

Převod bioprocessu do většího měřítka a jeho optimalizace

Ing. PETR ETTLER, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

663.11 663.15

Převod bioprocessu do většího měřítka je vyústěním studií morfologických, fyziologických a bioinženýrských a v plné šíři ukazuje nutnost komplexního interdisciplinárního přístupu k řešení problematiky. V dnešní době je již pojem optimalizace neoddelitelný od automatizovaného sběru dat s následným vyhodnocením na počítači. Přes tento po všech stránkách náročný a netradiční přístup (aparaturně i personálně) přežívá řada empirických přístupů, při kterých jsou používány jednoduché numerické přepočty parametrů získaných z polo-provozních, v některých případech i laboratorních měřítek. S vědomím obsáhlosti problematiky si klade tento příspěvek za cíl upozornit na některé přístupy k pře-

vodu biotechnologií do většího měřítka a různé způsoby optimalizace.

Dosud nebyla vyvinuta jednotná metodika postupu při zvětšování míchacích zařízení bioreaktorů, ve kterých probíhá sdílení hmoty. Pokud ve vsádce, byť heterogenní, probíhá děj nebo řada dějů, které lze kvantifikovat i identifikovat z hlediska kinetického, není převod do většího měřítka problémem, jde-li o chemicko-inženýrský výpočet. Při průběhu bioprocessu se však v reaktoru odehrává řada následných dějů, které jsme schopni nedokonale nebo vůbec ne kvantifikovat a kvalifikovat a které různým způsobem závisí na poměru zvětšení. Samotná přítomnost mikroorganismu někdy zásadně

ovlivňuje fyzikálně chemické podmínky procesu. Například zjistit podmínky pro maximální nadprodukt metabolitu z chemicko-inženýrského hlediska na daném zařízení představuje jen sledování vlivu frekvence otáčení míchadla a průtoku vzduchu. Proto je takový důraz kladen na kvalitu poloproduktů pokusů, při kterých je třeba specifikovat děje, které jsou v bioproduktu rozhodující na instrumentaci poloproduktu fermentoru. Nyiri [1] považuje za nejlepší prostředek k řešení komplexního úkolu optimalizace mikrobiálních procesů vysoce instrumentalizovaný poloproduktu fermentor integrovaný s počítačem.

Přenos do většího měřítka představuje zachování fyzikálních a biologických průběhů bioproduktu v geometricky podobných bioreaktorech. Teoretické základy zvětšování neprůtočného míchacího zařízení hovoří o teorii podobnosti či fyzikálním modelování, kdy popis složitých fyzikálních dějů (vyjádřených soustavou diferenciálních rovnic), nám umožňuje pro matematicky neřešitelné situace usuzovat na základě experimentů vykonaných na zařízení modelové velikosti na zákonitosti systému provozní velikosti [Mika a kol. 2]. Podobné jevy jsou pak takové, při nichž se poměr mezi odpovídajícími veličinami nemění. Rozlišujeme podobnost geometrickou, podobnost fyzikálních polí a počátečních a okrajových podmínek. Geometrickou podobnost se u různých fermentorů různých proveniencí i velikostí málokdy podaří dodržet, neboť představuje zachování vzájemných poloh plošných a prostorových údajů a konstantní poměr zvětšení. Podobnost fyzikálních polí častěji používaná pro porovnání a klasifikaci bioreaktorů a jejich vestaveb předpokládá, aby v obdobných systémech byl poměr hodnot dvou veličin uvažovaných ve stejném čase konstantní ve stejném místě nádoby. Řešením rovnic toku na základě teorie podobnosti lze získat obecný kritériální vztah pro tok kapaliny ve tvaru publikovaném Štěrbačkem a Tauskem [3].

$$F(Ho, Fr, Eu, Re) = 0 \quad (1)$$

Einsele [4] uvádí jako možná kritéria zvětšování:

- konstantní K_La
- konstantní P/V
- konstantní obvodová rychlost míchadla
- konstantní doba homogenizace
- konstantní průběh D. O. C.

Při zachování geometrické podobnosti systémů je jednou z možností fyzikální podobnosti volit podmínky takové, aby byla zachována konstantní hodnota Re . Neměnná velikost Re vyjadřuje fyzikální podobnost vzhledem k hydrodynamickým poměrům v systému. Tento způsob zvětšování však nebývá v literatuře doporučován. Jinou možností při zvětšování systému při dané geometrické podobnosti je zachování příkonu míchadla [4] na jednotku objemu kapaliny, který za turbulentního režimu proudění míchané vsádky je úměrný poměru $N^3 d^5/V$.

