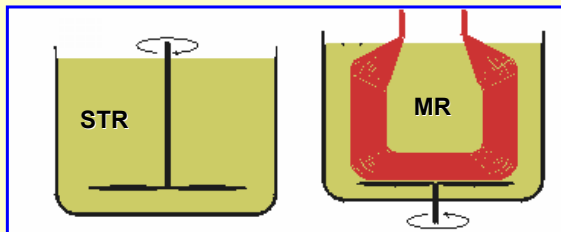


Enzymové reaktory

- nádoba, kde probíhá konverze substrátu prostřednictvím enzymové reakce
 - enzym ve volném stavu nebo imobilizovaný
- základní rozdělení:
 - vsádkové („batch“)
 - průtočné nebo kontinuální („flow-through“, „continuous“)
- hodnocení činnosti - stupeň konverze α

$$\alpha = \frac{[S]_0 - [S]}{[S]_0} = \frac{[P]}{[S]_0}$$

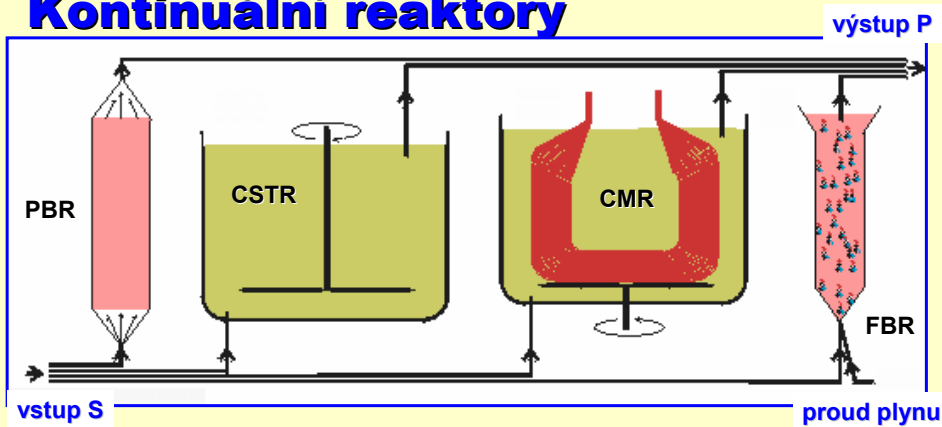
Vsádkové reaktory



- STR nádoba s míchadlem „stirred tank reactor“
- MR vsádkový membránový reaktor
 - enzym zadržován v dutých vláknech
 - možnost opakovaného použití enzymu
- společné vlastnosti:
 - enzym i substrát mají shodnou dobu setrvání v reakční směsi
 - nákladnější provoz, obtížnější kontrola (proměnlivost náplně)
 - jednoduchost, obtížné zvětšení rozsahu („scale-up“)
- kinetika = integrovaná MM rovnice

$$V_{\max} t = [P] + K_m \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]} = \alpha [S]_0 - K_m \ln(1 - \alpha)$$

Kontinuální reaktory



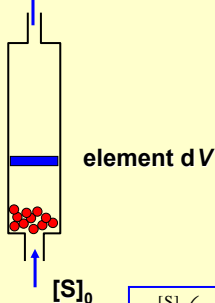
- PBR „packed bed reactor“ - průtočná kolona naplněná nosičem s imobilizovaným enzymem
- CSTR „continuous flow stirred tank reactor“ = kontinuálně provozovaná varianta vsádkového STR
- CMR „continuous flow membrane reactor“ = kontinuální varianta MR
- FBR „fluidized bed reactor“ - proud plynu (nebo nástřik substrátu) udržuje imobilizovaný enzym ve vznosu

Proudění vs. uspořádání

- pohyb kapaliny a způsob proudění (laminární / turbulentní) má výrazný vliv na produktivitu reaktoru
- hodnocení - empirické bezrozměrné faktory
- **Reynoldsovo číslo Re** - dává do souvislosti setrvačné síly vznikající při toku kapaliny a viskozitu (odpor prostředí v důsledku vnitřního tření)
 - malé Re - laminární proudění
 - kritické Re - přechodová oblast
 - velké Re - turbulentní proudění
- závisí na konfiguraci systému: $Re = Lf_m/\eta$ nebo $Re = Lf/v$
 - L charakteristická délka (průměr obtékané částice, průměr trubky, ...),
 - f_m rychlost toku hmoty [$g\ m^{-2}\ s^{-1}$], f je lineární rychlost toku [$m\ s^{-1}$],
 - η je dynamická viskozita [$g\ m^{-1}\ s^{-1}$], ν kinematická viskozita [$m^2\ s^{-1}$]
 - pro míchané systémy se uplatní rychlost míchání a průměr míchadla

