



Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής
Βιοτεχνολογίας
Καθηγητής Νικόλαος Καλογεράκης

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΚΡΗΤΗΣ

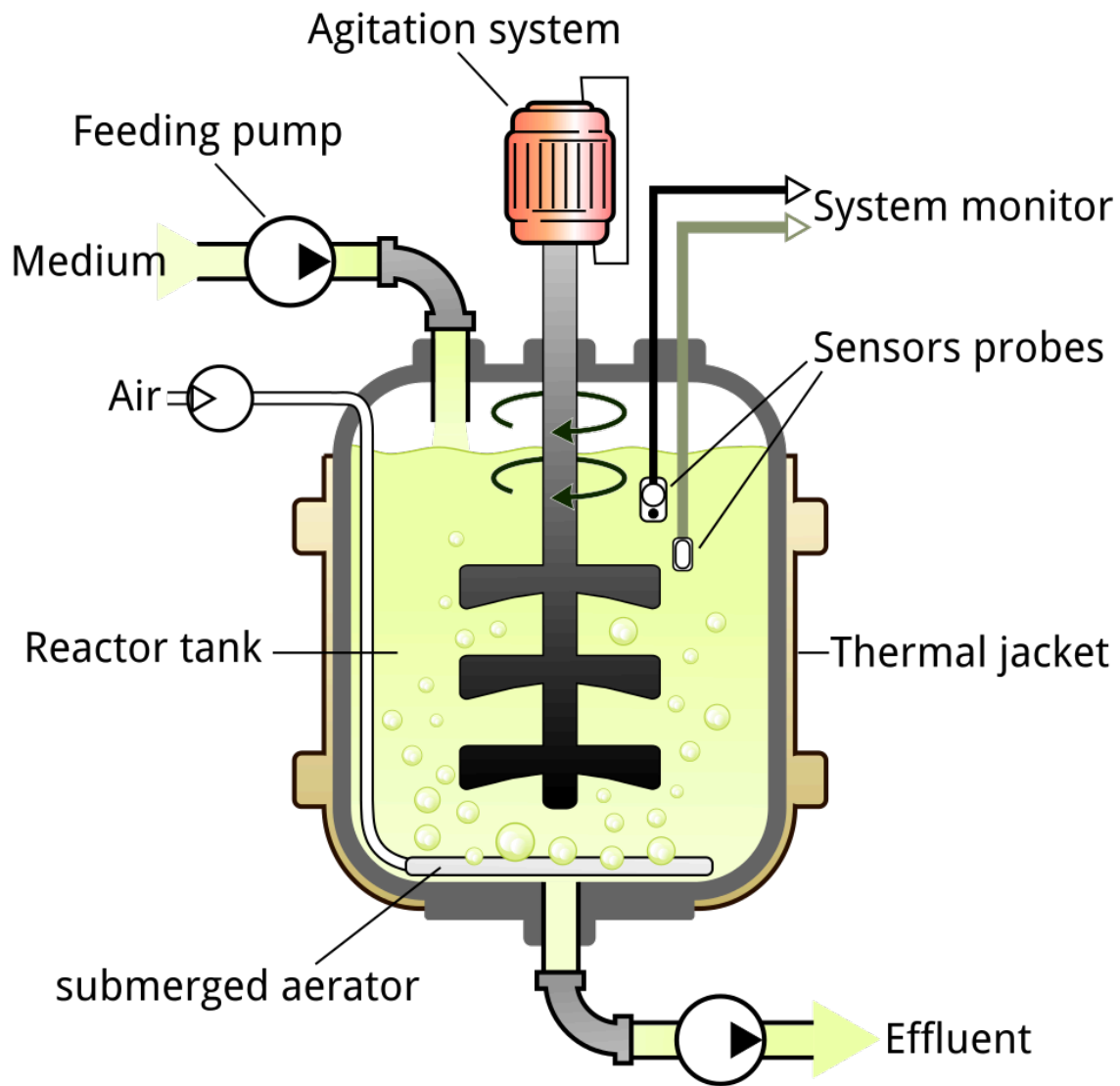
ΤΕΧΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

4. ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

Lab of Biochemical Engineering

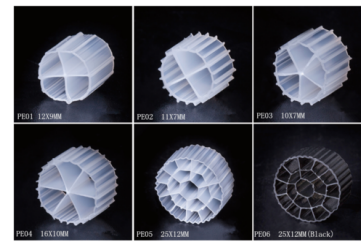


& Environmental Biotechnology





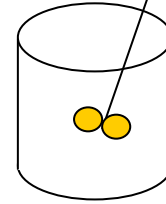
Moving Bed Biological Reactor



Βιοαντιδραστήρας Διαλείποντος Έργου (Batch Bioreactor)

Το ισοζύγιο μάζας για κάθε ουσία εντός ενός βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου έχει ως εξής (όπου έχουμε θεωρήσει ότι έχουμε **τέλεια ανάδευση και σταθερό όγκο**):

$$\frac{dN_i}{dt} = r_i V \Rightarrow \frac{d[C_i V]}{dt} = r_i V \Rightarrow \frac{dC_i}{dt} = r_i$$



$$F_{in,i} = F_{out,i} = 0$$

Η παραπάνω γενική εξίσωση για την βιομάζα, υπόστρωμα και προϊόν έχει ως εξής:

$$\frac{dx}{dt} = r_x \Rightarrow \frac{dx}{dt} = \mu x$$

$$\frac{dS}{dt} = r_s \Rightarrow \frac{dS}{dt} = -q_s x$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p \Rightarrow \frac{dP}{dt} = q_p x$$

Με $x(0) = x_0$, $S(0) = S_0$ & $P(0) = P_0 = 0$. Εάν θεωρήσουμε την απλή κινητική Monod, οδηγούμαστε στις παρακάτω δύο εξισώσεις για την βιομάζα και το υπόστρωμα:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_{max} S x}{K_s + S}$$

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_{X/S}^{app}} \frac{\mu_{max} S x}{K_s + S}$$

Batch bioreactor: Αναλυτική λύση για κινητική Monod

Θεωρώντας τον φαινομενικό συντελεστή απόδοσης σταθερό, διαπιστώνουμε ότι για κάθε t ισχύει:

$$\frac{d(x_t + Y_{X/S}^{\text{app}} S_t)}{dt} = 0 \Rightarrow x_t + Y_{X/S}^{\text{app}} S_t = x_0 + Y_{X/S}^{\text{app}} S_0 \Leftrightarrow x_t - x_0 = + Y_{X/S}^{\text{app}} (S_0 - S_t)$$

Εκφράζοντας το x συναρτήσει του S και αντικαθιστώντας στο ισοζύγιο του S λαμβάνουμε,

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_{X/S}^{\text{app}}} \frac{\mu_{\max} S [x_0 + Y_{X/S}^{\text{app}} (S_0 - S)]}{K_S + S}$$

Η ανωτέρω εξίσωση μπορεί να λυθεί αναλυτικά, καταλήγοντας σε μία έμμεση συνάρτηση (implicit function) του S ως προς t :

$$\left[x_0 + Y_{X/S}^{\text{app}} (S_0 + K_S) \right] \ln \left[\frac{x_0 + Y_{X/S}^{\text{app}} (S_0 - S)}{x_0} \right] - K_S Y_{X/S}^{\text{app}} \ln \left[\frac{S}{S_0} \right] = m_{\max} \left[x_0 + Y_{X/S}^{\text{app}} S_0 \right] t$$

Και την βιομάζα από την σχέση

$$x(t) = x_0 + Y_{X/S}^{\text{app}} (S_0 - S(t))$$

Batch bioreactor: Κατανάλωση Υποστρώματος (S) & παραγωγή προϊόντος (P)

Εάν έχουμε και παραγωγή ενός προϊόντος που είναι μερικώς εξαρτημένο από τον ρυθμό ανάπτυξης (partially growth associated product formation), το ισοζύγιο μάζας για το προϊόν είναι:

$$\frac{dP}{dt} = q_P x = \lambda_1 \frac{\mu_{\max} Sx}{K_S + S} + \lambda_2 x, \quad P(0) = 0$$

και για το υπόστρωμα:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{\max} Sx}{K_S + S} - mx - \frac{1}{Y_{P/S}} \left(\lambda_1 \frac{\mu_{\max} Sx}{K_S + S} + \lambda_2 x \right), \quad S(0) = S_0$$

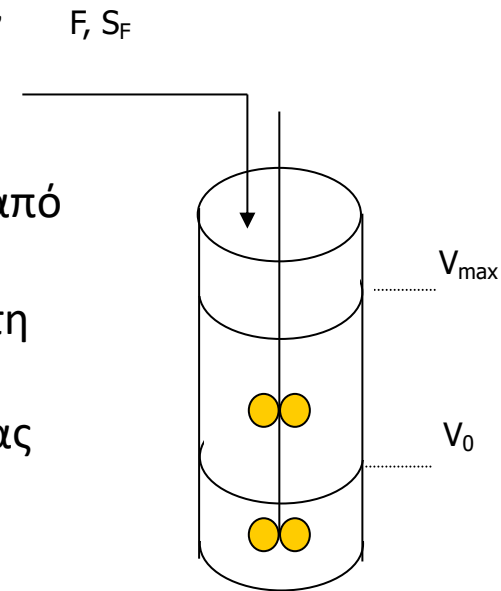
Οι παραπάνω εξισώσεις λύνονται συνήθως αριθμητικά με την βοήθεια Η/Υ. Η ολοκλήρωση ξεκινά από χρόνο $t=0$ έως ότου δεν υπάρχει άλλο υπόστρωμα ($S=0$).

Fed-batch Bioreactor: Βιοαντιδραστήρας Ημιδιαλείποντος Έργου

Η λειτουργία ενός βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου (batch) μπορεί να γίνει μόνο σε συνθήκες μεγίστου ρυθμού ανάπτυξης ($\mu \approx \mu_{\max}$). Εάν θέλουμε η ανάπτυξη να γίνει σε κάποιο μικρότερο μ , πρέπει να καταφύγουμε σε άλλου τύπου βιοαντιδραστήρα.

Σε βιοαντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch) ξεκινάμε από ένα μικρό όγκο (V_0) όπου έχουμε προσθέσει όλα τα απαιτούμενα θρεπτικά υλικά εκτός ενός, που είναι συνήθως η πηγή άνθρακα. Στη συνέχεια προσθέτουμε μικρές ποσότητες διαλύματος γλυκόζης (ή γενικότερα πηγής άνθρακος) και σιγά-σιγά ο όγκος της καλλιέργειας αυξάνει από $V=V_0$ μέχρι $V=V_{\max}$ οπότε και η τροφοδοσία σταματά.

