

Biochemický reaktor - úvod

Matej Kintler

6. januára 2020

Obsah

1	Uvod	3
2	Biochemický reaktor	4
2.1	Základné informácie	4
2.2	Typy bioreaktorov	4
2.3	Parametre opisujúce bioreaktor a ich význam	5
2.4	Matematické modely prietokového biochemického reaktora	6
3	Analýza matematických modelov	8
3.1	Dynamika	8
3.2	Stabilita	10
4	Odhad parametrov	13
4.1	Optimalizačné metódy	13
4.2	Pristupy k odhadu	13
5	Výsledky	13
6	Záver	13

1 Uvod

2 Biochemický reaktor

2.1 Základné informácie

Biochemický reaktor sa dá vo všeobecnosti definovať ako nádoba, ktorá využíva aktivitu biologického katalyzátora na dosiahnutie požadovanej chemickej premeny. Bioreaktor všeobecne poskytuje biomechanické a biochemické prostredie, ktoré riadi prenos živín a kyslíka do buniek a produkty metabolizmu z buniek. Dal by sa tiež označiť ako zariadenie, určené na optimálny rast a metabolickú aktivitu organizmu, pôsobením biokatalyzátora, enzýmu alebo mikroorganizmov a buniek zvierat alebo rastlín. Surovinou môže byť organická alebo anorganická chemická zlúčenina alebo dokonca komplexný materiál. Produkt konverzie môže zahŕňať pekárske kvasinky, proteín, štartovacie kultúry alebo primárne metabolity (napr. aminokyseliny, organické kyseliny, vitamíny, polysacharidy, etanol atď.) a sekundárne metabolity (napr. antibiotiká). Bioreaktory sa môžu použiť na biokonverziu alebo biotransformáciu produktov (steroidná biotransformácia, L-sorbitol), enzýmov (amyláza, lipáza, celuláza), rekombinantných produktov (niektoré vakcíny, hormóny, ako je inzulín a rastové hormóny). Bioreaktor musí byť navrhnutý tak, aby vyhovoval konkrétnemu procesu [2].

2.2 Typy bioreaktorov

Na základe spôsobu prevádzky môže byť bioreaktor klasifikovaný ako vsádzkový, kontinuálny a polovsádzkový. Pri vsádzkovom spôsobe sa sterilné kultivačné médium naočkuje mikroorganizmami. Počas tohto reakčného obdobia sa s časom menia množstvá buniek, substrátu vrátane výživných solí, vitamínov a produktov. Fermentácia prebieha vopred stanovenú dobu a produkt sa zbiera na konci. V polovsádzkovom režime sa do reaktora postupne pridávajú živiny, ako prebiehajú bioreakcie, aby sa získali lepšie výťažky a vyššia selektivita spolu s reguláciou reakčnej teploty. Produkty sa zbierajú na konci výrobného cyklu ako pri vsádzkovom bioreaktore. Charakteristickou črtou kontinuálneho bioreaktora je proces neustáleho dodávania substrátu. Prúd kvapaliny alebo suspenzie sa kontinuálne privádza a odstraňuje z reaktora. Na dosiahnutie rovnomerného zloženia a teploty je potrebné mechanické alebo hydraulické miešanie. Kultivačné médium, ktoré je buď sterilné alebo obsahuje mikroorganizmy, sa nepretržite dodáva do bioreaktora, aby sa udržal stabilný stav. Reakčné premenné a kontrolné parametre zostávajú konzistentné a vytvárajú v reaktore časovo konštantný stav. Výsledkom je nepretržitá produktivita. Tradičné vsádzkové miešacie tankové reaktory (STR) a kontinuálne miešacie tankové reaktory (CSTR) existujú už po stáročia a sú stále široko prijímané v chemickom a biologickom priemysle kvôli ich jednoduchosti. Ostatné bioreaktory, ktoré majú špeciálne konštrukčné a prevádzkové vlastnosti sú foto-bioreaktory, rotačné bubnové reaktory, hmlový bioreaktor, membránový bioreaktor, bioreaktory s náplňou a fluidnou vrstvou atď. Tieto boli navrhnuté tak, aby vyhovovali špecifickým procesom [2].

