

Niektoré problémy modelovania rastu a produkcie metabolitov

VLADIMÍR BÁLEŠ — DUŠAN HALAMA

Súhrn. Práca sa zaoberá niektorými problémami modelovania rastu biomasy. Odporúča sa postup na určovanie parametrov kinetických modelov rastu, ako aj na výber „správneho“ modelu.

Modelovanie chemických procesov na základe určenia ich kinetiky je už bežnou metódou, využívanou pri návrhu reaktorov i pri optimalizácii procesov.

V posledných rokoch sa takéto modelovanie stále viac uplatňuje aj v oblastiach biochemickej technológie, najmä v priemyselnej mikrobiológii [1, 2].

Často nie je takéto modelovanie skutočným opisom procesu — ten je veľmi komplikovaný. Avšak aj keď ide iba o matematickú formalizáciu, môže byť táto užitočná. Tak najjednoduchšia rastová kinetika podľa Monoda

$$\mu = \mu_m \frac{C_s}{K_s + C_s}, \quad (1)$$

kde

$$\mu = \frac{dC_x}{dt} \cdot \frac{1}{C_x} \quad (2)$$

a

$$C_x = f(C_s)$$

je analógiou najjednoduchšej enzýmovej kinetiky známej teraz ako rovnica Michaelisa—Mentenovej. Táto analógia sa vysvetľovala zdanlivo logicky: Ak je pri raste organizmov nejaká reakcia „úzkym miestom“, potom ona určuje celkovú rýchlosť procesu. V živej hmote to bude zrejmé enzýmová reakcia, a preto je aj pochopiteľné, prečo sa rast kultúry mikroorganizmov riadi kinetikou enzýmovej reakcie.

Doc. Ing. Vladimír Bálež, CSc., Katedra procesov a zariadení chemickej technológie, doc. Ing. Dušan Halama, CSc., Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Jánska 1, 812 37 Bratislava.

Avšak v priebehu rastu kultúry od naočkovania po stacionárnu fázu sa podmienky neustále menia. Platí to nielen pre kultivačné médium, ale aj pre zloženie a vlastnosti biomasy. Za týchto okolností by teda jedna enzýmová reakcia mala byť určujúcou od začiatku až do konca? A ak nie jedna, potom rôzne reakcie, ale s formálne rovnakými vlastnosťami vzhľadom na koncentráciu substrátu a biomasy?

Zrejme to nie je možné — ale napriek tomu mnohé priebehy rastu kultúr sa dajú takto dobre opísať. Dokonca aj taký zložitý systém, ako je biocenóza aktivovaného kalu v procese biologického aerobného (aj anaerobného) čistenia odpadovej vody, tejto kinetike veľmi dobre vyhovuje.

Teda ak aj ide o formalizáciu procesov, v mnohých prípadoch sa dajú dobre opísať niektorými základnými jednoduchými vzťahmi. Pravda, s výnimkou produkcie primárnych metabolitov, pre produkciu metabolitov sú už tieto vzťahy pomerne zložité. Avšak napriek tomu sa dajú použiť. Súvisí to jednak s rastom významu praktickej aplikácie biochemických technológií, jednak s rýchlym rozvojom biochemického inžinierstva. Súčasne to odráža aj možnosti výpočtovej techniky, ktorá sa v tejto oblasti s iba niekoľkoročným oneskorením za chemickou technológiou začína zavádzať aj pre priame riadenie mikrobiologických procesov.

Modely rastu biomasy

Oproti chemickej kinetike sa v opise rastu kultúr stretávame s niekoľkými typickými odlišnosťami.

