

Primjena metodologije kemijskog inženjerstva u razvoju bioprocasa

KUI 13/2005.
Prispjelo 13. srpnja 2004.
Prihvaćeno 7. prosinca 2004.

B. Zelić i Đ. Vasić-Rački

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu,
Zavod za reakcijsko inženjerstvo i katalizu, Marulićev trg 19; HR-10000 Zagreb;
Tel.: + 385 1 4597 146; Fax: + 385 1 4597 133; E-mail: bzelic@fkit.hr

Upotreba metodologije kemijskog inženjerstva, bilanciranje i modeliranje procesa te procjena procesnih parametara prikazana je na primjeru dva mikrobiološka procesa; proizvodnja pirogroždane kiseline iz glukoze gdje je upotrebljena genetski modificirana *Escherichia coli* YYC202 *ldhA::Kan* i proizvodnja 2,5-diketo-D-glukonske kiseline, intermedijera u biosintetskom postupku proizvodnje Vitamina C, iz glukoze gdje je upotrebljena genetski modificirana *Erwinia citreus*.

Poseban naglasak dan je na metode optimiranja procesnih parametara: genetski algoritam (GA) i evolucijsko optimiranje (EVOP). Obje metode temelje se na načelima biološke evolucije primijenjenim na traženje mogućih optimuma.

Prikazan je razvoj nestrakturnih matematičkih modela bioprocasa. Takvi modeli ne prikazuju i ne uzimaju u obzir široki spektar reakcija koje se odvijaju u stanicama već prate samo makroskopske veličine bioprocasa. Unatoč tome nezaobilazno su sredstvo analize i optimiranja bioprocasa te omogućuju njihovo bolje razumijevanje i razvoj.

Na kraju je prikazan razvoj kontinuiranog bioprocasa proizvodnje pirogroždane kiseline s potpuno integriranom separacijom produkta upotrebom elektrodijalize. Uspoređeni su klasični "kemijski" proces proizvodnje piruvata pirolizom vinske kiseline i mikrobiološki proces, a kao kriterij usporedbe primijenjene su bilance tvari i ekonomska ocjena uspješnosti procesa.

Ključne riječi: *Kemijsko-inženjerska metodologija pri razvoju bioprocasa, razvoj bioprocasa, simuliranje, modeliranje, optimiranje, ekološko/ekonomska ocjena bioprocasa*

Uvod

Kemijska sinteza velikog broja produkata kemijske, farmaceutske i prehrambene industrije provodi se u više stupnjeva uz zaštitu pojedinih aktivnih skupina, primjenom različitih organskih otapala i vrlo često teških metala kao katalizatora. K tome, visoke temperature, pred- i nad-tlakovi nužni za provedbu kemijskih reakcija čine takve sinteze skupima, kompleksnima i nepovoljnima za okoliš. Zbog toga je u posljednjih dvadesetak godina razvijen velik broj procesa koji za svoju provedbu primjenjuju biokatalizatore.¹ Primjenom biokatalizatora sintetski put je skraćen, procesi se provode u fiziološkim uvjetima, izbjegnuta je upotreba teških metala kao katalizatora, sporedni produkti su lako razgradljivi i neotrovni, što čini biotransformacije jednostavnijima za provedbu i ekološki prihvatljivim.²

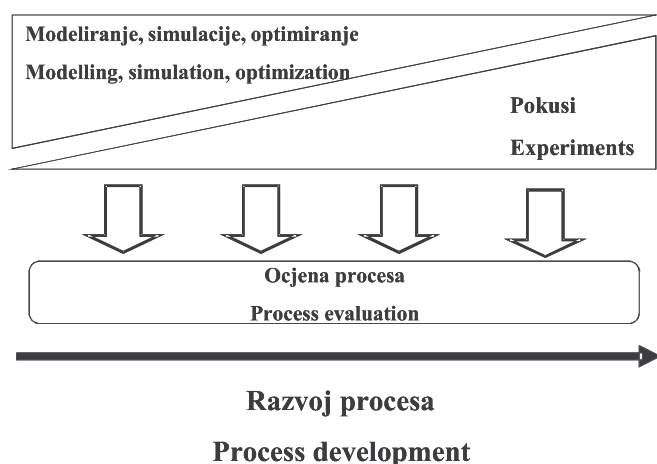
Industrijska upotreba biokatalizatora vrlo je raširena, primjerice pri proizvodnji vitamina, aminokiselina, organskih kiselina, antibiotika i cijelog niza drugih kemikalija.³ Moderne metode metaboličkog inženjerstva omogućuju provedbu velikog broja reakcija biotransformacija uporabom rekombinantnih produkcijskih mikroorganizama prilagođenih provedbi željenih reakcija, primjerice kroz ekspresiju gena bitnih za proizvodnju željenog produkta, "isključivanjem" neželjenih sporednih reakcija itd.

Pri razvoju bilo kojeg procesa i/ili proizvoda, a posebice visokovrijednih proizvoda farmaceutske industrije potrebno je voditi se trima glavnim smjernicama: (1) biti prvi na tržištu uz istodobno (2) postizanje visoke kvalitete konačnog proizvoda i (3) minimalne troškove proizvodnje. Osim ekonomskih čimbenika i socijalnih gledišta sadržanih u tim smjernicama, zaštita okoliša i kontrola emisija nezaobilazni su i ključni čimbenici razvoja održivih procesa. Prema tome eko-učinkovit razvoj procesa i/ili proizvoda presudan je činitelj održivog razvoja.

Kako bi se udovoljilo tim zahtjevima za eko-učinkovit razvoj procesa i/ili proizvoda potrebno je tijekom cjelokupnog razvoja provoditi ekonomsku i ekološku ocjenu procesa. Naime, najveći dio proizvodnih troškova i mogućih onečišćenja okoliša, te s njima povezanih troškova zbrinjavanja, posljedica je odluka donesenih u ranim fazama razvoja. Stoga je posvećivanje posebne pozornosti ekonomskoj i ekološkoj ocjeni procesa u ranim fazama razvoja nužno za ostvarivanje pozitivnih ekološko-ekonomskih karakteristika procesa i/ili proizvoda.⁴

Naravno, u ranim fazama razvoja najveći problem u ocjeni valjanosti procesa i/ili proizvoda je nedostatak raspoloživih i pouzdanih podataka. Osim toga takvu ocjenu potrebno je provesti u što kraćem vremenu kako bi ideja iz laboratorijskog mjerila prešla u poluindustrijsko i/ili industrijsko mjeri-

lo, odnosno u slučaju negativne ocjene bila u potpunosti odbačena. Primjena metodologije kemijskog inženjerstva, modeliranje i simuliranje procesa, te identifikacija i procjena procesnih parametara, u ranim fazama razvoja procesa pokazala se osobito učinkovitom u povećanju broja raspoloživih podataka i smanjenju vremena potrebnog za njihovo generiranje. Takav pristup omogućuje smanjenje broja pokusa potrebnih za ocjenu valjanosti mogućih proizvodnih procesa, a samim tim ostvaruje znatne uštede (slika 1). Naime, troškovi potrebni za provedbu tih istraživanja neusporedivo su manji od dobiti proizašlih iz primjene optimalnih procesnih uvjeta u industrijskom mjerilu. Treba napomenuti da u ranim fazama razvoja procesa nije potrebno razvijati kompleksne modele koji će obuhvatiti sve moguće karakteristike procesa, već je cilj definirati i optimirati ključne parametre procesa, te na temelju rezultata simulacije procesa pomoću modela, rezultata provedenih pokusa i ekološko-ekonomske verifikacije valjanosti procesa identificirati rizike i mogućnosti razvijanog procesa te odrediti moguće izvore onečišćenja okoliša.



Slika 1 – Strategija razvoja procesa

Fig. 1 – Strategy of process development

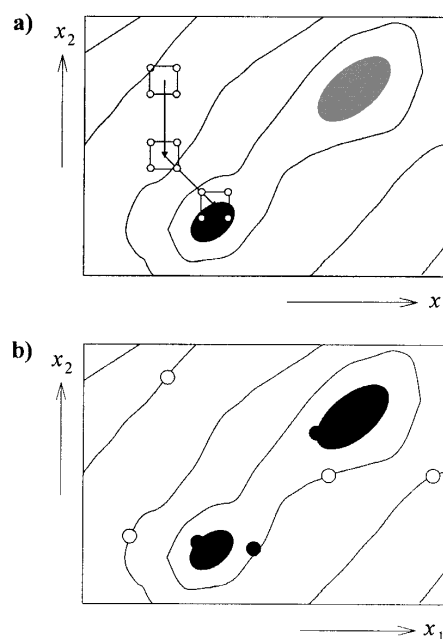
Upotreba metodologije kemijskog inženjerstva, bilanciranje i modeliranje procesa te identifikacija i procjena procesnih veličina bit će prikazana na primjeru dvaju mikrobioloških procesa, proizvodnji pirogrođane kiseline iz glukoze upotrebom genetski modificirane *Escherichia coli* YYC202 *ldhA::Kan*^{5,6} i proizvodnji 2,5-diketo-D-glukonske kiseline, intermedijeru u biosintetskom postupku proizvodnje Vitamina C, iz glukoze upotrebom *Erwiniae citreus*.⁷ Poseban naglasak bit će na eksperimentalnim metodama optimiranja parametara procesa: genetski algoritam⁸ (GA, *genetic algorithm*) i evolucijsko optimiranje⁹ (EVOP, *evolutionary operations*). Obje metode temelje se na načelima biološke evolucije primijenjenih na traženje mogućih optimuma. Dodatno, bit će prikazan razvoj nestrukturiranih matematičkih modela bioprocesa.¹⁰ Takvi modeli ne prikazuju i ne uzimaju u obzir široki spektar reakcija koje se u stanici odvijaju već prate samo makroskopske sadržaje procesa. Unatoč tome nezaobilazno su sredstvo analize i optimiranja bioprocesa, te omogućuju njihovo bolje razumijevanje. Bit će i prikazan razvoj kontinuiranog procesa proizvodnje pirogrođane kiseline s potpuno integriranom separacijom produkta upotrebom elektrodijalize.¹¹ Na kraju će biti prikazana ocjena procesa upotrebom bilanci tvari i ekonom-

skih pokazatelja na primjeru usporedbe klasične “kemijske” sinteze piruvata i semi-šaržnog procesa biokonverzije glukoze u piruvat s cijelim stanicama *Escherichia coli*.¹²

Metode optimiranja

Jedan je od temeljnih problema pri razvoju bioprocesa identificiranje bitnih parametara procesa te procjena njihovih početnih vrijednosti. Postoji velik broj parametara koji mogu utjecati na bioproces, te je identifikacija parametara koji znatno utječu na odziv procesa prvi korak u njegovom optimiranju. Naime, istodobna procjena optimalnih vrijednosti velikog broja parametara čini problem optimiranja izuzetno složenim i znatno produljuje vrijeme optimiranja i broj potrebnih pokusa. S druge strane, postoji i velik broj različitih metoda optimiranja, te je pravilan odabir metode bitan preduvjet uspješnosti optimiranja.