Einsele [4] uvádí pro velký rozsah velikostí fermentorů empirický vztah:

$$P/V \sim V^{-0.5} \quad (2)$$

Pro stanovení doby homogenizace uvádí též autor empirické vztahy:

$$\begin{aligned} T_{mix} &\sim V^{-0.3} \\ T_{mix} &\sim n^{-1} \end{aligned} \quad (3)$$

Všechna dosud uvedená kritéria pro převod do většího měřítka selhávají — jak P/V , tak Re i T_{mix} . Zatímco logicky není ekonomické zachovávat stejný jednotkový příkon u velkokapacitních fermentorů (navíc u některých biosyntetických procesů antibiotik nebyla potvrzena závislost zvýšením frekvence otáčení míchadla a vý-

těžky procesu), hodnota obvodové rychlosti míchadla není specifická, neboť jak průměr míchadel, tak frekvenci otáčení míchadla nelze mnohdy měnit, hodnota T_{mix} je velmi závislá na použité metodice a na „kvalitě“ vsádky.

Kinetiku růstu, sledovanou podle vztahu dodávky kyslíku k jeho spotřebě v různých velikostech nádob, lze obsáhnout do objemového koeficientu přestupu kyslíku — K_La . Přes řadu výhrad, hlavně metodických, zůstává tento parametr spolu s rychlostí absorpce Na parametry určujícími průběh růstu mikroorganismů bez zřetele na velikost fermentorů. Také tento parametr používaný často pro převod do většího měřítka není specifický, neboť např. u producentů antibiotik neexistuje přímá vazba mezi růstem a tvorbou produktu. Aiba s Okabem [5] se staví ke stávajícím analytickým způsobům převodu do většího měřítka (K_La , P/V apod.) kriticky. Problémy přenosů považují za nevyřešené. Rozkládají klasický jednorázový proces na tři úseky, které samostatně optimalizují:

- kontinuální sterilace média,
- míchání a vzdušnění kultivačního média,
- ostatní operace.

Jejich syntetický přístup upřednostňuje ekonomické zisky a zahrnuje sekvencování procesu do operací. Uvádějí též vztahy pro modelování počtu cyklů.

Známe-li vzájemné funkční závislosti mezi jednotlivými dynamickými proměnnými systémy, můžeme kinetické chování systému popsat soustavou diferenciálních rovnic. Představa kinetického modelu systému většinou předpokládá existenci ideálně míchaného reaktoru. Skutečný biologický proces je z hlediska koncentrací nehomogenní a parametry kinetického systému jsou navíc funkcemi souřadnic reakčního objemu. Rychlostí převodu hmoty v systému vzniká gradient koncentrací, teploty i hybnosti.

Modely bioproduktu jsou formalizací a matematickým popisem reálného systému; při biosyntézách sekundárních metabolitů je zvláště důležitá znalost faktorů, které jsou přímo korelovány s produkcí. Bohužel v tomto smyslu nejsou znalosti procesů tak podrobné a v mnoha případech jsme nuceni brát proces jako „černou skříňku“. Při formulacích modelů však není možno opomenout úlohu prekurzorů, stopových prvků, specifických živin či enzymů degradujících účinnou látku nebo limitujících její biosyntézu.

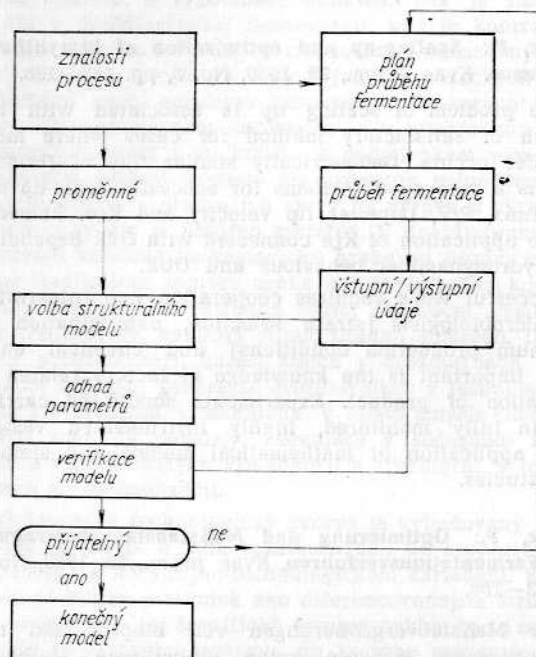
Protože však konečným cílem optimalizačních studií není dokonalé poznání procesu, zcela správně Nyiri [1] uvádí, že jde o vývoj flexibilní regulace vnějších podmínek, kterou bude metabolická aktivita mikrobiálních buněk regulována a upravována podle aktuálního stavu a trendu procesu. Tak bude vyloučen i negativní vliv nestandardního inokula a surovin.

