

# Capitolulul unu

## INTRODUCERE

*Studiul bioprocесelor pune in evidenta legatatile ce stau la baza evolutiei sistemelor vii. Astfel, in prima parte a acestui capitol vor fi analizate diversele tipuri de bioprocесe (in special cele aerobe), principalii parametri ai acestora, ca si elementele ce stau la baza metabolismului celular. In partea a doua vor fi prezentate cele mai importante tipuri de bioreactoare cu particularitatile lor, impreuna cu principiile ce stau la baza corelarii lor cu diverse tipuri de bioprocесe. In sfarsit, in finalul acestui capitol sunt trecute in revista sistemele de masura a parametrilor de bioprocес, modalitatile de structurare a informatiei si posibilitatile de consonantare a acesteia.*

### 1.1. BIOPROCESE

Bioprocesele sunt transformari complexe, dirijate, ale unor substante chimice anorganice / organice sau ale materiilor prime complexe de origine organica, prezente in mediul de cultura (amestec de reactanti, prin analogie cu sinteza chimica), in produse de interes economic (Moser, 1985).

Aceste transformari (conversii) reprezinta un ansamblu de reactii biochimice (metabolice) efectuate de celule vii. Celulele realizeaza aceste conversii atat pentru a obtine metaboliti (substante necesare sintezei componentelor celulare) cat si pentru asigurarea energiei utilizate in cresterea si mentinerea lor ca fiinte vii. In acelasi timp, conform cerintelor specifice proceselor biotehnologice, celulele sunt dirijate sa efectueze, pe langa propria lor crestere (multiplicare) si transformarea unor substante prezente in mediu, in produse utili (Levean, Bonix, 1984).

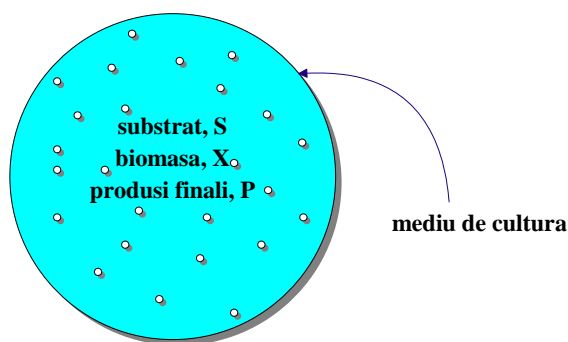


Figura 1.1.1 Conceptia despre bioproces

Astfel, substratul este transformat de catre celule fie in structuri noi (pe un ciclu crestere - dezvoltare - multiplicare celulara), fie/si in substante utile (ciclu de tip biotransformare / biosinteza) (Nagai, 1979).

Exista situatii in care din punct de vedere al transformarii intereseaza numai celulele, dar in majoritatea cazurilor se urmareste acumularea produsilor de metabolism (P). Astfel, la nivel de macrosistem, bioprocesul

poate fi apreciat ca un ansamblu al transformarilor ce au loc in mediul de cultura (transformari ce reprezinta o insumare a modificarilor complexe ce au loc in interiorul fiecărei celule / microsistem). Produsele rezultate se pot acumula fie in mediul de cultura (produsi extracelulari), fie in interiorul celulelor (produsi intracelulari), acestia din urma trebuind sa fie extrasi (separati) ulterior din celule.

Principalele bioprocese de importanta economica pot avea loc:

- in prezenta oxigenului drept componenta de mediu (substrat): **procese aerobe**, d.e. obtinerea aminoacizilor si a enzimelor;
- in lipsa oxigenului: **procese anaerobe** sau fermentatii propriu-zise, d.e. obtinerea alcoolului etilic (in vin - fermentatie alcoolica, obtinerea branzeturilor - fermentatie lactica)

In cele ce urmeaza vor fi prezentate principalele caracteristici ale **bioproceselor aerobe**, acestea caracterizandu-se prin reactii biochimice complexe, *ipso facto* impunandu-se necesitatea unor sisteme evolute de conducere.

Efactorii bioproceselor aerobe sunt celulele vii. Din punct de vedere biologic, acestea pot fi de mai multe tipuri: celule de microorganisme, celule vegetale sau celule animale, in cadrul unui bioproces utilizandu-se un singur tip de celule capabile sa realizeze complexul de reactii biochimice specifice obtinerii produsului avut in vedere. Astfel, microorganismele sunt celule vii de mici dimensiuni (0,5 - 10 $\mu$ ) care pot evolua individual in medii de cultura, fiind capabile de mecanisme metabolice versatile si avand in general sisteme asexuate de inmultire (multiplicare prin diviziune).

Substantele din interiorul oricărei celule vii, responsabile de efectuarea transformarilor metabolice ale componentelor de mediu, cu

rol de biocatalizator în cadrul bioprocesului, sunt **enzimele** (Levean, Bonix, 1984). Enzimele sunt substanțe proteice complexe, prezentând grupări chimice cu rol activ în cataliza biochimică și cu o geometrie spațială în vederea cuplării cu substraturile în timpul biotransformărilor efectuate. **Substratul** (substraturile) unei enzime reprezintă substanța (substaturile) pe care enzima o (le) transformă în produs în etapa (reacția) metabolică specifică.

Metabolismul celular reprezentat global sub denumirea de **bioproces** implică transformarea componentelor inițiale de mediu într-un produs principal și în alte produse secundare (Kingsburg, 1989). El cuprinde etape metabolice specifice celulei cultivate, la fiecare etapă acționând enzima caracteristică ce transformă produsul intermediar devenit substrat într-un alt produs intermediar, până la parcurgerea întregului lanț de reacții ce intervin între substaturile inițiale și produsele finale.

Enzimele sunt biosintetizate de celule, fiind prezente în mediul intra- sau extra-celular, în funcție de mediul în care poate avea loc atacul substraturilor în condiții corespunzătoare. De aceea, enzimele sunt eliminate de celulă în mediul de cultură ca urmare a atacului substraturilor cu moleculă mare (enzime extracelulare) sau acționează în interiorul celulei, în citoplasma (enzime intracelulare) pentru transformarea substraturilor cu moleculă mică (ce pot penetra ușor membrana celulară). Bioprocesele au loc în *mediul de cultură*, soluții apoase în care sunt amestecate substaturile ce urmează a fi preluate și transformate de către celule, ele însele parte a amestecului.

Din punct de vedere *fizic*, mediul de cultură se compune din următoarele faze (Moo Young, 1985):

- **faza solidă:** celulele și componentele insolubile din mediu;
- **faza lichidă:** apă în care sunt dizolvate substaturile solubile;

- **faza gazoasă:** aerul (oxigen, bioxid de carbon) și alte gaze.

Compoziția chimică elementară a celulelor constă în principal din: carbon, hidrogen, oxigen, azot, fosfor, precum și alte elemente în cantități foarte mici (microelemente): sodiu, potasiu, magneziu, calciu, mangan, fier, etc (Moo Young, 1985).

În aceste condiții, mediul de cultură (Bocker, Recknagel, 1983) trebuie să conțină toate aceste substanțe care asigură celulei aportul de elemente chimice din compoziția ei. Astfel, mediul de cultură are în primul rând un rol nutritiv, fiind sursa de materii prime pentru sinteza componentelor celulare necesare creării de noi celule și în același timp, de sursă de obținere a energiei necesare creșterii celulare și de menținere a culturii de celule ca organism viu. În al doilea rând, mediul de cultură conține și substaturile ce vor fi transformate de către enzimele celulare, în cadrul secvențelor metabolice specifice, în produsele (metabolitii) a căror biosinteză constituie scopul avansării bioprocesului.

Prin urmare, componentele de bază ale mediului de cultură (substraturile) sunt fie substanțe organice și anorganice, fie amestecuri complexe ale acestora și reprezintă (Aiba *et al.*, 1973):

- *sursă de carbon și energie:* glucoza, zaharoza și fructoza, celuloze, alcoolii inferiori, n-parafine;
- *sursă de azot:* saruri anorganice de azot (azotati, azotiti, saruri de amoniu), substanțe organice complexe cu azot prezent în aminoacizi, peptide, proteine (extract de porumb, hidrolizat, autolizat de drojdie, extract de drojdie, etc.);
- *sursă de fosfor:* fosfați;
- *sursă de oxigen pentru bioprocese aerobe:* aer, aer îmbogățit în oxigen, oxigen sub presiune;
- *sursă de bioxid de carbon sub presiune pentru metabolismul celulelor animale;*
- *sursă de metale ca microelemente:* saruri anorganice în cantități foarte mici.

Evident, in cazul oricarui bioproces (dar mai ales in cazul sistemelor inchise), compozitia initiala a mediului evolueaza pe parcursul acestuia, in sensul scaderii / cresterii unor componente.

Bioprocesele se desfasoara in instalatii specifice (eprubete, baloane, bioreactoare) in care substratele prezente in mediul de cultura sunt transformate de catre celulele vii in noi celule, produsi de biosinteza (metaboliti) si energia necesara desfasurarii acestor transformari. Se poate afirma deci, ca ansamblul *celule - mediu - instalatie de bioproces* defineste un **biosistem** caracterizat prin gradul extrem de complexitate al evolutiei interdependentelor (Moser, 1985).

