

Capitolul doi

PROBLEMATICA CONDUCERII BIOPROCESELOR

*In cadrul acestui capitol vor fi trecute in revista, intr-o prima parte, principalele modele din literatura referitoare la cinetica de bioproces. Astfel, in baza unei clasificari in general acceptate, modelele de crestere de biomasa si de obtinere de produsi de metabolism, de evolutie generala a principalilor parametrii de bioproces, sunt analizate, fiind precizate, acolo unde va fi cazul, si limitarile conceptuale ale acestora. In # 2.2 vor fi detaliate obiectivele generale de conducere a bioproceselor, punandu-se un accent deosebit pe interpretarea **economica** a criteriilor de performanta. In sfarsit, in finalul acestui capitol va fi facuta o prezentare generala a diferitelor strategii de conducere existente (cu model **a priori**, adaptive sau prin tehnici de inteligenta artificiala), cu exemplificari din literatura, pentru a evidentia stadiul conceptual existent ca si tendintele generale de manifestare.*

2.1. MODELAREA BIOPROCESELOR

Cunoasterea proceselor fiziologice si a modurilor de operare in biosistem (Doran, 1986; Young, Bungay, 1973), permite definirea mecanismelor de reglare a cailor metabolice in scopul dirijarii optime a unui bioproces. Daca aceasta cunoastere ajunge pana la realizarea unor modele matematice (in sensul descrierii matematice cantitative a proceselor metabolice ale microorganismelor ce evolueaza in bioreactor), atunci:

- reprezentarea matematica a proceselor va conduce la utilizarea de metode adecvate de optimizare si conducere (Moser, 1992; Wucherer *et al.*, 1992);
- modelarea tinand cont de mecanismele si reactiile cheie ce regleaza comportamentul microorganismelor, furnizeaza informatia necesara despre caracteristicile procedeului aplicat (Chen, Bastin, 1991; Bastin *et al.*, 1992);
- un model suficient de elaborat integreaza fiziologia si determinarile genetice ale microorganismului folosit. Cunoasterea acestora permite predictii asupra eficientei procedeului si constituie cea mai buna cale, daca este posibila definirea strategiei de conducere optima (Mosrati *et al.*, 1991).

Modelele matematice ce descriu evolutia celulelor vii trebuie sa exprime natura dinamica a acestor biosisteme, sa fie cat mai generale (si in consecinta complexe) si sa fie cat mai putin empirice, reflectand cu o cat mai mare acuratete biochimia de baza a celulei (Freyer *et al.*, 1989). In cazul unui model trebuie sa se faca un compromis acceptabil intre redarea cat mai detaliata a subproceselor ce au loc, ceea ce implica introducerea unui mare numar de parametrii (adesea necontrolabili) si folosirea unui numar mic de parametrii usor de estimat si controlat (Ljubanova, Ignatova, 1994).

In contrast cu modelele ce exprima mecanisme si comportamente celulare sau

chiar subcelulare doar in scopul conducerii bioproceselor, se pot dezvolta modele cu un grad mai ridicat de empirism, cu variabilele masurabile in-line / on-line direct sau indirect sau estimate (Eiki, Osono, 1990) din evolutia altor parametri (d.e. $X = f(OUR)$). Acesrea, la limita, sunt chiar modele tip *black box*. Parametrii acestor modele se obtin destul de frecvent prin procedee de fitting pe baza curbelor experimentale (Cushing, 1991).

Datorita specificitatii proceselor viului, modelele matematice ce le descriu se caracterizeaza prin *multivariabilitate*, *nelinearitate* si *varianta in timp* a parametrilor (Stanbury, Whitaker, 1994; Kurtanek, 1992). Astfel, ansamblul variabilelor bio-fizico-chimice ce descriu starea bioprocesului la un anumit moment, manifesta o puternica interconexiune ce face practic imposibila discernerea influentelor reciproce (Turner *et al.*, 1988). Este si motivul pentru care o ecuatie generala de tipul:

$$X = f(X, S, O_2, pH, T, \dots, t)$$

nu este in general posibila decat la nivel teoretic. Incercarile de realizare a unor astfel de modele globale s-au soldat cu un esec (, pe de o parte datorita imposibilitatii masurarii on-line a tuturor parametrilor de bioproces, iar pe de alta parte, datorita necunoasterii mecanismelor intime ce functioneaza la nivel celular. Iesirea din impas s-a facut prin introducerea unor dependente limitate la una / doua variabile, sau chiar prin introducerea unor modele lineare pe portiuni (Stanbury, Whitaker, 1994). Aceasta ultima posibilitate este functionala tinandu-se cont de faptul ca bioprocesele se caracterizeaza in general prin constante mari de timp (de ordinul orelor sau zecilor de ore) si deci, de-a lungul unei perioade de esantionare, procesul poate fi

considerat quasi-linear (Stanbury, Whitaker, 1994).

O prezentare generala a modelelor cineticii de bioproces este data de Moser (Moser, 1988), fig. 2.1.1. Conform acestei clasificari, in modelarea biosistemelor se prefera modelele deterministice celor probabilistice. La randul lor modelele deterministice pot fi (Moser, 1988):

- *nestructurate* - celulele sunt tratate tip *black box*, avand importanta doar cantitatea de celule (concentratia); in acest caz, celulele, ca entitati globale, sunt influentate doar de mediul exterior;
- *structurate* - se tine cont de structura celulara, fie la nivelul componentelor chimice (modele structurate chimic), fie la nivelul morfologiei celulare, introducand efecte legate de forma, varsta, dimensiune, etc.

O alta clasificare a modelelor ce descriu biosisteme este facuta in functie de recunoasterea/neglijarea faptului ca o populatie celulara este alcatuita dintr-un numar mare de indivizi (celule) care pot avea proprietati (caracteristici) diferite. Din acest punct de vedere, modelele pot fi (Moser, 1988):

- *nesegregate* (distributive, continui): se ia in considerare existenta celulelor individuale;
- *segregate* (corpusculare): se explicita prin model existenta celulelor individuale cu proprietati distincte.

Atata vreme cat proprietatile de interes pot fi reprezentate in mod adecvat prin valori medii, abordarea neselegata este suficienta. In schimb, in special in cazul celulelor transformate prin inginerie genetica, cantitatea de informatie codificata utilizata in biosinteza unui produs poate diferi de la un grup de celule la altul, si in consecinta, corelarea cu formarea produsului nu mai este identica pentru toate celulele. In acest caz modelele segregate sunt importante.

Cele mai simple si mai utilizate modele sunt cele nestructurate, neselegate (d.e. modelul

Monod de crestere microbiana). Dar numai modelele structurate pot prezice raspunsul culturilor in conditii neechilibrate de crestere (cresterea este echilibrata intr-un interval de timp daca in aceasta perioada fiecare proprietate extensiva a biosistemului creste in aceeasi proportie (notiune introdusa de Campbell (Campbell, 1977)). Modelul Monod este valabil numai in conditii de crestere echilibrata, in general, faza exponentiala in culturi discontinui si regimul stationar intr-un chemostat sunt considerate ca exemple tipice pentru acest tip de crestere.

In sfarsit, postulatele formulate de Edwards si Wilkie (Edwards, Wilke, 1968) in domeniul modelarii de bioproces stabilesc normele de realizare a oricarei cinetici a viului; astfel modelul trebuie:

- sa fie capabil sa reprezinte toate fazele culturii;
- sa fie suficient de flexibil ca sa aproximeze o serie de tipuri de date fara sa introduca distorsiuni semnificative;
- sa aiba parametrii de aproximare cu corespondent fizic direct;
- sa fie derivabil continuu;
- sa aiba parametrii usor de evaluat;
- sa fie usor de folosit, odata parametrii evaluati.

2.1.1. Modele nestructurate neselegate

Kossen si Oosterhuis (Kossen, Oosterhuis, 1985) considera modelele nestructurate (si implicit, neselegate) ca avand un caracter pronuntat de tratare a fenomenului biologic drept *black box*, iar cele structurate drept *gray box*, conceputa ca o colectie de *cutii negre* mai mici aranjate in ceea ce se numeste *structura* biosistemului (totalitatea cutiilor negre cu interconexiunile lor). Modelele matematice nestructurate pot reprezenta:

- ecuatii constitutive:
 - de viteza - cinetica;
 - de transport;
 - termodinamice;
- ecuatii de bilant - stoechiometrie.

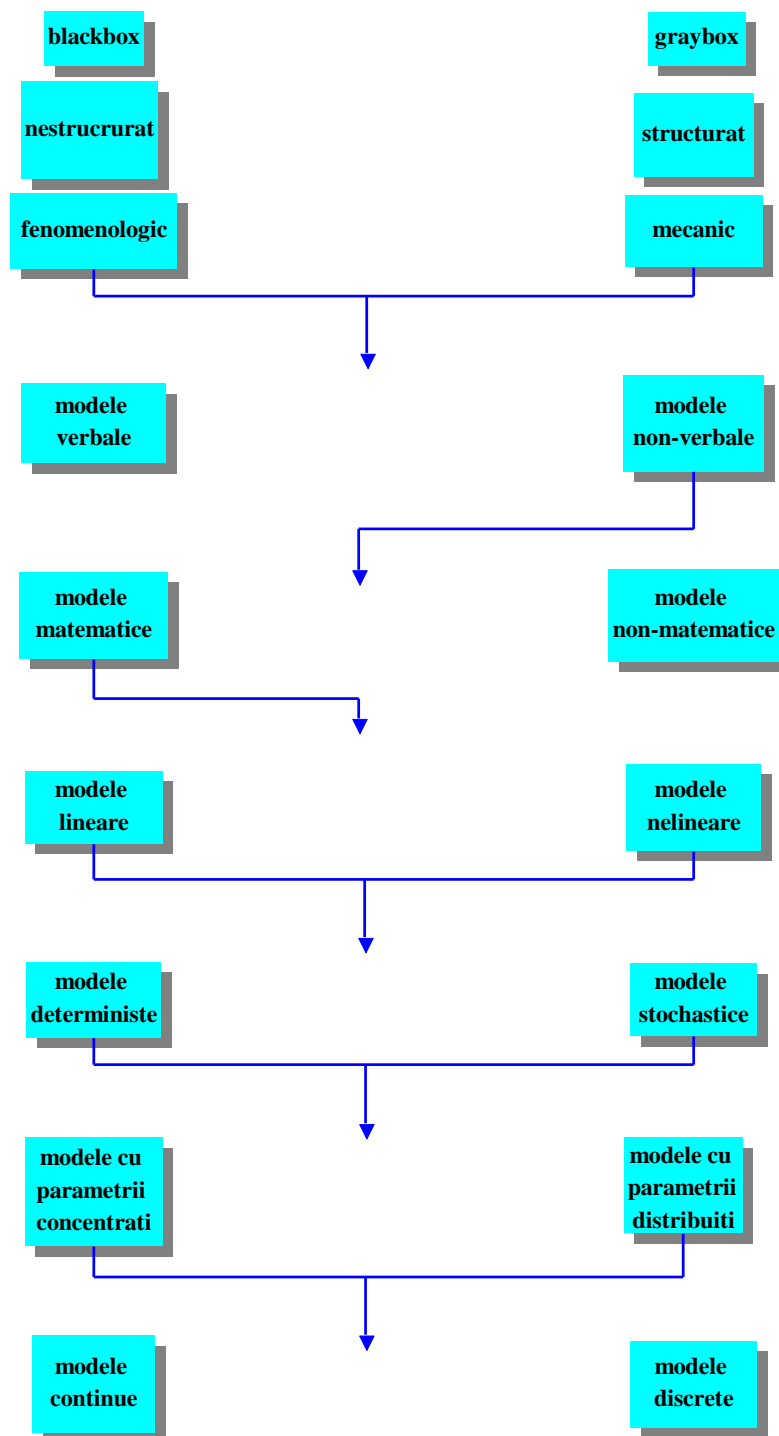


Figura 2.1.1.1. - Clasificare generala a tipurilor de modele de bioproces

2.1.1.1. Ecuatii de bilant

Modelarea pe baza ecuatiilor de bilant a fost utilizata de catre Cooney si Wang (Cooney *et al.* 1977) pentru crearea unui algoritm de calcul ce avea in vedere monitorizarea continua a indicatorilor de performanta ai unui bioproces. Folosind relatiile stoechio-

metrice pentru cresterea si formarea produsului si masurand continuu debitul de aerare, OUR, CPR si consumul de sursa de carbon si de amoniac s-au determinat X , $Y_{X/S}$ si $Y_{X/O}$. Algoritmul de estimare a fost verificat pentru bioprocesul discontinuu de crestere a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* pe glucoza.

În etapa următoare algoritmul stabilit a fost aplicat pentru a asigura controlul optimal al debitului de alimentare cu melasa în cazul unui proces fed-batch de cultivare a aceleiași drojdii (drojdia de panificație) în vederea obținerii unui randament ridicat ($Y_{X/S} = 0,5$) și în secundar al menținerii unei productivități ridicate în masa celulară pe parcursul bioprocesului ($dX/dt = \max$).

2.1.1.2. Modele cinetice nestructurate pentru creștere și utilizarea substratului

Se poate considera ca $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$ - viteza specifică de creștere, este variabila cheie

pentru descrierea creșterii celulare, a consumului de substrat și a formării produsului (Bastin, Dochain, 1990). Toate cercetările întreprinse în domeniu au indicat că variabila μ depinde de timp și este influențată de mulți factori fizico - chimici și biologici dintre care cei mai importanți sunt: substratul, S, concentrația de celule, X, concentrația de produs, P, pH-ul, temperatura, T, concentrația de oxigen dizolvat, pO_2 și inhibitori diferiți ai creșterii, I.

După Bastin (Bastin, Dochain, 1990), viteza specifică de creștere poate fi exprimată ca un produs de factori individuali, fiecare referindu-se la influența unei variabile:

$$\mu(t) = \mu(S)\mu(X)\mu(P)\mu(pH)\mu(T)\mu(C)\mu(I)$$

2.1.1.2.1

a) $\mu=\mu(S)$ Modele cinetice cu limitare a cresterii de catre substrat, fara inhibitie (tip de cinetica cu saturatie)

Pana in prezent cinetica cresterii microbiene este dominata de legea lui Monod (Monod 1942, Monod, 1949) pentru functia $\mu=\mu(S)$. Aceasta relatie este o analogie a ecuatiei Michaelis-Menten (Michaelis, Menten, 1913; Sakamoto, 1986) de baza pentru cinetica enzimatica, fiind derivata din aceasta in mod empiric si putand fi considerata de aceea ca o ecuatie de cinetica formala (Moser, 1988; Sivakumar et al., 1994; Luong, 1987; Han, Levenspiel, 1988):

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \quad 2.1.1.2.2$$

unde : μ_{\max} = viteza maxima specifica de crestere [1/h]
 K_S = constanta de saturatie [g/L]

Figura de mai jos prezinta evolutia tipica a vitezei specifice de crestere in functie de S, fara inhibitie:

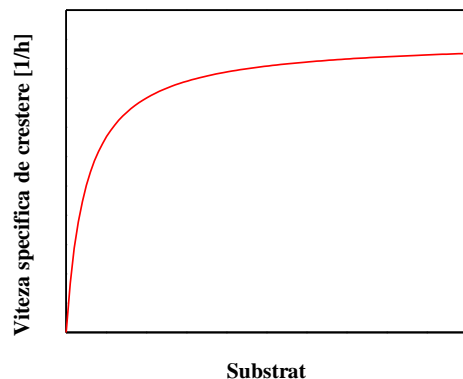


Figura 2.1.1.2 Dependenta $\mu=\mu(S)$ cf. legii lui Monod
 Similar viteza de consum a substratului este:

$$q_S = \frac{q_{S_{\max}} S}{K_S + S} \quad 2.1.1.2.3$$

Aceste relatii sunt legate intre ele prin coeficientul de conversie $Y_{X/S}$, conform expresiei

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{dX}{dS} = \frac{\mu}{q_S} \quad 2.1.1.2.4$$

Alte ecuatii au fost propuse ca alternative:
 ecuatia Teissier (Teissier, 1936):

$$\mu(S) = \mu_{\max} \left(1 - e^{-\frac{S}{K_S}}\right) \quad 2.1.1.2.5$$

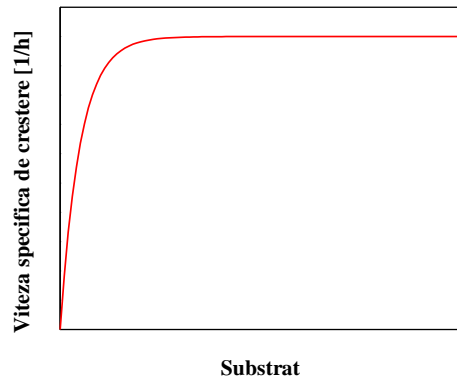


Figura 2.1.1.3 Dependenta $\mu=\mu(S)$ cf. ecuatiei Teissier
ecuatia Moser (Moser, 1988):

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\max} S^n}{K_s + S^n} \quad 2.1.1.2.6$$

prin analogie cu o cinetica de tip Hill ($n>0$)

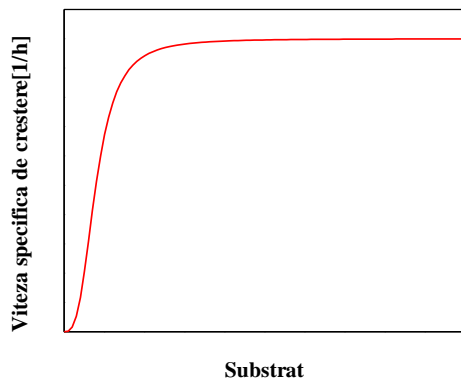


Figura 2.1.1.4 Dependenta $\mu=\mu(S)$ cf. ecuatiei Moser
ecuatia Blackman (Blackman, 1905):

$$\mu = \begin{cases} \frac{\mu_{\max}}{K_m} S(t) & \text{daca } S(t) \leq K_m \\ \mu_{\max} & \text{daca } S(t) > K_m \end{cases} \quad 2.1.1.2.7$$

ecuatia Powell (Powell, 1958), ce exprima prin factorul KD influenta permeabilitatii celulare, difuziei substratului si dimensiunii celulare:

$$\mu(S) = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + K_D + S} \quad 2.1.1.2.8$$

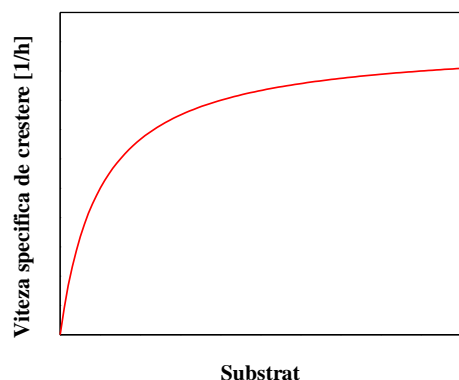
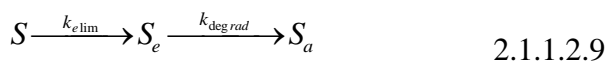


Figura 2.1.1.5 Dependenta $\mu=\mu(S)$ cf. ecuatiei Powell

S-a demonstrat ca modelul Monod (cinetica cu saturatie) tinde prea lent catre asimptota pentru a fi o buna reprezentare a datelor experimentale chiar si in cazuri simple. Modelele Teissier sau Blackman reprezinta mai corect evolutia reala deoarece saturatia se atinge mai repede.

Au fost propuse si modele care au in vedere pentru crestere si utilizarea lui S in cadrul unor mecanisme mai evolute. Astfel, Verhoff (Verhoff et al., 1972) introduce doua etape in cresterea celulara, asimilare si ingestie, derivand o ecuatie complicata si prea putin utila in practica. De asemenea, Nyholm (Nyholm, 1976) introduce o structura duala de utilizare a substratului, incluzand consum (asimilare sau eliminare din faza lichida) si crestere (degradare sau utilizare a lui S pentru crestere):



unde S_a este substratul nedisponibil pentru crestere, iar S_e este substratul functional folosit pentru crestere. Viteza de crestere se exprima ca functie de concentratia intracelulara a substratului limitator (S_{int}/X) si a substratelor conservate, d.e. ionii anorganici (saruri de fosfor si azot) sau vitamine, ce nu sunt descompuse la preluarea in celula, ci doar stocate:

$$\mu = \mu \frac{\frac{S_{int}}{X}}{\frac{dS_{int}}{dt}} = r_{S_{lim}} - r_{S_{deg rad}} \quad 2.1.1.2.10$$

Acest model are interes practic in cazul tratarii biologice a apelor uzate si este de fapt de tipul $\mu = \mu(S, X)$, viteza specifica de crestere depinzand de doua variabile S si X.

Unul din obiectivele dezvoltarii unui model cinetic generalizat este determinarea bazei conceptuale si stabilirea unor forme utile de descriere a cresterii microbiene (O'Neil, Fyeras, 1986). In acest sens, din comportamentul general al cresterii ca functie de evolutia concentratiei substratului forta motrice (Neubert et al., 1984) a schimbarii lui μ in raport cu modificarea lui S poate fi conceputa ca o diferenta de tipul $\mu_{max} - \mu$. Se obtine astfel modelul lui Konak (Konak, 1974):

$$\frac{d\mu}{dt} = k(\mu_{\max} - \mu)^p \quad 2.1.1.2.11$$

unde: k = constanta cinetica
 p = ordinul de reactie

Aceasta ecuatie reprezinta o analogie a cunoscutei legi de putere, utilizate in cinetica chimica. Daca se introduce notiunea de viteza relativa de crestere in sens biologic:

$$r_{rel} = \frac{\mu}{\mu_{\max}} \quad 2.1.1.2.12$$

atunci ecuatia (2.1.1.2.11) se poate rescrie:

$$d \frac{\mu}{\mu_{\max}} = k \mu_{\max}^{p-1} \left(1 - \frac{\mu}{\mu_{\max}}\right)^p dS \quad 2.1.1.2.13$$

Konak a demonstrat ca aceasta ecuatie se reduce la o relatie de tip Monod pentru $p = 2$ si la o relatie Teissier pentru $p = 1$, o dependenta interesanta intre μ_{\max} si K_S devenind posibila:

$$K_S = \frac{1}{\mu_{\max} k} \quad 2.1.1.2.14$$

Kargi si Shuler (Kargi, Shuler, 1979) au derivat ecuatiile generale pornind de la relatiile diferentiale de mai sus pentru μ , obtinand:

$$d \frac{\mu}{\mu_{\max}} = K \left(\frac{\mu}{\mu_{\max}}\right)^m \left(1 - \frac{\mu}{\mu_{\max}}\right)^p dS \quad 2.1.1.2.15$$

cu K, m, p = constante

In acelasi timp ecuatia generala (2.1.1.2.15) se poate reduce la modelele mai simple, expuse anterior conform tabelului de mai jos:

Tabel 2.1.1 Cazuri particulare pentru ec 2.1.1.2.15

Model	K	m	p
Monod	$1/K_S$	0	2
Teissier	$1/K_S$	0	1
Hill-Moser	$n/K_S 1/n$	$1-1/n$	$1+1/n$

b) $\mu=\mu(X,S)$ Influenta concentratiei celulare si a concentratiei substratului limitator de crestere asupra vitezei specifice μ

Intrucat dependenta $\mu=f(X)$ de concentratia celulara nu exclude ci cuprinde (Yamane, 1993), cel putin implicit si dependenta de S, sunt putine modele de tipul $\mu = f(X)$, mai logice si de aceea mai numeroase fiind modelele $\mu = f(X,S)$.