Γενικά όσο πιο σιγά προσθέτουμε θρεπτικό υλικό τόσο πιο μικρός παραμένει ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης.



Συνολικό ισοζύγιο μάζας

Εάν ορίσουμε σαν F την ογκομετρική παροχή στον βιοαντιδραστήρα [L/h] και σαν ρ την πυκνότητα, το συνολικό ισοζύγιο μάζας είναι:

$$\frac{d(\mu\alpha\zeta\alpha \text{ εντος βιοαν} / \rho\alpha)}{dt} = (\rho\upsilon\theta\mu\omicron\varsigma \text{ εισερχομενης } \mu\alpha\zeta\alpha\varsigma) - 0 \Rightarrow \frac{d(\rho V)}{dt} = \rho_F F$$

Θεωρώντας ότι η πυκνότητα παραμένει σταθερή και $\rho = \rho_F$, το ισοζύγιο συνολικής μάζας γίνεται ουσιαστικά ισοζύγιο όγκου,

$$\frac{dV}{dt} = F$$

$$\mu\epsilon \quad V(0) = V_0 \quad \pi.\chi., \text{ εάν } F = \text{const} \Rightarrow V(t) = V_0 + Ft$$

Ισοζύγιο βιομάζας

Το ισοζύγιο βιομάζας (θεωρώντας ότι η συγκέντρωση βιομάζας στην τροφοδοσία είναι μηδέν, $x_F=0$) έχει ως εξής:

$$\frac{d(xV)}{dt} = r_x V \Rightarrow V \frac{dx}{dt} + x \frac{dV}{dt} = \mu x V \Rightarrow$$

$$V \frac{dx}{dt} + xF = \mu x V \Rightarrow \frac{dx}{dt} = \left(\mu - \frac{F}{V} \right) x \Rightarrow \frac{dx}{dt} = (\mu - D) x$$

όπου $D=F/V$ [h^{-1}] είναι ο **ρυθμός αραιώσης** (dilution rate).

Ισοζύγιο υποστρώματος & προϊόντος

Το **ισοζύγιο υποστρώματος**, θεωρώντας ότι η συγκέντρωση του υποστρώματος στην τροφοδοσία είναι S_F [mol/L ή g/L], έχει ως εξής:

$$\frac{d(SV)}{dt} = S_F F - 0 + r_s V \Rightarrow V \frac{dS}{dt} = S_F F - q_s x V - SF \Rightarrow$$

$$\frac{dS}{dt} = (S_F - S) \frac{F}{V} - q_s x \Rightarrow \boxed{\frac{dS}{dt} = (S_F - S)D - q_s x}$$

Για το **ισοζύγιο προϊόντος** υποθέτουμε ότι η συγκέντρωση στην τροφοδοσία είναι μηδέν ($P_F=0$) με παρόμοιο τρόπο καταλήγουμε στην διαφορική εξίσωση

$$\frac{dP}{dt} = q_p x - \frac{F}{V} P \Rightarrow \boxed{\frac{dP}{dt} = q_p x - DP}$$

Εκτός των **αρχικών συνθηκών** στον βιοαντιδραστήρα (x_0 , S_0 και V_0), ο μηχανικός παραγωγής ή ο πειραματιστής έχει την δυνατότητα να διαλέξει την **παροχή της τροφοδοσίας**, F , και την **συγκέντρωση υποστρώματος στην τροφοδοσία**, S_F .

Στρατηγική Τροφοδοσίας (Feeding strategy)

Χρησιμοποιώντας την κατάλληλη κινητική για τους ειδικούς ρυθμούς (μ , q_p και q_s) μπορούμε να ολοκληρώσουμε τις 4 διαφορικές εξισώσεις και να υπολογίσουμε τις μεταβλητές $x(t)$, $S(t)$, $P(t)$ και $V(t)$ συναρτήσει του χρόνου.

Συνήθως είναι επιθυμητό να γίνει η ανάπτυξη των κυττάρων με τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης σταθερό και ίσο με κάποια επιθυμητή τιμή (set point), $\mu = \mu^{sp}$.

Ανεξάρτητα από την κινητική έκφραση, εάν απλά θεωρήσουμε ότι $\mu = \mu(S)$, σταθερό μ συνεπάγεται σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος, δηλ., $S(t) = \text{const.} = S^{sp}$.

Εάν έχουμε $S(t) = S^{sp}$, η διαφορική εξίσωση για το ισοζύγιο υποστρώματος γίνεται:

$$0 = (S_F - S^{sp}) \frac{F}{V} - q_s x \quad \Rightarrow \quad 0 = (S_F - S^{sp}) \frac{F}{V} - \frac{\mu^{sp}}{Y_{X/S}^{app}} x \quad \Rightarrow$$

$$\frac{F}{V} = D = \frac{\mu^{sp}}{Y_{X/S}^{app} (S_F - S^{sp})} x$$

Στρατηγική Τροφοδοσίας (Feeding strategy)

Επομένως για να έχουμε σταθερό μ , ο ρυθμός αραίωσης (D) θα πρέπει να είναι ανάλογος της συγκέντρωσης της βιομάζας, $x(t)$. Αντικαθιστώντας τον ρυθμό αραίωσης (D) στο ισοζύγιο βιομάζας, έχουμε,

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D)x \Rightarrow \frac{dx}{dt} = \left(\mu^{sp} - \frac{\mu^{sp}x}{Y_{X/S}^{app}(S_F - S^{sp})} \right)x \Rightarrow \frac{dx}{dt} = \mu^{sp}x - \beta\mu^{sp}x^2$$

$$\beta = \frac{1}{Y_{X/S}^{app}(S_F - S^{sp})} = \text{const.}$$

Ολοκλήρωση της διαφορικής εξίσωσης με αρχική συνθήκη $x(0)=x_0$ μας δίνει,

$$x(t) = \frac{x_0 e^{\mu^{sp}t}}{1 - \beta x_0 (1 - e^{\mu^{sp}t})}$$

Για να έχουμε αυτή την καμπύλη ανάπτυξης για το $x(t)$ (όπου $\mu=\mu^{sp}$ καθ' όλη την διάρκεια) η τροφοδοσία θα πρέπει να είναι:

$$\frac{F}{V} = \frac{\mu^{sp}}{Y_{X/S}^{app}(S_F - S^{sp})}x = \beta m^{sp} \frac{x_0 e^{\mu^{sp}t}}{1 - \beta x_0 (1 - e^{\mu^{sp}t})} \Rightarrow F(t) = \frac{\beta \mu^{sp} x_0 e^{\mu^{sp}t}}{1 - \beta x_0 (1 - e^{\mu^{sp}t})} V(t)$$

Λειτουργία σε ψευδομόνιμες συνθήκες (QSS)

Θεωρούμε ότι είμαστε σε συνθήκες ψευδομόνιμης κατάστασης όταν όλες οι άλλες μεταβλητές παραμένουν σταθερές εκτός από τον όγκο που συνεχώς αυξάνεται.

Εάν θεωρήσουμε ότι η συγκέντρωση βιομάζας είναι σταθερή και ίση με την επιθυμητή, δηλ., $x(t) = x^{qss}$ και $S(t) = S^{qss}$, τα ισοζύγια μάζας γίνονται:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} = 0 &\Rightarrow (\mu^{qss} - D)x^{qss} = 0 \Rightarrow D = \mu^{qss} \\ \frac{dS}{dt} = 0 &\Rightarrow (S_F - S^{qss})D - q_S^{qss}x^{qss} = 0 \Rightarrow S_F = S^{qss} + \frac{q_S^{qss}x^{qss}}{D} \end{aligned}$$

Επομένως, από τον επιθυμητό ρυθμό ανάπτυξης, μ^{qss} , βρίσκουμε τον ρυθμό αραίωσης (D) που πρέπει να χρησιμοποιήσουμε. Στη συνέχεια με βάση την επιθυμητή συγκέντρωση βιομάζας, x^{qss} , βρίσκουμε την απαιτούμενη συγκέντρωση υποστρώματος S_F που πρέπει να χρησιμοποιήσουμε στην τροφοδοσία.

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις για ένα ή περισσότερα προϊόντα ορίζονται από τα αντίστοιχα ισοζύγια μάζας, π.χ., για το P έχουμε,

$$\frac{dP}{dt} = 0 \Rightarrow q_P^{qss}x^{qss} - DP^{qss} = 0 \Rightarrow P^{qss} = \frac{q_P^{qss}x^{qss}}{D}$$

Μεγιστοποίηση του παραγόμενου προϊόντος

Η τελευταία σχέση είναι πολύ σημαντική διότι μας κατευθύνει προς την σωστή επιλογή των συνθηκών ανάπτυξης. Για την ακρίβεια συνήθως επιζητούμε μεγιστοποίηση του παραγόμενου προϊόντος, δηλ. $\max \{V_f \cdot P^{qss}\}$

$$P^{qss} = \frac{q_p^{qss} x^{qss}}{\mu^{qss}}$$

Αυτό μπορούμε να το επιτύχουμε:

- (α) με την μεγιστοποίηση του x^{qss} . Πρακτικά τούτο σημαίνει ότι διαλέγουμε τη μέγιστη δυνατή συγκέντρωση που δεν έχουμε προβλήματα οξυγόνωσης της καλλιέργειας.
- (β) με την ελαχιστοποίηση του μ^{qss} .
- (γ) με την μεγιστοποίηση του q_p^{qss} .