Autor optimalizací rozděluje na dvě složky: identifikace procesu a on-line optimalizace. Jako metody získání adekvátní identifikace jsou uváděny:

- nalezení vhodných čidel,
- definování veličin, které mohou vyjadřovat aktuální fyziologický a biochemický stav procesu,
- definování chování metabolismu jako odezvy na vnější podmínky,
- vypracování algoritmu procesu založeného na matematickém modelu a verifikovaném nahromaděnými experimentálními daty,
- experimentální ověření identifikačního systému.

Hegewaldová [6] navrhuje nechat několikrát proběhnout cyklus: pokus — hypotéza — zkoumání modelu — fitování na experimentální výsledky — hypotéza — experiment.

Votruba [7] popisuje druhý krok po výstavbě matematického modelu biotechnologického procesu. Jde o simulaci procesu pomocí modelu. Simulace totiž umožňuje provádět optimalizační experimenty i v případech, kdy je to na reálných objektech neekonomické. Podmínkou pro úspěšnou simulaci fermentačního procesu pomocí počítače je výstižný popis jevů probíhajících při fermentaci, kvantifikovaný souborem kinetických konstant a souhrnem volitelných technologických parametrů. Nejčastěji hodnoty kinetických konstant neznáme a je nezbytné řešit tzv. zpětnou úlohu modelování, což v praxi znamená „narážet“ model na experimentální data (obr. 1).



Obr. 1. Systémová analýza biosyntetického procesu

Všechny uvedené způsoby optimalizací byly prováděny na počítači zapojeném buď na on-line (dosud v řídkých případech), nebo off-line. Ryu a Oldshue [8] a Ryu a Humphrey [9] uvádí, že pokud se zvyšuje zdánlivá viskozita, klesá OTR. OUR se pak proporcionálně zvyšuje s koncentrací buněk. Je třeba znát změny parametrů biospenzí během biosyntézy a zajistit takové poměry, které by byly optimální, tj. při minimálním příkonu a průtoku vzduchu umožnily efektivní míchání a dostatečný přestup kyslíku. Pro hypotetický případ biosyntézy penicilinu tento optimální bod leží v intersekcii uvedených křivek OUR a OTR. Souřadnice na abscise pak reprezentuje optimální koncentraci biomasy.

Další cestou optimalizace biosyntetických procesů jsou studie genetiků, fyziologů a bioinženýrů. Uvádí se, že každá z těchto odborností se podílí zhruba 30 % na zvýšení produkci v posledních letech. Je nutné dodat, že práce jedné profese úzce podmiňuje druhou. Je možné vyselektovat vysokoprodukční kmen, který bude vykazovat vyšší produkční rychlost, ale za cenu bohatšího média, které komplikuje zvláště ve větších měřítkách dodávku kyslíku k rostoucí buňce. Ve fyziologických studiích při hledání nejvhodnějšího C- a N-zdroje existuje již historický trend obohacování médií. Prakticky již žádnou biosyntézu nelze považovat za typicky jednorázový proces. Kromě přítokování základních substrátů, kterými se zlepšuje fyziologický stav buňky a favorizuje metabolická dráha, při které je v nadprodukci synteti-

zován metabolit, jsou nátokovány do produkčních fermentů prekursor, odpěňovadlo, louh, kyselina či CaCO_3 s cílem zavést pH stat. v optimální oblasti pro biosyntézu.

Princip dávkování snadno přístupného uhlíkatého zdroje přehledně popisuje Squires [10] pro biosyntézu penicilinu. Do vrcholů trojramenného trojúhelníka umístěje hodnotu rozpuštěného kyslíku, obsah redukcijících látek v médiu a dusíku. Na rychlosti, s jakou je dávkována glukóza, závisí koncentrace biomasy a s tím i hladina rozpuštěného kyslíku a pH. Při nedostatku glukózy vzrůstá hodnota pH.