Pentru ca evolutia bioproceselor sa aiba loc cu randamente ridicate in fabricarea de produsi utili, este necesar sa fie stabilite nivelele optime ale principalilor parametri bio-fizico-chimici ce caracterizeaza conditiile de cultivare (Atkinson, Mavitema, 1985, Kompen, Seduberg, 1985). Aceste nivele optime trebuie mentinute sau determinate sa varieze in timpul bioprocesului conform unor curbe prestabilite, in functie de cerintele metabolice ale tipului de celula si a principiilor de cultivare aplicabile fiecarui caz in parte.

Principalii parametri de cultivare sunt (Brauer, 1985, Schugerl, 1985, Blenke, 1985, Schugerl, Sittig, 1987):

- a) **temperatura** (T): se mentine constanta in timpul unui bioproces, dar poate varia (pentru diferite tipuri de cultivari) in domeniul 20°C - 40°C;
- b) **presiunea** (p): este de asemenea mentinuta constanta in timpul avansarii procesului; domeniul general de variatie se situeaza in domeniul 0 - 0.5 atm. (o atmosfera in cazuri speciale);
- c) **agitarea** (n) (utilizata numai in cazul bioreactoarelor cu agitare mecanica) si **aeratia** (Q): variaza in cazul oricarui

proces aerob, conform unei curbe optime;

- d) **pH**: variaza in timpul unui bioproces conform unei curbe caracteristice; in general celulele vii suporta pH-uri in domeniul 3-10;
- e) **nivelul oxigenului dizolvat** ( $pO_2$ ): reprezinta un parametru de baza pentru bioprocesele aerobe (se masoara % concentratie de saturatie  $mg\ O_2/L$  mediu sau ppm) si evolueaza in cadrul fiecarui bioproces conform unei curbe optime prestabilite;
- f) **rH**: reprezinta potentialul redox al culturii fiind utilizat mai ales in cultivarile microbiene sau cu celule animale; acest parametru variaza de asemenea conform unor curbe caracteristice si se masoara in mV;
- g) **cantitatea de caldura consumata/eliminata in unitatea de timp**;
- h) **nivelul spumei**: este masurat prin metode diferite, stabilindu-se un nivel maxim admisibil al acesteia; in functie de tipul reactorului, combaterea spumarii poate fi facuta pe cale chimica sau mecanica;

Evolutia bioprocesului poate fi caracterizata de asemenea printr-o serie de marimi specifice (Charles, 1985):

- a) **concentratia substratului principal** - sursa de carbon si energie a cultivarii, S: se masoara in g/L sau %;
- b) **concentratia celulara** (biomasa) - X: se masoara in g/L;
- c) **concentratia produsului de biosinteza** - P: se masoara in unitati de concentratie specifice tipului de produs avut in vedere.

Concentratia substratului, S, poate fi determinata prin metode analitice specifice substantelor respective, fie on-line (mai rar, datorita specificitatii senzorilor), fie off-line (prin probe de mediu supuse analizei chimice la intervale regulate de timp). Exista si cazuri in care informatiile calitative asupra evolutiei substratului sunt obtinute din variatia caracteristica a unor parametri de cultivare

(d.e. epuizarea substratului corespunde anularii efectului exoterm al cultivării sau micșorării consumului oxigenului dizolvat).

Concentrația celulară,  $X$  (Kossen, 1994) se determină fie prin numărare de celule, fie prin calcularea substanței umede sau a substanței uscate (masă solidă cântărită după centrifugarea unui volum determinat de mediu pentru substanța umedă; aceeași masă solidă este uscată la  $110^{\circ}\text{C}$  și cântărită, obținându-se substanța uscată). Aceste determinări sunt realizate off-line, dar citirea densității optice (DO) la un spectrofotometru ca măsură a creșterii celulare se poate face și on-line prin intermediul turbidimetrelor de bioproces.

Concentrația produsului final,  $P$ , este determinată în general off-line prin tehnici analitice specifice, în afara de cazul când produsul urmărit este însăși biomasa  $X$ , a cărei concentrație se stabilește conform metodei prezentate anterior.

O condiție de bază a lansării optime a unui bioproces o reprezintă asigurarea sterilității (în mediul de bioproces trebuie să existe și să evolueze numai cultura de celule care produce transformarea studiată) (Winkler, 1983). Sterilizarea poate fi realizată pe cale termică, chimică sau cu radiații, toate intervențiile ce mai au loc pe parcursul bioprocesului efectuându-se numai în condițiile în care poate fi asigurată protecția la contaminare a biosistemului.

În cultivările discontinue (batch), în sisteme închise față de exterior și similare condițiilor naturale de viață a celulelor, substratul prezintă o concentrație inițială ridicată, tinzând, pe parcursul cultivării, să se epuizeze în timp, în paralel acumulându-se produși toxici de metabolism. Epuizarea substratului și acumularea produsilor de metabolism determină îmbătrânirea culturii, care-și stopează astfel creșterea și prezintă apoi, treptat, tot mai multe celule ce mor și suferă fenomenul de descompunere (liza) celulară

(Kargi, 1985). Astfel, cultura batch trece printr-o serie de faze intermediare caracteristice oricărui proces cu celule vii (cf. fig. 1.1.2) (Moser, 1985):

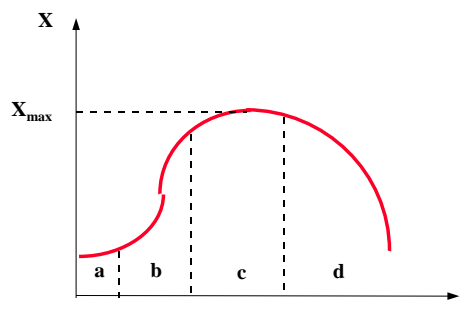


Figura 1.1.2 Reprezentarea standard a unei culturi batch

- faza de lag:** faza de adaptare a culturii la complexitatea noilor condiții de mediu;
- faza exponențială (logaritmică) de creștere:** caracterizată prin viteză constantă și ridicată de dezvoltare a culturii;
- faza staționară:** cultura își micșorează viteză de creștere datorită quasi-consumării substratului și acumulării metaboliților toxici;
- faza de declin:** diviziunea celulară încetează, crescând în schimb viteză de descompunere a celulelor.

În această evoluție, tipică oricărei culturi în sistem închis, este necesar a fi puse în evidență o serie de fenomene caracteristice proceselor viului, ajungându-se la definirea unor concepte importante în conducerea bioprocesului (Kobayashi, 1972):

- conceptul de inhibiție/limitare (I):** peste o anumită concentrație limită (diferită de la o cultură la alta), substratul devine inhibitor; orice substrat este deci limitator de creștere pentru culturile de celule cărora le constituie sursa nutritivă. De asemenea, metabolismul celular poate fi inhibat și prin depășirea concentrației produsilor de biosinteză (inhibiție prin exces de produs);

- b) **conceptul de produs asociat / neasociat cresterii** (Chisti, 1989): in general, in faza exponentiala, se biosintetizeaza un produs asociat cresterii; este cazul obtinerii proteinelor intracelulare pentru asa-numitele *proteine unicelulare* (SCP). Atunci cand viteza de acumulare a produsului este maxima dincolo de faza exponentiala (in timpul fazei stationare), se poate considera ca este sintetizat un produs neasociat cresterii.

Din punct de vedere al modurilor de cultivare (Chisti, 1989), bioprocesele pot fi:

- a) *discontinue* (batch): bioprosesul evolueaza inchis fata de exterior;
- b) *fed-batch* (discontinuu cu alimentare cu substrat): realimentarea mediului de cultura cu substrat se face pe parcurs, in urmatoarele moduri:
- intermitent, in portii;
  - continuu: se adauga substratul cu o viteza identica cu viteza lui de consum astfel incat este mentinuta constanta concentratia substratului in timpul cultivarii;
- c) *semicontinuu*: dupa o perioada de cultivare discontinua (cand viteza de formare a produsului sau cresterea celulara este incetinita si din cauza acumularii unor metaboli secundari toxici) se recolteaza o fractiune de mediu cu celule si se inlocuieste cu un acelasi volum de mediu proaspat;
- d) *continuu* (Bliem, Katinger, 1988), Prokop, Rosenberg, 1989): presupune realizarea si mentinerea culturii in regim

stationar pe perioade cat mai mari de timp.