2.3 Parametre opisujúce bioreaktor a ich význam

Hlavné premenné, ktoré opisujú mikrobiálne procesy v prírode sú uvedené v Tabuľke 1.

Množstvo mikroorganizmov môže byť vyjadrené ako biomasa (x) alebo počet buniek (N) pri jednobunkových organizmoch (baktérie, kvasinky, spóry) na jednotku pôdy, množstva vody, objemu alebo obsahu plochy. Vláknité organizmy (huby, aktinomycéty) sú charakterizované dĺžkou mycélia (L) a počtom hýf (n). Treba zdôrazniť, že (n) nie je totožné s (N), pretože vetvenie hýf skôr pripomína delenie buniek pri jednobunkových organizmoch. Vzťah medzi (x), (N) a (L) nie je jednoznačný pretože hmota jednotlivých buniek a šírka hýf sa líši v závislosti od organizmu a podmieno rastu. Všeobecne možno povedať, že pri nadbytku výživných zlúčenín sa formujú veľké bunky resp. široké hýfy, zatiaľ čo pri hladovaní sa tvoria skôr menšie bunky alebo užšie hýfy. Výber biomasy (x) alebo počet buniek (N) alebo dĺžku mycélia (L) závisí na danom prípade. Biomasa (x) má očividnú výhodu pri skúmaní cyklu uhlíka a živín, zatiaľ čo počet buniek (N) sa preferuje pri skúmaní populácie napr. výskyt mutácií alebo prenos plazmidov [1].

Tabuľka 1: Prehľad hlavných dynamických parametrov opisujúcich biochemický reaktor [1].

Parameter	Symbol	Rozmer
Hustota/koncentrácia biomasy	x	μg bunkovej hmoty na g pôdy; g bunkovej hmoty m^{-2} ; μg bunkovej hmoty na mL vody
Počet buniek	N	10^6 buniek na g pôdy; 10^6 buniek na mL vody
Dĺžka mycélia	L	m na g pôdy; m na mL vody
Počet hýf	n	10^6 na g pôdy; 10^6 na mL vody
Koncentrácia limitujúceho substrátu	s	mg na g pôdy; gm^{-2} ; gL^{-1} vody
Koncentrácia produktu	p	mg na g pôdy; gm^{-2} ; gL^{-1} vody

Koncentrácia limitujúceho substrátu vo vode alebo v pôde, (s), predstavuje množstvo esenciálnej živiny využívané mikroorganizmami na rast a rozmnožovanie. Bežne nevieme posúdiť všetky potenciálne dostupné živiny a zamerať sa iba na jednu alebo zopár individuálnych zlúčenín alebo triedu molekúl, ktorá reprezentuje limitujúcu zlúčeninu, pretože chemoorganotrofné mikroorganizmy čerpajú energiu z organických zlúčenín, zatiaľ čo fotosyntetizujúce mikroorganizmy vyžadujú prísun svetla a zdroj fosforu dusíka a železa [1].

Množstvo produktov (p). Sem patria všetky medziprodukty a konečné pro-

dukty metabolizmu mikroorganizmov, ktoré vznikajú počas rastu. Typickými medziproduktmi sú organické kyseliny vznikajúce počas glykolýzy. Jediný konečný produkt aeróbnej mikrobiálnej dekompozície je oxid uhličitý, avšak pri anaeróbných podmienkach vznikajú rôzne organické kyseliny, alkoholy, ketóny atď [1].

