

UNIVERZITET U NIŠU
Tehnološki fakultet Leskovac

OSNOVI BIOPROCESNOG INŽENJERSTVA

Josip Baras, Vlada Veljković, Stevan Popov,
Dragan Povrenović, Miodrag Lazić, Branislav Zlatković

Leskovac 2009.

Izdavač:
UNIVERZITET U NIŠU,
Tehnološki fakultet Leskovac

Za izdavača:
Dr Ivana Banković-Ilić

Recenzenti:
Prof. dr Slobodan Gaćeša, Tehnološki fakultet Novi Sad
Prof. dr Miomir Nikšić, Poljoprivredni fakultet, Beograd

Grafička priprema:
MD PROFY, Beograd

Tiraž:
100

Izdavanje publikacije pomoglo:
Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije

CIP Katalogizacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

60 (0.034.2)

OSNOVI bioprocenog inženjerstva

[Elektronski izvor] Josip Baras... [et al.]

.- Leskovac: Tehnološki fakultet, 2009

(Beograd: MD profy). 1 elektronski optički
disk (CD-ROM): tekst; 12 cm

Nasl. sa naslovnog ekrana. – Tiraž 100. –
Registar. – Bibliografija: str. 445-447.

ISBN 978-86-82367-68-0

a)Биотехнологија

COBISS.SR- ID 168216076

SADRŽAJ

SPISAK SIMBOLA.....	I
1. UVOD U BIOTEHNOLOGIJU I BIOPROCESNO INŽENJERSTVO	1
1.1. DEFINICIJA BIOTEHNOLOGIJU I BIOPROCESNO INŽENJERSTVO	1
1.2. TOKOVI RAZVOJA BIOTEHNOLOGIJE.....	5
1.3. RAZVOJ BIOPROCESA I BIOPROCESNE TEHNIKE	5
1.4. OBLASTI DELOVANJA I ZNAČAJNIJI PROIZVODI BIOTEHNOLOGIJE	5
1.4.1. Proizvodnja hrane	9
1.4.2. Proizvodnja farmaceutika	10
1.4.3. Proizvodnja agrohemikalija	11
1.4.4. Proizvodnja hemikalija	11
1.5. OBIM BIOTEHNOLOŠKE PROIZVODNJE DANAS.....	13
1.6. STRUKTURA BIOTEHNOLOŠKOG PROCESA	14
2. BIOLOŠKI KATALIZATORI.....	19
2.1. MIKROORGANIZMI.....	19
2.1.1. Izolacija i oplemenjivanje proizvodnih mikroorganizama	19
2.1.2. Uslovi u životnoj sredini i aktivnost mikroorganizama	23
2.1.3. Energetski metabolizam mikroorganizama.....	23
2.1.4. Tipovi ishrane mikroorganizama	25
2.1.5. Taksonomija, nomenklatura i klasifikacija mikroorganizama	28
2.2. BILJNE I ANIMALNE ĆELIJE I TKIVA.....	30
2.2.1. Animalne ćelije i tkiva	31
2.2.2. Biljne ćelije i tkiva	33

2.3. ENZIMI.....	38
2.4. IMOBILIZACIJA BIOLOŠKIH KATALIZATORA.....	41
2.4.1. Pasivna imobilizacija	42
2.4.2. Aktivna imobilizacija.....	42
2.5. ČUVANJE ČISTIH KULTURA	45
2.6. ZBIRKE BIOLOŠKIH KATALIZATORA.....	46
2.7. INOKULUM.....	47
3. INŽENJERSKI ASPEKTI BIOPROCESA.....	49
3.1. KINETIKA ENZIMSKIH REAKCIJA	50
3.1.1. Kinetika jednostavnih enzimskih reakcija bez inhibicije	50
3.1.2. Kinetika jednostavnih enzimskih reakcija sa inhibicijom	55
3.1.3. Grafički prikaz kinetičkih modela enzimskih reakcija.....	59
3.1.4. Integrisani oblici kinetičkih modela enzimskih reakcija.....	62
3.2. KINETIKA MIKROBIOLOŠKIH PROCESA	69
3.2.1. Kinetika rasta mikroorganizama u diskontinuiranim bioreaktorima	69
3.2.2. Metodi merenja rasta	74
3.2.3. Kinetički modeli rasta mikroorganizama	79
3.2.4. Maseni bilansi pri diskontinuiranom rastu mikroorganizama	86
3.2.5. Kinetika trošenja supstrata.....	90
3.2.6. Kinetika nastajanja proizvoda.....	91
3.2.7. Uticaj okoline na brzinu rasta mikroorganizama	94
3.3. KINETIKA RASTA MIKROORGANIZAMA U KONTINUALNIM I POLUKONTINUALNIM BIOREAKTORIMA	99
3.3.1. Sistemi za izvođenje kontinualnih mikrobioloških procesa	102
3.3.2. Idealni protočni bioreaktori sa mešanjem	106

