

فرايند توليد اسيد پيرويك

Pyruvic Acid

1 μm

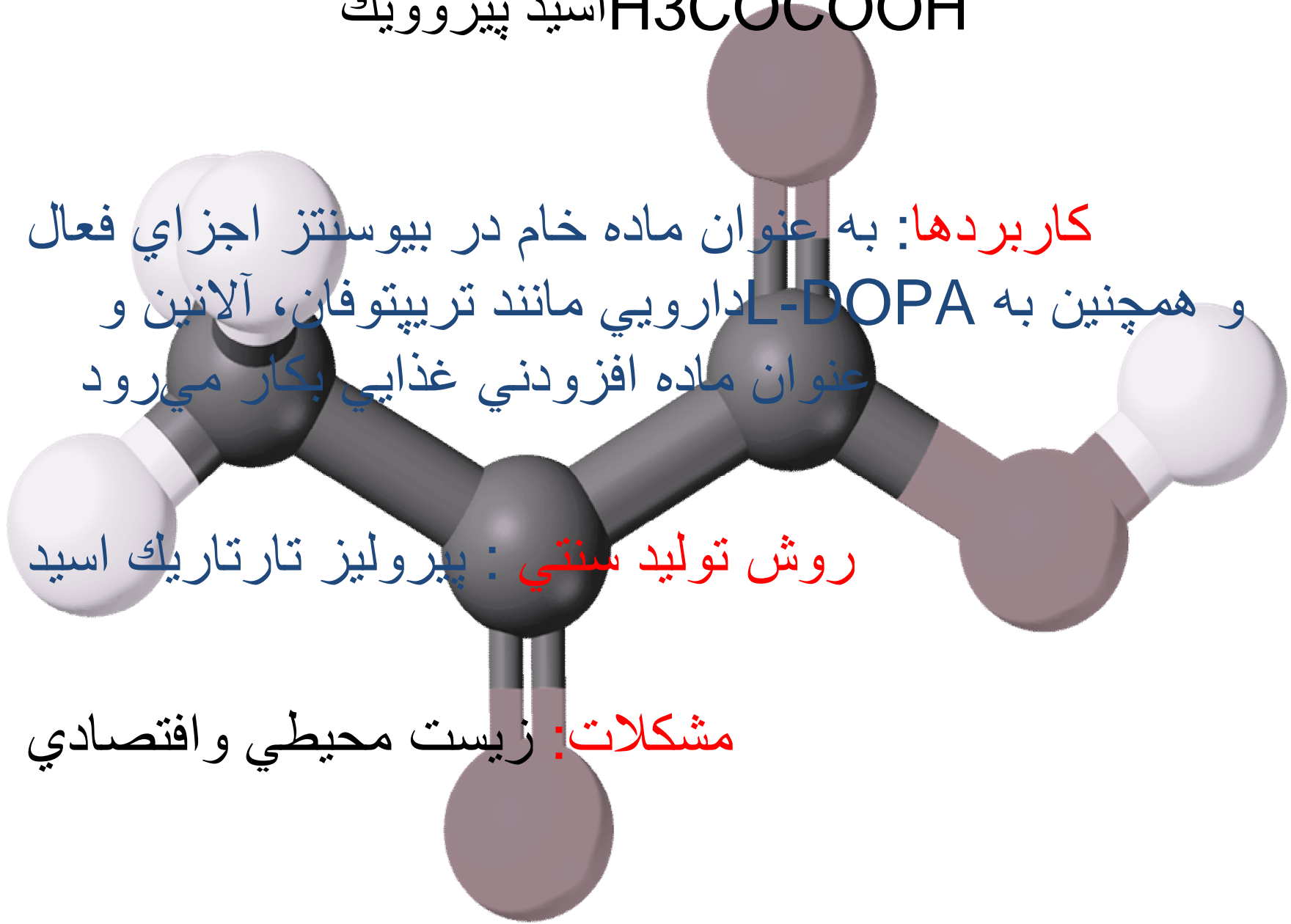


H3COCO₂H اسید پیروویک

کاربردها: به عنوان ماده خام در بیوسنتز اجزای فعال و همچنین به L-DOPA دارویی مانند تریپتوفان، آلانین و عنوان ماده افزودنی غذایی بکار می‌رود