2.4 Matematické modely prietokového biochemického reaktora

Najjednoduchším matematickým modelom, ktorý opisuje prietokový biochemický reaktor je tzv. Monod model. Tento model je veľmi obľúbený kvôli svojej jednoduchosti. Zakladá sa na dvoch predpokladoch: 1) špecifická rýchlosť rastu buniek závisí od koncentrácie substrátu a 2) tvorba biomasy je spojená so spotrebou substrátu. Formulácia rovníc, ktoré popisujú materialovú bilanciu biomasy je nasledovná:

$$\begin{array}{ccccc} \text{akumulácia} & & \text{množstvo} & & \text{množstvo} \\ \text{bunkovej} & = & \text{vzniknutých} & - & \text{odobraných} \\ \text{hmoty} & & \text{buniek} & & \text{buniek} \end{array}$$

a pre materialovú bilanciu substrátu platí:

$$\begin{array}{ccccccc} \text{akumulácia} & & \text{množstvo} & & \text{množstvo} & & \text{množstvo} \\ \text{substrátu} & = & \text{dodaného} & - & \text{odobraného} & - & \text{spotrebovaného} \\ \text{v systéme} & & \text{substrátu} & & \text{substrátu} & & \text{substrátu MO} \end{array}$$

Ak uvažujeme, že objem reaktora sa nemení a prítok substrátu sa rovná odtoku suspenzie, potom môžeme písať:

$$V \left(\frac{dx}{dt} \right) = V\mu(s)x - Fx, \quad (1)$$

$$V \left(\frac{ds}{dt} \right) = Fs_{in} - Fs - V \frac{1}{Y_x} \mu(s)x. \quad (2)$$

Ak obe strany rovníc vydělíme objemom reaktora a označíme si pomer $\frac{F}{V} = D$, rýchlosť riedenia, môžeme rovnice 1 a 2 upraviť do nasledovného tvaru:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu(s) - D)x, \text{ kde } \mu(s) = \mu_m \frac{s}{K_M + s}, \quad (3)$$

$$\frac{ds}{dt} = D(s_{in} - s) - \frac{1}{Y_x} \mu(s)x. \quad (4)$$

Tabuľka 2: Parametre Monod modelu, ich symbol a rozmer.

Parameter	Symbol	Rozmer
Špecifická rýchlosť rastu	$\mu(s)$	h^{-1}
Maximálna špecifická rýchlosť rastu	μ_m	h^{-1}
Michaelisova konštanta	K_M	gL^{-1}
Výťažok (biomasa)	Y_x	
Objem reaktora	V	L
Prietok substrátu/suspenzie	F	Lh^{-1}
Koncentrácia biomasy	x	gL^{-1}
Koncentrácia substrátu	s	gL^{-1}
Koncentrácia čerstvého substrátu	s_{in}	gL^{-1}

Rovnice 3 a 4 tvoria najjednoduchší opis biochemického reaktora – Monod model, a význam jednotlivých parametrov je uvedený v Tabuľke 2. Avšak, tento model má množstvo nedostatkov. Nedokáže vysvetliť jednotlivé fázy rastu, ktoré sú pozorované experimentálne a to: lag-fázu, smrť buniek na základe hladovania, tvorbu produktu atď. Tieto nedostatky boli doplnené u tkzv. štrukturovaných modelov.

Model, ktorý berie do úvahy aj tvorbu produktu, získame doplnením Monod modelu do nasledovného tvaru:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu(s) - D) x, \quad (5)$$

$$\frac{ds}{dt} = D(s_{in} - s) - \frac{1}{Y_x} \mu(s) x - \frac{1}{Y_p} \nu x, \quad (6)$$

$$\frac{dp}{dt} = \nu x - Dp, \quad (7)$$

kde p predstavuje koncentráciu produktu v gL^{-1} , Y_p je bezrozmerný koeficient výťažnosti produktu a ν predstavuje kinetický člen rýchlosti tvorby produktu v jednotkách času napr. h^{-1} . Do rovnice 4 sme doplnili časť, ktorá vraví, že časť substrátu sa spotrebuje na tvorbu produktu a rovnica 7 predstavuje obyčajnú materiálovú bilanciю produktu.