Primjerice, uobičajene metode optimiranja kao što su kompleks-metoda¹³ ili metoda evolucijskog planiranja (EVOP)⁹ neprimjenjive su u slučaju kada je potrebno istodobno procijeniti optimalne vrijednosti velikog broja veličina, odnosno u velikom broju slučajeva vode ka određivanju lokalnog optimuma procesa. U slučaju velikog broja veličina koje je potrebno istodobno procijeniti osobito su se uspješni pokazali genetski algoritmi (GA),¹⁴ koji su prekompleksni kada je potrebno procijeniti mali broj veličina. Općenito govoreći metode optimiranja u grubo bi se mogle podijeliti na statističke i stohastičke (slika 2).



Slika 2 – Pojednostavljeni prikaz različitih metoda optimiranja: **a)** Statističke metode optimiranja – EVOP: određivanje lokalnog optimuma umjesto globalnog optimuma ovisno o pretpostavljenim početnim uvjetima. **b)** Stohastičke metode optimiranja – genetski algoritam: brzo pretraživanje širokog prostora mogućih rješenja. ○ prva generacija pokusa; ● posljednja generacija pokusa.

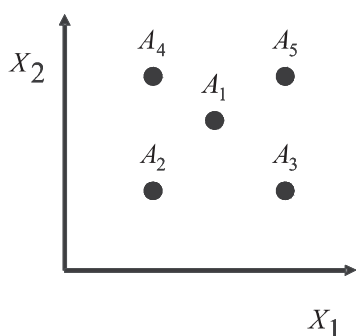
Fig. 2 – Simplified description of different optimization methods: **a)** Statistical optimization methods – EVOP: local optimum can be identified instead of local one depending on initial conditions. **b)** Stochastic optimization methods – genetic algorithm: searching of large parameter space in highly directed way. ○ first generation of experiments; ● last generation of experiments.

Kao primjer statističke metode bit će prikazano optimiranje biokonverzije glukoze u 2,5-diketo-D-glukonsku kiselinu primjenom metode evolucijskog planiranja (EVOP-a).¹⁵ Optimiranje ekstrakcije govedega serumskog albumina upotrebom genetskog algoritma pokazati će mogućnosti primjene stohastičkih metoda.¹⁶

Optimiranje biokonverzije glukoze u 2,5-diketo-D-glukonsku kiselinu EVOP-om¹⁵

Biokonverzija glukoze u 2,5-diketo-D-glukonsku kiselinu (2,5-DKG) primjenom genetski modificirane *Erwinia citreus* prvi je stupanj dvostupnjevita mikrobiološkog procesa proizvodnje ketoglukonske kiseline, ključnog intermedijara u proizvodnji vitamina C (L-askorbinske kiseline).⁷ Za optimiranje uvjeta provedbe procesa odabrana je metoda evolucijskih operacija,⁹ koja se pokazala osobito uspješnom i jednostavnom optimizacijskom tehnikom, pogotovo u slučajevima optimizacije mikrobioloških procesa kada oni nisu poduprti odgovarajućim teorijskim spoznajama. Osim toga, EVOP je osobito funkcionalan u optimiranju utjecaja dvaju ili triju ključnih parametara procesa, kao i njihovih međudjelovanja.

Osnova je rada s EVOP-om kreiranje plana pokusa koji se u osnovi može podijeliti na plan pokusa sa središnjom točkom i plan pokusa bez središnje točke, pri čemu u oba slučaja svaki od analiziranih parametara procesa treba biti promatran na dvije razine, višoj i nižoj. U slučaju prosudbe optimalnih vrijednosti dvaju procesnih parametara (x_1 i x_2) sa središnjom točkom, plan pokusa shematski se može prikazati slikom 3. Točke plana pokusa uobičajeno se označavaju kao A_1, A_2, A_3, A_4 i A_5 , pri čemu je A_1 središnja točka, dok su ostale točke ravnomjerno raspoređene oko nje. U tabličnom zapisu plana pokusa uobičajeno je vrijednost promatranog parametra na nižoj razini označavati s -1 , na višoj razini s $+1$, a u središnjoj točki nulom, 0 .^{9,17}



Slika 3 – Plan pokusa sa središnjom točkom. Optimiranje dva procesna parametara, x_1 i x_2 , na dvije razine.

Fig. 3 – Two level factorial experimental plan with central point. The optimization of two process parameters, x_1 i x_2 .

Središnja točka prvog plana pokusa odabire se na temelju prethodnih spoznaja ili literaturnih podataka, dok je korak za svaki analizirani parametar određen bilo na temelju prethodnih znanja bilo na temelju eksperimentalnih mogućnosti. Potrebno je naglasiti da je pokus u svakoj točki plana potrebno provesti barem dva puta, jer je ocjena učinka svakoga pojedinog parametra, kao i ocjena međudjelovanja parametara, temeljena na statističkoj obradi rezultata pokusa. Na temelju statističke obrade rezultata pokusa pro-

vodi se ocjena procesa u cjelini koja se temelji na lingvističkim pravilima odlučivanja, pri čemu kao rezultat te ocjene mogu proizaći bilo (1) novi plan pokusa, bilo (2) potreba za promjenom koraka pojedinog analiziranog parametra, bilo (3) kraj optimiranja odnosno postizanje (sub-)optimuma procesa.⁹

U slučaju biokonverzije glukoze u 2,5-DKG eksperimentalno je pokazano da su pH i temperatura provedbe procesa uzgoja biomase ključne veličine procesa.¹⁸ Naime, biokonverzija glukoze u 2,5-DKG odvija se preko dva intermedijara, glukonske kiseline (GK) i 2-keto-D-glukonske kiseline (2-KDG), a katalizirana je membranski vezanim periplazmatskim dehidrogenazama. Iz toga slijedi da je brzina produkcije izravno proporcionalna masi raspoloživog biokatalizatora koji se nalazi u biomasi, odnosno da se vrijeme potrebno za potpunu konverziju glukoze u biomasu i 2,5-DKG smanjuje povećanjem koncentracije biomase u uvjetima šaržnog uzgoja. Stoga je kao mjera ocjene uspješnosti procesa, odnosno kao mjera brzine prirasta mase biokatalizatora, odabrana maksimalna specifična brzina rasta biomase μ_{MAX} .

Na temelju podataka dostupnih u literaturi,¹⁹ vlastitih spoznaja o procesu i eksperimentalnih mogućnosti, kreiran je prvi plan pokusa i definiran korak za svaki od analiziranih parametara. Uvjeti provedbe pokusa, izračunate vrijednosti funkcije cilja – μ_{MAX} te učinci svakog pojedinog parametra procesa, međudjelovanja i promjene srednje vrijednosti prikazani su u tablici 1.

Tablica 1 – Prvi plan pokusa, rezultati provedenih pokusa i obrada rezultata prvog plana pokusa primjenom EVOP metode

Table 1 – First experimental plan, experimental results, and processing of the first experimental plan results by using EVOP method

Plan pokusa Plan of experiments	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5
$T / ^\circ\text{C}$	28	26	30	30	26
pH	4,5	4,0	5,0	4,0	5,0
Rezultati pokusa Results of experiments	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5
$\mu_{MAX} / \text{h}^{-1}$ (1. serija) (1. cycle)	0,8062	0,7350	0,8501	0,7816	0,7481
$\mu_{MAX} / \text{h}^{-1}$ (2. serija) (2. cycle)	0,7872	0,7120	0,8383	0,7897	0,7526
Razlike i srednje vrijednosti Differences and averages					
Razlike Differences	0,0190	0,0230	0,0118	-0,0081	-0,0045
$\mu_{MAX} / \text{h}^{-1}$	0,7967	0,7235	0,8442	0,7857	0,7504
Učinak temperature Temperature effect	0,0780 ± 0,0132				
Učinak pH pH effect	0,0427 ± 0,0132				
Učinak međudjelovanja temperature i pH Interaction effect of temperature and pH	0,0158 ± 0,0132				
Učinak promjene srednje vrijednosti Change in mean effect	-0,0166 ± 0,0117				

Pokazalo se da su učinci oba analizirana parametra, pH i temperature, pozitivni i znatno veći od intervala pogreške, što upućuje, a prema lingvističkim pravilima odlučivanja metode EVOP, na potrebu kreiranja novog plana pokusa pri čemu brojčana vrijednost svakog pojedinog parametra (x) u svakoj točki novog (drugog) plana pokusa treba biti uvećana za isti, na početku procesa optimiranja definiran korak. Osim toga, učinak međudjelovanja je pozitivan i njegova vrijednost je neznatno veća od intervala pogreške, što upućuje na međusobnu nezavisnost analiziranih parametara procesa. Na kraju, učinak promjene srednje vrijednosti je negativan i veći od intervala pogreške, što prema lingvističkim pravilima odlučivanja EVOP-a zahtijeva kreiranje novog plana pokusa.

U skladu s navedenim postavljen je novi plan pokusa (tablica 2), provedeni pokusi u svakoj točki plana i kao u slučaju prvog plana pokusa provedena obrada i analiza dobivenih rezultata. Pokazalo se da je učinak temperature i dalje pozitivan i zamjetno veći od intervala pogreške za razliku od učinaka pH vrijednosti i međudjelovanja koji su se pokazali zanemarivim.

Tablica 2 – Drugi plan pokusa, rezultati provedenih pokusa i obrada rezultata drugog plana pokusa primjenom metode EVOP

Table 2 – Second experimental plan, experimental results and processing of the second experimental plan results by using EVOP method

Plan pokusa Plan of experiments	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅
T / °C	30	28	32	32	28
pH	5,0	4,5	5,5	4,5	5,5
Rezultati pokusa Results of experiments	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅
μ_{MAX} / h^{-1} (1. serija) (1. cycle)	0,8501	0,8062	0,8631	0,8734	0,8153
μ_{MAX} / h^{-1} (2. serija) (2. cycle)	0,8383	0,7872	0,9062	0,8654	0,8550
Razlike i srednje vrijednosti Differences and averages					
Razlike Differences	0,0118	0,0190	-0,0431	0,0080	-0,0397
μ_{MAX} / h^{-1}	0,8442	0,7967	0,8847	0,8694	0,8351
Učinak temperature Temperature effect	0,0611 ± 0,0263				
Učinak pH pH effect	0,0269 ± 0,0263				
Učinak međudjelovanja temperature i pH Interaction effect of temperature and pH	-0,0116 ± 0,0263				
Učinak promjene srednje vrijednosti Change in mean effect	0,0018 ± 0,0234				

Navedeni rezultati analize provedenih pokusa upućuju na kreiranje novog (trećeg) plana pokusa u kojemu bi se vrijednosti temperature u svakoj točki plana trebale povećati za prethodno definirani korak, dok se pH vrijednosti trebaju zadržati konstantnima, odnosno jednake onima u drugom planu. Međutim, iz literature¹⁹ je bilo poznato da temperature više od 34 °C inhibiraju proces te je optimum procesa određen u drugom planu pokusa (uvjeti provedbe pokusa definirani točkom A₃). U odnosu na početne uvjete definirane središnjom točkom prvog plana pokusa (pH 4,5, T = 28 °C) funkcija cilja, μ_{MAX} , povećana je 11 % provedbom samo 16 pokusa.