Τα δύο τελευταία δεν είναι ανεξάρτητα. Γενικά η επιλογή του μ^{qss} γίνεται ώστε αφενός το να είναι κοντά στην μέγιστη δυνατή τιμή του και αφετέρου ο ρυθμός αραίωσης, $D = \mu^{qss}$, να μην είναι πολύ μικρός διότι ο συνολικός χρόνος της καλλιέργειας θα είναι εξαιρετικά μεγάλος (και η παραγωγικότητα του συστήματος θα είναι πολύ χαμηλή)

Fed batch: Γενικές παρατηρήσεις

Μεταβολή Όγκου Βιοαντιδραστήρα: Εάν τροφοδοτούμε την καλλιέργεια με σταθερό D , ο όγκος στον βιοαντιδραστήρα αυξάνεται εκθετικά.

$$\frac{dV}{dt} = F \quad \& \quad D = \frac{F}{V} \quad \Rightarrow \quad \frac{dV}{dt} = DV \quad \Rightarrow \quad V(t) = V_0 e^{Dt} \quad \& \quad F(t) = DV_0 e^{Dt}$$

Ανάπτυξη Βιομάζας: Παρόλο που η συγκέντρωση της βιομάζας είναι σταθερή, $x(t) = x^{qss}$, η συνολική ποσότητα της βιομάζας αυξάνεται εκθετικά συναρτήσει του χρόνου.

$$X(t) = x^{qss} \cdot V(t) \quad \Rightarrow \quad X(t) = x^{qss} V_0 e^{Dt} \quad \Rightarrow \quad X(t) = X_0 e^{Dt}$$

Fed batch: Γενικές παρατηρήσεις

Χρονική Διάρκεια Τροφοδοσίας: Η χρονική περίοδος που γίνεται η τροφοδοσία του βιοαντιδραστήρα είναι συνάρτηση του αρχικού και του τελικού όγκου. Η τροφοδοσία σταματά μόλις ο βιοαντιδραστήρας γεμίσει. Εάν ο ρυθμός αραίωσης είναι σταθερός, ο χρόνος μπορεί να υπολογιστεί από την σχέση:

$$V(t) = V_0 e^{Dt} \quad \Rightarrow \quad V_f = V_0 e^{Dt_f} \quad \Rightarrow$$

$$t_f = \frac{1}{D} \ln\left(\frac{V_f}{V_0}\right)$$

Ο τελικός όγκος, V_f , είναι συχνά και ο μέγιστος όγκος λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα, $V_{\max}$, (maximum working volume). Ο λόγος V_f/V_0 κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 3 και 5.

Παραδείγματος χάρη, αν θεωρήσουμε μία μυκητο-καλλιέργεια για παραγωγή αντιβιοτικών όπου $D = \mu^{qss} = 0.015 \text{ h}^{-1}$, ο χρόνος τροφοδοσίας είναι $t_f = 73 - 107 \text{ h}$.

Fed batch: Γενικές παρατηρήσεις

Παραγωγικότητα Διεργασίας: Η παραγωγικότητα είναι ένας σημαντικός δείκτης μιας διεργασίας ημιδιαλείποντος έργου. Η παραγωγικότητα ορίζεται για παραγωγή βιομάζας και για παραγωγή προϊόντος και δίνονται αντίστοιχα από τις σχέσεις:

$$\eta_x = \frac{x_f V_f - x_0 V_0}{V_f t_{\text{total}}}$$

[g - cells / (L · h)]

και

$$\eta_P = \frac{P_f V_f - P_0 V_0}{V_f t_{\text{total}}}$$

[g - product / (L · h)]

όπου

$$t_{\text{total}} = t_{\text{sterilization}} + t_{\text{lag}} + t_{\text{feeding}} + t_{\text{batch_end}} + t_{\text{clean-up}}$$

Μετά το τέλος της τροφοδοσίας, δεν σταματά η διεργασία αμέσως. Συνήθως την αφήνουμε να συνεχίσει σαν αντιδραστήρας διαλείποντος έργου ώστε να καταναλωθεί ό το υπόστρωμα βρίσκεται στον αντιδραστήρα στο τέλος της τροφοδοσίας.

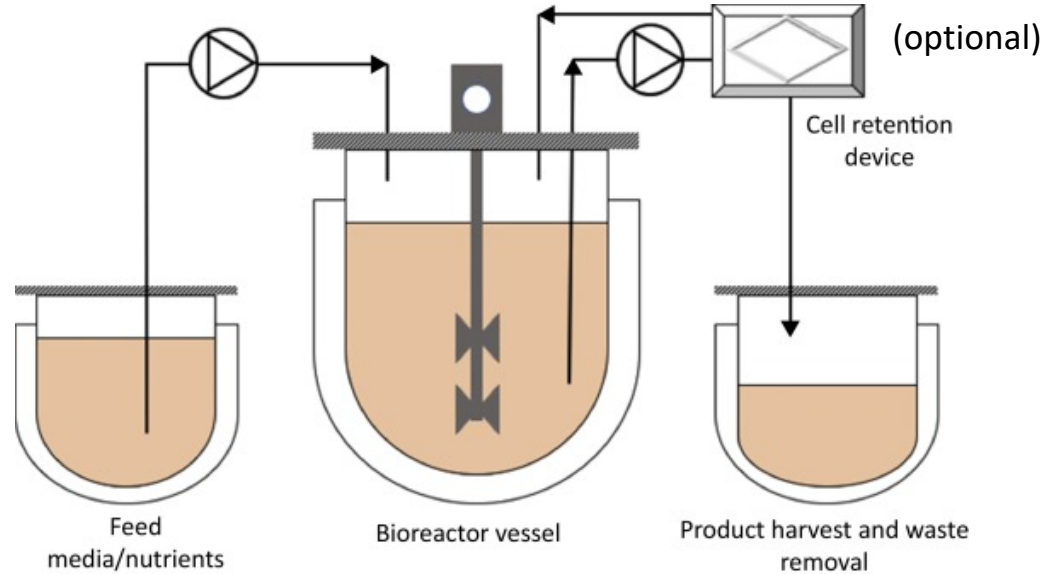
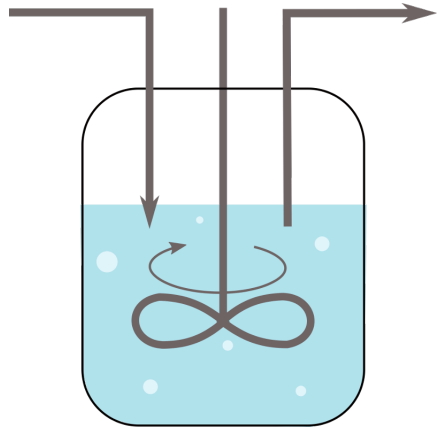
Βιοαντιδραστήρας Συνεχούς Λειτουργίας (CSTBR)

Η λειτουργία ενός βιοαντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας μπορεί να γίνει σε **μόνιμες συνθήκες** όπου οι συγκεντρώσεις όλων των χημικών ενώσεων παραμένουν σταθερές συναρτήσει του χρόνου. Γι' αυτό το λόγο συχνά χρησιμοποιείται η ονομασία «**χημοστάτης**» (**chemostat**).

Υπενθυμίζεται ότι κάνουμε την παραδοχή ότι ο βιοαντιδραστήρας αυτός είναι **πολύ καλά αναμεμειγμένος** (continuous-stirred tank bioreactor, CSTR, CSTBR) και επομένως η **θερμοκρασία και η συγκέντρωση είναι παντού η ίδια** μέσα στον βιοαντιδραστήρα.

Σαν συνέπεια, η **συγκέντρωση στην έξοδο θεωρείται ότι είναι ίδια με την συγκέντρωση εντός του βιοαντιδραστήρα**.

Σχηματικό διάγραμμα

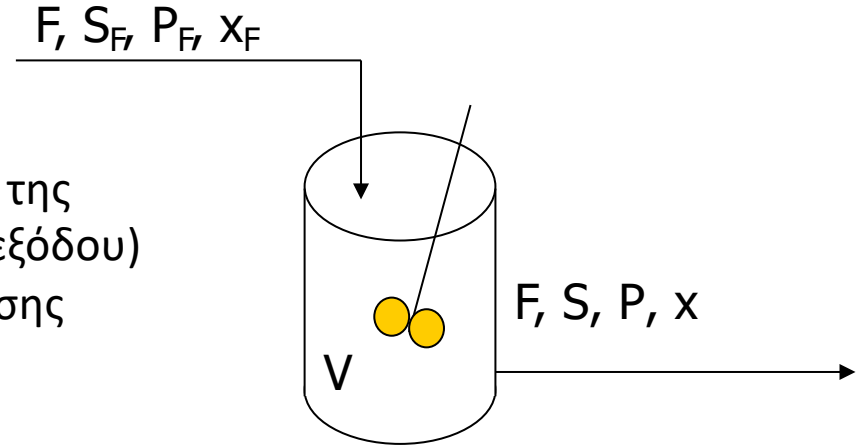




Αντλίες θρεπτικών (IN),
Αντλίες προϊόντων (OUT)
Αντλίες για ρύθμιση pH

CSTBR – ισοζύγιο S

Θεωρώντας ότι η ογκομετρική παροχή [L/h] της τροφοδοσίας (εισόδου) και της απορροής (εξόδου) είναι ίδια ($F_{in}=F_{out}=F$), ο όγκος της υγρής φάσης παραμένει σταθερός ($V=const$).



Το ισοζύγιο μάζας για το υπόστρωμα (S) έχει ως εξής:

$$\frac{d(SV)}{dt} = S_F F - S F + r_s V \Rightarrow V \frac{dS}{dt} = (S_F - S) F - q_s x V \Rightarrow$$

$$\frac{dS}{dt} = (S_F - S) \frac{F}{V} - q_s x \Rightarrow \boxed{\frac{dS}{dt} = (S_F - S) D - q_s x}$$

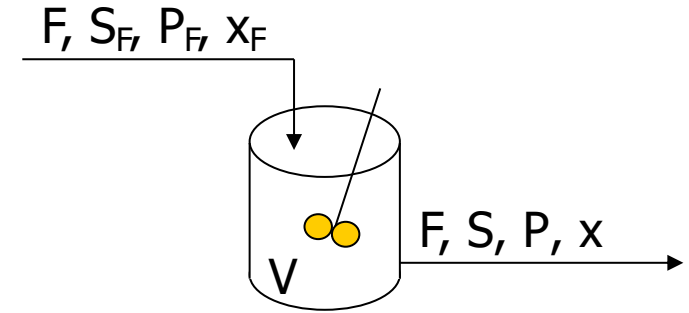
όπου $D=(F/V)$ είναι ο ρυθμός αραίωσης (dilution rate) [h^{-1}] και είναι το αντίστροφο του χρόνου παραμονής (residence time), $\tau=V/F$ [h].

CSTBR – ισοζύγιο x & P

Το ισοζύγιο μάζας για την βιομάζα (x) είναι:

$$\frac{d(xV)}{dt} = x_F F - xF + r_x V \Rightarrow V \frac{dx}{dt} = (x_F - x)F + \mu x V \Rightarrow$$

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D)x + x_F D$$



Το ισοζύγιο μάζας για το προϊόν (P) είναι:

$$\frac{d(PV)}{dt} = P_F F - PF + r_P V \Rightarrow V \frac{dP}{dt} = (P_F - P)F + q_P x V \Rightarrow$$

$$\frac{dP}{dt} = (P_F - P) \frac{F}{V} + q_P x \Rightarrow \frac{dP}{dt} = (P_F - P)D + q_P x$$

CSTBR – ισοζύγιο x & P

Πολύ συχνά έχουμε μόνο παροχή υποστρώματος στην τροφοδοσία ($x_F = P_F = 0$) και τα ισοζύγια βιομάζας και προϊόντος απλοποιούνται περαιτέρω,

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D)x$$

$$\frac{dP}{dt} = q_P x - PD$$

Οι εξισώσεις είναι «ίδιες» με αυτές από λειτουργία Fed-batch.

