC Cys UGA Stop UGG Trp	U C A G
C	CUU, CUC, CUA, CUG Leu	CCU, CCC, CCA, CCG Pro	CAU, CAC His CAA, CAG Gln	CGU, CGC, CGA, CGG Arg	U C A G
A	AUU, AUC, AUA Ile AUG Met	ACU, ACC, ACA, ACG Thr	AAU, AAC Asn AAA, AAG Lys	AGU, AGC Ser AGA, AGG Arg	U C A G
G	GUU, GUC, GUA, GUG Val	GCU, GCC, GCA, GCG Ala	GAU, GAC Asp GAA, GAG Glu	GGU, GGC, GGA, GGG Gly	U C A G

6. Argumentați importanța ciclului Krebs în procesele anabolice.

7. Explicați noțiunea de control metabolic și importanța acestuia într-un proces biotehnologic.

8. Explicați variația proceselor metabolice ale *Saccharomyces cerevisiae* în prezența și absența oxigenului.

9. Enumerați principalii parametri tehnici de care se ține cont la construcția unui bioreactor.

10. Propuneți clasificarea bioreactoarelor după modul de agitare, tipul procesului și tipul metabolismului.

11. Reprezentați schematic elementele unui bioreactor cu agitare mecanică și schimbător de căldură – serpentine.
12. Explicați importanța parametrilor geometrici în selectarea rotoarelor pentru bioreactoarele cu agitare mecanică.
13. Numiți rotoarele cel mai des utilizate la dotarea bioreactoarelor cu agitare mecanică și/sau mixtă.
14. Explicați esența parametrilor adimensionali: numărul Reynolds (Re), numărul putere (N_p), numărul viteză-gaz (Q_{lg}) și numărul Froude (Fr).
15. Argumentați importanța determinării prin calcule, la etapa de proiectare a unui bioproces, a necesarului de putere, dispersiei gazului și a suspendării particulelor în bioamestec.
16. Explicați principiul funcționării schimbătoarelor de căldură utilizând legea a II-a a termodinamicii.
17. Enumerați factorii ce influențează transferul termic dintre două lichide separate printr-un perete metalic.
18. Deduceți formula de calcul al rezistenței termice totale ce apare la transferul termic dintre două lichide printr-un perete metalic.
19. Explicați cele trei tipuri de transfer de masă: L – S, L – L, G – L.
20. Explicați metoda de calcul al concentrației maxime de celule ce pot benefecia de oxigenul transferat în bioreactor, pornind de la formula vitezei volumetrice a transferului de masă L – L.

4. OPERAȚII UNITARE DE SEPARARE ȘI PURIFICARE A PRODUSULUI DE INTERES

Abilități:

- explică etapele de procesare a bioamestecului;

- descrie tehnicile de separare a biocatalizatorului și a produsului de interes;

- enumeră factorii care influențează calitatea separării produsului de interes;

- efectuează calcule specifice referitoare la tehnicile de separare a celulelor și a produselor de interes;

- explică principiul de purificare cromatografică a produselor de interes.

Procesarea (separarea și purificarea) produsului de interes presupune aplicarea proceselor fizice, mai rar – a proceselor chimice sau biochimice. În selectarea metodelor de procesare se ține cont de tipul produsului de interes (Fig. 4.1, 4.2).

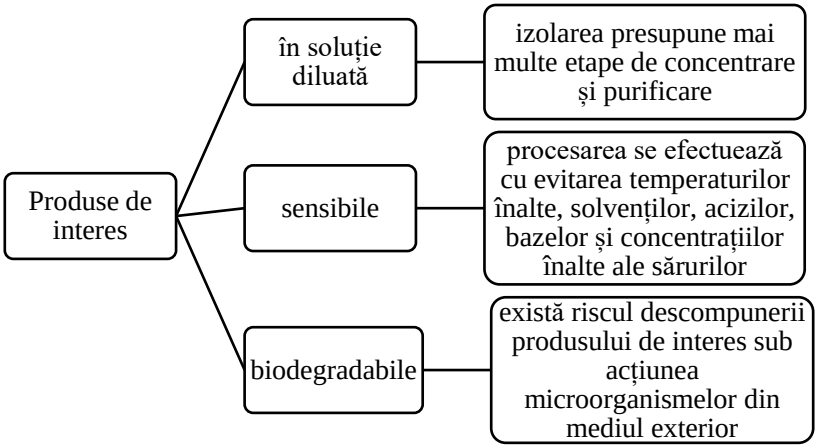


Figura 4.1. Tipurile produselor de interes în funcție de stabilitatea la procesare

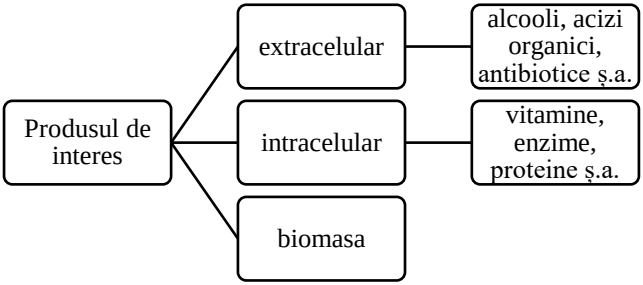


Figura 4.2. Tipurile produselor de interes în funcție de particularitățile metabolismului

Rețineți!

Separarea și purificarea produsului de interes deseori constituie mai mult de 50% din costul final al produsului, îndeosebi pentru produsele intracelulare.

Separarea și purificarea produsului presupune câteva etape comune, cum ar fi: separarea celulelor, izolarea primară, purificarea cromatografică și izolarea finală. Cel mai simplu flux tehnologic este pentru cazul când produsul de interes este biomasa propriu-zisă. Procesarea presupune doar separarea celulelor din bioamestec (Fig. 4.3).

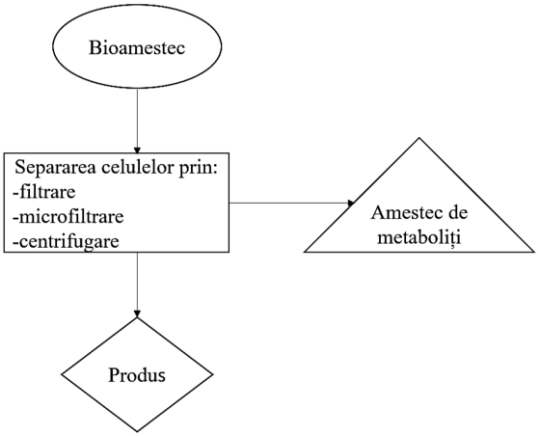


Figura 4.3. Schema fluxului tehnologic calitativ general al proceselor de obținere a biomasei

Pentru cazul în care produsul de interes este extracelular, fluxul tehnologic este completat cu etapele de izolare (primară și finală) și purificare cromatografică (Fig. 4.4).

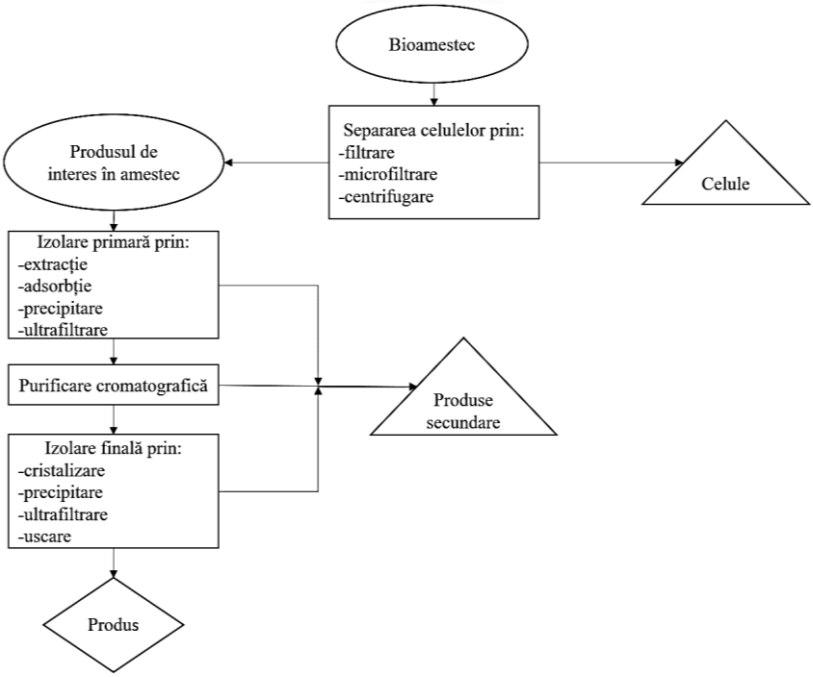


Figura 4.4. Schema fluxului tehnologic calitativ general de obținere a bioproduselor extracelulare

Cea mai complexă schemă de procesare este în cazul produselor intracelulare, unde apar operațiile de *lezare* a celulelor (distrugerea peretelui și/sau a membranei celulare) și separarea fragmentelor celulare (Fig. 4.5).

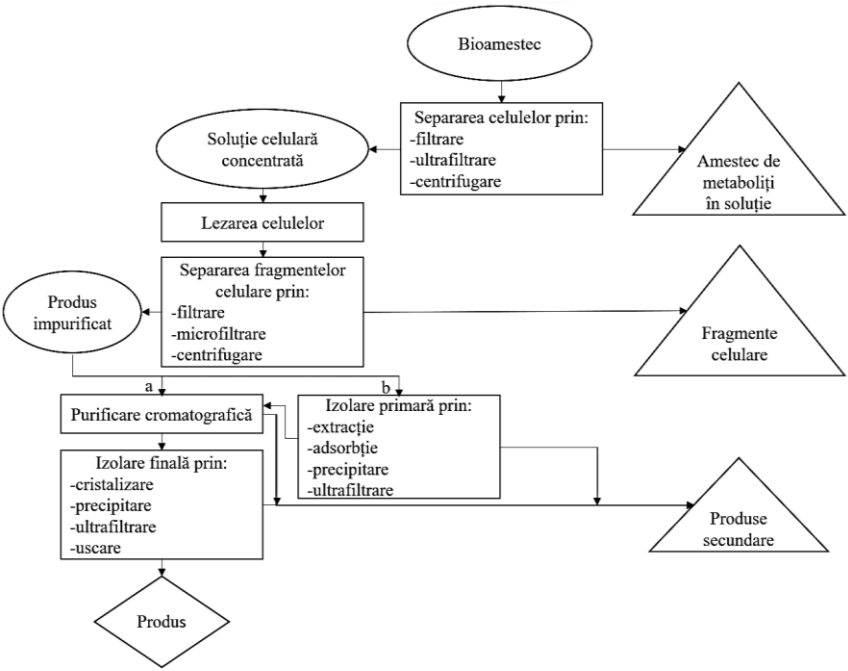


Figura 4.5. Schema fluxului tehnologic calitativ general de obținere a bioproduselor intracelulare

Rețineți!

La scară industrială lezarea celulelor se realizează cu ajutorul *omogenizatoarelor*, care pot fi operate la presiuni înalte. Presiunea aplicată depinde de tipul celulelor și de localizarea produsului de interes în interiorul celulei:

- solubilizat în citoplasmă,
- corpi de incluziune insolubili,
- imobilizat în membranele celulare.

Separarea celulelor. Metodele principale de separare a celulelor (biomasei) sunt: *filtrarea* simplă, în vid, micro- și ultrafiltrarea; *centrifugarea*.

Reținеți!

În unele bioprocese, bioamestecul este precondiționat pentru eficientizarea filtrării și/sau centrifugării. Precondiționarea presupune:

- încălzirea – coagularea unor proteine,
- reducerea viscozității,
- adăugarea electroliților sau polimerilor (agenți floculanți) – favorizează agregarea biomasei și a particulelor solide.

Filtrarea este cea mai rentabilă operație de separare a biomasei din amestecul de fermentare, îndeosebi în procesele de obținere a antibioticelor și la tratarea biologică a apelor reziduale. Cele mai utilizate filtre sunt cele cu tambur rotativ cu suprafața exterioară sub vid (numite *filtre celulare cu tambur*).

Important!

Microfiltrarea se utilizează pentru separarea celulelor și fragmentelor celulare cu dimensiunile de 0,2 - 10,0 μm. Dimensiunile porilor membranelor utilizate sunt de 0,05 - 5,00 μm. *Ultrafiltrarea* se utilizează pentru separarea proteinelor, polizaharidelor, virusurilor. Diametrul porilor membranelor – 0,01 - 1,00 μm. *Hiperfiltrarea (osmoza inversă)* se utilizează pentru separarea apei de săruri. Diametrul porilor membranelor constituie 0,0001 - 0,0010 μm.

Un aspect foarte important este calcularea vitezei de filtrare și a fluxului reieșind din parametrii tehnici ai filtrului utilizat. Ecuația generală a filtrării prin stratul de precipitat va fi:

$\frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p}{R}$, unde: (4.1)

dV – variația volumului, m^3;

dt – intervalul de timp, s;

Δp – diferența de presiune, N/m^2;

R – rezistența la filtrare, $N \cdot s/m^3$.

Ecuația filtrării la presiune constantă, numită *ecuația Ruth*, în forma integrată poate fi scrisă:

$V^2 + 2V \cdot V_0 = K \cdot t$, unde: (4.2)

$V_0 = \frac{R_m \cdot A}{\alpha \cdot C}$ și $K = \frac{2A^2 \cdot \Delta p \cdot g}{\alpha \cdot C \cdot \eta}$, unde:

V – volumul filtratului, m^3;

α – rezistența specifică a turtei, m/kg;

η – viscozitatea dinamică a bioamestecului, Pa·s;
C – masa fracției solide depuse per volum filtrat, kg/m^3;
A – aria suprafeței filtrante, m^2;
Δp – diferența de presiune, Pa;
R_m – rezistența mediului filtrant, m^{-1};
g – accelerația gravitațională, m/s^2;
t – timpul de filtrare, s.

Ecuația 4.2 poate fi reorganizată:

$$\frac{t}{V} = \frac{1}{K}(V + 2V_0) \qquad (4.2a)$$

Important!

Forma integrată a ecuației Ruth permite construirea dependenței grafice liniare t/V= f (V), unde parametrii a și b din ecuația dreptei vor fi egali cu:

$$a = \frac{1}{K},\ b = \frac{2V_0}{K}$$

În orice moment în timpul filtrării poate fi calculat *fluxul* ce trece prin filtru cu ajutorul relației:

$$J = \frac{\Delta p}{\eta(R_c + R_m)}, \text{ unde:} \qquad (4.3)$$

R_c – rezistența turtei la filtrare, m^{-1}.

Rezistența turtei la filtrare este corelată cu masa acesteia per unitate de suprafață:

$$R_c = \frac{\alpha \cdot C \cdot V}{A} \qquad (4.4)$$

Dacă turta este *incompresibilă* (nu își schimbă volumul cu variația presiunii), atunci rezistența specifică a turtei (α) nu variază cu modificarea presiunii. Pentru o turtă *compresibilă*, rezistența specifică va varia odată cu modificarea presiunii:

$$\alpha = \alpha'(\Delta p)^s, \text{ unde:} \qquad (4.5)$$

α' – constantă dependentă de dimensiunea și morfologia particulelor;
s – compresibilitatea turtei; *s=0* pentru turta incompresibilă, respectiv *s= 1* pentru turta de filtrare compresibilă.

Centrifugarea este operația unitară de separare a biomasei utilizată în cazul particulelor foarte mici și în cazul viscozității mari a bioamestecului. În procesele biotehnologice se utilizează cel mai des două tipuri de centrifugi:

1) cu stivă cu discuri – viteza de rotație până la 10000 rpm,
2) tubulară – viteza de rotație până la 50000 rpm.

Într-un câmp centrifugal, *viteza de separare terminală a particulelor* poate fi calculată în baza legii lui Stoke:

$$U_g = \frac{D_p^2 \cdot g(\rho_P - \rho_L)}{18 \cdot \eta}, \text{ unde:} \quad (4.6)$$

U_g – viteza de separare terminală, m/s;
D^2_p – diametrul particulelor, m;
g – accelerația gravitațională, m/s^2;
ρ_P – densitatea particulelor, kg/m^3;
ρ_L- densitatea bioamestecului, kg/m^3;
η – viscozitatea bioamestecului, kg/m·s.