روش تولید سنتی: پیرولیز تارتاریک اسید

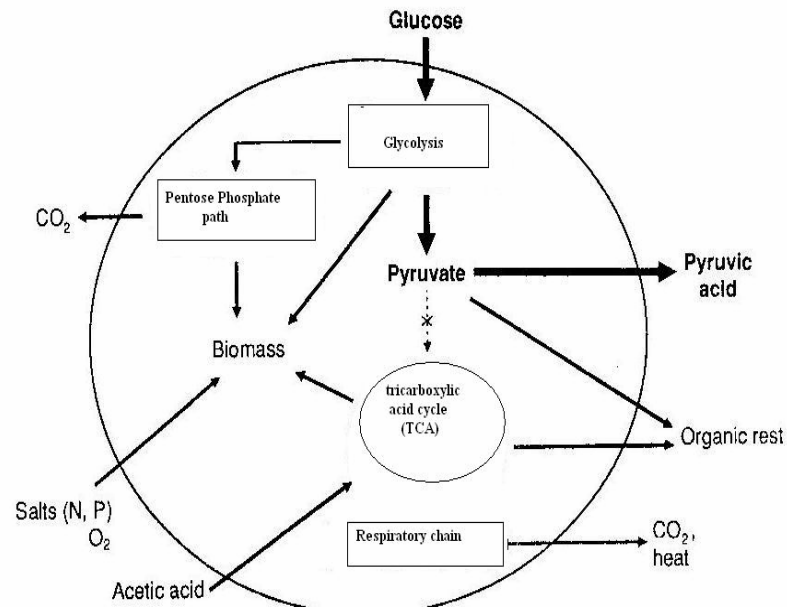
مشکلات: زیست محیطی و اقتصادی



توليد اسيد پيرويک به روش بيوشيميائي

باکترى مورد استفاده: نوع مهندسي ژنتيک شده ي *Escherichia coli*

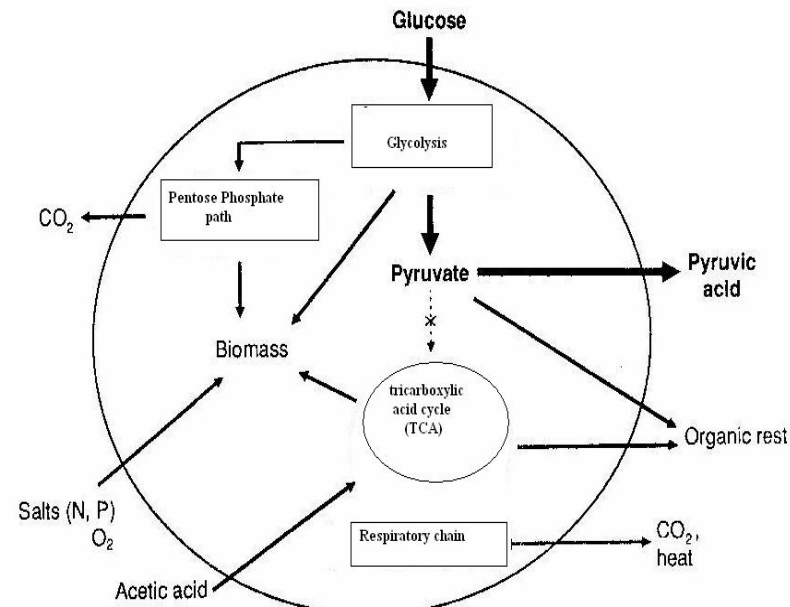
خوراک: گلوکز

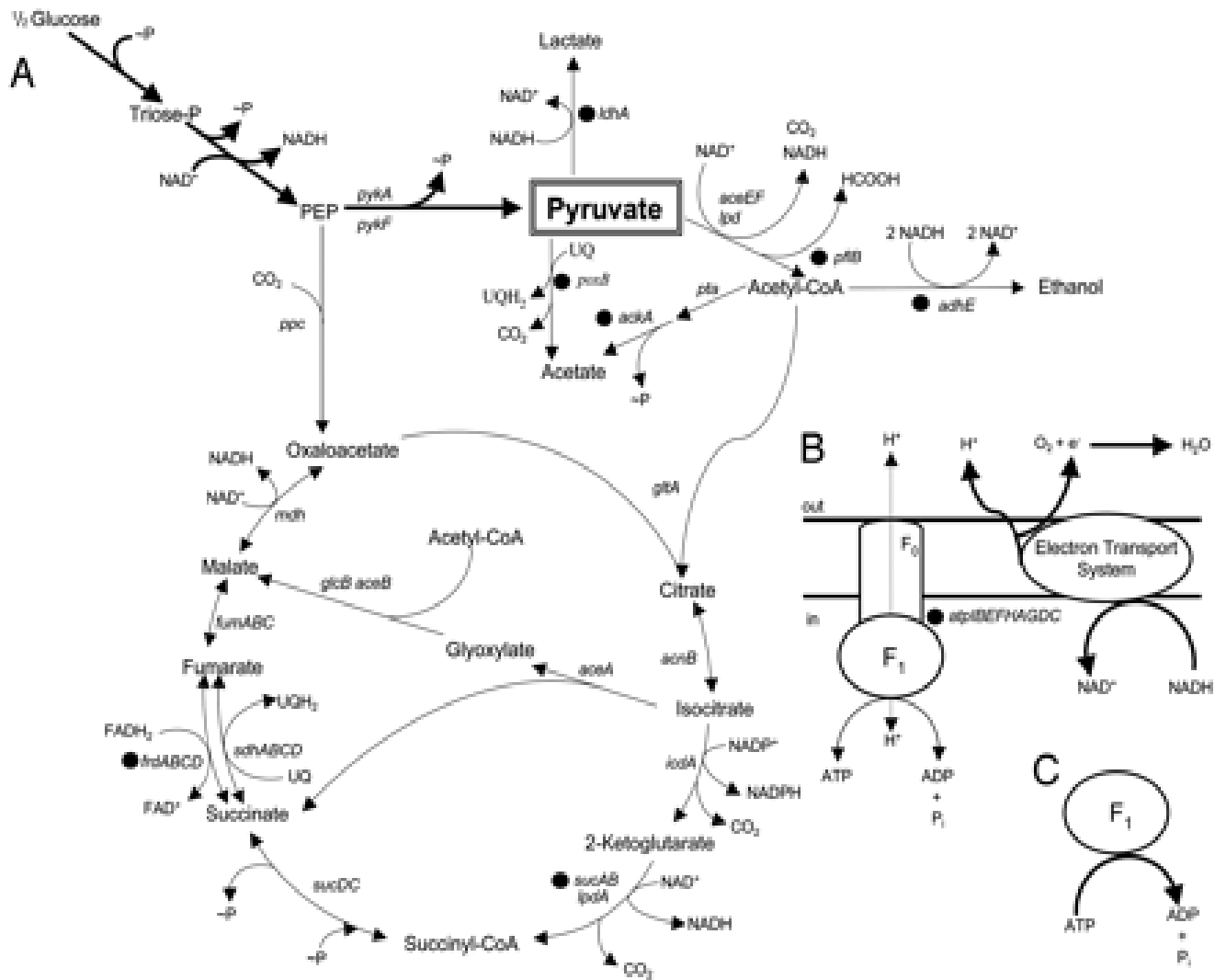


Pyruvate production by glycolysis

- In [glycolysis](#), [phosphoenolpyruvate](#) (PEP) is converted to pyruvate by [pyruvate kinase](#). This reaction is strongly exergonic and irreversible; in [gluconeogenesis](#) it takes two enzymes, [pyruvate carboxylase](#) and [phosphoenolpyruvate carboxykinase](#) to catalyze the reverse transformation of pyruvate to PEP. The arrow indicating a reverse reaction in the Figure below is incorrect.
- [phosphoenolpyruvate](#) $\xrightarrow{\text{pyruvate kinase}} \text{pyruvate} + \text{ADP} \rightarrow \text{ATP}$

باكتري گلوکز و استات را مصرف مي‌کند و همين طور نيتروژن آمونياک فسفر و اکسيژن . گلوکز عمدتاً از طريق گلوکليز تبديل به پيروويک اسيد مي‌شود . که به محيط کشت (Medium) ترشح مي‌شود .





نوع بیوراکتور

تخمیر بصورت يك fed-batch تکرار شونده با ۴ سیکل انجام می‌گردد.

سیکل اول: **رشد بیومس** و **تشکیل محصول** را شامل می‌گردد. در انتهای هر سیکل، بخشی از سوپ تخمیر خارج می‌شود. بیومس در بیوراکتور باقی می‌ماند. با محیط کشت تازه پر می‌شود.

سیکل‌های ۲-۴: استات اضافی وارد نمی‌شود و پیرویک اسید با سلول‌های ایستا (بدون رشد) تولید می‌شود..

Downstream Processing

• استخراج با حلال

بعد از حذف بیومس، محلول محصول به ستون تبادل یون P-37 هدایت می‌شود. و در آنجا کاتیون‌ها جذب می‌شوند. ستون شسته می‌شود (S-207) و کاتیون‌ها با اسید کلریدریک شسته می‌شوند (S-202) و بصورت فاضلاب تخلیه می‌شوند (S-203).