Katalyzátorom procesu je predovšetkým zložka živej hmoty. Jej koncentrácia sa v priebehu procesu zvyšuje (aspoň po dosiahnutie stacionárnej fázy rastu.) Teoreticky za podmienok bez limitácie by mala biomasa rásť do nekonečna podľa exponenciálneho vzťahu (v diferenciálnej forme)

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \quad (3)$$

lebo bez limitácie (limitácií) sa μ nemení (prakticky je totožná s μ_m). Pravda, podmienky bez limitácie možno udržať iba pomerne veľmi krátky čas a μ je potom závislá od koncentrácie limitujúceho substrátu, správnejšie substrátov, analogicky podľa [1]:

$$\mu = \mu_m \left[\frac{C_{si}}{K_{si} + C_{si}} \right] \quad (4)$$

Toto je častý prípad pri aerobných organizmoch: okrem limitácie zdrojom uhlíka a energie sú skoro vždy limitované aj koncentráciou kyslíka (formálne

tu vystupuje ako substrát). K_{s1} sú konštanty s rozmermi koncentrácie a predstavujú koncentráciu substrátu, pri ktorej je špecifická rastová rýchlosť μ práve polovičná v porovnaní s μ_m (teda proti nelimitovanému rastu).

Vzhľadom na zhodu s modelom enzýmovej kinetiky majú konštanty rovnice (4) fyzikálny zmysel. Veľmi často sa pozoruje odchýlka od tejto jednoduchej závislosti, a to najmä v závislosti od začiatočnej koncentrácie substrátu. Analógiou Monodovej rovnice je empirický vzťah [7]

$$\mu = \mu_m \frac{C_s}{K_{s1} + K_{s2}C_s + C_{s0}}. \quad (5)$$

Niekedy možno použiť vzťah (1), ale s exponenciálnou závislosťou od koncentrácie substrátu (Moser [4])

$$\mu = \mu_m \frac{C_s^n}{K_s + C_s^n} \quad (6)$$

V iných prípadoch sa môže opísať spomaľovanie rastu s poklesom koncentrácie substrátu (Teissier [3]):

$$\mu = \mu_m(1 - e^{-C_s/K_s}). \quad (7)$$

Pravda, pri posledných dvoch modeloch sotva môžeme hľadať v ich konštantách nejaký fyzikálny zmysel.

Contois [5] vysvetľoval spomalenie rastu „biologickou tesnosťou“ — pri vysokej koncentrácii biomasy si bunky navzájom prekážajú a brzdia svoje rozmnožovanie:

$$\mu = \mu_m \frac{C_s}{K_1 C_x + C_s}. \quad (8)$$

Dá sa dokázať, že ide o špecifický prípad tzv. logistických rastových kriviek

$$\mu = \mu_m \frac{C_{xm} - C_x}{C_{xm}} \quad (9)$$

alebo

$$\mu = \mu_m \left(1 + \frac{C_{x0}}{C_x} \right) \frac{C_{xm} - C_x}{C_{xm} - C_{x0}}. \quad (10)$$

Posledné dva vzťahy sa obyčajne vyjadrujú v integrálnej forme

$$C_x = \frac{C_{xm}}{1 + \exp(a - \mu_m t)}, \quad (11)$$

$$C_x = \frac{C_{xm} - C_{x0}}{(1 + \exp(a - \mu_m t))} + C_{x0} \quad (12)$$

Tieto krivky často dobre opisujú rast populácie nejakého druhu v určitom obmedzenom priestore a ich konštanty majú potom biologický zmysel.

V mnohých prípadoch hlavný zdroj uhlíka a energie má pri vyšších koncentráciách inhibičný vplyv na rast. Inokedy zase produkty metabomlizmu sú inhibičné (známy prípad: etylalkohol).

Potom prebieha rast často podľa závislosti, ktorú prvý odvodil Andrews [6];

$$\mu = \mu_m \frac{C_s}{K_s + C_s + \frac{C_s^2}{K_i}} \quad (13)$$

alebo podľa závislosti (Monod—Jerusalimskij [7]):

$$\mu = \mu_m \frac{C_s}{K_s + C_s} \frac{K_p}{K_p + C_p}. \quad (14)$$

Niektorí pracovníci sa snažili zjednotiť tieto zdanlivo veľmi odlišné modely [8, 9]. Kargi a Shuler [9] navrhli vzťah

$$\frac{d(\mu/\mu_m)}{dC_s} = K \left(\frac{\mu}{\mu_m} \right)^m \cdot \left(1 - \frac{\mu}{\mu_m} \right)^n, \quad (15)$$

ktorý zahrnuje niektoré predtým uvedené rastové kinetiky.