În câmpul centrifugal, accelerația gravitațională este determinată de forța centrifugă:

$$g = w^2 \cdot r, \text{ unde:} \quad (4.7)$$

r – distanța radială de la axul central, m;
w – viteza unghiulară de rotație, rad/s.

Substituind ecuația 4.7 în 4.6, se obține formula de calcul al vitezei de separare terminală a particulelor:

$$U_g = \frac{D_p^2 \cdot w^2 \cdot r \cdot (\rho_P - \rho_L)}{18 \cdot \eta} \quad (4.8)$$

Izolarea (primară și finală). Izolarea produsului de interes se efectuează după etapa de separare a celulelor din bioamestec – *izolarea primară*. *Izolarea finală* se efectuează după purificarea cromatografică a produsului și se încheie cu uscarea produsului.

Operațiile unitare principale de izolare a produsului sunt: extracția lichid – lichid, adsorbția, precipitarea, ultrafiltrarea, dializa, cristalizarea și uscarea.

Important!

Extracția L-L este prezentată în *subcompartimentul 3.3 Transferul de căldură și de masă*. Precipitarea este prezentată în *tabelul A.2.3*.

Adsorbția este utilizată, de obicei, pentru izolarea produselor cu destinație farmaceutică din soluțiile diluate după etapele de separare, lezare a celulelor și separarea fragmentelor celulare.

Rețineți!

Adsorbția cu schimbători de ioni este utilizată pentru izolarea aminoacizilor, proteinelor, antibioticelor; prin adsorbția pe cărbune activ se izolează acidul citric.

Procesul de adsorbție presupune următoarele etape:

1) adsorbția componentelor pe adsorbent;
2) spălarea adsorbentului pentru înlăturarea componentelor neadsorbite;
3) desorbția componentelor adsorbite;
4) înlăturarea resturilor de solvent prin spălare;
5) regenerarea adsorbentului.

La nivel cantitativ, adsorbția se apreciază prin izoterme de adsorbție. Pentru sistemele reale se utilizează *izoterma Freundlich*:

$$C_{AS}^{*} = K_F \cdot C_A^{*\frac{1}{n}}, \text{ unde:} \quad (4.9)$$

C_{AS}^{*} – concentrația substanței A pe adsorbent;
C_A^{*} – concentrația substanței A în soluție;
K_F, n – constante empirice, iar n > 1 (adsorbții favorabile).

Ultrafiltrarea este realizată prin flux încrucișat, unde direcția fluxului de filtrare este paralelă membranei. Membranele utilizate trebuie să fie rezistente termic, chimic și de o anumită porozitate. Tipurile de materiale utilizate sunt: polisulfone, polietersulfone, poliacrilamide, clorură de polivinil, acetat de celuloză ș.a.

Selectivitatea membranei este caracterizată de *coeficientul de reținere*:

$$R = \frac{C_R - C_P}{C_R}, \text{ unde:} \quad (4.10)$$

C_R – concentrația solutului reținut pe membrana filtrului;
C_P – concentrația solutului trecut prin membrana filtrului.

Fluxul solutului trecut prin membrană poate fi reprezentat prin formula:

$$J = \frac{D}{\delta} ln\left(\frac{C_W - C_P}{C_B - C_P}\right), \text{ unde:} \quad (4.11)$$

D – coeficientul de difuzie al solutului;
δ – distanța de la membrană la care există un gradient de concentrație;
C_W – concentrația solutului la suprafața membranei;
C_P – concentrația solutului în amestecul filtrat (permeat);
C_B – concentrația solutului în amestecul de filtrare.

Dacă se notează $\frac{D}{\delta} = K$ (coeficientul de transfer de masă), atunci ecuația 4.11 va avea forma:

$$J = K \cdot ln\left(\frac{C_W - C_P}{C_B - C_P}\right) \quad (4.12)$$

În cazul în care membrana are un coeficient de rejecție înalt, concentrația solutului în permeat va fi foarte mică și poate fi omisă:

$$J = K \cdot ln\left(\frac{C_W}{C_B}\right) \quad (4.13)$$

Cu creșterea presiunii, valoarea C_W crește până la o valoare maximă (C_G), când are loc precipitarea sau gelatinizarea solutului pe suprafața membranei. În acest caz, ecuația 4.13 va avea forma:

$$J = K \cdot ln\left(\frac{C_G}{C_B}\right) \quad (4.14)$$

Rețineți!

Concentrația de precipitare (sau gelatinizare) poate fi determinată experimental pentru a selecta parametrii optimi ai procesului de filtrare și a evita deteriorarea membranei.

Coeficientul de transfer de masă (K) se determină prin formulele empirice:

1. *Numărul Sherwood*: $Sh = \frac{K \cdot d_n}{D}$, unde: (4.15)

K – coeficientul de transfer de masă, m/s;
d_n – diametrul hidraulic, m;
D – coeficientul de difuzie, m^2/s.

2. *Numărul Reynolds*: $Re = \frac{\rho \cdot d_n \cdot u}{\eta}$, unde: (4.16)

ρ – densitatea soluției, kg/m^3;
u – viteza de filtrare, m/s;
η – viscozitatea dinamică a soluției, kg/m·s.

3. *Numărul Schmidt*: $Sc = \frac{\eta}{\rho \cdot D}$ (4.17)

Numărul Sherwood poate fi calculat conform formulei:

$$Sh = M \cdot Re^{\alpha} \cdot Sc^{\beta} \cdot \left(\frac{d_n}{L}\right)^{w}, \text{ unde:} \quad (4.18)$$

M, α, β, w – coeficienți empirici (Tab. 4.1);
L – lungimea tubului de filtrare.

Tabelul 4.1. Valorile coeficienților empirici M, α, β, w pentru fluxurile laminar și turbulent

Tipul fluxului	M	α	β	w	Re
flux laminar	1,860	0,43	0,33	0,33	<2300
flux turbulent	0,023	0,89	0,30	0	>2300

Dializa este o metodă utilizată în separarea moleculelor de diferite dimensiuni printr-o membrană semipermeabilă. Dializa este utilizată pentru desalinizarea proteinelor obținute la etapa de precipitare reversibilă a acestora.

Fluxul solutului trecut prin membrană (dializat) poate fi calculat cu ajutorul coeficientului general de transfer de masă:

$J = K_L(C_1 - C_2)$, unde: (4.19)

K_L – coeficientul general de transfer de masă;

C_1 – concentrația solutului în soluția supusă dializei;

C_2 – concentrația solutului trecut prin filtru.

Cristalizarea este o metodă eficientă de izolare finală a produselor biotehnologice, precum: antibiotice, aminoacizi, acizi organici, vitamine ș.a. Cristalizarea se efectuează la temperaturi joase, ceea ce minimizează riscul descompunerii termice a produsului.

Uscarea este ultima operație aplicată în scopul înlăturării apei din produs, care poate servi ca mediu de reacții, cum ar fi oxidarea, hidroliza ș.a., sau degradării fizice – agregarea.

Pentru produsele biotehnologice ce se descompun termic se aplică uscarea prin *liofilizare*. La presiuni reduse, apa congelată sublimă, vaporii sunt aspirați și condensați cu un schimbător de căldură. Prin liofilizare se usucă: unele vitamine, proteine, vaccinuri și steroizi.

Purificarea cromatografică. Cromatografia este una dintre metodele principale utilizate în purificarea produselor obținute pe cale biotehnologică. Orice sistem cromatografic include două componente, numite faze: *faza staționară* și *faza mobilă* (sau eluent). Substanțele sunt deplasate (eluate) pe faza staționară de faza mobilă. În funcție de structura chimică, substanțele analizate vor prezenta o anumită afinitate față de faza staționară și solubilitate în faza mobilă. Substanțele care stabilesc interacțiuni mai puternice (afinitate înaltă) cu faza staționară se vor deplasa mai lent (grad de reținere mai mare) față de cele care formează legături mai slabe (afinitate joasă, grad de reținere mai mic). Datorită acestui fapt, substanțele se vor deplasa cu viteze diferite pe faza staționară, ceea ce asigură separarea acestora (Fig. 4.6).

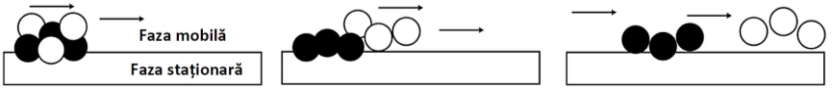


Figura 4.6. Reprezentarea schematică a deplasării diferențiate a substanțelor pe o fază staționară sub acțiunea fazei mobile

● – substanță cu un grad de reținere mai mare pe faza staționară (afinitate înaltă),

○ – substanță cu afinitate joasă față de faza staționară

Pentru cel mai simplu caz, cantitatea de solut adsorbit per unitate de volum al coloanei cromatografice poate fi descrisă prin izoterma de adsorbție:

$C_S' = M \cdot f(C_L)$, unde: (4.20)

M – cantitatea de adsorbent per unitate de volum, mg/mL;

$f(C_L)$ – cantitatea de solut adsorbit per unitate de adsorbent.

Poziția benzii cu solut pe coloana cromatografică poate fi calculată astfel:

$\Delta X = \frac{\Delta V}{A[\varepsilon + Mf'(C_L)]}$, unde: (4.21)

ΔV, A, ε, M – constante care reprezintă forma integrată de la $X=X_0$ la $X=X$ și de la $V=V_0$ la $V=V$;

$f'(C_L)$ – derivata funcției $f(C_L)$ ce determină ΔX.

Pentru eluarea unui amestec format din două componente (I și J), acestea vor forma, în funcție de afinitate, două benzi distincte. Dacă se notează prin L_I distanța parcursă de solutul I, L_S – distanța parcursă de solvent mai sus de faza staționară și L_C – distanța parcursă de solvent în faza staționară (Fig. 4.7), atunci *rezoluția* (R) sau raportul dintre distanța parcursă de solutul I și cea parcursă de solvent mai sus de faza staționară va fi:

$\frac{L_I}{L_S} = R = \frac{1}{\varepsilon + MK}$, unde: (4.22)

$K = f'(C_L)$ – coeficientul de partiție;

ε – porozitatea coloanei.

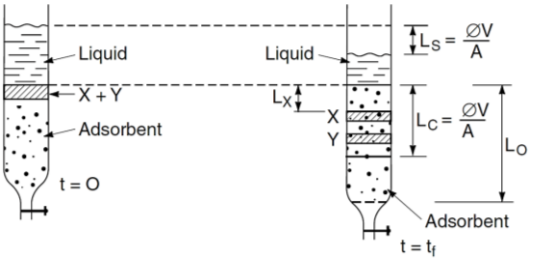


Figura 4.7. Separarea unui amestec binar într-o coloană cromatografică

Similar se poate defini raportul dintre distanța de deplasare a solutului I și cea a solventului în coloană:

$$R_f = \frac{L_I}{L_C} = \frac{\varepsilon}{\varepsilon + MK} \quad (4.23)$$

Când componentul I este eluat din coloană (L_I=L_0) și L_S=V_0/A, unde V_0 este volumul de solvent necesar eluării, atunci raportul volumului solventului la volumul coloanei va fi:

$$V_r = \frac{L_S}{L_C} = \frac{V_0}{L_0 A} = \varepsilon + MK \quad (4.24)$$

Lucrare practică 4.1. Probleme de calcul: Operații de separare și purificare a produsului biotehnologic

1. O probă cu volumul de 30 mL dintr-un bioamestec ce conține penicilină este trecută printr-un filtru de 3 cm^2; timpul de filtrare constituie 4,5 minute, iar compresibilitatea turtei de filtrare (s) este 0,5. Calculați suprafața filtrului, dacă diferența de presiune la filtrarea a 500 L bioamestec într-o oră este de 10 psi.

Modul de rezolvare:

1. Se aplică ecuația Ruth, considerând că rezistența mediului filtrant R_m=0, respectiv V_0=0; ecuația va avea forma:

$$\frac{t}{V} = \frac{\alpha \cdot C \cdot \eta}{2A^2 \Delta p \cdot g} \cdot V$$

2. Din condiția problemei, turta de filtrare este compresibilă (s= 0,5), respectiv:

$\alpha = \alpha'(\Delta p)^s$, deci: $\frac{t}{V} = \frac{\alpha'(\Delta p)^s \cdot C \cdot \eta}{2A^2 \Delta p \cdot g} \cdot V$, de unde: $\alpha'(\Delta p)^s \cdot C \cdot \eta \cdot V^2 =$

$= 2A^2 \Delta p \cdot g \cdot t$

3. Se calculează valoarea produsului $\alpha' \cdot C \cdot \eta$:

$$\alpha' \cdot C \cdot \eta = \frac{2A^2 \Delta p \cdot g \cdot t}{(\Delta p)^s \cdot V^2} = \frac{2 \cdot (3cm)^2 \cdot 10psi \cdot 3{,}528 \cdot 10^6\, {}^{cm}/_{min^2} \cdot 4{,}5\, min}{(10psi)^{0,5} \cdot (30cm^3)^2} = 1 \cdot 10^6$$

Conversia accelerației gravitaționale:

$$g = 9{,}8\, {}^{m}/_{s^2} = \frac{9{,}8 \cdot 100cm}{\left(\frac{1}{60} min\right)^2} = 3{,}528 \cdot 10^6\, {}^{cm}/_{min^2}$$

4. Se calculează aria filtrului:

$$A^2 = \frac{\alpha'(\Delta p)^s \cdot C \cdot \eta \cdot V^2}{2\Delta p \cdot g \cdot t} \Rightarrow A = \sqrt{\frac{\alpha'(\Delta p)^s \cdot C \cdot \eta \cdot V^2}{2\Delta p \cdot g \cdot t}}$$

$$A = \sqrt{\frac{\alpha'(\Delta p)^s \cdot C \cdot \eta \cdot V^2}{2\Delta p \cdot g \cdot t}} = \sqrt{\frac{1 \cdot 10^6 \cdot 10^{0,5} \cdot 500000^2}{2 \cdot 10 \cdot 3{,}528 \cdot 10^6 \cdot 60}} = 13784\, cm^2 = 1{,}378\, m^2$$

Răspuns: A= 1,378 m^2.

2. Într-o centrifugă tubulară, care se rotește cu 3600 rpm, are loc separarea *E. coli* dintr-o soluție cu densitatea de 1 g/cm^3 și viscozitatea cinematică de 10^{-6} m^2/s, la o distanță radială de 10 cm în raport cu axul central. Diametrul și densitatea celulelor constituie 1,25 μm și, respectiv, 1,1 g/cm^3. Calculați viteza de separare terminală a celulelor.

Modul de rezolvare:

1. Se recalculează viteza unghiulară de rotație în rad/s, dacă $360^0 = 2\pi \cdot$rad:

$1\ rpm = \frac{2\pi \cdot rad}{60\ s} = 0{,}1047\ {}^{rad}/_{s}$, respectiv: $w = 3600\ rpm \cdot 0{,}1047\ {}^{rad}/_{s} =$

$= 376{,}92\ {}^{rad}/_{s}$

2. Se calculează viteza de separare terminală, ținându-se cont că accelerația gravitațională într-un câmp centrifugal va fi determinată de forța centrifugă (ec. 4.7- 4.8):

$$U_g = \frac{(1{,}25 \cdot 10^{-6})^2 \cdot (376{,}92 s^{-1})^2 \cdot 0{,}1 m \cdot (1100 - 1000)\ {}^{kg}/_{m^3}}{18 \cdot 10^{-6}\ {}^{m^2}/_{s} \cdot 1000\ {}^{kg}/_{m^3}} = 1{,}23 \cdot 10^{-5}\ {}^{m}/_{s}$$

Răspuns: U_g= 1,23·10^{-5} m/s.

3. Concentrația unor biomolecule după separarea celulor este de 8·10^{-5} M. Pentru aceste biomolecule, constantele empirice k_n și n sunt egale cu 5,5·10^{-5} și, respectiv, 2,86. Calculați cantitatea minimă de adsorbant necesară pentru a reține aceste biomolecule în proporție de 90% din 2 m^3 de bioamestec.