Ak by sme chceli do modelu zakomponovať tendenciu úmrtia mikroorganizmov počas hladovania, treba upraviť špecifickú rýchlosť rastu $\mu(s)$ tak, že bude obsahovať inhibičný člen K_i , ktorého rozmer je gL^{-1} . Špecifická rýchlosť rastu potom nadobudne tvar:

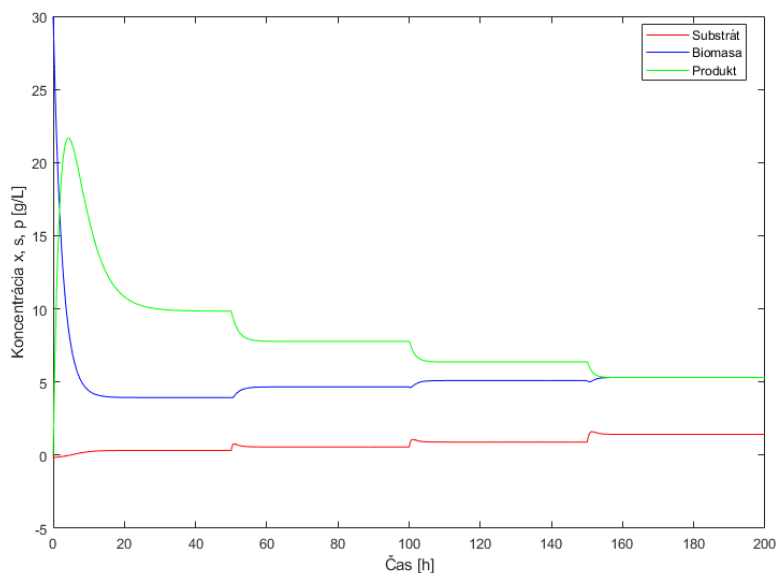
$$\mu(s) = \mu_m \frac{s}{K_M + s + \frac{s^2}{K_i}}. \quad (8)$$

3 Analýza matematických modelov

V predchádzajúcej časti sme spomenuli viacero modelov, ktorými môžeme opísať biochemický reaktor. V tejto časti sa budeme venovať analýze dvoch modelov a to Monod modelu doplnenému o produktovú časť a modelu, taktiež s produktovou časťou, ale s vplyvom inhibície.

3.1 Dynamika

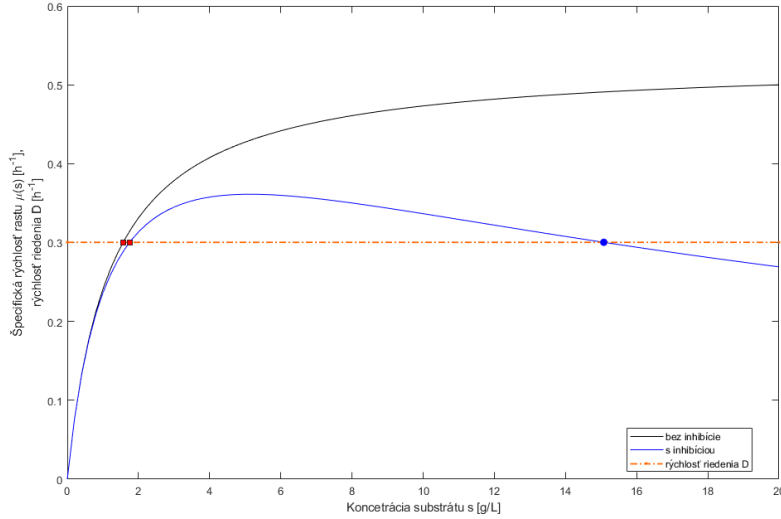
Matematický model, ktorý opisuje bioreaktor je nelineárny model. To znamená, že odozva systému je rôzna pre rovnakú veľkosť skokovej zmeny. Túto nelinearitu si možno všimnúť na Obr. 1. Ďalej si môžeme všimnúť prudký nárast koncentrácie produktu na počiatku, ktorý bol spôsobený nadbytkom biomasy a malým množstvom substrátu v systéme. Po ustálení dynamika produktu pripomína systém 1. rádu. Na druhej strane v dynamike tvorby biomasy sa prejavuje nestabilná nula (menšie podkmity), ktoré sú spôsobené veľkou časovou konštantou tvorby biomasy a malou časovou konštantou odtoku suspenzie. V dynamike substrátu sa zasa prejavuje stabilná nula, ktorá opäť súvisí s rýchlym prítokom čerstvého média a pomalšou spotrebou na tvorbu biomasy a produktu.