Din punct de vedere al cresterii (Chattaway *et al.*, 1992), s-a observat in destule experimente ca viteza de evolutie a culturii scade la concentratii ridicate ale lui X (Mulchandani, Luong, 1988; Matanguihan *et al.*, 1994). Un model simplu care explica aceasta situatie, considera ca viteza specifica descreste liniar cu concentratia de celule. Se obtine astfel ecuatiei lui Verhulst (Verhulst, 1845):

$$\mu(X) = \mu_{\max}(1 - k_x X) \quad 2.1.1.2.166$$

care mai poarta si numele de *modelul logistic al cresterii* (fig.2.1.1.6)

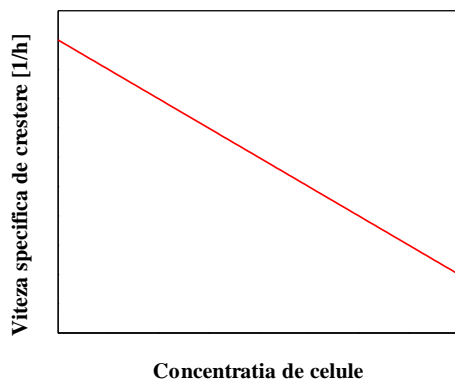


Figura 2.1.1.6 Dependenta $\mu=\mu(X)$ cf. ecuatiei Verhulst

O ecuatie mai realista, care exprima si limitarea prin concentratia substratului conform unei cinetici Monod a fost introdusa de Meyrath (Meyrath, 1973):

$$\mu(X,S) = \mu_{\max} \frac{S_0 - \frac{X}{Y}}{K_S + S_0 - \frac{X}{Y}} \quad 2.1.1.2.17$$

unde Y = randamentul de transformare a substratului la celule.

In termeni de dinamica de populatie, din ecuatiei lui Verhulst a derivat modelul cinetic al lui Verhulst - Pearl, care poate fi utilizat in locul ecuatiei cresterii nelimitate de substrat a unei populatii:

$$N = N_0 \exp(\mu_{\max} t)$$

$$= \frac{N_0 \mu_{\max}^0 \exp(\mu_{\max}^0 t)}{\mu_{\max}^0 + m_x N_0 (\exp(\mu_{\max}^0 t) - 1)} \quad 2.1.1.2.18$$

Cel mai cunoscut si mai utilizat model $\mu = f(X, S)$ aplicat pentru simplitatea lui si pentru faptul ca respecta o cinetica cu saturatie in functie de concentratia substratului limitator, este modelul Contois, sau Contois - Fujimoto (Contois, 1959):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_X X + S} \quad 2.1.1.2.19$$

Pentru S constant se manifesta inhibitia lui μ la valori ridicate ale concentratiei celulare.

Preluand modul de gandire al cineticii chimice, Kono si Asai (Kono, Asai, 1968) au derivat o ecuatie de crestere care include asa numitul *coeficient al activitatii de consum pentru crestere* Φ , redefinit de Bastin ca fiind *coeficientul aparent al activitatii de crestere*:

$$\mu(X) = K_X \Phi \quad 2.1.1.2.170$$

unde K_X = constanta de viteza de crestere (are diferite valori in functie de etapa de crestere in cultura discontinua);

$\Phi = 0$, faza de inductie;

$\Phi = \varphi$, cu $0 < \varphi < 1$, faza de tranzitie, $\varphi = \alpha t$;

$\Phi = 1$, faza exponentiala de crestere

Ideea de baza a lui Kono a fost o ecuatie generala de crestere:

$$\frac{dX}{dt} = k_1^i k_2^j C_1^i C_2^j - k_3 C_3 \quad 2.1.1.2.21$$

unde: C_1 = concentratia substratului limitator

C_2 = concentratia co-substratului;

C_3 = concentratia produsului;

X_{crit} = concentratia celulara critica.

Ordinul de reactie se modifica la X_{crit} ; astfel: $i = 1$ si $j = 0$ pentru $X < X_{\text{crit}}$, $i = 0$ si $j = 1$ pentru $X > X_{\text{crit}}$.

Alte modele interesante pentru $\mu = f(X, S)$ sunt:

- modelul Nihtila si Virkkunen (Moser, 1988)

$$\mu(X, S) = K_1 \frac{C(t)}{X(t)}$$

2.1.1.2.22

$$\frac{dc}{dt} = K_2 S(t)(X(t) - C(t)) - K_3 C(t)$$

unde: $C(t)$ = concentratia complexului celula-substrat;

K_1, K_2, K_3 = constante

- modelul Kishimoto (Kishimoto, 1978):

$$\mu(X, S) = \bar{\mu} + Q_1(X(t) - \bar{X}) + Q_2(S(t) - \bar{S})$$

2.1.1.2.23

cu $\bar{\mu}, \bar{X}, \bar{S}$ = valorile de medie aritmetica;

Q_1, Q_2 = coeficienti de regresie.

- modelul Staniskis si Levisauskas (Moser, 1988):

$$\mu(X, S) = k_1 S(t) - k_2 X(t)$$

2.1.1.2.24

c) Cinetica cu inhibitie prin concentratia substratului

In multe cazuri de inhibitie, ecuatiile modelului cinetic sunt ca si modelul Monod, derivate din teoriile inhibitei reactiilor enzimatic. De aceea, aceste ecuatii sunt mai putin general valabile, ele putandu-se substitui unele cu altele in functie de adecvanta la realitate a fenomenului experimental.

Din numarul mare de ecuatii cinetice cu inhibitie prin substrat, cele mai uzuale sunt:

- modelul Andrews (Andrews - Noack), inhibitie prin substrat in regim chemostat (Andrews, 1968):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{1}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}} = \frac{S}{K_s + S} \frac{1}{1 + \frac{S}{K_i}}$$

2.1.1.2.25

unde: K_i = constante de inhibitie in raport cu substratul. Reprezentarea grafica este data in fig. 2.1.1.7.

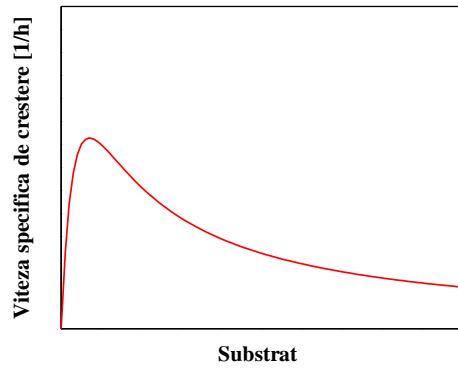


Figura 2.1.1.7 Dependenta $\mu=\mu(X)$ cf. ecuatiei Andrews

- modelul Webb (Webb, 1963):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S(1 + \frac{S}{K_S^I})}{S + K_S \frac{S^2}{K_S^I}} \quad 2.1.1.2.26$$

unde: K_S^I = constanta de inhibitie in raport cu substratul.

- modelul Yano (multi complexi inactivi enzima - substrat) (Yano *et al.*, 1966)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{1}{1 + \frac{K_S}{S} + \sum_j (\frac{S}{K_{i,S}})^j} \quad 2.1.1.2.27$$

unde: $K_{i,S}$ = constanta de inhibitie in raport cu substratul.

- modelul Aiba (Aiba, Hara, 1965):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} e^{-\frac{S}{K_{i,S}}} \quad 2.1.1.2.28$$

Reprezentarea grafica a modelului Aiba este data in figura de mai jos:

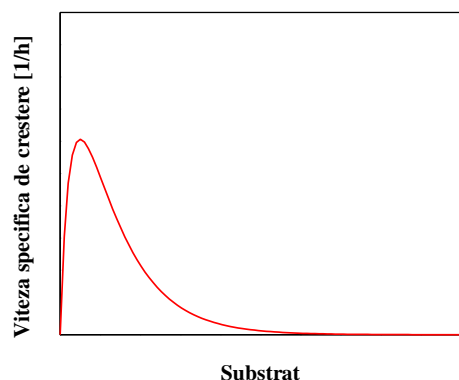


Figura 2.1.1.8 Dependenta $\mu=\mu(S)$ cf. ecuatiei Aiba

Edwards (Edwards, 1970) a analizat ecuatiile (2.1.1.25 - 2.1.1.28) pentru o serie de date experimentale de crestere din literatura si a demonstrat ca nu sunt criterii obiective pentru a realiza o clasificare a lor in functie de gradul de generalizare. De aceea el a recomandat modelul Andrews ca cel mai simplu si mai usor de folosit.

Un tip diferit de ecuatie pentru a exprima cinetica cu inhibitie prin substrat a fost propusa de Wayman si Tseng (Wayman, Tseng, 1976). Concentratiile de substrat mai mari decat o concentratie prag S_C inhiba cresterea liniara conform modelului:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} - K_{i,S}(S - S_C) \quad 2.1.1.2.29$$

Aceasta relatie se poate folosi cand curba $\mu = f(S)$ nu are o forma de tip Andrews ci are loc mai degraba o descrestere liniara a lui μ (fig. 2.1.1.9).

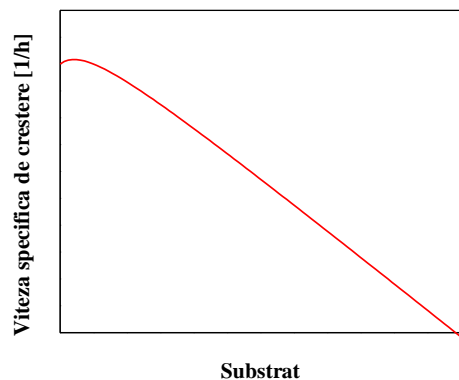


Figura 2.1.1.9 Dependenta $\mu=\mu(S)$ cf. ecuatiei Waymann si Tseng

d) $\mu = f(S,P)$ Cinetica de crestere cu inhibitie prin concentratia de produs.

Hinshelwood (Hinshelwood, 1946) distinge mai multe tipuri de efecte de inhibiție exercitate de concentrația de produs asupra vitezei specifice de creștere: descreștere liniară, descreștere exponențială, stopare bruscă a creșterii, descreșterea liniară / exponențială începând cu o concentrație de prag a lui P. Când nu apare o concentrație prag de la care începe să se manifeste inhibiția și descreșterea este liniară în raport cu P, modelul Hinshelwood (Hinshelwood- Dagley) poate exprima cantitativ fenomenul:

$$\mu(S, P) = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} (1 - kP) \quad 2.1.1.2.180$$

unde: k = constanta de inhibiție în raport cu produsul P.

Această relație a fost modificată astfel:

- modelul Holzberg (Holzberg *et al.*, 1967):

$$\mu(P) = \mu_{\max} - K_1(P - K_2) \quad 2.1.1.2.31$$

unde: K_1, K_2 = constante pozitive.

Reprezentarea grafică a modelului Holzberg este dată în figura de mai jos:

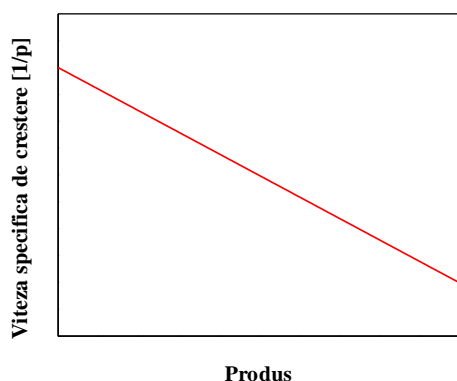


Figura 2.1.1.10 Dependența $\mu=\mu(P)$ cf. ecuației Holzberg

- modelul Ghose și Tyagi (Ghose, Tyagi, 1979) fig. 2.1.1.11:

$$\mu(P) = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) \quad 2.1.1.2.32$$

unde: P_{\max} = concentrația maximă de produs din mediu.

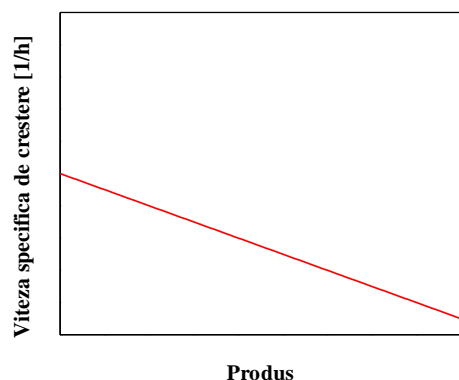


Figura 2.1.1.11 Dependenta $\mu=\mu(P)$ cf. ecuatiei Ghose si Tyagi

O ecuatie de tip diferit a fost introdusa de Aiba (Aiba, 1982), fig. 2.1.12:

$$\mu(P) = \mu_{\max} e^{-K_1 P(t)} \quad 2.1.1.2.33$$

unde: $K_1 = \text{constanta}$

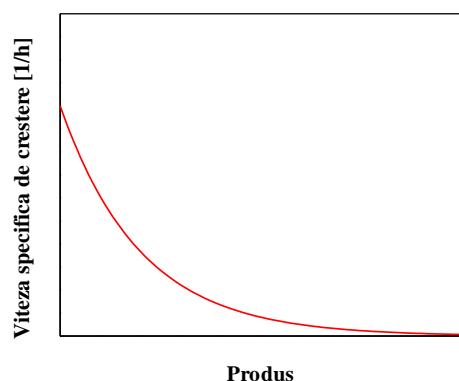


Figura 2.1.1.12 Dependenta $\mu=\mu(P)$ cf. ecuatiei Aiba

sau o varianta a ecutiei (2.1.1.2.33) - modelul Aiba si Shoda (Aiba, Shoda, 1989):

$$\mu(S, P) = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} e^{-KP} \quad 2.1.1.2.34$$

In sfarsit, o ecuatie de tip $\mu = f(P, S)$ poate fi modelata prin analogie cu cinetica enzimatica. Ierusalimsky (Ierusalimsky, 1967) recomanda in acest sens o ecuatie de tipul:

$$\mu(P) = \frac{\mu_{\max} P(t)}{K_{i,P} + P(t)} \quad 2.1.1.2.35$$

sau, mai detaliat:

$$\mu(S, P) = \frac{\mu_{\max} P(t)}{K_{i,P} + P(t)} \frac{S}{K_S + S} \quad 2.1.1.2.36$$

unde: $K_{i,P}$ = constanta de inhibitie in raport cu P.

Este de mentionat faptul ca ecuatia (2.1.1.2.36) este cel mai folosit model pentru cinetica cu inhibitie in raport cu produsul.

e) Influenta oxigenului dizolvat ca al doilea substrat asupra vitezei specifice de crestere.

In general, pentru oxigenul dizolvat, considerat al doilea substrat de crestere (Eiki, Osono, 1990) se utilizeaza un model de tip cinetica cu saturatie; de aceea cel mai utilizat pentru o dependenta $\mu(S, C)$ este modelul Olsson (Moser, 1988):

$$\mu(S, C) = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{C}{K_C + C} \quad 2.1.1.2.37$$

in care: K_C = constanta de saturatie in raport cu oxigenul;
sau ceva mai complicat, modelul Williams (Williams, 1969):

$$\begin{aligned} \mu(S, C, P) = & \left(\frac{K_1 S}{K_S + S} \frac{K_2 P}{K_P + P} \right) \cdot \\ & \cdot \left(\frac{C}{K_C + C} + K_3 C - K_4 \right) \end{aligned} \quad 2.1.1.2.38$$

f) Influenta altor factorii de mediu asupra vitezei specifice de crestere.

Pentru efectul **pH**-ului (Ben-Hassan *et al.*, 1991) in general se propun modele simple de tipul:

- modelului Andreyeva si Biriukov (dezvoltare polinomiala) (Andreyeva, Biriukov, 1973):

$$\mu(pH) = a \cdot (pH)^2 + b \cdot (pH) + c \quad 2.1.1.2.39$$

- modelului Jackson si Edwards (cu inhibitie) (Moser, 1988):

$$\mu(H^+) = \frac{H^+}{K_H + H^+ + K_i (H^+)^2} \quad 2.1.1.2.40$$

Pentru efectul simultan $\mu = f(S, pH)$ autorii propun varinate ale modelelor (2.1.1.2.39) si (2.1.1.2.40) dintre care sunt prezentate cele mai importante:

- Andreyeva si Biriukov (Andreyeva, Biriukov, 1973):

$$\mu(S, H^+) = \mu_{\max} \frac{SH^+}{K_S + SH^+ + \frac{(SH^+)^2}{K_i}}$$

2.1.1.2.41

sau:

$$\mu(S, H^+) = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_H}{K_H + H^+} \quad 2.1.1.2.42$$

- Jackson si Edwards (Moser, 1988):

$$\begin{aligned} \mu(S, H^+) &= \\ &= \mu_{\max} \frac{S}{(1 + \frac{K_2}{H^+} + \frac{H^+}{K_1})(K_H + S + \frac{S^2}{K_i(1 + \frac{K_3}{H^+})})} \end{aligned} \quad 2.1.1.2.43$$

Influenta **temperaturii** este modelata printr-o lege de tip Arrhenius, conform modelului Topiwala si Sinclair (Topiwala, Sinclair, 1971):

$$\mu(T) = \begin{cases} A_1 e^{-\frac{E_1}{RT}} - A_{21} e^{-\frac{E_{21}}{RT}} - A_3, & T \in [T_1, T_2] \\ 0 & T \notin [T_1, T_2] \end{cases}$$

2.1.1.2.44

In sfarsit Constantinides (Constantinides *et al.* 1970) modeleaza $\mu(T, X)$ introducand ecuatia:

$$\mu(T, X) = b_1(T) \left(1 - \frac{X}{b_2(T)}\right) \quad 2.1.1.2.45$$

unde:

$$b_1(T) = K_1 - K_2(T - K_3)^2 \quad 2.1.1.2.46$$

si:

$$b_2(T) = K_4 - K_5(T - K_6)^2 \quad 2.1.1.2.47$$

g) $\mu(S_1, S_2)$ Cinetica de crestere pe mai multe substrate

Oxygenul dizolvat a fost considerat un al doilea substrat de crestere prezentandu-se in consecinta modelele $\mu(S, C)$ in paragraful e). Prezinta insa o importanta mare si modelele cinetice de crestere pe mai multe surse de carbon din mediul de cultura (Chiu *et al.*, 1972). Pe cand cresterea in urma

consumului secvențial sau consecutiv a două sau mai multor surse de carbon, cunoscut sub numele de *diauxie* (Monod) poate fi analizată adesea ca două sau mai multe faze separate de creștere ce au loc pe parcursul aceluiași bioproces, cazul utilizării simultane a două sau mai multe substraturi (tratarea biologică a apelor uzate), este mai dificil de descris matematic (Chiu *et al.*, 1972).

2.1.1.3. Modele cinetice nestructurate pentru formarea produsului

Cinetica de formare a produsului se ia în considerare în raport cu cinetica creșterii. Până în prezent, din acest punct de vedere, a rămas valabilă clasificarea lui Gaden (Gaden, 1959) ce distinge patru tipuri de cinetica de formare a produsului:

Tipul 0. Producția are loc chiar în celulele în fază staționară care folosesc numai o mică parte din substrat pentru nevoile lor metabolice. Celulele microbiene funcționează numai ca purtătoare ale enzimelor necesare biosintezei produsului, d.e. transformările steroizilor și sinteza vitaminei E de către *Saccharomyces cerevisiae*.

Tipul 1. Acumularea produsului este direct asociată cu creșterea (*produs asociat creșterii*). Este cazul producerii metabolitilor primari, formarea produsului fiind legată de metabolismul energetic, d.e. producerea acidului gluconic, obținerea enzimelor respirației și creșterii.

Tipul 2. Acumularea produsului este parțial asociată cu creșterea (*produs parțial asociat creșterii*), existând o legătură indirectă cu metabolismul energetic, d.e. producerea acidului citric, obținerea aminoacizilor prin biosinteză.

Tipul 3. Acumularea produsului nu este asociată cu creșterea și nici nu există o conexiune directă sau indirectă cu metabolismul energetic primar (*produs neasociat creșterii*). Obținerea metabolitilor secundari (streptomicină, penicilină) este un exemplu de cinetica de acest tip.

Recunoașterea tipului de cinetica de formare a produsului se face conform diagramelor caracteristice r_s , r_x , $r_p = f(t)$ și în special considerând vitezele specifice q_s , μ , q_p .

Diagrama evoluției în timp a vitezelor specifice într-un bioproces poartă numele de *diagrama de cuantificare*. Ea oferă imaginea cea mai corectă a avansării vitezelor caracteristice și este fundamentală pentru stabilirea unor modele matematice adecvate.

În figura de mai jos sunt prezentate grafic tipurile de relații cinetice liniare între viteza specifică de creștere μ și viteza de producție q_p .