Kinetika

PBR



- celkový objem reaktoru je V , průtoková rychlost u [$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$], enzym s parametry K_M , V_{\max}
- gradient substrátu $d[S]/dV$, substrát co do elementu přiteče a bude konvertován:

$$-\frac{d[S]}{dV} u = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

sdužení parametrů:

$$-\frac{K_M + [S]}{[S]} d[S] = -\left(\frac{K_M}{[S]} + 1\right) d[S] = \frac{V_{\max}}{u} dV$$

- integrace v mezích 0, V a $[S]_0$, $[S]$:

$$-\int_{[S]_0}^{[S]} \left(\frac{K_M}{[S]} + 1\right) d[S] = \frac{V_{\max}}{u} \int_0^V dV$$

$$[S]_0 - [S] - K_M \ln \frac{[S]}{[S]_0} = \frac{V_{\max} V}{u}$$

$$\frac{V_{\max} V}{u} = \alpha [S]_0 - K_M \ln(1 - \alpha)$$

podíl V/u má význam doby zdržení substrátu v reaktoru

$V_{\max} V$ pak značí reakční kapacitu (odpovídá aktivitě enzymu)

PBR

- je výhodnější turbulentní režim toku
 - lepší promíchávání a přenos tepla
- efektivita je nejvyšší na vstupu a nejnižší na výstupu důsledkem gradientu koncentrace substrátu
- používají se rel. malé částice (1 až 3 mm), mechanicky pevné - komprese by velmi komplikovala průtok a snížila katalyticky účinnou plochu a pohyb média v pórech
- prakticky nelze regulovat pH, regulace teploty obtížná
- formování kanálků uvnitř náplně vede k nehomogennímu průběhu konverze
- médium je vhodnější pouštět směrem zdola nahoru
 - přiblížení k ideálnímu chování

Kinetika CSTR

- chování lze popsat na základě zákona zachování hmoty
 - rozdíl koncentrací substrátu na vstupu a výstupu znásobený průtočnou rychlostí je roven rychlosti enzymové reakce:

$$\frac{u}{V} ([S]_0 - [S]) = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

- lze upravit:

$$([S]_0 - [S]) + K_M \frac{[S]_0 - [S]}{[S]_0} = \frac{V_{\max} V}{u}$$

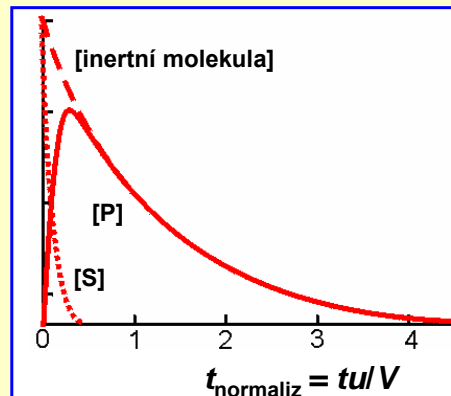
- případně vyjádřit pomocí stupně konverze:

$$\frac{V_{\max} V}{u} = \alpha [S]_0 + K_M \frac{\alpha}{(1 - \alpha)}$$

- enzym je obvykle imobilizován
 - částice se nesmí vymývat
- výhody:
 - jednoduchá konstrukce, nízké náklady, výměna náplně enzymu snadná, kontrola pH a teploty snadná, odvod plynných produktů

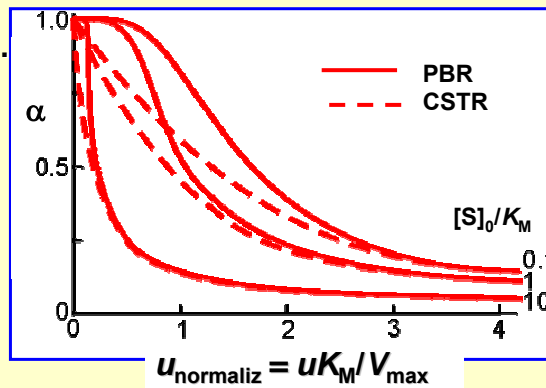
CSTR

- výhody zředění přitékajícího média
 - nevdává tak výrazně inhibice (inhibitorem či substrátem)
- odchylky od ideálního chování nastávají při neefektivním míchání
- distribuce molekul v reaktoru v závislosti na době zdržení („residence time“)
 - relativní normalizované vyjádření pomocí doby výměny 1 objemu reaktoru



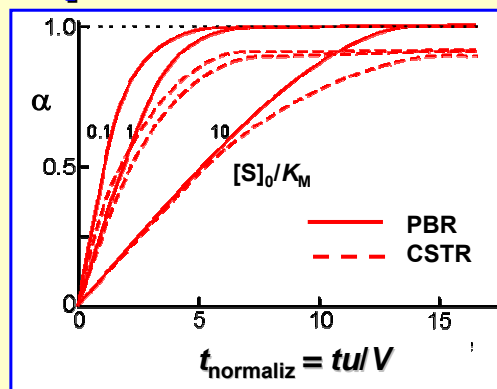
Stupeň konverze pro PBR a CSTR

- v závislosti na norm. rychlosti průtoku
- pro vyšší průtoky se rozdíly mezi PBR a CSTR ztrácí ...



