

MODELIRANJE ŠARŽNIH BIOREAKTORJEV

Jožef Ritonja, Jernej Černelič, Andreja Goršek, Darja Pečar

Izvleček:

Poznavanje matematičnih modelov fermentacijskih procesov je nepogrešljivo za načrtovanje bioreaktorjev, simulacijo njihovega delovanja, optimiranje fermentacijskih procesov in načrtovanje in sintezo regulacijskih sistemov za njihovo vodenje. Prispevek se osredotoča na določitev dinamičnega matematičnega modela procesa fermentacije mleka, ki poteka v šaržnem bioreaktorju. V literaturi poznani modeli ne omogočajo analize vpliva temperaturnih sprememb na presnovo med fermentacijo. Članek prikazuje odkritja obsežne multidisciplinarne študije, v kateri smo razvili nov matematični model, ki upošteva vpliv temperature na dinamiko sproščanja CO_2 med fermentacijo v šaržnem bioreaktorju. Na podlagi laboratorijskih poskusov in teoretične analize je bila najprej določena ustrezna struktura izpeljanega razširjenega modela. Nato smo z metodo optimizacije roja delcev identificirali modelne parametre preučevanega procesa. Na koncu smo meritve laboratorijskih poskusov primerjali s simulacijami z izpeljanim modelom. Izpeljani razširjeni model se je izkazal kot zelo primeren za simulacije, predvsem pa omogoča načrtovanje in sintezo krmilnih sistemov za šaržne bioreaktorje.

Ključne besede:

biotehnologija, bioproceno inženirstvo, fermentacijski proces, šaržni bioreaktorji, modeliranje fermentacijskega procesa, identifikacija parametrov, optimizacija z rojem delcev

1 Uvod

Biotehnologija je ena najpomembnejših znanstvenih in inženirskih disciplin 21. stoletja. Kongresni urad ZDA za tehnologije (Office of Technology Assessment of the United States Congress) je biotehnologijo definiral kot »postopke, pri katerih se uporabljajo živi organizmi ali snovi iz teh organizmov za izdelavo ali izboljšanje proizvodov, za izboljšanje rasti rastlin ali živali ali za razvoj mikroorganizmov za posebno uporabo« [1]. Pomembnost in prodornost biotehnologije je posebej vidna, če jo primerjamo z drugimi, danes tudi zelo pomembnimi gospodarskimi panogami. Svetovni biotehnološki trg je bil za leto 2016 ocenjen na 369,62 milijard dolarjev in za leto 2017 na 414,50 milijard dolarjev [2]. To je približno štirikrat več, kot je ocenjena svetovna proizvodnja elektromotorjev (96,97 milijard dolarjev za leto 2017 [2]). Vzpon biotehnologije je izreden. Razvoj na področju raziskav je hiter in skokovit, industrijske implementacije novih znanstvenih odkritij so skoraj trenutne. Obstajajo napovedi, da bo leta 2025 biotehnološki trg dosegel vrednost 727,1 milijardo dolarjev, kar še povečuje prednost v primerjavi

z napovedano rastjo vrednosti trga elektromotorjev, za katerega ocenjujejo za isto leto vrednost 136,5 milijard dolarjev [3]. Dodatna pomembnost biotehnologije izhaja iz svetovne težnje po zmanjšanju ogljikovega odtisa. V mnogih primerih se odpadki iz kmetijstva ali obnovljive surovine uporabljajo kot izvorni material v biotehnoloških industrijskih aplikacijah. To je razlog, da je biotehnologija zelo pomembna tudi za zmanjšanje odvisnosti od fosilnih goriv in za zmanjšanje emisij toplogrednih plinov. Predvideva se, da lahko uporaba biotehnologije za industrijske procese vodi do zmanjšanja emisij ogljikovega dioksida kar za 50 %, porabe energije za 20 % in porabe vode za 75 % [4].

Bioproceno inženirstvo je biotehnološka disciplina, ki je odgovorna za prenos rezultatov znanstvenega dela v izdelke, procese ali sisteme, ki služijo potrebam družbe [5]. Čeprav je danes najbolj vidna in prodorna uporaba biotehnologije v proizvodnji biofarmacevtskih izdelkov, ima bioproceno inženirstvo pomembno vlogo tudi v obstoječih industrijskih panogah, ki izkoriščajo industrijsko fermentacijo za proizvodnjo etanola (pijače, gorivo), mlečne kisline (mlečni izdelki), ogljikovega dioksida, vodikovega plina, butandiola (farmacevtske in kozmetične aplikacije), propanodiola (proizvodnja biopolimerov), jantarne kisline (kemična, farmacevtska, živilska in kmetijska industrija), asparaginske kisline (proizvodnja polimerov), ... [6].

Industrijska fermentacija je temeljni biotehnološki proces. Definirana je kot »načrtovana uporaba mi-

Izr. prof. dr. Jožef Ritonja, univ. dipl. inž.,
dr. Jernej Černelič, univ. dipl. inž., oba Univerza
v Mariboru, Fakulteta za elektrotehniko, računalništvo
in informatiko; prof. dr. Andreja Goršek,
univ. dipl. inž., izr. prof. dr. Darja Pečar, univ. dipl.
inž., obe Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemi-
jo in kemijsko tehnologijo

kroorganizmov (bakterije, kvasovke, plesni, alge) ali celic (živalske ali rastlinske celice) za izdelavo proizvodov, koristnih za ljudi» [7]. Industrijska fermentacija se uporablja v več biotehnoloških panogah: v »beli biotehnologiji« – to je biotehnološko področje, ki se ukvarja z industrijskimi procesi za proizvodnjo uporabnih kemikalij (imenovano tudi »industrijska biotehnologija«), v »rdeči biotehnologiji« – to je biotehnološko področje, namenjeno farmacevtski industriji, v »rumeni biotehnologiji« – to je uporaba biotehnologije pri proizvodnji hrane, in v »sivi biotehnologiji« – to je biotehnologija, namenjena okoljskim aplikacijam [7].

Bioreaktorji so posode, v katerih se izvaja industrijska fermentacija. Razvrščeni so glede na njihovo konstrukcijo in posledično način delovanja. Obstajajo tri vrste bioreaktorjev: šaržni, šaržni z napajanjem in kontinuirni bioreaktorji. Za šaržne bioreaktorje je značilno, da med izvajanjem bioprocasa vsebina bioreaktorja nima stika z zunanjimi snovmi ali organizmi, ker je bioreaktor zaprt in dodajanje ali odzemanje snovi v bioreaktor ali iz njega ni mogoče. Ta način delovanja dovoljuje enostavno konstrukcijo šaržnih bioreaktorjev, kar se odraža v nizkih proizvodnih stroških in preprostem vzdrževanju. Zato so šaržni bioreaktorji med vsemi najbolj razširjeni in uporabljeni. Šaržni bioreaktorji z napajanjem omogočajo, da med potekom bioprocasa dovajamo eno ali več hranilnih snovi v bioreaktor in s tem nadziramo hitrost reakcije. Vsi produkti ostanejo v bioreaktorju do konca procesa fermentacije. Kontinuirni bioreaktorji (imenovani tudi pretočni bioreaktorji) omogočajo kontinuiran dotok in odtok snovi ali organizmov v reaktor ali iz njega med izvajanjem bioprocasa. Mikroorganizmi (biomasa) v bioreaktorju se neprekinjeno hranijo.