علت جداسازی کاتیون‌ها: جداسازی کاتیون‌ها الزامی است زیرا ممکن است در مراحل آتی استخراج با حلال مشکلاتی ایجاد کند

بعد از حذف کاتیون‌ها در تبادل‌گر یون، pH محلول محصول کاملاً کمتر از pka اسید پیرویک ($pka = 2.4$) است

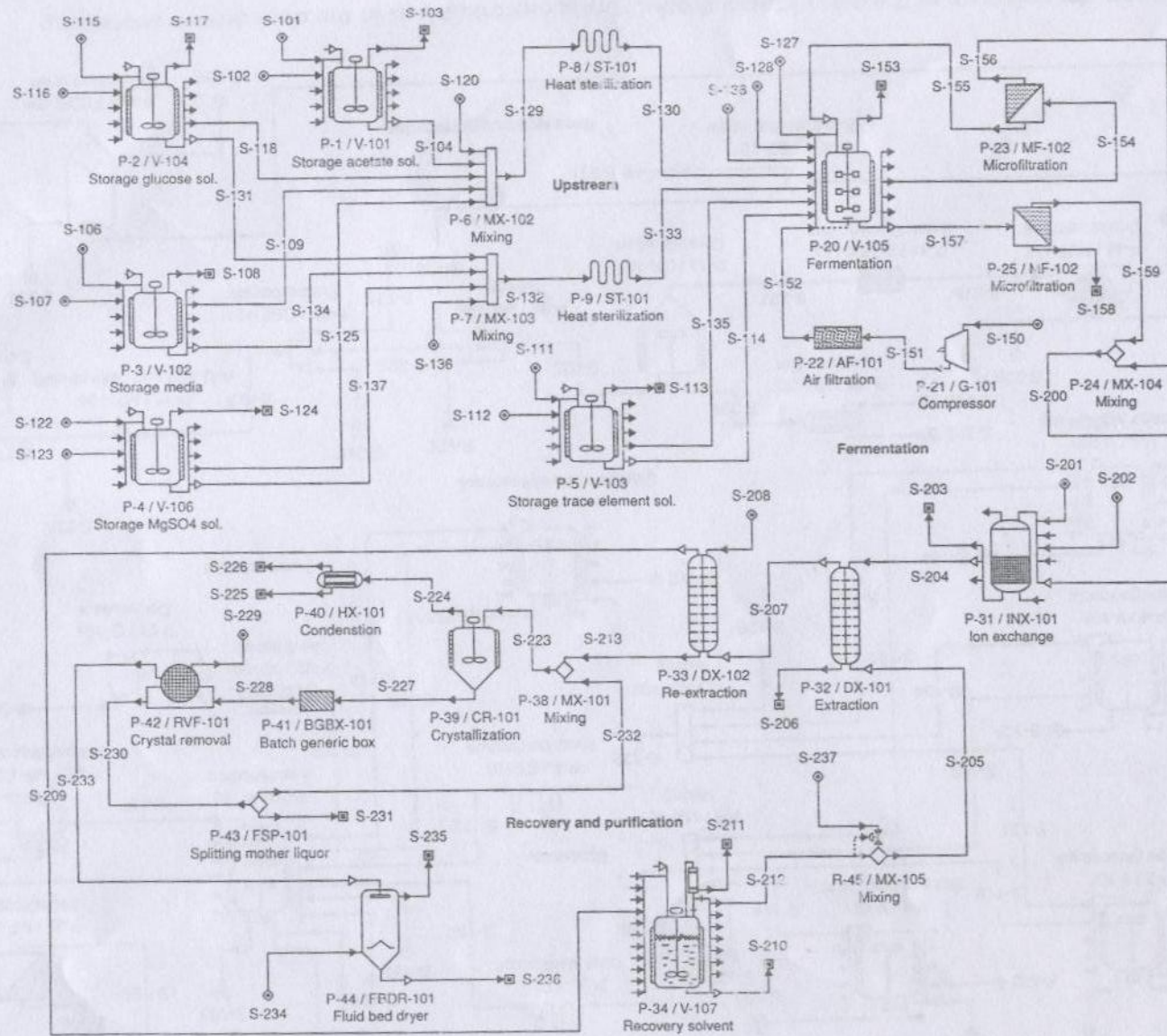
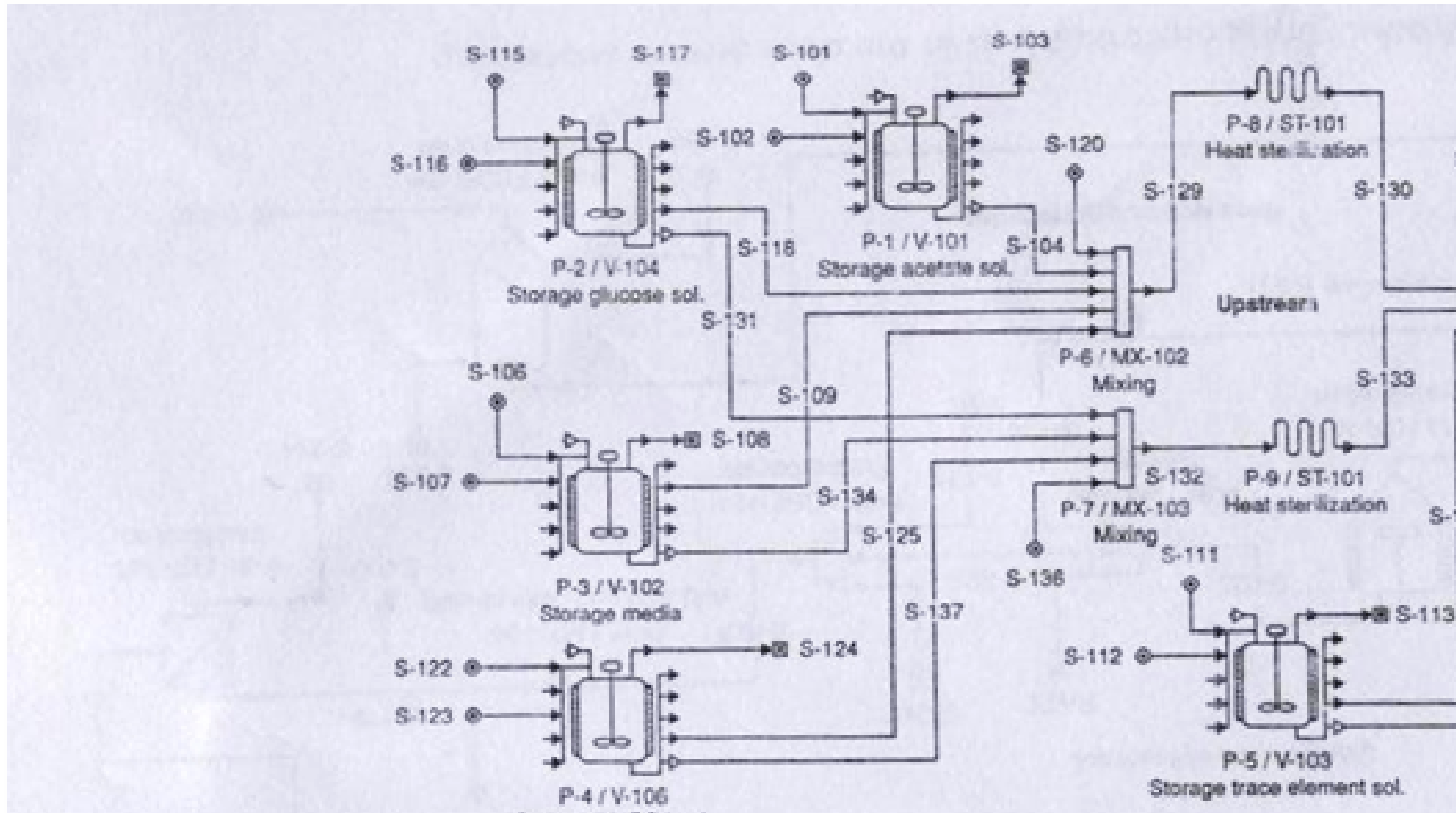
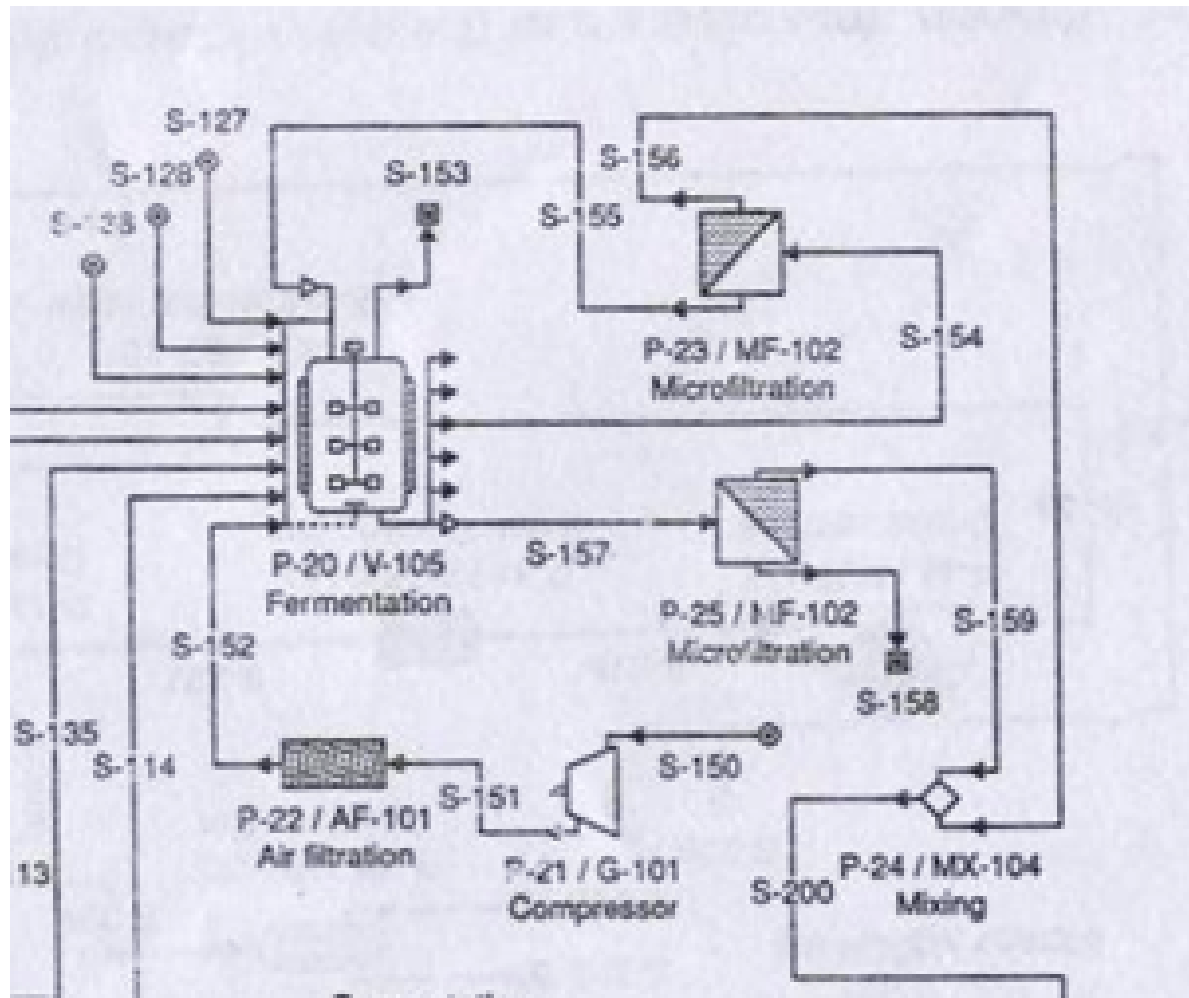