Este evident ca orice proces continuu debuteaza cu o etapa batch (sau fed-batch) pana la atingerea starii optime pentru variabilele de proces S, X, P (Tolbert *et al.* 1982). Se cunosc doua sisteme de cultivare continua (Chisti, 1989):

1. sistemul **chemostat**: este urmarita mentinerea constanta a concentratiei substratului in mediu prin asigurarea ratei corespunzatoare de alimentare cu substrat. Acest sistem de cultivare se caracterizeaza prin stabilitate interna, dar cu sensibilitate crescuta la perturbatii externe (variatii ale parametrilor de cultivare sau ale compozitiei mediului). Sistemul chemostat reprezinta o aplicatie performanta a conceptului de substrat limitator de crestere;
2. sistemul **turbidostat**: se bazeaza pe determinarea on-line a evolutiei concentratiei celulare X, asigurandu-se alimentarea corespunzatoare cu substrat in functie de sensul si marimea variatiei acesteia in jurul marimii de optim. Este un sistem stabil intrare / iesire, asigurandu-se un *continuu biologic* mai putin perfect, dar robust la perturbatii.

In afara acestor modalitati de cultivare, exista si cazuri de bioprocese la care, pentru obtinerea unui produs util, se utilizeaza un timp cai metabolice conjugate (conform unei secventieri bine controlate) sau se cultiva concomitent doua sau mai multe microorganisme (Scugerl, 1985).

## 1.2. BIOREACTOARE

### 1.2.1. Caracteristici generale

Problemele specifice bioprosesului aerob sunt corelate cu conceptia despre **bioreactor**,

instalatia in care cerintele cultivarii trebuie satisfacute la un nivel performant. Importanta bioreactorului pentru realizarea, dezvoltarea si operarea biosistemului reiese si din faptul

ca, în funcție de performanțele acestuia, sunt luate în considerare problemele pregătirii mediului de cultură și a inoculului, dimensionarea utilitatilor, sistemele de separare/purificare a produsilor finali, ca și complexitatea structurii de control a procesului, necesare reproducerii tehnologiilor optime de cultivare (Chisti, 1989).

Indiferent de tipul de celulă, bioreactorul trebuie să asigure în primul rând un bun contact între cele două subsisteme componente: **faza biotică** și **faza abiotică** (Levean, Bonix, 1984). Evoluția optimă a bioprocesului depinde de realizarea unui transfer nelimitativ de nutrienți de la mediu la celulele de cultură ca și de transferul eficient de produse de metabolism de la aceste celule înapoi în mediu. Transferul de masă este în corelație directă cu gradul de omogenizare a componentelor de mediu și a celulelor, fiind necesară minimizarea *zonelor moarte*, unde are loc scăderea ratei de creștere celulară și de biosinteză (și chiar intrarea celulelor în descompunere din lipsa de nutrienți).

Hidrodinamica reactorului, dependentă de geometria acestuia, de parametrii funcționali și de caracteristicile fizico-chimice ale ansamblului mediu+celule, influențează la rândul ei transferul de masă și de energie ca și eficiența amestecării (Chisti, 1989).

În bioprocesele aerobe, oxigenul este cel mai puțin solubil nutrient introdus în mediu și poate deveni frecvent substrat limitativ de creștere (prin epuizarea cantității transferate în faza lichidă). Concentrația critică de oxigen (care reprezintă cantitatea minimă de oxigen în faza lichidă ce nu limitează creșterea), este, pentru celulele de microorganisme, în domeniul de  $9.6 \cdot 10^{-5}$  -  $16 \cdot 10^{-3}$  kg/m<sup>3</sup> (Bailey, Ollis, 1977). În timp ce solubilitatea oxigenului în mediile de cultură (la presiunea și temperatura ambiantă) este de numai  $8 \cdot 10^{-3}$  kg O<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>, iar rata maximă a consumului de oxigen variază în

intervalul  $2 \cdot 10^{-4}$  -  $3 \cdot 10^{-3}$  kg O<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> s, se poate demonstra că, evoluând în sistem închis, o cultură de microorganisme poate epuiza tot oxigenul dizolvat în faza lichidă inițial saturată în cca. 2 - 45 s, în raport cu tipul de celulă. În aceste condiții, rata ridicată a consumului de oxigen trebuie cel puțin egalată de rata transferului interfazic al acestuia, pentru a nu provoca inhibiția dezvoltării celulare.

De asemenea, în bioreactoare trebuie să se realizeze un transfer eficient de căldură de la mediu la celule (în faza de lag a cultivării, care este endotermică), dar în special de la celule la mediu, concomitent cu eliminarea căldurii produse în biosistem în timpul celorlalte etape de cultivare (etape exoterme), avându-se în vedere necesitatea menținerii culturii la o temperatură optimă - condiție importantă pentru evoluția normală a bioprocesului (Moser, 1985).

O altă condiție impusă bioreactoarelor (în comparație cu reactoarele chimice) o reprezintă necesitatea asigurării sterilității, în special în cazul bioprocесelor continue de lungă durată și a cultivărilor de celule vegetale și animale, cu cicluri lungi de dezvoltare (Schugerl, 1985).

Starea fluidelor din bioreactor poate complica suplimentar fenomenele de amestecare și transfer de masă (Schugerl, 1981). Dacă prezenta în mediu a majorității celulelor de bacterii și drojdii conferă suspensiei un comportament de curgere newtoniană, în cazul unor drojdii, a majorității ciupercilor microscopice, a biosintezei biopolimerilor sau a cultivării unor celule vegetale și animale la densități celulare mai ridicate, suspensiile solide sunt ne-newtoniene, creîndu-se probleme majore în ceea ce privește omogenizarea mediului de cultură. Necesitatea introducerii unor sisteme de amestecare de mare eficiență vine deseori în contradicție cu o altă limitare impusă hidrodinamicii bioreactorului de către unele

tipuri de celule. Astfel, sistemele eficiente de amestecare (in special modulele mecanice) pot produce nivele ale fortelor de forfecare intolerabile pentru celulele fragile mecanic - micelii de ciuperci, celule vegetale si animale lipsite de perete celular intreg.

In concluzie, un bioreactor trebuie sa ofere in general asemenea conditii celulelor de cultura incat acestea sa realizeze optimal biotransformarea avuta in vedere.

Realizarea unui bioreactor implica atat studiul geometriei acestuia cat si a caracteristicilor functionale pe un prototip de mica capacitate. Conceptia despre bioreactor are in vedere respectarea conditiilor anterior enuntate, in concordanta cu necesitatile unor anumite tipuri de celule, pentru categorii bine definite de bioprocese (Charles, 1985):

- alegerea tipului de bioreactor in raport cu tipul bioprocesului si stabilirea geometriei optime;
- verificarea prototipului de bioreactor cu bioprocese test, de dinamica cunoscuta;
- stabilirea unui criteriu judicios de ridicare la scara;
- realizarea bioreactorului pilot si apoi a liniei industriale.

Stabilirea geometriei optime a bioreactorului se realizeaza in ultima instanta in functie de caracteristicile bioprocesului.

In acest sens este necesar sa se determine in primul rand corelatiile dintre marimile ce caracterizeaza modelul hidrodinamic al bioreactorului si geometria vasului in conexiune cu parametrii functionali ai instalatiei; in acelasi timp va trebui studiat transferul de masa si de energie ca si consumul de putere in functie de acelasi grup de factori - geometria bioreactorului si parametrii functionali (Chisti, 1989). Ulterior vor trebui stabilite caracteristicile bioprocesului considerat, atat din punct de vedere al hidrodinamicii cat si al transferului de masa si energie.

Conform celor enuntate anterior, se poate aprecia geometria bioreactorului corespunzatoare necesitatilor bioprocesului, urmand ca prototipul realizat la scara mica sa fie verificat prin efectuarea bioprocesului respectiv, sau prin realizarea unor bioprocese-test de dinamica cunoscuta si apropiata biosistemului avut in vedere.

Existenta unor gradienti de concentratie si a distributiei complexe a nivelelor marimilor ce caracterizeaza cultivarea in bioreactoarele industriale, poate conduce la modificarea unor indici de performanta ai bioreactorului, fiind necesara in consecinta refacerea unor etape ale studiului tehnologic in instalatiile de mare capacitate sau printr-un studiu de *scaling-down*.

### 1.2.2. Tipuri de bioreactoare

Principal, indiferent de variantele constructive adoptate, se disting doua mari categorii (Moo Young, 1985):

- reactoare cu agitare mecanica;
  - reactoare cu recirculare (pneumatice);
- la care se poate adauga, datorita specificitatii ei, categoria reactoarelor pentru celule vegetale si animale.

#### a) Reactoare cu agitare mecanica

Aceste tipuri de bioreactoare sunt inca cele mai utilizate in cultivarea de bioproc. In general de forma cilindrica, au indicele de suplete mic (raportul  $H$  (inaltime vas)/ $D$  (diametru vas) fiind cuprins intre 1 si 3) si pot asigura conditii optime pentru bioprocese discontinui si continui (Schugerl, 1985) cu diferite tipuri de celule, la care nu apar probleme deosebite determinate de forte de forfecare (care pot atinge nivele insemnate in aceste instalatii).

Bioreactoarele cu agitare mecanica prezinta o flexibilitate deosebita, aceeasi geometrie putand fi adaptata cu un minim de modificari, dar cu alegerea judicioasa a nivelelor parametrilor functionali, pentru realizarea unor bioprocese diferite.