Na področju raziskav in razvoja je nujno dopolnjevanje znanj biologije tudi z znanji iz nebioloških disciplin. Procesno inženirstvo, kamor sodi bioproceno inženirstvo, je bilo vedno tesno povezano z avtomatskim vodenjem. Proizvodni procesi v farmacevtski, živilski, kemični, naftni in drugih procesnih industrijah zahtevajo natančno vodenje veličin, ki opisujejo količino izdelka (masa, prostornina, pretok), in veličin, ki opisujejo pogoje med proizvodnim procesom (tlak, temperatura, kemične komponente). Natančno vodenje je potrebno za doseganje visoke kakovosti izdelkov in energetske učinkovitosti proizvodnje. Zahteve po natančnem vodenju v procesni industriji so imele velik vpliv na razvoj merilno-krmilne opreme (senzorji, aktuatorji, krmilniki) in na napredek v teoriji vodenja. Zanimivo je omeniti, da sta bila izum PID-regulacijskega algoritma in razvoj preprostih pravil za sintezo regulacijskih sistemov (Ziegler-Nicholsova metoda) neposredna posledica potreb v procesni industriji [8].

Osnovo metode za vodenje fermentacijskega procesa predstavlja dodajanje ali odstranjevanje mikroorganizmov in hranilnih snovi med fermentacijo

[9]. To je najbolj naraven način za vodenje fermentacije. Takšno vodenje je možno pri šaržnih bioreaktorjih z napajanjem in pri kontinuirnih bioreaktorjih. Šaržni bioreaktorji zaradi svoje preproste konstrukcije dodajanja ali odstranjevanja mikroorganizmov in hranilnih snovi (substrata) med delovanjem ne omogočajo. Zato pri teh bioreaktorjih izvedba vodenja na osnovi dodajanja in odzemanja mikroorganizmov in substrata med fermentacijo ni možna. To predstavlja veliko pomanjkljivost šaržnih bioreaktorjev. Obstajajo še druge metode za nadzor procesa fermentacije, ki temeljijo na spreminjanju fizikalnih pogojev fermentacije. Te metode vodenja so možne za vse tri vrste bioreaktorjev. Njihova izvedba je odvisna od dodatne opreme. Na primer: z uporabo mešalnega sistema lahko spreminjamo količino raztopljenega kisika v mediju v bioreaktorju, z grelno-hladilnim sistemom lahko spreminjamo temperaturo v bioreaktorju.

Prvi korak v razvoju regulacijskih sistemov za vodenje procesov vedno predstavlja določitev primerne matematičnega modela reguliranega procesa. Zato je bil (in je še vedno) razvoj na področju modeliranja fermentacijskih procesov zelo intenziven. V literaturi zasledimo matematične modele različnih kompleksnosti in natančnosti, ki omogočajo predvsem načrtovanje vodenja šaržnih bioreaktorjev z napajanjem in kontinuirnih bioreaktorjev. Večina modelov je izpeljana na osnovi snovne bilance sistema in opisuje razmerja med količinami aktivnih snovi fermentacijskega procesa. Področje, ki obravnava dinamične matematične modele fermentacijskega procesa v primeru spreminjanja pogojev med fermentacijo (spreminjanje temperature, spreminjanje hitrosti mešalnih sistemov), je bistveno manj raziskano.

Večina industrijskih bioreaktorjev, v katerih poteka šaržni fermentacijski procesi, deluje avtonomno, to je brez avtomatskega vodenja, s katerim bi vplivali na potek procesa. Ta je odvisen samo od začetnih vrednosti uporabljenih sestavin. Med potekom fermentacije namreč pri šaržnih bioreaktorjih ne moremo dodajati sestavin, s katerimi bi vplivali na potek fermentacije. Takšen način delovanja predstavlja veliko pomanjkljivost pri uporabi šaržnih bioreaktorjev.

V prispevku obravnavamo vodenje fermentacijskega procesa v šaržnem bioreaktorju. Možno ga je realizirati le s spreminjanjem pogojev fermentacije. Kot najprimernejši se je izkazal način, da na potek fermentacije vplivamo s spreminjanjem temperature vsebine bioreaktorja. Za sistematično načrtovanje takšnega vodenja je potrebno poznati dinamični matematični model, ki opisuje vpliv temperature na potek fermentacijskega procesa. Članek prikazuje strukturo takšnega matematičnega modela (poglavje 2), laboratorijski bioreaktorski sistem (poglavje 3), način določitve parametrov modela (poglavje 4), simulacijske rezultate, doblje-

ne s takšnim modelom (poglavje 5), in verifikacijo modela z meritvami na laboratorijskem šaržnem bioreaktorju (poglavje 6).

2 Matematični model fermentacijskega procesa v šaržnem bioreaktorju

Fermentacija je proces, pri katerem mikroorganizmi povzročijo razgradnjo substrata v fermentacijski produkt. Mikroorganizmi (biomasa), substrati in produkti fermentacije so prisotni pri vseh fermentacijah. Fermentacija je nelinearni kompleksni proces, katerega struktura in parametri so težko določljivi. V procesu fermentacije nastopa množica biokemičnih reakcij. Dodatno kompleksnost predstavljajo mutacije, s katerimi se mikroorganizmi prilagajajo okolju. Zato ne obstajajo matematični modeli, ki bi upoštevali vse vplivne dejavnike rasti mikroorganizmov in izvedbo procesa fermentacije in bi bili hkrati strukturno primerni (dovolj enostavni) za načrtovanje vodenja procesa.

V literaturi najdemo matematične modele različnih kompleksnosti, ki opisujejo dinamiko fermentacijskih procesov v šaržnih bioreaktorjih. Ti modeli večinoma temeljijo na masni bilanci snovi, ki nastopajo pri fermentaciji. V poglavju 2.1 predstavljamo izhodiščni matematični model fermentacijskega procesa, ki je največkrat uporabljen za opis dinamike fermentacije. Na osnovi tega modela smo v okviru našega dela razvili razširjen model, ki dodatno upošteva vpliv temperature na potek fermentacijskega procesa (poglavje 2.2).