Figure 6.2 Process flow diagram of the pyruvic acid product using solvent extraction in the downstream processing

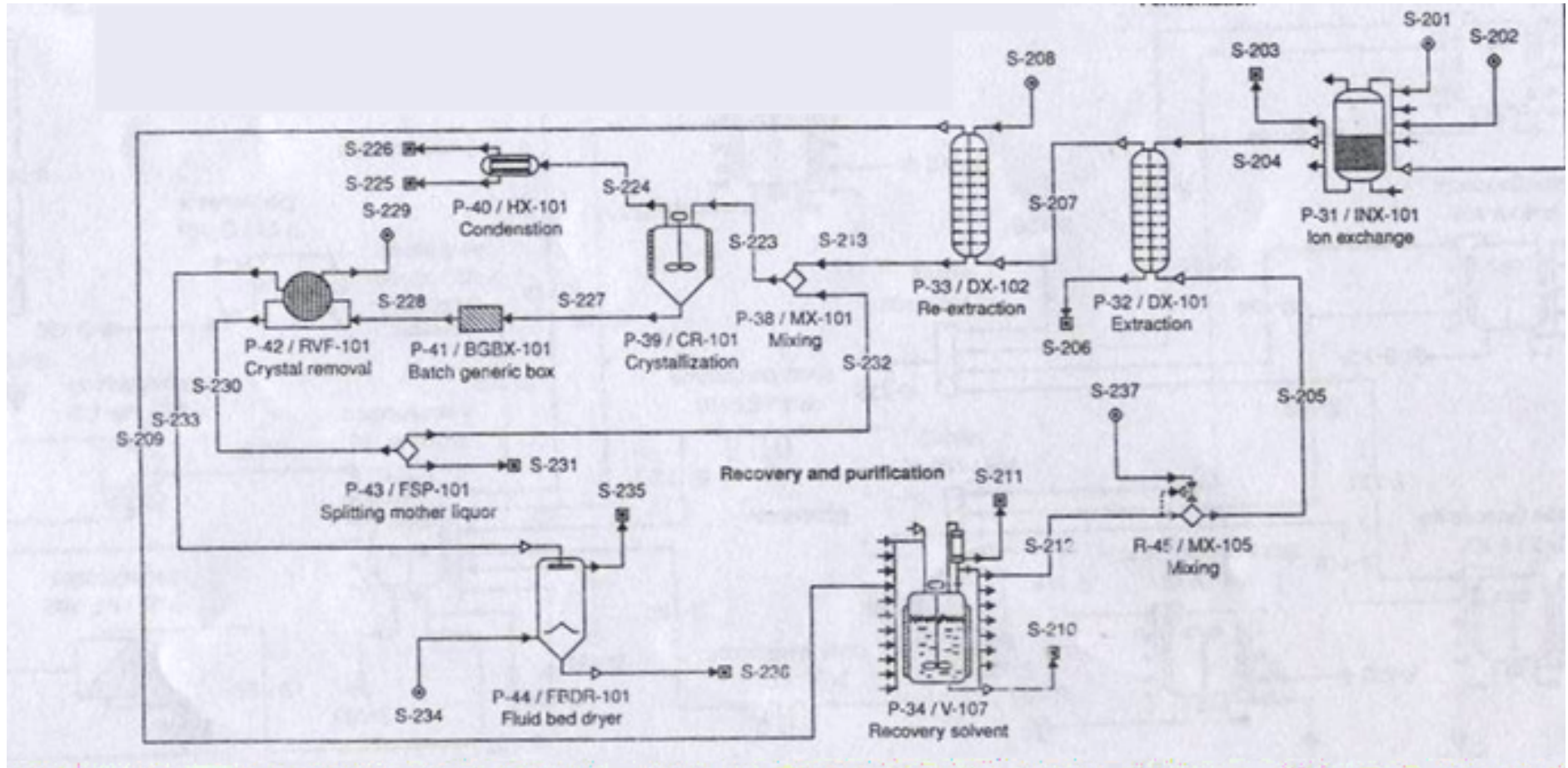
Upstream Processing



fermentation



Downstream Processing



back-Extraction

در پس استخراج (back-Extraction) (P-33) حلال آلي حاوي پيرويك اسيد با يك محلول آبي سدیم هيدروكسيد تماس داده مي شود. به علت pH بالاي اين محلول اسيد پيرويك به محلول آبي منتقل مي شود و سدیم پيرووات تشكيل مي دهد.