Yamané a kol. [11] navrhuje matematickou metodu optimalizace nástřikové rychlosti růst limitujícího substrátu, a to pro případ produkce metabolitu ve fed-batch systému. Struktura matematického modelu, který popisuje zmíněný systém, umožňuje použít jednoduchou analytickou metodu, založenou na Portyaginově principu maxima, k řešení optimálních změn specifické růstové rychlosti a celkového množství biomasy.

Regulace dávkování sacharidů podle Icygina a Biriukova [12] může být prováděna podle parciálního tlaku rozpuštěného kyslíku, podle pH či podle respirace kultury. Při vytváření procesu je podle Kuenziho [13] důležité rozhodnout, na kterém kritériu bude založena rychlost přítokování. Nejjednodušším způsobem je dávkování podle předem určené konstanty. V tomto případě vznikají sice malé požadavky na instrumentaci, ale existují nebezpečí z výpadku. Vznikají též variace mezi jednotlivými šaržemi. Pomocí flexibilního dávkování je možno reagovat na různé potřeby produkčního mikroorganismu a „puřovat“ též vedlejší vlivy ovlivňující proces (např. kvalitu surovin).

Literatura

- [1] NYIRI, L. K.: Develop. Ind. Microbiol. **13**, 1972, s. 136
- [2] MÍKA, V. a kol.: Základy chem. inženýrství, Alfa Praha, SNTL, 1977
- [3] ŠTĚRBÁČEK, Z., TAUSK, P.: Míchání v chem. průmyslu, SNTL Praha, 1959
- [4] EINSELE, A.: Scaling up of Bioreactors. Theory and Reality, 5. IFS, Berlin, 1976
- [5] AIBA, S., OKABE, M.: Adv. Biochem. Eng. No. 7, 110, Edited by T. K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough, Springer Verlag 1977
- [6] HEGEWALD, E.: Symposium Entwicklung von Laborfermentoren, Reinhardtbrunn, 1978
- [7] VOTRUBA, J.: Bioinženýrské metody a zařízení fermentační technologie, kurs ČVTS při MBÚ ČSAV, MBÚ ČSAV, 1978
- [8] RYU, D. Y., OLDSHUE, J. Y.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 621
- [9] RYU, D. Y., HUMPHREY, A. E.: J. Ferment. Technol. **50**, 6, 1972, s. 424
- [10] SQUIRES, R. W.: Devel. Ind. Microbiol. **13**, 1972, s. 128
- [11] YAMANÉ, T., KUME, T., SADA, E., TAKAMATSU, T.: J. Ferment. Technol. **55**, 6, 1977, s. 587
- [12] ICYGIN, C. B., BIRIUKOV, V. V.: Chim. farm. ž. **10**, 1976, s. 82
- [13] KUENZI, M. T.: Process design and control of antibiotic fermentations, FEMS Basel 1977.

Použité symboly

K_a	objemový koeficient přestupu kyslíku (h^{-1})
L	
OUR	rychlost spotřeby kyslíku ($\text{g O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
OTR	rychlost přestupu kyslíku ($\text{g O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
D.O.C.	koncentrace rozpuštěného kyslíku ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)
P/V	jednotkový příkon ($\text{KW} \cdot \text{m}^{-3}$)
Ho	kritérium homochronnosti (l)
Fr	Froudovo kritérium (l)
Eu	Eulerovo kritérium (l)
Re	Reynoldsovo kritérium (l)
N	frekvence otáčení míchadla (min^{-1})
d	průměr míchadla (mm)
T	doba homogenizace (s)
T_{mix}	
V	objem kapalné fáze fermentoru (m^3)

Ettler, P.: Převod bioprocessu do většího měřítka a jeho optimalizace. Kvas. prům., **26**, 1980, č. 8, s. 183–186.

Dosud nebyla vyvinuta jednotná metodika postupu při

zvětšování míchacích zařízení, ve kterých probíhá sdílení hmoty. Přenos do většího měřítka bývá prováděn podle teorie podobnosti. Protože geometrická podobnost je řídkým jevem, využívá se podobnosti fyzikálních polí. Re , T_{mix} , P/V , obvodová rychlost míchadla a K_{La} jsou nejčastěji používanými kritérii pro tzv. scaling-up. Nejméně výhrad je v literatuře ke sledování koeficientu K_{La} , který zahrnuje vztah mezi spotřebou kyslíku rostoucími buňkami a dodávkou umožněnou fyzikálně chemickými vlastnostmi vsádky. Důležité je však zachovat jednotnou metodiku sledování tohoto parametru ve všech stupních bioreaktorů.