3.3.3. Primena hemostata za određivanje kinetičkih parametara rasta.....	109
3.3.4. Idealni protočni bioreaktori sa klipnim proticanjem (cevni bioreaktor)	118
3.3.5. Selekcija mikroorganizama pri kontinualnom rastu.....	123
3.3.6. Mutacije mikroorganizama pri kontinualnom rastu	125
3.3.7. Sintaza proizvoda u kontinualnim uslovima rasta mikroorganizama.....	126
3.3.8. Idealni polukontinualni bioreaktori.....	126
3.3.9. Poređenje idealnih bioreaktora	129
3.4. REGULACIJA METABOLIZMA	131
3.4.1. Produkcija metabolizma	133
3.4.2. Regulacija biosinteze primarnih i sekundarnih metabolita	134
3.5. STEHIOMETRIJA BIOPROCESA.....	135
3.5.1. Maseni bilans rasta biomase	136
3.5.2. Koeficijent prenosa biomase.....	137
3.6. TERMODINAMIKA BIOPROCESA	141
3.6.1. Zakoni termodinamike.....	142
3.6.2. Gibsova energija	142
3.6.3. Zakoni termodinamike primenjeni na bioprocese.....	144
3.6.4. Step en reakcije.....	146
3.6.5. Izračunavanje toplote bioprocasa.....	146
4. BIOREAKTORI	149
4.1. BIOREAKTORI ZA IZVOĐENJE MIKROBIOLOŠKIH PROCESA	150
4.1.1. Bioreaktori za submerzno gajenje mikroorganizama.....	150
4.1.2. Površinski bioreaktori	157
4.1.3. Bioreaktori sa čvrstom i polučvrstom hranljivom podlogom.....	158
4.1.4. Bioreaktor sa imobilisanim ćelijama.....	158

4.2. BIOREAKTORI ZA IZVOĐENJE BIOPROCESA POMOĆU ANIMALNIH ĆELIJA,	
TKIVA I ORGANA	159
4.2.1. Bioreaktori za submerzno gajenje animalnih ćelija	161
4.2.2. Bioreaktor sa imobilisanim animalnim ćelijama.....	165
4.2.3. Bioreaktor sa fluidizovanim slojem	168
4.2.4. Bioreaktor sa šupljim vlaknima	168
4.2.5. Bioreaktor sa pakovanim slojem.....	169
4.3. BIOREAKTORI ZA IZVOĐENJE BIOPROCESA POMOĆU BILJNIH ĆELIJA	169
4.4. ENZIMSKI BIOREAKTORI.....	174
4.5. POREĐENJE BIOREAKTORA	175
4.6. IZBOR BIOREAKTORA.....	177
4.6.1. Uticaj prirode proizvodnog mikroorganizma	177
4.6.2. Uticaj osobina hranljive podloge	177
4.6.3. Uticaj parametara procesa.....	179
4.6.4. Problemi pri izboru bioreaktora	179
5. FENOMENI PRENOSA U BIOPROCESNOM INŽENJERSTVU	181
5.1. PRENOS KOLIČINE KRETANJA.....	181
5.1.1. Reološko ponašanje fluida	182
5.1.2. Prenos količine kretanja mešanjem.....	185
5.1.3. Izbor mešalice	186
5.1.4. Uticaj mehaničkih sila na mikroorganizme	187
5.1.5. Izračunavanje vremena I snage mešanja	188
5.2. PRENOS TOPLOTE U BIOREAKTORIMA	195
5.2.1. Jednačina bilansa toplote	196