Crystallization

در مرحله‌ی متبلور سازی (P-39) بیشتر آب تبخیر می‌شود. سپس محلول سرد می‌شود. سدیم پیرووات ته نشین می‌شود. بخار حاصله در P-40 کندانس می‌شود. کریستال‌ها جدا شده و در واحد فیلتراسیون خلاء (P-42) شسته می‌شوند (S-229). مایع مادر به مخزن متبلور سازی برای دستیابی به بازده بازیافتی بالاتر بازگردانده می‌شود. به منظور اجتناب از تجمع ترکیبات نامطلوب یک جریان تخلیه در P-43 گرفته می‌شود. سدیم پیرووات جدا شده در خشک کن بستر سیال P-44 (S-236) خشک می‌شود.

الکترو دیالیز

الکترو دیالیز عملیات جداسازی است که در آن نیروی محرکه الکتریکی برای انتقال یون‌ها از میان یک غشای یون - انتخابی و نیمه تراوا بکار می‌رود و در نتیجه آنها را از فاز آبی جدا می‌کند. آزمایش‌های مقدماتی قابلیت کاربرد آن برای تخلیص پیرویک اسید را ثابت کرد

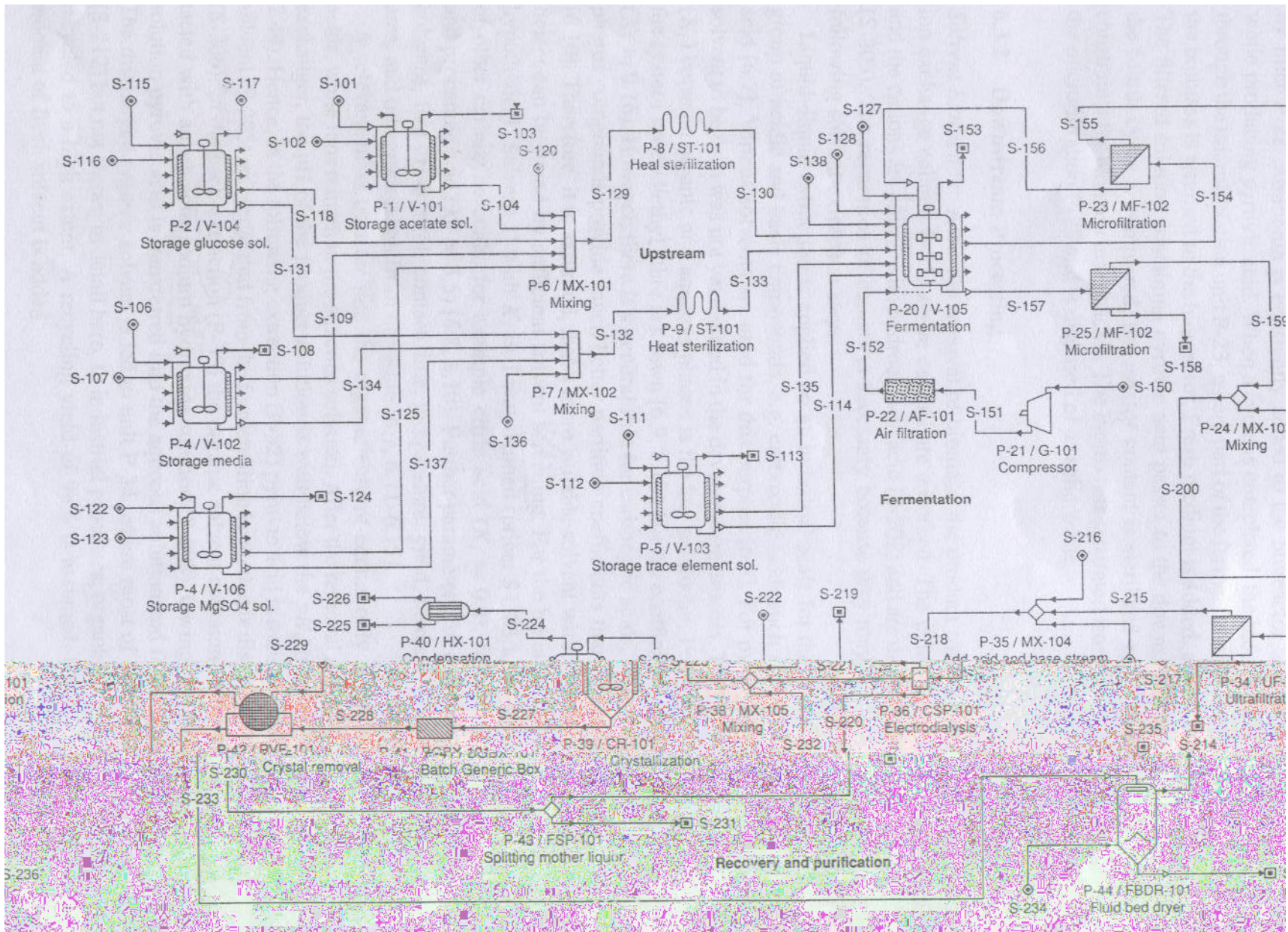


Figure 6.3 Process flow diagram of the pyruvic acid product using electrodesis in the downstream processing

- يك الكترودياليز تفكيك كننده آب با غشاهاي دو قطبي فرض مي شود (P-35, P-36). از آنجائيكه آمونيوم براي كنترل pH در بيوراكتور بكار مي رود محلول محصول در واقع حاوي آمونيوم پيرووات است وقتي وارد واحد الكترودياليز مي شود. آمونيوم و ديگر كاتيون هاي تك ظرفيتي از ميان غشاي كاتيوني وارد جريان باز (base) مي شوند (S-220). يون هاي چند ظرفيتي و مولكول هاي بدون بار مانند گلوکز عمدتاً داخل محلول باقي مي مانند كه بصورت پساب دفع مي شود (رقيق S-219). غشاي دو قطبي واقع در بين غشاهاي يوني آب را به يون هاي هيدروكسيد و پروتون تفكيك مي كند. در جريان اسيدي، پيرويك اسيد تشكيل مي شود و در جريان بازي آمونيوم هيدروكسيد توليد مي شود. فرض مي شود غلظت هاي پيرويك اسيد در جريان اسيدي و آمونيوم هيدروكسيد در جريان بازي به $1/5 M$ مي رسد.