În funcție de aplicațiile specifice se utilizează diferite tipuri de module de agitare (Schugerl, 1985): turbina clasică (cu număr variabil de brate, fiind caracterizată prin eficiența maximă la amestecare, dar și prin consum ridicat de energie și forțe crescute de forfecare), agitator cu palete, agitator tip ancora, agitator tip elice marină. Ultimele tipuri de module de agitare se utilizează mai ales în medii cu vâscozitate redusă sau cu celule fragile la socuri mecanice (Aiba *et al.*, 1973).

Tipul modulului de agitare, viteza agitării și dispunerea agitatoarelor pe axul agitatorului sunt de mare importanță pentru asigurarea omogenizării și a transferului de masă și energie. Aceste caracteristici sunt determinate de funcțiile pe care trebuie să le îndeplinească modulul de agitare (Brauer, 1985):

- transferul de energie către fluid;
- dispersia gazului în lichide;
- separarea gaz - lichid;
- amestecarea componentelor mediului.

Rezultanta condițiilor impuse de aceste cerințe (cu efecte uneori contrare asupra geometriei agitatoarelor) conduce la alegerea unor tipuri de agitatoare și dispunerea lor pe axul motorului după criterii practice de compromis, încă insuficient fundamentate teoretic.

Aerul steril este distribuit în bioreactorul cu agitare mecanică de către un barbotor sau distribuitor de aer, de regulă de forma unui tor cu un număr mare de orificii, de diametru inferior diametrului turbinei și dispus la distanță convenabilă față de aceasta.

Amestecarea eficientă corespunde unui regim turbulent de curgere a mediului, caracterizat prin valoarea ridicată a numărului lui Reynolds al agitatorului ( $N_{Re} \geq 10^2$ ). Acest criteriu adimensional este definit prin relația (Aiba *et al.*, 1973):

$$N_{Re} = \frac{nd^2}{\nu} \quad 1.2.1$$

unde:  $n$  = turatia agitatorului;  
 $d$  = diametrul agitatorului;  
 $\nu$  = vâscozitatea cinematică a fluidului (vâscozitate dinamică/densitate).

#### b) Reactoare cu recirculare (pneumatice)

Principalele tipuri de reactoare cu recirculare sunt:

- reactoare tip air-lift (Chisti, 1989, Schugerl, 1985, Blenke, 1985);
- reactoare coloană;
- reactoare turn (construcție de tip coloană de vase, dispuse în serie pe verticală, asigurându-se astfel circulația între etaje).

Toate aceste reactoare sunt cu circulație internă. Există însă și bioreactoare cu recirculare în buclă externă, pentru o serie de aplicații specifice; în aceste cazuri hidrodinamica și transferul de masă sunt relativ dificil de caracterizat și de optimizat (Schugerl, Siltig, 1987).

Bioreactoarele air-lift cu recirculare internă prezintă față de reactoarele cu agitare mecanică o serie de avantaje. Astfel, ele realizează o amestecare eficientă și un transfer de masă suficient de rapid în condiții de consum moderat de putere, asigurând în același timp menținerea sterilității în condiții mai simple de operare. Caracterizate prin cheltuieli de construcție mai mici și prin mai multă robustețe în exploatare, reactoarele air-lift protejează mai bine celulele fragile mecanic prin nivelul redus al forțelor de forfecare. Pe de altă parte, geometria lor este mai puțin flexibilă în raport cu efectele asupra evoluției diferitelor categorii de bioprocese și de aceea caracterul de *reactor universal* este redus, pentru fiecare bioproces fiind necesară alegerea unui anumit tip de bioreactor, conform unor criterii judicioase a geometriei optime și a parametrilor funcționali adecvați (Chisti, 1989).

În raport cu bioreactoarele tip coloană cu bule, vasele air-lift asigură o amestecare și un transfer interfazic al oxigenului îmbunătățite datorită debitelor mari de aerare care le sunt caracteristice (Chisti, 1989).

Conform unor date de referință, (Kossen, 1994), în bioindustria proceselor aerobe se utilizează în proporție de 93% bioreactoare cu agitare mecanică și de 7% bioreactoare pneumatice (air-lift și coloane cu bule). Această apreciere a fost efectuată luând ca bază de calcul valoarea relativă a produselor obținute în bioreactoarele respective. Se poate considera însă că situația va evolua în viitor, dând câștig de cauză bioreactoarelor pneumatice datorită avantajelor anterior enunțate.

### **c) Bioreactoare pentru celule animale și vegetale**

Datorită condițiilor speciale de bioproces impuse de caracteristicile celulelor vegetale și animale, realizarea bioreactoarelor pentru aceste tipuri de cultură a evoluat ca domeniu distinct de inginerie de bioproces.

În primul rând, din punct de vedere al fiziologiei proprii (Katinger, Scheirer, 1985), celulele vegetale și animale desprinse din complexul funcțional care este țesutul și adaptate să crească sub formă de celule independente în soluție, sunt fragile la socuri mecanice și deci, afectate de nivelul ridicat al forțelor de forfecare și uneori chiar de prezența bulelor de gaz (aer,  $\text{CO}_2$ ).

În plus, dacă celulele animale anormale (provenite din tumori) și celulele vegetale pot fi crescute libere în suspensie, celulele animale normale sunt dependente de ancoraj, fiind cultivate în conglomerate de celule fixate în strat monocelular pe micropurtători. În același timp, limitele parametrilor uzuali de cultivare (agitare, aerare, temperatură, pH, concentrație oxigen dizolvat) sunt mult mai înguste decât pentru microorganisme, ceea ce impune o reglare mai precisă și mai strictă a acestor parametri.

Pentru celulele animale este necesar un substrat nutritiv gazos, alături de oxigen fiind impus și un aport de bioxid de carbon dizolvat, capătând astfel o importanță deosebită sistemul aeratiei de suprafață (transferul amestecului de  $\text{O}_2 + \text{CO}_2$  prin suprafața liberă a mediului).

În aceste condiții, pentru cultivarea celulelor vegetale și animale sunt utilizate în prezent:

- reactoare cu agitare mecanică;
- reactoare pneumatice;
- reactoare tip vibromixer;
- tipuri speciale de bioreactoare.

Reactoarele cu agitare mecanică (Katinger, Scheirer, 1985, Brunswick, 1982, Cheng, Papontsakakis, 1986, Bliew, Katinger, 1988, Prokop, Rosenberg, 1989) au indici de suplete mici și sunt echipate cu agitatoare de tip ancora și elice marine, caracterizate prin nivel redus al forțelor de forfecare sau cu module de agitare de construcție specială, prezentând o geometrie ce protejează celulele de socuri mecanice, dar în același timp determină curenți verticali eficienți în amestecarea mediului. Pe de altă parte, viteza agitatorului rămâne scăzută, chiar dacă nu se asigură un regim turbulent de curgere.

### 1.3. SISTEME DE MASURARE A PARAMETRILOR DE BIOPROCES

Conducerea bioprocесelor impune cunoasterea starii si a evolutiei acestora.

sinteza asupra evolutiei bioprocесului (Shimizu. *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1994).

Sistemele de masurare a variabilelor de bioprocес pot fi clasificate din trei puncte de vedere:

- dupa *tipul de marime masurata*: variabile **fizice** sau **chimice** (i.e. biochimice/biologice) (Aiba *et al.*, 1973, Fiechter *et al.*, 1987);
- dupa *locul si felul cum se realizeaza determinarea*: **in-line**, **on-line**, **off-line** (Linek *et al.*, 1985);
- dupa *modul in care este realizata masurarea*: **direct** sau **indirect**, marimile indirecte obtinandu-se prin prelucrarea informatiilor obtinute in urma masuratorilor directe. Astfel, marimile indirecte devin purtatoare de informatii de

Sistemele de determinare off-line, mult folosite in analiza de flux a bioprocесelor, implica analiza de laborator a unor probe prelevate la intervale regulate de timp (in general determinandu-se evolutia concentratiei unor componente de mediu sau acumularea de produsi utili).

Sistemele in-line au fost realizate in cazurile in care nu pot fi efectuate determinari in interiorul bioreactorului, ca si pentru evitarea sterilizarii instrumentului de masura, uneori imposibil de efectuat. Exista insa si sisteme continue de masura (sau cu perioada mica intre determinari), care pot fi integrate in structura generala de conducere (Anders *et al.*, 1992).

Tabel 1. Clasificarea sistemelor de masura a parametrilor de bioprocес

Sisteme de masura pentru variabile fizice	Sisteme de masura pentru variabile chimice
temperatura	pH
presiune	redox
putere consumata pentru agitare mecanica	oxigen dizolvat
spumare	bioxid de carbon dizolvat
debite de gaze sau lichide	O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> in gazul de iesire
turbiditate (DO)	concentratia sursei de carbon (zaharuri)
vascozitate	concentratia sursei de azot
volumul de lichid	concentratia ionilor de Mg <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , NaFe <sup>3+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
	AND, ARN
	NAD, NADH
	ATP, ADP, AMP

Sistemele on-line, cele mai recomandate în monitorizarea bioproceselor (Sonnleitner, Fiechter, 1992; Schugerl, 1992) preiau continuu informația din bioproces, transferand-o sistemului de conducere.