5.2.2. Određivanje ukupnog koeficijenta prenosa toplote.....	197
5.3. PRENOS MASE U BIOREAKTORIMA.....	200
5.3.1. Međufazni prenos mase kiseonika	202
5.3.2. Osnovi teorije međufaznog prenosa mase	203
5.3.3. Brzina međufaznog prenosa mase	204
5.3.4. Teorija izotropne turbulencije.....	205
5.3.5. Faktori koji određuju brzinu prenosa mase kiseonika.....	208
6. PRIPREMNA FAZA U BIOTEHNOLOŠKOJ PROIZVODNJI	225
6.1. PRIPREMA VODE ZA POTREBE BIOTEHNOLOŠKE PROIZVODNJE	225
6.1.1. Osobine voda	225
6.1.2. Vrste voda.....	226
6.1.3. Sastav prirodnih voda	227
6.1.4. Zagađivanje prirodnih voda	228
6.1.5. Klasifikacija prirodnih voda prema kvalitetu.....	228
6.1.6. Korišćenje voda	230
6.1.7. Pregled postupka za pripremu(obrađu)vode	230
6.1.8. Postupci pripreme vode za industrijske potrebe.....	232
6.1.9. Postupci za uklanjanje neponželjnih supstanci iz vode.....	241
6.1.10. Priprema vode za prenos toplote.....	248
6.2. INDUSTRIJSKE HRANLJIVE PODLOGE	251
6.2.1. Vrste hranljivih podloga	251
6.2.2. Supstrati za hranljive podloge.....	252
6.2.3. Definicija sastava hranljive podloge	258
6.2.4. Priprema industrijskih hranljivih podloga.....	260
6.3. STERILIZACIJA U BIOTEHNOLOGIJI	261

6.3.1. Postupci, mehanizam i kinetika sterilizacije	262
6.3.2. Sterilizacija hranljivih podloga toplotom.....	264
6.3.3. Diskontinualna (šaržna) sterilizacija toplotom.....	269
6.3.4. Kontinualna sterilizacija toplotom.....	278
6.3.5. Sterilizacija hranljive podloge filtracijom.....	286
6.3.6. Sterilizacija vazduha	288
6.3.7. Drugi načini sterilizacije vazduha.....	295
6.3.8. Sterilizacija bioreaktora	296
6.3.9. Aseptično zasejavanje bioreaktora.....	297
6.4. PRIPREMA INOKULUMA PROIZVODNIH ORGANIZAMA	298
6.4.1. Postupci pripreme inokuluma	298
7. IZVOĐENJE BIOPROCESA.....	303
7.1. TEHNIKE IZVOĐENJA BIOPROCESA.....	303
7.2. PRAĆENJE BIOPROCESA	304
7.2.1. Analitički metodi za praćenje bioprocasa	305
7.2.2. Vođenje dokumentacije o praćenju bioprocasa.....	306
7.2.3. Merni instrumenti	307
7.2.4. Merenja u biotehnologiji.....	308
7.3. BIOSENZORI.....	317
7.3.1. Komponente biosenzora	318
7.4. KONTROLA I REGULACIJA BIOPROCES	325
7.4.1. Kompjuterizovani kontrolni sistem.....	327
8. ZAVRŠNA FAZA U BIOTEHNOLOŠKOJ PROIZVODNJI.....	333
8.1. IZDVAJANJE NERASTVORNIH PROIZVODA.....	336
8.1.1. Filtracija.....	336

8.1.2. Centrifugisanje.....	340
8.1.3. Koagulacija i flokulacija.....	343
8.1.4. Destilacija	344
8.2. DEZINTEGRACIJA MIKROBNIH ČELIJA.....	344
8.3. IZDVAJANJE RASTVORENIH PROIZVODA.....	347
8.3.1. Ekstrakcija	347
8.3.2. Precipitacija	350
8.3.3. Adsorpcija.....	352
8.3.4. Hromatografija.....	357
8.3.5. Membranska separacija.....	359
8.3.6. Dijaliza.....	362
8.4. PREČIŠĆAVANJE PROIZVODA	363
8.5. KONCENTRISANJE PROIZVODA	364
8.6. SUŠENJE PROIZVODA	364
8.7. LIOFILIZACIJA.....	373
8.8. MLEVENJE.....	375
8.9. UMEŠAVANJE PRAŠKASTIH PROIZVODA	376
9. RAZVOJ BIOPROCESA	377
9.1. POVEĆANJE RAZMERA BIOPROCESA.....	377
9.1.1. Metodi povećanja razmera bioreaktora.....	379
9.1.2. Promena inteziteta aeracije povećanjem razmera bioreaktora	384
9.1.3. Ograničenja održavanja geometrijske sličnosti.....	385
9.2. MODELOVANJE BIOPROCESA	386
9.3. KONTROLA BIOPROCESA	388
9.4. SIMULACIJA BIOPROCESA	389