خروجی (kg/kg P)		ورودی (kg/kgP)		نام جزء
الکترودیالیز	استخراج	الکترودیالیز	استخراج	
		0.09	0.09	اسید استیک
		0.03	0.03	آمونیم سولفات
0.18	0.18	0.19	0.19	آمونیم
0.09	0.09	<0.01	<0.01	بیومس
0.05	0.05			کربن دی اکسید
0.10	0.10	1.18	1.19	گلوکز
		<0.01	0.62	هیدروژن کلرید
	-0.31		0.31	حلال ۱
0.08	0.08			اتلاف محصول
0.15	0.15			باقیمانده آلی
		0.18	0.19	اکسیژن
		0.38	0.37	سدیم هیدروکسید
		0.14	0.14	نمک های معدنی
0.32	0.75			نمک های آلی
32.7	47.3	32.3	46.9	آب
33.5	51.6	34.5	52.6	شاخص جرمی (MI)
0.8	1.7	2.2	3.1	MI بدون آب

جدول ۱,۶: موازنه مواد برای تولید اسید پیرویک. $kg = [kg/kg P]$ جزء بر kg سدیم پیروات

مصرف انرژی

- مراحل با بیشترین مصرف انرژی متبلورسازی (P-39)، بازگردانی حلال (P-34)، کمپرسور (P-21) و راکتور (P-20) می‌باشند. برق مخصوص مصرفی $1/9 \text{ kwh/kgp}$ برای فرایند استخراج با حلال و $2/4 \text{ kwh/kgp}$ برای الکترودیالیز است. مصرف برق بالاتر به علت مرحله الکترودیالیز می‌باشد. در برابر، مصرف بخار، سرمایش و آب سرد در استخراج با حلال (50 kg/kgp ، 265 kg/kgp ، $2/7 \text{ m}^3/\text{kgp}$ ، به ترتیب ...) بالاتر از فرایند الکترودیالیز (15 kg/kgp ، 50 kg/kgp ، $1/5 \text{ m}^3/\text{kgp}$ به ترتیب) می‌باشد.
- تقاضای انرژی پایین‌تر الکترودیالیز عمدتاً به علت حذف بازگردانی حلال است. به علاوه کاربرد الکترودیالیز سبب افزایش غلظت محصول در S-223 و در نتیجه کاهش تقاضای بخار مخصوص و آب خنک‌کننده کمتر در متبلورسازی می‌شود.

ارزیابی زیست محیطی

- بیومس جدا شده تنها پس ماند جامد است.
- محتوی آب لجن تولیدی بسیار بالا است. بنابراین بایستی به یک واحد تصفیه فاضلاب داده شود. جدای از هوا، انتشارهای تولیدی تنها حاوی آب و در مقادیر کمتر دی اکسید کربن می باشد.

نیاز نیست. شاخص زیست محیطی کلی برای الکترودیالیز پایینتر HCl از آنجاییکه حلال آلی و است که نشان دهنده پایینتر بودن تاثیر زیست محیطی ایجاد شده توسط این فرآیند است.

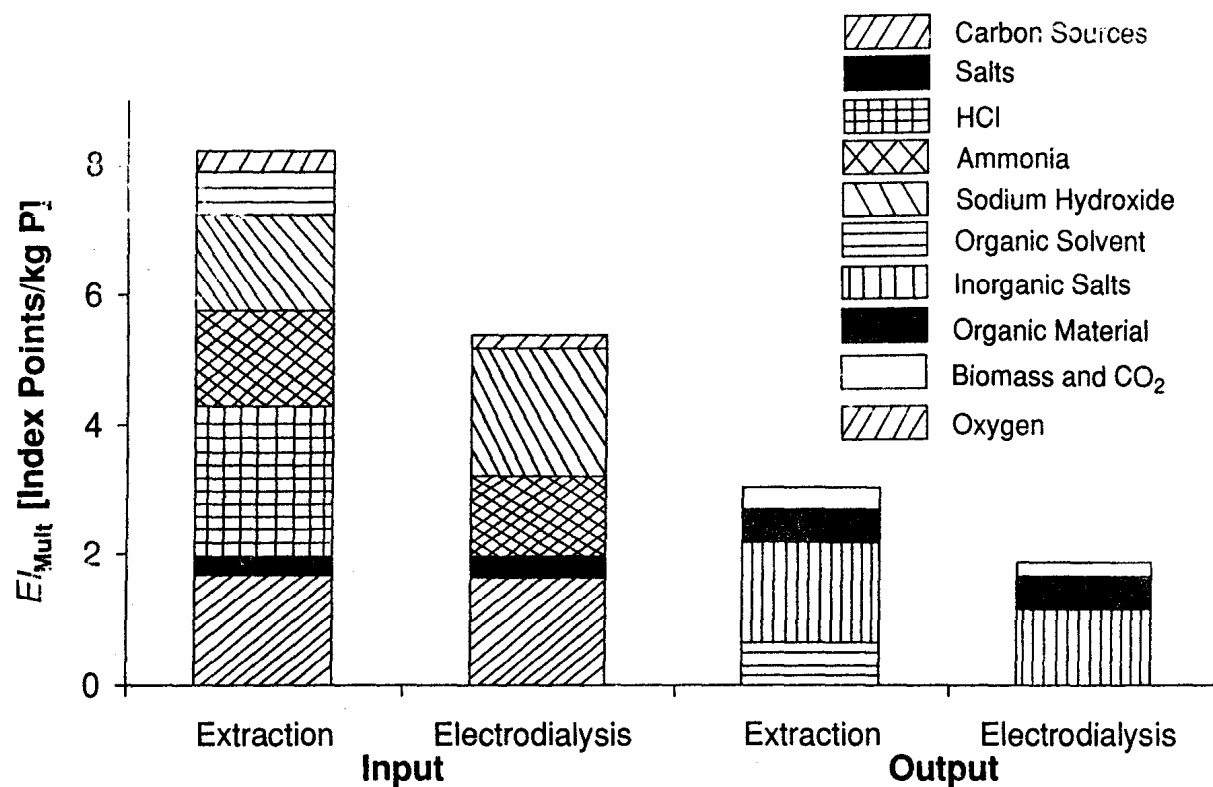


Figure 6.4 EI_{Mult} of the output components of the two alternative processes for the production of pyruvic acid. BM = biomass (dry cell weight)

پایان

فرايند توليد اسيد پيرويك


Pyruvic Acid

1 μm





ارزىابى اقتصاىى



فرآیند استخراج با حلال در مجموع به ظرفیت سرمایه‌گذاری
۸۵ میلیون دلار احتیاج دارد، در حالی که تخمین زده شده
است که مجموع ظرفیت سرمایه‌گذاری در فرآیند تجزیه
الکتریکی برابر با ۶۰ میلیون دلار است.



گراںقیمتترین تجهیزات واحدها

در فرآیند الکترودیالیز:

n بیوراکتورها،

n متبلورکنندهها

n واحدهای تجزیه الکتریکی



گرانقیمتترین تجهیزات واحدها

در فرآیند استخراج با حلال :

n استخراج کننده P-32

n بازگردانی حلال



اختلاف بین فرآیندها ناشی از:

هزینه کمتر تجزیه الکتریکی و واحدهای فرافیلتراسیون
در فرآیند الکترودیالیز

در مقایسه با

هزینه‌های مربوط به استخراج کننده بازگردانی حلال و تبادل
کننده‌های یونی (ion exchanger)

در فرآیند استخراج با حلال

می‌باشد.