Modul de rezolvare:

1. Se calculează concentrația biomoleculelor rămase în soluție:

100% ---- 8·10^{-5} M

10% ---- x

$$x = C_A^* = \frac{10\% \cdot 8 \cdot 10^{-5} M}{100\%} = 8 \cdot 10^{-6} M$$

2. Se calculează cantitatea adsorbită de biomolecule conform ecuației 4.9 (mol/cm^3):

$$C_{AS}^* = 5{,}5 \cdot 10^{-5} \cdot (8 \cdot 10^{-6})^{\frac{1}{2{,}86}} = 9{,}08 \cdot 10^{-7}\ {}^{mol}/_{cm^3}$$

3. Se recalculează cantitatea de biomolecule adsorbite din 2 m^3 de bioamestec, dacă:

100% ---- 8·10^{-5} M

90% ---- x

$$x = \frac{90\% \cdot 8 \cdot 10^{-5} M}{100\%} = 7{,}2 \cdot 10^{-5}\ M$$

7,2·10^{-5} mol ---- 1 L

x mol ---- 2000 L, de unde: $x = 0{,}144\ mol$

4. Se calculează cantitatea de adsorbant necesară pentru a adsorbi 0,144 mol biomolecule:

$9{,}08 \cdot 10^{-7}$ mol ---- 1 cm^3

0,144 mol ---- x cm^3, de unde: $x = 0{,}16 \cdot 10^6\ cm^3 = 0{,}16\ m^3$

Răspuns: Cantitatea minimă de adsorbant necesară reținerii biomoleculelor este 0,16 m^3.

4. Concentrația de gelatinizare a unor polizaharide constituie 25 g/L. Densitatea și viscozitatea fluidului – 1020 kg/m^3 și, respectiv, 0,0018 kg/m·s, coeficientul de difuzie – $5{,}6 \cdot 10^{-11}$ m^2/s. Polizaharidele sunt separate prin ultrafiltrare, cu o viteză de 0,34 m/s în tuburi membranare cu diametrul și lungimea de 2,4 cm și 2,0 m, corespunzător. Calculați fluxul filtrării, dacă concentrația polizaharidelor în bioamestec este de 12 g/L.

Modul de rezolvare:

1. Se calculează numărul Schmidt (ec. 4.17):

$$Sc = \frac{0{,}0018\ {}^{kg}/_{m \cdot s}}{1020\ {}^{kg}/_{m^3} \cdot 5{,}6 \cdot 10^{-11}\ {}^{m^2}/_{s}} = 3{,}15 \cdot 10^4$$

2. Se calculează numărul Reynolds (ec. 4.16):

$$Re = \frac{1020\ {}^{kg}/_{m^3} \cdot 2{,}4 \cdot 10^{-2} m \cdot 0{,}34\ {}^{m}/_{s}}{0{,}0018\ {}^{kg}/_{m \cdot s}} = 4624$$

3. Se calculează numărul Sherwood (ec. 4.18), reieșind din valoarea Re= 4624 (Tab. 4.1):

$$Sh = 0{,}023 \cdot 4624^{0{,}89} \cdot (3{,}15 \cdot 10^4)^{0{,}3} \cdot \left(\frac{2{,}4 \cdot 10^{-2} m}{2\ m}\right)^0 = 940$$

4. Se calculează coeficientul de transfer de masă (ec. 4.15):

$$K = \frac{940 \cdot 5{,}6 \cdot 10^{-11}\ {}^{m^2}/_{s}}{2{,}4 \cdot 10^{-2}\ m} = 2{,}19 \cdot 10^{-6}\ {}^{m}/_{s}$$

5. Se calculează fluxul filtrării (ec. 4.14):

$$J = 2{,}19 \cdot 10^{-6}\ {}^{m}/_{s} \cdot ln\left(\frac{25\ g/L}{12\ g/L}\right) = 1{,}61 \cdot 10^{-6}\ {}^{m}/_{s}$$

Răspuns: J= $1{,}61 \cdot 10^{-6}$ m/s.

5. Într-o coloană de separare cromatografică utilizată pentru adsorbția solutului A pe un solid adsorbant B izoterma de adsorbție este dată de:

$C_S = k_1 \cdot C_L^3 = f(C_L)$, unde:

C_S este mg soluție adsorbită/mg adsorbant, C_L este concentrația de soluție în mediu lichid (mg soluție/ml lichid), iar k_1 este o constantă (k_1= 0,2). Porozitatea coloanei umplute este ε = 0,35. Aria secțiunii transversale a coloanei este de 10 cm^2 și M este 5 g de adsorbant la 100 mL volum de coloană. Dacă volumul lichidului adăugat este 250 mL (ΔV):

a) Determinați poziția (ΔX) benzii solutului în coloană când concentrația de solut în faza lichidă la echilibru este $C_L = 5 \cdot 10^{-2}$ mg/mL.

b) Calculați raportul dintre distanța parcursă de solutul A (L_A) și cea de solventul B în coloană (R_f) când $C_L = 5 \cdot 10^{-2}$ mg/mL.

Modul de rezolvare:

1. Inițial se calculează derivata funcției ce caracterizează izoterma de adsorbție:

$$f(C_L) = k_1 C_L^3, \quad f'(C_L) = 3k_1 C_L^2$$
$$f'(C_L) = 3 \cdot 0{,}2 \cdot (5 \cdot 10^{-2})^2 = 0{,}0015$$

2. Se calculează (în mg/mL) cantitatea de adsorbant per unitate de volum:

$$M = \frac{5 \cdot 10^3 mg}{100\ mL} = 50\ {}^{mg}/_{mL}$$

3. Poziția benzii cu solut în coloana cromatografică se calculează cu ajutorul ecuației 4.21:

$$\Delta X = \frac{250}{10 \cdot (0{,}35 + 50 \cdot 0{,}0015)} = 58{,}5\ cm$$

4. Se calculează raportul dintre distanța de deplasare a solutului și cea a solventului în coloană (ec. 4.23):

$$R_f = \frac{0{,}35}{0{,}35 + 50 \cdot 0{,}0015} = 0{,}824$$

Răspuns: ΔX= 58,5 cm, R_f= 0,824.

Probleme pentru rezolvare individuală:

1. La filtrarea unui bioamestec de drojdii au fost obținute următoarele date experimentale:

t, min	4	20	48	76	120
V, L	115	365	680	850	1130

Caracteristicile filtrului utilizat sunt: A = 0,28 m^2, C = 1920 kg/m^3, η= $2{,}9 \cdot 10^{-3}$ kg/m·s, α= 4 m/kg. Calculați:

a) coeficienții empirici k și V_0;

b) rezistența mediului filtrant;

c) suprafața filtrului, dacă scăderea presiunii constituie $2{,}3 \cdot 10^{-4}$ N/m^2, pentru filtrarea a 4000 L de bioamestec în 20 de minute.

Răspuns: K= $1{,}5 \cdot 10^4$ L^2/min; V_0= 210 L; R_m= 5760 m^{-1}; A= 27,43 m^2.

2. La filtrarea unui bioamestec ce conține gentamicină (antibiotic), rezistența filtrului este neglijabilă, au fost obținute următoarele date:

t, s	10	20	30	40
V, L	0,60	0,78	0,95	1,10

Caracteristicile filtrului utilizat sunt: A= 1,5 m^2, C= 5 kg/m^3, η= 1,2 cP, α= 3 m/kg. Calculați:

a) coeficienții empirici k și V_0;

b) rezistența mediului filtrant;

c) timpul de filtrare, dacă scăderea presiunii la filtrarea a 5000 L de bioamestec constituie $8 \cdot 10^{-5}$ N/m^2.

Răspuns: $K= 2{,}6 \cdot 10^{-2}$ L^2/s; $V_0= 0{,}076$ L; $R_m= 0{,}76$ m^{-1}; t= 2 min 8 s.

3. Într-o centrifugă tubulară, care se rotește cu 5000 rpm, are loc separarea biocatalizatorului dintr-o soluție cu densitatea de 1 g/cm^3 și viscozitatea cinematică de $1{,}1 \cdot 10^{-6}$ m^2/s, la o distanță radială de 15 cm în raport cu axul central. Diametrul și densitatea celulelor constituie 1,15 μm și, respectiv, 1,2 g/cm^3. Calculați viteza de separare terminală a celulelor.

Răspuns: $Ug= 5{,}49 \cdot 10^{-4}$ m/s.

4. Concentrația de gelatinizare a unui produs de interes constituie 15 g/L. Densitatea și viscozitatea fluidului – 1035 kg/m^3 și, respectiv, 0,001 kg/m·s, coeficientul de difuzie – $5{,}1 \cdot 10^{-11}$ m^2/s. Produsul este separat prin ultrafiltrare, cu o viteză de 0,44 m/s în tuburi membranare cu diametrul și lungimea de 2,6 cm și 1,7 m corespunzător. Calculați fluxul filtrării, dacă concentrația produsului în bioamestec este de 7,5 g/L.

Răspuns: $J= 1{,}71 \cdot 10^{-5}$ m/s.

5. Într-o coloană de separare cromatografică a unei proteine izoterma de adsorbție este dată de ecuația:

$$f(C_L) = kC_L^2$$

În baza valorilor următoarelor constante: k= 0,4, ε= 0,3, A= 25 cm^2, M= 100 mg/mL, ΔV= 400 mL, calculați:

a) Poziția (ΔX) benzii solutului în coloană când concentrația proteinei în faza lichidă la echilibru este $C_L = 9 \cdot 10^{-2}$ mg/ml.

b) Raportul dintre distanța parcursă de proteină și cea de solvent în coloană, când $C_L = 9 \cdot 10^{-2}$ mg/ml.

Răspuns: $\Delta X= 2{,}1$ cm, $R_f= 0{,}04$.

Lucrare de laborator 4.1. Metode de separare și purificare a aminoacizilor dintr-un bioamestec

Scopul lucrării constă în identificarea cromatografică a aminoacizilor dintr-un bioamestec modelat, izolarea și purificarea aminoacizilor pe exemplul schemei tehnologice industriale de izolare-purificare a acidului glutamic din bioamestec.

Modul de lucru:

1. Separarea aminoacizilor prin metoda cromatografică în strat subțire

- ✓ cu o oră înainte de efectuarea experimentului, în camera cromatografică se trece lichidul de eluție (butanol: apă: acid acetic glacial, în raport volumetric 12:5:3; amestecul se agită cel puțin 15 minute înainte de utilizare), la o înălțime de 0,5- 0,8 cm și se închide ermetic pentru saturarea atmosferei cu vaporii lichidului de eluare;
- ✓ pe placa Silufol, a cărei lățime este cu 0,5-1,0 cm mai mică decât diametrul camerei cromatografice, este trasată linia start la 1,5 cm de margine;
- ✓ pe linia start se aplică cu ajutorul unui capilar, sau micropipetă, fiecare probă: bioamestecul modelat, soluția standard de acid glutamic (0,02 M în izopropanol) și aminoacidul indicat de profesor (0,02 M în izopropanol), astfel încât diametrul spotului să nu depășească 2-3 mm. Pentru mărirea concentrației aminoacidului, aplicarea probei se poate repeta de 3-5 ori. Fiecare aplicare suplimentară se realizează după uscarea celei anterioare. Placa se usucă la temperatura de 80 – 90^{0}C;

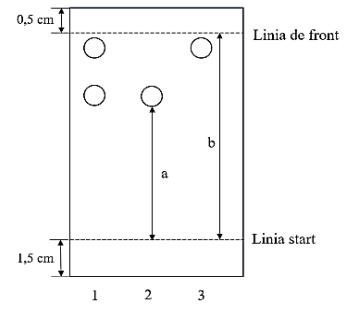


Figura 4.8. Cromatograma aminoacizilor

- ✓ se imersează placa în coloana cromatografică, astfel încât toată partea inferioară a plăcii să intre simultan în lichidul de eluare. Camera se închide ermetic;
- ✓ procesul se oprește în momentul în care frontul lichidului va atinge 0,5-0,8 cm de la marginea de sus a plăcii;
- ✓ se trasează cu creionul linia de front și se usucă 2-3 minute la t = 80 – 90^{0}C;
- ✓ după uscare, placa se stropește cu soluție de revelare (soluție de ninhidrină de 0,1-0,2% în acetonă) sub nișa de ventilare; stropirea se efectuează ținând pulverizatorul la o distanță de 30 – 40 cm, realizând o umectare uniformă a plăcii. Placa se usucă la temperatura de 100-110^{0}C până la apariția spoturilor colorate ale produșilor aminoacizilor cu ninhidrina;
- ✓ se conturează marginile spoturilor și se marchează centrul fiecărui spot;
- ✓ se măsoară distanța de la linia start până la centrul spotului (a) și până la linia de front (b) și se calculează coeficientul de retenție (R_f) pentru fiecare spot:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

- ✓ valorile obținute se compară cu datele tabelare ale R_f și se concluzionează referitor la aminoacizii identificați.

Tabelul 4.2. Valorile coeficientului de retenție a α-aminoacizilor; lichidul de eluare butanol: apă: acid acetic în raport volumetric 12:5:3

α-aminoacid	**R_f**
glicină	0,23
alanină	0,30
serină	0,22
cisteină	0,08
acid aspartic	0,23
asparagină	0,12
fenilalanină	0,60
tirozină	0,45
triptofan	0,50
histidină	0,23
valină	0,51
treonină	0,26
metionină	0,50
acid glutamic	0,28
glutamină	0,17
leucină	0,70
izoleucină	0,67
arginină	0,15
lizină	0,12

2. Izolarea și purificarea aminoacizilor din bioamestec

- ✓ se ajustează pH-ul bioamestecului modelat ce conține acid glutamic (L-Glu), cu soluție de HCl 0,1 M până la valoarea 3,2 (pI al L-Glu);
- ✓ bioamestecul, cu pH-ul ajustat, se răcește pe o baie de gheață până la temperatura $\leq 6^0$C;
- ✓ se centrifughează amestecul la viteza de rotație 5000 rpm timp de 30 de minute;
- ✓ se colectează fracția superioară (limpede) din eprubete, astfel încât precipitatul (cristale de L-Glu) să rămână în eprubetă; fracția colectată reprezintă soluția celuilalt α-aminoacid din bioamestec;
- ✓ fracția lichidă (ce conține al doilea α-aminoacid) este supusă cristalizării într-o ceașcă de evaporare pe o baie de apă (t=60^0C);
- ✓ α-aminoacidul cristalizat se usucă în etuvă până la masă constantă la temperatura de 100±5^0C și se cântărește produsul obținut;
- ✓ fracția ce conține L-Glu se cristalizează într-o ceașcă de evaporare pe o baie de apă la temperatura de 60^0C;
- ✓ cristalele de L-Glu se resolubilizează (se neutralizează) cu o cantitate echimolară de NaOH (este indicată de personalul laboratorului) pentru a obține glutamat monosodic;
- ✓ dacă soluția (glutamat monosodic) are nuanță galbenă, atunci aceasta se decolorează pe o coloană de cărbune activ;
- ✓ soluția de glutamat de sodiu (incoloră) se supune cristalizării pe o baie de apă (t=60^0C);
- ✓ cristalele de sare obținute se usucă în etuvă până la masă constantă la temperatura de 100±5^0C și se cântărește produsul obținut;
- ✓ se întocmește bilanțul de materiale al tehnologiei de izolare și purificare a aminoacizilor obținuți din bioamestec și se calculează randamentul de separare a L-Glu sub formă de glutamat monosodic ($C_5H_8NO_4Na$).

Important!

Izolarea și purificarea aminoacizilor din bioamestec corespunde tehnologiei reale de izolare- purificare a acidului glutamic obținut în urma fermentării substratului de melasă de către *C. glutamicum* (Fig. 4.9).