Optimalizace vyžaduje integraci mikrobiologických (genetických a fyziologických) a inženýrských znalostí.

Bioinženýrství přispívá k optimalizaci bioprocésů aplikací Henryho zákona (vyloučení limitu pO_2 přetlakem nebo regulací teploty vsádky) či regulací režimu míchání a vzdušnění. Modelováním a simulací ve vazbě na počítač lze dosáhnout jednak optimálního designu biosyntézy včetně její regulace, jednak identifikace procesu. Je zřejmé, že hlavní rozvoj těchto mikrobiálních technik teprve leží před námi. Pro optimalizační studie všeho druhu je však zvláště důležitá znalost faktorů, které jsou přímo korelovány s produkcí metabolitů.

Эттлер, П.: Оптимизация биологических процессов при переходе на установки повышенной мощности. Квас. прум. 26. 1980, № 8, стр. 183—186.

До настоящего времени не была разработана единая, достаточно проверенная, методика определения оптимальных условий массообмена в мешалках при переходе от малых установок на современные, более мощные. Обычно расчеты базируются на теории подобия. Так как геометрическое подобие встречается редко, пользуются подобием физических полей. Критериями при пропорциональном увеличении мощностей установок бывают чаще всего величины Re , T_{mix} , P/V окружная скорость мешалки и K_{La} . В литературе меньше всего встречается розражений к коэффициенту K_{La} , который показывает расход кислорода размножающимися клетками и его отношение к пополнению, вытекающему из химических и физических свойств среды. Неодходимо, однако, соблюдать единую методику определени этого параметра во всех фазах биологических процессов, протекающих в реакторах.

Оптимизация требует совместного использования знаний в области микробиологии, т. е. генетических и физиологических факторов, и в области техники. Инженеры-специалисты по биологическим процессам могут способствовать их оптимизации путем использования за-

кона Генри (о выделении максимального количества pO_2 путем повышения давления или регулирования температуры среды) или управления режимами перемешивания и аэрации. Моделирование, исходящее из использования современной вычислительной техники, дает возможность эффективной оптимизации процессов биологического синтеза, их целесообразного регулирования и точного изучения всех их фаз. Нет сомнения о том, что на пути к решению проблем биологических процессов размножения микроорганизмов были сделаны лишь первые шаги и что остается еще много задач. С точки зрения оптимизации самое важное значение имеет знание факторов, находящихся в корреляции с образованием продуктов метаболизма.

Ettler, P.: Scaling-up and optimization of biosynthetic processes. Kvas. prům., 26, 1980, No. 8, pp. 183—186.

The problem of scaling up is associated with the search of satisfactory method for cases where mass transfer occurs. Geometrically similar line of fermentors is a rare case — items for succesful scale-up are Re , T_{mix} , P/V , impeller tip velocity and K_{La} . Relevant is the application of K_{La} connected with OTR depending on hydrodynamical behaviour and OUR.

Succesful work requires cooperation and integration of microbiologists (strain selection, determination of optimum production conditions) and chemical engineers. Important is the knowledge of factors related to formation of product. Experiments should be carried out in fully monitored, highly instrumented vessels with application of mathematical models and simulation studies.

Ettler, P.: Optimierung und Maßstabstabsübertragung von Fermentationsverfahren. Kvas. prům., 26, 1980, No. 8, S. 183—186.

Für Maßstabvergrößerungen von Bioprocessen mit Stoffübergang bisheute keine einheitliche Methodik entwickelt wurde. Betriebeinsatz von geometrisch ähnlichen Fermentoren verwirklicht sich sehr selten. Außer Re , T_{mix} , P/V , Rührergeschwindigkeit, sind die geringste Vorbehalte zur Koeficient K_{La} , der umfaßt den Verhältnis zwischen Sauerstofftransportrate ermöglichte durch hydrodynamischen Verhalten der Kulturbrohen und Sauerstoffbedarf. Optimierung verlangt Integration von genetischen, fyziologischen und technischen Kenntnissen. Wichtige scheint die Entdeckung von Faktoren, die direkt zur Erhöhung des Wrkstoffsitters gebunden sind.