نتیجہ گیری



محاسن روش الکترو دیالیز نسبت به تجزیه الکتریکی بر مبنای
مدل انتخاب شده :

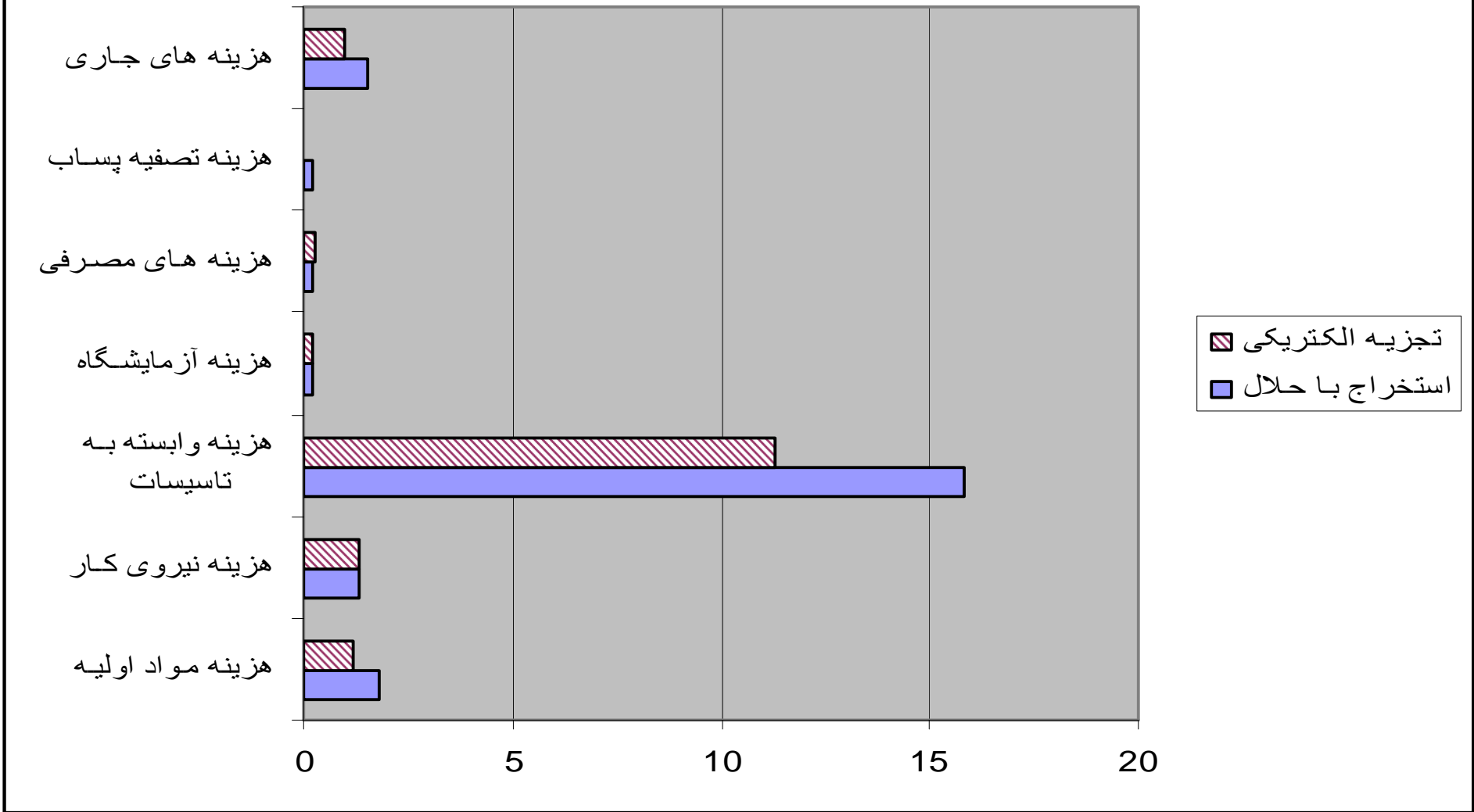
n آثار زیست محیطی کمتری ناشی از مواد استفاده شده

n مصرف انرژی کمتر

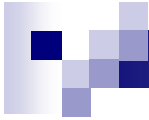
n میزان سرمایه گذاری لازم کمتر

n میزان هزینه تولید (UPC) کمتر

هزینه های عملیاتی سالیانه (میلیون دلار)



شکل 6.5 میزان تخصیص هزینه های سالیانه برای استخراج با حلال و تجزیه الکتریکی




مقایسه هزینه تولید پیروویک اسید توسط روشهای :

شیمیایی ، تخمیری ، آنزیمی

Table 6 Cost comparison for the production of pyruvate by chemical, fermentation and enzymatic conversion methods^a

Chemical method ^b				Fermentation method ^c				Enzymatic conversion method ^d			
Material	Price (\$/ton)	Consumption (ton/ton pyruvate)	Cost (\$/ton)	Material	Price (\$/ton)	Consumption (ton/ton pyruvate)	Cost (\$/ton)	Material	Price (\$/ton)	Consumption (ton/ton pyruvate)	Cost (\$/ton)
Tartaric acid	1,500	3.33	5,000	Glucose	450	1.9	855	Lactate	2,100	1.1	2,300
KHSO ₄	730	5	3,650	NH ₄ Cl	150	0.1	15				
				K ⁺ , Mg ²⁺	500	0.04	20				
				Vitamin			20				
				NaOH (30 w/v%)	50	1.5	75				
				H ₂ SO ₄	50	0.6	30				
				Extraction solvent	600	0.4	240				
Total cost (\$)			8,650				1,255				2,300



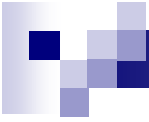
مدل بیوراکتور برای تولید اسید پیروویک



اسید پیروویک در یک بیوراکتور، از گلوکز با استفاده از

Escherichia col:YYC202ldhA::Kon

تولید می‌شود. فرآیند تخمیر بصورت خوراک‌دهی ناپیوسته
تکراری، با ۴ چرخه انجام می‌شود.



n چرخه اول شامل رشد بیومس (biomass) و شکل‌گیری محصول می‌باشد.

n در انتهای هر چرخه، بخشی از مایع تخمیر شده، خارج می‌شود. ولی بیومس (biomass) در راکتور باقی می‌ماند، که با محیط کشت جدید مجدداً پر می‌شود.

n در سیکل‌های ۲ تا ۴، استات بیشتری اضافه نمی‌شود و اسید پیروویک توسط باقی‌سلول‌ها تولید می‌شود.

n برای مدل‌سازی بیوراکتور، چرخه‌های ۲ تا ۴ با یکدیگر جمع شده‌اند.