Metoda evolucijskog optimiranja pokazala se u ovom slučaju jednostavnom i praktičnom tehnikom optimiranja procesnih uvjeta. Ne zahtijeva provedbu velikog broja pokusa, a omogućuje usporednu analizu utjecaja dva parametra. Treba napomenuti da je za pouzdanije zaključke potrebno provesti više od dva pokusa u svakoj točki plana, ali i za ovako mali broj pokusa metoda pokazuje svoju opravdanost.

Optimiranje ekstrakcije BSA u vodenom dvofaznom sustavu primjenom genetskog algoritma

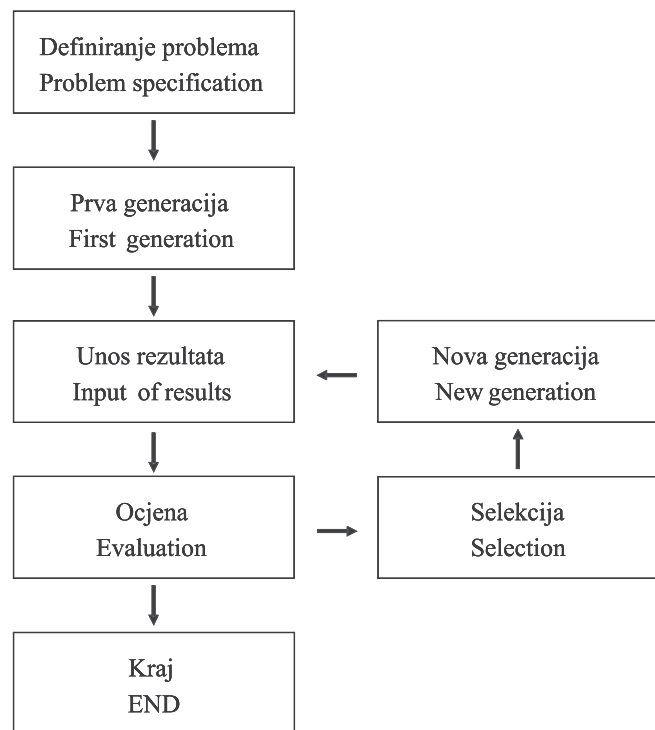
Genetski algoritmi²⁰ pripadaju grupi heurističkih optimizacijskih metoda nastalih po uzoru na prirodne procese. U posljednjih tridesetak godina koliko postoje, privukli su mnogo pozornosti i jedna su od najistraživanijih i najprimjenjivanijih metoda u području u kojem klasična matematika i računalna znanost ne uspijevaju udovoljiti strogim zahtjevima za rješavanje i optimiranje sve složenijih problema i procesa, posebice bioprocesa.

Iako su genetski algoritmi razvijeni s idejom proučavanja fenomena prilagodbe u prirodi, te načina kako se mehanizmi prilagodbe mogu primijeniti na računalu, danas služe za rješavanje vrlo raznolikih problema. Osim osnovne namjene, numeričke optimizacije funkcija koje se ne mogu optimirati uobičajenim matematičkim metodama, danas se rabe u području strojnog učenja, u procjeni težinskih faktora neuronskih mreža, u biologiji za predviđanje strukture proteina, u ekonomiji za razvoj pregovaračkih strategija i nastanak ekonomskih tržišta, u medicini za modeliranje imunoloških sustava, u ekologiji, u psihologiji za rješavanje problematike zatvorenikove dileme, u razvijanju strategije igara na sreću itd.

U odnosu na ostale optimizacijske metode glavne prednosti genetskog algoritma su u tome da ne postavlja prethodne zahtjeve na prostor rješenja (kontinuiranost prostora, postojanje derivacija i sl.), pokriva široke, složene i teško razumljive prostore stanja te ne generira točke u prostoru rješenja na slučajan način već ispituje one točke koje imaju potencijal da budu ili da vode prema optimalnom rješenju. Osim toga brzo i lako se implementira i integrira s drugim metodama, a rezultati se mogu fizikalno interpretirati (za razliku od neuronskih mreža).²¹

Genetski algoritmi kao heurističke metode optimiranja nastali su oponašanjem prirodne biološke evolucije. Analogija evolucije kao prirodnog procesa i genetskog algoritma kao metode optimiranja, očituje se u procesu selekcije i genetskim operatorima (križanje i mutacija). Mehanizam oda-

bira nad nekom individuom u evolucijskom procesu čine okolina i uvjeti u prirodi. U genetskim algoritmina selekcija je sadržana u funkciji cilja, koja na odgovarajući način ističe problem koji se rješava. U prirodi jedinka koja je najbolje prilagođena uvjetima i okolini u kojoj živi ima najveću vjerojatnost preživljavanja i reprodukcije, a time i prenošenja svoga genetskog materijala na potomke. Prirodna evolucija vrste nije potraga za rješenjem (jedinkom koja je najbolje prilagođena uvjetima u prirodi), već prilagođavanje postojeće populacije na nove uvjete. U genetskim algoritmina svaka individua predstavlja potencijalno rješenje problema koji se obrađuje, pri čemu tu može biti matematička funkcija, ali i plan rada neke tvrtke. Svaka je jedinka obilježena u jednakom obliku (broj, niz, matrica itd.), a te jedinke nazivaju se kromosomi. Svakom rješenju pridjeljuje se određena mjera kvalitete (usklađenosti, eng. *fitness*), dok se funkcija koja tu kvalitetu određuje naziva funkcija cilja ili funkcija usklađenosti (eng. *fitness function*). Iz prethodne (stare) populacije formira se nova populacija, izdvajanjem (selekcijom) prikladnijih, odnosno boljih individua iz skupa postojećih. Neke individue nove populacije podvrgavaju se utjecajima genetskih operatora koji kreiraju nove individue kombinirajući značajke nekoliko jedinki. Takvim postupkom se postiže iz generacije u generaciju sve veća i veća prosječna usklađenost (kvaliteta) populacije. Takav ciklus selekcije, reprodukcije i manipulacije genetskim materijalom individue ponavlja se dok nije udovoljen uvjet zastavljanja evolucijskog procesa, a najbolji član trenutne populacije predstavlja rješenje koje bi trebalo biti u blizini optimuma (slika 4).



Slika 4 – Struktura genetskog algoritma

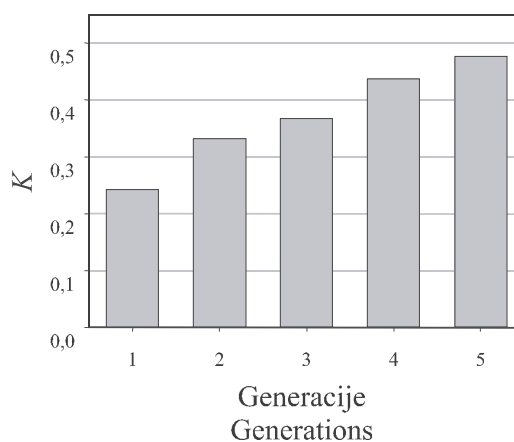
Fig. 4 – Structure of the genetic algorithm

U genetskom algoritmu individue su potencijalna rješenja, a okolinu zastupa funkcija cilja. Kad se genetski algoritam primjenjuje kao metoda optimiranja, potrebno je definirati

proces dekodiranja i preslikavanja podataka zapisanih u kromosomu te odrediti funkciju cilja.

Na jednostavnom primjeru ekstrakcije govedega serumskog albumina (BSA) u vodenom dvofaznom sustavu $\text{PEG}_{6000}\text{-H}_2\text{O-(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$ prikazana je funkcionalnost primjene genetskog algoritma u optimiranju procesnih uvjeta.¹⁵ U seriji eksperimenata provedenih u šaržnom sustavu istraživana je utjecaj pH, masenog udjela PEG-a, masenog udjela amonijevog sulfata (AMS) i koncentracije modelne otopine BSA na koeficijent raspodjele (omjer ravnotežnih koncentracija proteina u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi K) u vodenom dvofaznom sustavu. Kako bi se smanjio broj parametara koje je potrebno procijeniti, početne koncentracije PEG-a i AMS-a aproksimirane su duljinom spojnih linija (TLL, *tie-line length*) binodalne krivulje. Prije iniciranja prvog plana pokusa (generacije) genetskog algoritma potrebno je definirati broj individua svake generacije, područje definicije i korak za svaku analiziranu veličinu te vjerojatnosti križanja i mutacije. U navedenom primjeru optimiranja ekstrakcije u vodenom dvofaznom sustavu razina populacije bila je četiri individue u generaciji, dok su vjerojatnost križanja i vjerojatnost mutacije bili postavljeni na 0,95, odnosno 0,01. Nakon što je kreirana početna populacija jedinki (γ_{BSA} , pH, TLL), pri čemu su određene i njihove značajke iniciran je genetski algoritam i dobivena je prva generacija elemenata populacije.

Maksimalna vrijednost koeficijenta raspodjele, $K = 0,242$, prve generacije ostvarena je u 4. individui. Optimalni koeficijent raspodjele $K = 0,4793$ postignut je u petoj generaciji (slika 5) pri pH 7,0; koncentraciji otopine BSA, $\gamma_{\text{BSA}} = 2,5$ mg cm^{-3} ; masenom udjelu PEG-a, $w_{\text{PEG}} = 0,1770$ i masenom udjelu amonijevog sulfata, $w_{\text{AMS}} = 0,1105$. Genetski algoritam je završio u petoj generaciji jer je plan pokusa šeste generacije, zbog zadane male vjerojatnosti mutacije, bio istovjetan onome pete generacije. Druga mogućnost završetka genetskog algoritma je istovjetnost svih individua jedne generacije. U usporedbi s 1530 pokusa potrebnih za provedbu potpunog plana eksperimenta, optimum procesa procijenjen je u samo dvadeset (20) pokusa. Istodobno koeficijent raspodjele uvećan je za 100 %.