Λειτουργία υπό μόνιμες συνθήκες (steady-state operation)

Συνήθως η λειτουργία ενός CSTR γίνεται κάτω από μόνιμες συνθήκες, και επομένως:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dx}{dt} = \frac{dP}{dt} = 0$$

Τα ισοζύγια μάζας απλοποιούνται στις παρακάτω αλγεβρικές εξισώσεις:

$$(S_F - S)D - q_S x = 0 \quad \Rightarrow \quad S = S_F - \frac{q_S x}{D}$$

$$(\mu - D)x + x_F D = 0 \quad \Rightarrow \quad \mu = D - \frac{x_F}{x} D$$

$$(P_F - P)D + q_P x = 0 \quad \Rightarrow \quad P = P_F + \frac{q_P x}{D}$$

Λειτουργία υπό μόνιμες συνθήκες (steady-state operation)

Όταν έχουμε στείρα τροφοδοσία ($x_F = 0$) και χωρίς εισερχόμενο προϊόν ($P_F = 0$), τα ισοζύγια βιομάζας και προϊόντος απλοποιούνται περαιτέρω,

$$P = \frac{q_P x}{D}$$

και

$$\mu = D$$

Κατά την λειτουργία ενός χημοστάτη σε μόνιμες συνθήκες, ο ρυθμός απομάκρυνσης της βιομάζας με την απορροή είναι ίσος με τον ρυθμό ανάπτυξης νέων κυττάρων.

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης βιομάζας είναι ίσος με τον ρυθμό αραίωσης και επομένως έχουμε **την δυνατότητα να χειριζόμαστε το μ κατά βούληση**. Αυτό καθιστά τον χημοστάτη ένα πολύ σημαντικό πειραματικό εργαλείο για την μελέτη της κινητικής ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Υπολογισμός Μόνιμης Κατάστασης με Κινητική Monod

Αν θεωρήσουμε ότι έχουμε κινητική Monod, τότε από την σχέση $\mu=D$ υπολογίζουμε την συγκέντρωση του περιοριστικού υποστρώματος,

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} = D \quad \Rightarrow \quad S^{ss} = \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D}$$

αν επίσης θεωρήσουμε ότι ο ειδικός ρυθμός ανάλωσης υποστρώματος είναι

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}^{app}}$$

τότε έχουμε

$$S = S_F - \frac{q_S X}{D} \quad \Rightarrow \quad X = (S_F - S) Y_{X/S}^{app} \quad \Rightarrow \quad X^{ss} = \left(S_F - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \right) Y_{X/S}^{app}$$

Υπολογισμός Μόνιμης Κατάστασης με Κινητική Monod

Αντίστοιχα, αν θεωρήσουμε ότι έχουμε μερικώς συσχετιζόμενο ειδικό ρυθμό παραγωγής προϊόντος,

$$q_p = \lambda_1 \mu + \lambda_2$$

η συγκέντρωση του παραγόμενου προϊόντος υπό σταθερές συνθήκες είναι:

$$P = \frac{q_p X}{D} \Rightarrow P^{ss} = \frac{(\lambda_1 D + \lambda_2)}{D} \left(S_F - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \right) Y_{X/S}^{app}$$

Οι τιμές των τριών μεταβλητών (x^{ss}, S^{ss}, P^{ss}) που υπολογίστηκαν θα αντιπροσωπεύουν πραγματικές συνθήκες λειτουργίας σε μόνιμες συνθήκες μόνον εάν η λειτουργία είναι *ευσταθής*.

Συνθήκες ευσταθούς λειτουργίας με κινητική Monod

Η σχετική ανάλυση ευσταθείας (με κινητική Monod) μας οδηγεί στα κάτωθι συμπεράσματα για την ευστάθεια της μόνιμης κατάστασης:

1. Έχουμε ευσταθή λειτουργία όταν ο ρυθμός αραίωσης είναι:

$$D < D_{\max} = \frac{\mu_{\max} S_F}{K_S + S_F}$$

και οι μόνιμες συνθήκες δίνονται από τις προηγούμενες εκφράσεις.

2. Έχουμε «έκπλυση» (wash-out) όταν ο ρυθμός αραίωσης είναι: $D > D_{\max}$.
Υπό συνθήκες έκπλυσης οι μόνιμες συνθήκες είναι: $x=0$, $P=0$, $S=S_F$.

Λειτουργία σε Συνθήκες Μέγιστης Παραγωγικότητας

Μέγιστη παραγωγή βιομάζας

Ο ρυθμός της παραγόμενης βιομάζας (που εξέρχεται από τον βιοαντιδραστήρα) είναι

$$x \cdot F \quad [\text{g-cells/h}]$$

ή καλύτερα αν εκφραστεί ανά μονάδα όγκου αντιδραστήρα,

$$x \frac{F}{V} \equiv x \cdot D \quad [\text{g-cells}/(\text{h} \cdot \text{L})]$$

Μεγιστοποίηση της παραγόμενης βιομάζας (που είναι στην συγκεκριμένη περίπτωση ο δείκτης απόδοσης, Performance Index) επιτυγχάνεται όταν ο ρυθμός αραίωσης παίρνει την τιμή D^* ώστε να ισχύει η συνθήκη,

$$\frac{d(xD)}{dD} = 0 \quad \Rightarrow \quad \frac{d}{dD} \left(\left(S_F - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \right) Y_{X/S}^{\text{app}} D \right) = 0 \quad \Rightarrow \quad D^* = \mu_{\max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + S_F}} \right)$$

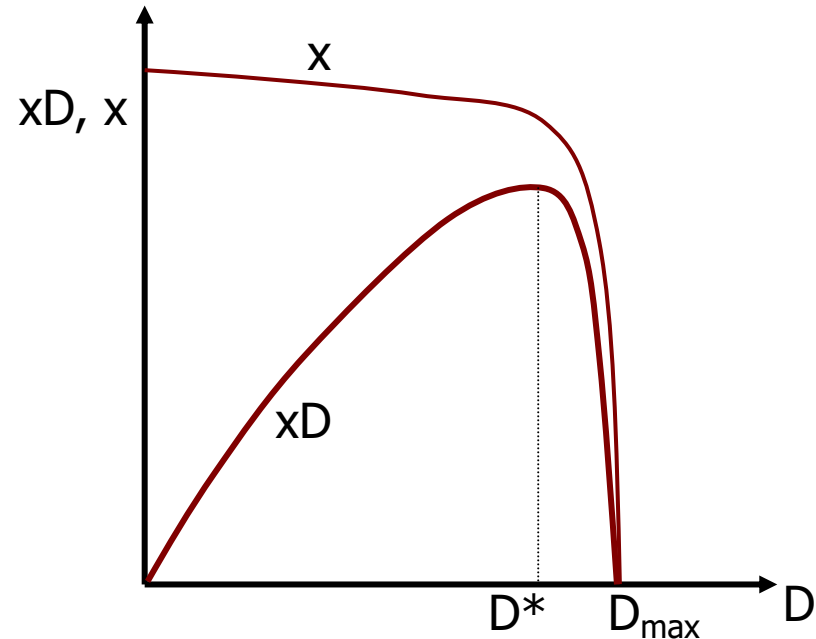
Λειτουργία σε Συνθήκες Μέγιστης Παραγωγικότητας

Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας

Σε αυτή την περίπτωση αντί του $x \cdot D$ επιδιώκουμε την μεγιστοποίηση του x . Δεδομένου ότι η σχέση του x ως προς D μεταβάλλεται μονοτονικά, η μέγιστη τιμή του x αντιστοιχεί σε μηδενική τροφοδοσία, $D=0$. Με άλλα λόγια, όταν μειώνουμε τον ρυθμό αραίωσης αυξάνεται μεν η συγκέντρωση βιομάζας, αλλά μειώνεται η παραγωγικότητα. Επομένως διαλέγουμε

$$D^* = D_{\min}$$

όπου το $D_{\min}$ αντιστοιχεί στην μέγιστη τιμή του x σε μία ανεκτή παραγωγικότητα xD .



Λειτουργία σε Συνθήκες Μέγιστης Παραγωγικότητας

Μέγιστη παραγωγή προϊόντος

Κατά αναλογία με τα προηγούμενα, ζητάμε τον ρυθμό αραίωσης που αντιστοιχεί στην μέγιστη τιμή του παραγόμενου προϊόντος ανά μονάδα όγκου του χημοστάτη ($P \cdot D$). Ο ρυθμός αραίωσης παίρνει την τιμή D^* ώστε να ισχύει η συνθήκη,

$$\frac{d(PD)}{dD} = 0 \quad \Rightarrow \quad \frac{d}{dD} \left(\frac{(\lambda_1 D + \lambda_2)}{D} \left(S_F - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \right) Y_{X/S}^{\text{app}} D \right) = 0 \quad \Rightarrow$$

$$\frac{d}{dD} \left((\lambda_1 D + \lambda_2) \left(S_F - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \right) Y_{X/S}^{\text{app}} \right) = 0$$