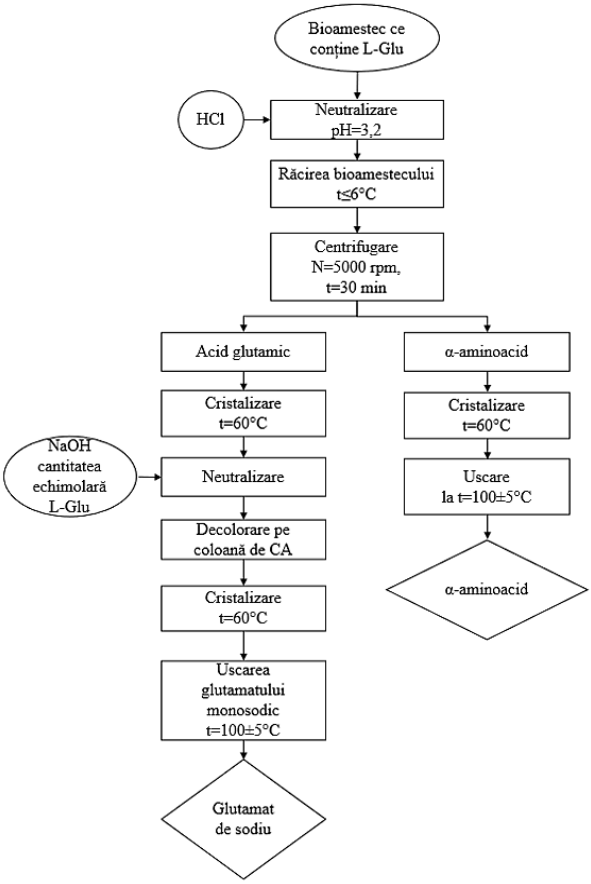


Figura 4.9. Fluxul tehnologic de separare și purificare a acidului glutamic din bioamestec

Notă: α-aminoacidul indicat în procesul industrial este reprezentat de bioamestec

Lucrare de laborator 4.2. Analiza purității produsului biotehnologic de interes

Scopul lucrării constă în determinarea purității produsului biotehnologic de interes (alcooli, hidrați de carbon, aminoacizi) după etapele de separare și purificare a acestora, cu ajutorul parametrilor fizici: densitatea, unghiul de refracție și unghiul de rotație al planului luminii polarizate.

Modul de lucru:

1. Determinarea densității alcoolilor cu areometrul:

- ✓ se selectează areometrul potrivit densității scontate pentru fiecare alcool: etanol, propan-1-ol și propan-2-ol;
- ✓ într-un cilindru se trece proba de analizat;
- ✓ se fixează temperatura alcoolului cu ajutorul unui termometru;
- ✓ se imersează areometrul și se citește valoarea densității după 3-4 minute;
- ✓ densitatea, exprimată în g/cm^3, se recalculează pentru temperatura de 20^{0}C cu ajutorul formulei:

$$\rho_{20} = \rho_t[1 - k(t - 20)], \text{ unde:}$$

ρ_{20}– densitatea la 20^{0}C, g/cm^3;

ρ_t– densitatea măsurată la temperatura t, g/cm^3;

k – (0,0011) coeficient de dilatare termică, $^0C^{-1}$;

t – temperatura măsurată, ^{0}C.

- ✓ se determină conținutul (în %) de alcool, utilizând datele din tabelul 4.3.

Tabelul 4.3. Densitatea soluțiilor apoase ale alcoolilor (la t=20^{0}C), g/cm^3

Partea de masă (*w*), %	**Alcool**		
	Etanol	**Propan-1-ol**	**Propan-2-ol**
0,5	0,9973	0,9973	0,9973
1,0	0,9963	0,9963	0,9939
2,0	0,9945	0,9946	0,9939
3,0	0,9927	0,9928	0,9920
4,0	0,9910	0,9911	0,9902
5,0	0,9893	0,9896	0,9884
6,0	0,9878	0,9882	0,9871
7,0	0,9862	0,9868	0,9855
8,0	0,9847	0,9855	0,9843
9,0	0,9833	0,9842	0,9831
10,0	0,9819	0,9829	0,9816
12,0	0,9792	0,9804	0,9793
14,0	0,9765	0,9779	0,9772
16,0	0,9739	0,9749	0,9751
18,0	0,9713	0,9719	0,9725
20,0	0,9687	0,9686	0,9696
22,0	0,9660	0,9653	0,9667
24,0	0,9632	0,9612	0,9637
26,0	0,9602	0,9571	0,9609
28,0	0,9571	0,9533	0,9580

30,0	0,9539	0,9495	0,9551
32,0	0,9504	0,9452	0,9552
36,0	0,9431	0,9370	0,9493
38,0	0,9392	0,9288	0,9464
40,0	0,9352	0,9288	0,9302
42,0	0,9311	0,9206	0,9286
44,0	0,9269	0,9124	0,9225
46,0	0,9227	0,9042	0,9154
48,0	0,9183	0,8961	0,9060
50,0	0,9139	0,8959	0,8978
52,0	0,9139	0,8895	0,8936
56,0	0,9139	0,8878	0,8902
60,0	0,8676	0,8875	0,8824
70,0	0,8676	0,8714	0,8816
80,0	0,8436	0,8470	0,8341
90,0	0,8180	0,8345	0,8249
92,0	0,8125	0,8288	0,8188
94,0	0,8070	0,8226	0,8026
98,0	0,7954	0,8146	0,7947
100,0	0,7893	0,8034	0,7848

2. Determinarea unghiului de refracție al alcoolilor:

- ✓ etalonarea aparatului se efectuează periodic cu ajutorul unor substanțe cu indice de refracție constant, cum ar fi: monobromnaftalina ($n_D^{20} = 1{,}6588$) sau apa distilată ($n_D^{20} = 1{,}3330$);
- ✓ câteva picături din lichidul analizat se plasează între prismele refractometrului;
- ✓ în câmpul vizual al ocularului se observă două zone, delimitate între ele: una luminoasă și cealaltă întunecată;
- ✓ limita dintre zone se aduce exact la punctul de încrucișare al firelor reticulare;
- ✓ pe scala aparatului se citește valoarea indicelui de refracție; citirea se efectuează cu o precizie de trei zecimale;
- ✓ valorile fixate se introduc în tabel:

Produsul biotehnologic analizat	$\boldsymbol{n_D^{20}}_{\textbf{tabelar}}$	$\boldsymbol{n_D^{20}}_{\textbf{determinat}}$
Etanol	1,3614	
Propan-1-ol	1,3856	
Propan-2-ol	1,3772	

3. Determinarea unghiului de rotire al planului luminii polarizate:

- ✓ se prepară soluțiile de lucru conform standardelor în vigoare (fiecare clasă de compuși are metoda specifică de preparare: de exemplu, aminoacizii se prepară în soluții alcaline sau acide) cu concentrația de 1g/100 mL solvent;
- ✓ se conectează polarimetrul, lucrul poate fi început după 15-20 min, pentru ca lampa de sodiu să se încălzească;
- ✓ se umple cuva cu solventul utilizat și se urmărește ca lentilele prin care trece lumina să fie curate;
- ✓ se plasează cuva cu solvent în polarimetru și se verifică unghiul de rotire. (pentru apa distilată unghiul de rotire trebuie să constituie 0^0). Se ajustează, prin rotire, axele de pe ecranul de citire, astfel încât acestea să fie pe linia dintre partea întunecată și cea luminoasă și se fixează valoarea și direcția unghiului de rotire al solventului;
- ✓ se plasează cuva cu substanța analizată și se citește valoarea unghiului și direcția de rotire a luminii polarizate;
- ✓ se calculează unghiul de rotire al luminii polarizate a substanței de analizat cu ajutorul formulei:

$$\alpha_D^{20} = \alpha_{subst.} - \alpha_{solvent}$$

- ✓ valoarea obținută se compară cu datele tabelare (Tab. 4.4).

Tabelul 4.4. Valorile standard ale unghiului de rotire al planului luminii polarizate

Substanța	$\boldsymbol{\alpha_D^{20},^0}$
D-glucoză	+52,7
D-fructoză	-92,0
D-galactoză	+80,2
D-lactoză	+55,4
D-riboză	-19- (-22)
D-zaharoză	+66,4
L-citrulină	+3,7 (solvent-apa distilată)
L-cisteină	+5 - +10 (solvent HCl)
L-acid glutamic	+31,5- +32,2 (solvent HCl)
L-triptofan	-31,5 (solvent apa distilată) +2,4 (solvent HCl 0,5 M) +6,1 (solvent NaOH 11%)

Lucrare de laborator 4.3. Simularea proceselor de separare și purificare a produsului de interes în DWSIM

Programul **DWSIM**
Disponibil: dwsim.org

Scopul lucrării constă în familiarizarea studenților cu simularea proceselor de separare și purificare a produsului biotehnologic de interes utilizând software-ul DWSIM.

Modul de lucru:

1. Simularea procesării post-fermentative a bioetanolului

- ✓ se deschide programul DWSIM și se creează un proiect nou;
- ✓ se selectează compușii chimici necesari pentru simulare: etanol (*Ethanol*) și apă (*Water*);
- ✓ se selectează modelul termodinamic NRTL sau UNIFAC;
- ✓ se selectează unitățile de măsură *SI Engineering*;
- ✓ se definește fluxul materiei prime (*Material Stream*) din panoul *Flowsheet Objects* prin tragerea și plasarea pictogramei pe diagrama de proces (ecranul de lucru);
- ✓ se selectează fluxul materiei prime adăugat (în partea stângă se deschide panoul corespunzător), care se denumește generic *Bioamestec*, și se setează parametrii indicați de profesor în compartimentul *Input Data → Stream Conditions:* temperatură, presiune, debit, iar în compartimentul *Input Data → Compound Amounts:* cantitățile de compuși;
- ✓ se selectează coloana de distilare (*Shortcut Column*) din panoul *Flowsheet Objects → Columns* prin tragerea și plasarea pictogramei pe diagrama de proces;
- ✓ se selectează coloana de distilare și se verifică conexiunile (*Connections*) pentru amestecul ce intră în coloană (numit Bioamestec), distilatul *(Distillate Stream)* evacuat pe partea superioară a coloanei și reziduurile *(Bottoms Stream)* evacuate pe partea inferioară a coloanei;
- ✓ se indică fracțiile ușoară și grea în procesul de distilare în felul următor: în compartimentul *Calculation Parameters* se selectează *Ethanol* pentru *Light Key Compound* (LK) și, respectiv, *Water* pentru *Heavy Key Compound* (HK);
- ✓ în același compartiment se indică conținutul remanent de etanol în fracția grea, respectiv apă în fracția ușoară și raportul de reflux (*Reflux Ratio*);

Important!

O valoare mai mare pentru parametrul *Reflux Ratio* asigură o separare mai eficientă, dar totodată și consum energetic ridicat.

- ✓ se setează tipul condensatului (*Partial*) și presiunea (atmosferică);
- ✓ pentru a simula schema tehnologică construită, se utilizează pictograma *Solve* situată în bara de instrumente;
- ✓ se analizează randamentul obținut, compoziția reziduului, energia consumată;
- ✓ pentru optimizarea procesului se modifică parametrii selectați și se tastează din nou pictograma *Solve.*

2. Simularea extracției lichid- lichid a unui produs de interes

- ✓ în programul DWSIM se creează un proiect nou;
- ✓ se selectează compușii chimici necesari pentru simulare: hexan (*Hexane*), apă (*Water*) și eter etilic (*Diethyl ether*);

Important!

Compușii sunt selectați grație formării a două faze nemiscibile într-un timp foarte scurt după omogenizare, iar extracția are un randament înalt (proprietăți pre-setate în programul DWSIM).

- ✓ se selectează modelul termodinamic UNIFAC-LL;
- ✓ se selectează unitățile de măsură *SI Engineering*;
- ✓ se definesc două fluxuri de materie primă (*Material Stream*) din care unul este amestecul apă – hexan, iar al doilea solventul – eterul etilic;
- ✓ se setează parametrii indicați de profesor în compartimentul *Input Data → Stream Conditions:* temperatură, presiune, debit, iar în compartimentul *Input Data → Compound Amounts:* cantitățile de compuși;
- ✓ pentru simplificarea procesului, în schema tehnologică se include un omogenizator: *Flowsheet Objects → Mixers/Splitters,* la care se racordează cele două fluxuri create anterior;
- ✓ se selectează coloana de separare (*Compound Separator*) din panoul *Flowsheet Objects → Separators/Tanks* prin tragerea și plasarea pictogramei pe diagrama de proces; coloana se racordează la conducta de evacuare a amestecului obținut în omogenizator;
- ✓ în compartimentul *Separation Fractions,* care se deschide prin accesarea coloanei de separare, se indică randamentele de extracție;

- ✓ pentru a simula schema tehnologică construită se utilizează pictograma *Solve* situată în bara de instrumente;
- ✓ se analizează compoziția fracțiilor obținute;
- ✓ pentru determinarea condițiilor optime de extracție se modifică parametrii conform tabelului de mai jos:

Setare simulare	Raport solvent: amestec	Temperatura, ^{0}C	Randamentul de extracție, %
1	1:1	15	85
2	1:2	25	72
3	2:1	45	96

Sarcini de evaluare și de autoevaluare

1. Definiți etapele de separare și purificare a unui produs biotehnologic.
2. Enumerați operațiile unitare de separare și purificare a produsului de interes.
3. Explicați diferența dintre operațiile unitare de separare și cele de purificare a produsului de interes.
4. Clasificați produsul biotehnologic după stabilitatea la procesare și în funcție de particularitățile metabolismului biocatalizatorului.
5. Explicați succint influența etapei de lezare a celulelor asupra sinecostului produsului biotehnologic.
6. Explicați în ce mod stabilitatea produsului biotehnologic determină tehnologia de separare și purificare aplicată.
7. Propuneți scheme pentru trei fluxuri tehnologice calitative de separare și purificare a produselor biotehnologice (biomasa, produs extracelular, produs intracelular).
8. Enumerați parametrii care determină tehnica de filtrare a bioamestecului la etapa de proiectare a procesului biotehnologic.
9. În baza ecuației generale a filtrării și a ecuației Ruth, explicați, la nivel cantitativ, esența procesului de filtrare a bioamestecului.
10. Explicați particularitățile izolării primare și finale a produsului de interes.
11. Argumentați particularitățile izolării aminoacizilor și proteinelor extracelulare din bioamestec.
12. Enumerați etapele procesului de adsorbție a produsului de interes din bioamestec.
13. Argumentați, cu ajutorul parametrilor adimensionali: numerele Reynolds, Sherwood, Schmidt, cum poate fi calculat fluxul filtrării bioamestecului.

14. Definiți procesul de dializă și importanța acestuia în desalinizarea proteinelor.
15. Definiți noțiunile de cristalizare, uscare și liofilizare a produsului biotehnologic.
16. Argumentați, prin calcule, determinarea vitezei de separare terminală a particulelor în procesul de centrifugare a bioamestecului.
17. Demonstrați, prin formule de calcul, influența compresibilității turtei de filtrare asupra fluxului de filtrare.
18. Argumentați importanța cromatografiei în purificarea produsului biotehnologic.
19. Definiți noțiunile specifice separării cromatografice: fază staționară, eluent, solut, coeficient de repartiție.
20. Elaborați un flux tehnologic al etapelor de separare și purificare a acidului citric.

BIBLIOGRAFIE

1. SHULER, M.L., KARGI, F., DELISA, M.P. *Bioprocess engineering. Basic concepts.* Third edition. S.U.A.: Prentice Hall, 2017. 656 p. ISBN 978-0-13-706270-6.
2. NAJAFPOUR, G.D. *Biochemical engineering and biotechnology*. *Second edition*. Elsevier, 2015. 650 p. ISBN 978-0-444-63357-6.
3. KATOH, S., HORIUCHI, J., YOSHIDA, F. *Biochemical engineering. A textbook for engineers, chemists and biologists. Second, completely revised and enlarged edition*. Weinheilm: Wiley-VCH Verlag GmbH &Co., 2015. 327 p. ISBN 978-3-527-33804-7.
4. GRIGORCEA, P., GLIJIN, A. *Biochimie tehnologică. Lucrări de laborator*. Chișinău: CE USM, 2003. 200 p. ISBN 9975-70-362-3.
5. BARBĂ, N., DRAGALINA, G., VLAD, P. *Chimie organică*. Chișinău: Știința, 1997. 722 p. ISBN 9975-67-005-9.
6. ISAC, V., ONU, A., TUDOREANU, C., NEMȚOI, G. *Chimie fizică. Lucrări practice*. Chișinău: Știința, 1995. 759 p. ISBN 5-376-01937-2.
7. GUȚU, I. *Nomenclatura compușilor organici*. Chișinău: Editerra-Prim, 2008. 156 p. ISBN 978-9975-9801-4-2.
8. GRIGORCEA, P., GLIJIN, A., CHERDIVARĂ, A. *Biochimie: Compendiu. Lucrări de laborator. Teste.* Ed. a 2-a. Chișinău: CEP USM, 2011. 80 p. ISBN 978-9975-71-116-6.
9. DUCA, G., MEREUȚA, A., MARCHITAN, N. *Procese și aparate în industrie. Îndrumar de laborator*. Chișinău: CEP USM, 2012. 222 p. ISBN 978-9975-71-255-2.
10. *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, bioseparation*. Edited by Michael C. Flickinger & Stephen W. Drew, John Wiley & Sons, Inc., 1999. 2798 p. ISBN 0-471-13822-3.
11. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. Edited by Michael C. Flickinger, John Wiley & Sons, Inc., 2010. 5248 p. ISBN 978-0-471-79930-6.
12. *Fermentation and biochemical engineering handbook. Principles, process design and equipment.* Edited by Henry C. Vogel & Celeste M. Todaro. Elsevier, 2014. 434 p. ISBN 978-1-4557-2553-3.
13. WAITES, M.J. et al. *Industrial microbiology: an introduction*. Padstow: T. J. International Ltd, 2001. 304 p. ISBN 0-632-05307-0.