În general, pentru evaluarea și compararea performanțelor diferitelor sisteme de măsură pot fi luate în considerare  *timpul de răspuns, sensibilitatea, acurately și stabilitatea* acestuia (Polakovic, Mandenius, 1994; Leung *et al.*, 1991). În plus, pentru sistemele on-line utilizate în bioprocese, sunt necesare structuri ce nu interferează cu biosistemul, senzorii fiind sterilizabili termic sau chimic.

În descrierea instrumentelor folosite în măsurarea variabilelor de bioproces (Tabel 1) este adoptată prezentarea sistematică ce are la bază clasificarea lui Aiba (Aiba *et al.*, 1973). Tot Aiba a introdus și conceptul de *gateway sensors* - sisteme de măsură utilizate în stabilirea unor variabile derivate ce caracterizează bioprocesul. Calculul variabilelor complexe, bazat pe măsurarea uzuală a mai multor parametri, se realizează în cadrul sistemului de monitorizare (Tabel 2).

**Tabel 2. Tipuri de marimi calculate în raport cu senzorii utilizați**

Tipul de senzor	Tipul de marime calculată
pH	formarea produsilor acizi
oxigen dizolvat	OTR (viteza de transfer interfazic a oxigenului)
concentrația de oxigen în gazul de ieșire; debite de gaze	OUR (viteza de consum a oxigenului)
concentrația de bioxid de carbon în gazul de ieșire; debite de gaze	CPR (viteza de evoluție a bioxidului de carbon)
OUR; viteza de evoluție a bioxidului de carbon	continutul respiratoriu ( $RQ = OUR/CPR$ )
concentrația sursei de carbon și debitul de alimentare	randamentul și concentrația celulară

### 1.3.1. Marimi măsurabile direct

#### 1.3.1.1. Determinări fizice directe

##### 1.3.1.1.1. Temperatura (Brunswick, 1992)

Determinarea temperaturii este importantă nu numai în raport cu evoluția bioprocesului, dar și pentru alte operații de tip sterilizare, concentrare, purificare. Măsurarea temperaturii se face prin utilizarea termometrelor cu contact (protejate de contactul cu mediul steril de o teacă de

protecție) sau termorezistente, termocupluri, termistoare, în gama de precizie  $\pm 0.1$  °C.

Măsurarea temperaturii în diferite puncte poate fi utilizată și pentru realizarea bilanțului termic.

##### 1.3.1.1.2. Presiunea (suprapresiunea) (Brunswick, 1992)

Masurarea presiunii se realizeaza continuu in domeniul 0.3 - 0.5 atm (suprapresiune de lucru). Manometrele cu diafragma sunt in general utilizate pentru determinarea, suprapresiunii din bioreactor (la sterilizare sau in timpul bioprocesului) sau a presiunii de pe diferitele circuite de alimentare / iesire de fluide, nepunand probleme deosebite din punct de vedere al mentinerii sterilitatii.

#### **1.3.1.1.3. Viteza agitatorului si puterea consumata pentru agitarea mecanica (Brunswick, 1992)**

Masurarea acestor variabile este caracteristica vaselor cu agitare mecanica. Viteza agitatorului se determina direct cu un tahometru instalat pe axul agitatorului. Turatia motorului asigura atat eliminarea gradientilor de concentratie cat si nivelul transferului de oxigen.

Puterea consumata de agitator depinde nu numai de viteza acestuia, dar si de densitatea si vascozitatea mediului de cultura, in special aceasta din urma putand varia mult in evolutia unor bioprocese (d.e. cultivarea de ciuperci microscopice, obtinerea de biopolimeri extracelulari, etc.). Este si motivul pentru care puterea consumata de agitator trebuie determinata la vasele cu agitare mecanica atat in starea initiala a biosistemului cat si in evolutie.

In fermentatoarele mari, determinarea consumului de putere electrica cu wattmetre instalate la nivelul motorului este suficienta, intrucat, desi se obtine puterea totala consumata nu numai pentru agitarea fluidului, dar si pentru invingerea frecarii in lagare, sisteme de etansare, curele, rulmenti, etc., ponderea acestor consumuri pentru depasirea frecarilor este mica. In vasele mai mici inasa, fractia de energie consumata contra frecarii in sistemele de etansare si de antrenare devine importanta si de aceea se face calibrarea masuratorilor sau se efectueaza masuratori cu un dinamometru de

torsiune instalat pe axul agitatorului in interiorul vasului.

#### **1.3.1.1.4. Spumarea (Brunswick, 1992)**

Spumarea reprezinta un fenomen caracteristic mediilor de bioproces, cauzat pe de o parte de compozitia organica complexa a acestora, iar pe de alta parte, de schimbul intens de gaze ce caracterizeaza respiratia microorganismelor in perioadele in care viteza specifica de crestere atinge nivele ridicate. In acelasi timp, pot avea loc degajari insemnate de gaze pentru anumite tipuri de biosinteze/biodescompuneri celulare a unor produsi sau ca urmare a unor metabolisme celulare deviate.

In final, spumarea reprezinta un fenomen daunator, neprevenirea sau necombaterea lui conducand la infectii sau la pierderi de celule si mediu ceea ce poate determina chiar stoparea bioprocesului. In acest sens, actiunea de prevenire este importanta, caci neinterventia in primele momente poate conduce la obtinerea unei spume cu structura stabila (bula de gaz inconjurata de canale de drenaj a lichidului in asezare spatiala), greu de distrus ulterior.

Exista doua procedee de combatere a spumarii - una *meccanica* si alta *chimica*, cu adaos de agenti antispumanti (substante tensioactive ce nu interfera in metabolismul celular). Cantitatile de antispumant adaugate trebuie sa fie reduse, valori mari ale acestora afectand transferul interfazic al oxigenului.

#### **1.3.1.1.5. Debite de gaze si lichide (Brunswick, 1992)**

Masurarile simple de debite de lichide sau de gaze se fac cu ajutorul rotametrelor, debitmetrelor cu presiune diferentiala, cu dispozitive de rotatie sau electromagnetice. Debitmetrele electromagnetice sunt utilizabile in cazul suspensiilor de tip mediu

cu celule, nefiind afectate de variatiile de densitate si vascozitate ale acestora.

Pentru masurarea precisa a debitelor de gaze este folosit debitmetrul cu monitorizarea efectului termic (d.e. Brook thermal mass flowmeter).

#### **1.3.1.1.6. Vascozitatea mediului (Brunswick, 1992)**

Vascozitatea mediului este determinata in general off-line prin intermediul vascozimetrelor cu cilindru rotativ, principalele dificultati tinand de prezenta fazei gazoase ce trebuie eliminata inaintea determinarilor si de faptul ca masurarea trebuie efectuata cu faza solida (celulele) omogen suspendata in mediul de cultura.

#### **1.3.1.1.7. Turbiditatea (DO) (Brunswick, 1992)**

Masurarea turbiditatii (sau a densitatii optice) poate fi considerata ca o metoda fizica pentru determinarea indirecta a concentratiei celulare in mediu. In mod frecvent (si cu o precizie mai mare) densitatea celulara se poate determina off-line (pe baza probelor prelevate la intervale bine definite de timp) prin:

- numararea la microscop a celulelor dintr-un volum bine definit de mediu;
- determinarea substantei uscate a mediului centrifugat prin uscarea pana la masa constanta a depozitului celular obtinut.

Instalatiile moderne sunt prevazute cu turbidimetre (spectrofotometre) on-line cu sistem diferential de masura. In vederea eliminarii erorilor de masurare cauzate de prezenta in mediu a bulelor de gaz, masuratorile se efectueaza intr-o zona relativ saraca in bule a reactorului sau intr-un circuit special realizat (by - pass).

#### **1.3.1.1.8. Volumul de mediu (Brunswick, 1992)**

Determinarile de volum de mediu sunt importante in special pentru procesele de tip fed-batch sau continuu. Sistemele de masura utilizate au la baza fie senzori de nivel pentru lichide, fie senzori de presiune diferentiala sau sisteme de cantarire.

#### **1.3.1.2. Determinari chimice directe**

##### **1.3.1.2.1. pH (Brunswick, 1992)**

Echipamentul de determinare continua a evolutiei pH-ului in cadrul bioproceselor este standartizat, utilizand ca element sensibil un electrod combinat de pH (sticla - Ag). Electrocul este sterilizabil termic sau / si chimic. Sterilizarea termica poate fi realizata impreuna cu vasul gol, datorita unui sistem de compensare a presiunii.

##### **1.3.1.2.2. Potential redox (eH) (Brunswick, 1992)**

In mediul de cultura sunt prezente simultan un mare numar de sisteme redox. De aceea interpretarea datelor obtinute prin masuratori de potential redox este relativ dificila, neputandu-se aprecia cu exactitate cauza ce determina la un moment dat eventualele modificari de potential.