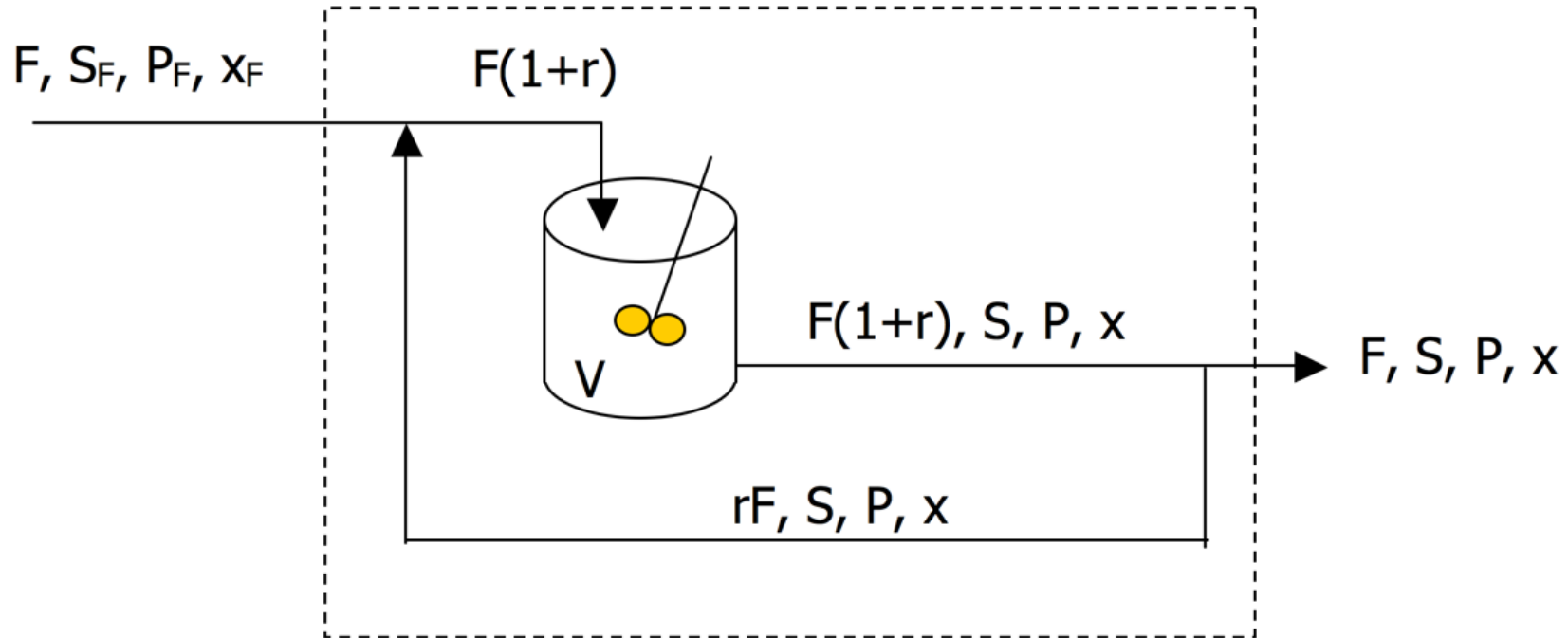
α) όταν $\lambda_2 = 0$ (δηλ. έχουμε παραγωγή συσχετιζόμενη με την ανάπτυξη βιομάζας), το D^* είναι το ίδιο με εκείνο που αντιστοιχεί σε μέγιστη παραγωγή βιομάζας,

$$D^* = \mu_{\max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + S_F}} \right)$$

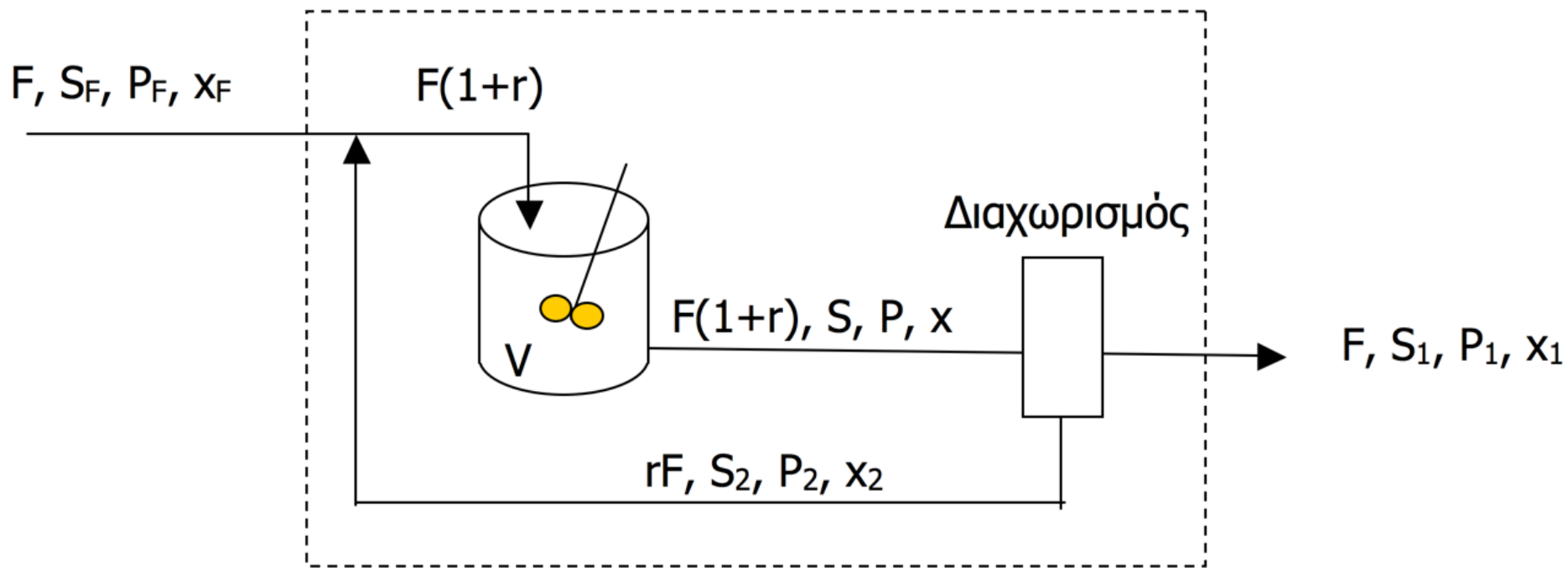
β) όταν $\lambda_1 = 0$ (δηλ. έχουμε παραγωγή μη συσχετιζόμενη με την ανάπτυξη βιομάζας), το D^* είναι το ίδιο με εκείνο που αντιστοιχεί σε μεγιστοποίηση του x στην έξοδο, $D^* = D_{\min}$

Βιοαντιδραστήρας Συνεχούς Λειτουργίας με Επαναφορά

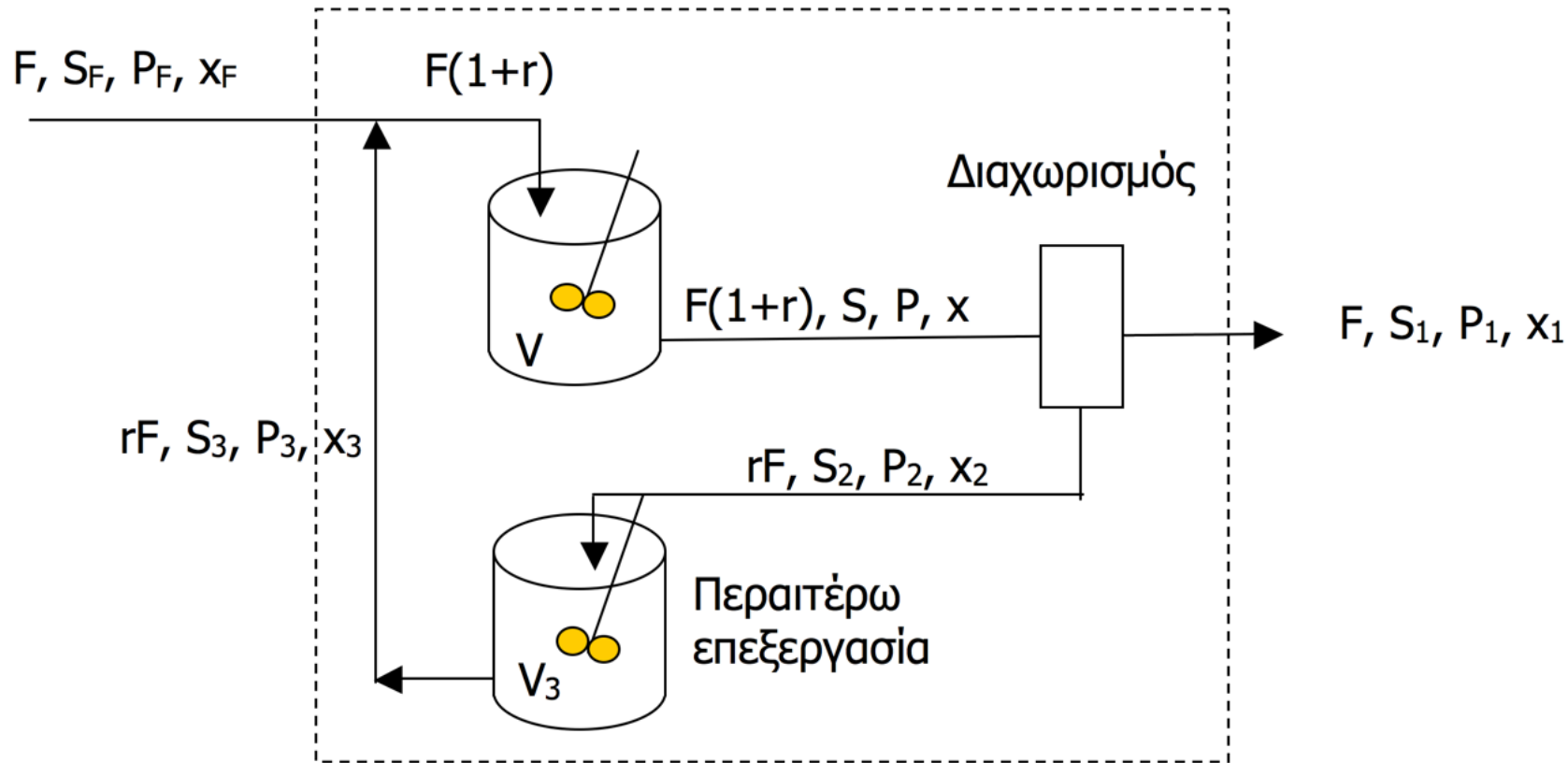
Ο ρυθμός αραίωσης δεν μπορεί να αυξηθεί πολύ διότι έχουμε έκπλυση (wash-out). Ένας απλός τρόπος επίλυσης του προβλήματος είναι με την επαναφορά ενός ποσοστού της απορροής. Σχηματικά μπορούμε να έχουμε τις παρακάτω περιπτώσεις:



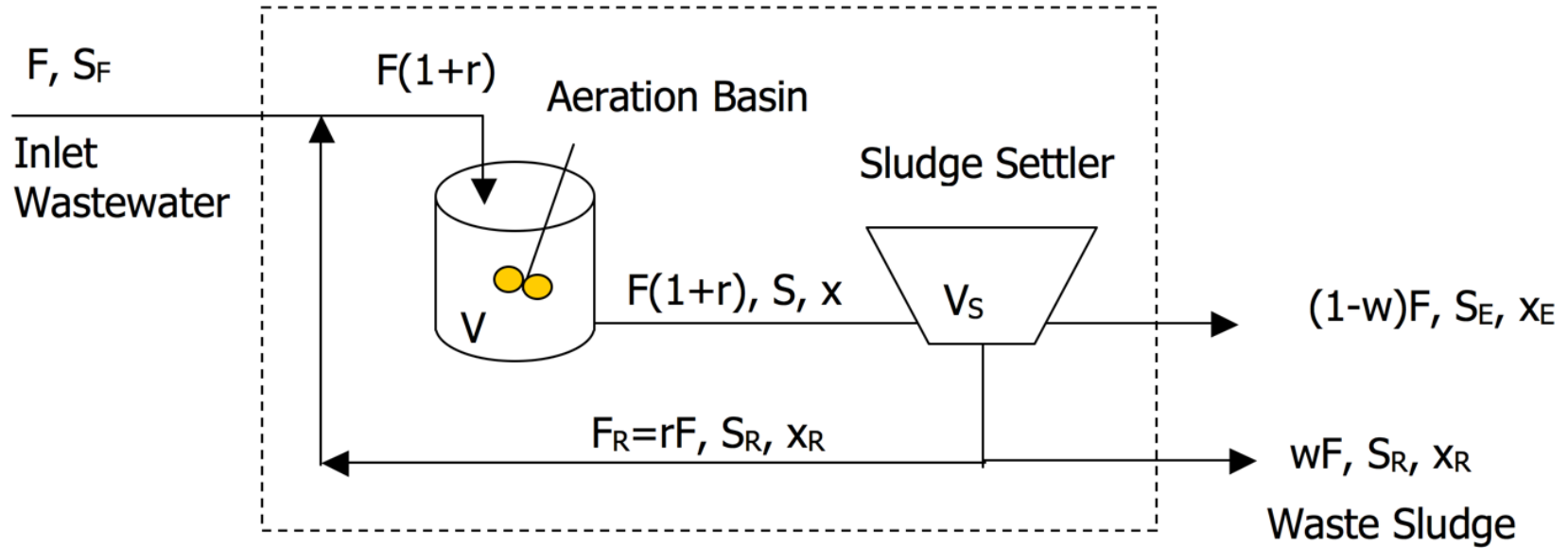
Βιοαντιδραστήρας Συνεχούς Λειτουργίας με Επαναφορά



Βιοαντιδραστήρας Συνεχούς Λειτουργίας με Επαναφορά



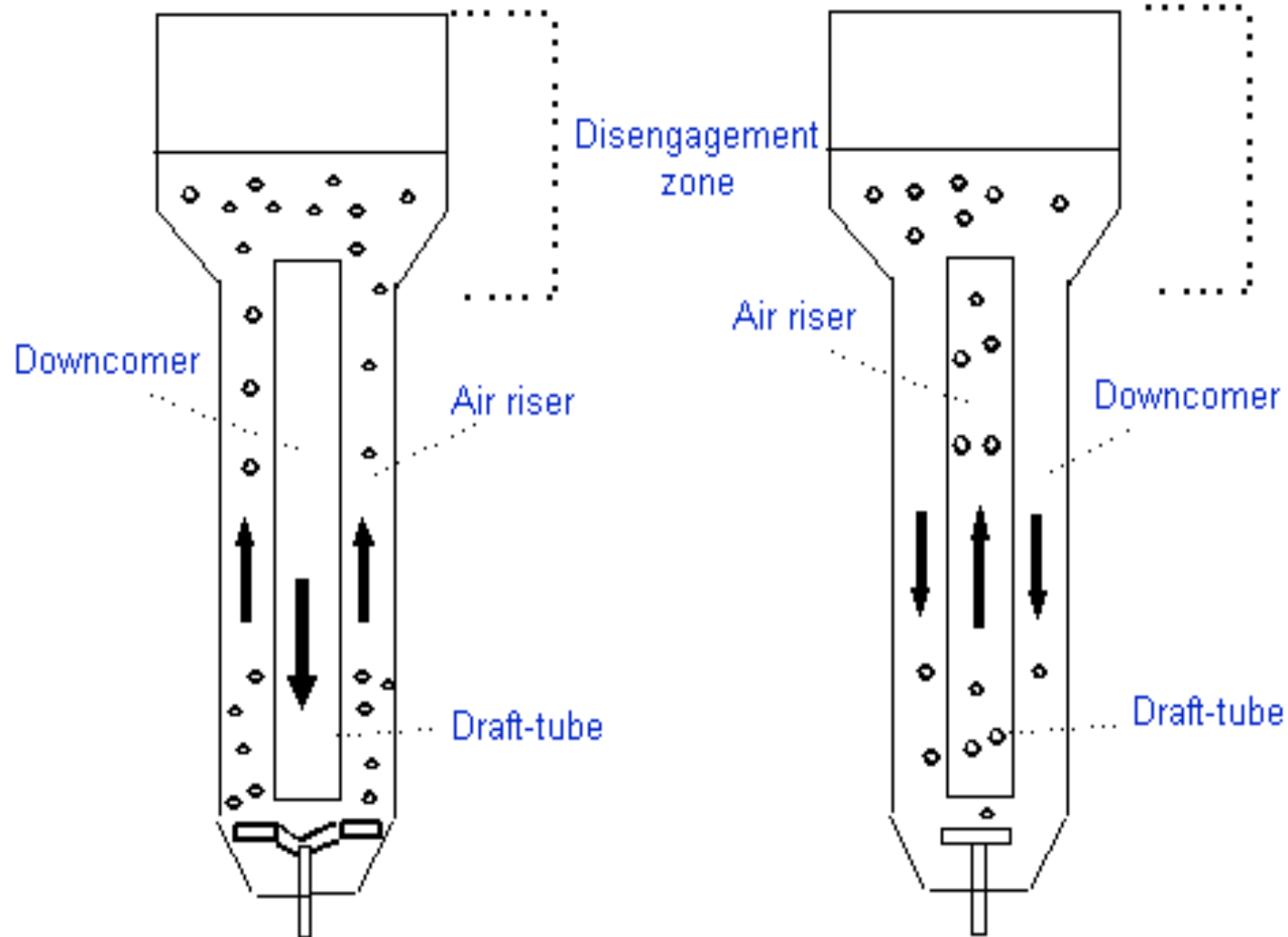
Εφαρμογή στο Activated Sludge Process



$$\left(\frac{F}{V} \right)_{\max} = \left(\frac{r + w}{w(1+r)} \right) \mu_{\max}$$

Το σημείο όπου έχουμε έκπλυση είναι όταν ο φαινομενικός ρυθμός αραίωσης προσεγγίζει το $D_{\max}$, το οποίο για τυπικές τιμές του r & w μας δίνει ότι δεν θα έχουμε έκπλυση όταν ο ρυθμός αραίωσης είναι μικρότερος του **14,13** $\mu_{\max}$ (που είναι πολύ παραπάνω από την τιμή για ένα απλό χημοστάτη).

Βιοαντιδραστήρες τύπου Airlift



Οξυγόνωση και Ανάδευση Βιοαντιδραστήρων

Ανεξάρτητα με το είδους του βιοαντιδραστήρα που έχουμε (π.χ., διαλείποντος έργου, ημιδιαλείποντος έργου ή συνεχούς λειτουργίας), εάν πρόκειται να αναπτύξουμε αερόβιους μικροοργανισμούς είμαστε υποχρεωμένοι να έχουμε συνεχή παροχή αέρος (ή οξυγόνου) στον βιοαντιδραστήρα ώστε να μπορούμε να διατηρήσουμε την συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στην υγρή φάση σταθερή.

Συνήθως προσπαθούμε να διατηρήσουμε το ποσοστό διαλυμένου οξυγόνου (D.O.) από 25% έως 70% της τιμής κορεσμού.

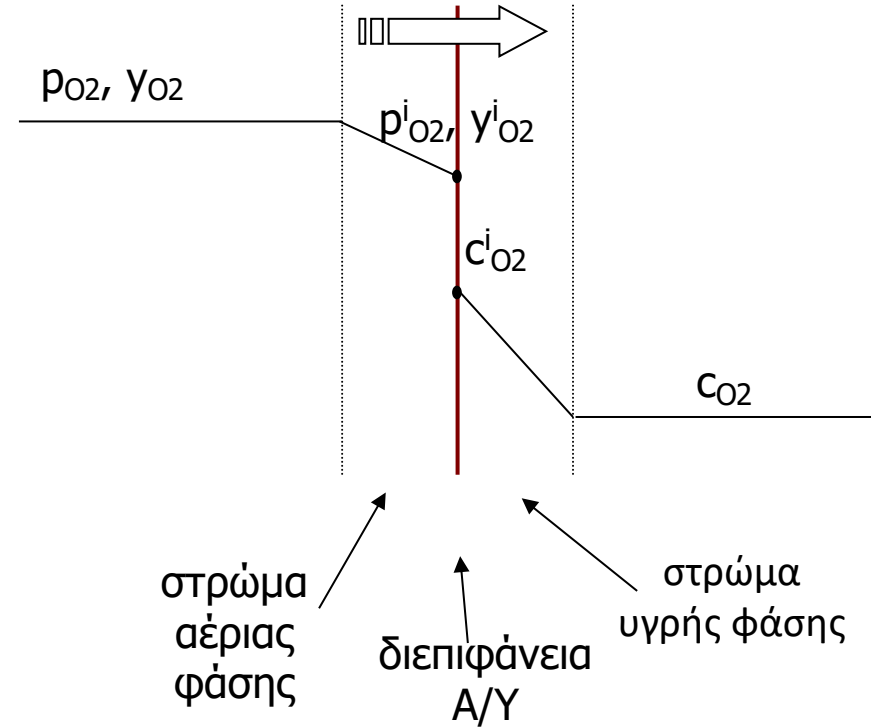
ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΜΑΖΑΣ ΑΠΟ ΑΕΡΙΑ ΣΕ ΥΓΡΗ ΦΑΣΗ (Gas-Liquid Mass Transfer)

Όταν σε μία από τις δύο φάσεις (π.χ., την υγρή) έχουμε κατανάλωση του O_2 , και επομένως η συγκέντρωση είναι χαμηλότερη του, τότε έχουμε μεταφορά μάζας από την άλλη φάση (δηλ. από την αέριο φάση στην υγρή).

Η ρυθμός μεταφορά μάζας ανά μονάδα επιφανείας (flux, J_{O_2}) μεταξύ δύο φάσεων μπορεί να υπολογιστεί από την θεωρία των δύο στρωμάτων (two film theory).