14. OKAFOR, N., OKEKE, B.C. *Modern industrial microbiology and biotechnology*. Second edition. Boca Raton: CRC Press, 2017. 488 p. ISBN 978-1-1385-5018-6.
15. DUTTA, R. *Fundamentals of biochemical engineering*. Springer, 2008. 292 p. ISBN 978-3-540-77900-1.
16. STANBURY, P.F., WHITAKER, A., HALL, S.J. *Principles of fermentation technology*. Third edition. Elsevier, 2016. 824 p. ISBN 978-0-08-099953-1.
17. JI, X.X., ZHANG, Q., YANG, B.X., SONG, Q.R., SUN, Z.Y., XLE, C.Y., TANG, Y.Q. Response mechanism of ethanol-tolerant Sccharomyces cerevisiae strain ES-42 to increased ethanol during continous ethanol fermentation. In: *Microbial Cell Factories*, 2025, 24, 33. DOI: 10.1186/s12934-025-02663-7.
18. MARTINS, C.T., JACOBUS, A.P., CONCEICAO, R., BARBIN, D.F., BOLINI, H., GOMBERT, A.K. Simultaneous enumeration of yeast and bacterial cells in the context of industrial bioprocesses. In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2024, 51. DOI: 10.1093/jimb/kuae029.
19. БЕЙЛИ, ДЖ., ОЛЛИС, Д. *Основы биохимической инженерии*. Часть 1. Перевод с английского А.А. Кирюшкина. Москва: Мир, 1989. 692 с. ISBN 5-03-001028-9.
20. БЕЙЛИ, ДЖ., ОЛЛИС, Д. *Основы биохимической инженерии*. Часть 2. Перевод с английского А.А. Кирюшкина. Москва: Мир, 1989. 590 с. ISBN 5-03-001029-7.
21. НОВИКОВ, Д.А. *Выделение и очистка продуктов биотехнологий*. Минск: БГУ, 2014. 256 с. УДК 631.147(075.8).
22. РЯБИЧЕВА, А.Е. *Микробиология: учебно-методическое пособие*. Брянск: Изд-во Брянского ГАУ, 2015. 172 с. УДК 619:579(07).

ANEXE

ANEXA 1. Răspândirea și proprietățile fizico-chimice ale hidraților de carbon

Hidrații de carbon sunt substanțe naturale fundamentale, cu formula generală $(C_n(H_2O)_m$, unde n=m≥3, răspândite în toate organismele vii, atât vegetale, cât și animale, inclusiv microorganisme. În biosferă, hidrații de carbon sunt cele mai abundente biomolecule. Glucidele, rezultate din metabolismul primar al organismelor autotrofe, au, la nivel celular, rolul de substanțe de rezervă, rol plastic, energetic, precum și de precursori în biosinteza altor biomolecule din cadrul metabolismului secundar.

Procesul metabolic de biosinteză a hidraților de carbon este fotosinteza, un proces fotobiochimic, de reducere a dioxidului de carbon la hidrați de carbon ce conțin de la 3 la 9 atomi de carbon și oxidarea apei la oxigen. În cazul glucozei, ecuația procesului de fotosinteză are forma:

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{h\nu} C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad (1.1)$$

A fost estimat că prin fotosinteză se convertește cca 0,1% (10^{18} kcal) din radiația solară ce ajunge pe suprafața Terrei. Aproximativ aceeași cantitate de energie solară „stocată" în energia legăturilor chimice este disipată în mediul ambiant prin procesul invers fotosintezei – respirația.

După numărul atomilor de carbon și structura chimică, hidrații de carbon ***se clasifică*** în: monozaharide, oligozaharide și polizaharide (Fig. A.1.1).

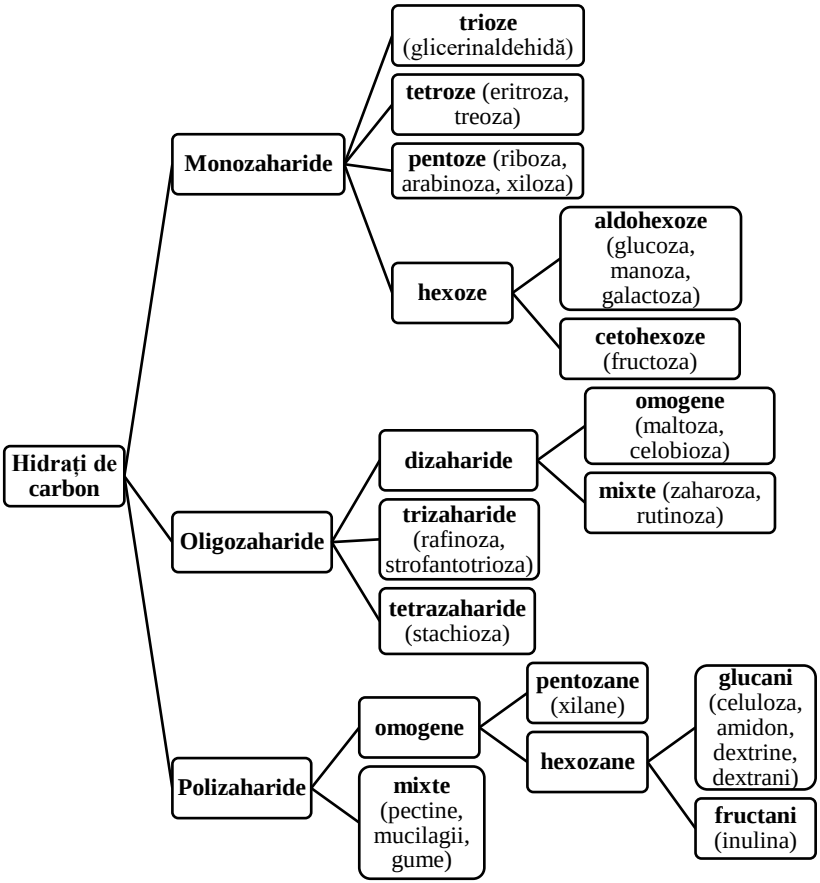
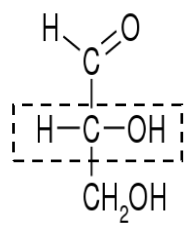


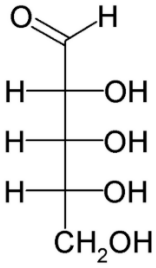
Figura A.1.1. Clasificarea chimică a hidraților de carbon

Din grupul monozaharidelor în natură cele mai răspândite sunt pentozele (Fig. A.1.2b) și hexozele (Fig. A.1.2c), pe când triozele (Fig. A.1.2a) și tetrozele nu se întâlnesc în stare liberă.

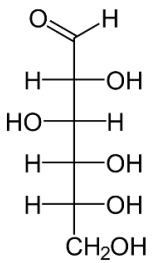


D-gliceralaldehidă

a



b



c

Figura A.1.2. Structurile chimice ale D-gliceralaldehidei (**a**) (triază), D-ribozei (**b**) (pentază) și D-glucozei (**c**) (hexază)

Monozaharidele conțin în molecule atomi de carbon asimetrici, fiind astfel molecule chirale. Numărul stereoizomerilor se calculează conform formulei Fischer (ec. 1.2).

$$N = 2^n, \qquad (1.2)$$

unde: N – numărul de stereoizomeri, n – numărul atomilor de carbon asimetrici. Prin urmare, există 8 pentoze și 16 hexoze stereoizomere.

Monozaharidele în care configurația atomului de carbon asimetric cu numărul de ordine cel mai mare este aceeași ca pentru D-gliceralaldehidă (Fig. A.1.2a) sunt clasificate în seria sterică *D*, iar în caz opus – în seria sterică *L*. Apartenența glucidelor la una din serii se indică prin literele *D* și *L* plasate înaintea denumirii compusului.

Important!

Stereoizomerii au un rol esențial în procesele metabolice ale organismelor vii, deoarece majoritatea enzimelor (catalizatori ai proceselor biologice) posedă *specificitate*, de regulă pentru un singur stereoizomer. Altfel spus, enzimele pot cataliza procese biochimice cu condiția că acestea pot forma produși intermediari cu substratul pe care îl „recunoaște stereochimic” (a se vedea compartimentul 2).

Prezența atomilor de carbon asimetrici în moleculă conduce la fenomenul de *mutarotație*. Dacă substanța chirală rotește planul luminii polarizate spre dreapta, în sensul acelor ceasornicului, aceasta este **dextrogiră** (lat. *dextro*), iar dacă spre stânga, împotriva acelor ceasornicului, **levogiră** (lat. *laevo*). Dacă direcția de rotire este *dextro*, substanței i se atribuie în denumire simbolul „+”, iar dacă direcția este *laevo*, simbolul „–”.

În realitate, glucidele în stare solidă există sub formă ciclică. Acestea se formează prin interacțiunea intramoleculară a grupei carbonil cu grupa hidroxil generând semiacetali ciclici. Spre exemplu, hexozele formează cicluri stabile din 5 (ciclu furanozic, β-D-fructofuranoză) sau din 6 atomi (ciclu piranozic, α-D-glucopiranoză) (Fig. A.1.3), obținute prin interacțiunea grupei carbonil cu grupele hidroxil ale atomilor C_4 sau C_5. Prin ciclizare se pot obține stereoizomerii α sau β, numiți *anomeri*. Dacă hidroxilul rezultat prin ciclizare (atomul C_1 pentru glucopiranoză și C_2 pentru fructofuranoză) se află în partea superioară față de planul ciclului, este vorba despre anomerul α, în caz contrar – despre anomerul β. În soluție glucidele ciclice există în echilibru cu formele liniare.



a (α-D-glucopiranoză) **b (**β-D-fructofuranoză)

Figura A.1.3. Structurile chimice ale semiacetalilor ciclici: piranoză (**a**) și furanoză (**b**) formați de hexoze

Rețineți!

În procesele biochimice din organismele vii, hidrații de carbon sunt compuși doar din stereoizomerii **D** ai monozaharidelor corespunzătoare.

Formarea semiacetalilor ciclici duce la apariția unui nou centru asimetric și, respectiv, a unei grupe hidroxil la atomul C_1 (ex. α-D-glucopiranoză) sau C_2 (ex., β-D-fructofuranoză), numită *hidroxil glicozidic* (semiacetalic). Hidroxilul glicozidic este mai reactiv decât celelalte grupe hidroxil din moleculă.

Proprietăți fizico-chimice. Pentozele și hexozele sunt compuși cristalini, incolori, majoritatea cu gust dulce. Monozaharidele sunt solubile în apă, mai puțin solubile în alcooli și insolubile în solvenți organici slab polari și nepolari (eteri, cloroform, benzen ș.a.).

Proprietățile fizico-chimice ale hidraților de carbon sunt caracteristice compușilor carbonilici și alcoolilor poliatomici. Prin reducerea grupei carbonil, monozaharidele se transformă în polialcoolii corespunzători.

Monozaharidele sunt compuși reducători, ușor oxidabili. Aceste proprietăți stau la baza reacțiilor de identificare a acestora. În prezența reagentului Fehling are loc formarea Cu_2O, iar în prezența reagentului Tollens – a argintului

metalic (reacția oglinzii de argint). În aceste reacții are loc oxidarea grupei carbonil a aldozelor și formarea acizilor aldonici corespunzători. Acizii aldonici se pot lactoniza dacă reacția de oxidare se efectuează în prezența apei de brom. Oxidanții puternici induc oxidarea concomitentă a carbonilului și a hidroxilului C_6 și transformarea aldozelor în acizi dicarboxilici corespunzători (acizi zaharici). Oxidarea selectivă a hidroxilului C_6 al aldozelor determină formarea acizilor uronici. Aceste reacții sunt prezentate, pe exemplul D-glucozei, în figura A.1.4.

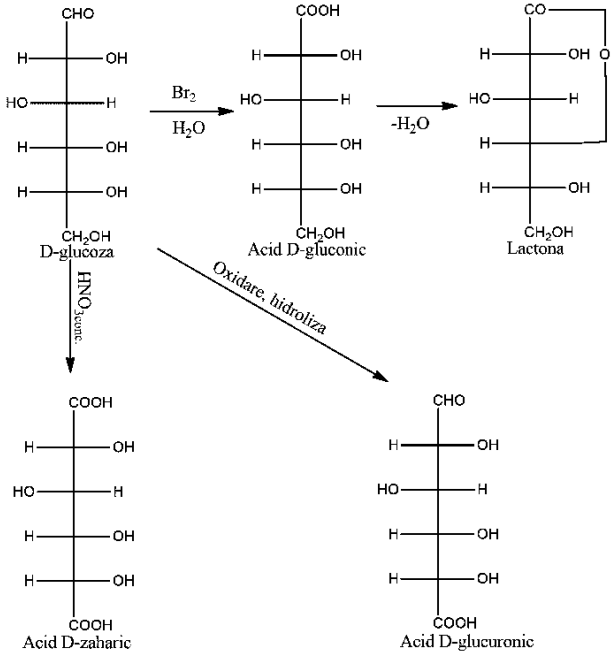


Figura A.1.4. Oxidarea glucozei cu diferiți oxidanți

În reacțiile de eterificare și esterificare, hidroxilul glicozidic manifestă o reactivitate înaltă, comparativ cu celelalte grupe hidroxil. Derivații obținuți pe cale biochimică duc la apariția unei clase extrem de variate de metaboliți secundari – *glicozide*. Glicozidele sunt compuse din partea glucidică – *glicon* și restul neglucidic – *aglicon*. Glicozidele la care agliconul este de natură glucidică sunt oligozaharidele.

O proprietate-cheie în domeniul biotehnologiei este *fermentarea* hidraților de carbon, care poate fi de mai multe tipuri, în funcție de natura biocatalizatorului implicat în procesul biochimic (a se vedea compartimentul 2).

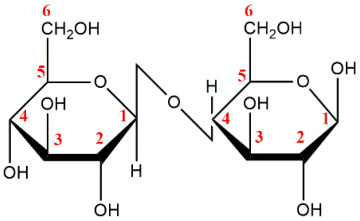
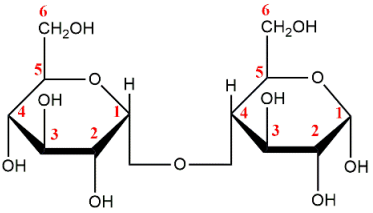
Oligozaharidele conțin în moleculă de la 2 până la 10 resturi de monozaharide. Cele mai importante oligozaharide sunt dizaharidele formate din două resturi de monozaharide. Dizaharidele sunt compuși cristalini, bine solubili în apă și insolubili în solvenți organici.

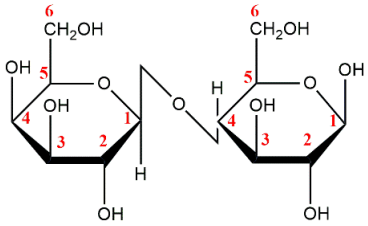
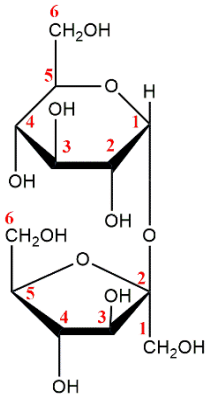
Dizaharidele hidrolizează la încălzire în prezență de acizi, cu formarea de monozaharide. Hidroliza are loc și în prezența enzimelor.

Denumirea dizaharidelor include configurația, seria sterică și numărul de ordine al atomului de carbon din monozaharida de bază (glicon) și din aglicon (considerată ca substituient), urmată de seria sterică a celei de a doua monozaharide (aglicon).