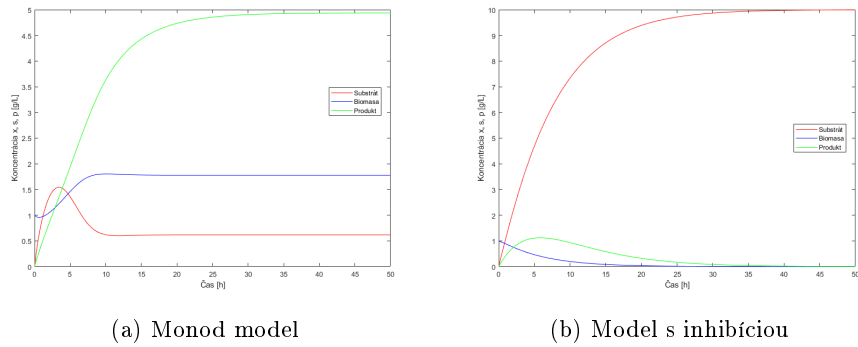
Obr. 1: Viacnásobná skoková zmena rýchlosti riedenia D pri začiatočných podmienkach $p_0 = s_0 = 0, x_0 = 30gL^{-1}$.

Réžim fungovania bioreaktora má významný vplyv na dynamiku celého systému a pri určitých podmienkach Monod model a model s inhibíciou môžu vy-

kazovať rovnaké správanie, presne ako je tomu na Obr. 1. Avšak, tieto modely sa odlišujú vo formulácii špecifickej rýchlosti rastu, ktorý má zásadný vplyv na dynamiku systému. Ako vidno na Obr. 2 pri Monod modeli sa špecifická rýchlosť rastu limitne blíži ku maximálnej špecifickej rýchlosti rastu, zatiaľ čo model s inhibíciou dosahuje svoje maximum v bode $S^* = \sqrt{K_M K_i}$.



Obr. 2: Porovnanie priebehu špecifickej rýchlosti rastu Monod modelu (červená) a modelu s inhibíciou (modrá). Červeným štvorčekom sú označené nenulové stabilné ustálené stavy, modrou guľkou je označený nestabilný stav.



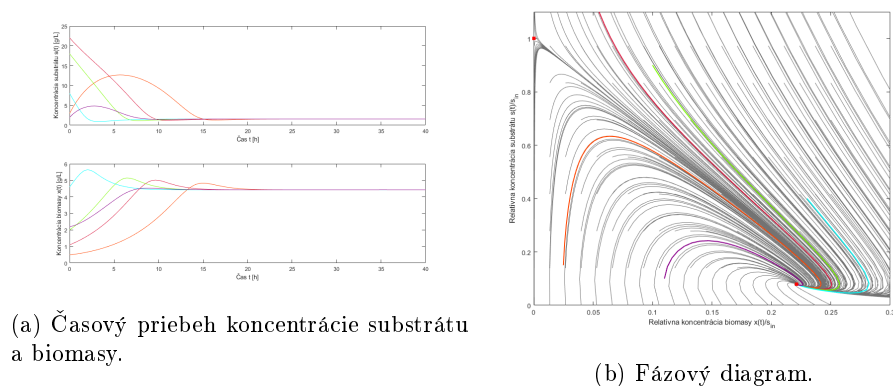
Obr. 3: Porovnanie dynamiky modelov pri rovnakých pracovných podmienkach.