Intrucat in conditii aerobe potentialul redox este esentialmente corelat cu concentratia oxigenului dizolvat in mediu, masuratorile de potential redox sunt recomandate mai ales in bioprocesele anaerobe sau microaerobe, cu observatia ca poate fi determinat doar potentialul redox al mediului, diferit de cel din interiorul celulei.

##### **1.3.1.2.3. Oxigenul dizolvat ( $pO_2$ ) (Brunswick, 1992)**

Cehii Linek si Vacek (Linek *et al.*, 1985) au fost printre cercetatorii care au studiat in profunzime nu numai realizarea electrozilor  $pO_2$ , si dinamica reactiilor electrochimice ce

au loc, dar si interpretarea rezultatelor obtinute in bioprocese si in determinarea  $k_L a$  prin metoda dinamica in medii simulate sau reale de bioproces. In acelasi timp masuratorile de oxigen dizolvat sunt utilizate pentru determinarea unor marimi derivate: OTR (rata de transfer a oxigenului), OUR (rata de consum a oxigentului).

#### 1.3.1.2.4. Bioxidul de carbon dizolvat (Brunswick, 1992)

Bioxidul de carbon este un metabolit important ce rezulta in cantitate mare ca produs final al oxidarii complete a sursei de carbon utilizate de microorganisme. Totusi cercetarile privind efectele bioxidului de carbon dizolvat asupra cresterii celulare si formarii produsului sunt inca putin

numeroase, desi electrodul sterilizabil pentru determinarea  $\text{CO}_2$  dizolvat este disponibil de o perioada lunga de timp.

#### 1.3.1.2.5. Analiza gazelor de fermentatie (Brunswick, 1992)

Schimbul de gaze intr-un bioproces reprezinta un fenomen important in studiul cantitativ al acestuia intrucat furnizeaza informatii indispensabile ce pot fi utilizate in calculul unor variabile *gateway*, optimizarea nivelelor acestora putand constitui criteriul de conducere optima a biosistemelor (Onken, Weiland, 1985).

In Tabelul 3 sunt prezentate comparativ diferitele tehnici utilizate pentru determinarea gazelor din bioproces

**Tabel 3. Tehnici de determinare a gazelor din bioproces (studiu comparativ)**

Aparat de masura	Avantaje	Dezavantaje
analiza in infrarosu ( $\text{CO}_2$ )	foarte specific	timp lung de raspuns
conductometru termic ( $\text{CO}_2$ )	mai putin scump	interferenta cu alte gaze
spectrometru de masa ( $\text{CO}_2$ , $\text{O}_2$ , etc.)	versatil, timp scurt de raspuns, utilizare multipla	scump
analizor paramagnetic ( $\text{O}_2$ )	foarte specific	interferenta cu vaporii de apa, timp lung de raspuns
celula de combustie cu electrolit	fara interferenta cu vaporii de apa	interferenta cu alte gaze
cromatograf de gaze pentru bioprocese ( $\text{CO}_2$ , $\text{O}_2$ , substrate, etc.)	cu utilizare multipla	acuratete redusa

#### a) Metode manometrice si electrozi pentru gaze

Metodele manometrice au fost cele mai utilizate metode in analiza oxigenului sau bioxidului de carbon din mediile biologice (respiratie celulara, stadii metabolice). Toate metodele folosesc pentru obtinerea unor determinari on-line traductoare ce transforma modificari de presiune in semnal electric.

#### b) Analize continui de flux pentru $\text{O}_2$ si $\text{CO}_2$

Variabilele derivate - OUR (viteza consumului de  $\text{O}_2$ ) si CPR (viteza productiei de  $\text{CO}_2$ ) se pot determina din bilantul in

evolutie al raportului  $O_2/CO_2$  in aerul de intrare / gazul de iesire din fermentator. Oxigenul gazos poate fi determinat cu analizorul paramagnetic, iar concentratia de bioxid de carbon se masoara cu analizorul in IR. Aceste analizoare pot fi utilizate simultan pentru mai multe bioreactoare.

### c) Cromatografie de proces

Cromatografia de gaze (si de lichide) a devenit tehnica de masura cea mai utilizata in analiza de flux. Ponderea ei va creste in viitor, intrucat alaturi de spectrometria de masa, constituie singura posibilitate de masurare simultana a mai multor componente prezente in amestec.

Trebuie tinut cont insa de acuratetea redusa a masuratorilor si mai ales de problemele delicate de calibrare, in special pentru masurarea simultana a mai multor componente, deoarece coloanele de separare si detectoarele nu pot fi folosite cu aceeasi precizie pentru diferite gaze.

### d) Spectrometria de masa

Intrucat viteza de raspuns este importanta, (mai ales cand un acelasi aparat analizeaza simultan gazele rezultate din mai multe bioreactoare), a crescut interesul pentru utilizarea spectrometrelor de masa. Acestea pot fi folosite pentru determinarea simultana si a altor componente in afara oxigenului si bioxidului de carbon (d.e. unele substrate sau produse de metabolism).

#### 1.3.1.2.6. Electrozi ioni-specifici

Importanta sarurilor anorganice in mediile de bioproces ca sursa de N, P, S, K, Mg, Ca, Na, Fe a fost demonstrata anterior. De aceea monitorizarea concentratiilor anumitor cationi si anioni ( $NO_3^-$ ,  $Cl^-$  sau  $SO_4^{2-}$ ) este avuta in vedere mai ales in bioprocese de tip fed-batch, semicontinui sau continui.

Electrozii ioni-sensibili sunt in general electrozi de tip potentiometric. Electrozi cu membrana de sticla pot fi utilizati pentru determinarea  $Na^+$ , iar alte variante pentru  $K^+$  si  $NH_4^+$ . Alte tipuri de electrozi folosesc proprietatea de selectivitate a membranelor pentru anumite cristale sau sunt simpli electrozi metalici. Aceasta din urma categorie prezinta dezavantajul reactiei simultane atat fata de potentialul redox cat si fata de metalul specific.

#### 1.3.1.2.7. Determinarea unor metaboli cheie

Pentru analiza activitatii celulare este necesar sa se cunoasca evolutia concentratiilor intermediarilor NAD-NADH, ce caracterizeaza catabolismul si a intermediarilor ATP-ADP, ce constituie o masura a activitatii anabolice. Daca determinarea intermediarului NADH este posibila in baza fluorescentei emise, masurarea celorlalti parametri nu este realizabila in practica curenta.

#### 1.3.1.2.8. Senzori enzimatici

Senzorii enzimatici fac parte din categoria mai larga a biosenzorilor. Conceptul de biosenzor a fost prezentat in studiul elaborat de Roelf si Martin (Roelf, Martin, 1982) si reluat de Hardman (Hardman, 1989).

Astfel, un component specific este prezent intr-un mediu complex de bioproces impreuna cu alte substante. El este *recunoscut* de componenta biologica a biosenzorului, care poate fi o enzima, un anticorp sau un alt produs cu care substanta de analizat interactioneaza specific. Ca rezultat al interactiunii, prin intermediul unui traductor specializat, este generat un semnal proportional. Substantele prezente in mediul de cultura si care pot concura cu substanta de analizat in a interactiona cu componenta biologica, pot fi eliminate prin incorporarea unei membrane selective.



De asemenea, problemele de stabilitate termica a enzimelor pot fi evitate utilizand

### 1.3.2. Marimi masurabile indirect

Masurarile indirecte permit estimarea valorilor variabilelor la fiecare interval de timp  $t$ , dar erorile acestor estimari exced erorile provenite din masuratorile directe; se poate preciza ca eroarea statistica intre metoda directa si cea indirecta poate fi pana la 40% (Montague *et al.*, 1988).

Daca se considera dinamica procesului biotehnologic reprezentata prin ecuatia generala :

$$\frac{dx}{dt} = f(x(t), u(t), p_1(t), t) + v(t)$$

#### 1.3.2.1

iar masura:

$$z(t) = h(x(t), u(t), p_2(t), t) + w(t)$$

#### 1.3.2.2

unde:  $x^T = (x_1, \dots, x_L)$  = vectorul de stare al variabilelor (concentratia de biomasa  $X$ , substrat  $S$ , produs  $P$ , etc.);

$u^T = (u_1, \dots, u_k)$  = vectorul de control al variabilelor (rata de dilutie  $D$ , pH, temperatura  $T$ , etc.);

$p_1(t), p_2(t)$  = vectorii modelului procesului biotehnologic si ai sistemului de masura;

$f, h$  = vectori (de model) ai procesului si ai masurii (operatori nelineari)  $\dim f = L$ ;  $\dim h = p$ ;

$v, w$  = zgomot;

$z$  = vector de masura.

o posibila metoda de rezolvare a problematicii masuratorilor indirecte se constituie in utilizarea tehnicilor de discretizare. Se poate presupune (Montague *et al.*, 1988) ca masurarea directa a

enzime termostabile obtinute din microorganisme termofile sau din microorganisme modificate genetic.