Z hľadiska návrhu a optimalizácie fermentačných procesov má veľký význam určenie správnej kinetiky rastu biomasy, resp. určenie parametrov modelu, ktorý najpriliehavejšie opisuje študovanú kinetiku rastu biomasy. V bežnej praxi sa postupuje tak, že sa rovnice kinetík linearizujú a metódou najmenších štvorcov sa určujú parametre modelov. V mnohých publikáciách, v ktorých sú takto spracované experimentálne údaje, neuvádzajú sa však základné štatistické údaje experimentov ani výpočtových parametrov, bez ktorých sú vypočítané konštanty bezcenné.

Podobné úskalía má aj nelineárna regresia, pomocou ktorej sa dajú vhodnou voľbou účelovej funkcie a výberom optimalizačnej metódy určiť parametre modelov. Napríklad, my sme vypracovali program C12SIM na výpočet parametrov uvedených modelov využívajúci simplexnú metódu, keď sa minimalizovala účelová funkcia v tvare

$$F = \frac{\sum_{i=1}^N \left(\frac{\mu_{i, \text{nam}} - \mu_{i, \text{vyp}}}{\mu_{i, \text{nam}}} \right)^2}{N}, \quad (16)$$

kde $\mu_{i, \text{nam}}$ sú namerané a $\mu_{i, \text{vyp}}$ vypočítané hodnoty špecifickej rastovej rýchlosti. Výber modelu sa riadi minimom účelovej funkcie a je testovaný rozptylom a korelačným koeficientom.

Priliehavosť modelu k experimentálnym údajom vyplýva zo správneho určenia parametrov (konštánt) použitého modelu. Adekvátny model musí obsahovať parametre, ktoré majú fyzikálny zmysel. Napríklad: Konštanta inhibície K_1 v Andrewsovom modeli (rov. (9)) musí mať reálnu kladnú hodnotu. Regresnou analýzou však možno niekedy získať aj záporné hodnoty tohto parametra, a takéto výsledky sú dokonca publikované aj v odborných prácach. Formálne možno akceptovať aj zápornú hodnotu, ak rovnica adekvátne opisuje experimentálne údaje a je použitá hoci na modelovanie procesu riadiacim počítačom. Pravda, na základe takto získaných parametrov nemožno robiť žiadny fyzikálno-inžiniersky rozbor procesu. Nežiadúce hodnoty konštánt možno vylúčiť zabudovaním patričnej podmienky do výpočtu parametrov modelu. V lineárnych modeloch by sa mohli získané parametre porovnať s ich zodpovedajúcimi štandardnými odchýlkami, použijúc t -test. Pri nelineárnej regresii t -test nie je signifikantný. Uvádza sa, že pre jednoduché modely, keď je štandardná odchýlka menšia ako 50 %, možno vypočítané parametre akceptovať.

Pri výpočte parametrov kinetik rastu biomasy sa predpokladá vzájomná nezávislosť parametrov modelu. Táto požiadavka často nie je splnená pre rovnice kinetiky rastu. Napr. našla sa kovariancia medzi parametrami Monodovho vzťahu.

Určenie správneho modelu kinetiky rastu biomasy spomedzi konkurenčných modelov sa riadi týmito zásadami:

- a) Model, ktorého vypočítané parametre sú nereálne (napr. záporné) a majú veľký rozptyl, je nevyhovujúci.
- b) Ak reziduá z vypočítaných (podľa modelu) a nameraných údajov nespĺňajú náhodné rozdelenie, model nie je vhodný.
- c) Za najvhodnejší model pokladáme model s najmenším rozptylom

$$Q^2 = \frac{(\mu_{i, \text{nam}} - \mu_{i, \text{vyp}})^2}{N - p}, \quad (17)$$

kde $\mu_{i, \text{nam}}$ je experimentálny údaj, $\mu_{i, \text{vyp}}$ — vypočítaný údaj, N — počet experimentálnych hodnôt, p — počet parametrov.