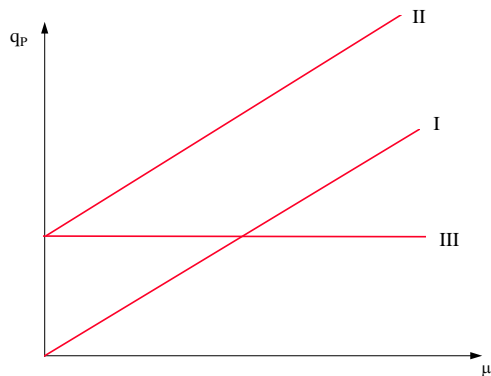


Figura 2.1.14 - Dependenta vitezei specifice de crestere de viteza de formare a produsului pentru cele trei tipuri principale de cinetica (cf. Gaden)

Tipul 1. Formarea produsului asociat cresterii poate fi descrisa prin relatiile caracteristice:

$$r_p = Y_{p/X} r_X \quad 2.1.1.2.48$$

si:

$$q_p = Y_{p/X} \mu \quad 2.1.1.2.49$$

Similar, Constantidines (Constantinides *et al.* 1970):

$$r_p = Y_{p/S} r_S \quad 2.1.1.2.50$$

In final rezulta urmatoarea relatie intre coeficientii de conversie:

$$\frac{Y_{p/S}}{Y_{X/S}} = Y_{p/X} \quad 2.1.1.2.51$$

Considerand pentru q_p o dezvoltare de tip Monod, se obtine o functie hiperbolica pentru viteza de productie in cazul asocierii produsului cu cresterea:

$$r_p = q_p X = q_{p_{\max}} \frac{S}{K_s + S} X \quad 2.1.1.2.52$$

Tipul 3. In cazul unui produs neasociat cresterii nu exista nici o relatie directa cu cresterea; ca o alternativa in acest caz, dependenta $r_p = f(X)$ este adesea reprezentata cu succes prin relatia:

$$r_p = k_p X \quad 2.1.1.2.53$$

Formarea produsului poate fi insa cuantificata prin dependenta de viteza de utilizare a substratului printr-o relatie similara ecuatiei (2.1.1.2.50).

Tipul 2. Cand formarea produsului este partial asociata cresterii si partial independenta de aceasta, este in general valabila o combinatie a ecuatiilor (2.1.1.2.49) si (2.1.1.2.53), conform propunerii lui Luedeking si Piret (Luedeking, Piret, 1959):

$$q_P = Y_{P/X}\mu + k_{pr} \quad 2.1.1.2.54$$

Ecuatia generala (2.1.1.2.54) impreuna cu ecuatiile (2.1.1.2.49) si (2.1.1.2.53) drept cazuri limita, sugereaza o ecuatie logistica.

Kono si Asai (Kono, Asai, 1968) au introdus o alta ecuatie generala pentru corelarea productiei cu cresterea formulata cu ajutorul coeficientului de consum Φ (gandit ca un coeficient aparent al activitatii de crestere):

$$r_P = k_{P_1}X\Phi + k_{P_2}X(1 - \Phi) \quad 2.1.1.2.55$$

Aceasta ecuatie se alatura ecuatiei (2.1.1.2.20) ce descrie evolutia vitezei specifice de crestere. Prin valorile parametrului $k_{P_j}, > 0$ sau $k_{P_j}, < 0, j = 1, 2$ se particularizeaza cazurile anterioare de cinetica de formare a produsului descrise de Gaden.

Pentru cazuri speciale, au fost propuse ecuatii cinetice adecvate datelor experimentale (Shu, 1961, Fishman, Birjukov, 1974, Ryu, Humphrey, 1972, Brown, Vass, 1981).

2.1.2. Modele structurate

Cele mai importante modele structurale sunt corelate cu structura chimica celulara (chimic structurate). Williams si Ramkrishna au propus printre primii modele cu doua componente. Williams (Williams, 1975) a considerat concentratia componentelor R cu rol in sinteza celulara (in principal ARN) si concentratia componentelor D cu rol structural - genetic (ADN si proteine), pe cand Ramkrishna (Ramkrishna, 1969) a impartit celula in masa G (ADN si ARN) si masa D (proteine). Fredrickson (Fredrickson, 1970) a analizat ulterior aceste modele demonstrand invaliditatea lor deoarece in formularea expresiilor cinetice nu erau utilizate concentratiile intrinseci ale componentelor structurale luate in considerare. Totusi modelele Williams si Ramkrishna raman importante datorita modificari conceptuale introduse in tratarea dinamicii microbiene.

Formularea riguroasa a unui model structural chimic implica introducerea in ecuatiile cinetice a concentratiei intrinseci a unui component al structurii luate in considerare, ceea ce inseamna cantitatea de component/unitatea de volum celular sau unitatea de masa celulara; in acest fel se renunta la concentratiile extrinseci din modelele nestructurate, in care masa celulara considerata nestructurata era exprimata in unitati de concentratie raportate la volumul reactorului.

Fredrickson introduce in acest sens bilantul general intr-un bioreactor discontinuu prin ecuatia de tipul:

$$\frac{d(m\hat{V}c_j)}{dt} = m\hat{V}\sum_i r_{ij} \quad 2.1.2.1$$

unde: m = biomasa totala la timpul t ;

\hat{V} = volumul ocupat de celule pe unitatea de masa celulara;
 C_j = masa componentului j pe unitatea de volum celular (concentratia intrinseca a componentului j);
 r_j = viteza de aparitie/disparitie in procesul i a componentului j raportata la volumul celular.

Daca \hat{V} este constant si se considera prin similitudine cu cinetica nestructurata:

$$\mu = \frac{1}{m} \frac{dm}{dt} \quad 2.1.2.2$$

se obtine:

$$\frac{dc_j}{dt} = \sum_i r_{ij} - \mu C_j \quad 2.1.2.3$$

Termenul μC_j poate fi neglijat in majoritatea modele structurale.

In loc de C_j se poate folosi concentratia X_j (masa componentului j raportata la unitatea de masa celulara), conform relatiei:

$$X_j = C_j \hat{V} \quad 2.1.2.4$$

Modelele structurale si-au gasit o aplicare adecvata si in tratarea culturilor mixte, structurarea chimica fiind inlocuita cu divizarea in speciile componente (modele de populatie).

Harder si Roels au trecut in revista aplicatiile in biotehnologie ale modelelor simple structurale (Harder, Roels, 1981). Autorii prezinta in primul rand principiile de baza folosite in constructia modelelor structurale, derivate in special din biologia moleculara:

- modificarile concentratiilor unor substrate sau intermediari determina schimbari in vitezele de reactie in care sunt implicate aceste substante;
- interactiunile enzimelor cu unele molecule mici, efectorii, conduc la modificari in conformatia enzimelor si in consecinta a actiunii lor catalitice;
- concentratiile diferitelor macromolecule celulare se adapteaza la schimbarea conditiilor de mediu prin modificarea vitezei lor de sinteza (d.e. concentratia ARN creste in mod deosebit odata cu cresterea ratei de dilutie in cultura continua), in urma exercitarii unor mecanisme de control genetic;
- selectia naturala este o modalitate de adaptare; prin variatia genetica in interiorul unei specii se poate selecta un individ cu proprietati ce-i ofera un avantaj in mediul inconjurator considerat;
- schimbarile de mediu pot induce modificari in raportul dintre diferitele specii prezente intr-o cultura mixta.

Pornind de la aceste principii si de la conceptul de timp de relaxare, autorii propun o serie de modele structurale:

- cresterea biomasei conform unui model bicompartimental;
- cresterea biomasei conform unui model tricompartimental;

- sinteza enzimelor supuse unui control genetic (modelul operonului, al represiei catabolice, al cresterii diauxice).

Deși valabilitatea diferitelor ipoteze ale modelului este discutabilă și forma ecuațiilor cinetice a fost supusă criticii, metoda teoretică de deducere a unui model structural chimic are valoare și în viitor - pentru situații în care compoziția unui microorganism se modifică sub influența mediului, această modificare afectând comportamentul culturii la un nivel semnificativ. În același timp, modelele cinetice structurale își găsesc o aplicație interesantă în descrierea dinamicii bioprocesului cu celule modificate genetic. Astfel, Ryu și Kim (Ryu, Kim, 1992) au studiat un bioproces cu celule recombinante, unde evoluează celule purta-toare de plasmide continuând informații gene-tice privind producția unui metabolit de interes alături de celule lipsite de aceste plasmide.

Pentru cinetica formării produsului se propune ecuația:

$$q_p = k_0 \varepsilon G_p (\mu^+ + b) \quad 2.1.2.5$$

unde: k_0 = constanta vitezei globale de biosinteză

ε = eficiența exprimării genetice;

G_p = concentrația ADN în plasmide;

μ^+ = viteza specifică de creștere a celulelor purta-toare de plasmide;

b = constantă.

Această ecuație poate fi comparată cu modelul cinetic nestructurat al lui Luedeking - Piret (2.1.1.2.54), ce poate fi reexprimat pentru fermentația cu celule recombinante:

$$\frac{dP}{dt} = A \frac{dX^+}{dt} + BX^+ \quad 2.1.1.2.54'$$

unde: X^+ = concentrația celulelor purta-toare de plasmide

În acest mod coeficienții A și B din ecuația de mai sus prin structurarea în ecuația (2.1.3.5) capătă o semnificație biologică clară:

$$\begin{aligned} A &= k_0 \varepsilon G_p \\ B &= Ab \end{aligned} \quad 2.1.2.6$$

În continuare, în funcție de modelul cinetic propus, se pot introduce strategii de reglare a temperaturii optime de producție sau a ratei de diluție.

2.1.3. Modele cinetice segregate (corpusulare)

Dincolo de structurarea pe baza compoziției chimice a unui model, literatura de specialitate nu deosebește cu claritate alte tipuri de modele structurate de modelele segregate.

Shuler (Shuler, 1985) definește ca modele segregate, dar nestructurate (considerând compoziția chimică) modelele care pornesc de la prezumția că o unică variabilă (varsta celulelor, dimensiunea celulară, etc.) poate descrie complet starea unei celule în sensul că toate celulele de aceeași vârstă sau dimensiune au aceeași compoziție și același potențial productiv.

De asemenea, Bley (Bley, 1987) propune un model considerând celulele de drojdie aflate în două stări fiziologice distincte - celule neînmugurite / celule înmugurite. Cele două stări fiziologice diferă prin μ , dS/dt , eficiența în producerea biomasei, etc. Dacă se consideră concentrațiile X_1 și X_2 pentru celulele neînmugurite și respectiv înmugurite, S fiind concentrația substratului, atunci în cazul unui proces continuu, în care tranziția de la o stare la alta este în principal influențată de concentrația S , se propun relațiile:

$$\begin{cases} \frac{dX_1}{dt} = (\mu_1(S) - k_1(S) - D)X_1 + k_2(S)X_2 \\ \frac{dX_2}{dt} = (\mu_2(S) - k_2(S) - D)X_2 + k_1(S)X_1 \\ \frac{dS}{dt} = (S_0 - S)D - \alpha_1(S)X_1 - \alpha_2(S)X_2 \end{cases}$$

2.1.3.1

În acest model $k_1(S)$ reprezintă viteza specifică a trecerii de la starea X_1 la X_2 , iar $k_2(S)$ - viteza procesului invers; $\alpha_1(S)$ și $\alpha_2(S)$ reprezintă coeficienții de randament de conversie S în X_1 și respectiv S în X_2 .

Modelele structurate și segregate sunt încă insuficient aplicate în modelarea bioproceselor fiind preluate din biologia moleculară și fiziologie, unde au un rol important în investigarea și validarea unor mecanisme celulare (Sonnleitner, Fiechter, 1989). Pentru dezvoltarea și utilizarea lor în conducerea bioproceselor sunt necesare:

- evoluția rapidă a tehnicilor analitice (Sonnleitner, 1992) nedistructive (care să nu interfere cu mecanismele funcționale și reglările interne ale celulei) folosindu-se proprietățile optice, electrice sau electromagnetice ale celulei sau a unor componente celulare (fluorimetrie, rezonanță magnetică nucleară, spectroscopie IR);
- progrese însemnate în modelarea matematică în conexiune cu teorii despre mecanismele celulare (van Breusegem, Bastin, 1992).

e) Influenta oxigenului dizolvat ca al doilea substrat asupra vitezei specifice de crestere.

In general, pentru oxigenul dizolvat, considerat al doilea substrat de crestere (Eiki, Osono, 1990) se utilizeaza un model de tip cinetica cu saturatie; de aceea cel mai utilizat pentru o dependenta $\mu(S,C)$ este modelul Olsson (Moser, 1988):

$$\mu(S,C) = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{C}{K_C + C} \quad 2.1.1.2.37$$

in care: K_C = constanta de saturatie in raport cu oxigenul;
sau ceva mai complicat, modelul Williams (Williams, 1969):

$$\mu(S,C,P) = \left(\frac{K_1 S}{K_S + S} \frac{K_2 P}{K_P + P} \right) \cdot \left(\frac{C}{K_C + C} + K_3 C - K_4 \right) \quad 2.1.1.2.38$$

f) Influenta altor factorii de mediu asupra vitezei specifice de crestere.

Pentru efectul **pH**-ului (Ben-Hassan *et al.*, 1991) in general se propun modele simple de tipul:

- modelului Andreyeva si Biriukov (dezvoltare polinomiala) (Andreyeva, Biriukov, 1973):

$$\mu(pH) = a \cdot (pH)^2 + b \cdot (pH) + c \quad 2.1.1.2.39$$

- modelului Jackson si Edwards (cu inhibitie) (Moser, 1988):

$$\mu(H^+) = \frac{H^+}{K_H + H^+ + K_i (H^+)^2} \quad 2.1.1.2.40$$

Pentru efectul simultan $\mu = f(S,pH)$ autorii propun varinate ale modelelor (2.1.1.2.39) si (2.1.1.2.40) dintre care sunt prezentate cele mai importante:

- Andreyeva si Biriukov (Andreyeva, Biriukov, 1973):

$$\mu(S, H^+) = \mu_{\max} \frac{SH^+}{K_S + SH^+ + \frac{(SH^+)^2}{K_i}} \quad 2.1.1.2.41$$

sau:

$$\mu(S, H^+) = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_H}{K_H + H^+} \quad 2.1.1.2.42$$

- Jackson si Edwards (Moser, 1988):

$$\mu(S, H^+) = \mu_{\max} \frac{S}{(1 + \frac{K_2}{H^+} + \frac{H^+}{K_1})(K_H + S + \frac{S^2}{K_i(1 + \frac{K_3}{H^+})})} \quad 2.1.1.2.43$$

Influenta **temperaturii** este modelata printr-o lege de tip Arrhenius, conform modelului Topiwala si Sinclair (Topiwala, Sinclair, 1971):

$$\mu(T) = \begin{cases} A_1 e^{-\frac{E_1}{RT}} - A_{21} e^{-\frac{E_{21}}{RT}} - A_3, & T \in [T_1, T_2] \\ 0 & T \notin [T_1, T_2] \end{cases} \quad 2.1.1.2.44$$

In sfarsit Constantinides (Constantinides *et al.* 1970) modeleaza $\mu(T, X)$ introducand ecuatia:

$$\mu(T, X) = b_1(T) \left(1 - \frac{X}{b_2(T)}\right) \quad 2.1.1.2.45$$

unde:

$$b_1(T) = K_1 - K_2(T - K_3)^2 \quad 2.1.1.2.46$$

si:

$$b_2(T) = K_4 - K_5(T - K_6)^2 \quad 2.1.1.2.47$$

g) $\mu(S_1, S_2)$ Cinetica de crestere pe mai multe substraturi

Oxigenul dizolvat a fost considerat un al doilea substrat de crestere prezentandu-se in consecinta modelele $\mu(S, C)$ in paragraful e). Prezinta insa o importanta mare si modelele cinetice de crestere pe mai multe surse de carbon din mediul de cultura (Chiu *et al.*, 1972). Pe cand cresterea in urma consumului secvential sau consecutiv a doua sau mai multor surse de carbon, cunoscut sub numele de *diauxie* (Monod) poate fi analizata adesea ca doua sau mai multe faze separate de crestere ce au loc pe parcursul aceluiasi bioproces, cazul utilizarii simultane a doua sau mai multe substraturi (tratarea biologica a apelor uzate), este mai dificil de descris matematic (Chiu *et al.*, 1972).

2.1.1.3. Modele cinetice nestructurate pentru formarea produsului

Cinetica de formare a produsului se ia in considerare in raport cu cinetica cresterii. Pana in prezent, din acest punct de vedere, a ramas valabila clasificarea lui Gaden (Gaden, 1959) ce distinge patru tipuri de cinetica de formare a produsului:

Tipul 0. Productia are loc chiar in celulele in faza stationara care folosesc numai o mica parte din substrat pentru nevoile lor metabolice. Celulele microbiene functioneaza numai ca purtatoare ale enzimelor necesare biosintezei produsului, d.e. transformarile steroizilor si sinteza vitaminei E de catre *Saccharomyces cerevisiae*.

Tipul 1. Acumularea produsului este direct asociată cu creșterea (*produs asociat creșterii*). Este cazul producerii metabolitilor primari, formarea produsului fiind legată de metabolismul energetic, d.e. producerea acidului gluconic, obținerea enzimelor respirației și creșterii.

Tipul 2. Acumularea produsului este parțial asociată cu creșterea (*produs parțial asociat creșterii*), existând o legătură indirectă cu metabolismul energetic, d.e. producerea acidului citric, obținerea aminoacizilor prin biosinteză.

Tipul 3. Acumularea produsului nu este asociată cu creșterea și nici nu există o conexiune directă sau indirectă cu metabolismul energetic primar (*produs neasociat creșterii*). Obținerea metabolitilor secundari (streptomicina, penicilina) este un exemplu de cinetica de acest tip.

Recunoașterea tipului de cinetica de formare a produsului se face conform diagramelor caracteristice r_S , r_X , $r_P = f(t)$ și în special considerând vitezele specifice q_S , μ , q_P .

Diagrama evoluției în timp a vitezelor specifice într-un bioproces poartă numele de *diagrama de cuantificare*. Ea oferă imaginea cea mai corectă a avansării vitezelor caracteristice și este fundamentală pentru stabilirea unor modele matematice adecvate.

În figura de mai jos sunt prezentate grafic tipurile de relații cinetice liniare între viteza specifică de creștere μ și viteza de producție q_P .

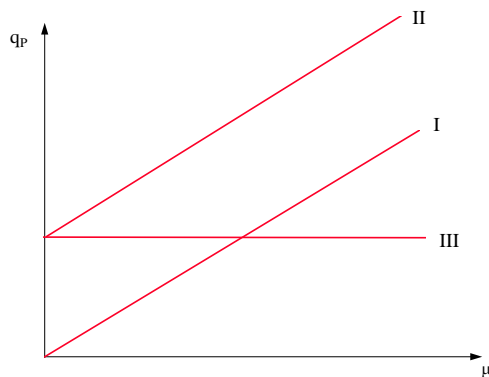


Figura 2.1.14 - Dependența vitezei specifice de creștere de viteza de formare a produsului pentru cele trei tipuri principale de cinetica (cf. Gaden)

Tipul 1. Formarea produsului asociat creșterii poate fi descrisă prin relațiile caracteristice:

$$r_P = Y_{P/X} r_X \quad 2.1.1.2.48$$

și:

$$q_P = Y_{P/X} \mu \quad 2.1.1.2.49$$

Similar, Constantinides (Constantinides *et al.* 1970):

$$r_P = Y_{P/S} r_S \quad 2.1.1.2.50$$

În final rezulta următoarea relație între coeficienții de conversie:

$$\frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} = Y_{P/X} \quad 2.1.1.2.51$$

Considerând pentru q_p o dezvoltare de tip Monod, se obține o funcție hiperbolică pentru viteza de producție în cazul asocierii produsului cu creșterea:

$$r_p = q_p X = q_{p_{\max}} \frac{S}{K_s + S} X \quad 2.1.1.2.52$$

Tipul 3. În cazul unui produs neasociat creșterii nu există nici o relație directă cu creșterea; ca o alternativă în acest caz, dependența $r_p = f(X)$ este adesea reprezentată cu succes prin relația:

$$r_p = k_p X \quad 2.1.1.2.53$$

Formarea produsului poate fi însă cuantificată prin dependența de viteza de utilizare a substratului printr-o relație similară ecuației (2.1.1.2.50).

Tipul 2. Când formarea produsului este parțial asociată creșterii și parțial independentă de aceasta, este în general valabilă o combinație a ecuațiilor (2.1.1.2.49) și (2.1.1.2.53), conform propunerii lui Luedeking și Piret (Luedeking, Piret, 1959):

$$q_p = Y_{P/X} \mu + k_{pr} \quad 2.1.1.2.54$$

Ecuația generală (2.1.1.2.54) împreună cu ecuațiile (2.1.1.2.49) și (2.1.1.2.53) drept cazuri limită, sugerează o ecuație logistică.

Kono și Asai (Kono, Asai, 1968) au introdus o altă ecuație generală pentru corelarea producției cu creșterea formulată cu ajutorul coeficientului de consum Φ (găndit ca un coeficient aparent al activității de creștere):

$$r_p = k_{p_1} X \Phi + k_{p_2} X (1 - \Phi) \quad 2.1.1.2.55$$

Această ecuație se alătură ecuației (2.1.1.2.20) ce descrie evoluția vitezei specifice de creștere. Prin valorile parametrului k_{p_j} , > 0 sau k_{p_j} , < 0 , $j = 1, 2$ se particularizează cazurile anterioare de cinetica de formare a produsului descrise de Gaden.

Pentru cazuri speciale, au fost propuse ecuații cinetice adecvate datelor experimentale (Shu, 1961, Fishman, Birjukov, 1974, Ryu, Humphrey, 1972, Brown, Vass, 1981).