Stupeň konverze pro PBR a CSTR

- v závislosti na norm. době zdržení
- pro vyšší průtoky se rozdíly mezi PBR a CSTR ztrácí ...



FBR

- chování je někde mezi PBR a CSTR
- enzymová náplň je udržována ve vznosu
 - proudem substrátu zdola nahoru
 - bubláním plynem
 - velikost částic 20 až 40 μm (velká katalytická plocha), uniformní
- výhodné pro reakce zahrnující plynné produkty
- obtížný „scale-up“, jen cca 10 až 100x
 - u PBR jednoduše až 5000x
- činnost citlivá na fluktuace průtočné rychlosti média

Praktické použití enzymových reaktorů

- velikost výrobní kapacity na bázi kontinuálního procesu je obvykle o 2 řády menší než srovnatelné použití rozpustného enzymu

Enzym	EC	Produkt
aminoacylasa	3.5.1.14	L-aminokyseliny
aspartát amoniak-lyasa	4.3.1.1	L-asparagová kyselina
aspartát 4-dekarboxylasa	4.1.1.12	L-alanin
kyanidasa	3.5.5.x	kys. mravenčí (z odpad. kyanidů)
glukoamylasa	3.2.1.3	D-glukosa
glukosa isomerasa	5.3.1.5	fruktosový sirup
histidin amoniak-lyasa	4.3.1.3	urokanová kyselina
hydantoinasa	3.5.2.2	D- a L-aminokyseliny
invertasa	3.2.1.26	invertní cukr
laktasa	3.2.1.23	bezlaktosové mléko
lipasa	3.1.1.3	náhražky kakaového másla
nitril hydratasa	4.2.1.x	akrylamide
penicillin amidasa	3.5.1.11	peniciliny
rafinasa	3.2.1.22	odstranění rafinosy
thermolysin	3.2.24.4	aspartam

Fruktosový sirup

- od 1940 - vývoj glukoamylasy vedl k snadné produkci glukosových sirupů, ale komerční komplikace
 - ty jsou ale málo sladké (pouze cca 70% sladkosti sacharosy)
 - menší rozpustnost - buď udržovat roztoky teplé, nebo naředit (pak zase hrozí mikrobiální atak)
 - proto se použitím **glukosaisomerasy** (objevena kolem 1950) převede polovina na fruktosu (2x rozpustnější, o 30% sladší než sacharosa)
- v současnosti enzymy z *Actinoplanes missouriensis*, *Bacillus coagulans* a *Streptomyces* sp.
-

Ekonomika procesu

Parameter	Batch (soluble GI)	Batch (immobilised GI)	Continuous (PBR)
Reactor volume (m ³)	1100	1100	15
Enzyme consumption (tonnes)	180	11	2
Activity, half-life (h)	30	300	1500
Active life, half-lives	0.7	2	3
Residence time (h)	20	20	0.5
Temperature (°C)	65	65	60
pH	6.8	6.8	7.6
Colour formation (A ₄₂₀)	0.7	0.2	< 0.1
Product refining	Filtration C-treatment Cation exchange Anion exchange	- C-treatment Cation exchange Anion exchange	- C-treatment - -
Capital, labour and energy costs, £ tonne ⁻¹	5	5	1
Conversion cost, £ tonne ⁻¹	500	30	5

- použije se 45% roztok glukosy, konverze na fruktosu je 42%
- rozsah 10 tis. tun za měsíc
- 1 kg enzymu vyrobí 10 až 11 tun fruktosového sirupu

Rafinasa (α -D-galaktosidasa)

- odstranění rafinosy při výrobě sacharosy
- bylo třeba najít organismus produkující galaktosidasu, ale NE invertasu - plíseň *Mortierella vinacea* var. *raffinoseutilizer*
- lze použít přímo vysušeného mikroba, přidá se k výluhu z cukrovky, používá se STR
- uvolněná galaktosa se zničí v prvních výrobních krocích při čerání výluhu zahrnujících alkalické prostředí