Slika 5 – Promjena koeficijenta raspodjele pri ekstrakciji proteina s vodenim dvofaznim sustavom kroz generacije genetskog algoritma

Fig. 5 – Change of the partition coefficient in extraction of protein with aqueous two-phase system through generations of the genetic algorithm

Nestrukturani matematički modeli mikrobioloških procesa

Kvantitativno razumijevanje temeljnih staničnih karakteristika od presudne je važnosti pri razvoju mikrobioloških procesa na laboratorijskom nivou, kao i njihovog uvećanja u kasnijim fazama razvoja. Stoga je razvoj jednostavnih i robusnih modela sposobnih da podrže temeljne inženjerske zahtjeve sadržane u dizajnu i optimiranju procesa početak svake studije modeliranja. U tu svrhu najčešće se upotrebljavaju nestrukturani *black-box* stanični modeli^{10,22} jer oni, uz izraženu jednostavnost razvoja i primjene, nude mogućnost razumijevanja dominantnih metaboličkih procesa u proizvodnom mikroorganizmu. Iako ovakvi modeli vrijede samo u slučaju uravnoteženog rasta (*balanced growth*), mogu se primijeniti i pogodni su za opisivanje širokog spektra mikrobioloških procesa.²³ Dodatno, nestrukturani modeli čine prvi korak u razvoju strukturalnih modela koji su sposobni opisati sve detalje unutarstaničnih reakcija. Nestrukturalni modeli koriste jednostavnu kinetiku Michaelis-Mentenovog tipa, s malim brojem nezavisnih parametara, koja je više ili manje temeljena na fizičkoj slici zbivanja u procesu. Za razliku od njih, strukturalni modeli sastoje se od velikog broja nezavisnih parametara i nastoje opisati svu kompleksnost mikrobioloških procesa na biokemijskom nivou. Zbog svoje jednostavnosti, nestrukturalni modeli ne mogu opisati pojedine faze mikrobiološkog procesa, primjerice dugačke faze prilagodbe, što ima za posljedicu njihovu neprimjenjivost u nestacionarnim procesnim uvjetima.²⁴

Poseban problem pri razvoju nestrukturalnih modela mikrobioloških procesa je procjena optimalnih vrijednosti kinetičkih parametara modela, jer je ona nužna za uspješnu prosudbu valjanosti modela. Najčešće se prosudba parametara nestrukturalnih modela mikrobioloških procesa provodi pomoću kontinuiranog uzgoja,²³ ali ovakvi pokusi su kompleksni za provedbu i zahtijevaju relativno velik utrošak vremena. S druge strane, jednostavni pokusi u uvjetima šaržnog uzgoja ne zadovoljavaju zbog nemogućnosti dobivanja jednoznačnih vrijednosti valoriziranih parametara.²⁵ Prelazak sa šaržnih na semi-šaržne uvjete uzgoja, s promjenjivim dotokom dohrane, ima za posljedicu veću točnost i pouzdanost prosuđenih parametara.²⁶

Modeliranje i simuliranje mikrobioloških procesa bit će pokazano na primjerima (1) biokonverzije glukoze u 2,5-DKG s rastućim stanicama *Erwinia citreus*^{7,18,27} i (2) biokonverzije glukoze u piruvat s cijelim stanicama genetski modificirane *Escherichia coli*.^{12,28}

Matematički model procesa biokonverzije glukoze u 2,5-DKG s rastućim stanicama *Erwinia citreus*

Proces biokonverzije glukoze u 2,5-DKG s rastućim stanicama *Erwinia citreus* je biotransformacija koja se može podijeliti u dva podprocesa: (1) proces rasta biomase (X) i (2) proces biokonverzije glukoze (G) u 2,5-DKG serijskom oksidacijom na periplazmatskim dehidrogenazama, pri čemu nastaju dva međuproducta GK i 2-KDG (slika 6).⁷

Na temelju saznanja prikupljenih provedbom uzgoja biomase u šaržnom¹⁸ i protočnom kotlastom²⁷ reaktoru postavljen je matematički model procesa biokonverzije glukoze u 2,5-DKG u uvjetima kontinuiranog uzgoja u protočnom kotlastom bioreaktoru. Na temelju rezultata pokusa ustanovljeno je da biomasa raste na svakom supstratu i produktu (glukozi, glukonskoj kiselini, 2-KDG-u i 2,5-DKG-u) pa je uvedena pretpostavka da je ukupna specifična brzina rasta biomase jednaka sumi pojedinačnih specifičnih brzina rasta na svakom pojedinom supstratu:

$$\mu_U = \mu_G + \mu_{GA} + \mu_{2\text{-KDG}} + \mu_{2,5\text{-DKG}} \quad (1)$$

pri čemu su:

$$\mu_G = \mu_{MAX}^G \cdot \frac{C_G}{k_S^G + C_G} - m_k \cdot Y_{X/G} \quad (2)$$

$$\mu_{GK} = \mu_{MAX}^{GK} \cdot \frac{C_{GK}}{k_S^{GK} + C_{GK}} \quad (3)$$

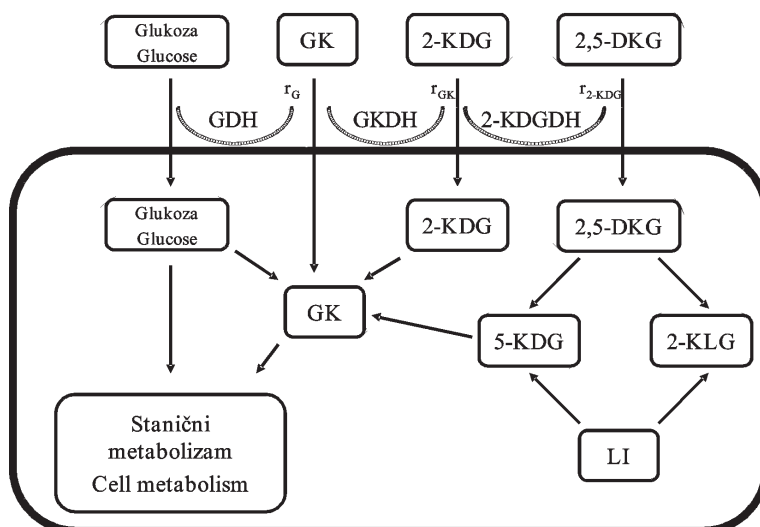
$$\mu_{2\text{-KDG}} = \mu_{MAX}^{2\text{-KDG}} \cdot \frac{C_{2\text{-KDG}}}{k_S^{2\text{-KDG}} + C_{2\text{-KDG}}} \quad (4)$$

$$\mu_{2,5\text{-DKG}} = \mu_{MAX}^{2,5\text{-DKG}} \cdot \frac{C_{2,5\text{-DKG}}}{k_S^{2,5\text{-DKG}} + C_{2,5\text{-DKG}}} \quad (5)$$

Promjena koncentracije biomase u uvjetima kontinuiranog uzgoja, uzimajući u obzir prethodne jednadžbe (1–5), može se u tom slučaju prikazati kao:

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu_U \cdot c_X - D \cdot c_X \quad (6)$$

Pretpostavljeni model, osim procesa rasta, opisuje i proces biosinteze. Brzine bioreakcije potrošnje glukoze, glukonske kiseline i 2-KDG definirane su pretpostavljenom Michaelis-Mentenovom kinetikom. Promjena koncentracije svake od komponenata reakcijske smjese, odnosno matematički model procesa biosinteze, u tom slučaju može se prikazati sljedećim izrazima:



Slika 6 – Metabolizam glukoze i biokonverzija u 2,5-DKG u bakteriji roda *Erwinia* i njezinih rekombinantata

Fig. 6 – Metabolism of glucose and bioconversion to 2,5-DKG in the *Erwinia* species bacteria and their recombinants

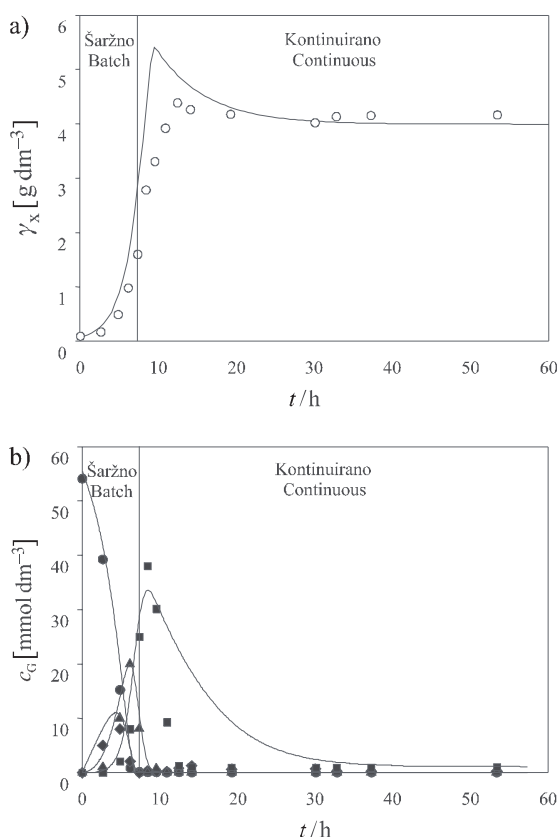
$$\frac{dc_G}{dt} = (c_{G0} - c_G) \cdot D - \left(m_k + \frac{1}{Y_{X/G}} \cdot \mu_G \right) \cdot c_X - r_G(c_X) \quad (7)$$

$$\frac{dc_{GA}}{dt} = (c_{GA0} - c_{GA}) \cdot D - \frac{1}{Y_{X/GA}} \cdot \mu_{GA} \cdot c_X + r_G(c_X) \cdot Y_{GK} - r_{GK}(c_X) \quad (8)$$

$$\frac{dc_{2-KDG}}{dt} = (c_{2-KDG0} - c_{2-KDG}) \cdot D - \frac{1}{Y_{X/2-KDG}} \cdot \mu_{2-KDG} \cdot c_X + r_{GK}(c_X) \cdot Y_{2-KDG/GA} - r_{2-KDG}(c_X) \quad (9)$$

$$\frac{dc_{2,5-DKG}}{dt} = (c_{2,5-DKG0} - c_{2,5-DKG}) \cdot D - \frac{1}{Y_{X/2,5-DKG}} \cdot \mu_{2,5-DKG} \cdot c_X + r_{2-KDG}(c_X) \cdot Y_{2,5-DKG/2-KDG} - r_{2-KDG} \quad (10)$$

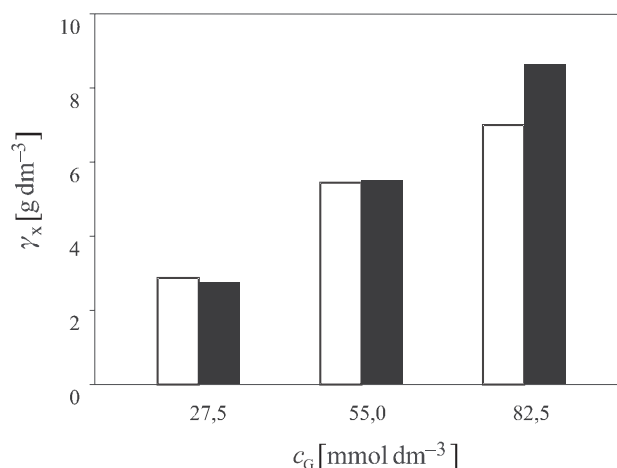
Parametri modela koji se odnose na proces biosinteze procijenjeni su u šaržnim pokusima iz rezultata mjerenja oksidacijske aktivnosti biomase i pripadajuće vrijednosti početne brzine reakcije za svaki pojedini supstrat.⁷ Veličine modela koje se odnose na rast biomase procijenjeni su iz pokusa provedenih u protočnom kotlastom reaktoru u uvjetima rasta limitiranog glukozom.²⁷ Na slici 7 prikazana je ocjena valjanosti modela na primjeru usporedbe rezultata pokusa i rezultata simulacija za slučaj prijelaza iz šaržnog u uvjete kontinuiranog uzgoja. Pokazano je da model dobro opisuje dinamiku procesa, pa čak i da zadovoljavajuće kvantitativno može opisati sam proces.