2.1.2. Modele structurate

Cele mai importante modele structurale sunt corelate cu structura chimică celulară (chimic structurate). Williams și Ramkrishna au propus printre primii modele cu două componente. Williams (Williams, 1975) a considerat concentrația componentelor R cu rol în sinteza celulară (în

principal ARN) si concentratia componentelor D cu rol structural - genetic (ADN si proteine), pe cand Ramkrishna (Ramkrishna, 1969) a impartit celula in masa G (ADN si ARN) si masa D (proteine). Fredrickson (Fredrickson, 1970) a analizat ulterior aceste modele demonstrand invaliditatea lor deoarece in formularea expresiilor cinetice nu erau utilizate concentratiile intrinseci ale componentelor structurale luate in considerare. Totusi modelele Williams si Ramkrishna raman importante datorita modificari conceptuale introduse in tratarea dinamicii microbiene.

Formularea riguroasa a unui model structural chimic implica introducerea in ecuatiile cinetice a concentratiei intrinseci a unui component al structurii luate in considerare, ceea ce inseamna cantitatea de component/unitatea de volum celular sau unitatea de masa celulara; in acest fel se renunta la concentratiile extrinseci din modelele nestructurate, in care masa celulara considerata nestructurata era exprimata in unitati de concentratie raportate la volumul reactorului.

Fredrickson introduce in acest sens bilantul general intr-un bioreactor discontinuu prin ecuatie de tipul:

$$\frac{d(m\hat{V}c_j)}{dt} = m\hat{V}\sum_i r_{ij} \quad 2.1.2.1$$

unde: m = biomasa totala la timpul t ;

\hat{V} = volumul ocupat de celule pe unitatea de masa celulara;

C_j = masa componentului j pe unitatea de volum celular (concentratia intrinseca a componentului j);

r_j = viteza de aparitie/disparitie in procesul i a componentului j raportata la volumul celular.

Daca \hat{V} este constant si se considera prin similitudine cu cinetica nestructurata:

$$\mu = \frac{1}{m} \frac{dm}{dt} \quad 2.1.2.2$$

se obtine:

$$\frac{dc_j}{dt} = \sum_i r_{ij} - \mu C_j \quad 2.1.2.3$$

Termenul μC_j poate fi neglijat in majoritatea modele structurale.

In loc de C_j se poate folosi concentratia X_j (masa componentului j raportata la unitatea de masa celulara), conform relatiei:

$$X_j = C_j \hat{V} \quad 2.1.2.4$$

Modelele structurale si-au gasit o aplicare adecvata si in tratarea culturilor mixte, structurarea chimica fiind inlocuita cu divizarea in speciile componente (modele de populatie).

Harder și Roels au trecut în revista aplicațiile în biotehnologie ale modelelor simple structurale (Harder, Roels, 1981). Autorii prezintă în primul rând principiile de bază folosite în construcția modelelor structurale, derivate în special din biologia moleculară:

- modificările concentrațiilor unor substraturi sau intermediari determină schimbări în vitezele de reacție în care sunt implicate aceste substanțe;
- interacțiunile enzimelor cu unele molecule mici, efectorii, conduc la modificări în conformația enzimelor și în consecință a acțiunii lor catalitice;
- concentrațiile diferitelor macromolecule celulare se adaptează la schimbarea condițiilor de mediu prin modificarea vitezei lor de sinteză (d.e. concentrația ARN crește în mod deosebit odată cu creșterea ratei de diluție în cultura continuă), în urma exercitării unor mecanisme de control genetic;
- selecția naturală este o modalitate de adaptare; prin variația genetică în interiorul unei specii se poate selecționa un individ cu proprietăți ce-i oferă un avantaj în mediul înconjurător considerat;
- schimbările de mediu pot induce modificări în raportul dintre diferitele specii prezente într-o cultură mixtă.

Pornind de la aceste principii și de la conceptul de timp de relaxare, autorii propun o serie de modele structurale:

- creșterea biomasei conform unui model bicompartimental;
- creșterea biomasei conform unui model tricompartimental;
- sinteza enzimelor supuse unui control genetic (modelul operonului, al represiei catabolice, al creșterii diauxice).

Deși valabilitatea diferitelor ipoteze ale modelului este discutabilă și forma ecuațiilor cinetice a fost supusă criticii, metoda teoretică de deducere a unui model structural chimic are valoare și în viitor - pentru situații în care compoziția unui microorganism se modifică sub influența mediului, această modificare afectând comportamentul culturii la un nivel semnificativ. În același timp, modelele cinetice structurale își găsesc o aplicație interesantă în descrierea dinamicii bioprocesului cu celule modificate genetic. Astfel, Ryu și Kim (Ryu, Kim, 1992) au studiat un bioproces cu celule recombinante, unde evoluează celule purtătoare de plasmide continuând informații gene-tice privind producția unui metabolit de interes alături de celule lipsite de aceste plasmide.

Pentru cinetica formării produsului se propune ecuația:

$$q_p = k_0 \varepsilon G_p (\mu^+ + b) \quad 2.1.2.5$$

unde: k_0 = constanta vitezei globale de biosinteză

ε = eficiența exprimării genetice;

G_p = concentrația ADN în plasmide;

μ^+ = viteză specifică de creștere a celulelor purtătoare de plasmide;

b = constantă.

Această ecuație poate fi comparată cu modelul cinetic nestructurat al lui Luedeking - Piret (2.1.1.2.54), ce poate fi reexprimat pentru fermentația cu celule recombinante:

$$\frac{dP}{dt} = A \frac{dX^+}{dt} + BX^+ \quad 2.1.1.2.54'$$

unde: X^+ = concentratia celulelor purtatoare de plasmide

In acest mod coeficientii A si B din ecuatia de mai sus prin structuarea in ecuatia (2.1.3.5) capata o semnificatie biologica clara:

$$\begin{aligned} A &= k_0 \varepsilon G_p \\ B &= Ab \end{aligned} \quad 2.1.2.6$$

In continuare, in functie de modelul cinetic propus, se pot introduce strategii de reglare a temperaturii optime de productie sau a ratei de dilutie.

2.1.3. Modele cinetice segregate (corpulculare)

Dincolo de structurarea pe baza compozitiei chimice a unui model, literatura de specialitate nu deosebeste cu claritate alte tipuri de modele structurate de modelele segregate.

Shuler (Shuler, 1985) defineste ca modele segregate, dar nestruurate (considerand compozitia chimica) modelele care pornesc de la prezumtia ca o unica variabila (varsta celulelor, dimensiunea celulara, etc.) poate descrie complet starea unei celule in sensul ca toate celulele de aceeasi varsta sau dimensiune au aceeasi compozitie si acelasi potential productiv.

De asemenea, Bley (Bley, 1987) propune un model considerand celulele de drojdie aflate in doua stari fiziologice distincte - celule neinmugurite / celule inmugurite. Cele doua stari fiziologice difera prin μ , dS/dt , eficienta in producerea biomasei, etc. Daca se considera concentratiile X_1 si X_2 pentru celulele neinmugurite si respectiv inmugurite, S fiind concentratia substratului, atunci in cazul unui proces continuu, in care tranzitia de la o stare la alta este in principal influentata de concentratia S, se propun relatiile:

$$\begin{cases} \frac{dX_1}{dt} = (\mu_1(S) - k_1(S) - D)X_1 + k_2(S)X_2 \\ \frac{dX_2}{dt} = (\mu_2(S) - k_2(S) - D)X_2 + k_1(S)X_1 \\ \frac{dS}{dt} = (S_0 - S)D - \alpha_1(S)X_1 - \alpha_2(S)X_2 \end{cases}$$

2.1.3.1

In acest model $k_1(S)$ reprezinta viteza specifica a trecerii de la starea X_1 la X_2 , iar $k_2(S)$ - viteza procesului invers; $\alpha_1(S)$ si $\alpha_2(S)$ reprezinta coeficientii de randament de conversie S in X_1 si respectiv S in X_2 .

Modelele structurate si segregate sunt inca insuficient aplicate in modelarea bioproceselor fiind preluate din biologia moleculara si fiziologie, unde au un rol important in investigarea si validarea

unor mecanisme celulare (Sonnleitner, Fiechter, 1989). Pentru dezvoltarea si utilizarea lor in conducerea bioproceselor sunt necesare:

- evolutia rapida a tehnicilor analitice (Sonnleitner, 1992) nedistructive (care sa nu interfere cu mecanismele functionale si reglarile interne ale celulei) folosindu-se proprietatile optice, electrice sau electromagnetice ale celulei sau a unor componente celulare (fluorimetrie, rezonanta magnetica nucleara, spectroscopie IR);
- progrese insemnate in modelarea matematica in conexiune cu teorii despre mecanismele celulare (van Breusegem, Bastin, 1992).

b) $\mu=\mu(X,S)$ Influenta concentratiei celulare si a concentratiei substratului limitator de crestere asupra vitezei specifice μ

Intrucat dependenta $\mu=f(X)$ de concentratia celulara nu exclude ci cuprinde (Yamane, 1993), cel putin implicit si dependenta de S , sunt putine modele de tipul $\mu = f(X)$, mai logice si de aceea mai numeroase fiind modelele $\mu = f(X,S)$.

Din punct de vedere al cresterii (Chattaway *et al.*, 1992), s-a observat in destule experimente ca viteza de evolutie a culturii scade la concentratii ridicate ale lui X (Mulchandani, Luong, 1988; Matanguihan *et al.*, 1994). Un model simplu care explica aceasta situatie, considera ca viteza specifica descreste liniar cu concentratia de celule. Se obtine astfel ecuatia lui Verhulst (Verhulst, 1845):

$$\mu(X) = \mu_{\max}(1 - k_x X)$$

2.1.1.2.196

care mai poarta si numele de *modelul logistic al cresterii* (fig.2.1.1.6)

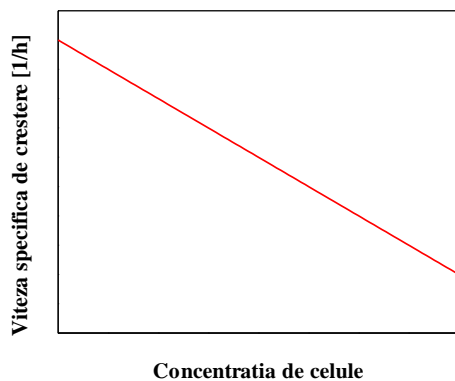


Figura 2.1.1.6 Dependenta $\mu=\mu(X)$ cf. ecuatiei Verhulst

O ecuatie mai realista, care exprima si limitarea prin concentratia substratului conform unei cinetici Monod a fost introdusa de Meyrath (Meyrath, 1973):

$$\mu(X,S) = \mu_{\max} \frac{S_0 - \frac{X}{Y}}{K_s + S_0 - \frac{X}{Y}}$$

2.1.1.2.17

unde Y = randamentul de transformare a substratului la celule.

In termeni de dinamica de populatie, din ecuatia lui Verhulst a derivat modelul cinetic al lui Verhulst - Pearl, care poate fi utilizat in locul ecuatiei cresterii nelimitate de substrat a unei populatii:

$$N = N_0 \exp(\mu_{\max} t) \\ = \frac{N_0 \mu_{\max}^0 \exp(\mu_{\max}^0 t)}{\mu_{\max}^0 + m_x N_0 (\exp(\mu_{\max}^0 t) - 1)}$$

2.1.1.2.18

Cel mai cunoscut si mai utilizat model $\mu = f(X,S)$ aplicat pentru simplitatea lui si pentru faptul ca respecta o cinetica cu saturatie in functie de concentratia substratului limitator, este modelul Contois, sau Contois - Fujimoto (Contois, 1959):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_x X + S}$$

2.1.1.2.19

Pentru S constant se manifesta inhibitia lui μ la valori ridicate ale concentratiei celulare.

Preluand modul de gandire al cineticii chimice, Kono si Asai (Kono, Asai, 1968) au derivat o ecuatie de crestere care include asa numitul *coeficient al activitatii de consum pentru crestere* Φ , redefinit de Bastin ca fiind *coeficientul aparent al activitatii de crestere*:

$$\mu(X) = K_x \Phi$$

2.1.1.2.200

unde K_x = constanta de viteza de crestere (are diferite valori in functie de etapa de crestere in cultura discontinua);

$\Phi = 0$, faza de inductie;

$\Phi = \varphi$, cu $0 < \varphi < 1$, faza de tranzitie, $\varphi = \alpha t$;

$\Phi = 1$, faza exponentiala de crestere

Ideea de baza a lui Kono a fost o ecuatie generala de crestere:

$$\frac{dX}{dt} = k_1^i k_2^j C_1^i C_2^j - k_3 C_3$$

2.1.1.2.21

unde: C_1 = concentratia substratului limitator

C_2 = concentratia co-substratului;

C_3 = concentratia produsului;

X_{crit} = concentratia celulara critica.

Ordinul de reactie se modifica la X_{crit} ; astfel: $i = 1$ si $j = 0$ pentru $X < X_{crit}$, $i = 0$ si $j = 1$ pentru $X > X_{crit}$.

Alte modele interesante pentru $\mu = f(X, S)$ sunt:

- modelul Nihtila si Virkkunen (Moser, 1988)

$$\mu(X, S) = K_1 \frac{C(t)}{X(t)}$$

$$\frac{dc}{dt} = K_2 S(t)(X(t) - C(t)) - K_3 C(t)$$

2.1.1.2.22

unde: $C(t)$ = concentratia complexului celula-substrat;

K_1, K_2, K_3 = constante

- modelul Kishimoto (Kishimoto, 1978):

$$\mu(X, S) = \bar{\mu} + Q_1(X(t) - \bar{X}) + Q_2(S(t) - \bar{S})$$

2.1.1.2.23

cu $\bar{\mu}, \bar{X}, \bar{S}$ = valorile de medie aritmetica;

Q_1, Q_2 = coeficienti de regresie.

- modelul Staniskis si Levisauskas (Moser, 1988):

$$\mu(X, S) = k_1 S(t) - k_2 X(t)$$

2.1.1.2.24

c) Cinetica cu inhibitie prin concentratia substratului

In multe cazuri de inhibitie, ecuatiile modelului cinetic sunt ca si modelul Monod, derivate din teoriile inhibitei reactiilor enzimatiche. De aceea, aceste ecuatii sunt mai putin general valabile, ele putandu-se substitui unele cu altele in functie de adecvanta la realitate a fenomenului experimental.

Din numarul mare de ecuatii cinetice cu inhibitie prin substrat, cele mai uzuale sunt:

- modelul Andrews (Andrews - Noack), inhibitie prin substrat in regim chemostat) (Andrews, 1968):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{1}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}} = \frac{S}{K_s + S} \frac{1}{1 + \frac{S}{K_i}}$$

2.1.1.2.25

unde: K_i = constante de inhibitie in raport cu substratul. Reprezentarea grafica este data in fig. 2.1.1.7.

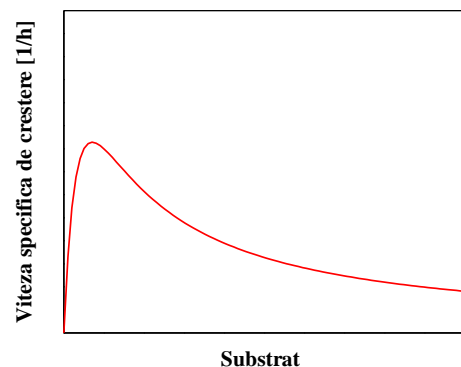


Figura 2.1.1.7 Dependenta $\mu = \mu(X)$ cf. ecuatiei Andrews

- modelul Webb (Webb, 1963):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S(1 + \frac{S}{K_s'})}{S + K_s \frac{S^2}{K_s'}}$$

2.1.1.2.26

unde: K_s^1 = constanta de inhibitie in raport cu substratul.

- modelul Yano (multi complecsi inactivi enzima - substrat) (Yano *et al.*, 1966)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{1}{1 + \frac{K_s}{S} + \sum_j \left(\frac{S}{K_{i,S}}\right)^j}$$

2.1.1.2.27

unde: $K_{i,S}$ = constanta de inhibitie in raport cu substratul.

- modelul Aiba (Aiba, Hara, 1965):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} e^{-\frac{S}{K_{i,S}}}$$

2.1.1.2.28

Reprezentarea grafica a modelului Aiba este data in figura de mai jos:

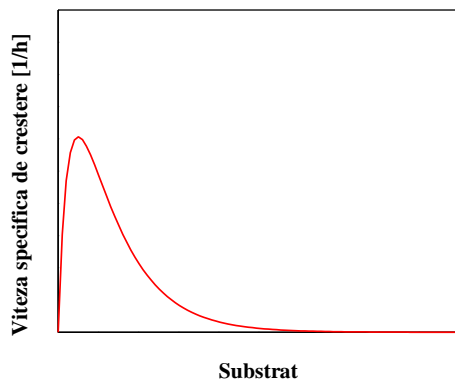


Figura 2.1.1.8 Dependenta $\mu=\mu(S)$ cf. ecuatiei Aiba

Edwards (Edwards, 1970) a analizat ecuatiile (2.1.1.25 - 2.1.1.28) pentru o serie de date experimentale de crestere din literatura si a demonstrat ca nu sunt criterii obiective pentru a realiza o clasificare a lor in functie de gradul de generalizare. De aceea el a recomandat modelul Andrews ca cel mai simplu si mai usor de folosit.

Un tip diferit de ecuatie pentru a exprima cinetica cu inhibitie prin substrat a fost

propusa de Wayman si Tseng (Wayman, Tseng, 1976). Concentratiile de substrat mai mari decat o concentratie prag S_C inhiba cresterea liniara conform modelului:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} - K_{i,S}(S - S_C)$$

2.1.1.2.29

Aceasta relatie se poate folosi cand curba $\mu = f(S)$ nu are o forma de tip Andrews ci are loc mai degraba o descrestere liniara a lui μ (fig. 2.1.1.9).

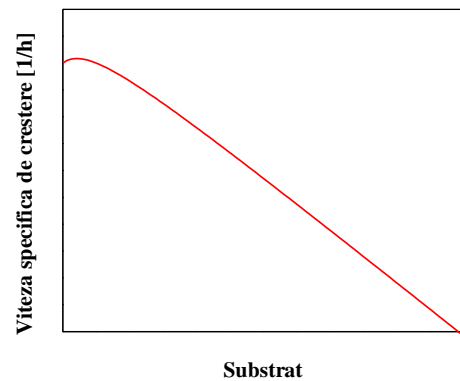


Figura 2.1.1.9 Dependenta $\mu=\mu(S)$ cf. ecuatiei Waymann si Tseng

d) $\mu = f(S,P)$ Cinetica de crestere cu inhibitie prin concentratia de produs.

Hinshelwood (Hinshelwood, 1946) distinge mai multe tipuri de efecte de inhibitie exercitate de concentratia de produs asupra vitezei specifice de crestere: descrestere liniara, descrestere exponentiala, stopare brusca a cresterii, descresterea liniara / exponentiala incepand cu o concentratie de prag a lui P. Cand nu apare o concentratie prag de la care incepe sa se manifeste inhibitia si descresterea este liniara in raport cu P, modelul Hinshelwood (Hinshelwood-Dagley) poate exprima cantitativ fenomenul:

$$\mu(S,P) = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} (1 - kP)$$

2.1.1.2.210

unde: k = constanta de inhibitie in raport cu produsul P.

Aceasta relatie a fost modificata astfel:

- modelul Holzberg (Holzberg *et al.*, 1967):

$$\mu(P) = \mu_{\max} - K_1(P - K_2)$$

2.1.1.2.31

unde: $K_1, K_2 = \text{constante pozitive.}$

Reprezentarea grafica a modelului Holzberg este data in figura de mai jos:

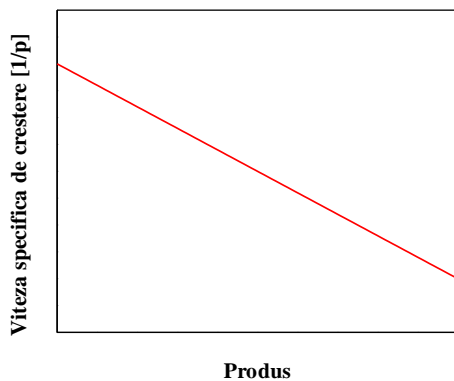


Figura 2.1.1.10 Dependenta $\mu=\mu(P)$ cf. ecuatiei Holzberg

- modelul Ghose si Tyagi (Ghose, Tyagi, 1979) fig. 2.1.1.11:

$$\mu(P) = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)$$

2.1.1.2.32

unde: $P_{\max} = \text{concentratia maxima de produs din mediu.}$

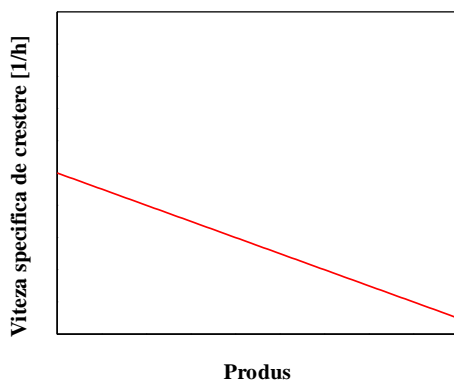


Figura 2.1.1.11 Dependenta $\mu=\mu(P)$ cf. ecuatiei Ghose si Tyagi

O ecuatie de tip diferit a fost introdusa de Aiba (Aiba, 1982), fig. 2.1.12:

$$\mu(P) = \mu_{\max} e^{-K_1 P(t)}$$

2.1.1.2.33

unde: $K_1 = \text{constanta}$

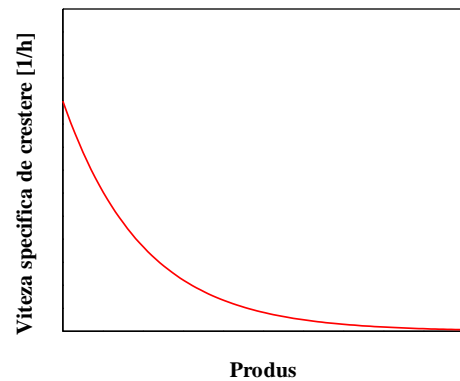


Figura 2.1.1.12 Dependenta $\mu=\mu(P)$ cf. ecuatiei Aiba

sau o varianta a ecutiei (2.1.1.2.33) - modelul Aiba si Shoda (Aiba, Shoda, 1989):

$$\mu(S, P) = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} e^{-KP}$$

2.1.1.2.34

In sfarsit, o ecuatie de tip $\mu = f(P, S)$ poate fi modelata prin analogie cu cinetica enzimatica. Ierusalimsky (Ierusalimsky, 1967) recomanda in acest sens o ecuatie de tipul:

$$\mu(P) = \frac{\mu_{\max} P(t)}{K_{i,P} + P(t)}$$

2.1.1.2.35

sau, mai detaliat:

$$\mu(S, P) = \frac{\mu_{\max} P(t)}{K_{i,P} + P(t)} \frac{S}{K_S + S}$$

2.1.1.2.36

unde: $K_{i,P}$ = constanta de inhibitie in raport cu P.