Pri nesprávne zvolených pracovných podmienkach, či už počiatočných podmienkach systému, koncentrácie čerstvého substrátu alebo rýchlosti riedenia, model

s inhibíciou bude vykazovať diametrálne odlišné správanie od Monod modelu, ako to je zobrazené na Obr. 3.

3.2 Stabilita

Výhodou prietokových bioreaktorov je, že pri dodržaní správnych podmienok, dokážeme systém uviesť do časovo konštantného stavu, ktorý nepretržite pracuje. Avšak nájdenie správnych parametrov, nemusí byť také triviálne, ako by sa na prvý pohľad mohlo zdať. Z rovnice 5 vyplýva, že na dosiahnutie ustáleného stavu, je nutné, aby sa špecifická rýchlosť rastu rovnala rýchlosti riedenia, takto získame netriviálne riešenie, alebo je počiatočná koncentrácia biomasy nulová a takto získame triviálne riešenie. Na Obr. 2 môžeme vidieť nenulové ustálené stavy Monod modelu, ale aj modelu s inhibíciou. Je dobré si všimnúť, že zatiaľ čo Monod model má iba jeden nenulový ustálený stav, model s inhibíciou už obsahuje dva.



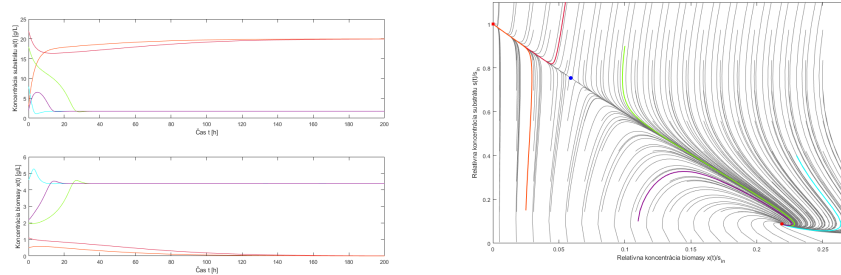
(a) Časový priebeh koncentrácie substrátu a biomasy.

(b) Fázový diagram.

Obr. 4: Stabilita a ustálený stav Monod modelu pri nastavení parametrov uvedených v Tabuľke 3.

Na fázovom diagrame Monod modelu (Obr. 4 napravo), môžeme vidieť oba ustálené stavy. Ak zvolíme začiatočné podmienky rôzne od nuly (najmä pri koncentrácii biomasy – vedú k triviálnemu riešeniu a systémom bude pretekať čerstvý substrát) pri konštantnej rýchlosti riedenia menšej alebo rovnnej ako špecifická rýchlosť rastu, sa vždy dostaneme do toho istého ustáleného stavu.

Model s inhibíciou vykazuje odlišné správanie. Na fázovom diagrame (Obr. 5 napravo) môžeme sledovať už dva nenulové stavy a jeden nulový. Výsledkom triviálneho riešenia je "výplach", ktorý vedie k nulovej koncentrácii biomasy a systémom bude pretekať čerstvý substrát. Ako si môžeme všimnúť, vždy keď je rýchlosť rastu biomasy pomalšia ako je odtok suspenzie zo systému, dostaneme sa do výplachu.



(a) Časový priebeh koncentrácie substrátu a biomasy. (b) Fázový diagram. Červeným štvorčekom sú označené stabilné ustálené stavy, modrou guľičkou je označený nestabilný stav.

Obr. 5: Stabilita a ustálené stavy modelu s inhibíciou pri nastavení parametrov uvedených v Tabuľke 3.