variabilelor de proces se obtine la momentul  $K$ , iar masurarea indirecta la momentul  $k$ . Din (1.3.2.1), (1.3.2.2) se obtine:

$$Z(K) = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \dots \\ x_L \\ h_1(x(K), u(K), p_2(K), K) \\ \dots \\ h_{p-L}(x(K), u(K), p_2(K), K) \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ \dots \\ v_L \\ v_{L+1} \\ \dots \\ v_p \end{bmatrix} \quad 1.3.2.3$$

unde:  $t = m \cdot \Delta t$ ,  $m \cdot 2\Delta t$ , informatia fiind obtinuta atat din masuratorile directe cat si din cele indirecte;

$$m = \Delta T / \Delta t \text{ si } m \cdot \Delta t < t < m \cdot 2\Delta t.$$

De asemenea :

$$x(k+1) = \Phi(x(K), u(K), p_1(K), K, \Delta t) + w(K)$$

$$Z(K) = \begin{bmatrix} h_1(x(K), u(K), p_2(K), K) \\ \dots \\ h_{p-L}(x(K), u(K), p_2(K), K) \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} v_1 \\ \dots \\ v_{p-L} \end{bmatrix} \quad 1.3.2.4$$

Algoritmul de masura prin filtrare discreta poate da estimarea lui  $\hat{x}(K)$ , daca ecuatiile (1.3.2.3), (1.3.2.4) pot fi determinate. In general, acest lucru nu este posibil, deoarece procesele biotehnologice:

- nu sunt stationare (vectorii parametrilor  $p_1(k), p_2(k)$  isi schimba valoarea in timpul procesului);
- ecuatiile (1.3.2.3), (1.3.2.4) sunt simplificate si nu descriu toate fenomenele din proces.

The diagram illustrates the information flow in a control system for a bioprocess. The components and their interactions are as follows:

- Bioproces (3):** Receives input  $w(k)$  and  $v(K)$ . It outputs to **Masurari directe** and **Estimarea starii prin estimari directe**.
- Masurari directe (4):** Receives input from **Bioproces** and outputs  $Zin(K)$  to **Filtrare masurari directe**.
- Masurari indirecte (4):** Receives input from **Bioproces** and outputs  $Zd(K)$  to **Filtrare masurari indirecte**.
- Estimarea starii prin estimari directe (6):** Receives input from **Bioproces** and outputs  $X(K)$  to **Identificare parametrica**.
- Estimarea starii prin estimari indirecte (6):** Receives input from **Bioproces** and outputs  $X(K)$  to **Identificare parametrica**.
- Filtrare masurari directe (5):** Receives inputs  $Zin(K)$  and  $p1(K)$ . It outputs  $X(K)$  to **Estimarea starii prin estimari directe**.
- Filtrare masurari indirecte (5):** Receives inputs  $Zd(K)$  and  $p2(K)$ . It outputs  $X(K)$  to **Estimarea starii prin estimari indirecte**.
- Identificare parametrica (7):** Receives inputs  $X(K)$ ,  $Zin(K)$ ,  $Zd(K)$ ,  $p1(K)$ , and  $p2(K)$ . It outputs  $p(K)$  to **Estimarea starii prin estimari indirecte**.

Este esential de cunoscut caracteristicile statice si erorile metodelor de masura; astfel, erorile metodelor de masurare directa pot fi approximate printr-un zgomot alb gaussian:  $E\{V\} = 0$  si dispersia  $G_{v_i}^2 = (K_{v_i} z_i)^2$ . Aici  $K_{v_i}$  este un coeficient ce caracterizeaza eroarea medie a masuratorilor. Experimentele au aratat ca valoarea coeficientului  $K_{v_i}$  este cuprinsa in domeniul 0,001...0,5 si depinde de metoda de masura si de variabila de stare. In general, se considera ca pot fi masurate: concentratia de oxigen ( $r_{O_2}$ ), pH ( $r_a$ ), evolutia consumului de carbon ( $r_{CO_2}$ ), evolutia caldurii ( $r_Q$ ), toate acestea fiind conectate cu variabilele de stare din proces prin ecuatii cinetice.

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= D(X_0 - X) + \mu(X, S, P, u', p_1, t)X + W_1(t) \\ \frac{dS}{dt} &= D(S_0 - S) + \eta(X, S, P, u', p_1, t)X + W_2(t) \\ \frac{dP}{dt} &= D(P_0 - P) + \varepsilon(X, S, P, u', p_1, t)X + W_3(t)\end{aligned}$$

unde:  $X_0, S_0, P_0, X, S, P$  = concentratia de biomasa, substratul limita si produsul la intrare si respectiv iesirea din fermentator;

$\mu, \eta, \varepsilon$  = ratele specifice de crestere a microorganismelor, de consum a substratului si formare a produsului;

$u' = [T, pH, pO_2 \dots]^T$  = vectorul conditiilor externe din proces;

$p_1$  = vectorul parametrilor modelului;

$D$  = rata de dilutie;

$W_1(t), W_2(t), W_3(t)$  = zgomote de modelare.

In aceste conditii, sistemul de masurari indirecte este descris de urmatorul model matematic:

$$r_{O_2}(t) = K_1\mu(X, S, P, u', p_1, t)X(t) + K_2X(t) + K_3\varepsilon(X, S, P, u', p_1, t)X(t) + v_1(t)$$

$$r_{CO_2}(t) = K_{41}\eta(X, S, P, u', p_1, t)X(t) + K_5X(t) + K_6\varepsilon(X, S, P, u', p_1, t)X(t) + v_2(t)$$

$$r_{al}(t) = f(U) + K_7\mu(X, S, P, u', p_1, t)X(t) + K_8X(t) + K_9\varepsilon(X, S, P, u', p_1, t)X(t) + v_3(t)$$

$$OD(t) = K_{10}X(t) + v_4(t)$$

### 1.3.2.6

Cazul estimarii on-line a variabilelor de stare utilizand masuratorile directe si indirecte pune la baza un model al procesului de tip (1.3.2.3) si impune o procedura de tip filtru Kalman. In aceste conditii, algoritmul de filtrare este:

$$\hat{X}(K+1) = X(K+1/K)(K+1) \bullet$$

$$\bullet (Z(K+1) - h(\hat{X}(K+1/K), u(K+1), p_2(K), K+1))$$

### 1.3.2.7

iar cel de predictie cu un pas:

$$\hat{X}(K+1/K) = \Phi(\hat{X}(K), u(K), p_1(K), K, \Delta T)$$

### 1.3.2.8

De asemenea, algoritmul pentru calculul *a priori* a matricei de covarianta a erorilor poate fi scris:

$$P_x(K+1/K) = S_a \frac{\partial \Phi[\hat{X}(K), u'(K), p_1(K), K, \Delta T]}{\partial \hat{X}(K)} \cdot P_x(K) \cdot \frac{\partial \Phi^T[\hat{X}(K), u(K), p_1(K), K, \Delta T]}{\partial \hat{X}(K)} + Q(K)$$

### 1.3.2.9

iar cel de estimare a matricii de covarianta a erorilor:

$$\begin{aligned} P_x(K+1) = & P_x(K+1/K) - P_x(K+1/K) \frac{\partial h^T[\hat{X}(K+1/K), u(K+1), p_2(K), K+1]}{\partial \hat{X}(K+1/K)} \cdot \\ & \cdot \left[ \frac{\partial h[\hat{X}(K+1/K), u(K+1), p_2(K), K+1]}{\partial \hat{X}(K+1/K)} \cdot P_x(K+1/K) \cdot \right. \\ & \cdot \left. \frac{\partial h^T[\hat{X}(K+1/K), u(K+1), p_2(K), K+1]}{\partial \hat{X}(K+1/K)} + S(K+1) \right]^{-1} \cdot \\ & \cdot \frac{\partial h[\hat{X}(K+1/K), u(K+1), p_2(K), K+1]}{\partial \hat{X}(K+1/K)} \cdot P_x(K+1/K) \end{aligned}$$

### 1.3.2.10

De asemenea:

=

$$P_x(K+1) \cdot \frac{\partial h^T[\hat{X}(K+1/K), u(K+1), p_2(K), K+1]}{\partial \hat{X}(K+1/K)} \cdot S^{-1}(K+1)$$

### 1.3.2.11

unde:  $S_a$  = coeficientul de imbatranire;

$S(K)$ ,  $Q(K)$  = matricile de covarianța ale zgomotului de masura și respectiv modelare.

Condițiile inițiale:  $X(0)$  și  $P_x(0)$  reprezintă cea mai bună estimare a vectorului variabilelor de stare la pasul inițial și respectiv gradul de incertitudine în alegerea lui  $X(0)$ .