Este de mentionat faptul ca ecuatia (2.1.1.2.36) este cel mai folosit model pentru cinetica cu inhibitie in raport cu produsul.

e) Influenta oxigenului dizolvat ca al doilea substrat asupra vitezei specifice de crestere.

In general, pentru oxigenul dizolvat, considerat al doilea substrat de crestere (Eiki, Osono, 1990) se utilizeaza un model de tip cinetica cu saturatie; de aceea cel mai utilizat pentru o dependenta $\mu(S,C)$ este modelul Olsson (Moser, 1988):

$$\mu(S,C) = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{C}{K_C + C}$$

2.1.1.2.37

in care: K_C = constanta de saturatie in raport cu oxigenul;
sau ceva mai complicat, modelul Williams (Williams, 1969):

$$\mu(S,C,P) = \left(\frac{K_1 S}{K_S + S} \frac{K_2 P}{K_P + P} \right) \cdot \left(\frac{C}{K_C + C} + K_3 C - K_4 \right)$$

2.1.1.2.38

f) Influenta altor factorii de mediu asupra vitezei specifice de crestere.

Pentru efectul pH-ului (Ben-Hassan *et al.*, 1991) in general se propun modele simple de tipul:

- modelului Andreyeva si Biriukov (dezvoltare polinomiala) (Andreyeva, Biriukov, 1973):

$$\mu(pH) = a \cdot (pH)^2 + b \cdot (pH) + c$$

2.1.1.2.39

- modelului Jackson si Edwards (cu inhibitie) (Moser, 1988):

$$\mu(H^+) = \frac{H^+}{K_H + H^+ + K_i(H^+)^2}$$

2.1.1.2.40

Pentru efectul simultan $\mu = f(S,pH)$ autorii propun varinate ale modelelor (2.1.1.2.39) si (2.1.1.2.40) dintre care sunt prezentate cele mai importante:

- Andreyeva si Biriukov (Andreyeva, Biriukov, 1973):

$$\mu(S,H^+) = \mu_{\max} \frac{SH^+}{K_S + SH^+ + \frac{(SH^+)^2}{K_i}}$$

2.1.1.2.41

sau:

$$\mu(S,H^+) = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_H}{K_H + H^+}$$

2.1.1.2.42

- Jackson si Edwards (Moser, 1988):

$$\begin{aligned} \mu(S,H^+) &= \\ &= \mu_{\max} \frac{S}{\left(1 + \frac{K_2}{H^+} + \frac{H^+}{K_1}\right) \left(K_H + S + \frac{S^2}{K_i \left(1 + \frac{K_3}{H^+}\right)}\right)} \end{aligned}$$

2.1.1.2.43

Influenta temperaturii este modelata printr-o lege de tip Arrhenius, conform modelului Topiwala si Sinclair (Topiwala, Sinclair, 1971):

$$\mu(T) = \begin{cases} A_1 e^{\frac{E_1}{RT}} - A_{21} e^{\frac{E_{21}}{RT}} - A_3, & T \in [T_1, T_2] \\ 0 & T \notin [T_1, T_2] \end{cases}$$

2.1.1.2.44

In sfarsit Constantinides (Constantinides *et al.* 1970) modeleaza $\mu(T,X)$ introducand ecuatia:

$$\mu(T, X) = b_1(T) \left(1 - \frac{X}{b_2(T)}\right)$$

2.1.1.2.45

unde:

$$b_1(T) = K_1 - K_2(T - K_3)^2$$

2.1.1.2.46

si:

$$b_2(T) = K_4 - K_5(T - K_6)^2$$

2.1.1.2.47**g) $\mu(S_1, S_2)$ Cinetica de crestere pe mai multe substrate**

Oxigenul dizolvat a fost considerat un al doilea substrat de crestere prezentandu-se in consecinta modelele $\mu(S, C)$ in paragraful e). Prezinta insa o importanta mare si modelele cinetice de crestere pe mai multe surse de carbon din mediul de cultura (Chiu *et al.*, 1972). Pe cand cresterea in urma consumului secvential sau consecutiv a doua sau mai multor surse de carbon, cunoscut sub numele de *diauxie* (Monod) poate fi analizata adesea ca doua sau mai multe faze separate de crestere ce au loc pe parcursul aceluasi bioproces, cazul utilizarii simultane a doua sau mai multe substrate (tratarea biologica a apelor uzate), este mai dificil de descris matematic (Chiu *et al.*, 1972).

2.1.1.3. Modele cinetice nestructurate pentru formarea produsului

Cinetica de formare a produsului se ia in considerare in raport cu cinetica cresterii. Pana in prezent, din acest punct de vedere, a ramas valabila clasificarea lui Gaden (Gaden, 1959) ce distinge patru tipuri de cinetica de formare a produsului:

Tipul 0. Productia are loc chiar in celulele in faza stationara care folosesc numai o mica parte din substrat pentru nevoile lor metabolice. Celulele microbiene functioneaza numai ca purtatoare ale enzimelor necesare biosintezei produsului, d.e. transformările

steroizilor si sinteza vitaminei E de catre *Saccharomyces cerevisiae*.

Tipul 1. Acumularea produsului este direct asociata cu cresterea (*produs asociat cresterii*). Este cazul producerii metabolitilor primari, formarea produsului fiind legata de metabolismul energetic, d.e. producerea acidului gluconic, obtinerea enzimelor respiratiei si cresterii.

Tipul 2. Acumularea produsului este partial asociata cu cresterea (*produs partial asociat cresterii*), existand o legatura indirecta cu metabolismul energetic, d.e. producerea acidului citric, obtinerea aminoacizilor prin biosinteza.

Tipul 3. Acumularea produsului nu este asociata cu cresterea si nici nu exista o conexiune directa sau indirecta cu metabolismul energetic primar (*produs neasociat cresterii*). Obtinerea metabolitilor secundari (streptomicina, penicilina) este un exemplu de cinetica de acest tip.

Recunoasterea tipului de cinetica de formare a produsului se face conform diagramelor caracteristice $r_S, r_X, r_P = f(t)$ si in special considerand vitezele specifice q_S, μ, q_P .

Diagrama evolutiei in timp a vitezelor specifice intr-un bioproces poarta numele de *diagrama de cuantificare*. Ea ofera imaginea cea mai corecta a avansarii vitezelor caracteristice si este fundamentala pentru stabilirea unor modele matematice adecvate.

In figura de mai jos sunt prezentate grafic tipurile de relatii cinetice liniare intre viteza specifica de crestere μ si viteza de productie q_P .

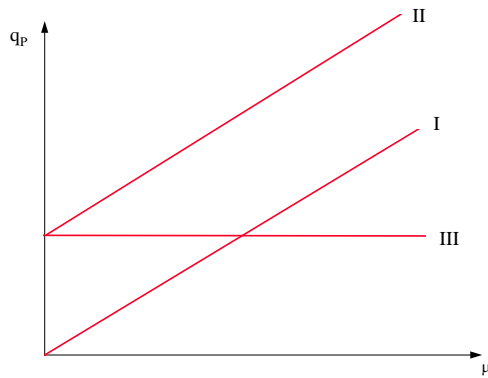


Figura 2.1.14 - Dependenta vitezei specifice de crestere de viteza de formare a produsului pentru cele trei tipuri principale de cinetica (cf. Gaden)

Tipul 1. Formarea produsului asociat cresterii poate fi descrisa prin relatiile caracteristice:

$$r_p = Y_{p/x} r_x$$

2.1.1.2.48

si:

$$q_p = Y_{p/x} \mu$$

2.1.1.2.49

Similar, Constantidines (Constantinides *et al.* 1970):

$$r_p = Y_{p/s} r_s$$

2.1.1.2.50

In final rezulta urmatoarea relatie intre coeficientii de conversie:

$$\frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}} = Y_{p/x}$$

2.1.1.2.51

Considerand pentru q_p o dezvoltare de tip Monod, se obtine o functie hiperbolica pentru viteza de productie in cazul asocierii produsului cu cresterea:

$$r_p = q_p X = q_{p_{\max}} \frac{S}{K_s + S} X$$

2.1.1.2.52

Tipul 3. In cazul unui produs neasociat cresterii nu exista nici o relatie directa cu cresterea; ca o alternativa in acest caz, dependenta $r_p = f(X)$ este adesea reprezentata cu succes prin relatia:

$$r_p = k_p X$$

2.1.1.2.53

Formarea produsului poate fi insa cuantificata prin dependenta de viteza de utilizare a substratului printr-o relatie similara ecuatiei (2.1.1.2.50).

Tipul 2. Cand formarea produsului este partial asociata cresterii si partial independenta de aceasta, este in general valabila o combinatie a ecuatiilor (2.1.1.2.49) si (2.1.1.2.53), conform propunerii lui Luedeking si Piret (Luedeking, Piret, 1959):

$$q_p = Y_{p/x} \mu + k_{pr}$$

2.1.1.2.54

Ecuatia generala (2.1.1.2.54) impreuna cu ecuatiile (2.1.1.2.49) si (2.1.1.2.53) drept cazuri limita, sugereaza o ecuatie logistica.

Kono si Asai (Kono, Asai, 1968) au introdus o alta ecuatie generala pentru corelarea productiei cu cresterea formulata cu ajutorul coeficientului de consum Φ (gandit ca un coeficient aparent al activitatii de crestere):

$$r_p = k_{p_1} X \Phi + k_{p_2} X (1 - \Phi)$$

2.1.1.2.55

Aceasta ecuatie se alatura ecuatiei (2.1.1.2.20) ce descrie evolutia vitezei specifice de crestere. Prin valorile parametrului k_{p_j} , > 0 sau k_{p_j} , < 0 , $j = 1, 2$ se particularizeaza cazurile anterioare de cinetica de formare a produsului descrise de Gaden.

Pentru cazuri speciale, au fost propuse ecuatii cinetice adecvate datelor experimentale (Shu, 1961, Fishman, Birjukov, 1974, Ryu, Humphrey, 1972, Brown, Vass, 1981).

2.1.2. Modele structurate

Cele mai importante modele structurale sunt corelate cu structura chimica celulara (chimic structurate). Williams si Ramkrishna au propus printre primii modele cu doua componente. Williams (Williams, 1975) a considerat concentratia componentelor R cu rol in sinteza celulara (in principal ARN) si concentratia componentelor D cu rol structural - genetic (ADN si proteine), pe cand Ramkrishna (Ramkrishna, 1969) a impartit celula in masa G (ADN si ARN) si masa D (proteine). Fredrickson (Fredrickson, 1970) a analizat ulterior aceste modele demonstrand invaliditatea lor deoarece in formularea expresiilor cinetice nu erau utilizate concentratiile intrinseci ale componentelor structurale luate in considerare. Totusi modelele Williams si Ramkrishna raman importante datorita modificari conceptuale introduse in tratarea dinamicii microbiene.

Formularea riguroasa a unui model structural chimic implica introducerea in ecuatiile cinetice a concentratiei intrinseci a unui component al structurii luate in considerare, ceea ce inseamna cantitatea de component/unitatea de volum celular sau unitatea de masa celulara; in acest fel se renunta la concentratiile extrinseci din modelele nestructurate, in care masa celulara considerata nestructurata era exprimata in unitati de concentratie raportate la volumul reactorului.

Fredrickson introduce in acest sens bilantul general intr-un bioreactor discontinuu prin ecuatia de tipul:

$$\frac{d(m\hat{V}C_j)}{dt} = m\hat{V}\sum_i r_{ij}$$

2.1.2.1

unde: m = biomasa totala la timpul t ;

\hat{V} = volumul ocupat de celule pe unitatea de masa celulara;

C_j = masa componentului j pe unitatea de volum celular (concentratia intrinseca a componentului j);

r_j = viteza de aparitie/disparitie in procesul i a componentului j raportata la volumul celular.

Daca \hat{V} este constant si se considera prin similitudine cu cinetica nestructurata:

$$\mu = \frac{1}{m} \frac{dm}{dt}$$

2.1.2.2

se obtine:

$$\frac{dc_j}{dt} = \sum_i r_{ij} - \mu C_j$$

2.1.2.3

Termenul μC_j poate fi neglijat in majoritatea modele structurale.

In loc de C_j se poate folosi concentratia X_j (masa componentului j raportata la unitatea de masa celulara), conform relatiei:

$$X_j = C_j \hat{V}$$

2.1.2.4

Modelele structurale si-au gasit o aplicare adecvata si in tratarea culturilor mixte, structurarea chimica fiind inlocuita cu divizarea in speciile componente (modele de populatie).

Harder si Roels au trecut in revista aplicatiile in biotehnologie ale modelelor simple structurale (Harder, Roels, 1981). Autorii prezinta in primul rand principiile de baza folosite in constructia modelelor structurale, derivate in special din biologia moleculara:

- modificarile concentratiilor unor substrate sau intermediari determina schimbari in vitezele de reactie in care sunt implicate aceste substante;
- interactiunile enzimelor cu unele molecule mici, efectorii, conduc la modificari in conformatia

enzimelor si in consecinta a actiunii lor catalitice;

- concentratiile diferitelor macromolecule celulare se adapteaza la schimbarea conditiilor de mediu prin modificarea vitezei lor de sinteza (d.e. concentratia ARN creste in mod deosebit odata cu cresterea ratei de dilutie in cultura continua), in urma exercitarii unor mecanisme de control genetic;
- selectia naturala este o modalitate de adaptare; prin variatia genetica in interiorul unei specii se poate selecta un individ cu proprietati ce-i ofera un avantaj in mediul inconjurator considerat;
- schimbarile de mediu pot induce modificari in raportul dintre diferitele specii prezente intr-o cultura mixta.

Pornind de la aceste principii si de la conceptul de timp de relaxare, autorii propun o serie de modele structurale:

- cresterea biomasei conform unui model bicompartimental;
- cresterea biomasei conform unui model tricompartimental;
- sinteza enzimelor supuse unui control genetic (modelul operonului, al represiei catabolice, al cresterii diauxice).

Desi valabilitatea diferitelor ipoteze ale modelului este discutabila si forma ecuatiilor cinetice a fost supusa criticii, metoda teoretica de deducere a unui model structural chimic are valoare si in viitor - pentru situatii in care compozitia unui microorganism se modifica sub influenta mediului, aceasta modificare afectand comportamentul culturii la un nivel semnificativ. In acelasi timp, modelele cinetice structurale isi gasesc o aplicatie interesanta in descrierea dinamicii bioprocesului cu celule modificate genetic. Astfel, Ryu si Kim (Ryu, Kim, 1992) au studiat un bioproces cu celule recombinante, unde evolueaza celule purta-toare de plasmide continand informatii gene-tice

privind productia unui metabolit de interes alaturi de celule lipsite de aceste plasmide.

Pentru cinetica formarii produsului se propune ecuatia:

$$q_p = k_0 \varepsilon G_p (\mu^+ + b)$$

2.1.2.5

unde: k_0 = constanta vitezei globale de biosinteza

ε = eficienta exprimarii genetice;

G_p = concentratia ADN in plasmide;

μ^+ = viteza specifica de crestere a celulelor purtatoare de plasmide;

b = constanta.

Aceasta ecuatie poate fi comparata cu modelul cinetic nestructurat al lui Luedeking - Piret (2.1.1.2.54), ce poate fi reexprimat pentru fermentatia cu celule recombinante:

$$\frac{dP}{dt} = A \frac{dX^+}{dt} + BX^+$$

2.1.1.2.54'

unde: X^+ = concentratia celulelor purtatoare de plasmide

In acest mod coeficientii A si B din ecuatie de mai sus prin structuarea in ecuatie (2.1.3.5) capata o semnificatie biologica clara:

$$A = k_0 \varepsilon G_p$$

$$B = Ab$$

2.1.2.6

In continuare, in functie de modelul cinetic propus, se pot introduce strategii de reglare a temperaturii optime de productie sau a ratei de dilutie.

2.1.3. Modele cinetice segregate (corpulculare)

Dincolo de structurarea pe baza compozitiei chimice a unui model, literatura de specialitate nu deosebeste cu claritate alte

tipuri de modele structurate de modelele segregate.

Shuler (Shuler, 1985) definește ca modele segregate, dar nestructurate (considerând compoziția chimică) modelele care pornesc de la prezumția că o unică variabilă (varsta celulelor, dimensiunea celulară, etc.) poate descrie complet starea unei celule în sensul că toate celulele de aceeași vârstă sau dimensiune au aceeași compoziție și același potențial productiv.

De asemenea, Bley (Bley, 1987) propune un model considerând celulele de drojdie aflate în două stări fiziologice distincte - celule neînmugurite / celule înmugurite. Cele două stări fiziologice diferă prin μ , dS/dt , eficiența în producerea biomasei, etc. Dacă se consideră concentrațiile X_1 și X_2 pentru celulele neînmugurite și respectiv înmugurite, S fiind concentrația substratului, atunci în cazul unui proces continuu, în care tranziția de la o stare la alta este în principal influențată de concentrația S , se propun relațiile:

$$\begin{cases} \frac{dX_1}{dt} = (\mu_1(S) - k_1(S) - D)X_1 + k_2(S)X_2 \\ \frac{dX_2}{dt} = (\mu_2(S) - k_2(S) - D)X_2 + k_1(S)X_1 \\ \frac{dS}{dt} = (S_0 - S)D - \alpha_1(S)X_1 - \alpha_2(S)X_2 \end{cases}$$

2.1.3.1

În acest model $k_1(S)$ reprezintă viteza specifică a trecerii de la starea X_1 la X_2 , iar $k_2(S)$ - viteza procesului invers; $\alpha_1(S)$ și $\alpha_2(S)$ reprezintă coeficienții de randament de conversie S în X_1 și respectiv S în X_2 .

Modelele structurate și segregate sunt încă insuficient aplicate în modelarea bioproceselor fiind preluate din biologia moleculară și fiziologie, unde au un rol important în investigarea și validarea unor mecanisme celulare (Sonnleitner, Fiechter, 1989). Pentru dezvoltarea și utilizarea lor în conducerea bioproceselor sunt necesare:

- evoluția rapidă a tehnicilor analitice (Sonnleitner, 1992)

nedistructive (care să nu interfere cu mecanismele funcționale și reglările interne ale celulei) folosindu-se proprietățile optice, electrice sau electromagnetice ale celulei sau a unor componente celulare (fluorimetrie, rezonanță magnetică nucleară, spectroscopie IR);

- progrese însemnate în modelarea matematică în conexiune cu teorii despre mecanismele celulare (van Breusegem, Bastin, 1992).

2.2. CONFIGURAREA STRUCTURILOR DE CONDUCERE.

2.2.1. Obiective

Conducerea (si optimizarea) proceselor de biosinteza are la baza trei mecanisme principale (Pokkinen *et al.*, 1992):

- *optimizarea algoritmica*, care este dependenta de existenta si definirea diferitelor relatii dintre parametrii; in acest fel optimum poate fi determinat analitic si deci optimizarea algoritmica devine mai economica decat cea adaptiva;
- *optimizarea adaptiva* (controlul extremal), care nu impune cunoasterea a priori a relatiilor dintre parametrii procesului; in practica, productivitatea [$(\text{kg}/\text{m}^3)\text{hr}$] poate constitui un posibil criteriu de optimizare;
- *optimizarea prin tehnici de inteligenta artificiala* (sisteme expert, retele neuronale, structuri fuzzy), care necesita transferul de cunostiinte de la un expert uman.

Daca cea de-a doua solutie impune, in general, utilizarea unor modele simple, care sa permita revizuirea periodica a valorilor constantelor si implicit, corectarea conditiilor necesare evolutiei procesului, prima solutie ofera posibilitatea calcularii conditiilor de varf si deci a optimizarii in raport cu parametrul ales. O analiza completa trebuie insa sa tina seama de reactiile de la nivelul celular.

Dificultatile conducerii si optimizarii bioproceselor provin din faptul ca, fiind vorba de organisme vii, cu mecanisme metabolice proprii, conditiile de optim variaza continuu, fiind axate pe ciclurile existentiale ale celulelor.

In general, problematica controlului automat al proceselor de fermentatie este descrisa de (DECHEMA, 1984):

- inacesibilitatea masuratorilor continue a tuturor variabilelor de proces;
- masuratori afectate de zgomot;
- acces la masurarea unor parametrii dupa timpi morti mari;
- parametri de bioproces care interactioneaza puternic;
- rata de reproducere a microorganismelor variaza in timp si in raport cu conditiile de mediu.

Prima din problematicile enuntate pare sa fie in curs de rezolvare partiala prin introducerea utilizarii pe scara larga a biosezorilor (d.e. cei pentru glucoza). Metoda clasica utilizeaza structurile *schemelor de observare* (Nogai, 1979) prin intermediul masuratorilor secundare. De exemplu, este usor de realizat controlul coeficientului de respiratie (RQ) in fermen-tatiile fed - batch, prin variatia aditiei de substrat (zahar). Problema principala in acest caz o reprezinta alegerea valorii de referinta pentru variabila secundara in scopul atingerii valorii dorite pentru variabila primara a procesului.

Configuratia generala a unui sistem de conducere de bioproces este prezentata in figura 2.2.1.

2.2.2. Criterii de performanta

Literatura de specialitate (Moser, 1988, Richards, 1988, Trilli, 1977) recomanda, din punct de vedere al conducerii bioproceselor, trei indici de performanta (care trebuiesc maximizati):

- rata productivitatii;
- rata de conversie;
- profitul.

primii doi tratand aspectele tehnologice, cel de - al treilea, pe cele economice.