9.5. OPTIMIZACIJA BIOPROCESA.....	390
9.5.1. Integralni pristup optimizaciji u bioprocenom inženjerstvu	391
10. INŽENJERSKI ASPEKTI ZAŠTITE ŽIVOTNE SREDINE I	
ODRŽIVOG RAZVOJA U BIOTEHNOLOGIJI.....	393
10.1. OPŠTI ASPEKTI ZAŠTITE ŽIVOTNE SREDINE I ODRŽIVOG RAZVOJA.....	393
10.1.1. Pojam održivog razvoja	393
10.1.2. Pravne norme i standardi u oblasti održivog razvoja	394
10.2. PROCESNE TEHNOLOGIJE KAO ZAGAĐIVAČI ŽIVOTNE SREDINE.....	395
10.3. MESTO BIOTEHNOLOGIJE KAO ZAGAĐIVAČA ŽIVOTNE SREDINE	397
10.4. PRINCIPI POVEZIVANJA PROCESNIH TEHNOLOGIJA U ‘ZATVORENE’	
PROIZVODNE SISTEME	398
10.5. UŠTEDA ENERGIJE U BIOTEHNOLOGIJI.....	401
10.5.1. Alternativni izvori obnovljive energije	401
10.5.2. Uvoženje termički racionalnijih tehnoloških rešenja u biotehnologiji.....	402
10.6. OTPADNE VODE U BIOTEHNOLOGIJI I NJIHOVO PREČIŠĆAVANJE.....	404
10.6.1. Karakteristike otpadnih voda	404
10.6.2. Načini prečišćavanja otpadnih voda	404
10.6.3. Karakterizacija otpadnih voda za potrebe projektovanja postrojenja za prečišćavanje	405
10.6.4. Smanjenje količine i stepena zagađenosti otpadnih voda	408
10.7. POSTUPCI PREČIŠĆAVANJA OTPADNIH VODA.....	409
10.7.1. Sistemi za prečišćavanje otpadnih voda.....	411
10.8. BIOLOŠKO PREČIŠĆAVANJE OTPADNIH VODA.....	415
10.8.1. Biološke karakteristike otpadnih voda.....	415
10.8.2. Biološki postupci prečišćavanja otpadnih voda	415
10.8.3. Aerobni procesi prečišćavanja	417

10.9. ANAEROBNI POSTUPCI OBRADE	428
10.9.1. Mehanizam bioliškog delovanja	428
10.10. MEMBRANSKI PROCESI.....	436
10.11. DEZINFEKCIJA EFLUENTA	436
 INDEKS POJMOVA	 439
LITERATURA	445