2.1 Matematični model fermentacijskega procesa, ki ne upošteva vpliva spreminjanja temperature

Osnovni kinetični model je zapisan s sistemom treh nelinearnih diferencialnih enačb prve stopnje [1-3] [9, 10]:

$$\dot{x}_1(t) = \frac{\mu_m \left(1 - \frac{1}{P_i} x_3(t)\right) x_2(t)}{S_m + x_2(t) + \frac{1}{S_i} (x_2(t))^2} x_1(t) \quad (1)$$

$$\dot{x}_2(t) = - \frac{\mu_m \left(1 - \frac{1}{P_i} x_3(t)\right) x_2(t)}{S_m + x_2(t) + \frac{1}{S_i} (x_2(t))^2} x_1(t) \quad (2)$$

$$\dot{x}_3(t) = \left(\alpha \frac{\mu_m \left(1 - \frac{1}{P_i} x_3(t)\right) x_2(t)}{S_m + x_2(t) + \frac{1}{S_i} (x_2(t))^2} + \beta \right) x_1(t) \quad (3)$$

Spremenljivke stanja modela označujejo koncentracije sestavin v bioreaktorju:

$x_1(t)$ – koncentracija biomase (g/L),

$x_2(t)$ – koncentracija substrata (g/L),

$x_3(t)$ – koncentracija fermentacijskega produkta (g/L),

parametri modela so:

μ_m – maksimalna hitrost rasti biomase (h^{-1}),

P_i – inhibicijska konstanta produkta (g/L),

S_m – konstanta nasičenosti substrata (g/L),

S_i – inhibicijska konstanta substrata (g/L),

α – parameter, ki opisuje razmerje med donosom produkta in rastjo biomase, in

β – rastno neodvisna konstanta (h^{-1}).

Takšen matematični model nima vhodne spremenljivke in je avtonomen. To ustreza dejanski realizaciji fermentacije v šaržnih bioreaktorjih. Vse tri fermentacijske sestavine se na začetku fermentacije vnešajo v bioreaktor. Med fermentacijo jih ni mogoče dodajati ali odstranjevati. Dinamika procesa je odvisna samo od količine in kakovosti uporabljenih sestavin, tj. prehodni pojav modela je odvisen samo od začetnih vrednosti in od parametrov matematičnega modela.

Med postopkom fermentacije se koncentracija biomase in fermentacijskega produkta povečuje, koncentracija substrata pa zmanjšuje. V primeru nespremenljivih zunanjih pogojev (temperatura v bioreaktorju, hitrost vrtenja mešala) so ves čas trajanja fermentacijskega procesa vsi parametri osnovnega kinetičnega matematičnega modela konstantni. Predstavljeni matematični model omogoča preprosto in učinkovito simulacijo in analizo časovnih potekov koncentracij biomase, substrata in produkta v primeru različnih začetnih koncentracij. Glavna pomanjkljivost tega modela je nezmožnost upoštevanja vpliva spremembe temperature na proces fermentacije, kar je potrebno v primeru uporabe modela za načrtovanje regulacijskega sistema. Zato je potrebna takšna izpeljava matematičnega modela procesa fermentacije v šaržnem bioreaktorju, ki bo upoštevala vpliv spremembe temperature na potek procesa.

2.2 Matematični model fermentacijskega procesa, ki upošteva vpliv spreminjanja temperature

Na osnovi sistematičnih poskusov in temeljite analize izmerjenih rezultatov smo ugotovili, da imajo temperaturne spremembe na potek fermentacije podoben vpliv kot spreminjanje parametrov μ_m in α na odziv matematičnega modela [10-12]. Eksperimentalno je bilo pokazano, da sprememba temperature pomembno vpliva na parametra μ_m in α , medtem ko na druge parametre nima velikega vpliva. Ugotovljeno je bilo, da je μ_m povezan s hitrostjo fermentacije, vendar ne vpliva na končno vrednost fermentacijskega produkta. Nasprotno, parameter α vpliva na vrednost fermentacijskega produkta v stacionarnem stanju in ne vpliva bistveno na prehodni pojav.

To pomeni, da v primeru spremenljive temperature v bioreaktorju parametra μ_m in α ne bosta več

konstantna, temveč se bosta njuni vrednosti spreminjali. Zato smo osnovni matematični model fermentacijskega procesa razširili z dodatno diferencialno enačbo, s katero izračunavamo temperaturo v bioreaktorju, namesto konstantnih parametrov μ_m in α smo vpeljali temperaturno odvisna parametra $\mu_{m\theta}(t)$ in $\alpha_\theta(t)$. V [13] je bilo dokazano, da obstaja statično razmerje med temperaturo in parametri matematičnega modela. Ker se temperatura med fermentacijo giblje v relativno majhnem območju (previsoke ali prenizke temperature lahko poškodujejo mikroorganizme), smo uporabili linearno odvisnost med temperaturnim odklonom in odstopanjem parametrov modela. Tako izpeljan razširjen matematični model fermentacijskega procesa je prikazan z enačbami (4-7):

$$\dot{x}_1(t) = \frac{\mu_m(1+k_{\mu_m}(x_4(t)-\vartheta_0))\left(1-\frac{1}{P_1}x_3(t)\right)x_2(t)}{S_m+x_2(t)+\frac{1}{S_1}(x_2(t))^2}x_1(t) \quad (4)$$

$$\dot{x}_2(t) = -\frac{\mu_m(1+k_{\mu_m}(x_4(t)-\vartheta_0))\left(1-\frac{1}{P_1}x_3(t)\right)x_2(t)}{S_m+x_2(t)+\frac{1}{S_1}(x_2(t))^2}x_1(t) \quad (5)$$

$$\dot{x}_3(t) = \left(\alpha \frac{(1+k_\alpha(x_4(t)-\vartheta_0))\mu_m(1+k_{\mu_m}(x_4(t)-\vartheta_0))}{S_m+x_2(t)+\frac{1}{S_1}(x_2(t))^2} \left(\frac{1-\frac{1}{P_1}x_3(t)}{x_2(t)} + \beta \right) \right) x_1(t) \quad (6)$$

$$\dot{x}_4(t) = \frac{1}{T_{\vartheta cs}}(u(t) - x_4(t)) \quad (7)$$

kjer dodatni simboli predstavljajo:

- $x_4(t)$ – dejanska temperatura v bioreaktorju ($^{\circ}\text{C}$),
- $u(t)$ – referenčna temperatura grelno-hladilnega sistema bioreaktorja ($^{\circ}\text{C}$),
- $T_{\vartheta cs}$ – časovna konstanta člena 1. reda, ki predstavlja model grelno-hladilnega sistema bioreaktorja (h),
- ϑ_0 – temperatura v bioreaktorju na začetku fermentacijskega procesa, običajno je ta temperatura enaka temperaturi okolice ($^{\circ}\text{C}$),
- k_{μ_m} – koeficient za ovrednotenje vpliva temperature na maksimalno hitrost rasti biomase ($^{\circ}\text{C}^{-1}$),
- k_α – koeficient za ovrednotenje vpliva temperature na razmerje med donosom produkta in rastjo biomase ($^{\circ}\text{C}^{-1}$).

Izpeljani razširjeni model ovrednoti vpliv temperature v prehodnem pojavu in v stacionarnem stanju. Razširjeni model (4-7) je po strukturi delno podoben osnovnemu temeljnemu modelu (1-3), po uporabnosti za namene načrtovanja regulacijskih sistemov je razširjeni popolnoma neprimerljiv s temeljnim modelom. Temeljni model je avtonomen in omogoča le simulacije odzivov koncentracij na začetne vrednosti fermentacijskih snovi. Nasprotno, razširjeni model predstavlja neavtonomni model

nelinearnih diferencialnih enačb, ki dodatno omogoča izračun dinamičnih profilov koncentracij komponent v bioreaktorju v primeru sprememb temperature.