Slika 7 – Usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacija (—) pri prijelazu iz šaržnog u uvjete kontinuiranog uzgoja *Erwinia citreus* uz biokonverziju glukoze u 2,5-DKG: (a) biomasa – ○ i (b) komponente reakcijske smjese, G – ●, GK – ◆, 2-KDG – ▲, 2,5-DKG – ■.

Fig. 7 – Comparison of the experimental and simulation results (—) for transition from batch to continuous culture of *Erwinia citreus* with the bioconversion of glucose to 2,5-DKG: (a) biomass – ○ and (b) components of reaction mixture, G – ●, GK – ◆, 2-KDG – ▲, 2,5-DKG – ■.

Na slici 8. prikazana je usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije procesa u uvjetima kontinuiranog uzgoja u stacionarnome stanju pri $D = 0,31 \text{ h}^{-1}$ pri tri različite ulazne koncentracije glukoze ($c_{G0} = 27,5, 55,0$ i $82,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) na primjeru koncentracije biomase. Vidljivo je da predloženi model može opisati koncentraciju biomase samo u području ulaznih koncentracija glukoze u kojemu je provedena procjena kinetičkih parametara, konkretno u području koncentracije glukoze od 55 mmol dm^{-3} (10 g dm^{-3}).



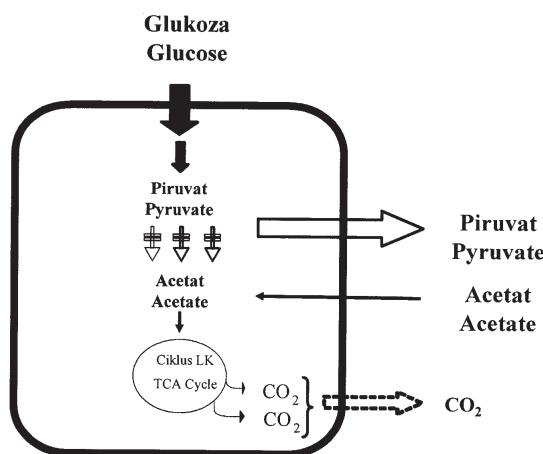
Slika 8 – Usporedba rezultata pokusa (□) i rezultata simulacije (■) procesa biokonverzije glukoze u 2,5-DKG u uvjetima kontinuiranog uzgoja. Koncentracija biomase u stacionarnome stanju i $D = 0,31 \text{ h}^{-1}$ pri ulaznoj koncentraciji glukoze: $c_{G0} = 27,5, 55,0$ i $82,5 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Fig. 8 – Comparison of experimental (□) and simulation results (■) for bioconversion of glucose in 2,5-DKG in continuous culture. Biomass concentration in steady-state at $D = 0.31 \text{ h}^{-1}$ for three initial glucose concentrations: $c_{G0} = 27.5, 55.0$ and $82.5 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Na ovome primjeru pokazan je temeljni nedostatak nestrukturiranih modela mikrobioloških procesa jer matematičko opisivanje procesa nije jednoznačno. Pri promjeni bilo kojeg procesnog uvjeta mora se uzeti u obzir potrebno razdoblje da se mikroorganizam prilagodi novim uvjetima, pri čemu može doći do promjene fizičke slike procesa, što rezultira promjenama vrijednosti veličine u matematičkim modelima koji opisuju fizičku sliku bioprocasa. Konkretno, za zadovoljavajuće opisivanje rezultata pokusa pri višim ulaznim koncentracijama glukoze trebalo bi provesti pokuse kontinuiranog uzgoja biomase pri tim uvjetima, te je ovaj uvjet jedan od glavnih nedostatak izloženog pristupa modeliranju mikrobioloških procesa upotrebom nestrukturiranih modela.

Matematički model procesa biokonverzije glukoze u piruvat s cijelim stanicama genetski modificirane *Escherichia coli*

Matematički model procesa biokonverzije glukoze u piruvat s cijelim stanicama genetski modificirane *Escherichia coli* YYC202 *ldhA::Kan* temeljen je na shemi metaboličkih tokova prikazanoj na slici 9.^{5,6,12} Zbog nepoznavanja detaljnijeg mehanizma bitnih unutarstaničnih reakcija te nekih nedoumica vezanih uz inhibirajuće djelovanje supstrata i produkata na rast biomase i nastajanje glavnog produkta, piruvata,¹¹ matematički model procesa razvijen je uspoređujući različite kinetičke mehanizme za rast biomase (Monod, Levenspiel, Jerusalimsky, Andrews) i nastajanje produkta (Michaelis-Menten, Luedeking-Piret, Luedeking-Piret sa Levenspielovim članom).²⁸ Pokusima je ustanovljeno da do proizvodnje piruvata dolazi i s rastućim i s nerastućim stanicama biomase te da piruvat nastaje isključivo iz glukoze, dok je rast biomase moguć samo uz istodobno postojanje glukoze i acetata, dakle da biomasa raste simultano na dva različita supstrata. Osim toga pokusima je ustanovljeno da visoke koncentracije piruvata u mediju imaju za posljedicu inhibiciju rasta biomase, ali i inhibiciju nastajanja piruvata.

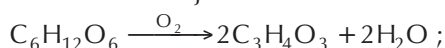


Slika 9 – Pojednostavljeni shematski prikaz metabolizma u genetski modificiranoj stanici *Escherichia coli*

Fig. 9 – Simplified metabolic scheme of genetically modified cell of *Escherichia coli*

Uzimajući u obzir te temeljne eksperimentalne spoznaje te poznatu shemu metaboličkih putova postavljen je sljedeći verbalni model procesa:²⁸

- Glukoza i acetat su limitirajući supstrati;
- Glukoza i acetat potrebni za rast biomase troše se istodobno;
- Nema utjecaja koncentracije kisika ni na rast biomase ni na biokonverziju glukoze u piruvat u području istraživanih udjela otopljenog kisika (od 40 do 100 %);
- Kinetika nastajanja produkta vezana je uz brzinu rasta biomase i može biti neovisna o brzini rasta biomase;
- Biokonverzija glukoze u piruvat je opisana jednostupnjevitom enzimatskom reakcijom:



f) Proizvodnje piruvata i/ili biomase limitirane su visokom koncentracijom piruvata.

Matematički model procesa biokonverzije glukoze u piruvat u uvjetima semi-šaržnog uzgoja biomase temeljen na verbalnom modelu može se prikazati sljedećim jednadžbama (11–15)

$$\frac{dc_X}{dt} = \frac{Q}{V} \cdot c_X + \mu \cdot c_X \quad (11)$$

$$\frac{dc_G}{dt} = \frac{Q}{V} \cdot c_G + \frac{Q_G}{V} c_{G,0} - r_G(c_X) - r_P(c_X) \quad (12)$$

$$\frac{dc_A}{dt} = \frac{Q}{V} \cdot c_A + \frac{q_{VA}}{V} c_{A,0} - r_A(c_X) \quad (13)$$

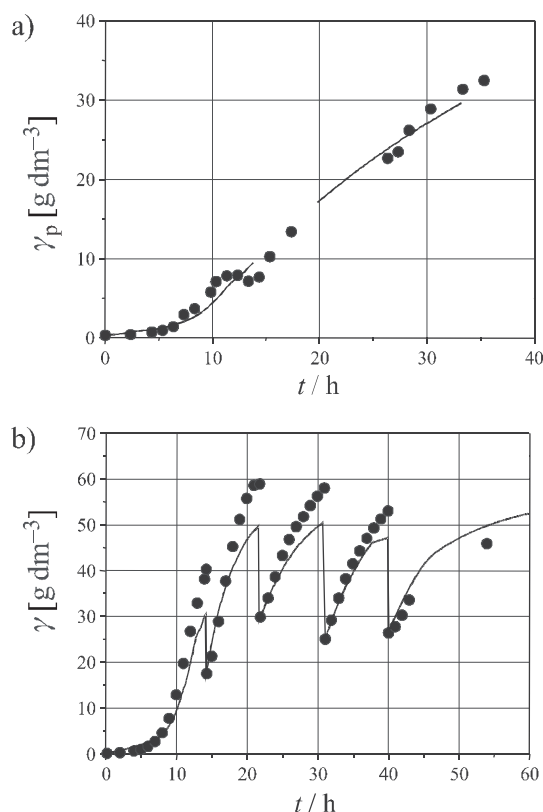
$$\frac{dc_P}{dt} = \frac{Q}{V} \cdot c_P + r_P(c_X) \cdot Y_{P/G} \quad (14)$$

$$\frac{dV}{dt} = Q_G + Q_A = Q \quad (15)$$

Kombinacijom različitih kinetičkih modela za rast biomase i produkciju piruvata postavljeno je deset različitih matematičkih modela biokonverzije glukoze u piruvat. Parametri modela procijenjeni su iz rezultata semi-šaržnih pokusa nelinearnom regresijskom analizom primjenom Nealder-Meadove metode.²⁹ Različiti modeli međusobno su uspoređeni i ocijenjeni usporedbom sume kvadrata greške rezultata pokusa i rezultata simulacije. Kao dodatni kriterij primjenjivosti i valjanosti pojedinog matematičkog modela korištena je metoda selekcije modela (*MSC, model selection criterion*).³⁰

Uzimajući u obzir navedene kriterije ocjene modela, kao najprimjenjiviji model odabran je onaj koji kombinira brzinu rasta biomase koju inhibira visoka koncentracija piruvata (kinetički model Jerusalimsky) i brzinu nastajanja piruvata koju inhibira visoka koncentracija piruvata (kinetički model Luedeking-Piret koji uključuje Levenspielov član).

Na slici 10 prikazana je usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije procesa pomoću tog modela za semi-šaržni i ponovljivi semi-šaržni pokus na primjeru koncentracije piruvata. Vidljivo je da odabrani model može opisati dinamiku procesa, dok se u slučaju ponovljivog semi-šaržnog pokusa još jednom uočavaju nedostaci nestrukturiranih modela. Naime, u prvih 40 sati ponovljivog semi-šaržnog pokusa koncentracije piruvata izračunate modelom manje su od onih dobivenih eksperimentalno, dok je u posljednjoj fazi pokusa (poslije 40. sata) situacija obrnuta. Sa stanovišta fiziologije stanice ovo odstupanje se vrlo jednostavno može obrazložiti nešto većom aktivnošću biomase u prvoj fazi pokusa, odnosno smanjenom aktivnošću biomase u drugoj fazi pokusa. Jednostavni nestrukturirani modeli ne mogu predvidjeti takvo ponašanje sustava, stoga je jasna potreba za njihovim proširivanjem i razvojem strukturalnih modela. Bez obzira na te nedostatke odabrani model korisno je sredstvo u daljem razvoju procesa i koristan temelj za razvoj strukturalnog modela.



Slika 10 – Usporedba rezultata pokusa (●) i rezultata simulacije (—) procesa biokonverzije glukoze u piruvat s genetski modificiranim stanicama *Escherichia coli*: (a) semi-šaržni i (b) ponovljivi semi-šaržni proces.

Fig. 10 – Comparison of experimental (●) and simulation results (—) for bioconversion of glucose to pyruvate by *Escherichia coli* genetically modified cells: (a) fed-batch and (b) repetitive fed-batch process.

Razvoj mikrobiološkog procesa proizvodnje piruvata s cijelim stanicama *Escherichia coli*

Pirogroždana kiselina i njene soli piruvati predstavljaju jednu od najznačajnijih metabolita u centralnom metabolizmu živih stanica (glikolizi i ciklusu limunske kiseline), zbog, primjerice, njenog značenja u prijenosu glukoze kroz staničnu stijenku, uloge prekursora u sintezi aminokiselina itd. Osim bitne funkcije u metabolizmu, piruvati spadaju u grupu industrijski interesantnih kemikalija jer služe kao sirovine u proizvodnji lijekova, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. U posljednjih nekoliko godina sve je izraženija primjena piruvata kao dijetetika, a najviše se primjenjuje u enzimatskoj sintezi L-dehidrosifenilalanina (L-DOPA-e).³¹

Današnja proizvodnja piruvata temelji se na klasičnoj kemijskoj sintezi u kojoj se pirogroždana kiselina dobiva dehidracijom i dekarboksilacijom vinske kiseline uz KHSO_4 na $220\text{ }^\circ\text{C}$.³² Osim te metode, za proizvodnju piruvata uobičajeni su i dekarboksilacija dietil-tartarata, oksidacija propilen-glikola i oksidativna dehidrogenacija mliječne kiseline uz prisutnost teških metala kao katalizatora pri visokim temperaturama. Zajednička je značajka tih "klasičnih" procesa da su energetski intenzivni te da je za njihovu provedbu potrebna prisutnost teških metala što ih čini nekonkurentnim sa stajališta zaštite okoliša i razvoja održivih procesa. Kao

posljedica toga u zadnja dva desetljeća intenzivirana su istraživanja na razvoju po okoliš prihvatljivih i održivih "zelenih" procesa proizvodnje piruvata. Oni se najčešće dijele u tri grupe:³³ (i) enzimске procese, (ii) procese s cijelim nerastućim stanicama i (iii) fermentacijske procese. U usporedbi sa drugim procesima fermentacijski procesi pokazali su se najboljim odabirom jer uključuju proizvodnju piruvata od jeftinog i održivog supstrata glukoze uz visoko iskorištenje i visoku volumnu produktivnost. Istodobno pri njihovoj provedbi ne dolazi do nastajanja neželjenih sporednih produkata, kao što je primjerice H_2O_2 kod enzimске sinteze.

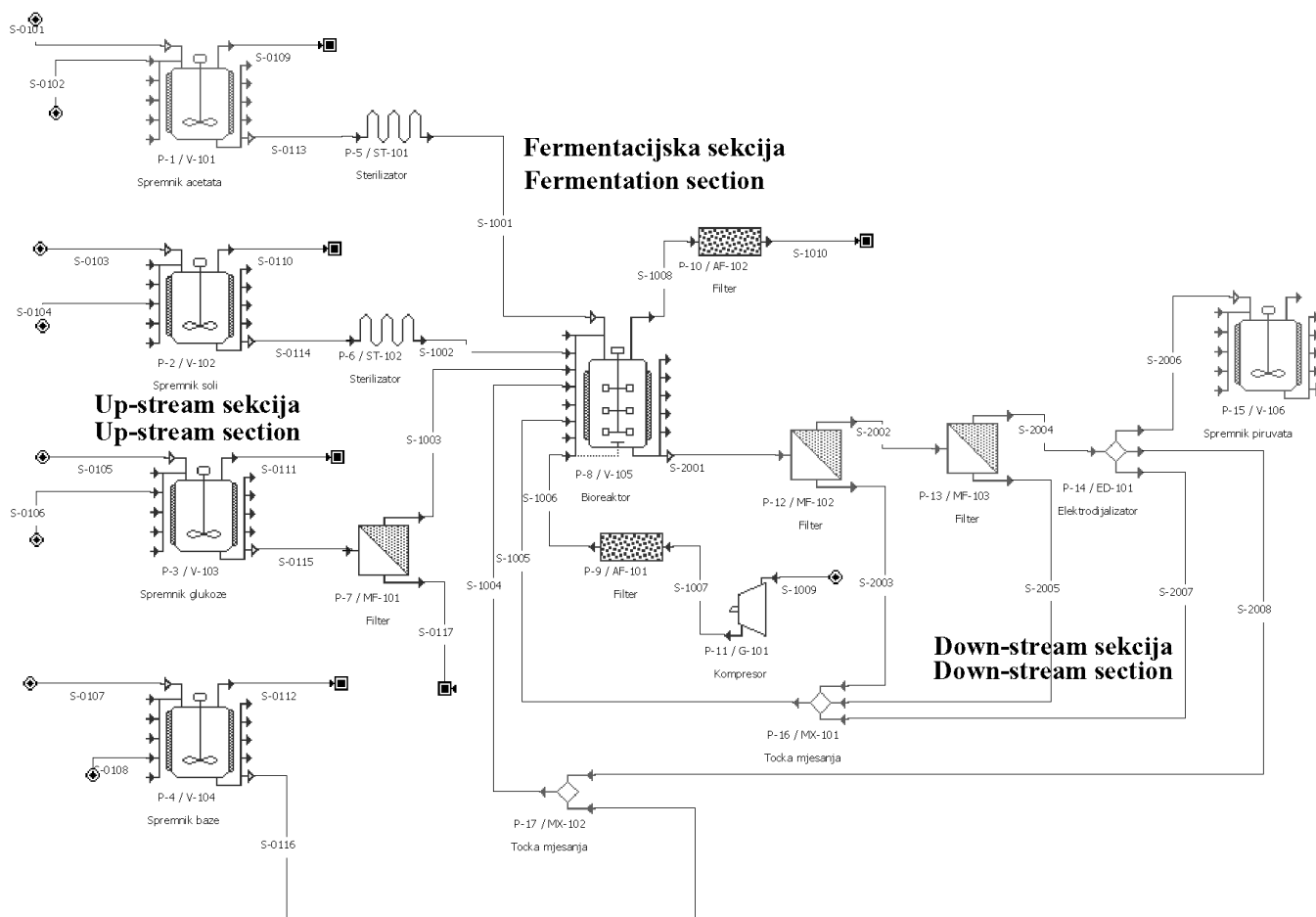
U usporedbi s do sada objavljenim fermentacijskim procesima, biokonverzija glukoze u piruvat (slika 9) s cijelim stanicama genetski modificirane *Escherichia coli* *YEC202* *ldhA::Kan* pokazala se najkonkurentnijim procesom.¹¹ Osim najvećeg iskorištenja piruvata na glukozi i najveće volumne produktivnosti, konačne koncentracije piruvata u reakcijskom mediju bile su dovoljno visoke da omoguće uspješnu separaciju. Osim potrebe da razvoj procesa završi i sa separacijom željenog produkta, poseban naglasak pri razvoju ovog procesa bio je dan na izolaciju piruvata jer njegove visoke koncentracije inhibirajuće djeluju i na brzinu rasta biomase i na brzinu nastajanja samog piruvata. Naravno, ne treba zaboraviti ni činjenicu da udjel (dio) troškova separacije i koncentriranja produkta u fermentacijski procesima može činiti i 90 % proizvodne cijene.

Ionska izmjena, ekstrakcija i destilacija su uobičajene metode izolacije piruvata iz fermentacijskih komina (nakon što se ukloni biomasa). Pokazalo se da su male ionske jakosti ionsko-izmjenjivačkih punila i upotreba koncentriranih kiselina pri eluiranju osnovni problemi primjene ionske izmjene u procesima separacije piruvata.¹² S druge strane primjena organskih otapala u ekstrakcijama te visok utrošak energije u destilacijama čine sve navedene uobičajene procese separacije nepovoljnim s ekološkog, i s ekonomskog, odnosno sa stanovišta održivosti procesa.

Kako je proces elektrodijalize osobito pogodan za izolaciju organskih kiselina iz fermentacijskih komina, ova je metoda upotrijebljena za separaciju piruvata u mikrobiološkom procesu biokonverzije glukoze u piruvat s cijelim stanicama *Escherichia coli*. Na temelju rezultata pokusa biokonverzije glukoze u piruvat te rezultata pokusa elektrodijalize zamišljen je i razvijen proces kontinuirane proizvodnje piruvata s izolacijom piruvata *in situ* (slika 11).¹² Sam proces može se podijeliti na tri glavne cjeline: (i) *up-stream* sekcija, (ii) fermentacijska sekcija i (iii) *down-stream* sekcija.

U *up-stream* sekciji namještavaju se reaktanti i nutrijenti (glukoza, acetat, soli, inokulum, baza) te provodi sterilizacija svakog procesnog toka (ulazne struje fermentacijske sekcije). Glukoza se sterilizira kontinuirano ultrafiltracijom pri sobnoj temperaturi, dok se acetat i soli steriliziraju kontinuirano pri $152\text{ }^\circ\text{C}$. Baza (25 % NH_4OH) koja služi za regulaciju pH u fermentacijskoj sekciji je autosterilizabilna.

U *down-stream* sekciji se u prvoj ultrafiltracijskoj ćeliji (*cut-off* $0,22\text{ }\mu\text{m}$) uklanja biomasa, dok se u drugoj ultrafiltracijskoj ćeliji (*cut-off* $0,01\text{ }\mu\text{m}$) uklanjaju proteini za koje je eksperimentalno ustanovljeno da smanjuju učinkovitost procesa elektrodijalize (začepljuju pore membrana). Na



Slika 11 – Procesna shema kontinuirane biokonverzije glukoze u piruvat s izolacijom piruvata in situ

Fig. 11 – Process scheme of continuous bioconversion of glucose to pyruvate with in-situ pyruvate separation

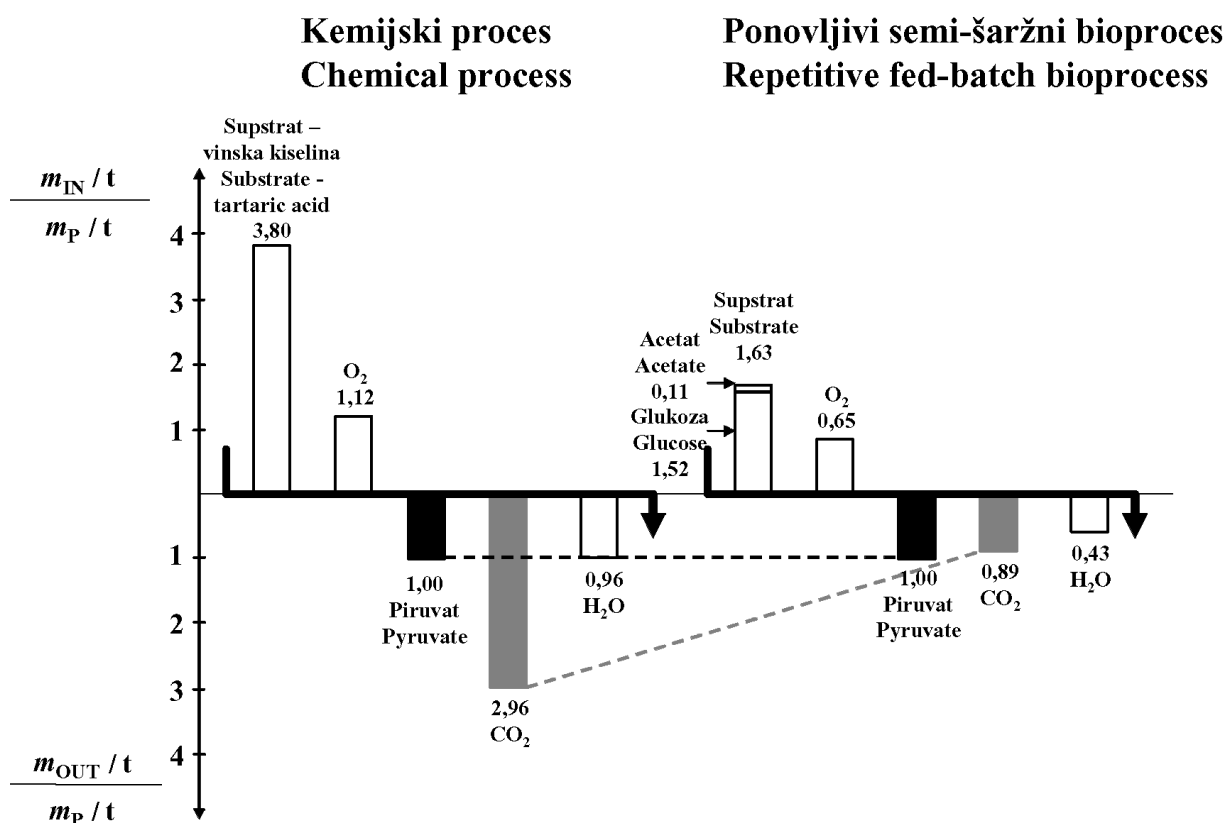
ovaj način dobivena fermentacijska komina uvodi se u bipolarnu elektrodijalitičku ćeliju koju napuštaju tri procesna toka: vodena otopina pirogroždane kiseline, razrijeđena baza i fermentacijska komina sa smanjenom ionskom jakošću. Kako bi se smanjila potrebna količina svježe baze potrebne za regulaciju pH u sekciji fermentacije, baza dobivena u procesu elektrodijalize se miješa sa svježom bazom i vraća u proces. Isto tako, fermentacijska komina sa smanjenom ionskom jakošću vraća se povratnim tokom u proces. Na taj način ostvaruje se dvostruka ušteda jer ne samo da se u proces vraćaju soli već se u njega vraća i praktički cjelokupna količina neproreagirane glukoze (>99 %) koja nema električki naboj te stoga ne može biti separirana u električnom polju procesa elektrodijalize. Pokazalo se da je na taj način kao rezultat moguće dobiti koncentriranu vodu otopinu piruvata, $\gamma_p > 75 \text{ g dm}^{-3}$ 98 %-tne čistoće.

Valja napomenuti da je svaki korak u razvoju procesa bio praćen ocjenom njegove ekonomsko-ekološke primjenjivosti. Primjerice, pri ocjeni uspješnosti semi-šaržnog procesa uspoređene su bilance tvari klasičnog kemijskog procesa proizvodnje piruvata i semi-šaržnog mikrobiološkog procesa (slika 12).¹² Pri izračunu uzeto je u obzir iskorištenje na produktu kemijskog procesa proizvodnje piruvata od 50 % te eksperimentalno određeno iskorištenje produkta mikrobiološkog procesa proizvodnje piruvata od 75 %. Pretpostavljeno je da je iskorištenje na produktu u separacijskim

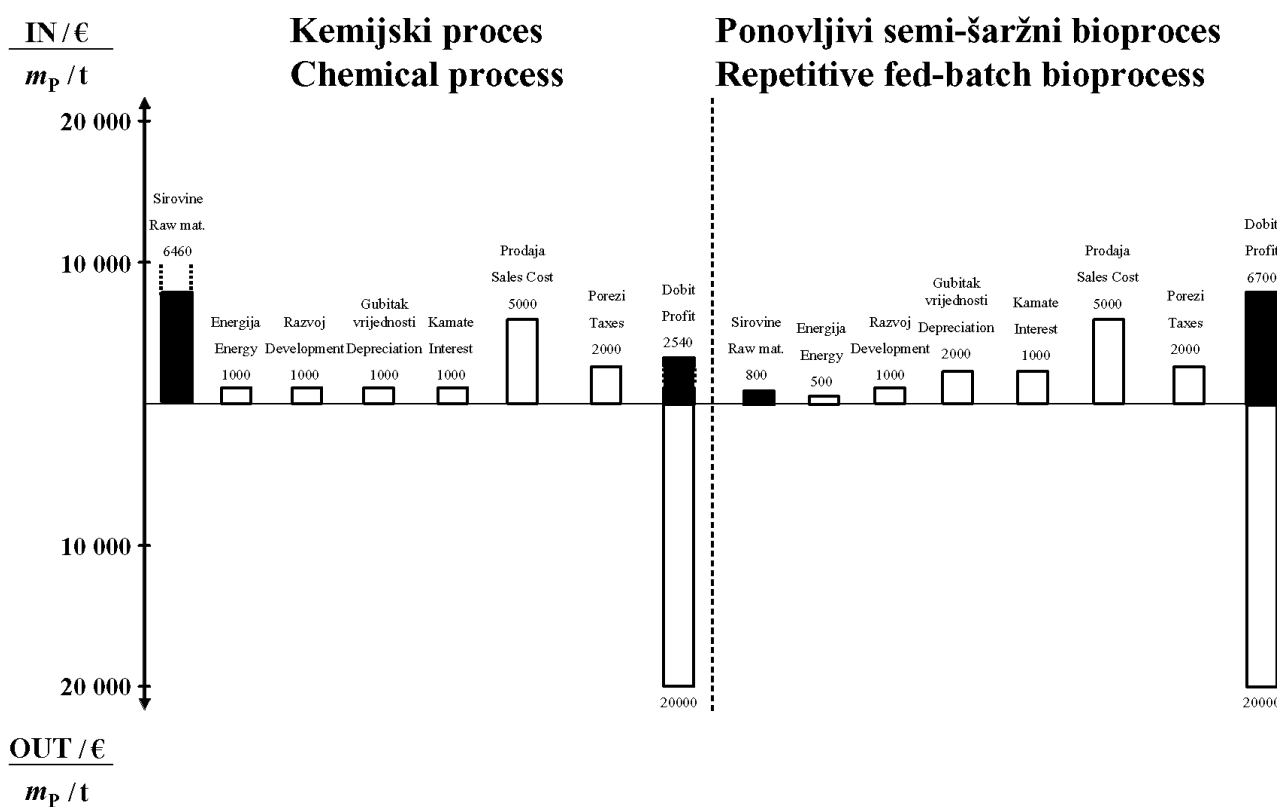
procesima jednako u oba procesa i da iznosi 90 %. Dodatno, u slučaju mikrobiološkog procesa proizvodnje, uzeto je u obzir da se 10 % izvora ugljika tijekom mikrobiološkog procesa konvertira u energiju. U oba slučaja proračun bilanci tvari normaliziran je na 1 t proizvedenog piruvata.

Vidljivo je da je u slučaju mikrobiološkog procesa i količina potrebnih reaktanata i količina nastalih nusprodukata manja nego kod klasičnog kemijskog procesa. To upućuje na znatno manje opterećenje okoliša s izlaznim emisijama te na znatno veću djelotvornost procesa s obzirom na ulazne sirovine što se izravno odražava i na ekonomskim uštedama (slika 13). Posebice je interesantno da je količina nastalog CO_2 po toni piruvata tri puta manja u mikrobiološkom procesu.

Osim bilanci tvari grubo su procijenjeni i izračunati ekonomski pokazatelji procesa pri čemu su ponovno uspoređeni klasični "kemijski" proces i semi-šaržni mikrobiološki proces (slika 13). Kao baza za proračun uzeta je procjena cijene koštanja proizvodnje 1 t piruvata od 20 000 US\$. Uzeti su u obzir sljedeći troškovi: cijena koštanja reaktanata, cijena potrebne energije, gubitak zbog pada vrijednosti investicije, troškovi istraživanja i razvoja, kamate, troškovi prodaje, troškovi marketinga i porezi. Cijena koštanja reaktanata izračunata je na temelju postavljenih bilanci tvari, uzimajući za proračun cijene reaktanata na svjetskom



Slika 12 – Bilance tvari klasičnog “kemijskog” procesa i semi-šaržnog bioprocasa proizvodnje piruvata
 Fig. 12 – Mass balances for the classical chemical process and fed-batch bioprocess for the pyruvate production



Slika 13 – Ekonomski pokazatelji klasičnog “kemijskog” procesa i semi-šaržnog bioprocasa proizvodnje piruvata
 Fig. 13 – Economical indexes for the classical chemical process and fed-batch bioprocess for the pyruvate production

tržištu. Treba napomenuti da u slučaju klasičnog "kemijskog" procesa cijena koštanja KHSO_4 nije bila uzeta u obzir jer njegovu količinu potrebnu za provedbu pirolize vinske kiseline nije bilo moguće pouzdano odrediti ni procijeniti. Ostali troškovi procijenjeni su na temelju literaturnih i iskusvenih podataka. Primjerice, uobičajeno je da je potrošnja energije u mikrobiološkim procesima znatno manja nego u klasičnim kemijskim procesima. S druge strane, provedba mikrobioloških procesa u industrijskom mjerilu zbog svoje složenosti zahtijeva veća inicijalna ulaganja u opremu, a samim tim i veće investicije te s tim povezane gubitke, i zbog smanjenja vrijednosti opreme i zbog troškova kamata. Nadalje, pretpostavljeno je da troškovi istraživanja i razvoja, troškovi prodaje, troškovi marketinga i porezi u oba slučaja sudjeluju u jednakom mjerilu i prema tome su jednaki. Uzevši u obzir sve navedene pretpostavke i obrazloženja, vidljivo je da je dobit mikrobiološkog procesa gotovo 2,5 puta veća od klasičnog "kemijskog" procesa proizvodnje piruvata.

Zaključak

Primjena kemijsko inženjerske metodologije u ranim fazama razvoja mikrobioloških procesa omogućuje identificiranje ključnih ekoloških i ekonomskih točaka proizvodnog procesa. Simuliranjem, modeliranjem i optimiranjem proizvodnog procesa moguće je smanjiti vrijeme potrebno za njegov razvoj, identificirati problematične točke procesa i ponuditi moguća rješenja. Takvim pristupom moguće je usporediti klasična i alternativna procesna rješenja, primjerice kemijske i mikrobiološke procese. Stalnom ekološko/ekonomskom ocjenom procesa moguće je znatno smanjiti kasnije proizvodne troškove i troškove zbrinjavanja otpada i nusprodukata, odnosno racionalno gospodariti prirodnim izvorima u skladu s modernim zahtjevima u razvoju održivih procesa.

Popis simbola i skraćenica

List of symbols and abbreviations

A	– točka plana pokusa – experimental plan point	t	– vrijeme, h – time, h
c	– koncentracija, mmol dm^{-3} – concentration, mmol dm^{-3}	T	– temperatura, °C – temperature, °C
D	– brzina razrjeđenja, h^{-1} – dilution rate, h^{-1}	TLL	– duljina spojne linije, cm – tie-line length, cm
K	– koeficijent raspodjele – partition coefficient	V	– volumen, dm^3 – volume, dm^3
K_S	– konstanta zasićenja supstratom, mmol dm^{-3} – Monod constant, mmol dm^{-3}	w	– maseni udjel – mass fraction
m_k	– kinetička veličina održanja, $\text{mmol mmol}^{-1} \text{h}^{-1}$ – maintenance, $\text{mmol mmol}^{-1} \text{h}^{-1}$	x	– parametar procesa – process parameter
m	– masa, t – mass, t	Y	– iskorištenje, mmol mmol^{-1} – yield, mmol mmol^{-1}
Q	– volumni protok, $\text{dm}^3 \text{h}^{-1}$ – volumetric flow rate, $\text{dm}^3 \text{h}^{-1}$	γ	– masena koncentracija, g dm^{-3} – mass concentration, g dm^{-3}
$r(c_x)$	– brzina reakcije kao funkcija c_x , $\text{mmol dm}^{-3} \text{h}^{-1}$ – reaction rate as c_x function, $\text{mmol dm}^{-3} \text{h}^{-1}$	μ	– specifična brzina rasta biomase, h^{-1} – specific growth rate, h^{-1}
		μ_{MAX}	– maksimalna specifična brzina rasta biomase, h^{-1} – maximal specific growth rate, h^{-1}
		0	– početni uvjeti – initial conditions
		2-KDG	– 2-keto-D-glukonska kiselina – 2-keto-D-gluconic acid
		2,5-DKG	– 2,5-diketo-D-glukonska kiselina – 2,5-diketo-D-gluconic acid
		A	– acetat – acetate
		BSA	– goveđi serumski albumin – bovine serum albumin
		EVOP	– evolucijske operacije – evolutionary operation
		G	– glukoza – glucose
		GA	– genetski algoritam – genetic algorithm
		GK	– glukonska kiselina – gluconic acid
		IN	– ulaz – inlet
		MSC	– kriterij selekcije modela – model selection criterion
		OUT	– izlaz – outlet
		P	– piruvat – pyruvate
		PEG	– polietilen-glikol – polyethylene glycol
		X	– biomasa – biomass

Literatura

References

1. Đ. Vasić-Rački, History of industrial biotransformations-Dreams and realities, u A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley VCH, Weinheim, 2000, str. 3–29.
2. Đ. Vasić-Rački, *Kem. Ind.* **39** (1990) 459.
3. A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley VCH, Weinheim, 2000.
4. A. P. Bower, E. Heinzle, *Eng. Life Sci.* **2** (2002) 265.
5. M. Bott, T. Gerharz, R. Takors, B. Zelić (Forschungszentrum Juelich GmbH) German Pat. Appl. 10129711, 22 Jun 2001.
6. T. Gerharz, B. Zelić, R. Takors, M. Bott (Forschungszentrum Juelich GmbH) German Pat. Appl. 10220234, 6 May 2002.
7. B. Zelić, N. Pavlović, V. Delić, Đ. Vasić-Rački, *Bioprocess Eng.* **21** (1999) 45.
8. D. Weuster-Botz, M. Karutz, B. Joksch, D. Schaertges, C. Wandrey, *Biotechnol. Prog.* **13** (1997) 387.
9. B. Zelić, N. Pavlović, Đ. Vasić-Rački, *Kem. Ind.* **46** (1997) 233.
10. J. E. Bailey, D. F. Ollis, *Biochemical engineering fundamentals*, McGraw-Hill, New York, 1997.
11. B. Zelić, S. Gostović, K. Vuorilehto, Đ. Vasić-Rački, R. Takors, *Biotechnol. Bioeng.* **85** (2004) 638.
12. B. Zelić, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2003.
13. K. Selber, F. Nellen, B. Steffen, J. Thoemmes, M.-R. Kula, *J. Chromatogr. B.* **743** (2000) 21.
14. D. M. Bates, D. G. Watts, *Nonlinear regression analysis and its applications*, Wiley, New York, 1988.
15. B. Zelić, N. Pavlović, V. Delić, Đ. Vasić-Rački, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **16** (2002) 7.
16. Z. Findrik, B. Zelić, S. Bogdan, Đ. Vasić-Rački, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **18** (2004) 37.
17. R. Banerjee, B. C. Bhattacharyya, *Bioprocess. Eng.* **8** (1992) 151.
18. B. Zelić, N. Pavlović, V. Delić, Đ. Vasić-Rački, Kinetic model for the bioconversion of glucose to 2,5-diketo-D-gluconic acid, u G. Poli (ur.) *Proceedings of the first European congress of chemical engineering*, The Italian association of chemical engineering, Milano, 1997, str. 3105–3108.
19. T. Sonoyama, H. Tadi, K. Matsuda, B. Kageyama, M. Tanimoto, K. Kobayashi, S. Yagi, H. Kyotani, *Appl. Environ. Microb.* **43** (1982) 1064.
20. D. M. Bates, D. G. Watts, *Nonlinear regression analysis and its application*, Wiley, New York, 1988.
21. D. Weuster-Botz, V. Pramatarova, G. Spassov, C. Wandrey, *J. Chem. Technol. Biot.* **64** (1995) 386.
22. I. J. Dunn, E. Heinzle, J. Ingham, J. E. Prenosil, *Biological reaction engineering: principles, applications and modelling with PC simulation*, VCH, Weinheim, 1992.
23. R. Takors, W. Wiechert, D. Weuster-Botz, *Biotechnol. Bioeng.* **56** (1997) 564.
24. E. B. Daae, A. P. Ison, *Biotechnol. Bioeng.* **58** (1998) 263.
25. M. Baltes, R. Schneider, C. Sturm, M. Reuss, *Biotechnol. Prog.* **10** (1994) 480.
26. M. Nihtila, J. Virkkunen, *Biotechnol. Bioeng.* **19** (1977) 1831.
27. B. Zelić, N. Pavlović, Đ. Vasić-Rački, Analysis of microbial growth of *Erwinia citreus* in continuous culture. u F. Gilles, *Specific processes and technologies*, **13** (1999) str. 303–310.
28. B. Zelić, Đ. Vasić-Rački, C. Wandrey, R. Takors, *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **26** (2004) 249.
29. J. A. Nelder, R. Mead, *Comput. J.* **7** (1965) 308.
30. *Scientist handbook* (1986-1995), MicroMath, Salt Lake City, UT.
31. Y. Li, J. Chen, S.-Y. Lun, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57** (2001) 451.
32. J. W. Howard, W. A. Fraser, *Org. Synth. Coll.* **1** (1932) 475.
33. B. Zelić, T. Gerharz, M. Bott, Đ. Vasić-Rački, C. Wandrey, R. Takors, *Eng. Life Sci.* **3** (2003) 299.

SUMMARY

Application of the Methodology of Chemical Engineering on Development of Bioprocesses*B. Zelić and Đ. Vasić-Rački*

Environmental protection and pollution control, together with economic and social aspects, play the key role in evaluation sustainability. The development of eco-efficient products and processes is crucial for a sustainable development. An ecological and economic evaluation from the very beginning of the product/process design is therefore a matter of prime importance. In the early stages of product/process design, the evaluation procedure has to deal with a lack of knowledge, but at the same time it has to deliver sound results in a relatively short time period. It is possible to overcome that contradiction by using extensive, but nowadays time-efficient, modeling and simulation methods. Modeling, simulation and optimization enable the taking of maximal advantage of the experimental data.

Chemical engineering methodology that includes modeling, simulation and optimization of processes, and process parameters, is shown on the two examples: the process of bioconversion of glucose to pyruvate using genetically modified *Escherichia coli* strain, and the process of bioconversion of glucose to 2,5-diketo-D-gluconic (2,5-DKG) using *Erwinia citreus*.

Optimization of process parameters was studied in detail using two different optimization techniques: genetic algorithms (GA) and evolutionary operation (EVOP). Both techniques are based on the principle of the evolution applied on the estimation of possible solutions – process optimums. The evolutionary operation was used to determine optimal operating conditions, namely pH and temperature for the process of bioconversion of glucose to 2,5-DKG. For this purpose, a two-level factorial experimental design with central point was used. Optimization using GA was applied to investigate the influence of the mass fractions of PEG-6000, the mass fraction of ammonium sulfate, pH and BS Albumine (BSA) concentration on partition coefficient of BSA in an aqueous two-phase system, consisting of PEG-6000 and ammonium sulfate. In comparison to the full experimental plan, which would require 1530 experiments, the process optimum using GA was achieved in twenty experiments only.

Modeling studies were performed to identify simple, easy to use, and robust models that are suitable to support the engineering tasks of process optimization and design. For this purpose, "black box" unstructured cell models were chosen because they provide significant simplicity and at the same time a general understanding of the dominant metabolic processes in the production strain. Although these types of models require very rigorous constrains, they nevertheless showed their applicability and suitability for a variety of different modeling tasks. Basic principle used for the development of the unstructured cell model was shown also by two examples, for 2,5-DKG and for pyruvate production process.

Finally, the pyruvate production process with *in situ* product recovery with fully integrated electrodialysis was shown as an illustration of eco-efficient process development. Use of mass balances and economic calculations during the early stages of process development was also shown for pyruvate production process.

*Faculty of Chemical Engineering and Technology
Marulićev trg 19, 10000 Zagreb, Croatia*

*Received July 13, 2004
Accepted December 7, 2004*