Oligozaharidele reducătoare conțin în moleculă un hidroxil semiacetalic (glicozidic) liber, comportându-se ca potențiale aldoze, susceptibile să reducă reactivul Fehling sau Tollens. Cele mai răspândite dizaharide reducătoare sunt celobioza, maltoza și lactoza (Tab. A.1.1).

Tabelul A.1.1 Structurile chimice ale unor dizaharide

Denumirea	Structura chimică	Caracteristica
Celobioza	 β-D-glucopiranozil-(1→4)-D-glucopiranoză	Este formată din două resturi de D-glucoză. Gliconul și agliconul au configurația β. Celobioza nu poate fi asimilată de plante și animale din lipsa enzimei ce poate să hidrolizele legătura eterică, β (1→4). Celobioza se obține la hidroliza parțială a celulozei.
Maltoza		Este formată din două resturi de D-glucoză. Atât gliconul, cât și agliconul au confi-gurația α. Maltoza se obține prin hidroliza enzimatică a

	α-D-glucopiranozil-(1→4)-D-glucopiranoză	amidonului și constituie materia primă în unele procese biotehnologice (ex., fabricarea alcoolului etilic, berii).
Lactoza	 β-D-galactopiranozil-(1→4)-D-glucopiranoză	Se conține în lapte și este formată dintr-un fragment de D-galactoză (aglicon β) și de D-glucoză (glicon β).
Zaharoza	 α-D-glucopiranozil-(1→2)-D-fructofuranoză	Este formată dintr-un fragment de D-glucoză (aglicon α) și unul de D-fructoză (glicon β). Zaharoza reprezintă constituentul major al mediilor nutritive în multe procese biotehnologice.

Oligozaharidele nereducătoare nu conțin în moleculă hidroxil glicozidic, respectiv nu posedă proprietatea de reducere. Reprezentantul principal este zaharoza (Tab. A.1.1).

Rețineți!

Prin hidroliza acidă a zaharozei se formează un amestec de α-D-glucoză și β-D-fructoză, numit *zahăr invertit*.

Polizaharidele sunt formate prin policondensarea de la 11 la câteva zeci de mii de resturi de monozaharide (monomeri). Cele mai răspândite polizaharide sunt amidonul și celuloza.

Important!

În procesele biotehnologice amidonul (polimer al glucozei) este utilizat în calitate de substrat fie direct, fie după hidroliza acidă sau enzimatică. Hidroliza amidonului are loc treptat până la glucoză: *amidon → oligozaharide (dextrine: 20 resturi de glucoză) → dizaharide (maltoza) → glucoza.*

Amidonul este format din *amiloză* și *amilopectină*. Amiloza este un polimer liniar format din legături glicozidice α(1→4) (Fig. A.1.5). Amiloza este insolubilă în apă și constituie cca 20% din conținutul amidonului.

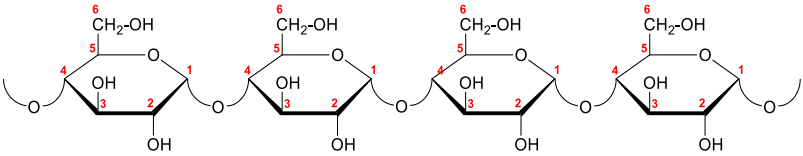


Figura A.1.5. Structura chimică a unui fragment de amiloză

Amilopectina constituie cca 80% din componența amidonului și este un polimer ramificat prin legături α(1→6), este solubil în apă (Fig. A.1.6).

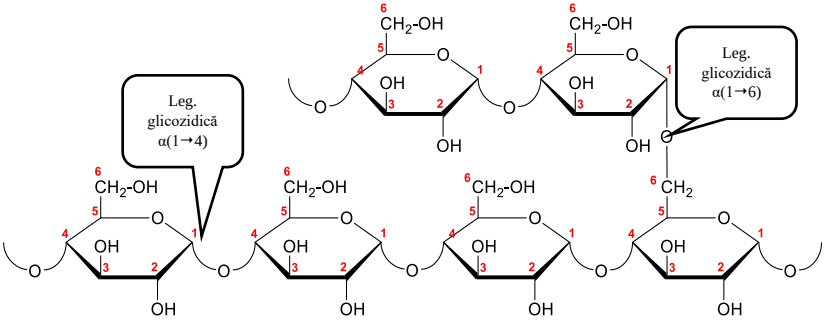


Figura A.1.6. Structura chimică a unui fragment de amilopectină

Important!

Amidonul este hidrolizat de patru enzime originare din bacterii și fungii: **α-amilaze** – hidrolizează legăturile 1→4 până la maltoză, **β-amilaze** – legăturile 1→4 de la capătul non-reducător (care nu conține hidroxilul glicozidic), formând molecule de maltoză, **γ-amilaza (maltaza)** – hidrolizează maltoza la glucoză și, cu o viteză mai mică, legăturile 1→6, **izoamilaze** – hidrolizează legăturile 1→6 din amilopectină la dextrine și maltoză.

Rețineți!

Glicogenul este o polizaharidă de origine animală, similar amilopectinei, însă cu o structură mai ramificată și servește ca substanță de rezervă de glucoză.

Celuloza este o polizaharidă neramificată, fragmentele de glucoză sunt unite prin legături β(1→4) (Fig. A.1.7). Între macromolecule se formează legături de hidrogen, care conferă rezistență mecanică înaltă fibrelor de celuloză.

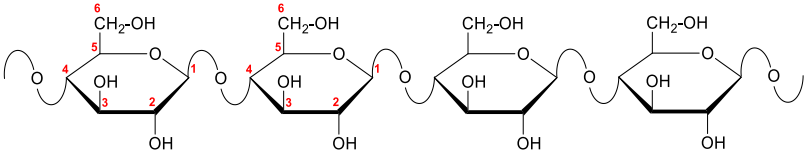


Figura A.1.7. Structura chimică a unui fragment de celuloză

În prezent celuloza poate fi utilizată în calitate de substrat în procesele biotehnologice, doar după procesarea fizică și hidroliza acidă sau enzimatică. Celulazele sunt enzimele care pot hidroliza celuloza. La nivel industrial, celulazele sunt produse prin fermentarea efectuată de fungiile modificate genetic *Trichoderma reesei*.

Rețineți!

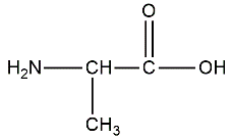
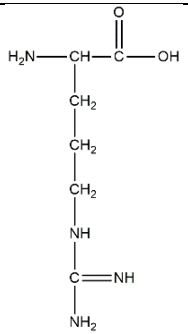
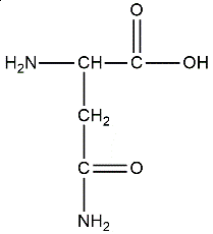
Valorificarea celulozei neprelucrate ca materie primă ieftină în procesele biotehnologice reprezintă o direcție actuală de cercetare în domeniul ingineriei biochimice.

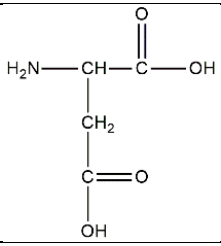
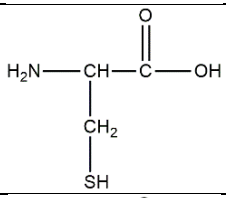
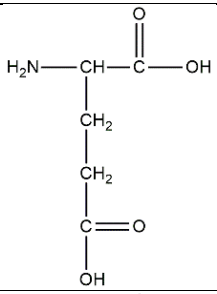
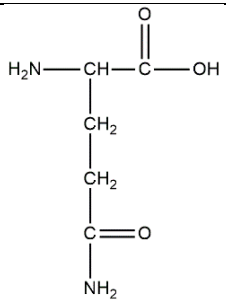
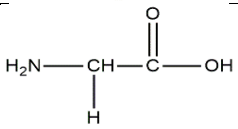
ANEXA 2. Răspândirea și proprietățile fizico-chimice ale proteinelor

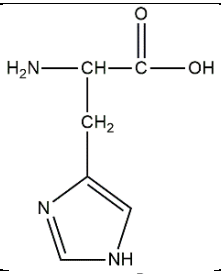
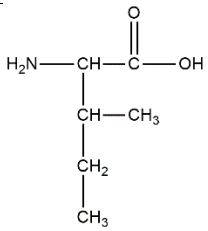
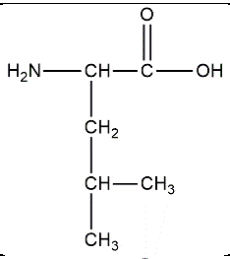
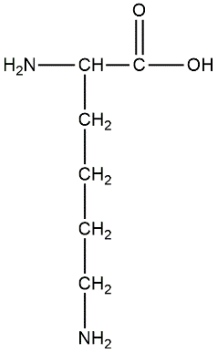
Proteinele (*proteios* – de prim rang) reprezintă constituenții chimici ai organismelor vii cu cel mai înalt grad de complexitate. Acestea au funcții esențiale în toate procesele ce asigură fenomenul vieții, având rol structural, imun, catalitic ș.a.

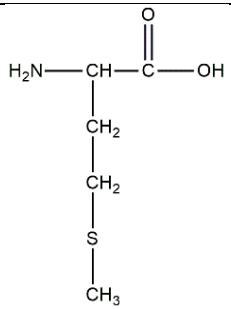
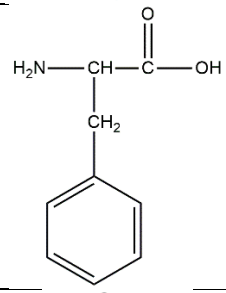
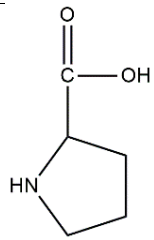
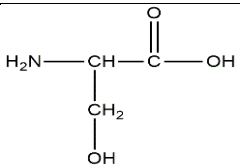
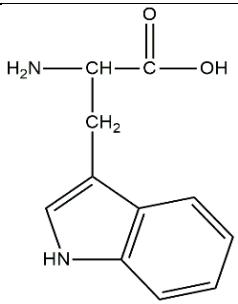
Proteinele sunt polimeri obținuți prin biosinteză din aminoacizi (monomeri). ***Aminoacizii*** conțin grupele funcționale *amino* (-NH_2) și *carboxil* (-COOH), având formula generală H_2N-R-COOH (R- catena carbonică). Din totalitatea aminoacizilor, doar **20 α-aminoacizi** (grupa *amino* se află în poziția α față de grupa *carboxil*) intră în componența proteinelor (Tab. A.2.1).

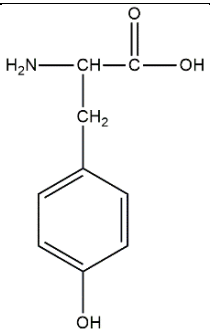
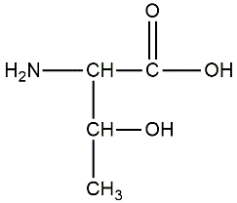
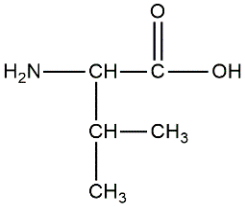
Tabelul A.2.1. Structurile chimice ale aminoacizilor proteinogeni

Denumire	**Structura chimică (în forma neionizată)**	**Simbol**	**Punct izoelectric (pI)**
Alanină		Ala / A	6,02
Arginină		Arg / R	10,76
Asparagină		Asn / N	5,41

Acid aspartic		Asp / D	2,87
Cisteină		Cys / C	5,02
Acid glutamic		Glu / E	3,22
Glutamină		Gln / Q	5,65
Glicină		Gly / G	5,97

Histidină		His / H	7,58
Izoleucină		Ile / I	6,02
Leucină		Leu / L	5,98
Lizină		Lys / K	9,74

Metionină		Met / M	5,75
Fenilalanină		Phe / F	5,98
Prolină		Pro / P	6,10
Serină		Ser / S	5,68
Triptofan		Trp / W	5,88

Tirozină		Tyr / Y	5,65
Treonină		Thr / T	6,53
Valină		Val / V	5,97

După rolul biologic, cei 20 α-aminoacizi pot fi clasificați în 3 grupe (Fig. A.2.1).

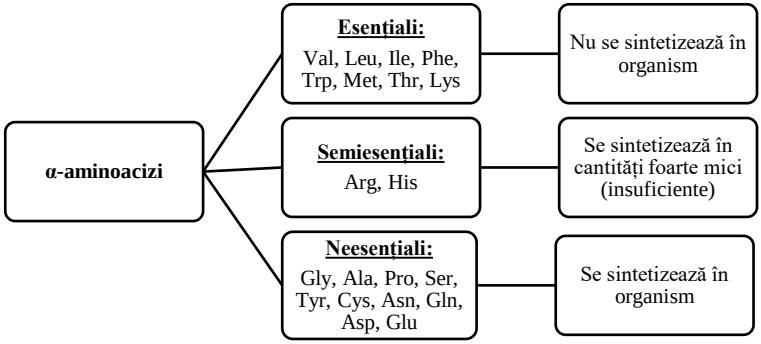


Figura A.2.1. Clasificarea α-aminoacizilor proteinogeni după rolul biologic

Din totalul de 20 α-aminoacizi, 19 (cu excepția Gly) conțin cel puțin un atom de carbon asimetric, prin urmare, prezintă izomeri optic activi. Dacă grupa *amino* (în poziția α față de gruparea *carboxil*) se află în partea stângă, izomerii vor aparține seriei *L*, iar pentru seria *D* aceasta se situează în partea dreaptă (Fig. A.2.2).

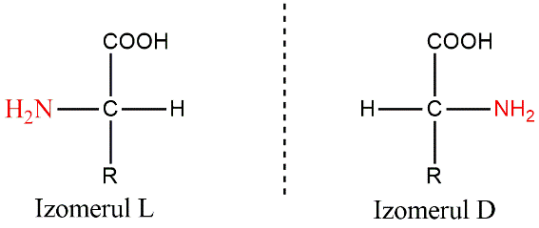


Figura A.2.2. Reprezentarea schematică a izomerilor optic activi ai aminoacizilor chirali

Important!

Proteinele sunt formate din aminoacizii *L*. Aminoacizii seriei *D* pot fi identificați în componența proteinelor peretelui celular al unor microorganisme.

Rețineți!

În cadrul producerii biotehnologice a α-aminoacizilor se obține exclusiv izomerul *L* al α-aminoacidului corespunzător, spre deosebire de sinteza chimică clasică, când se formează ambii izomeri *L* și *D* în cantități egale (amestec racemic) și care necesită utilizarea unor tehnici suplimentare costisitoare pentru separarea izomerului *L*.

Similar hidraților de carbon, aminoacizii prezintă *fenomenul de mutarotație*. Tipul de rotație (+) sau (-) pentru soluțiile aminoacizilor se stabilește pe cale experimentală (a se vedea compartimentul 4).

Proprietăți fizico-chimice. Aminoacizii sunt compuși cristalini, solubili în apă. Prezența concomitentă a grupei amino (-NH_2) și carboxil (-COOH) determină *proprietățile amfotere* (reacționează atât cu acizii, cât și cu bazele) ale aminoacizilor. În stare solidă, aminoacizii există sub forma unor săruri interne, numite ***amfioni*** (ioni bipolari sau zwitterioni): H_3N^+–R–COO^-. În soluție amfionii

aminoacizilor și ai proteinelor funcționează ca substanțe tampon, deoarece pot menține pH-ul stabil într-un anumit interval prin neutralizarea unor cantități mici de baze sau de acid (Fig. A.2.3).

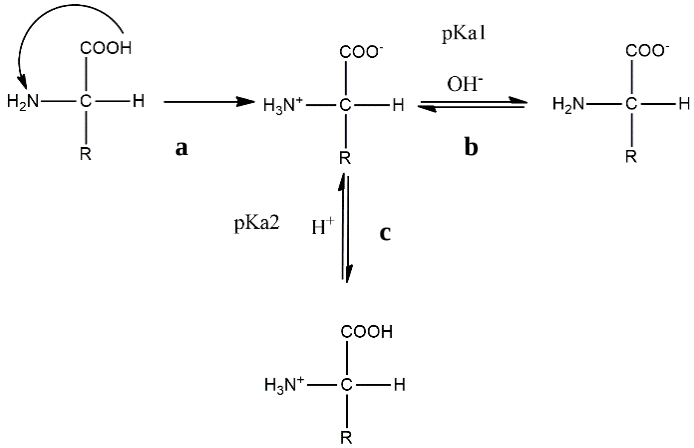


Figura A.2.3. Ecuațiile reacțiilor de formare a amfionilor (**a**) și de interacțiune a acestora cu bazele (**b**) și cu acizii (**c**)

Valoarea pH-ului la care aminoacizii au *sarcina electrică nulă* (numărul sarcinilor negative și pozitive este egal) se numește **punct izoelectric** (pI sau pH_i):

$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} \qquad (1.3)$$

Important!

