

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 procedurii 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 procedurii 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 parametri (adesea necontrolabili) si folosirea unui numar mic de parametri usor de estimat si controlat (Ljubenova, Ignatova, 1994).

In contrast cu modelele ce exprima mecanisme si comportamente celulare sau chiar subcelulare doar in scopul conducerii

bioprocetelor, 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. $X = f(OUR)$). Accesarea, 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 bioprocetsele 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 generală a modelelor cineticii de bioproces este dată de Moser (Moser, 1988), fig. 2.1.1. Conform acestei clasificări, în modelarea biosistemelor se preferă modelele deterministice celor probabilistice. La rândul lor modelele deterministice pot fi (Moser, 1988):

- *nestructurate* - celulele sunt tratate tip *black box*, având importanță doar cantitatea de celule (concentrația); în acest caz, celulele, ca entități globale, sunt influențate doar de mediul exterior;
- *structurate* - se ține cont de structura celulară, fie la nivelul componentelor chimice (modele structurate chimic), fie la nivelul morfologiei celulare, introducând efecte legate de formă, vârstă, dimensiune, etc.

O altă clasificare a modelelor ce descriu biosisteme este făcută în funcție de recunoașterea/neglijarea faptului că o populație celulară este alcătuită dintr-un număr mare de indivizi (celule) care pot avea proprietăți (caracteristici) diferite. Din acest punct de vedere, modelele pot fi (Moser, 1988):

- *nesegregate* (distributive, continue): se ia în considerare existența celulelor individuale;
- *segregate* (corpusculare): se explicitează prin model existența celulelor individuale cu proprietăți distincte.

Atată vreme cât proprietățile de interes pot fi reprezentate în mod adecvat prin valori medii, abordarea nesegregată este suficientă. În schimb, în special în cazul celulelor transformate prin inginerie genetică, cantitatea de informație codificată utilizată în biosinteza unui produs poate diferi de la un grup de celule la altul, și în consecință, corelarea cu formarea produsului nu mai este identică pentru toate celulele. În acest caz modelele segregate sunt importante. Cele mai simple și mai utilizate modele sunt cele nestructurate, nesegregate (d.e. modelul Monod de creștere microbiană). Dar numai

modelele structurate pot prezice răspunsul culturilor în condiții neechilibrate de creștere (creșterea este echilibrată într-un interval de timp dacă în această perioadă fiecare proprietate extensivă a biosistemului crește în aceeași proporție (noțiune introdusă de Campbell (Campbell, 1977)). Modelul Monod este valabil numai în condiții de creștere echilibrată, în general, faza exponentială în culturi discontinue și regimul staționar într-un chemostat sunt considerate ca exemple tipice pentru acest tip de creștere.

În sfârșit, postulatele formulate de Edwards și Wilkie (Edwards, Wilke, 1968) în domeniul modelării de bioproces stabilesc normele de realizare a oricărei cinetici a viului; astfel modelul trebuie:

- să fie capabil să reprezinte toate fazele culturii;
- să fie suficient de flexibil ca să aproximeze o serie de tipuri de date fără să introducă distorsiuni semnificative;
- să aibă parametrii de aproximare cu corespondent fizic direct;
- să fie derivabil continuu;
- să aibă parametrii ușor de evaluați;
- să fie ușor de folosit, odată parametrii evaluați.

2.1.1. Modele nestructurate nesegregate

Kossen și Oosterhuis (Kossen, Oosterhuis, 1985) consideră modelele nestructurate (și implicit, nesegregate) ca având un caracter pronunțat de tratare a fenomenului biologic drept *black box*, iar cele structurate drept *gray box*, concepută ca o colecție de *cutii negre* mai mici aranjate în ceea ce se numește *structură* biosistemului (totalitatea cutiilor negre cu interconexiunile lor). Modelele matematice nestructurate pot reprezenta:

- ecuații constitutive:
 - de viteză - cinetică;
 - de transport;
 - termodinamice;
- ecuații de bilanț - stoechiometrie.