3 Opis obravnavanega fermentacijskega procesa in laboratorijskega šaržnega bioreaktorja

V okviru raziskave smo se osredotočili na dinamično modeliranje procesa fermentacije v šaržnih bioreaktorjih. Zato sta v naslednjih poglavjih podrobneje opisana obravnavani proces fermentacije in šaržni bioreaktor s potrebno opremo za meritve.

3.1 Obravnavan fermentacijski proces

Predstavljena študija obravnava fermentacijo mleka s kefirnimi zrni. Tradicionalno se kefir proizvaja z inokulacijo mleka s kefirnimi zrni, ki so mešanica beljakovin, polisaharidov, mezofilnih, homofermentativnih in heterofermentativnih mlečnokislinskih streptokokov, termofilnih in mezofilnih laktobacilov, oecetnokislinskih bakterij in kvasovk. Fermentacija mleka z inokulumom traja približno 24 ur, v tem času homofermentativni mlečnokislinski streptokoki hitro rastejo in sprva povzročijo padec pH . Nizek pH spodbuja rast laktobacilov, vendar povzroči zmanjšanje števila streptokokov. Prisotnost kvasovk v mešanici skupaj s primerno temperaturo fermentacije ($21-23^{\circ}\text{C}$) spodbuja rast heterofermentativnih streptokokov, ki proizvajajo aromo. Ko fermentacija poteka, je rast mlečnokislinskih bakterij hitrejša od rasti kvasovk in oecetnokislinskih bakterij.

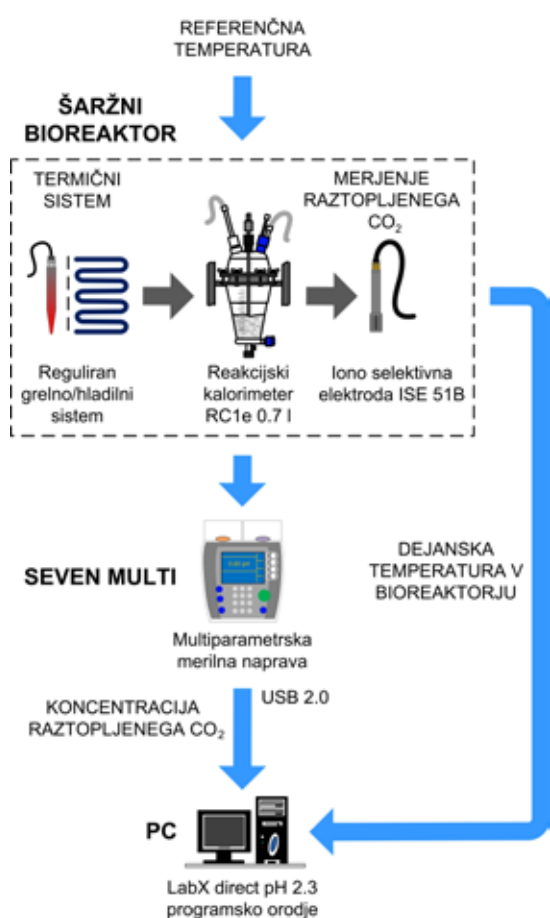
Pred začetkom fermentacijskih poskusov smo aktivirali 40 g kefirnih zrn tako, da smo jih 5 zaporednih dni spirali s hladno vodo in dajali v sveže pasterizirano polnomastno mleko (500 mL) pri sobni temperaturi. Fermentacijo smo sprožili tako, da smo v fermentorju segreli 500 mL svežega pasteriziranega polnomastnega mleka na želeno temperaturo in nato inokulirali s 40 g aktivnih kefirnih zrn.

Med fermentacijo nastajajo ogljikov dioksid, očetna kislina, diacetil, acetaldehid, etil-alkohol in številne druge komponente, ki dajejo izdelkom značilen svež okus in aromo. Fermentacija mleka z razmnoževanjem kefirnih zrn je zaradi specifične narave mikrobnega metabolizma in nelinearnosti njegove kinetike zelo nelinearen in kompleksen proces, ki zahteva ustrezno vodenje. Za načrtovanje in sintezo vodenja fermentacijskih procesov je nujen matematični model primerne natančnosti in stopnje.

3.2 Laboratorijski bioreaktorski sistem

Za analizo fermentacijskega procesa, določitev strukture modela, identifikacijo parametrov in ve-

rifikacijo matematičnega modela smo uporabili laboratorijski sistem, ki je omogočal spreminjanje temperature v bioreaktorju in meritev časovnega poteka koncentracije v bioreaktorju. Laboratorijski sistem sestavljajo šaržni bioreaktor z reguliranim grelno-hladilnim sistemom in merilnim sistemom za merjenje raztopljenega ogljikovega dioksida v bioreaktorju ter sistem za zajemanje podatkov. Blokovni diagram laboratorijskega sistema je prikazan na *sliki 1*.



Slika 1 : Laboratorijski sistem za identifikacijo fermentacijskega procesa v šaržnem bioreaktorju

Takšen laboratorijski sistem je omogočal izvajanje nadzorovanih temperaturnih sprememb v bioreaktorju in dinamično merjenje koncentracij reaktantov in produktov procesa za ugotavljanje vpliva temperature na potek fermentacije. V nadaljevanju so podrobneje opisane posamezne komponente laboratorijskega sistema.

3.2.1 Šaržni bioreaktor

Proces fermentacije smo raziskovali v računalniško vodenem bioreaktorju RC1e podjetja Mettler Toledo. Uporabljeni šaržni bioreaktor je prikazan na *sliki 2* in podrobno opisan v [10, 12, 13].



Slika 2 : Šaržni bioreaktor Mettler Toledo RC1e

3.2.2. Grelno-hladilni sistem

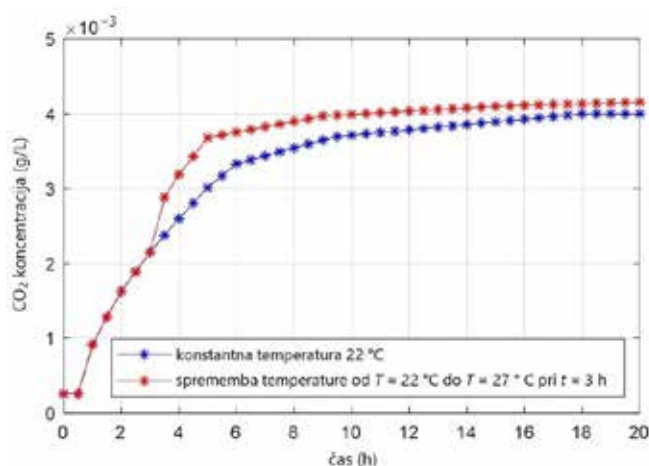
Za spreminjanje temperature reakcijske zmesi je bil uporabljen integriran grelno-hladilni sistem. Za prenos toplote služi silikonsko olje. Olje v zaprtem cirkulacijskem sistemu kroži skozi dvojni plašč bioreaktorja. Temperaturni regulacijski sistem ohranja temperaturo vsebine bioreaktorja na referenčni vrednosti [13]. V primerjavi z dinamiko procesa fermentacije je odziv grelno-hladilnega sistema zelo hiter. Identificirana časovna konstanta sistema je približno 6 min.