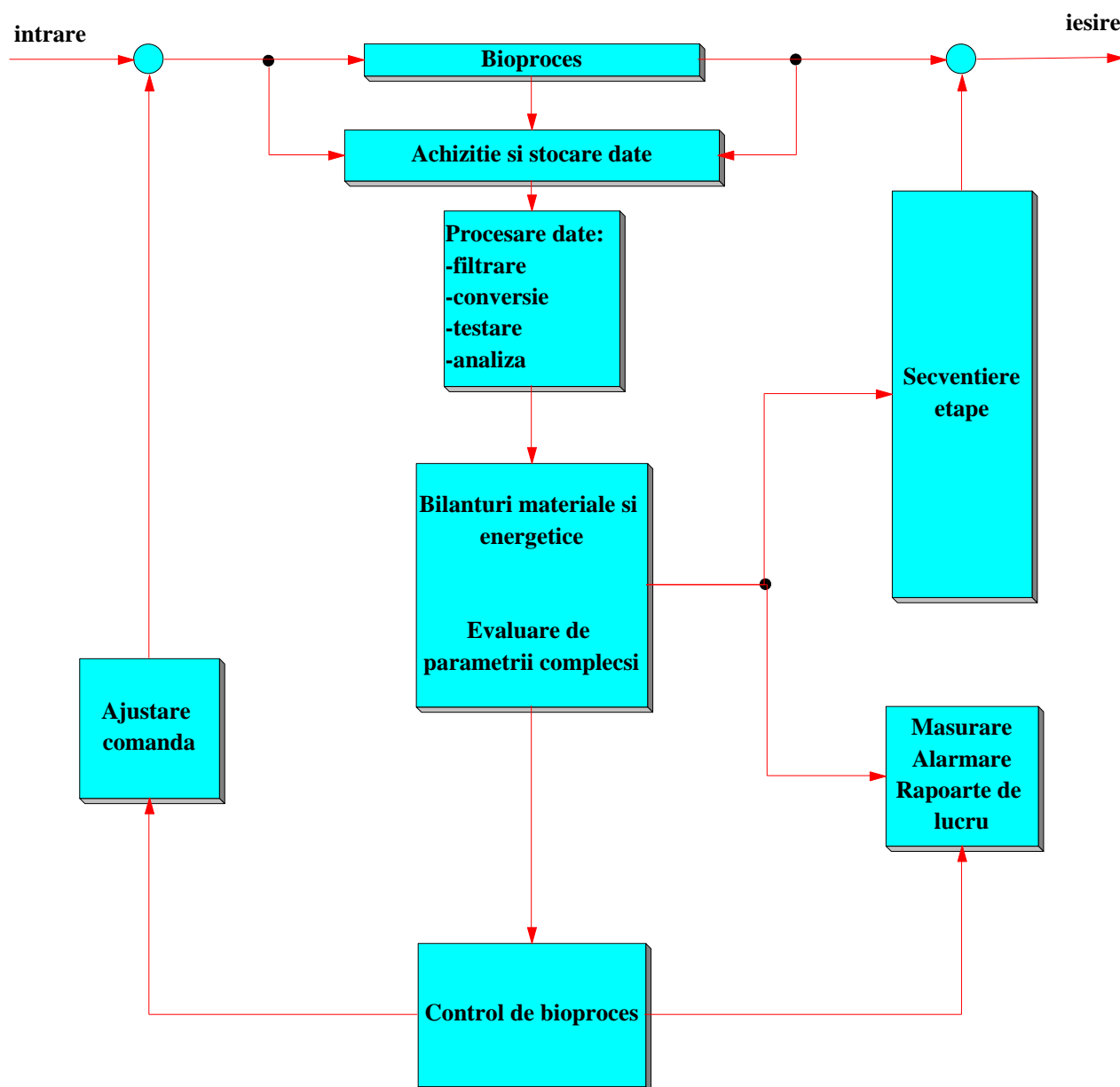


Figura 2.2.1. Structura generala de control de bioproces

Astfel, rata productivitatii, r_j , a unui bioproces, este in general definita ca fiind masa de produși de metabolism, j , pe unitatea de timp si volum si se masoara in $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} / \text{h}^{-1}$. Fie, d.e. curba din figura 2.2.2.

Se observa ca, in cazul proceselor discontinue este necesar un timp de lag intre ciclurile de productie datorat golirii, sterilizarii si reumplerii bioreactorului. Acest timp de lag, notat cu t_0 este figurat pe axa negativa in figura 2.2.2.

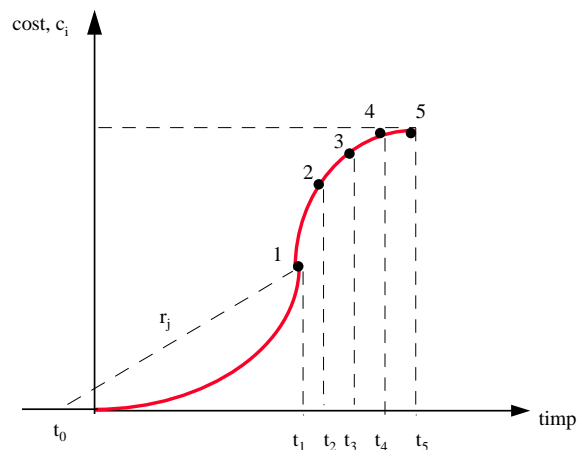


Figura 2.2.2. Variatia in timp a costurilor

O dreapta din acest punct la punctul de inflexiune al curbei ofera momentul maximei productivitatii pentru regim discontinuu:

$$r_{j \max} = \frac{C_{\max j} - C_{0j}}{t_0 - t_r} \quad t_r = t_2 - t_0$$

2.2.1

si aceasta in conditiile in care, punctul 1 de pe curba din figura 2.2.2. ofera productivitatea pentru un proces continuu, echivalent din punctul de vedere al conditiilor de mediu.

Din aceeasi figura rezulta o productivitate zero pentru punctul 5. Acest punct poate deveni interesant in conditiile unui substrat scump. In acest caz bioprocesul trebuie sa lucreze in zona de utilizare completa a substratului.

Rata de conversie, ξ_i se defineste (in conditii de volum constant) ca fiind:

$$\xi_i = \frac{C_{i0} - C_{it}}{C_{i0}}$$

2.2.2

putandu-se exprima si in forma relativa:

$$\xi = \frac{\xi_i}{\xi_{i \max}}$$

2.2.2'

De asemenea, poate fi calculat un anumit randament de transformare (in conditii de volum constant), si anume:

$$Y_{i/j} = \frac{C_{jt} - C_{j0}}{C_{i0}}$$

2.2.3

indicele j indicand produsul obtinut prin consumul substratului i . Si in acest caz se poate defini marimea relativa:

$$Y_{i/j \text{ rel}} = \frac{Y_{i/j}}{Y_{i/j \max}}$$

2.2.3'

Iesirea unui bioreactor se poate scrie ca fiind:

$$Esire = \xi_i n_i = Y_i n_i \quad [\text{tone/zi}]$$

2.2.4

unde n_i reprezinta fluxul de masa al componentei i [t/zi]. In cazul in care $\xi_i \rightarrow 1$ sau $Y_i \rightarrow 1$, esirea coincide cu n_i .

Punctul 4 reprezinta punctul de cost minim (C_{\min}). De altfel, costul acumulat la oricare moment de timp se poate calcula cu relatia:

$$C_{\text{tot/Kg}} = \frac{C_B}{W} + \frac{C_R}{W}$$

2.2.5

unde: C_B = costurile batch (sterilizare, materiale, etc.);

C_R = costurile de operare (puterea de agitare si aerare, etc.)

Astfel, pentru timpul t_4 se poate exemplifica (figura 2.2.3), variatia costurile in raport cu timpul.

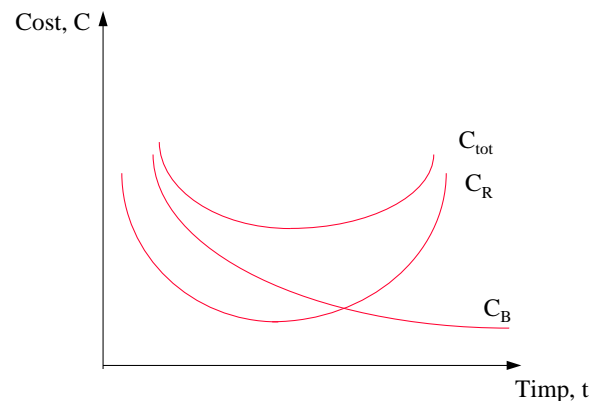


Figura 2.2.3. Variatia in timp a costurilor

In sfarsit, punctul 3 din figura 2.2.2 reprezinta punctul de profit maxim. Empiric, acest punct se situeaza intre cel al productivitatii maxime si cel al costurilor minime. Analitic, relatia de calcul a profitului a fost data de Geyson si Gray (Geyson, Gray, 1972):

$$\text{Profit}[\$/ \text{tona}] = W(\text{pret} - C_{pe}) - C_R t - (C_B - C_e)$$

2.2.6

unde: W = masa, [kg];

C_{pe} = pretul de cost al extractiei de produs (total), [\$];

C_e = pretul de cost al extractiei pe ciclu, [\$].

În figura 2.2.4 este prezentată o metodă de determinare grafică a profitului pentru diverse tipuri de procese:

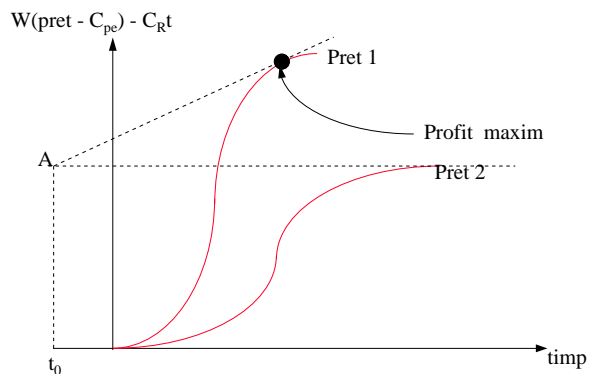


Figura 2.2.4. Determinarea grafică a profitului

2.3. STRATEGII DE CONDUCERE A BIOPROCESELOR

2.3.1. Conducerea cu model matematic *a priori*

O mai buna cunoastere a proceselor fiziologice si a modurilor de operare ce actioneaza intr-un biosistem permite structurarea mecanismelor de reglare a cailor metabolice in scopul dirijarii optimale a unui bioproces (Vanichsiratana *et al.* 1996). Daca aceasta cunoastere ajunge pana la realizarea unor modele (in sensul descrierii matematice, cantitative a proceselor metabolice ce au loc in celule), atunci:

- reprezentarea matematica a proceselor va conduce la utilizarea de metode adecvate de optimizare si conducere (Abidi *et al.*, 1993; Isaacs, Thoma, 1992);
- modelarea, tinand cont de mecanismul si de reactiile cheie de reglare a comportamentului celular, furnizeaza si informatia necesara despre caracteristicile procedurii aplicat (Rohner, Meyer, 1995; Eaton, Rawlings, 1992).

Elaborarea unui model matematic cat mai comprehensibil, capabil sa integreze cinetica microbiana conditionata si justificata fiziologic si genetic, ca si fenomenele de transfer (Moser, 1984), permite predictii asupra eficientei procedurii si constituie cea mai buna cale in masura in care este accesibila, pentru definirea strategiei de conducere optima (Slimes *et al.*, 1995).

Modelele matematice, ce descriu evolutia celulelor vii, trebuie sa exprime natura dinamica a biosistemului, sa fie cat mai generale (in consecinta complexe) si sa fie cat mai putin empirice reflectand biochimia de baza a culturii. In cazul structurarii unui model trebuie sa se faca un compromis acceptabil intre cuprinderea cat mai detaliata a subproceselor ce au loc, ceea ce implica introducerea unui numar mare de parametri (adesea necontrolabili / nedeterminabili) si folosirea unui numar mic de parametri usor

de estimat si de controlat (Patwardhan *et al.*, 1992; Henson, Seborg, 1992).

In general in conducerea cu model *a priori* a bioproceselor se prefera modelele deterministice celor probabilistice (Cazzador, 1988). Modelele deterministe nestructurale (in care celulele sunt tratate tip black-box) sunt actualmente utilizate in conducerea bioproceselor, desi cele structurale par sa aiba pe viitor o pondere tot mai insemnata, in masura in care vor putea sa exprime cat mai verosimil fenomenele si mai ales in masura in care o serie de variabile ce reflecta comportamente subcelulare vor fi determinabile on-line. Si aceasta intrucat modelele structurale tin cont de structura celulara, fie la nivelul componentelor chimice (modelele structurate chimic), fie la nivelul morfologiei celulare, introducand efecte legate de forma, varsta, dimensiune, etc.

Este de asemenea necesar sa se mentioneze ca in conducerea bioproceselor alaturi de ecuatiile cinetice pot fi utilizate ecuatiile de bilant de masa (Weinrich, Lapidus, 1972; Balzer *et al.*, 1984) si elementele definitorii pentru stoechiometria de bioproces (coeficientii de randament $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, $Y_{X/O}$, etc.).

2.3.1.1. Problematika conducerii cu model matematic

Stabilirea unui model global de evolutie a unui bioproces are, pe langa avantajul determinarii analitice a valorilor de optim si pe cel al posibilitatii modificarii in timp a parametrilor. In aceste conditii, o data fixat modelul, trebuie precizat indicele de performanta si stabilita strategia de maximizare / minimizare a acestuia (Cardello, San, 1988; Dovi, Reverberi, 1993).

In momentul in care au putut fi puse intr-o forma matematica legatunile ce guverneaza

evolutia bioprocesului, problema conducerii se reduce la aplicarea unui algoritm de mentinere a evolutiei parametrilor in jurul valorilor de optim. Acesta este de altfel si cazul cel mai simplu de aplicare a unui algoritm de conducere.

Problemele principale in cazul conducerii cu model *a priori* sunt legate de caracterul neliniar si nestationar al bioproceselor (Shields, Kao, 1994). In plus, accesul la informatie (prin intermediul masuratorilor on-line si al estimarilor) este in general redus si puternic afectat de erori dupa cum a fost deja aratat.

Un exemplu de rezolvare a problematicii conducerii cu model *a priori* a unui bioproces este cel prezentat de Proell intr-un studiu recent (Proell *et al.*, 1994). Pornind de la un model de forma:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{X}{V} \frac{dV}{dt} \quad 2.3.1.1$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{FS_0}{V} - \mu \frac{X}{Y_{X/S}} - \frac{S}{V} \frac{dV}{dt} \quad 2.3.1.2$$

$$\frac{dC_t}{dt} = q\sqrt[3]{S} - \frac{C_t}{V} \frac{dV}{dt} \quad 2.3.1.3$$

$$\frac{dV}{dt} = F - F_v \quad 2.3.1.4$$

unde: X = concentratia celulara;
 S = substrat;
 V = volumul culturii;
 C_t = inhibitori (toxine);
 μ = viteza specifica de crestere;
 F = debit de alimentare;
 S_0 = concentratia de substrat de ali-mentare;
 $Y_{X/S}$ = coeficientul de randament al transformarii $S \rightarrow X$;
 F_v = rata de pierderi prin evaporare.

In conditiile de mai sus, expresiile analitice pentru $Y_{X/S}$ si μ sunt:

$$Y_{X/S} = \frac{\mu y}{My + \mu} \quad 2.3.1.5$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \frac{K_t}{K_t + C_t^2} \quad 2.3.1.6$$

unde valorile parametrilor y , M , μ_{\max} , K_i , K_s si K_t se obtin prin estimare.

Problema conducerii se pune in acest caz la doua nivele:

- determinarea valorii minime a timpului final, t_f , la care concentratia de celule atinge valoarea maxima (dupa care bioprocesul intra in conditii de regim stationar);
- optimizarea productivitatii globale intr-un timp fixat.

In aceste conditii, autorii definesc functia obiectiv ca fiind:

$$\max_F F = \int_0^{t_f} (\mu X) dt \quad 2.3.1.7$$

Starea sistemului cuprinde concentratia celulara, concentratia de substrat, concentratia de toxine si volumul culturii, fiind impuse urmatoarele restrictii:

$$\begin{aligned} F_{\min} &\leq F \leq F_{\max} \\ 0 &\leq V \leq V_{\max} \\ C_t &\leq C_{t \max} \end{aligned} \quad 2.3.1.8$$

Obtinerea debitului optim de alimentare se fac prin maximizarea hamiltonianului functional (Proell *et al.*, 1994):

$$F = \begin{cases} F_{\max} & \text{daca } H_F = \frac{\partial H}{\partial F} > 0; \\ F_{\min} & \text{daca } H_F < 0; \\ F_S & \text{daca } H_F = 0 \end{cases} \quad 2.3.1.9$$

unde: F_S = solutia pe arcul singular (conditia la limita).

Solutia de conducere trebuie circumscrisa conditiilor de control date de viteza specifica de crestere:

$$F(t+1) = F(t) + K\varepsilon(t) \quad 2.3.1.10$$

$$\varepsilon(t) = \mu_{\text{ref}} - \mu(t) \quad 2.3.1.11$$

unde: μ_{ref} = valoarea de referinta (optima) a vitezei specifice de crestere;

K = constanta de acordare

In masura in care avem o dependenta directa $\mu = f(S)$, relatia poate fi rescrisa:

$$\varepsilon(t) = S_{\text{ref}} - S(t) \quad 2.3.1.12$$

cu valoarea de referinta, S_{ref} , determinata analitic:

$$S_{\text{ref}} = \sqrt{\frac{K_S K_i}{2}} \quad 2.3.1.13$$

Pornindu-se de la modele neliniare de evolutie, autorii recomanda in vederea modificarii acestora in echivalente lineare, transformarile neliniare de coordonate. Astfel, productivitatea fermentatorului este controlata indirect prin reglarea concentratiei de celule, a substratului sau a produsilor de metabolism la valorile prescrise, rezultand insa performante suboptimale.

2.3.1.2. Conducerea cu model *a priori* a unor bioconversii

In cazul multor bioconversii (biotransformari) pentru producerea unor substante chimice cu structura complexa, se constata nivele puternice de inhibitie prin substrat sau produs. Pentru a conduce automat la scara industriala asemenea procese, a devenit o practica acceptabila stabilirea prin modelare a intervalelor de optim (in afara inhibitiei) pentru principalele marimi de bioproces. Asa cum se intampla in cazul tuturor bioproceselor unde cinetica microbiana indica inhibitie prin substrat, se recomanda modul de operare semicontinuu alimentat (fed-batch). In aceste cazuri, substrate sau produse (eventual intermediari) sunt adaugate in timpul bioprocesului, conform unui regim specific impuls.

In acelasi timp, pentru rentabilizarea bioprocesului industrial, este practicat modul de operare in regim semicontinuu (alimentat) repetat, ceea ce inseamna ca la terminarea procesului propriu-zis se pastreaza cca. 5-10% din volumul de mediu ca inocul pentru ciclul urmator, in conditiile in care fiabilitatea instalatiei si sterilitatea operarii pot fi asigurate. Conducerea proceselor de transformare in care cresterea celulara si formare produsului au loc concomitent, foloseste intr-un mod mai simplu modelarea prin ecuatii de bilant ce includ expresii cinetice. In acest sens, prin rezolvarea sistemului de ecuatii diferentiale de bilant, se determina concentratiile optime de substrat si produs ca si vitezele specifice optime de mentinut in bioproces in timpul cultivarii.

2.3.1.3. Limitari conceptuale ale conducerii cu model *a priori*

Conducerea bioproceselor in baza unui model *a priori* reprezinta metoda optima de control a acestora, datorita posibilitatii determinarii analitice a coordonatelor punctelor de extrem. Dupa cum s-a aratat in # 2.1. exista o mare varietate de modele analitice capabile sa reprezinte diferite etape de evolutie a unei culturi. In functie de parametrii dominanti, modelele sunt capabile

sa realizeze un fitting acceptabil al datelor experimentale. Din pacate insa, modelele din literatura nu sunt suficient de generale pentru a putea reprezenta toate fazele de evolutie a unui bioproces. Si aceasta deoarece, pe de o parte, nu exista o instrumentatie capabila sa masoare on-line toate variabilele din biosistem, (cf. # 1.3.), iar pe de alta parte, studiile teoretice efectuate pana acum si prezente in literatura nu conceptualizeaza ansamblul fenomenelor biologice, fizice si chimice ce se desfasoara prin mecanisme metabolice. Este si motivul existentei unui numar atat de mare de modele cinetice, fiecare incercand sa surprinda o anumita interdependenta a parametrilor si o evolutie determinata a bioprocesului. Asa se explica si faptul ca realizarea unor structuri de conducere bazate pe modele *a priori* a cedat treptat teren in favoarea unor configuratii mai flexibile, bazate pe tehnici adaptive sau de inteligenta artificiala.

2.3.2. Conducerea adaptiva a bioproceselor

In paralel cu aplicatiile avand la baza conducerea bioprocesului in raport cu un model analitic global, capabil sa reprezinte cat mai adecvat dinamica fenomenelor si interdependenta acestora, au fost dezvoltate strategii alternative de conducere asistate de calculator a bioproceselor (Liu *et al.*, 1993; Jorgensen *et al.*, 1992), dintre care conducerea adaptiva prezinta inca o importanta deosebita (Ferreira, de Azevedo, 1996, Vanichsriratanana *et al.*, 1996).

Algoritmi adaptivi de conducere, conform concepiei scolii belgiene in domeniu, condusa de prof. Bastin (Bastin, Dochain, 1990; Chen *et al.*, 1991), au la baza realizarea unor programe de estimare a variabilelor de bioproces, ce nu pot fi masurate on-line. Conceptual, sunt dezvoltati algoritmi de conducere pornindu-se de la cunostiinte *minimale* despre cinetica bioprocesului, ceea ce revine la a considera ca la baza structurarii unor astfel de programe de conducere este conceptul de *modelare minimala*.