Din cele prezentate anterior, rezulta varianta în timp a parametrilor  $p_1$  și  $p_2$ , de unde și necesitatea estimării variabilelor de stare și a modelării parametrilor. O metodă larg utilizată este cea a celor mai mici pătrate (CMMP) după estimarea stării: se descompune modelul în serie Taylor și prin neglijarea termenilor patratici, ecuația (1.3.2.4) devine:

$$X_1(K+L) = \Phi_1(p_1(K)) + W(K)$$

$$Z_1(K) = h_1(p_2(K)) + V(K)$$

### 1.3.2.12

de unde rezulta estimarea lui  $p_1(K)$  prin metoda CMMP recursivă:

$$p_1(K) = \hat{p}_1(K-1) + K(X_1(K-1) - \Phi_1(K)\hat{p}_1(K-1))$$

$$K(K) = P(K-1)\Phi_1^T(K)X_1(K)P(K-1)\Phi_1^T(K) + \frac{1}{S_0^2}$$

$$P(K) = S_0^2(I - K(K)\Phi_1(K)P(K-1))$$

### 1.3.2.13

$p_2$  putându-se estima analog. În acest fel,  $p_1(0)$  și  $p_2(0)$  vor rezulta în urma identificării off-line, iar  $P(0)$  va defini eroarea identificării preliminară a lui  $p_1(0)$  și  $p_2(0)$ .

O a doua metodă pune în evidență estimarea concomitentă a stării procesului și a parametrilor modelului. Astfel, presupunem că  $p_1(K)$  și  $p_2(K)$  sunt constante pentru o scurtă perioadă de timp (i.e. procesul este quasistationar). Vectorul variabilelor de stare va fi deci:

$$X_c(K+1) = \begin{bmatrix} X(K+1) \\ p_1(K+1) \\ p_2(K+1) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \Phi[X(K), u(K), K, \Delta T] \\ p_1(K) \\ p_2(K) \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} W(K) \\ W_{p_1}(K) \\ W_{p_2}(K) \end{bmatrix} \quad 1.3.2.14$$

algoritmul (1.3.2.7) ÷ (1.3.2.11) putând fi aplicat și în acest caz.

## CONCLUZII

1. Prezentarea generala a bioproceselor pune in evidenta specificitatea proceselor viului, caracterizate prin nelinearitate, multivariabilitate si puternica interdependenta a variabilelor de lucru. In aceste conditii, diferitele modalitati de cultivare impun, pe langa o tratare teoretica exhaustiva, si implementarea unor strategii de conducere specifice, capabile sa optimizeze global ansamblul bioproces-bioreactor.
2. Dezvoltarea instrumentatiei pentru masurarea principalelor variabile de bioproces este o conditie de baza pentru evolutia strategiilor de conducere a acestora. Limitarile actuale ale sistemelor de masura cuprind in general urmatoarele aspecte:
  - instrumentele de masura sunt relativ scumpe, motiv pentru care nu sunt in general incluse in echipamentul standard al bioreactoarelor;
  - monitorizarea se face mai ales in raport cu modificarile din mediul inconjurator celular si mai putin la nivelele intermediarilor din reactiile metabolice celulare;
  - problematica dozarii activitatii principalelor enzime raspunzatoare de sinteza celulara si de acumularea produsilor de bioproces ramane deschisa: daca dozarile de substrate si ale unor produse pot fi efectuate continuu, dozarile enzimatic se fac off-line, dupa proceduri greoaie, dependente de calitatea prestatiei analistului si deci susceptibile de erori mari.

In acest sens, structurile de conducere vor evolua in functie de gradul de avansare a sistemelor de masura. Conducerea pe baza modelelor analitice (care implica evolutia cunoasterii cantitative a fenomenelor si reprezinta dezvoltarea unor procedee de dirijare rationala a bioproceselor pe cai optime) este limitata de lipsa sistemelor de masura a fenomenelor intracelulare si de incapacitate de cunoastere a modalitatilor de interactiune a variabilelor de bioproces (puternic si complex interdependente). Pentru depasirea unor astfel de dificultati, adoptarea tehnicilor de conducere bazate pe inteligenta artificiala reprezinta o solutie, chiar daca, in final, doar avansarea cunoasterii fenomenelor ce au loc va constitui rezolvarea adecvata a problemei conducerii optimale a unui bioproces.

## BIBLIOGRAFIE

\*\*\*

- Aiba, S., Humphrey, A. E., Millis, N. F.  
Anders, K. D., Muller, W., Kammeyer, R., Scheper, T.  
Atkinson, B., Mavitima, F.  
Bailey, J. E., Ollis, D. E.  
Baker, M., Recknagel, R. D.  
Blenke, H.  
Bliem, R., Katinger, H.  
Brauer, H.  
Charles, M.  
Cheng, R. S., Papoutsakis, N. T.  
Chisti, M. Y.  
Fiechter, A., Meiners, M., Sukatsch, D. A.  
Hardman, N.  
Kargi, F.  
Katinger, A., Scheirer, W.  
Kingsburg, D. T.  
Kobayashi, T.  
Kompen, W. H., Seduberg, A. C.  
Kossen, N. W. F.  
Leung, K. K., Petersen, J. N., Lee, J. M.  
Levean, J. Y., Bouix, M.  
Linek, V., Sinkule, J., Vacek, V.  
Montague, G. A., Morris, A. J., Bush, J. R.  
Moo Young, M.  
Moser, A.  
N. Brunswick Sci. Co Inc., Res. and Develop. Dept., USA, 1992.  
Biochem. Eng., S. Aiba (Ed.), Academic Press, N.Y., 1973  
Biotechnol. Tech., **6(2)**, p.97, 1992  
Biochem. Eng. Biotechn. Handb., B. Atkinson & F. Mavitima (Ed.), Nature Press, N.Y., 1985  
Biochem. Eng. Fund., J. E. Bailey (Ed.), Mc Graw-Hill, N.Y., 1977  
Acta Biotechnologica, **3**, p.89, 1983  
Biotechnology, **2**, H. J. Rehm & G. Reed (Ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1985  
Trends in Biotechnol., **6**, p.224, 1988  
Biotechnology, **2**, H. J. Rehm & G. Reed (Ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1985  
Comprehensive Biotechnology, **2**, M. Moo Young (Ed.), Pergamon Press, N.Y., p.57, 1985  
Bioproc. Eng., **1**, p.29, 1986  
Air Lift Bioreactors, M. Y. Chisti (Ed.), Elsevier App. Sci., N.Y., 1989  
Handbuch der Biotechnologie, W. Sittig, V. Faust (Ed.), Oldenburg Verlag, Munchen, 1987  
Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol, **40**, p.1, 1989  
Comprehensive Biotechnology, **2**, M. Moo Young (Ed.), Pergamon Press, N.Y., p.6, 1985  
Animal Cell Biotechnol., **1**, R. E. Spier & J. B. Griffiths (Ed.), Academic Press, N.Y., p.10, 1985  
Trends in Biotechnology, **7**, p.82, 1989.  
Group Training Course, 1977, Osaka University, Osaka.  
Ferment. Biochem. Eng. Handb., H. C. Vogel (Ed.), Noyes Publications, N.Y., p.56, 1985  
The 7<sup>th</sup> Biotechnol. Internat. Symp., New Delhi, Febr., 1984.  
Bioproc. Eng., **7**, p.19, 1991  
Biotechnologie, R. Scriban (Ed.), Edition Technique et Documentation, Paris, p.135, 1984  
Biotechnology, **2**, H. J. Rehm & G. Reed (Ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, p.363, 1985  
IEEE Control Systems Magazine, **8**, p.44, 1988  
Comprehensive Biotechnology, **2**, M. Moo Young (Ed.), Pergamon Press, N.Y., XV, 1985  
Biotechnology, **2**, H. J. Rehm & G. Reed (Ed.), Springer Verlag, Berlin, p.227, 1985

- Nagai, S.  
Ouken, V., Weiland, P.  
  
Polakovic, M., Mandenius, C. F.  
Prokop, A., Rosenberg, C.  
  
Schugerl, K.  
Schugerl, K.  
  
Schugerl, K.  
  
Schugerl, K., Sittig, W.  
  
Shimizu, H., Takamatsu, T., Shioya, S., Suga, K. I.  
Sonnleitner, B., Fiechter, A.  
Tolbert, W. R., Schoenfeld, R. A., Lewis, C., Feder, J.  
Winkler, M. A.  
  
Yu, Z. H., Li, W., Lee, J. H.
- Adv. Biochem. Eng., **11**, p.49, 1979  
Biotechnology, **2**, H. J. Rehm & G. Reed (Ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, p.787, 1985  
  
Bioproc. Eng., **10**, p.217, 1994  
Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol., **39**, A. Fichter (Ed.), Springer Verlag, Berlin, p.29, 1989  
EFB Bioreac. Eng. Course, p.263, 1992  
Adv. Biochem. Eng., **19**, A. Fiechter (Ed.), Springer Verlag, Berlin, p.181, 1981  
Comprehensive Biotechnology, **2**, M. Moo Young (Ed.), Pergamon Press, N.Y., p.99, 1985  
Handbuch der Biotechnologie, W. Sittig, V.Faust (Ed.), Oldenburg Verlag, Munchen, p.143, 1987  
Biotechnol. Bioeng., **33**, p.354, 1989  
  
EFB Bioreac. Eng. Course, p.143, 1992  
Biotechnol. Bioeng., **24**, p.1671, 1982  
  
Principles Biochem., A. Wiseman (Ed.), Surrey Univ. Press, London, p.118, 1983  
Chem. Eng., Sci., **49(3)**, p.285, 1994