Rozptyl Q^2 pre vyhovujúci model by sa mal rovnať rozptylu experimentálnych údajov.

Z hľadiska skúmania procesu primárnym problémom je identifikácia „pravdivého“ modelu kinetiky rastu a nie určenie „najlepších“ parametrov modelu. Optimálny opis procesu fyzikálnym modelom nie je preto identický s určením parametrov modelu. V určitých prípadoch sa môže na určenie „pravdivého“ modelu použiť rozdiel medzi hodnotami rýchlosti v i -tom experimentálnom bode μ_i a zodpovedajúcej hodnote vypočítanej podľa zvoleného modelu μ_{i0} , pravda, definitívny výber medzi dvoma konkurenčnými modelmi nemôže byť uspokojivo urobený iba na základe jedného súboru kinetických údajov.

Musí sa urobiť ďalšia séria meraní, podmienky ktorých sa určujú na základe tzv. diskriminačnej funkcie [10]

$$g_i = \mu_{ij} - \mu_{ik}, \quad (18)$$

kde i označuje i -tý experimentálny údaj a j, k alternatívne modely. Požitie diskriminačnej funkcie spočíva v nájdení bodov, resp. oblastí nezávisle premennej, v ktorých nepravdivý model neopisuje experimentálne údaje. Dodatočné experimenty v tejto oblasti pre nepravdivý model vykazujú značne veľký rozptyl (rov. 17). Optimálne experimentálne podmienky sa určujú z maxima diskriminačnej funkcie. Maximum sa môže nájsť deriváciou rovnice (18), rešpektujúc nezávisle premenné (koncentráciou substrátu, čas atď.), a to buď analyticky, buď numericky. Určovanie parametrov pravdivého modelu možno urobiť už uvedeným spôsobom.

Pokúsili sme sa ukázať niektoré problémy modelovania kinetiky rastu biomasy, ktoré sa často prehliadajú. Správnou metodikou výberu modelu a určovania parametrov modelu sa vyhneme chybným záverom, ktoré môžu významne ovplyvniť naše praktické rozhodnutia.

Tabuľka 1

Table 1

Model ¹	K	m	n
(7)	$1/K_s$	0	1
(1)	$1/K_s$	0	2
(3)	$(n/K_s)^{1/n}$	$1 - n^{-1}$	$1 + n^{-1}$
(8)	K_1^{-1}	0	2

¹Model.

Literatúra

1. KAFAROV, V. V. — VINAROV, A. Ju. — GORDEEV, L. S.: Modelirovanije biokhimičeskich reaktorov. Moskva, Lesnaja promyšlennost'. 1979.
2. KOCH, L. A.: J. theor. Biol., 98, 1982, s. 401.
3. TEISSIER, G.: Ann. Physiol. Physicochim. Biol., 12, 1936, s. 527.
4. MOSER, A.: Bioprozesstechnik. Wien, Springer 1981.
5. CONTOIS, D. E.: J. Gen. Microbiol., 21, 1959, s. 40.
6. ANDREWS, J. F.: Biotechnol. Bioengng, 10, 1968, s. 707.
7. JAROPENSKO, V. L. — ROVINSKIJ, L. A.: Modelirovanije i optimalizacija mikrobiologičeskich procesov spirtovovo proizvodstva. Moskva, Piščevaja promyšlennost' 1978.
8. KONACK, A. R.: J. appl. Chem. Biotechnol., 24, 1974, s. 453.
9. KARGI, F. — SHULER, M. L.: Biotechnol. Bioengng, 21, 1979, s. 1871.
10. ENDRENYI, L. (Ed.): Kinetic Data Analysis. New York, Plenum Press 1981.

Некоторые проблемы моделирования роста и продукции метаболитов

Резюме

В работе рассматриваются некоторые проблемы моделирования роста биомассы. Рекомендуется метод определения параметров кинетических моделей роста, а также метод определения „правильной“ модели.

On some problems of modelling the growth and production of metabolites

Summary

The paper deals with some problems of modelling the growth of biomass. To this purpose the authors recommend a method for determination of parameters of kinetic growth models as well as for selection of a „proper“ model.