Δεδομένου ότι δεν υπάρχει συσσώρευση O_2 στα στρώματα έχουμε:

$$J_{O_2} = k_g(p_{O_2} - p_{O_2}^i) = k_L(c_{O_2}^i - c_{O_2})$$



ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΜΑΖΑΣ ΑΠΟ ΑΕΡΙΑ ΣΕ ΥΓΡΗ ΦΑΣΗ

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση ισορροπίας στην διεπιφάνεια,
Καταλήγουμε στην σχέση:

$$p_{O_2}^i = H \cdot c_{O_2}^i$$

$$J_{O_2} = \frac{\left(\frac{p_{O_2}}{H} - c_{O_2} \right)}{\left(\frac{1}{H \cdot k_g} + \frac{1}{k_L} \right)} \Rightarrow$$

$$J_{O_2} = K_L (c_{O_2}^* - c_{O_2})$$

ή

$$J_{O_2} = K_g (p_{O_2} - p_{O_2}^*)$$

όπου είναι η συγκέντρωση του O_2 στην υγρά φάση που βρίσκεται σε ισορροπία με την αέρια φάση, ενώ c_{O_2} είναι η συγκέντρωση O_2 στην υγρά φάση και K_L , K_g ,

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{H \cdot k_g} + \frac{1}{k_L}$$

και

$$\frac{1}{K_g} = \frac{1}{k_g} + \frac{H}{k_L}$$

Πολύ συχνά (σχεδόν πάντα στην περίπτωση βιοαντιδραστήρων) η αντίσταση στην μεταφορά μάζας στην αέρια φάση είναι αμελητέα σε σχέση με αυτή στην υγρά φάση ($p_{O_2}^i \approx p_{O_2}$), επομένως

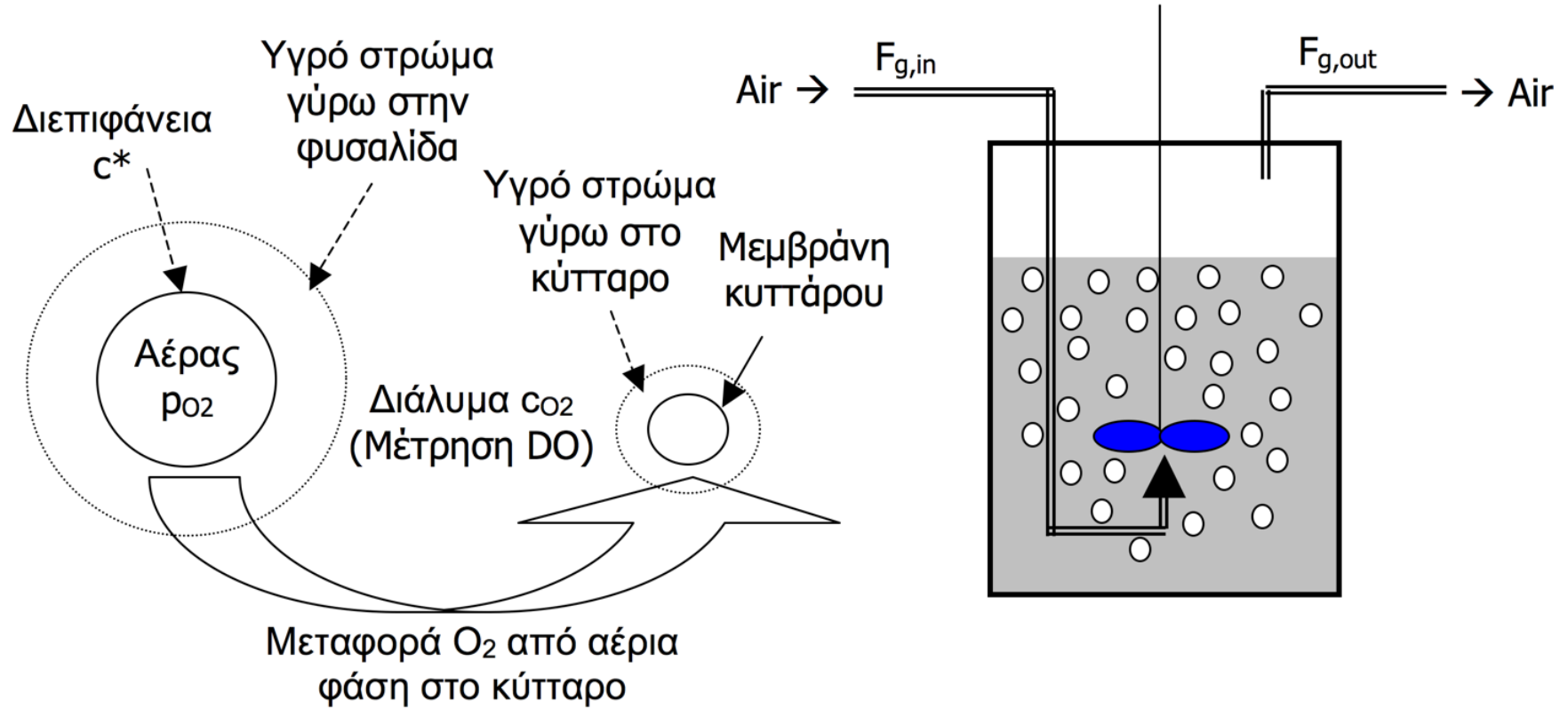
$$K_L \approx k_L$$

επομένως

$$J_{O_2} = k_L (c_{O_2}^* - c_{O_2})$$

[mg/(m²·h)] ή [mmol/(m²·h)]

Οξυγόνωση Βιοαντιδραστήρων (Gas-Liquid Mass Transfer)



Οξυγόνωση Βιοαντιδραστήρων (Gas-Liquid Mass Transfer)

Η οξυγόνωση ενός βιοαντιδραστήρα γίνεται συνήθως με την συνεχή παροχή αέρος που περνά μέσα από την υγρή φάση υπό μορφή φυσαλίδων
το ισοζύγιο μάζας για το διαλυμένο οξυγόνο στην υγρή φάση είναι:

όπου
$$\frac{d(c_{O_2} V)}{dt} = k_L A_T (c^* - c_{O_2}) + r_{O_2} V \Rightarrow \frac{dc_{O_2}}{dt} = k_L \left(\frac{A_T}{V} \right) (c^* - c_{O_2}) - q_{O_2} x$$

q_{O_2} [mg-O₂/(g-cells·h)] είναι ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου , και
 A_T [m²] είναι το συνολικό εμβαδόν της διεπιφάνειας αέριας / υγρής φάσης.

Το εμβαδόν διεπιφάνειας ανά μονάδα όγκου (surface area per unit volume) είναι μία πολύ χρήσιμη λειτουργική παράμετρος $a = A_T/V$, και επομένως έχουμε

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = k_L a (c^* - c_{O_2}) - q_{O_2} x$$

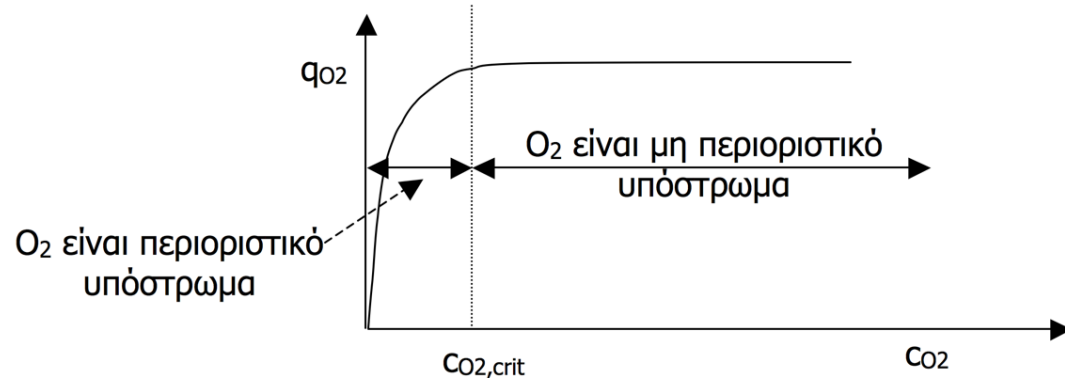
OUR & OTR

Η δυναμική συμπεριφορά του c_{O_2} είναι πολύ ταχύτερη σε σχέση με τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Επομένως κατά την διάρκεια της λειτουργίας ενός βιοαντιδραστήρα μπορούμε να θεωρήσουμε ότι είμαστε σε ψευδο-μόνιμη κατάσταση (QSS) ως προς την συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου:

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = 0 \Rightarrow \text{OUR} = q_{O_2}x = k_L a (c^* - c_{O_2}) = \text{OTR}$$

όπου OUR [mmol- O_2 /(g-dw-cells·h)] είναι ο ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου. Ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης, q_{O_2} , εξαρτάται προφανώς από το είδος του αερόβιου μικροοργανισμού καθώς επίσης και από τις συνθήκες καλλιέργειας.

$$q_p = \frac{q_{pmax} C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}}$$



Τυπικές τιμές ειδικού ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου

Μικροοργανισμός	q_{O_2} [mmol- O_2 /(g_dw_cells·h)]
Βακτήρια (bacteria)	
<i>E. coli</i>	10-12
<i>Azotobacter</i> sp.	30-90
<i>Spectromyces</i> sp.	2-4
Ζυμομήκυτες (yeasts)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
Ευρωτομήκυτες (molds)	
<i>Penicillium</i> sp.	3-4
<i>Aspergillus niger</i>	3
Φυτικά κύτταρα (plant cells)	
<i>Acer pseudoplatanus</i> (sycamore)	0,2
<i>Saccharum</i> (sugar cane)	1-3
Ζωϊκά κύτταρα (animal cells)	q_{O_2} [(mmol- O_2 /L·h)/(10 ⁶ cells/mL)]
HeLa	0,4
WI-38	0,15

Οι ανωτέρω ρυθμοί ισχύουν όταν η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη συγκέντρωση ($c_{O_2} > c_{O_2, crit}$). Για συγκεντρώσεις μικρότερες της κρίσιμης, ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης q_{O_2} , μειώνεται κατά τρόπο ανάλογο με την κινητική Monod. Η συγκέντρωση $c_{O_2, crit}$ είναι περίπου από 0,1% έως 10% του C^* .

Πειραματικός Υπολογισμός του “ $k_L a$ ”

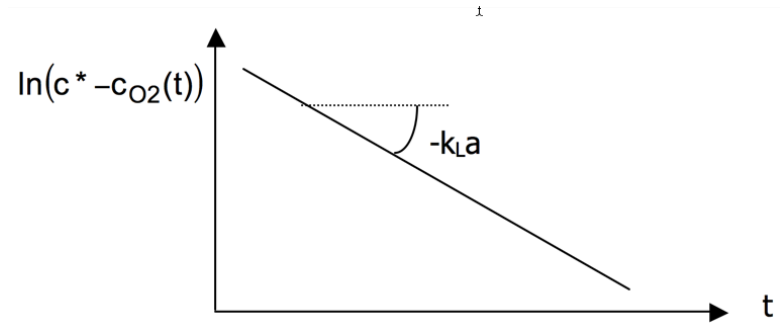
Υπάρχουν τρεις τρόποι πειραματικού υπολογισμού του “ $k_L a$ ”

- (1) Η μέθοδος της οξυγόνωσης (gassing-in method),
- (2) Η μέθοδος της χημικής οξείδωσης (sulfite oxidation method),
- (3) Η μέθοδος της δυναμικής οξυγόνωσης (dynamic method).