3.2.3. Sistem za merjenje raztopljenega ogljikovega dioksida

Opazovani fermentacijski produkt je bil ogljikov dioksid (CO_2), raztopljen v bioreaktorskem mediju. CO_2 je produkt celične presnove mikroorganizmov in je v našem primeru predstavljal izhodno veličino matematičnega modela ter služil kot pokazatelj fermentacije. Porazdelitev CO_2 v bioreaktorskem mediju je zelo homogena. Senzorji za merjenje koncentracije CO_2 so zanesljivi in natančni. Kot centralna enota je bila uporabljena večparametrna merilna naprava SevenMulti proizvajalca Mettler Toledo z možnostmi modularne razširitve. Za spremljanje koncentracije raztopljenega CO_2 v tekočem mediju smo aparat SevenMulti priključili na iono selektivno elektrodo ISE51B. Potencialni odziv elektrode na koncentracijo CO_2 je v semilogaritemskem merilu linearen v dveh dekadah koncentracije ($5 \cdot 10^{-4}$ g/L do $2 \cdot 10^{-2}$ g/L).

3.3 Eksperimentalni rezultati obravnavanega bioreaktorja

Na *sliki 3* je prikazan časovni potek koncentracije CO_2 za obravnavani fermentacijski proces v laboratorijskem bioreaktorju v primeru konstantne temperature mešanice v bioreaktorju (22°C) in v primeru, ko se je referenčna temperatura v bioreaktorju v trenutku, $t = 3$ h, povišala od 22°C na 27°C . Iz dinamičnih profilov obeh koncentracij je viden vpliv povišane temperature: dvig temperature povzroči porast koncentracije CO_2 – povečata se strmina in končna vrednost časovnega CO_2 profila.



Slika 3 : Časovni potek koncentracije CO_2 v primeru konstantne temperature v bioreaktorju (modra krivulja) in v primeru dviga referenčne temperature od 22°C na 27°C (rdeča krivulja) v času $t = 3$ h.

4 Identifikacija parametrov matematičnega modela

Parametri matematičnega modela μ_m , P_i , S_m , S_p , α , β , $k_{\mu m}$, $k_{\alpha'}$ in T_{gcs} (4-7) so odvisni od kakovosti in količine snovi fermentacijskega procesa ter zunanjih dejavnikov (pogojev). V primeru nespremenjenih zunanjih pogojev ostanejo parametri med postopkom fermentacije večinoma nespremenjeni [14]. Parametre matematičnih modelov za fermentacijske procese v laboratorijskih ali industrijskih bioreaktorjih je možno izračunati z različnimi identifikacijskimi metodami iz izmerjenih trajektorij. V predstavljeni raziskavi smo za izračun parametrov uporabili optimizacijo z rojem delcev (Particle Swarm Optimization, kratica PSO).

PSO je bil izvorno predstavljen v [15]. PSO je metahevristični postopek, ki lahko zagotovi dovolj dobro rešitev optimizacijskega problema v primeru malo, nepopolnih ali nobenih predpostavk o optimiranem problemu. Med optimizacijo se roj delcev spreminja po izbranem območju. Optimizacijski algoritem v vsakem koraku izračuna kriterijsko funkcijo, nakar premakne vsak delec na najbolj utemeljeno lokacijo.

Za hitrejšo uporabo PSO za izračun parametrov modela smo uporabili funkcije iz knjižnice MathWorks MATLAB/Optimization Toolbox. Matlab funkcija `particleswarm.m` temelji na algoritmu, opisanem v [16], z uporabo modifikacij, predlaganih v [17]. Podrobnosti o algoritmu PSO v funkciji `particleswarm.m` so zapisane v [18].

Optimizacija je bila izvedena na osnovi izmerjenih časovnih potekov fermentacijskega produkta laboratorijskega bioreaktorja. Kriterijska funkcija je bila določena z integralom absolutnega odstopanja (Integral Absolute Error – IAE) med izmerjenim odzivom bioreaktorja in izračunanim odzivom modela.

Na osnovi približne ocene obsega parametrov modela smo omejili področje, kjer je algoritem iskal optimalne rešitve. Optimizacijski algoritem je spreminjal parametre matematičnega modela (4-7) tako dolgo, da je dosegel minimum kriterijske funkcije. Optimizacija je bila končana, ko je relativna sprememba kriterijske funkcije dosegla nastavljeno mejo.

Za določitev razširjenega matematičnega modela je bilo potrebno identificirati devet parametrov. PSO lahko uporabljamo za identifikacijo vseh parametrov hkrati, lahko pa parametre modela identificiramo v več fazah. S pomočjo sistematičnega poskušanja smo ugotovili, da je najprimerneje identificirati parametre v dveh fazah. V prvi fazi smo identificirali parametre μ_m , P_i , S_m , S_p , α in β , v drugi fazi smo izračunali preostale parametre $k_{\mu m}$, $k_{\alpha'}$ in T_{gcs} .

4.1 Identifikacija parametrov μ_m , P_i , S_m , S_p , α in β (parametri osnovnega modela)

V prvi fazi identifikacije so bili identificirani parametri μ_m , P_i , S_m , S_p , α in β . To so parametri osnovnega matematičnega modela, ki opisuje fermentacijski proces v primeru konstantne temperature v bioreaktorju.

Tabela 1 : Začetne vrednosti veličin fermentacijskega procesa v šaržnem bioreaktorju

Veličina	Vrednost
začetna vrednost koncentracije biomase	$x_1(0) = 2,6 \text{ mg/L}$
začetna vrednost koncentracije substrata	$x_2(0) = 9,0 \text{ mg/L}$
začetna vrednost koncentracije produkta	$x_3(0) = 0,1 \text{ mg/L}$
začetna temperatura vsebine bioreaktorja	$x_4(0) = 22^\circ\text{C}$

Za identifikacijo parametrov smo najprej izmerili začetne vrednosti koncentracij biomase, substrata in fermentacijskega produkta v bioreaktorju. Izmerjene vrednosti so zapisane v *tabeli 1*.

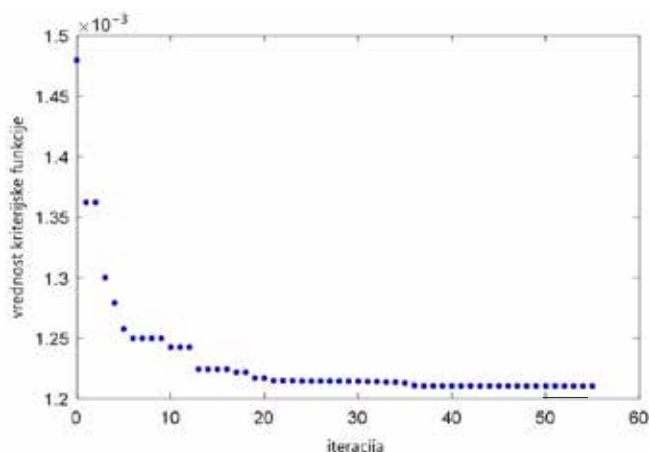
Sledila je fermentacija. Med potekom fermentacije so bili vsi zunanji pogoji (temperatura, hitrost mešala) konstantni. Ker je izhodno spremenljivko modela predstavljala koncentracija raztopljenega CO_2 , smo merili samo to veličino. Koncentracija raztopljenega CO_2 predstavlja enega izmed produktov fermentacije, ki daje probiotični pijači značilen okus. Izmerjeni časovni potek koncentracije raztopljenega CO_2 pri konstantni temperaturi 22 °C je prikazan na *sliki 3* (modra krivulja). Kriterijska funkcija optimizacijskega algoritma je bila izračunana kot integral absolutnega odstopanja med izmerjenim potekom koncentracije raztopljenega CO_2 (*slika 3*) in izračunano spremenljivko prostora stanj $x_3(t)$ nelinearnega matematičnega modela (1–3). Algoritem PSO je spreminjal vrednosti identificiranega modela μ_m , P_i , S_m , S_i , α in β tako dolgo, da je kriterijska funkcija do-

segla minimalno vrednost. Časovni potek kriterijske funkcije je prikazan na *sliki 4*.