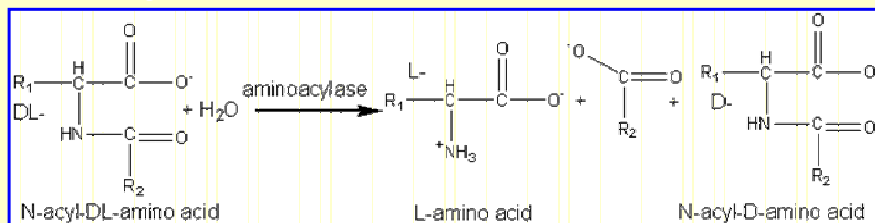
- imobilizovaná rafinasa také slouží k odstranění rafinosy a stachyosy ze sojového mléka (vadí tam při speciálních dietách, působí nadýmání)

Imobilizovaná invertasa

- 1941-6 - scházela kyselina při výrobě tzv. "Golden Syrupu" - náhražkou tedy byla invertasa z kvasnic
 - autolyzované kvasnice, vyčerené, pH na 4.7, filtrace přes síran vápenatý, adsorpce na aktivní uhlí z masokostní moučky (stejně se používalo pro odbarvování ...)
 - výborná stabilita (akorát to napadali mikrobi a přestalo to odbarvovat...)
 - akorát že produkt neměl mírně nakyslou chuť
- nyní se to ještě navíc zesíl'uje pro zvýšení stability

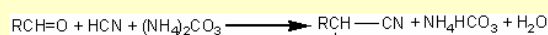
Příprava aminokyselin

- aminoacylasa z *Aspergillus oryzae* slouží pro štěpení racemické směsi z chemické přípravy N-acyl-DL-aminokyselin:

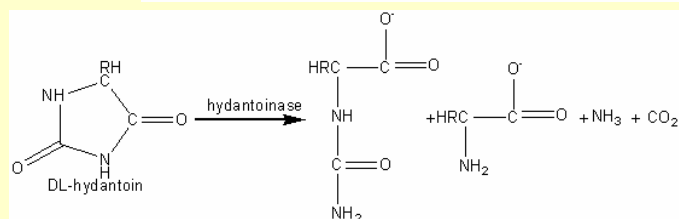
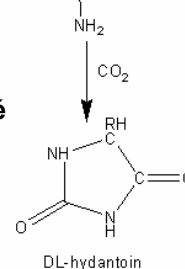


- produkty se snadno separují krystalizací, zbylé N-acyl-D-aminokyseliny se racemizují (chem. nebo enz.) a vrátí se do procesu
- enzym imobilizován na DEAE-Sephadexu, reaktivace prostým přidáním nového enzymu

Hydantoinasa



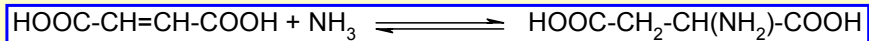
- nové i přírodní aa - chemickou konverzí z aldehydů přes DL-aminonitryl na racemické DL-hydantoiny
- následuje enzymová hydrolýza pomocí hydantoinasy a karbamoylasy, oba enzymy z *Arthrobactera*



- D-aminokyseliny lze připravit hydantoinasou z *Pseudomonas striata*, zbylé L-hydantoiny se racemizují v alk. prostředí

Kyselina L-asparagová

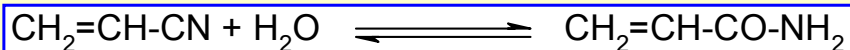
- v potravinářství, farmaceutickém průmyslu, pro výrobu aspartamu (nízkokalorické umělé sladidlo)
- výroba z kyseliny fumarové pomocí aspartát:amoniaklyasy z *E. coli*:



- celé buňky *E. coli* se imobilizují v karageenanovém gelu, zesítuje se glutaraldehydem a hexamethyldiaminem

Akrylamid

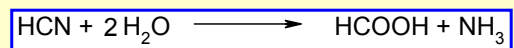
- monomer pro přípravu polymerů
- vzniká adicí vody na akrylonitril:



- lze použít Cu⁺, ale výtěžek je malý a vznikají další balastní produkty (polymerace, kys. akrylová, ...)
- použití **nitrilhydratasy** (často chybně zvána nitrilasou)
 - pochází z *Rhodococcus* sp.
 - velmi nízká amidasová aktivita
 - celé buňky se zapolymerují v zesítovaném polyakrylamid/dimethylaminoethylmetakrylátovém gelu,

Odstranění kyanidů

- z průmyslových odpadních vod
- detoxifikace krmiv a potravin obsahujících amygdalin
- použijí se kyanidaso:



- a kyanid hydratasa:

