

MAGDALENA CUDAK

Instytut Inżynierii Chemicznej i Procesów Ochrony Środowiska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, Szczecin

Możliwości zastosowania bilansu populacji do wybranych bioprocessów

Wprowadzenie

Większość modeli matematycznych opisujących układy biologiczne składa się z dużej liczby wysoko nieliniowych równań różniczkowych lub macierzy chemicznych współczynników stechiometrycznych [1]. Modele te są trudne do rozwiązania bez zastosowania odpowiednich narzędzi komputerowych [2]. Matematyczne modelowanie wzrostu mikroorganizmów oraz symulacje komputerowe stanowią efektywne narzędzia do opisu systemów biologicznych. Umożliwiają one lepsze zrozumienie przebiegu takich bioprocessów. Narzędzia te mają olbrzymie zastosowanie w biologii, medycynie, naukach o środowisku oraz w przemyśle farmaceutycznym [2]. Aby adekwatnie opisać fazę biologiczną, konieczne jest uwzględnienie w modelu faktu, że aktualny stan populacji komórek zależy od przeszłości poszczególnych komórek [3].

Praca ta ma na celu analizę możliwości zastosowania bilansu populacji do wybranych bioprocessów.

Analiza możliwości zastosowania bilansu populacji w różnych bioprocessach

Analiza możliwości zastosowania bilansu populacji do opisu układów biologicznych została przeprowadzona na podstawie trzech wybranych bioprocessów: produkcji drożdży w bioreaktorze o działaniu ciągłym [4-7], biologicznego oczyszczania ścieków [8] oraz produkcji antybiotyków [9-11].

Produkcja drożdży

Saccharomyces cerevisiae jest bardzo ważnym mikroorganizmem wykorzystywanym w przemyśle spożywczym, np. browarnictwie, piekarnictwie oraz inżynierii genetycznej. Drożdże mogą być produkowane w bioreaktorze ciągłym poprzez dostarczenie w strumieniu pożywki glukozy [4]. W przypadku hodowli komórek drożdży w takim bioreaktorze Henson [4] opisał szybkość wzrostu mikroorganizmów za pomocą strukturalno-masowego bilansu populacji dla zmiennej stężenia substratów:

$$\frac{\partial N(m,t)}{\partial t} + \frac{\partial [K(S')N(m,t)]}{\partial m} =$$

$$= 2 \int \Gamma(m', S) p(m, m') N(m', t) dm' - [D + \Gamma(m)] N(m, t) \quad (1)$$

gdzie:

- $N(m,t)$ – funkcja gęstości liczbowej komórek,
- $K(S')$ – całkowita szybkość wzrostu pojedynczej komórki,
- S' – efektywne stężenie substratów,
- $\Gamma(m', S)$ – funkcja intensywności podziału komórek,
- $p(m, m')$ – funkcja gęstości prawdopodobieństwa podziału komórek,

- D – odwrotność czasu przebywania,
- m' – fizjologiczny stan komórek macierzystych,
- m – fizjologiczny stan komórek potomnych.

Porównując wyniki uzyskane z modelu z danymi eksperymentalnymi Henson [4] stwierdził, że model ten dobrze przewiduje szybkość zużycia tlenu, natomiast nie dość dokładnie określa on szybkość fermentacji.

Organizmy modelowe, tj. drożdże *Saccharomyces cerevisiae* stanowią dobre narzędzie do zrozumienia regulacji zachodzących w cyklach komórkowych [5]. Hatzis i Porro [5] opisali wzrost populacji drożdży za pomocą morfologiczno-strukturalnego bilansu populacji. Rodzaje regulacji cykli komórkowych są zakodowane w rozkładzie wielkości wzrostu populacji drożdży. Jest to spowodowane przyjęciem zależności pomiędzy wzrostem a podziałem komórki w danym organizmie. W tym modelu możliwe jest uwzględnienie własności wewnątrzkomórkowych lub struktury biochemicznej wewnątrz każdej morfologicznie odrębnej klasy [5].

Wzrost populacji drożdży może być również modelowany za pomocą niestrukturalnych modeli, w których kluczowy parametr cyklu komórek jest funkcją warunków środowiskowych, np. stężenie substratu lub produktu. Chociaż te modele są stosunkowo proste mogą opisywać szeroki zakres dynamiki procesu [6]. Beuse i wsp. [7] analizowali właściwości wzrostu w bioreaktorze niesymetrycznie zbudowanych komórek *Saccharomyces cerevisiae*. Analizę przeprowadzili przy wykorzystaniu dwuklasowego modelu bilansu populacji. W tym modelu założono, że nie ma różnic między formą komórek potomnych oraz formą komórek macierzystych po podziale. Obie te grupy należą do klasy komórek macierzystych w następnym cyklu. Dla wyższej klasy modelu przyjmuje się, że populacja składa się z kilku genealogicznych klas. Liczba komórek N_i w danej klasie i zależy od czasu procesu t . Stan cyklu komórkowego jest scharakteryzowany przez masę m indywidualnych komórek [7]. Szybkość wzrostu komórek została opisana równaniem

$$\frac{\partial N_i}{\partial t} + \frac{\partial [q_i(m)N_i(t, m)]}{\partial m} = -DN_i(t, m) \quad (2)$$

z warunkami granicznymi

$$N_i(0, m) = N_{i0} m^{-C_1} f_i(m) \quad (3)$$

$$q_i(m_i^{\min}) N_i(t, m_i^{\min}) = \sum_j a_{i,j} q_j(m_j^{\max}) N_j(t, m_j^{\max}) \quad (4)$$

gdzie

- a_{ij} – współczynniki w genealogicznej macyry,
- q_i – masowa prędkość przepływu,
- C_1 – stała,
- N_i – liczba komórek w danej klasie,
- f_i – rozkład liczby komórek,

m^{min} , m^{max} – odpowiednio rozmiary komórek o najmniejszej i największej masie w danym cyklu komórkowym.

Generalnie ten model populacji jest definiowany przez g klas ($g \geq 1$) komórek macierzystych oraz $(g + 1)$ klas komórek potomnych [7]. Komórki macierzyste zmieniają się ze wzrostem liczby całkowitych cykli (wieku genealogicznego) z klasy i do klasy $i + 1$. W tym modelu bilans populacji może być określony jako macierz, w której pierwsza $g + 1$ linia opisuje klasę komórek potomnych, a ostatnia g linia opisuje klasę komórek macierzystych.

Biologiczne oczyszczanie ścieków

Proces oczyszczania ścieków za pomocą osadu czynnego jest najpopularniejszą metodą używaną do biologicznej obróbki ścieków. W pracy Biggsa i Lanta [8] przedstawiono zastosowanie dyskretnego bilansu populacji do modelowania flokulacji osadów czynnych. W tym modelu przyjęto, że proces jest okresowy, rozmiar kłaczków jest zmienny w czasie oraz, że agregacja i rozpad stanowią jedyne mechanizmy procesu. Szybkość zmiany liczby cząstek należących do klasy o określonym rozmiarze opisano równaniem

$$\frac{dN_i}{dt} = \sum_{j=1}^{i-2} 2^{j-i+1} \alpha \beta_{i-1,j} N_{i-1} N_j + \frac{1}{2} \alpha \beta_{i-1,j-1} N_{i-1}^2 +$$

$$- N_i \sum_{j=1}^{i-1} 2^{j-1} \alpha \beta_{i,j} N_j - N_i \sum_{j=1}^{i_{max}} \alpha \beta_{i,j} N_j + \sum_{j=1}^{i_{max}} \Gamma_{i,j} S_j N_j - S_i N_i$$
(5)

gdzie:

- N_i – stężenie kłaczków o rozmiarze i ,
- α – efektywność zderzeń,
- β_{ij} – częstotliwość zderzeń dla objętości cząstkowej v_i oraz v_k ,
- S_i – szybkość rozpadu kłaczków o rozmiarze i ,
- $\Gamma_{i,j}$ – funkcja rozkładu rozpadu.

Cztery kolejne człony po prawej stronie równania dotyczą początku i końca agregacji, piąty człon odpowiada za początek rozpadu komórek, natomiast ostatni człon oznacza powstanie dwóch jednakowych kłaczków o danym rozmiarze.

Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy [8] stwierdzili, że ze wzrostem średniego gradientu prędkości zmniejsza się rozmiar kłaczków, a zwiększa się współczynnik szybkości rozpadu.

Produkcja antybiotyków

Grzyby nitkowate, takie jak *Penicillium chrysogenum* lub *Aspergillus oryzae* biorą istotny udział w produkcji antybiotyków, kwasów organicznych lub enzymów [9]. Jeżeli te bioproceny są realizowane w bioreaktorze z mieszaniem mechanicznym, to moc mieszania oraz wybór geometrii mieszadła determinuje siły mechaniczne, które mogą wpływać na morfologię i różnicowanie rodzaju gatunków nitkowatych. W wyniku rozpadu grzybni podczas mieszania zmniejsza się szybkość wzrostu komórek oraz wydajność tworzenia danego produktu [9]. Zmianę populacji komórek *Penicillium chrysogenum* w czasie, uwzględniającą fragmentację powierzchni grzybni, opisuje dynamiczne równanie bilansu populacji zaproponowane przez Justena i wsp. [10]:

$$\frac{\partial N(A,t)}{\partial t} = - \frac{\partial [N(A,t)f(A)]}{\partial A} \quad (6)$$

$$f(A) = -K(A - A')^G = \frac{dA}{dt} \quad A > A' \quad (7)$$

- f – funkcja szybkości fragmentacji, którą można zapisać w postaci równania (7),
- K – stała szybkości fragmentacji [1/s], która zależy od geometrii mieszadła oraz częstości obrotów mieszadła,
- G – rząd pola powierzchni rzutowej $(A - A')$ w procesie fragmentacji,
- A' – minimalna powierzchnia, która może ulec fragmentacji.

Wyniki otrzymane z modelu autorzy ci porównali z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi w bioreaktorze mieszadłowym. Na podstawie tego porównania stwierdzili pewne różnice wynikające najprawdopodobniej z wprowadzenia do modelu założeń upraszczających. Mimo tych różnic, uznali, że zgodność tych wyników jest wystarczająca, aby przyjąć hipotezę, że grzybnia o najmniejszej powierzchni nie może się dzielić oraz że proces fragmentacji jest stopniowo redukowany. Justen i wsp. [10, 11] stwierdzili, że fragmentacja przedstawiana jako zmniejszenie średniej powierzchni grzybni jest zależna od geometrii mieszadła (przy założeniu stałej mocy mieszania). Największe rozdrobienie uzyskano dla układu z mieszadłem o łopatkach pochyłych.

Podsumowanie

Badania doświadczalne, modelowanie matematyczne i symulacje komputerowe uzupełniają się i stanowią niezbędne narzędzie do poznania systemów biologicznych. Uzyskana na ich podstawie wiedza dotycząca organizmów, pozwala na opracowanie uporządkowanego i rozbudowanego harmonijnego modelu matematycznego [2]. Wzrost i formowanie się populacji komórek w bioreaktorze silnie zależy od otaczającego je środowiska nieożywionego oraz przeszłości indywidualnych komórek [3]. Bilans populacji stanowi uniwersalne równanie, które może być stosowane do opisu zbioru komórek, w układzie jednorodnym lub niejednorodnym przy uwzględnieniu stałych lub zmiennych warunków środowiska nieożywionego.

LITERATURA:

1. A.G. Fredrickson, N.V. Mantzaris: Chem. Eng. Sci. **57**, 2265 (2002).
2. N. Ishii, M. Robert, Y. Nakayama, A. Kanai, M. Tomita: Journal of Biotechnology **113**, 281 (2004).
3. A. Lapin, J. Schmid, M. Reuss: Chem. Eng. Sci. **61**, 4783 (2006).
4. M.A. Henson: Computers and Chemical Engineering **27**, 1185 (2003).
5. Ch. Hatzis, D. Porro: Journal of Biotechnology **124**, 420 (2006).
6. M.A. Hjortso, J. Nielsen: Journal of Biotechnology **42**, 255 (1995).
7. M. Beuse, R. Bartling, A. Kopmann, H. Diekmann, M. Thoma: Journal of Biotechnology **61**, 15 (1998).
8. C.A. Biggs, P.A. Lant: Chem. Eng. Sci. **124**, 201 (2002).
9. A. Amanullah, P. Justen, A. Davies, G.C. Paul, A.W. Nienow, C.R. Thomas: Biochem. Eng. J. **5**, 109 (2000).
10. P. Justen, G.C. Paul, A.W. Nienow, C.R. Thomas: Biotechnol. Bioeng. **52**, 672 (1996).
11. P. Justen, G.C. Paul, A.W. Nienow, C.R. Thomas: Bioprocess Engineering **18**, 7 (1998).