În pI solubilitatea aminoacizilor și a proteinelor este minimă, ceea ce determină precipitarea din soluțiile apoase. Această proprietate este cu succes aplicată în cadrul proceselor biotehnologice la etapa de separare a aminoacizilor/proteinelor din bioamestec prin modificarea pH-ului amestecului.

Prin condensarea a doi aminoacizi se formează o *legătură peptidică* (Fig. A.2.4). Prin condensarea unui număr mic de aminoacizi (2-10) se obțin **oligopeptide** (Fig. A.2.5), **polipeptidele** au masa moleculară până la 5000 u.a.m. (unități atomice de masă), iar la condensarea a mai mult de 50 de aminoacizi se formează **proteinele**, cu masa moleculară de peste 5000 u.a.m.

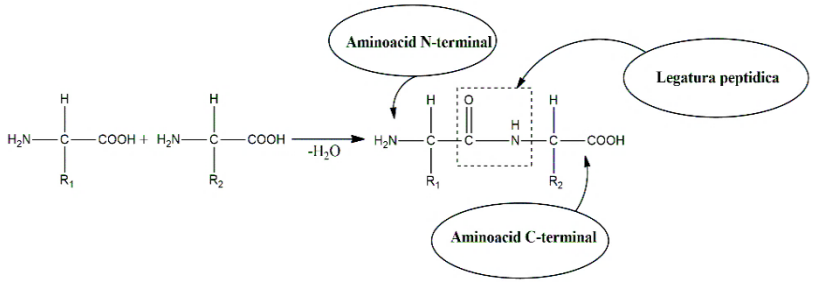


Figura A.2.4. Formarea legăturii peptidice la condensarea α-aminoacizilor

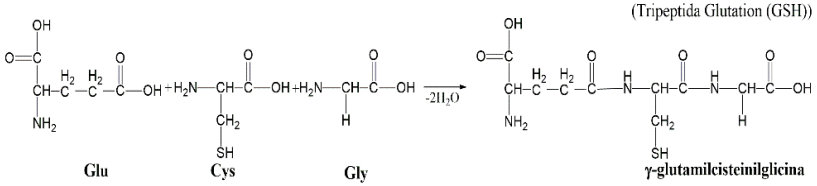


Figura A.2.5. Ecuația reacției de formare a tripeptidei glutation

În macromoleculele proteice fragmentele aminoacizilor (radicalii R) pot forma legături de hidrogen, ionice, covalente și interacțiuni hidrofobe, care vor determina o anumită *organizare structurală spațială* a moleculei (Fig. A.2.6) și, prin urmare, o anumită proprietate biologică. Funcție de organizarea structurală, proteinele se clasifică în fibroase și globulare.

După complexitate, proteinele se clasifică în *simple* și *compuse* (proteide) (Tab. A.2.2).

Tabelul A.2.2. Unii reprezentanți ai proteinelor și proteidelor

Tipul proteinei	Proteine reprezentative	Răspândire
Proteine simple	albumine	albuș de ou, lapte
	globuline	sânge, mușchi
	gluteline	cereale
	scleroproteine	cheratina din păr, lână; fibroina din mătase
Proteine compuse (proteide)	fosfoproteide	caseina din lapte
	lipoproteide	ser sanguin
	cromoproteide	hemoglobina
	glicoproteide	coarne, ouă, ser sanguin
	nucleoproteide	grupa prostetică constituie acizii nucleici

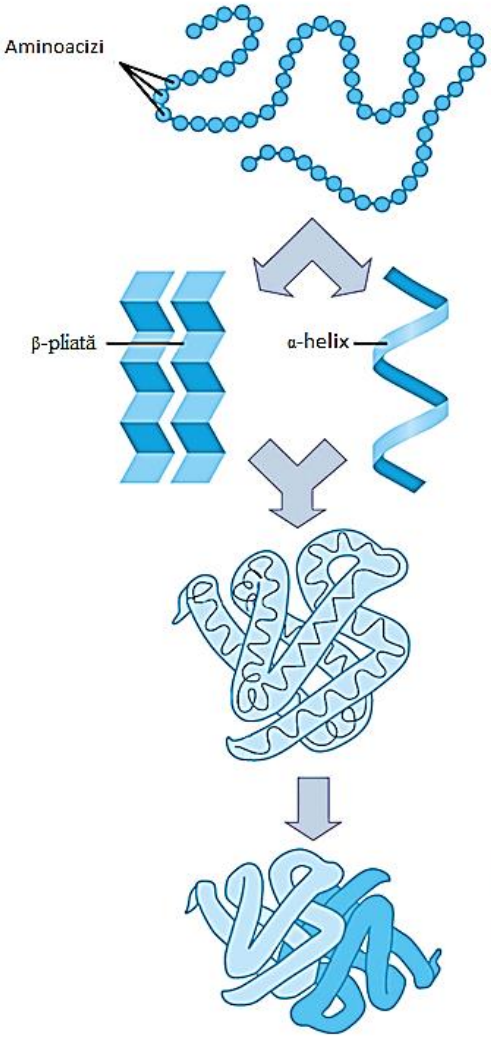
Rețineți!

Unele proteide conțin *grupe prostetice*, molecule non-proteice organice sau anorganice (inclusiv ioni metalici), legate covalent sau prin legături slabe (ionice sau de hidrogen) de proteină, fiind necesare funcției biologice a acesteia (a se vedea compartimentul 2).

După importanța biologică, proteinele au următoarele funcții:

- ✓ structurală (glicoproteine, colagen ș.a.),
- ✓ catalitică (enzime),
- ✓ de transport (cromoproteide),
- ✓ de reglare (hormoni),
- ✓ de protecție (anticorpi).

O proprietate importantă a proteinelor pentru procesele industriale este denaturarea. ***Denaturarea*** presupune alterarea structurii proteice sub acțiunea factorilor fizici (temperatura, radiația, ultrasunetele) și/sau chimici (acizi, baze, săruri, ionii metalelor grele ș.a.) (Tab. A.2.3).



Structura primară corespunde unei secvențe liniare a aminoacizilor. Fiecare proteină nu are doar o anumită compoziție dar și o *ordine specifică* de legare a fragmentelor aminoacizilor în catena proteică.

Structura secundară corespunde organizării catenei polipeptidice în baza legaturilor de hidrogen *intercatenare*, în structuri de tip **helix** și **pliată**. Legăturile de hidrogen sunt stabilite între grupele C=O și NH.

Structura terțiară rezultă din *interacțiunea radicalilor R* (legături de hidrogen, covalente S-S, ionice, interacțiuni hidrofobe) de-a lungul catenei polipeptidice. (Structura 3D a proteinei).

Structura cuaternară este caracteristică proteinelor care au mai mult de o catenă polipeptidică. Structura cuaternară rezultă prin combinarea mai multor structuri terțiare.

Figura A.2.6. Gradele de organizare a proteinelor

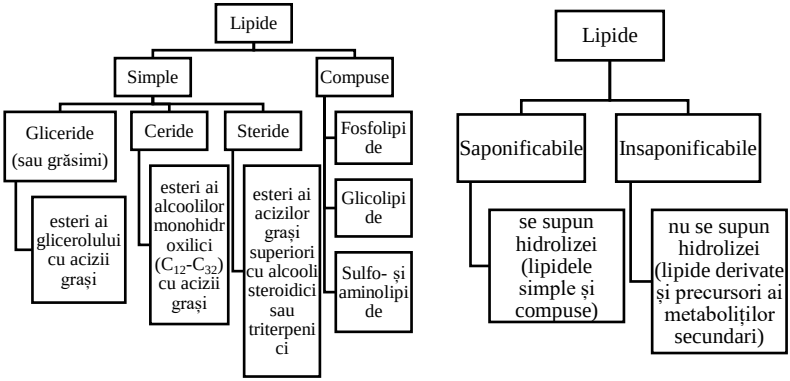
Tabelul A.2.3. Principiile de acțiune a agenților denaturanți asupra proteinelor

Tipul denaturării	Agentul denaturant	Principiul de acțiune a agentului denaturant
Reversibilă	săruri	Soluțiile concentrate ale sărurilor induc agregarea și precipitarea proteinelor. În aceste condiții, apa care hidratează proteinele va hidrata ionii sărurilor, regiunile hidrofobe ale proteinelor devin mai expuse, apar interacțiuni hidrofobe, ceea ce determină precipitarea proteinelor.
	solvenți organici	În solvenții organici (etanol, acetonă) gradul de disociere al proteinelor este mai mic, ceea ce determină atracții mai puternice între grupele polare ale proteinei. În același timp, datorită hidratării moleculelor de solvent, gradul de hidratare al proteinelor scade.
	variația pH-ului	La adăugarea unor cantități mici de acid sau de bază, la un anumit pH (punct izoelectric) poate fi indusă precipitarea proteinelor (precipitarea izoelectrică), când sarcina netă a proteinei este zero.
Ireversibilă	acizi minerali concentrați	Acizii concentrați denaturează ireversibil moleculele proteice prin scindarea legăturilor ionice, hidroliza parțială, derularea unor reacții de nitrare ale fragmentelor aromatice, dacă denaturarea se efectuează cu HNO_3 concentrat.
	ionii metalelor grele (Cu^{2+}, Pb^{2+}, Cd^{2+}, Ag^{+} ș.a.)	Ionii metalici denaturează proteina prin destabilizarea legăturilor ionice formând complecși cu grupele funcționale ionizate. În același timp, ionii metalici cu afinitatea înaltă față de sulf pot scinda legăturile tioeterice (S-S) din proteină.
	temperatura	Încălzirea proteinelor la o temperatură superioară celei de 50^0C determină

		schimbări structurale ireversibile determinate de scindarea legăturilor de hidrogen, legăturilor ionice, anularea interacțiunilor apolare, formarea legăturilor tioeterice (-S-S-) prin oxidarea legăturilor tiolice (-SH) ale fragmentelor de cisteină ș.a.

Lipidele (*lipos* – grăsime) sunt metaboliți primari răspândiți în toate organismele vii. Acestea au rol structural (formează biomembranele), energetic, de crioprotecție, precursori în sinteza metaboliților secundari ș.a.

Lipidele pot fi clasificate după mai multe criterii. În funcție de compoziție și structură, se deosebesc lipide *simple* și *compuse,* iar după proprietatea de a hidroliza lipidele se clasifică în *saponificabile* și *insaponificabile* (Fig. A.3.1).



a **b**

Figura A.3.1. Clasificarea lipidelor după structura chimică (**a**) și după proprietatea de a hidroliza (**b**)

Din totalitatea lipidelor (Fig. A.3.1), interes în procesele de fermentare și ulterior la etapa de separare a produsului de interes prezintă 3 grupe: *gliceridele* (grăsimile), *steridele* (steroizii) și *fosfolipidele* (fosfatidele, fosfogliceridele), care sunt descrise în continuare.

Lipidele, exceptând steroizii, conțin fragmente ale acizilor grași superiori. Acizii grași sunt formați dintr-o catenă lungă (hidrofobă) și gruparea carboxil (hidrofilă). Acizii grași din componența lipidelor sunt *saturați* și *nesaturați*.

De regulă, în compoziția lipidelor de origine animală predomină resturile acizilor grași saturați ce le conferă stare solidă, iar în lipidele de origine vegetală se regăsesc predominant resturile acizilor grași nesaturați, respectiv, acestea sunt lichide.

Acizii grași nesaturați pot conține una, două, trei sau patru legături duble, de regulă în configurația *cis,* și un număr par de atomi de carbon (Tab. A.3.1).

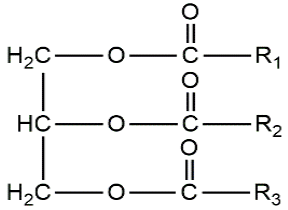
Tabelul A.3.1. Principalii acizi grași din componența lipidelor

	Denumirea trivială		Formula brută
Acizi grași saturați	acid caprilic		$C_7H_{15}COOH$
	acid caprinic		$C_9H_{19}COOH$
	acid lauric		$C_{11}H_{23}COOH$
	acid miristic		$C_{13}H_{27}COOH$
	acid palmitic		$C_{15}H_{31}COOH$
	acid stearic		$C_{17}H_{35}COOH$
	acid arahidic		$C_{19}H_{39}COOH$
	acid behenic		$C_{21}H_{43}COOH$
Acizi grași nesaturați	1 legătură dublă	acid miristoleic	$C_{13}H_{25}COOH$
		acid palmitoleic	$C_{15}H_{29}COOH$
		acid oleic	$C_{17}H_{33}COOH$
	2 legături duble	acid linoleic	$C_{17}H_{31}COOH$
	3 legături duble	acid linolenic	$C_{17}H_{29}COOH$
	4 legături duble	acid arahidonic	$C_{19}H_{31}COOH$

Important!

Acizii grași nesaturați nu se obțin prin biosinteză de organismele animale, necesarul trebuie suplinit cu dieta. Acizii grași nesaturați se numesc *indispensabili*.

Grăsimile sunt esteri ai glicerolului cu acizii grași. După numărul fragmentelor de acizi grași, deosebim mono-, di-, și trigliceride (Fig. A.3.2).



unde R_1, R_2, R_3 sunt resturi ale acizilor grasi

Figura A.3.2. Structura generală a trigliceridelor

Dacă $R_1=R_2=R_3$, atunci grăsimea se numește *omogenă*, iar dacă $R_1\neq R_2\neq R_3$, grăsimea este *mixtă*.

În procesele biochimice, gliceridele reprezintă o sursă importantă de energie. Prin hidroliză se formează acizi grași (Fig. A.3.3) care prin metabolizare produc adenozintrifosfat (ATP).

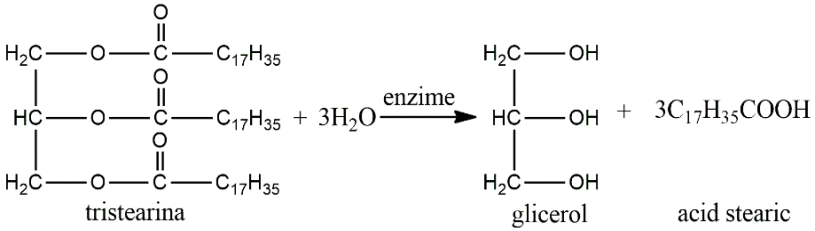


Figura A.3.3. Hidroliza enzimatică a trigliceridelor pe exemplul tristearinei

Important!

Analog aminoacizilor, gliceridele chirale de origine naturală sunt izomeri de tip *L*.

Fosfolipidele sunt derivații acidului fosfatidic esterificat în pozițiile C_1 și C_2 cu acizi grași, iar în poziția C_3 cu aminoalcool (colină, etanolamină), aminoacid (serină) sau cu alcooli polihidroxilici (glicerol, inozitol) (Fig. A.3.4).

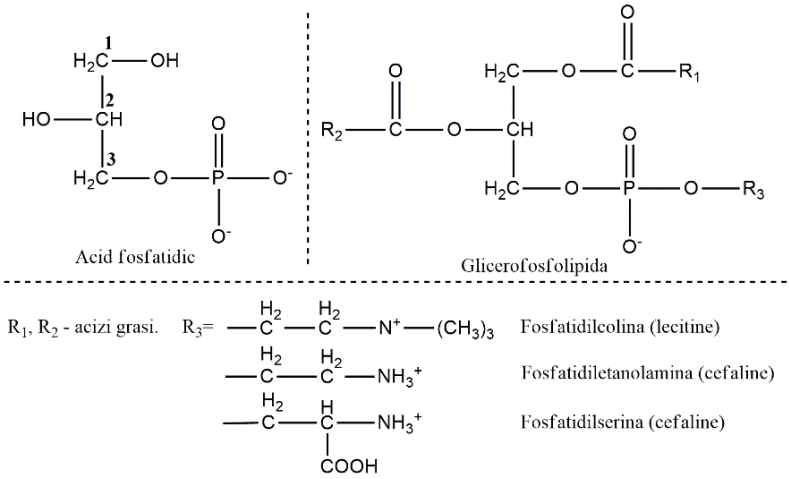


Figura A.3.4. Formulele de structură a unor glicerofosfolipide

Fosfogliceridele formează *membranele celulare* (*biomembranele*) ale microorganismelor, celulelor vegetale și animale. Fosfogliceride membranare tipice sunt: fosfatidilcolinele, fosfatidilserinele, fosfatidil-glicerolul (component major al membranelor bacteriilor) și fosfatidil-inozitolul.