Astfel, este introdusa structura de reactie a unui bioproces, considerat ca un set de M reactii intre N componente. O asemenea structura de reactie nu reprezinta o relatie stoechimetrica intre componente, ci una calitativa si este introdusa ca instrument de lucru necesar pentru obtinerea unui model dinamic operational al procesului. In aceste conditii, un proces simplu de crestere microbiana pe un unic substrat poate fi reprezentat prin:



Este vorba de o reactie autocatalizata cu φ_g = viteza de crestere si X = autocatalizator al propriei productii, neexistand cresterea microbiana fara biomasa initiala (inocul).

Productia prin cataliza enzimatica poate fi reprezentata prin:

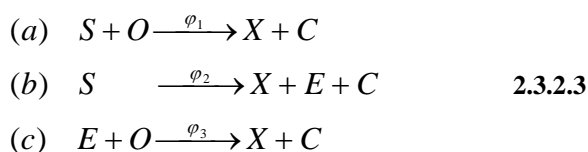


unde: φ_c = viteza catalizei enzimatice;
 P = produși finali.

Cataliza enzimatica este posibila numai in prezenta unei biomase ce creste pe un acelasi substrat.

Un exemplu util de schema de reactie complexa il reprezinta cresterea drojdiei de panificatie pe glucoza, caracterizate prin 3 reactii metabolice:

- cresterea respiratorie pe glucoza (a);
- cresterea fermentativa pe glucoza (b);
- cresterea respiratorie pe etanol (c).



In acest set de 3 reactii cu 5 componente, O reprezinta concentratia oxigenului dizolvat,

E, concentratia etanolului, iar C, concentratia bioxidului de carbon dizolvat.

Din schema de reactie se poate deduce modelul general dinamic al bioprocesului. Daca la modul general se considera ca au loc in bioreactor M reactii ($j = 1, \dots, M$), ce cuprind N componente ξ_i ($i = 1, \dots, N$), vitezele de reactie fiind notate φ_j ($j=1, \dots, M$), evolutia concentratiei fiecarui component φ_i se poate scrie in termeni de bilant:

$$\frac{d\xi_i}{dt} = \sum_{j=1}^M \pm k_{ij} \varphi_j - D\xi_i - Q_i + F_i \quad 2.3.2.4$$

unde:

- $\sum_{j=1}^M$ semnifica faptul ca suma se face pentru reactiile j care implica componentul (substrat sau produs) de indice i ;
- K_{ij} sunt coeficientii de randament strict pozitivi, adimensionali ai componentului ξ_i in reactia j (de tipul $Y_{X/S}$ sau $Y_{P/S}$, conform notatiilor consacrate); acesti coeficienti au semnul - pentru $\xi_i =$ reactant si semnul + pentru $\xi_i =$ produs;
- Q_i reprezinta viteza fluxului de eliminare a componentelor ξ_i din reactor sub forma gazoasa (in general, pentru multe procese $Q = 0$);
- $D\xi_i$ reprezinta concentratia de component ξ_i eliminata in unitatea de timp, daca procesul este continuu ($D =$ viteza de dilutie);
- F_i reprezinta debitul de alimentare cu componentul ξ_i in cazul in care acesta este substrat extern (proces semicontinuu / continuu).

Daca se introduc notatii matriciale:

$$\xi^T = [\xi_1, \dots, \xi_N]$$

$$\varphi^T = [\varphi_1, \dots, \varphi_M]$$

$$F^T = [F_1, \dots, F_N]$$

$$K = [K_{ij}], \text{ matrice } N \times M$$

2.3.2.5

Dinamica bioprocesului poate fi reprezentata prin urmatorul model general neliniar in spatiul starilor:

$$\frac{d\xi}{dt} = K\varphi(\xi, t) - D\xi + F - Q(\xi) \quad 2.3.2.6$$

unde $K\varphi(\xi, t)$ descrie cinetica reactiilor ce au loc, in timp ce ceilalti termeni din partea dreapta descriu dinamica fenomenelor de transport. Trebuie precizat ca $\varphi(\xi, t)$ reprezinta o functie complexa ce depinde de starea procesului si de conditiile de operare, putandu-se explicita prin modelele deja propuse de cresterea si/sau formare a produsului. Aceasta ecuatie de stare sta la baza obtinerii tuturor algoritmilor de estimare si conducere propusi in continuare.

De exemplu, conform ecuatiei (2.3.1.1) pentru reactia de crestere se obtine:

$$\varphi_j(\xi) = \mu_j(\xi)X_i \text{ sau } \varphi_g = \mu X \quad 2.3.2.7$$

unde $\mu(\xi) =$ viteza specifica de crestere.

Modelul dinamic devine in acest caz:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S \\ X \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} -k_1 \\ k_2 \end{bmatrix} \varphi - D \begin{bmatrix} S \\ X \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} F \\ 0 \end{bmatrix} \quad 2.3.2.8$$

iar φ poate fi exprimat in doua moduri:

$$\varphi(S, X) = \alpha(S, X)SX$$

$$\varphi(S, X) = \mu(S, X)X$$

2.3.2.9

Conform celei de-a doua expresii din (2.3.2.8), modelul dinamic coincide cu

reprezentarea clasică pentru $k_2 = 1$ și $F = DS_0$ (S_0 = concentrația substratului în fluxul de alimentare). Astfel:

$$\begin{aligned}\frac{dS}{dt} &= D(S_0 - S) - k_1\mu X \\ \frac{dX}{dt} &= (\mu - D)X\end{aligned}\quad 2.3.2.10$$

dar:

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \equiv k_1\mu \quad 2.3.2.11$$

și deci:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - q_S X \quad 2.3.2.12$$

De asemenea pentru reacția autocatalitică cu un substrat și un produs gazos:



modelul dinamic global devine:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} S \\ X \\ P \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -k_1 \\ 1 \\ k_2 \end{bmatrix} \varphi - D \begin{bmatrix} S \\ X \\ P \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} DS_0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ Q_1 \end{bmatrix} \quad 2.3.2.14$$

În dezvoltarea în continuare a modelului dinamic global, exprimarea cineticii $\varphi(\xi)$ reprezintă dificultatea majoră, în sensul:

- alegerii adecvate a factorilor biologici și fizico-chimici care o influențează;
- stabilirii unei expresii analitice ce descrie corect fenomenele;
- determinării coeficienților cinetici pe baza datelor experimentale.

De aceea, în lipsa unui model corespunzător pentru $\varphi(\xi)$, se recomandă introducerea unei

modelări minime a cineticii de bioproces folosind pentru vectorul de reacție o expresie de tipul:

$$\varphi(\xi) = H(\xi)\rho(\xi) \quad 2.3.2.15$$

unde: $H(\xi)$ este o matrice cunoscută, deci reprezentând partea cunoscută a cineticii, pe când $\rho(\xi)$ este un vector necunoscut funcție de ξ . Ideea este de a exprima vectorul vitezelor de reacție ca un produs de doi factori: $H(\xi)$, în care se introduc numai cunoștințele bine definite și disponibile cu privire la cinetica și $\rho(\xi)$, parametru complet necunoscut, dependent de timp. Forma adoptată este flexibilă și permite cuprinderea multor situații practice, având cazul limită în care cinetica de bioproces este în întregime necunoscută:

$$\varphi(\xi) = \rho(\xi) \quad 2.3.2.16$$

În aceste condiții poate fi dat un exemplu simplu de ilustrare a aplicării conceptului de modelare minimă pornind de la schema de reacție a procesului de obținere a unui produs prin cataliză enzimatică:



Dezvoltarea acestor idei conduce la următoarele:

I Dacă cinetica este *a priori* necunoscută în totalitate, se pot defini parametrii necunoscuți:

$$\begin{aligned}\rho_1(\xi) &= \varphi_g(S, X, P) \\ \rho_{21}(\xi) &= \varphi_c(S, X, P)\end{aligned} \quad 2.3.2.19$$

II În plus, poate fi introdusă expresia:

$$\varphi(\xi, t) = \alpha(\xi, t)G(\xi) \quad 2.3.2.20$$

unde: $\alpha(\xi, t)$ = viteza specifica de reactie;
 $G(\xi)$ = matricea diagonala a produselor $\prod_{n=j} \xi_n$

Pornind de la aceasta expresie, daca vitezele specifice de reactie sunt parametrii necunoscuti, atunci se obtine in continuare pentru schema de reactie de mai sus:

$$\begin{aligned} \rho_1(\xi) &= \alpha_g(S, P) \\ \rho_2(\xi) &= \alpha_c(S, X) \end{aligned} \quad 2.3.2.21$$

In acest caz, matricea $H(\xi)$ are forma:

$$H(\xi) = G(\xi) = \begin{bmatrix} SX & 0 \\ 0 & SX \end{bmatrix} \quad 2.3.2.22$$

in final rezultand:

$$\begin{bmatrix} \varphi_g(S, X, P) \\ \varphi_c(S, X, P) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} SX & 0 \\ 0 & SX \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \rho_1 \\ \rho_2 \end{bmatrix} \quad 2.3.2.23$$

III Daca viteza specifica $\mu(S, P)$ trebuie tratata ca un parametru necunoscut al modelului, se poate defini:

$$\begin{aligned} \rho_1(\xi) &= \mu(S, P) \\ \rho_2(\xi) &= \alpha_c(S, X) \\ H(\xi) &= \begin{bmatrix} X & 0 \\ 0 & SX \end{bmatrix} \end{aligned} \quad 2.3.2.24$$

Pentru variabilele de stare care sunt monitorizate in timp real cu instrumentatia existenta, pot fi realizati algoritmi de estimare on-line cu ajutorul carora se pot obtine informatii fiabile despre evolutia acestor variabile.

De asemenea, pot fi construiti algoritmi de conducere adaptiva pentru bioprocese: pe baza algoritmului adaptiv de conducere, calculatorul recomanda debitul de alimentare cu substrat, astfel incat in bucla inchisa o variabila de proces sa fie mentinuta cat mai aproape de valoarea de referinta. Sarcina regulatorului adaptiv este deci de a determina pentru fiecare interval de esantionare cel mai potrivit debit de alimentare in baza datelor masurate on-line si a valorilor estimate.

In cazul conducerii adaptive, problema controlului neliniar este rezolvata prin folosirea unui algoritm de reglare de tip *control cu liniarizare exacta*.

Astfel, din punct de vedere al modelului general dinamic, obiectivul conducerii il reprezinta controlul unei variabile scalare (de iesire) care poate fi scris ca o combinatie liniara a variabilelor de stare:

$$y = \sum_{i=1}^N C_i \xi_i = C^T \xi \quad 2.3.2.25$$

unde: $C^T = [C_1, C_2, \dots, C_N]$ este un vector al constantelor cunoscute. In acest caz, comanda u reprezinta debitul de alimentare cu substrat:

$$\begin{aligned} u &= F_i \\ F &= bu + f \\ b^T &= [b_1, b_2, \dots, b_N] \quad b_i = 1 \quad b_j = 0 \quad \forall j \neq i \\ f^T &= [f_1, f_2, \dots, f_N] \quad f_i = 0 \quad f_j = F_j \quad \forall j \neq i \end{aligned} \quad 2.3.2.26$$

Introducand aceste notatii, modelul general dinamic (2.3.2.6) devine:

$$\frac{d\xi}{dt} = K\varphi(\xi) - D\xi + bu + f - Q \quad 2.3.2.27$$

cu f si Q masurabili on-line, iar variabilele de stare ξ , obtinute dupa caz, fie prin masuratori, fie cu ajutorul unui estimator on-line.

Principiul controlului cu liniarizare consta in stabilirea unei legi de control $u(\varphi, Q, f, y^*)$, care este o functie neliniara multivariabila depinzand de φ, Q, f, y^* ; aceasta lege de control trebuie astfel calculata incat eroarea (y^*-y) sa respecte o ecuatie diferentiala liniara prespecificata (model de referinta).

Proiectarea controlului cu liniarizare exacta se realizeaza printr-o procedura in trei etape:

Etapa I. Este obtinut, prin derivare, un model intrare/iesire pornindu-se de la modelul general dinamic; astfel modelul are forma unei derivate de ordinul δ :

$$\frac{d^\delta y}{dt^\delta} = f_0(t) + u(t)f_1(t) \quad 2.3.2.28$$

unde: $\delta = \text{grad relativ}$

In functie de aplicatie, $f_0(t)$ si $f_1(t)$ pot fi functii complexe de ξ, Q, F si derivatele lor succesive, modelul intrare/iesire fiind liniar in raport cu $u(t)$.

Etapa II. Este selectat un model de referinta (stabil) liniar al erorii $[y^*(t)-y(t)]$, conform ecuatiei de mai jos:

$$\sum_{j=0}^{\delta} \lambda_{\delta-j} \frac{d^j}{dt^j} [y^*(t) - y(t)] = 0 \quad \text{cu} \quad \lambda_0 = 1 \quad 2.3.2.29$$

Modelul descrie modul de proiectare a scaderii diferentei $[y^*(t)-y(t)]$, coeficientii λ fiind alesi arbitrar, astfel incat ecuatiea diferentiala de mai sus sa fie stabila, iar modelul de referinta sa fie independent de punctul de functionare ales.

Etapa III. In final, proiectarea algoritmului de conducere consta in calcularea comenzii $u(t)$, astfel incat modelul intrare/iesire sa fie identic cu modelul de referinta.

Astfel, este obtinuta o solutie de tipul:

$$u(t) = \frac{1}{f_1(t)} [-f_0(t) + \sum_{j=0}^{\delta-1} \lambda_{\delta-j} \frac{d^j}{dt^j} (y^*(t) - y(t)) + \frac{d^\delta y^*(t)}{dt^\delta}] \quad 2.3.2.30$$

care reprezinta legea *controlului cu liniarizare exacta*.

O aplicatie extrem de simpla, dar ilustrativa pentru procedura descrisa, il reprezinta cazul unui bioproces continuu de crestere microbiana unde se doreste mentinerea concentratiei substratului $S = y$ la o valoare impusa, S^* .

In baza schemei de reactie deja prezentate (2.3.2.1) poate fi scris modelul dinamic:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= \mu(X, S)X - DX \\ \frac{dS}{dt} &= -k_1 \mu(X, S)X - DS + F \end{aligned} \quad 2.3.2.31$$

cea de-a doua ecuatie putand fi considerata un model intrare/iesire cu $\delta=1$. In aceste conditii este ales un model de referinta tot de ordinul 1 pentru eroarea de reglare:

$$\frac{d}{dt} (S^* - S) + \lambda_1 (S^* - S) = 0 \quad 2.3.2.32$$

Deoarece $S^* = \text{ct}$, $\frac{dS^*}{dt} = 0$, adica:

$$\lambda_1 (S^* - S) = \frac{dS}{dt} \quad 2.3.2.33$$

Conform etapei III, substituind a doua relatie din (2.3.2.10) in ecuatie (2.3.2.25) se obtine:

$$-k_1\mu(X,S)X - DS + F = \lambda_1(S^* - S) \quad 2.3.2.34$$

Legea controlului cu liniarizare este expresia lui F care satisface aceasta ecuatie, adica:

$$F = \lambda_1(S^* - S) + k_1\mu(X,S)X + DS \quad 2.3.2.35$$

Daca $F=DS_0$, atunci (2.3.2.10') \Rightarrow (2.3.2.10) si viteza de dilutie D devine variabila asupra careia se exercita actiunea de control. In aceste conditii, legea controlului cu liniarizare devine:

$$D = \frac{\lambda_1(S^* - S) + k_1\mu(X,S)X}{S_0 - S} \quad 2.3.2.36$$

In conceptia autorilor, o atentie deosebita trebuie acordata stabilitatii controlului, fiind de consemnat doua aspecte:

- in bioprocesele fed-batch, obiectivul conducerii nu il reprezinta stabilizarea globala a procesului, ci mai degraba mentinerea unei traiectorii instabile sub control si aceasta in contrdictie cu un proces continuu, unde se are in vedere stabilitatea globala;
- in contextul unei modelari minimale si functie de formele particulare ale acesteia, o aceeaasi metoda de realizare a regulatorului cu linearizare poate produce bucle de reglare stabile sau instabile.

Pentru proiectarea reglatoarelor cu liniarizare este recomandata metoda generala de aplicare sistematica a tehnicii perturbatiei singulare, care conduce la obtinerea modelelor *complet reduce*. Aceasta este in principal o tehnica de transformare a unui set de $M + N$ ecuatii diferentiale intr-un set de N ecuatii diferentiale si un set de M ecuatii algebrice, deci o tehnica de reducere la maximum a ordinului ecuatiilor diferentiale (care sunt, in general, de ordinul I).

Introducerea acestei metode necesita cunoasterea coeficientilor de randament K, in

general putin cunoscuti sau variabili in timp, ceea ce revine la faptul ca regulatorul nu este bine adaptat procesului. Pentru eliminarea acestei consecinte, se apeleaza la metodologii speciale de proiectare a reglatoarelor (conducerea adaptiva).

In principiu, legea controlului cu liniarizare este reformulata prin adaugarea legii de control adaptiv. Legea de control adaptiv consta in introducerea unei functii $h(y, F, Q)$ de aproximare a derivatei de ordinul I pentru parametrul necunoscut in conexiune cu valorile pentru coeficientii K. In acest mod parametrul necunoscut ce exprima coeficientii de randament K se estimeaza / calculeaza on-line la fiecare moment de esantionare. In asemenea cazuri apar probleme de stabilitate a buclei de reglare datorate lipsei cunoasterii parametrului derivat din vectorul coeficientilor K.

Practica industrială impune varianta ce porneste de la faptul ca substratul alimentat in timpul procesului semicontinuu / continuu este introdus impreuna cu restul mediului lichid; in aceste conditii, viteza de dilutie, D, devine variabila asupra careia se intervine in conducerea bioprosesului. Astfel, vom avea $\mathbf{u} = \mathbf{D}$, iar in toate legile de reglare ce deriva de la modelul dinamic global, se substituie F cu DS_0 .

Analiza modalitatilor de conducere adaptiva prezentate permite structurarea unor concluzii preliminare. Astfel, conceptualizarea sub forma matriceala a variabilelor de bioproses ofera o usurinta sporita in implementarea algoritmilor de conducere (Hinde, Cooper, 1995; Meszaros, *et al.*, 1995), dar nu are corespondenti fizici reali. In al doilea rand, prin definitie, optimizarea conducerii se face de-a lungul fiecarei perioade de esantionare (Estler, 1995; Andrews, 1995), ceea ce nu corespunde unei optimizari globale (Harmon, *et al.*, 1987; Modak, Lim, 1987; Modak, Lim, 1989); *ipso facto*, metoda de conducere este din start suboptimala (Morningred *et al.*, 1992; Modak, Lim, 1992). In sfarsit, realizarea unor configuratii de conducere

bazate pe asemenea tipologii de modele nu ofera sansa cunoasterii intrinseci a mecanismelor bio-fizico-chimice ce stau la baza metabolismului celular (Lee, Ramirez, 1996).

2.3.3. Conducerea inteligenta a bioproceselor

Patrunderea tot mai accentuata a tehnicilor de inteligenta artificiala in problematica conducerii bioproceselor reprezinta, pe de o parte, rezultatul unui quasi esec al tehnicilor traditionale de conducere (cu model *a priori* sau adaptiv / optimale), iar pe de alta parte, o incercare de eludare a problematicii cunoasterii printr-o compensare pragmatica. Primul aspect porneste de la constatarea (Narendra, Parthasarathy, 1992) existentei unor structuri de control ce au la baza elementul decizional uman (afectat de subiectivism) si care ofera rezultate comparabil mai bune in procesul de conducere decat structurile algoritmice bazate pe tehnicile clasice de control. Al doilea aspect ia in considerare faptul ca exista o tendinta generala de stagnare conceptuala in domeniul modelarii de bioproces (singura deschidere fiind cea a modelelor structurale), motiv pentru care se pune din ce in ce mai mult accent pe performantele sporite ale tehnicii de calcul in dauna unei cunoasteri explicite a fenomenelor si a legilor ce guverneaza evolutiile viului (Hinde, Cooper, 1994; Cooper *et al.*, 1992). In acest fel, prin tehnici de tip retele neuronale, structuri fuzzy, algoritmi genetici sau sisteme expert, se formalizeaza matematic gradul de necunoastere a fenomenelor, se folosesc cunostiintele si aprecierile (subiective) ale expertului uman sau se simuleaza legi de evolutie in vederea stabilirii unor tipuri de dezvoltare. Asemenea solutii dau rezultate in general mai bune decat cele obtinute prin tehnici traditionale de conducere, dar nu contribuie substantial la cunoasterea aprofundata a bioproceselor.

2.3.3.1. Structurarea sistemelor expert pentru conducerea bioproceselor

In general, un sistem expert (SE) reprezinta un algoritm de conducere creat pornindu-se de la experienta operatorului uman si alcatuit din reguli ce redau in mod coerent capacitatea de decizie asupra unor interventii de efectuat in functie de traiectoria/evolutia unor variabile/fenomene.

Aplicabilitatea SE porneste de la problematica alegerii unui algoritm adecvat pentru dezvoltarea acestuia, dedicat bioprocesului avut in vedere (ESDT). Intrucat tehnologia de creare si utilizare a SE pentru conducerea diferitelor tipuri de procese a permis dezvoltarea multor produse comerciale, dar in acelasi timp, nu este inca cunoscut un algoritm de dezvoltare specializat pentru bioprocese, alegerea unui ESDT adecvat se face respectand o serie de criterii stabilite cu precizie.

In acest sens, trebuie avute in vedere structura, functiile, schemele de implementare ale sistemelor expert si caracteristicile algoritmilor ESDT, inclusiv limitarile ce apar in aplicarea in bioprocese.

Functiile si structurile de implementare ale sistemului expert

Caracteristicile algoritmului de dezvoltare a SE pentru conducerea bioproceselor trebuiesc corelate cu functiile pe care acesta trebuie sa le indeplineasca in conditii reale:

- identificarea starii populatiei celulare, care cuprinde evaluarea on-line a starii fiziologice, interpretarea comportamentului celular, predictia starilor viitoare, detectia si diagnosticul fenomenelor biologice normale sau anormale;
- identificarea starii aparaturii implicate in conducerea bioprocesului, in ceea ce inseamna diagnosticarea defectiunilor la aparatele de masura sau la efectoriile interventiilor;

- supervizarea sistemului conventional de conducere, care implica activarea / dezactivarea buclor de control individual al variabilelor de bioproces, modificarea parametrilor de control, schimbarea valorilor de referinta ale unor variabile, etc.;
- comunicare avansata cu operatorul de proces prin reprezentarea tuturor informatiilor despre proces intr-o forma adecvata cerintelor utilizatorului si explicarea deciziilor si activitatilor intreprinse.