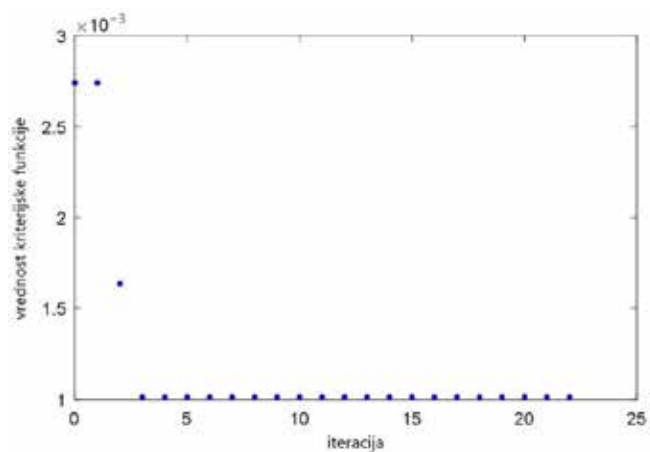
Kot je razvidno s *slike 4*, je bilo za izračun parametrov μ_m , P_i , S_m , S_i , α in β potrebnih manj kot 60 ponovitev. Identificirani parametri modela so predstavljeni v *tabeli 2*.

4.2 Identifikacija dodatnih parametrov razširjenega modela (parametri $k_{\mu m}$, k_α in T_{gcs})

V drugi fazi identifikacije smo določili parametre $k_{\mu m}$, k_α in T_{gcs} . Ti parametri so pomembni za razširjeni del matematičnega modela, ki opisuje vpliv spremenljive temperature na dinamično in statično obnašanje fermentacijskega procesa. Parametra $k_{\mu m}$ in k_α opisujeta vpliv spremenljive temperature na rast biomase in pridobivanje produkta, parameter T_{gcs} predstavlja časovno konstanto grelno-hladilnega sistema v bioreaktorju.



Slika 4 : Časovni potek IAE kriterijske funkcije med PSO parametrom μ_m , P_i , S_m , S_i , α in β



Slika 5 : Časovni potek IAE kriterijske funkcije med PSO parametrom $k_{\mu m}$, k_α in T_{gcs}

Tabela 2 : Parametri osnovnega modela fermentacijskega procesa v šaržnem bioreaktorju

Parameter	Vrednost
maksimalna hitrost rasti biomase	$\mu_m = 2,1\text{ h}^{-1}$
inhibicijska konstanta produkta	$P_i = 0,75\text{ g/L}$
konstanta nasičenosti substrata	$S_m = 0,03\text{ g/L}$
inhibicijska konstanta substrata	$S_i = 1,0\text{ g/L}$
parameter, ki opisuje razmerje med donosom produkta in rastjo biomase	$\alpha = 0,38\text{ g/L}$
rastno neodvisna konstanta (h^{-1})	$\beta = 0,002\text{ h}^{-1}$
temperatura v bioreaktorju med potekom fermentacijskega procesa	$\vartheta_0 = 22\text{ °C}$

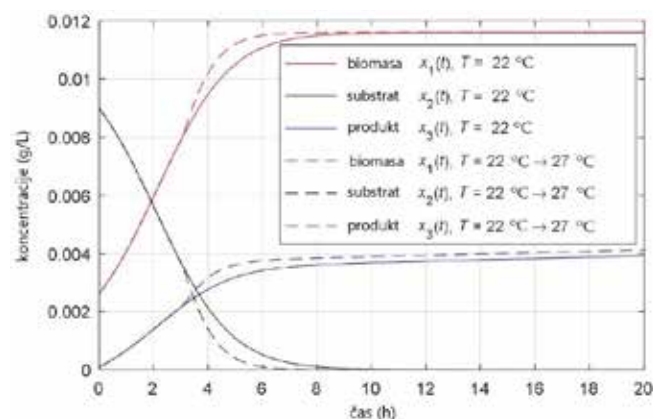
Tabela 3 : Parametri dodatnega dela razširjenega modela fermentacijskega procesa v šaržnem bioreaktorju

Parameter	Vrednost
koeficient za ovrednotenje vpliva temperature na maksimalno hitrost rasti biomase	$k_{\mu m} = 0,14\text{ (°C)}^{-1}$
koeficient za ovrednotenje vpliva temperature na razmerje med donosom produkta in rastjo biomase	$k_\alpha = 0,03\text{ (°C)}^{-1}$
časovna konstanta člena 1. reda, ki predstavlja model grelno-hladilnega sistema bioreaktorja	$T_{gcs} = 0,1\text{ h}$
temperatura v bioreaktorju na začetku fermentacijskega procesa, običajno enaka temperaturi okolice	$\vartheta_0 = 22\text{ °C}$

Za identifikacijo teh parametrov smo fermentacijski postopek ponovili pri enakih začetnih pogojih. Tokrat smo med postopkom fermentacije spremenili referenčno temperaturo grelnno-hladilnega sistema. Referenčno temperaturo smo stopnično spremenili v času, $t = 3$ h, od vrednosti $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Časovni potek raztopljenega CO_2 v primeru takšnega fermentacijskega procesa je prikazan na sliki 3 (rdeča krivulja). Ponovno je bila za identifikacijo parametrov modela uporabljena PSO z IAE kriterijsko funkcijo. Kriterijska funkcija je bila izračunana kot integral absolutnega odstopanja med izmerjenim potekom koncentracije raztopljenega CO_2 (slika 3) in izračunano spremenljivko prostora stanj $x_3(t)$ nelinearnega matematičnega modela (4–7). Algoritem PSO je spreminjal parametre identificiranega modela k_{um} , k_{a} in T_{gcs} tako dolgo, da je kriterijska funkcija dosegla minimum. Pri optimizaciji smo za parametre μ_{m} , P_{i} , S_{m} , S_{i} , α in β modela v kriterijski funkciji nastavili vrednosti, ki smo jih identificirali v prvi fazi identifikacije. Časovni potek kriterijske funkcije med postopkom identifikacije je prikazan na sliki 5.