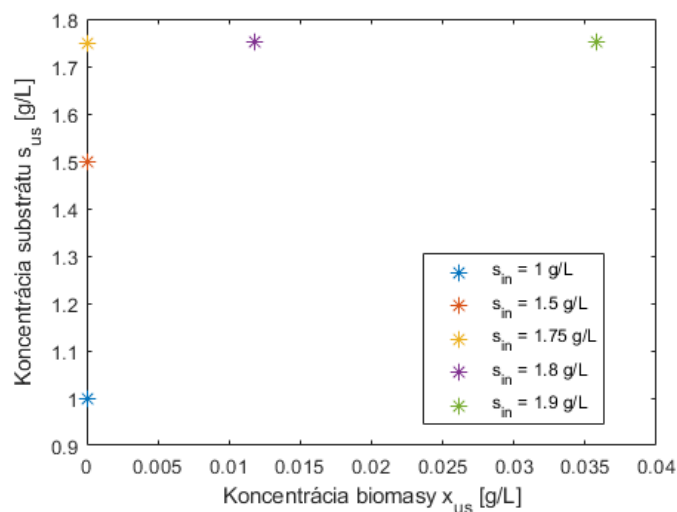
Ostali dva netriviálne stavy, z ktorých jeden je nestabilný a druhý je stabilný. V okolí nestabilného stavu môžu nastať dva prípady a to v závislosti od počiatočných podmienok. Ak sa nachádzame na Obr. 2 naľavo, to znamená, že rýchlosť rastu biomasy je väčšia ako odtok suspenzie, dostaneme sa do nenulového ustáleného stavu. Ak sa nachádzame viac napravo, dostaneme sa do výplachu.

Tabuľka 3: Nastavenie parametrov Monod modelu a modelu s inhibíciou. Údaje pod čiarou mali danú veľkosť v prípade, že sa nemenili.

Parameter	Veľkosť	Rozmer
μ_m	0.53	h^{-1}
ν	0.5	h^{-1}
K_M	1.2	gL^{-1}
K_i	22	gL^{-1}
Y_x	0.4	
Y_p	1	
V	3.33	L
F	1	Lh^{-1}
s_{in}	20	gL^{-1}
p_0, s_0	0	gL^{-1}
x_0	10	gL^{-1}

Ďalší parameter, ktorý dokáže ovplyvniť stabilitu systému, je koncentrácia čerstvého substrátu. Z Obr. 6 je zrejmé, že ak koncentrácia čerstvého roztoku je nižšia ako nejaká minimálna hodnota, náš systém pôjde do výplachu. Koncentrácia čerstvého substrátu ovplyvňuje špecifickú rýchlosť rastu (na Obr. 2 si to možno predstaviť ako znižovanie maximálnej hodnoty koncentrácie substrátu), tým pádom ak sa nachádzame v oblasti pod prvým nenulovým ustáleným stavom (ten v takomto prípade neexistuje, pretože sme mimo pracovného

nastavenia) dochádza k výplachu. Ak sa chceme dostať do nenulového ustáleného stavu, je nutné aby koncentrácia čerstvého substrátu bola vyššia ako koncentrácia v prvom nenulovom ustálenom stave. Pri Monod modeli by sme mohli ísť s touto koncentráciou do nekonečna, kde by sme dosiahli maximálnu rýchlosť rastu. Ale na rozdiel od Monod modelu, pri modeli s inhibíciou, by od istého momentu so zväčšujúcou sa koncentráciou čerstvého substrátu klesala špecifická rýchlosť rastu, ktorá sa limitne blíži k nule a koncentrácia biomasy padne na nulu.



Obr. 6

Je zrejmé, že nastaviť optimálny chod biochemického reaktora je zložitá záležitosť a jeho pracovný režim treba prispôsobiť na základe daného fermentačného média, teda na základe parametrov maximálnej špecifickej rýchlosti rastu, Michaelisovej konštanty a prípadne konštanty inhibície. Tie však nepoznáme a je nutné ich získať z jednotlivých časových priebehov, najčastejšie koncentrácie substrátu.

4 Odhad parametrov

4.1 Optimalizacne metody

4.2 Pristupy k odhadu

riesenie diff rovníc; pomocou diferencie

5 Vysledky

6 Zaver

Literatúra

- [1] Nicolai Panikov. *Kinetics of Microbial Processes. In.*: 12 2016.
- [2] Jagriti Singh, Nirmala Kaushik, and Soumitra Biswas. Bioreactors – technology & design analysis. 06 2014.