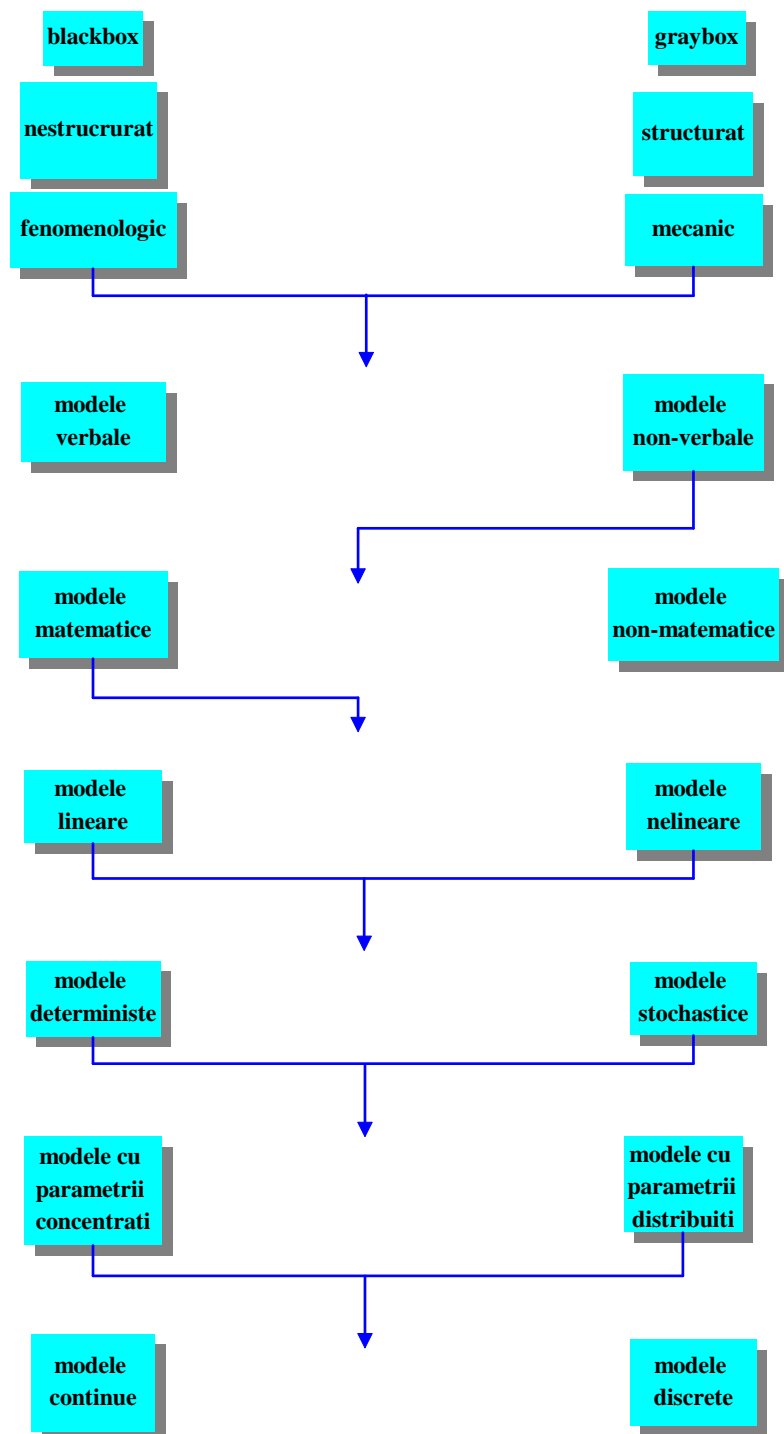


Figura 2.1.1.1. - Clasificare generala a tipurilor de modele de bioproces

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 masă celulară pe parcursul bioprocesului ($dX/dt = \max$).