5 Simulacijski rezultati razširjenega modela fermentacijskega procesa

Rezultati simulacije identificiranega razširjenega modela fermentacije v laboratorijskem bioreaktorju so prikazani na sliki 6. Prikazani so časovni odzivi koncentracij biomase, substrata in produkta v primeru konstantne temperature (polne črte), $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$, enake spremenljivke so v primeru stopnične spremembe referenčne temperature bioreaktorja od $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ v $t = 3$ h narisane s črtkanimi črtami. Očitno je, da temperaturne spremembe povzročajo znatne razlike v dinamiki vseh količin procesa fermentacije. Dejanska temperatura mešanice v bioreaktorju sledi spremembi referenčne temperature. Zakasnitev je majhna in ustreza kratki časovni konstanti regulirnega grelnno-hladilnega sistema, $T_{\text{gcs}} = 0,1$ h.



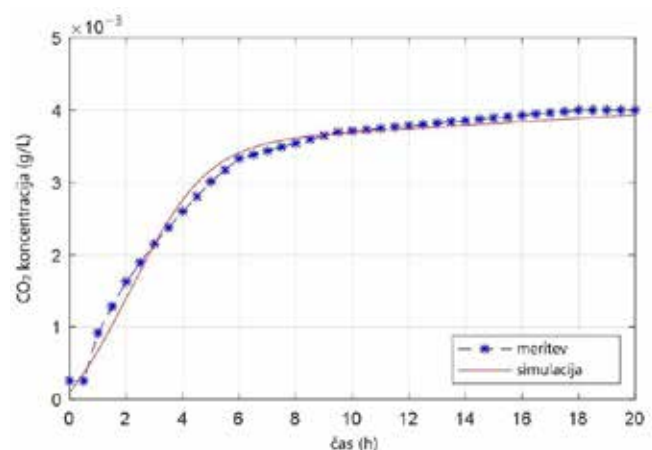
Slika 6 : Časovni potek spremenljivk stanja modela fermentacijskega procesa (koncentracije biomase, substrata in fermentacijskega produkta) v primeru konstantne temperature (neprekinjene črte) in v primeru stopnične spremembe temperature v bioreaktorju

6 Primerjava simulacij in eksperimentalnih rezultatov

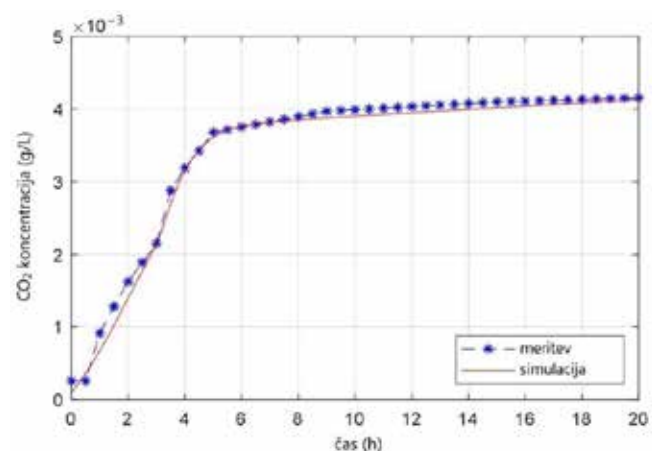
Ujemanje numeričnih izračunov identificiranega modela z rezultati meritev v laboratorijskem bioreaktorju je prikazano na slikah 7 do 9.

Na sliki 7 je prikazan koncentracijski profil CO_2 pri konstantni temperaturi $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odziv identificiranega matematičnega modela se zelo dobro ujema z odzivom, izmerjenim v laboratorijskem bioreaktorju. Usklajevanje je vidno v vseh fazah fermentacijskega procesa: v začetni indukcijski fazi, v sledeči eksponentni fazi rasti ter v končni stacionarni fazi.

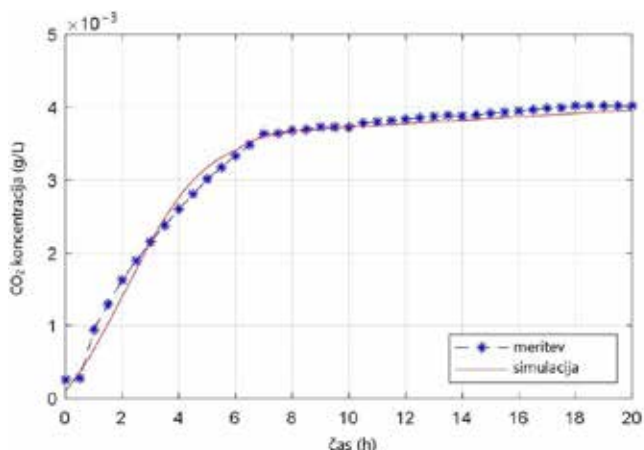
Na sliki 8 je prikazan rezultat fermentacije, kjer smo med procesom spremenili referenčno temperaturo grelnno-hladilnega sistema. Referenčno temperaturo smo stopnično zvišali od $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ za $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ v času, $t = 3$ h. Posledica stopnične spremembe referenčne temperature je vidna v povečanju rasti produkta



Slika 7 : Merjeni in simulirani časovni potek koncentracije raztopljenega CO_2 med fermentacijo pri konstantni temperaturi $22\text{ }^{\circ}\text{C}$



Slika 8 : Merjeni in simulirani časovni potek koncentracije raztopljenega CO_2 med fermentacijo s spremenljivo temperaturo bioreaktorja (stopnična sprememba temperature od $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ v času, $t = 3$ h)



Slika 9 : Merjeni in simulirani časovni potek koncentracije raztopljenega CO_2 med fermentacijo s spremenljivo temperaturo bioreaktorja (stopnična sprememba temperature od 22°C na 27°C v času, $t = 6\text{ h}$)

po spremembi temperature. Tudi v tem primeru je ujemanje odzivov identificiranega modela in laboratorijskih meritev zelo dobro.

Na *sliki 8* je prikazana primerjava koncentracijskih profilov CO_2 , pridobljenih s simulacijo in eksperimentom v primeru vhodnega signala, ki je bil predhodno uporabljen za identifikacijo parametrov modela. Smiselno je preizkusiti natančnost identificiranega matematičnega modela za spremenjen potek vhodne veličine (ko identificiramo z enim vhodnim signalom, verifikacijo modela pa opravimo z drugim vhodnim signalom). *Slika 9* prikazuje rezultate fermentacije, kjer je prišlo do stopničnega povečanja referenčne temperature od 22°C za 5°C pri $t = 6\text{ h}$. Podobno kot v prejšnjih primerih se oba odziva zelo dobro ujemata. Nekontinuiteta v odzivu, sicer manjša kot v prejšnjem primeru, je vidna pri $t = 6\text{ h}$. *Sliki 8* in *9* potrjujeta empirične ugotovitve, da je učinek spremembe temperature na proizvodnjo CO_2 večji na začetku fermentacije (visoka stopnja rasti) in manjši v drugem delu procesa fermentacije (nizka stopnja rasti).