۱ سیکل (۱)

- n داده‌های معلوم توسط آزمایشات عبارتند از:
- n حجم بیوراکتور آزمایشگاهی: در ابتدا $2/5$ L و در انتها $3/78$ L.
- n حجمی از نمونه که در طی چرخه ۱ خارج می‌شود: 260 mL.
- n زمان واکنش بیوشیمیایی: 13 ساعت.
- n استات اضافه شده: 2550 C-mmol.
- n CO_2 تولید شده: 423 mmol.
- n گلوکز مصرفی
- n اسید پیروویک: غلظت نهایی: 458 ؛ بازده: $1/46$.
- n بیومس (biomass): غلظت ابتدایی: $0/11$ و غلظت نهایی: $16/4$.
- n غلظت نهایی: گلوکز: $3/5$ و استات: 38 mmol ($2/3$).

علاوه بر این، فرض‌هایی نیز صورت گرفته است:

- n آمونیوم، عناصر جزئی، و دیگر ذرات واسطه، به مقدار کافی در طی واکنش وجود دارند.
- n مصرف شدن نیتروژن و فسفر در این مدل در نظر گرفته شده است، در حالی که مصرف شدن عناصر جزئی، برای ساده‌سازی در نظر گرفته نشده است.
- n از تشکیل فومارات، گلوتامات و آلانین صرف نظر شده استف چون که آنها کمتر از ۱٪ موازنه کربن را شامل می‌شوند.
- n حجم نهایی مایع تخمیر شده، بعد از چرخه ۱ برابر با $m^3 37/1$ می‌باشد (حجم ابتدایی $m^3 24/6$). برای تنظیمات داده شده شرایط منجر به حجم نهایی $m^3 50$ بعد از چرخه ۴ می‌شود.

علاوه بر این، فرض‌هایی نیز صورت گرفته است:

n موازنه کربن کاملاً دقیق نیست. تعدادی از محصولات جانبی، بوضوح در طی فرآیند تخمیر تشکیل می‌شوند که در جزئیات، اندازه‌گیری و مشخص نمی‌شوند. اتم‌های کربنی که به اسید پیروویک، بیومس (biomass)، دی اکسید کربن و گلوکز استفاده نشده اختصاص ندارند، تحت عنوان «بقایای آلی» خلاصه می‌شوند. ترکیبات متوسط بقایای آلی، مشابه با گلوکز فرض می‌شود. برای حجم نهایی m^3 ۳۷/۱، موازنه کربن در جدول 6-A1 نشان داده شده است.

Table 1 Kinetic equations used for description of biomass growth and product formation in the developed models

Model	Biomass growth	Product formation
1	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A}$	$r_P = \alpha \cdot \mu + \beta$
2	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A}$	$r_P = r_{P,\max} \cdot \frac{c_P}{\left(K_P + c_P + \frac{c_P^2}{K_I}\right)}$
3	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A} \cdot \left(1 - \frac{c_P}{c_{P,\max}}\right)^n$	$r_P = \alpha \cdot \mu + \beta$
4	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A} \cdot \left(1 - \frac{c_P}{c_{P,\max}}\right)^n$	$r_P = r_{P,\max} \cdot \frac{c_P}{\left(K_P + c_P + \frac{c_P^2}{K_I}\right)}$
5	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A} \cdot \frac{K_P}{(c_P + K_P)}$	$r_P = \alpha \cdot \mu + \beta$
6	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A} \cdot \frac{K_P}{(c_P + K_P)}$	$r_P = r_{P,\max} \cdot \frac{c_P}{\left(K_P + c_P + \frac{c_P^2}{K_I}\right)}$
7	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A}$	$r_P = \alpha \cdot \mu + \beta$
8	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A}$	$r_P = r_{P,\max} \cdot \frac{c_P}{\left(K_P + c_P + \frac{c_P^2}{K_I}\right)}$
9	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A} \cdot \frac{K_P}{(c_P + K_P)}$	$r_P = \left(\alpha \cdot \frac{dc_X}{dt} + \beta \cdot c_X\right) \cdot \left(1 - \frac{c_P}{c_{P,\max}}\right)$
10	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_A}{K_S^A + c_A + \frac{c_A^2}{K_I}}$	$r_P = \alpha \cdot \mu + \beta$

$$r_G = \frac{\mu}{Y_{X/G}} \quad (1)$$

$$r_A = \frac{\mu}{Y_{X/A}} \quad (2)$$

$$Y_{X/G} = \frac{Y_{X/G, \max} \cdot \mu}{Y_{X/G, \max} \cdot m_G + \mu} \quad (3)$$

$$Y_{X/A} = \frac{Y_{X/A, \max} \cdot \mu}{Y_{X/A, \max} \cdot m_A + \mu} \quad (4)$$

$$\frac{dc_X}{dt} = -\frac{q_V}{V} \cdot c_X + \mu \cdot c_X \quad (5)$$

$$\frac{dc_G}{dt} = -\frac{q_V}{V} \cdot c_G + \frac{q_{VG}}{V} c_{G,0} - r_G \cdot c_X - r_P \cdot c_X \quad (6)$$

$$\frac{dc_A}{dt} = -\frac{q_V}{V} \cdot c_A + \frac{q_{VA}}{V} c_{A,0} - r_A \cdot c_X \quad (7)$$

$$\frac{dc_P}{dt} = -\frac{q_V}{V} \cdot c_P + r_P \cdot c_X \cdot Y_{P/G} \quad (8)$$

$$\frac{dV}{dt} = q_{VG} + q_{VA} = q_V \quad (9)$$

Table 2 Kinetics used for description of biomass growth and product formation in the developed models. Microbial specific growth rate approaches: multiple substrate Monod kinetics [17, 18, 19], growth inhibition by product formation according to the Levenspiel [20], growth inhibition by product formation described by the Jerusalemsky [21], Monod kinetics and acetate growth inhibition described by Andrews kinetics [22]. Product formation

kinetics: product formation based on the Luedeking–Piret [23], product formation according to the Michaelis–Menten equation for non-competitive inhibition with product [24] and product formation and product inhibition described by the modified Luedeking–Piret equation together with the Levenspiel term (L–P Levenspiel)

Model	Biomass growth					Product formation		
	Multiple substrate Monod	Levenspiel	Jerusalemsky	Monod	Andrews	Luedeking–Piret	Michaelis–Menten	L–P Levenspiel
1	+					+		
2	+						+	
3		+				+		
4		+					+	
5			+			+		
6			+				+	
7				+		+		
8				+			+	
9			+					+
10					+	+		

طبق تعریف ” قضاوت انتخاب مدل (MSC) ”
عبارت است از :

$$MSC = \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (Y_{obs_i} - \bar{Y}_{obs})^2}{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (Y_{obs_i} - Y_{cal_i})^2} \right) - \frac{2 \cdot p}{n}$$

مقادير " قضاوت انتخاب مدل (MSC) " براي مدل هاي مختلف

Table 3 Residual sum of squares and model selection criterion (MSC) for different models

Model	Residual sum of squares	MSC
1	$3.97 \cdot 10^2$	2.18
2*	$1.15 \cdot 10^3$	1.09
3	$5.58 \cdot 10^2$	1.82
4*	$1.39 \cdot 10^3$	0.88
5	$2.46 \cdot 10^2$	2.68
6	$8.37 \cdot 10^2$	1.39
7	$2.06 \cdot 10^2$	2.59
8	$4.31 \cdot 10^2$	2.14
9	$1.99 \cdot 10^2$	2.77

*Negative values of estimated parameters.