In domeniul bioproceselor, structura de implementare cea mai utilizata este cea a controlului indirect, fiind posibile doua tipuri de cuplare:

- prin utilizarea unei interfete, ceea ce inseamna ca algoritmul SE functioneaza independent pe un calculator separat interfatat cu regulatoarele conventionale (De obicei nivelul superior este introdus sub forma unui ESDT, din care se dezvoltă SE propriu-zis, el fiind introdus ulterior, dupa ce sistemul de control conventional este deja in functiune). Actualmente aceasta este solutia standard utilizata in conducerea bioproceselor;
- cuplarea integrata, cand sistemul SE coexista cu algoritmi de control conventional utilizandu-se un unic calculator. Desi aceasta schema de cuplare este probabil cea mai buna solutie, fiindca algoritmi ESDT existenti nu au fost creati pentru un asemenea tip de integrare, se utilizeaza in prezent prima varianta.

Caracteristicile algoritmului ESDT

Caracteristicile generale comune tuturor aplicatiilor in timp real in domeniul bioproceselor sunt:

- viteza mare de executie (ESDT dezvoltat in limbaj C si/sau Assembler);
- activitatea regulilor la timpul prevazut, cu posibilitatea de a modifica aceste

intervale de timp in functie de etapele existente in evolutia bioprocesului;

- operare ciclica continua;
- interventie in evolutia unor evenimente / fenomene continui sau discrete in functie de timp (durata) - reguli temporale;
- integrare cu alti algoritmi externi, prin existenta unor mecanisme puternice de schimb de informatii;
- existenta unor mecanisme pentru structurarea cunostiintelor dupa criterii functionale de timp, deci posibilitatea de a activa/dezactiva grupuri de reguli.
- flexibilitatea in reprezentarea cunostiintelor si sistem eficient de eliminare a cunostiintelor inexacte sau de integrare on-line a unora recente (datorita caracterului incremental si repetitiv al modului de creare a bazei de cunostinte);
- capacitatea de a explica utilizatorului regulile existente si modul de folosire;
- ilustrarea grafica a evolutiei bioprocesului;
- capacitatea de invatare folosind retele neuronale si/sau alte mecanisme.

Caracteristicile specifice ale unui ESDT pentru controlul bioproceselor sunt:

- "largime" limitata si "profundime" crescuta, ceea ce inseamna inregistrarea unui anumit numar limitat de variabile masurabile on-line sau estimate, existenta unui numar de cateva zeci/sute de reguli;
- utilizarea unor informatii (incerte, imprecise, incomplete) avand un caracter calitativ, ceea ce necesita capacitatea de a avea mecanisme pentru inglobarea unor cunostinte necantitative si pentru definirea unor nivele de incredere;
- orientarea catre folosirea unor variabile continui;
- supervizarea sistemelor continui de masura prin schimbarea intervalor de esantionare, recalibrarea periodica a senzorilor, efectuarea unor teste de functionare a aparatelor de masura, verificarea functionarii unor sisteme analitice complexe.

Proiectarea unui sistem expert pornind de la un ESDT poate dura in functie de complexitatea aplicatiei intre 3-12 luni, ceea ce este acceptabil. Dar timpul si dificultatile ar fi diminuate daca s-ar porni de la un ESDT special conceput pentru dezvoltarea unor sisteme expert de conducerea bioproceselor.

In realizarea oricarui sistem expert pentru bioprocese, structurarea bazei de date si bazei de cunostinte sunt de maxima importanta, de adecvanta acestora ca si de complexitatea setului depinzand direct performanta procedurii de conducere.

2.3.3.2. Conducerea bioproceselor prin intermediul retelelor neuronale

Controlul si optimizarea unui bioproces fed - batch este realizata (Thibault, Bresegem, 1991) prin intermediul unui model neuronal predictiv, determinandu-se acea secventa de conducere care minimizeaza o functie obiectiv in prezenta unor limitari structurale, luandu-se in considerare un proces de crestere de biomasa in prezenta unui substrat limitativ. Substratul este introdus in reactor la o concentratie constanta. Se considera un model inhibitiv de tip Haldane. Functia obiectiv consta in maximizarea productivitatii in conditiile fermentatiei fed - batch. Problema conducerii o reprezinta stabilirea ratei de alimentare care duce la satisfacerea functiei obiectiv.

Elaborarea legii de comanda se face in baza estimarii de catre reseaua neuronală a valorilor curente ale biomasei si substratului. Criteriul de optimizare al biomasei la momentul k este:

$$J_k = -V\hat{X}_{k+N} \quad 2.3.3.1$$

unde: $V\hat{X}_{k+N}$ = valoarea estimata dupa N pasi a biomasei, in baza valorilor curente X_k si S_k ;

V = volumul util de biosinteza;

N = orizontul de predictie.

Urmeaza o secventa de N valori calculate ale ratei de alimentare (F_{k+i-1} , $i = 1...N$) cu urmatoarele restrictii:

$$0 \leq F_{k+i-1} \leq F_{\max}, \quad i = 1...N \quad 2.3.3.2$$

$$|F_{k+i} - F_{k+i-1}| \leq \Delta F_{\max}$$

Evident, doar prima valoare estimata a ratei de alimentare este aplicata, urmatoarea secventa optima fiind calculata la momentul $k + 1$.

In acest caz, reseaua neuronală propusa contine o configuratie de N neuroni si realizeaza o predictie a cresterii de biomasa la fiecare interval de esantionare, a modificarii substratului ca si valoarea estimata a biomasei la sfarsitul orizontului de timp. Rezultatele obtinute in raport cu diferitele rate de alimentare sunt comparate cu rata teoretica optima de alimentare, elaborandu-se comanda curenta.

Pentru a limita variatiile bruste ale ratei de alimentare de la un moment de esantionare la altul - fapt ce ar duce la inducerea unui regim oscilant in cadrul bioprocesului - se poate utiliza o functie obiectiv:

$$J = \alpha (V\hat{X}_{k+N} - VX_k)^2 - \beta \sum_{i=1}^N (F_{k+i} - F_{k+i-1})^2 \quad 2.3.3.3$$

unde α si β reprezinta factori de ponderare corespunzatori.

Alegerea lui α si β este facuta, in general, in domeniul $10^2 - 10^5$, desi valorile recomandabile sunt: $\alpha = 10$ si $\beta = 0.1$.

CONCLUZII

1. Studiul modelelor de literatura conduce la ideea imposibilitatii fundamentarii unor modele conceptuale capabile sa respecte postulatele lui Edwards si Wilke. In aceste conditii, exprimarea matematica a evolutiei diferitelor parametrii de bioproces se face prin neglijarea in special a caracterului multivariabilitatii biosistemelor. De asemenea, exista o dihotomie a abordarii diverselor clase de modele: pe de o parte se urmareste o cunoastere cat mai aprofundata a mecanismelor viului ce actioneaza la nivelul celulei, iar pe de alta parte, o tratare sintetica a fenomenelor macroscopice pare a fi satisfacatoare. Abordarile structuraliste ale ultimei perioade par sa dea un suflu nou conceptiei analitice.
2. Aprecierea diferitelor obiective ale conducerii bioproceselor s-a facut pornind de la performantele economice ale acestora. Au fost prezentate astfel modalitati de determinare directa a profitului, tinandu-se cont de tipul bioprocesului si faza lui de evolutie.
3. Analiza metodelor din literatura cu privire la diferitele structuri de conducere a bioproceselor demonstreaza imposibilitatea actuala a unei abordari sistematice in domeniul optimizarii acestora. Astfel, daca conducerea cu model *a priori* este ineficienta datorita inexistentei unor modele care sa poata sa caracterizeze global bioprocesul (nelinear, multivariabil, cu parametrii varianti in timp), nici solutia conducerii adaptive nu aduce imbunatatiri majore: optimizarea procesului de-a lungul fiecarei perioade de esantionare nu presupune implicit atingere optimului global. In sfarsit, solutia tehnicilor de inteligenta artificiala confera o rezolvare economica (in sensul eficientizarii) problematicii conducerii bioproceselor si mai putin una conceptuala. De altfel, experienta umana ce sta la baza implementarii acestor tehnici le confera puternice caracteristici subiective, grefate pe viteze superioare de calcul.

BIBLIOGRAFIE

- Abidi, K., Corriou, J. P., Fonteix, C.
Aiba, S.
Aiba, S., Hara, H.
Aiba, S., Shoda, M.
Andrews, J. F.
Andrews, G. F.
Andreyevna, L. N., Biryukov, V. V.
Balzer, D., Hesse, J., Schmidt, A.
Bastin, G.
- Bastin, G.
- Bastin, G., Dochain, D.
- Bastin, G., Chen, L., Chotteau, V.
- Ben-Hassan, R. M., Ghaly, A. E., Mansour, M. H.
Blackman, F. F.
Bley, Th.
van Breusegem, V., Bastin, G.
- Brown, D. E., Vass, R. C.
Cardello, R. J., San, K. Y.
Cazzador, L.
Chattaway, T., Demain, A. L.,
Stephanopoulos, G.
Chen L., Bastin, G., van Breusegem, V.
- Chen, L., Bastin, G.
- Chiu, S. Y., Erickson, L. E., Fan, L. T.,
Kao, I. C.
Constantinides, A. et al.
Contois, D. E.
Cooney, C. L., Wang, H. Y., Wang, D. I. C.
Cooper, D. J., Megan, L., Hinde, R. F.
- DECHEMA Monograph, Process Variables in
Biotechnology, Bioreactor Perf. EFB-WP,
Frankfurt, 1984
Rec. progr. genie proc., **7**, p.131, 1993
Adv. Biochem. Eng., **23**, p.85, 1982.
J. Gen. Microbiol., **11**, p.41, 1970.
J. Ferment. Technol., **47**, p.790, 1969.
Biotechnol. Bioeng., **10**, p.707, 1968.
J. Biotechnol., **42**, p.281, 1995
Biotechnol. Bioeng. Symp., **4**, p.61, 1973.
Acta Biotechn., **4**, p.11, 1984
Computer Applications in Fermentation Technology:
Modelling and Control of Biotechnological Process,
N. M. Fish, R. I. Fox & N. F. Thornhill (Ed.),
Elsevier Sci. Publishers, Amsterdam, Holland,
p.331, 1988
ECC'91 European Control Conference, Grenoble,
France, p.2001, 1991
On line estimation and adaptive control of
bioreactors, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam,
Holland, 1990
Can we identify biotechnological processes ?, Tech.
Rep., 1992
App. Biochem. Biotechnol., **30**, p.233, 1991

Ann. Bot., **19**, p.281, 1905.
Acta Biotechnol., **7**, p.151, 1987
A singular perturbation approach to the reduced
order dynamical modelling of reaction systems,
Tech. Rep., 1992
Biotechnol. Bioeng., **15**, p.321, 1973.
Biotechnol. Bioeng., **32**, p.519, 1988.
Biotechnol. Bioeng., **31**, p.670, 1988
Biotechnol. Prog., **8**, p.81, 1992

Adaptive Nonlinear Regulation of Fed-Batch
Biological Reactors, Tech. Rep., 1991
*On the model identifiability of stirred tank
bioreactors*, ECC'91, Europ. Contr. Conf.,
Grenoble, France, 1991
Biotechnol. Bioeng., **14**, p.207, 1972

Biotechnol. Bioeng., **12**, p.803, 1970.
J. Gen. Microbiol., **21**, p.40, 1959
Biotechnol. Bioeng., **19**, p.269, 1977.
AIChE Journal, **38(1)**, p.41, 1992

- Cushing, J. M.
Doran, P. M.
Dovi, V. G., Reverberi, A. P.
Eaton, J. W., Rawlings, J. B.
Edwards, H. V., Wilke, Ch. R.
Edwards, V. H.
Eiki, H., Osono, T.
Estler, M. U.
Ferreira, E. C., Feyeo de Azevedo, S.

Fishman, V. M., Biryukov, V. V.
Frederickson, A. G. et al.
Freyer, S. A., Kurten, T. V., Wandrey, C.

Gaden Jr., E. L.

Geyson, H. M., Gray, P.
Ghose, T.K., Tyaji, R. D.
Han, K., Levenspiel, O.
Harder, A., Roels, J. A.

Harmon, J., Svoronos, S. A., Lyberatos, G.
Henson, M. A., Dale, E. S.
Hinde, R. F., Cooper, D. J.
Hinde, R. F., Cooper, D. J.
Hinshelwood, C. N.

Holzberg, I. et al.
Isaacs, S. H., Yhoma, M.
Isidori, A.

Jerusalimsky, N. D.

Jorgensen, S. B., Moller, H. E., Andersen, M. Y.
Kargi, F., Shuler, M. L.
Kishimoto, M.
Kokotovici, P., Khalil, H. K., Reilly, J. O.

Konak, A.R.
Kono, T., Asai, T.
Kossen, N. W. F., Ossterhns, N. M. G.

Kurtanek, Z.
Lee, J., Ramirez, W. F.
Liu, Y. C., Wu, W. T., Tsao, J. H.
Ljubenova, V., Ignatova, M.

Math. Biosc., **107**, p.47, 1991
Biotechnol. Bioeng., **28**, p.73, 1986
Chem. Eng. Sci., **48(14)**, p.2609, 1993
Chem. Eng. Sci., **47(1)**, p.705, 1992
Biotechnol. Bioeng., **10**, p.205, 1968.
Biotechnol. Bioeng., **18**, p.147, 1976.
J. Ferm. Bioeng., **69**, p.313, 1990
Bioproc. Eng., **12**, p.205, 1995
UKACC Int. Conf. Control'96, Conf. Publ. **427**, p.1184, 1996
Biotechnol. Bioeng. Symp., **4**, p.647, 1973.
Adv. Appl. Microbiol., **13**, p.419, 1970.
Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol, A. Fiechter, (Ed.), **30**, p780, 1984
J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng., **1**, p.413, 1959.
Biotechnol. Bioeng., **14**, p.857, 1972
Biotechnol. Bioeng., **21**, p.1401, 1979.
Biotechnol. Bioeng., **32**, p.430, 1988
Adv. Biochem. Eng., Fiechter, A. (Ed.), Springer Verlag, Berlin, **21**, p.56, 1981.
Biotechnol. Bioeng., **30**, p.335, 1987
Chem. Eng. Sci., **47(4)**, p.821, 1992
Chem. Eng. Sci., **49(9)**, p.1403, 1994
AIChE Journal, **41**, p.110, 1995
The chemical kinetics of the bacterial cell, Clarendon Press, Oxford, 1946.
Biotechnol. Bioeng., **9**, p.413, 1967.
Chem. Eng. Sci., **47**, p.943, 1992
Nonlinear Control Systems: An Introduction, 2nd Ed., 1989, Springer Verlag, Berlin, Germany
Microbial physiology and continous culture, Powell, E. O. (Ed.), London: Her Majesty's Stationary Office, p.23, 1967.
EFB Bioreac. Eng. Course, p.131, 1992

Biotechnol. Bioeng., **21**, p.1871, 1979.
Biotechnol. Bioeng., **20**, p.416, 1975.
Singular perturbations methods in control analysis and design, 1986, Academic Press, London, England.
J. Appl. Chem. Biotechnol., **24**, p.453, 1974.
J. Ferment. Technol., **46**, p.391, 1968.
Biotechnology, H. Rehm & E. Reed (Ed.), Weinheim, Germany, **2**, 1985..
EFB Bioreact. Eng. Course, p.285, 1992
Chem. Eng. Sci., **51**, p.521, 1996
Bioproc. Eng., **9**, p.135, 1993
Bioproc. Eng., **11**, p.107, 1994

- Luedeking, A., Piret, E. L. Biotechnol. Bioeng., **1**, p.393, 1959.
Luong, J. H. T. Biotechnol. Bioeng., **29**, p.242, 1987
Matanguihan, R. M., Konstantinov, K. B., Yoshida, T. Bioproc. Eng., **11**, p.213, 1994
Meszaros, A., Brdys, A. M., Tatjewski, P., Lednicky, P. Bioproc. Eng., **12**, p.1, 1995
Michaelis, L., Menten, M. L. Biochem. Z., **49**, p.333, 1913
Modak, J. M., Lim, H. C. Biotechnol. Bioeng., **30**, p.528, 1987
Modak, J. M., Lim, H. C. Biotechnol. Bioeng., **33**, p.11, 1989
Modak, J. M., Lim, H. C. Chem. Eng. Sci., **47(15)**, p.3869, 1992
Monod, J. Ann. Rev. Microb., **3**, p.371, 1949.
Monod, J. Recherche sur la croissance des cultures bacteriennes, Hermann & Cie., Paris, France, 1942.
Morningred, J. D., Paden, B. E., Seborg, D. E., Mellichamp, D. A. Chem. Eng. Sci., **47(4)**, p.755, 1992
Moser, A. Acta Biotechn., **4**, p.3, 1984
Moser, A. EFB Bioreac. Eng. Course, p.137, 1992
Moser, A. Bioprocess Technology, Springer Verlag, Berlin, Germany, p.113, 1988.
Mulchandani, A., Luong, J. H. T., Leduy, A. Biotechnol. Bioeng., **32**, p.639, 1988
Nagai, S. Adv. Biochem. Eng., **11**, p.49, 1979
Narendra, K. S., Parthasarathy, K. Int. J. App. Reas., **6**, p.109, 1992
Neubert, M., Borman, E. J., Gebhardt, I., Wollechensky, E. Acta Biotechnol., **4(1)**, p.37, 1984
Nielsen, J., Villadsen, J. Chem. Eng. Sci., **47**, 7/18, p.4225, 1992,
Nosrati, R., Fonteix, C., Marc Recents progres en genie des procedees, Ed. Lavoisier, France, **5**, p.275, 1991.
Nyholm, N. Biotechnol. Bioeng., **18**, p.1043, 1976
O'Neil, G. D., Fyeras, G. Biotechnol. Bioeng., **28**, p.1323, 1986
Patwardhan, A. A., Wright, G. T., Edgar, T. F. Chem. Eng. Sci., **47(4)**, p.721, 1992
Pokkinen, M., Oinas, R., Hamaker, E., Saari, A., Denicolai, M. Modelling and Control of Biotechnical Processes, M. N. Karim, G. Stephanopoulos (Ed.), Pergamon Press, Oxford, p.461, 1992
Powell, E. O. J. Gen. Microbiol., **18**, p.259, 1958.
Ramkrishna, D. et al. J. Ferment. Technol., **44**, p.210, 1966.
Richards, J. W. Proc. Biochem., **23**, p.56, 1988
Rohner, M., Meyer, H. P. Bioprocess Eng., **13**, p.69, 1995,.
Ryu, D. J., Humphrey, A. E. J. Ferment. Technol., **50**, p.424, 1972.
Ryu, D. J., Kim, J. Y. Biochem. Eng. for 2001 (Proceed. Asia Pacific Biochem. Eng. Conf.), p.385, 1992.
Sakamoto, N. Biotechnol. Bioeng., **28**, p.1191, 1986
Shields, R. W., Kao, E. I. Bioproc. Eng., **10**, p.91, 1994
Schugerl, K. Bioreaction Eng., **1**, John Wiley & Sons, N.Y., SUA, 1987
Shu, P. Biotechnol. Bioeng., **3**, p.95, 1961.
Shuler, M. L. Comprehensive Biotechnol., Moo-Young, M. (Ed.), Pergamon Press, New York, **2**, 1985.
Sivakumar, A., Srinivasaraghavan, T., Bioproc. Eng., **11**, p.185, 1994

- Swaminathan, T., Baradarajan, A.
Slimes, T., Pokkinen, M., Holmberg, A., Linko, P.
Sonnleitner, B.
Sonnleitner, B., Fiechter, A.
Stanbury, P. F., Whitaker, A.
Teissier, G.
Topiwala, H. H., Sinclair, G.
Trilli, A.
Turner, B. G., Ramkrishna, D., Jansen, N. B.
Vanichsriratana, W., McFarlane, D., Keshavarz, T., Leigh, J. R.
Verhoff, P. F.
Verhulst, P. F.
Wayman, M., Tseng, M. C.
Webb, J. L.
Weinrich, S. D., Lapidus, L.
Williams, F. M.
Williams, F. M.
Wucherer, H., Heiler, H., Egerer, E.
Yamane, T.
Yano, T. et al.
Young, T. B., Bungay, H. R.
- Bioproc. Eng., **12**, p.141, 1995
EFB Bioreac. Eng. Course, p.271, 1992
Adv. Biochem. Eng., Fiechter, A. (Ed.), Springer Verlag, Berlin, **40**, 1989.
Principles of Fermentation Technology, Pergamon Press, Oxford, 1994
Ann. Physiol. Physicochim. Biol., **12**, p.527, 1936.
Biotechnol. Bioeng., **13**, p.919, 1971.
J. Appl. Chem. Biotechnol., **27**, p.251, 1977
Biotechnol. Bioeng., **32**, p.46, 1998
UKACC Int. Conf. Control'96, Conf. Publ. **427**, p.258, 1996
Biotechnol. Bioeng., **14**, p.411, 1972.
Rech. math. sur la loi d'acroiss. de la popul., Nouv. Mem. de l'Acad. Roy.des Sciences et Belles-Lettres de Bruxelles, **18**, 1845.
Biotechnol. Bioeng., **18**, p.383, 1976.
Enzyme and Metabolic Inhibition, Academic Press, New York, **1**, 1963.
Biotechnol. Bioeng., **14**, p.13, 1972.
System analysis and simulation in ecology, Pattern, B. V. (Ed.), Academic Press, New York, **7**, cap.3, 1975.
J. Theoret. Biol., **15**, p.90, 1969.
BioEng., **2**, p.45, 1992
Biotechnol. Prog., **9**, p.81, 1993
Agric. Biol. Chem. (Jap.), **30**, p.42, 1966.
Biotechnol. Bioeng., **15**, p.377, 1973