Rezultati simulacije kažejo, da se izpeljani model lahko upravičeno uporablja za analizo bioprocesov, simulacije in razvoj krmilnega sistema. Identifikacija parametrov izpeljanega razširjenega modela ni zapletena, je pa časovno zamudna. Za namene identifikacije je potrebno najprej izvesti fermentacijski poskus pri konstantni temperaturi. Zatem moramo postopek fermentacije ponovno izvesti tako, da med procesom spremenimo temperaturo reakcijske zmesi.

7 Zaključki

Šaržni bioreaktorji so ceneni in enostavni za uporabo in vzdrževanje. Njihovo slabost predstavlja

šaržni princip obratovanja, ki ne predvideva zaprtostnega vodenja fermentacijskega procesa. Možno rešitev za realizacijo vodenja predstavlja uporaba grelnno-hladilnega sistema, s katerim lahko s spreminjanjem temperature v bioreaktorju vplivamo na potek fermentacije. Za načrtovanje takšnega regulacijskega sistema je potrebna izpeljava matematičnega modela, ki bi opisoval vpliv spreminjanja temperature na potek fermentacije.

Osnovni model fermentacijskega procesa ne obravnava vpliva temperature na potek fermentacije. V članku je prikazana izpeljava razširjenega modela, ki omogoča kvantitativno ovrednotenje vpliva temperature na časovne poteke vseh veličin fermentacijskega procesa.

Najpomembnejše značilnosti predstavljenega razširjenega modela so:

- ▶ izpeljani model je opisan s sistemom štirih nelinearnih enačb 1. stopnje;
- ▶ vhod modela je referenčna spremenljivka grelnno-hladilnega sistema, spremenljivke v prostoru stanja modela so koncentracije biomase, substrata in produkta ter temperatura v bioreaktorju;
- ▶ izpeljani model je kompakten in primeren za analizo procesov fermentacije, za simulacije in za implementacijo nadzornega sistema;
- ▶ izpeljani model ima 9 parametrov, ki so odvisni od sestave fermentacijskega medija. Določanje parametrov za določen bioreaktor je možno z identifikacijo. Za njihovo identifikacijo je potrebno postopek fermentacije izvesti vsaj dvakrat: enkrat s konstantno temperaturo in enkrat s spremembo temperature med fermentacijo. Za identifikacijo matematičnega modela je bila uporabljena optimizacija rojev delcev.
- ▶ Dobljeni rezultati številnih poskusov in izračunov so potrdili ujemanje modela z realnim objektom.

Literatura

- [1] K. N. Watabe and E. Pehu, Biotechnology intelligence unit: Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity. R. G. Landes Company and Academic Press, Inc, Austin, San Diego, London, 1997.
- [2] Grand View Research, Biotechnology Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Health, Food & Agriculture, Natural Resources & Environment, Industrial Processing Bioinformatics), By Technology, And Segment Forecasts, 2018–2025. Grand View Research, San Francisco, 2017.
- [3] V. Banik, A. Chinchane and O. Sumant, Elec-

- tric Motor Market by Type, Output Power, Voltage Range, Application & Speed: Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2018–2025. Allied Market Research, Pune, Singapore, Portland, London, 2019.
- [4] J. Villadsen, "Innovative technology to meet the demands of the white biotechnology revolution of chemical production". Chemical Engineering Science, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2007.08.017>
- [5] National Research Council, Putting Biotechnology to Work: Bioprocess Engineering. The National Academies Press, Washington, DC, 1992. <https://doi.org/10.17226/2052>.
- [6] C. S. M. Barcelos, F. B. Lupki, G. A. Campolina, D. L. Nelson and G. Molina, "The colors of biotechnology: general overview and developments of white, green and blue areas". FEMS Microbiology Letters, 2018. doi: 10.1093/femsle/fny239
- [7] E. J. DaSilva, "Editorial – The Colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind". Electronic Journal of Biotechnology, 2005. doi: 10.4067/S0717-34582004000300001
- [8] K. J. Åström and P. R. Kumar, "Automatic Control – a Perspective," Proceedings of the 36th Chinese Control Conference, 2017.
- [9] A. Cinar, S. J. Parulekar, C. Undey, G. Birol, Batch Fermentation – Modelling, Monitoring and Control, Marcel Dekker Inc., New York, 2003.
- [10] Ritonja, J.; Goršek, A.; Pečar, D. Use of a Heating System to Control the Probiotic Beverage Production in Batch Bioreactor. Appl. Sci. 2021, 11(1), 84. <https://doi.org/10.3390/app11010084>
- [11] Goršek, A.; Ritonja, J.; Pečar, D. Mathematical model of CO₂ release during milk fermentation using natural kefir grains. J Sci Food Agric 2018, 98, 4680–4684. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9001>
- [12] Ritonja, J.; Goršek, A.; Pecar, D. Control of Milk Fermentation in Batch Bioreactor. Elektrona Ir Elektrotehnika 2020, 26(1), 4–9. <https://doi.org/10.5755/j01.eie.26.1.23377>
- [13] Ritonja, J.; Goršek, A.; Pečar, D.; Petek, T.; Polajžer, B. Dynamic Modeling of the Impact of Temperature Changes on CO₂ Production during Milk Fermentation in Batch Bioreactors. Foods 2021, 10, 1809. <https://doi.org/10.3390/foods10081809>
- [14] Thatipamala, R. On-line Monitoring, State and Parameter Estimation, Adaptive Computer Control and Dynamic Optimization of a Continuous Bioreactor, PhD Thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, 1993.
- [15] Kennedy, J.; Eberhart, R. C. Particle swarm optimization. Proc. IEEE Int. Conf. Neural Netw., Nov. 1995, pp. 1942–1948.
- [16] Mezura-Montes, E.; Coello, C. A. Constraint-handling in nature-inspired numerical optimization: Past, present and future. Swarm and Evolutionary Computation 2011, pp. 173–194.
- [17] Pedersen, M. E. H. Good Parameters for Particle Swarm Optimization, Technical Report no. HL1001. Luxembourg: Hvas Laboratories, 2010.
- [18] Particle Swarm Optimization Algorithm. Available online: <https://mathworks.com/help/gads/particle-swarm-optimization-algorithm.html> (accessed 12 May 2021).

Modelling of batch bioreactors

Abstract:

Mathematical models of fermentation processes are indispensable for designing bioreactors, simulation of their operation, optimization of fermentation processes, and design and synthesis of control systems for their control. The paper focuses on the determination of a dynamic mathematical model of the milk fermentation process taking place in a batch bioreactor. Models known in the literature do not allow the analysis of the influence of temperature changes on metabolism during fermentation. The paper presents the findings of an extensive multidisciplinary study. We developed a new mathematical model that considers the impact of temperature on the dynamics of CO₂ release during fermentation in a batch bioreactor. Based on laboratory tests and theoretical analysis, the appropriate structure of the derived extended model was first determined. This was followed by the identification of the model parameters of the fermentation process in the laboratory bioreactor by particle swarm optimization. In the end, we compared the measurements of laboratory tests with simulations with a derived model. The derived augmented model proved to be very suitable for simulations, and above all, it enables the design and synthesis of a control system for batch bioreactors.

Keywords:

biotechnology; bioprocess engineering; fermentation process; batch bioreactors; modeling of the fermentation process; identification of parameters; particle swarm optimization