2.1.1.2. Modele cinetice nestructurate pentru creștere și utilizarea substratului

Se poate considera ca $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$ - viteză 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 creșterii de către substrat, fără inhibiție (tip de cinetica cu saturatie)

Până în prezent cinetica creșterii microbiene este dominată de legea lui Monod (Monod 1942, Monod, 1949) pentru funcția $\mu=\mu(S)$. Această relație este o analogie a ecuației Michaelis-Menten (Michaelis, Menten, 1913; Sakamoto, 1986) de bază pentru cinetica enzimatică, fiind derivată din aceasta în mod empiric și putând fi considerată de aceea ca o ecuație de cinetica formală (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} = viteză maximă specifică de creștere [1/h]

K_S = constanta de saturatie [g/L]

Figura de mai jos prezintă evoluția tipică a vitezei specifice de creștere în funcție de S , fără inhibiție:

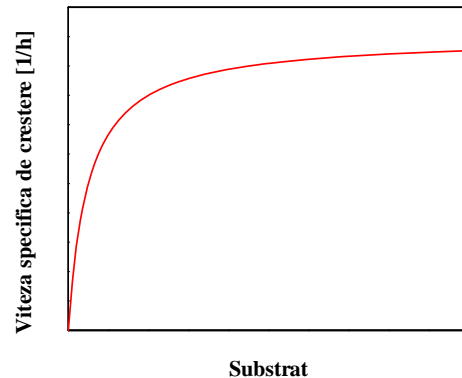


Figura 2.1.1.2 Dependența $\mu=\mu(S)$ cf. legii lui Monod

Similar viteza de consum a substratului este:

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

Aceste relații sunt legate între 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):

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

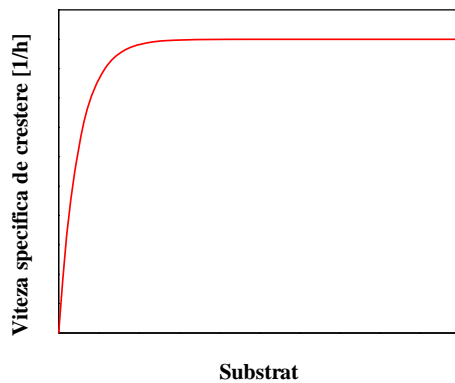


Figura 2.1.1.3 Dependenta $\mu=\mu(S)$ cf. ecuatiei Teissier

- 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 ($n>0$)

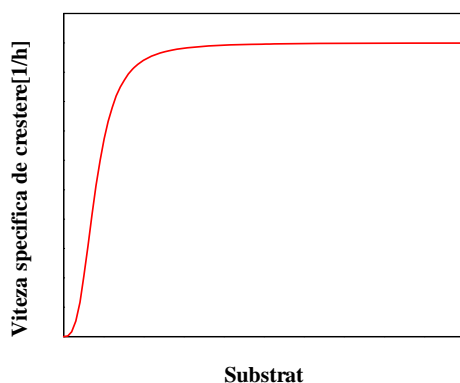


Figura 2.1.1.4 Dependenta $\mu=\mu(S)$ cf. ecuatiei Moser

- 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 K_D influenta permeabilitatii celulare, difuziei substratului si dimensiunii celulare:

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

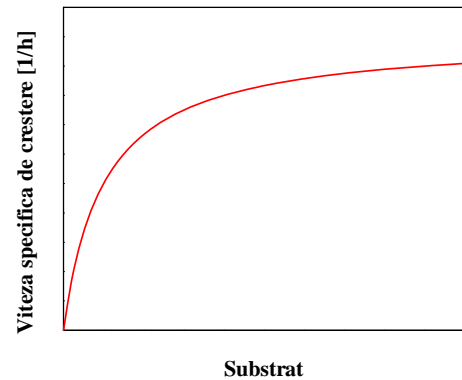
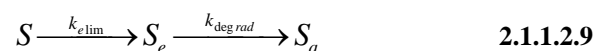


Figura 2.1.1.5 Dependenta $\mu=\mu(S)$ cf. ecuatiei Powell

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:

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

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:

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

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:

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

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	$n/K_S^{1/n}$	$1-1/n$	$1+1/n$