

**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):

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

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 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. transformarea 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

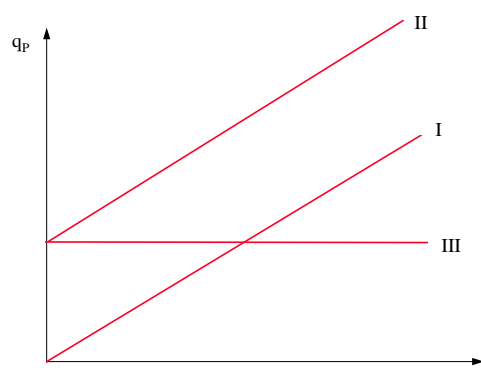
metabolismul energetic, d.e. producerea acidului citric, obtinerea aminoacizilor prin biosinteza.

*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  $q_s, \mu, q_p$ .

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  $\mu$  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:

$$r_p = Y_{p/x} r_x \quad 2.1.1.2.48$$

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  $\Phi$  (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  $\mu C_j$  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).

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:

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

unde:  $k_0$  = constanta vitezei globale de biosinteza

$\varepsilon$  = eficienta exprimarii genetice;

$G_p$  = concentratia ADN in plasmide;

$\mu^+$  = 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:

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

unde:  $X^+$  = concentratia celulelor purtatoare de plasmide

In acest mod coeficientii A si B din ecuatia de mai sus prin structurarea in ecuatia (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 (corpusculare)

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 nestructurate (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  $\mu$ ,  $dS/dt$ , 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

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 interfereze 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).