Biomembranele nu sunt doar parte componentă a peretului celular și a membranei plasmatice, dar și delimitează organitele celulare.

Important!

Cunoașterea naturii chimice a lipidelor complexe ce formează biomembranele microorganismelor este importantă în proiectarea unui proces biotehnologic la etapa de separare a produsului de interes, în special dacă acesta este format intracelular.

Interes în ingineria biochimică prezintă și *steroizii* (lipide insaponificabile), structura de bază a cărora este *ciclopentanperhidrofenantrenul* (Fig. A.3.5a). Precursorul din care se obțin steroizii este colesterolul (Fig. A.3.5b).

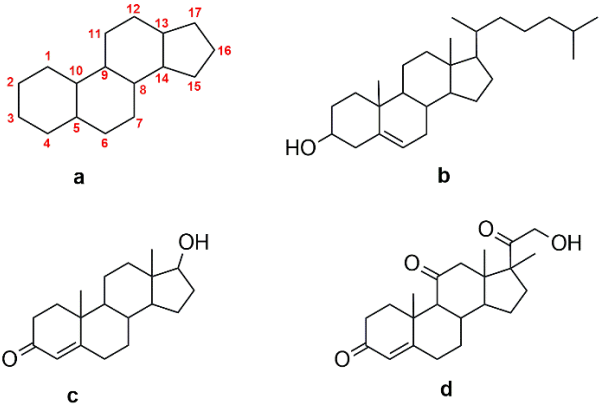


Figura A.3.5. Structurile chimice ale ciclopentanperhidrofenantrenului (**a**), colesterolului (**b**), testosteronului (**c**) și cortizonei (**d**)

Producerea industrială a steroizilor (ex., testosteronul, cortizona ș.a. Fig. A.3.5c-d) se realizează cu ajutorul unor microorganisme.

ANEXA 4. Răspândirea și proprietățile fizico-chimice ale acizilor nucleici

Fenomenul vieții, pentru toate organismele vii, este asigurat de metaboliții primari, din care fac parte și acizii nucleici. Acizii nucleici asigură stocarea, transmiterea și expresia informației genetice (biosinteza proteinelor). Altfel spus, acizii nucleici conțin informația necesară ce asigură *metabolismul* tuturor organismelor vii.

Fiecare celulă conține un set de „proiecte" (informație codificată) pentru biosinteza enzimelor (proteine), care catalizează toate reacțiile metabolice. Informația codificată se conține în nucleul celulei, sub forma moleculelor de ***acid deoxiribonucleic*** sau ***ADN***. Mitocondriile și cloroplastele sunt organite celulare ce conțin ADN propriu, numit ***ADN extranuclear***.

Biosinteza proteinelor are loc prin intermediul acidului ribonucleic (ARN) care se conține 90% în citoplasmă și 10% în nucleu.

Acizii nucleici sunt polimeri constituiți din **nucleotide** (monomeri) (Fig. A.4.1), care, la rândul lor, sunt compuse din *5 baze azotate, două tipuri de hidrați de carbon și un rest fosfat* (Tab. A.4.1).

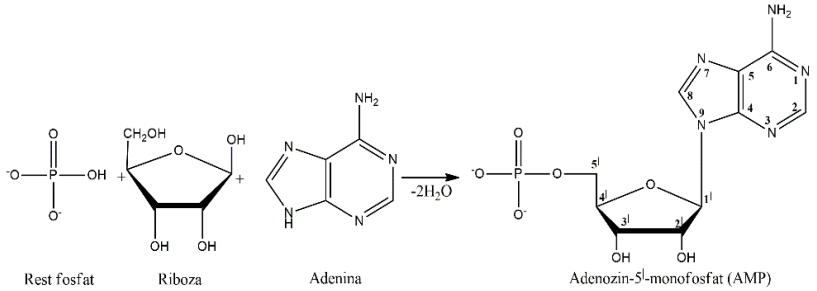
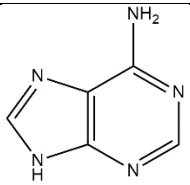
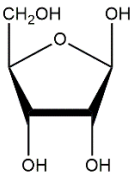
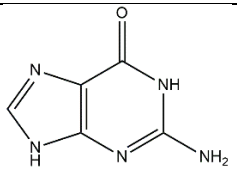
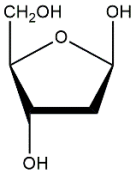
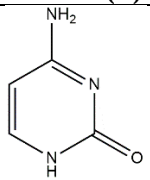
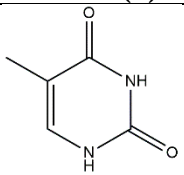
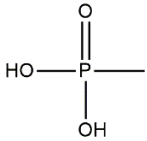
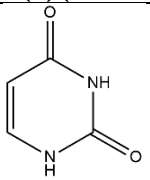


Figura A.4.1. Ecuația reacției de formare a unei nucleotide

Tabelul A.4.1. Constituenții nucleotidelor

	Baze azotate	**Hidrați de carbon**
Purinice	 **Adenina (A)**	 **Riboza (*Doar în ARN*)**

<table>
<tr><td rowspan="4">Pirimidinice</td><td>
Guanina (G)</td><td rowspan="2">
2-deoxiriboza (Doar în ADN)</td></tr>
<tr><td>
Citozina (C)</td></tr>
<tr><td>
Timina (T) (Doar în ADN)</td><td rowspan="2">Rest fosfat
</td></tr>
<tr><td>
Uracil (U) (Doar în ARN)</td></tr>
</table>

Unele nucleotide – **acidul adenozintrifosforic (ATP)** și **acidul guanozintrifosforic (GTP) –** au rolul de conservare și furnizare a energiei pentru procesele biochimice (Fig. A.4.2).

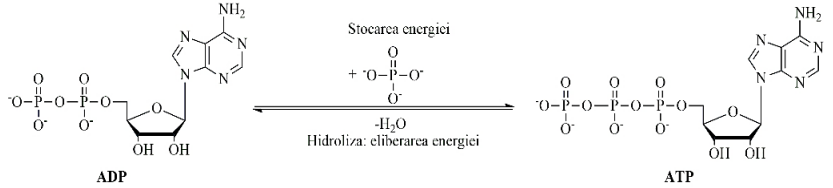


Figura A.4.2. Ecuațiile reacțiilor de stocare și eliberare a energiei pentru procesele biochimice de către ATP

Important!

Nucleotidele ADN-ului sunt formate din *2-deoxiriboză* și *4 baze azotate (A, G, C, T)*, iar nucleotidele ARN-ului sunt formate din *riboză* și *4 baze azotate: A, G, C, U*.

Nucleotidele acizilor nucleici sunt legate chimic prin resturile fosfat, formând *legături fosfodiesterice* în pozițiile 5' și 3' (Fig. A.4.3). Succesiunea nucleotidelor din catenele macromoleculelor acizilor nucleici constituie *structura primară* a acestora.

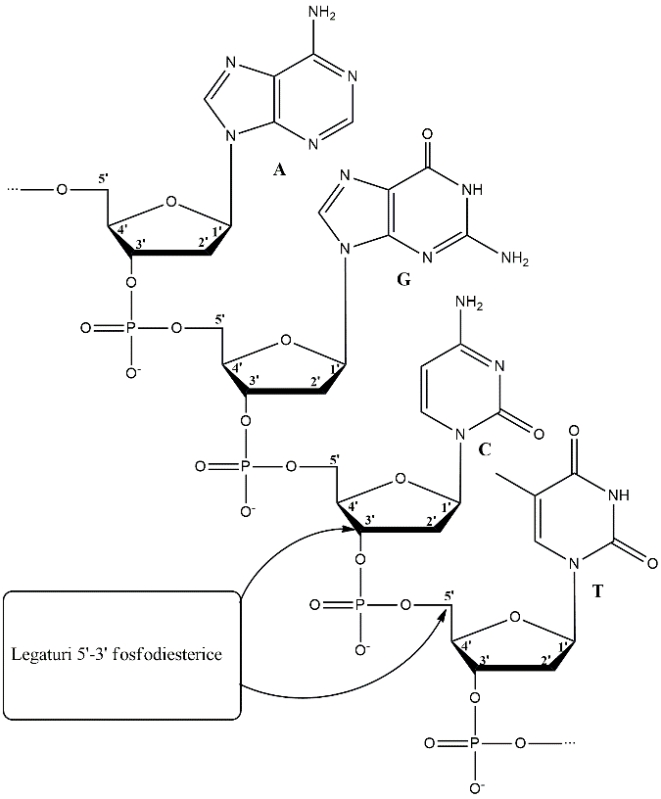


Figura A.4.3. Fragment al structurii primare a moleculei de ADN

Acizii nucleici sunt compuși polimerici, cu catene foarte mari. ARN-ul este un polimer liniar ce poate să conțină până la câteva mii de nucleotide, iar

ADN-ul poate să conțină până la 10^8 nucleotide. ADN-ul are o structură dublu helix (*structura secundară*), formată grație legăturilor de hidrogen între două catene complementare (*principiul complementarității*). O catenă are direcția 5'→ 3', iar a doua este inversată 3' → 5' (Fig. A.4.4).

Important!

Principiul complementarității presupune că bazei azotate **A** îi corespunde **T** (două legături de hidrogen (**A=T**)), iar **C** îi corespunde **G** (trei legături de hidrogen (**C≡G**)).

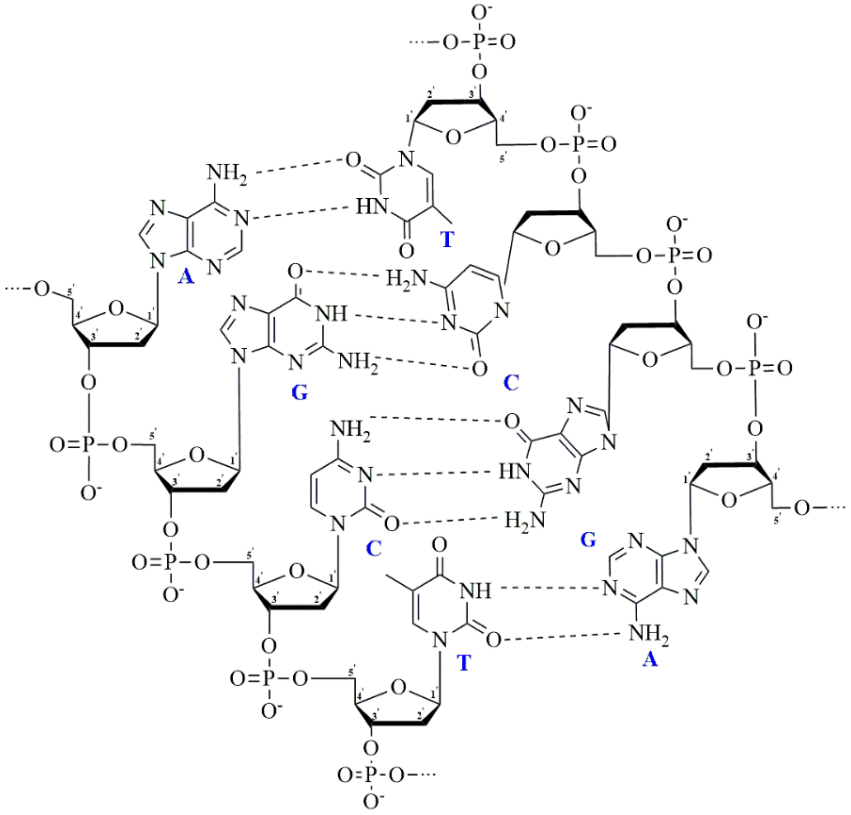


Figura A.4.4. Fragment al structurii secundare a moleculei de ADN

Reținеți!

Dividerea celulelor vii presupune transferul de informație genetică (codul genetic), astfel încât celulele noi să fie identice celulei-mamă, proces numit **replicarea ADN-ului**.

Biosinteza proteică presupune în prima etapă formarea unei copii a ADN-ului sub formă de *acid ribonucleic* (ARN), numit *mesager* (ARN_m). ARN_m este direcționat din nucleul celulei în citoplasmă, unde, cu ajutorul ribozomilor (ARN – *ribozomal*, „fabricile" de proteine), are loc biosinteza organizată a proteinelor, aminoacizii fiind transportați spre ribozomi de ARN-ul *de transport* (ARN_t) (Fig. A.4.5).

Reținеți!

Pentru fiecare dintre cei 20 aminoacizi proteinogeni există câte un ARN_t specific, care conține, fiecare, 73-93 nucleotide.

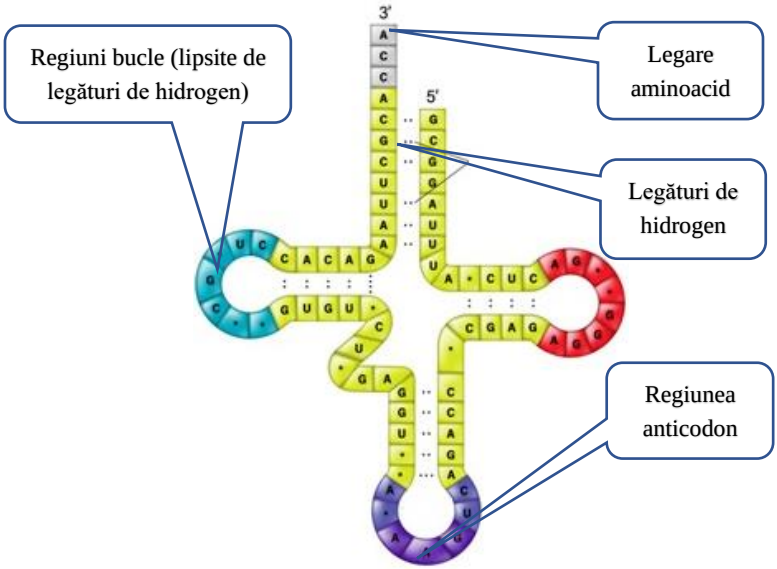


Figura A.4.5. Reprezentarea schematică a structurii ARN-ului de transport

Moleculele de ARN_m sunt constituite din *codoni* – tripleți (3 nucleotide aranjate secvențial). Molecula de ARN_t conține *anticodoni* – tripleți care recunosc codonii ARN_m. Prin urmare, molecula de ARN_m interacționează cu ARN_t doar dacă codonii sunt recunoscuți de anticodoni. ARN_t transportă aminoacidul corespunzător la complexul format dintre ARN_m și ribozomi (ARN_r), unde are loc formarea legăturii peptidice. Ribozomii se „deplasează" de-a lungul ARN_m prin asamblarea continuă și organizată a proteinelor cu ajutorul ARN_t. Biosinteza continuă până la momentul când ribozomii ajung la codonul STOP sinteză.

Important!

Procesul de formare a moleculei de ARN_m de pe catena ADN se numește **transcripție**, iar procesul de biosinteză proteică în baza informației codificate din ARN_m se numește **translație**.

Rețineți!

În procesul de transcripție a moleculei de ARN_m, conform principiului de complementaritate, adeninei (A) îi va corespunde *uracilul (U)*, din motiv că ARN nu conține timină (T).

Vladislav BLONSCHI, Angela LIS

Îndrumar
pentru lucrările practice și de laborator
la
Inginerie biochimică

Redactare – Ariadna Strungaru

Bun de tipar 25.11.2025. Formatul 60x84 $^{1}/_{16}$
Coli de tipar 11,5. Coli editoriale 9,0.
Comanda 42. Tirajul 20 ex.

Centrul Editorial – Poligrafic al USM
str. Al. Mateevici, 60, Chișinău, MD-2009.