Η μέθοδος του δυναμικού Αερισμού (gassing-in method):

Ξεκινώντας από μία χαμηλή τιμή του διαλυμένου οξυγόνου (όχι αναγκαστικά μηδέν), αρχίζει η παροχή αέρος και έχουμε σταδιακή αύξηση του DO το οποίο μπορούμε να μετράμε πολύ εύκολα (D.O. probe). Από το ισοζύγιο μάζας (με $x=0$) έχουμε

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = k_L a (c^* - c_{O_2}) \quad \Rightarrow$$



$$\frac{c^* - c_{O_2}(t)}{c^* - c_{0O_2}} = e^{-(k_L a)t} \quad \Rightarrow$$

$$\ln(c^* - c_{O_2}(t)) = -(k_L a)t + \ln(c^* - c_{0O_2})$$

Η μέθοδος της χημικής οξείδωσης (sulfite oxidation method)

Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι η χημική οξείδωση του SO_3^{--} σε SO_4^{--} είναι πολύ γρήγορη με την παρουσία Cu^{++} ή Co^{++} ως καταλύτη. Επομένως μπορούμε να υποθέσουμε ότι το διαλυμένο οξυγόνο είναι πρακτικά μηδέν και ο ρυθμός δημιουργίας των ιόντων SO_4^{--} είναι ίσος με την μεταφορά οξυγόνου στο διάλυμα (oxygen transfer rate, OTR).

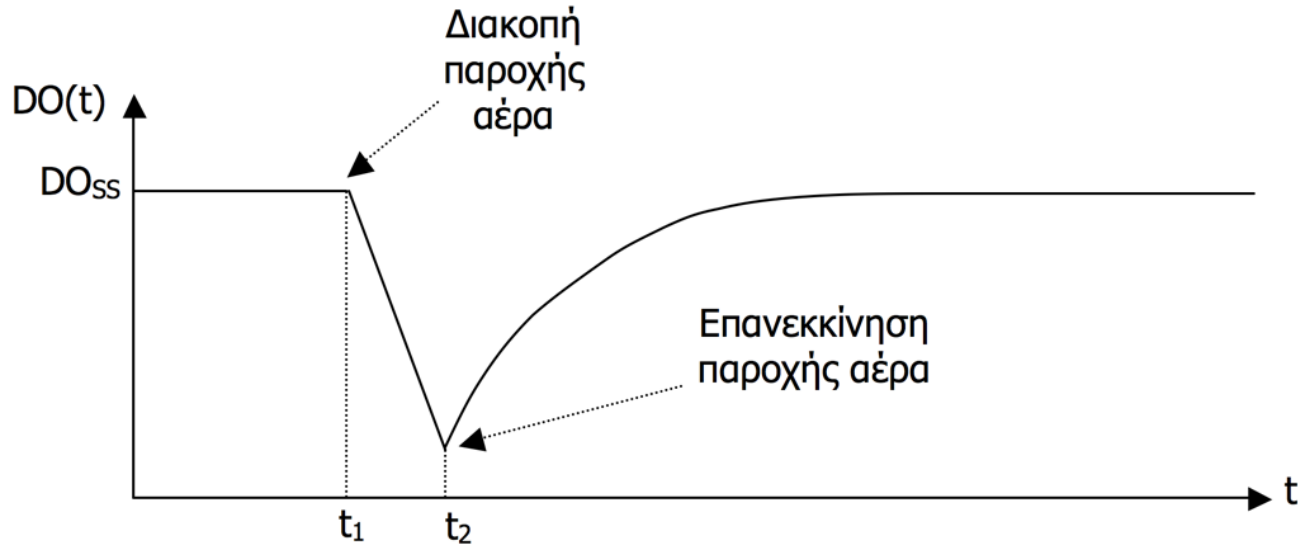
$$\text{OTR} = k_L a (c^* - 0)$$

Δεν χρησιμοποιούμε αισθητήρα διαλυμένου οξυγόνου, απλώς μετράμε τα εναπομείναντα ιόντα SO_3^{--} με τιτλοδότηση (titration) ξεκινώντας με 0.5 M διάλυμα Na_2SO_3 στο οποίο έχουμε προσθέσει 0.001 M Cu^{++} και το αναδεύουμε με σταθερό ρυθμό.

Η μέθοδος είναι **χρονοβόρα** (~3 ώρες για ένα πείραμα) και μπορεί να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα όταν υπάρχουν ακόμα και σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση ακαθαρσίες με ενεργές επιφάνειες (surface active contaminants).

Η μέθοδος της δυναμικής οξυγόνωσης (dynamic method)

Το πείραμα διεξάγεται όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



$$q_{O_2}X = k_L a (c^* - c_{O_2,ss}) \Rightarrow C_{O_2}^* = C_{O_2,ss} + \frac{q_{O_2}X}{k_L a}$$

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = k_L a (c^* - c_{O_2}) - q_{O_2}X \Rightarrow \ln(C_{O_2,ss} - C_{O_2}(t)) = \ln(C_{O_2,ss} - C_{O_2}(t_2)) - k_L a [t - t_2]$$

Συσχετίσεις για το $k_L a$

Υπάρχουν πολλές συσχετίσεις για τον υπολογισμό του $k_L a$. Μία που χρησιμοποιείται αρκετά και που ισχύει για βιοαντιδραστήρες με μηχανική ανάδευση, έχει την μορφή:

$$k_L a \sim \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0,4} (u_s)^{0,5} (\text{RPM})^{0,5}$$

Όπου u_s είναι η ταχύτητα (superficial velocity) του αέρα μέσα στον βιοαντιδραστήρα

$u_s = F_{\text{air}}/A$ (παροχή αέρα / εμβαδόν διατομής βιοαντιδραστήρα).

P_g είναι η απαιτούμενη **ισχύ για τον αεριζόμενο** βιοαντιδραστήρα όγκου V και υπολογίζεται από συσχετίσεις.

$$P_g \sim \left(\frac{P_u^2 (\text{RPM}) D_i^3}{F_{\text{air}}^{0,56}} \right)^{0,45}$$

Για τυρβώδεις συνθήκες, έχουμε ότι: $P_u \sim (\text{RPM})^3 D_i^5$

Όπου D_i είναι η διάμετρος αναδευτήρα, P_u η ισχύ για μη αεριζόμενο βιοαντιδραστήρα.

Κινητική Αποστείρωσης Μέσου (Medium sterilization)

Η εξόντωση των μικροοργανισμών με θερμούς ατμούς ακολουθεί την κινητική μιας α' τάξης χημικής αντίδρασης:

$$\frac{dN_v}{dt} = -k_d N_v \quad \Rightarrow \quad N_v(t) = N_{v0} e^{-k_d t}$$

όπου

N_v είναι ο αριθμός των ζώντων μικροοργανισμών και N_{v0} είναι ο αριθμός των ζώντων μικροοργανισμών στην αρχή της αποστείρωσης,

k_d είναι η σταθερά της αντίδρασης ή οποία αλλάζει με την θερμοκρασία σύμφωνα με την σχέση του Arrhenius

$$k_d = k_{d0} e^{-\frac{E_d}{RT}}$$

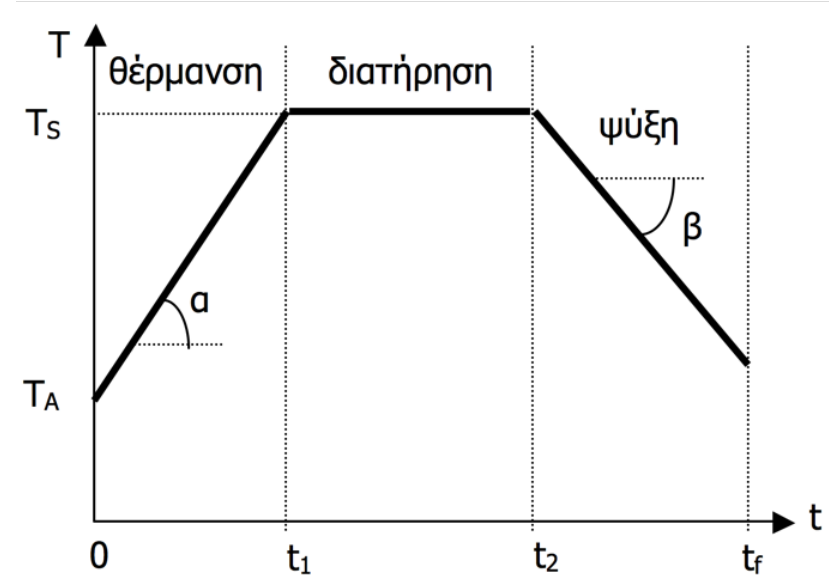
Αποστείρωση Διαλείποντος Έργου (Batch Sterilization)

Αυτή συνήθως γίνεται σε **κλειστό**, καλά αναμεμειγμένο **δοχείο**. Τα υγρά θερμαίνονται σε **υψηλή θερμοκρασία**, διατηρούνται σε σταθερή θερμοκρασία για κάποιο χρονικό διάστημα και μετά ψύχονται στην θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο αριθμός των ζώντων μικροοργανισμών μειώνεται στο καθένα από τα στάδια αυτά.

$$\ln\left(\frac{N_v(t_f)}{N_{v0}}\right) = \Delta_1 + \Delta_2 + \Delta_3$$

$$\Delta_1 = \int_0^{t_1} k_{d0} e^{-\frac{E_d}{R(T_A + \alpha t)}} dt \quad \Delta_3 = \int_0^{t_1} k_{d0} e^{-\frac{E_d}{R(T_S - \beta(t-t_2))}} dt$$
$$\Delta_2 = -k_{d0} e^{-\frac{E_d}{RT_S}} (t - t_1)$$

Η τιμή του $N(t_f)$ είναι προδιαγραφή και συνήθως έχει τιμή 10^{-3} με 10^{-5} .



$T(t)$ δίδεται από τις σχέσεις:

$$0 < t < t_1, \quad T = T_A + \alpha t$$

$$t_1 < t < t_2, \quad T = T_S$$

$$t_2 < t < t_f, \quad T = T_S - \beta(t - t_2)$$