SPISAK SIMBOLA

a, b, c ...	koeficijenti u polinomu, kriterijalnim jednačinama, empirijskim formulama itd.
a	specifična površina čestica u pogači, m
A	Arrhenius-ova konstanta, h^{-1}
A	površina, m^2
A	površina poprečnog preseka cevi, m^2
B	konstanta u jednačini 3.100
BM	količina produkovane biomase, kg/d
Bo	Bodenstein-ov broj, 1
c	masa čvrste faze izdvojena po zapremini profiltrirane tečnosti, kgm^{-3}
c	koncentracija rastvorenog kiseonika u masi tečnosti, kg m^{-3}
c*	koncentracija kiseonika u zasićenom rastvoru, kgm^{-3}
c _i	koncentracija rastvorenog kiseonika na granici faza, kg m^{-3}
c _p	specifična toplota fermentacione tečnosti, rashladnog ili grejnog fluida itd., $\text{Jkg}^{-1}\text{K}^{-1}$
c _p	specifična toplota rashladnog fluida, $\text{Jkg}^{-1}\text{K}^{-1}$
c _p '	specifična toplota medijuma za hlađenje, $\text{Jkg}^{-1}\text{K}^{-1}$
c*	koncentracija rastvorenog kiseonika koja je u ravnoteži sa parcijalnim pritiskom kiseonika u gasnoj fazi, kgm^{-3}
D	brzina razblaživanja, h^{-1}
$\mathcal{D}$	koeficijent molekulske difuzije, m^2h^{-1}
Da	Damkeler-ov broj, 1
D _i	prečnik mešalice, m
D _L	koeficijent molekulske difuzije, m^2s^{-1}
D _m	brzina razblaživanja pri kojoj se ostvaruje maksimalna proizvodnost bioreaktora, h^{-1}
D _t	prečnik suda bioreaktora, m
D _w	kritična brzina razblaživanja, m
d	prečnik cevi, m
d _f	prečnik filtra, m
E	koncentracija slobodnog enzima, kgm^{-3}
E ₀	koncentracija enzima na početku, kgm^{-3}
ES	koncentracija enzim-supstrat kompleksa, kgm^{-3}
E _a	energija aktivacije za rast, odumiranje itd., Jmol^{-1}
E _s	energija aktivacije za razgradnju ključne komponente hranljive podloge, Jmol^{-1}
F	vučna sila, N
f _c	konverzioni faktor
f _c	korekcionni faktor, 1
G	starost mulja, $\text{kg}/(\text{kg}/\text{dan})$
ΔG	promena Gibsove energije, Jmol^{-1}
ΔG^0	standardna promena Gibsove energije, Jmol^{-1}
g _i	parcijalna molarna Gibsova energija $\dot{I}$ -te komponente, Jmol^{-1}
H _i	rastojanje između mešalica, m
H _L	visina tečnosti u sudu, m

ΔH	promena entalpije, Jmol^{-1}
h	koeficijent prenosa toplote, $\text{Wm}^{-2}\text{K}^{-1}$
h_i	parcijalna molarna entalpija, m^2h^{-2}
i	eksponent u odgovarajućim jednačinama
j	eksponent u odgovarajućim jednačinama
K	konverzija supstrata, kgkg^{-1}
K	ukupni koeficijent prenosa toplote, $\text{Wm}^{-2}\text{K}^{-1}$
K_i	konstanta inhibicije, kgm^{-3}
K_l	ukupni koeficijent prenosa mase, ms^{-1}
K_L	ukupni koeficijent prenosa mase kiseonika (izražen u jedinicama koje odgovaraju tečnoj fazi), mh^{-1}
K_m	Mihaelis-Mentenova konstanta, kgm^{-3}
K_p	konstanta inhibicije proizvodom, kgm^{-3}
K_s	konstanta zasićenja supstratom (Monod-va), kgm^{-3}
K_s	konstanta disocijacije kompleksa enzim – supstrat
K_v	zapreminski koeficijent prenosa mase, s^{-1}
K_v	faktor oblika čestica u filtracionoj pogači, 1
k	konstanta proporcionalnosti
k	konstanta brzine odumiranja, odnosno inaktivacije mikroorganizama, h^{-1}
k	faktor konzistencije, Pa s^n
k_f	toplotna provodljivost fluida, $\text{Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$
k_G	koeficijent prenosa mase kiseonika sa strane gasa, mh^{-1}
k_L	koeficijent prenosa mase kiseonika sa strane tečnosti, mh^{-1}
k_{ia}	zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika, m^3h^{-1}
L	dužina cevnog bioreaktora, filtra za sterilizaciju vazduha, m
L_k	kritična dužina kolone, m
L_{90}	debljina filtra koji izdvaja 90% čestica, m
l	dužina bioreaktora, m
l	karakteristična dimenzija sistema (prečnik bioreaktora ili prečnik cevi), m
l_i	veličina intermedijarnih vrtloga, m
M	molska masa kiseonika, supstrata, enzima itd., gmol^{-1}
M_c	ukupna masa u filtracionoj pogači, kg
$MLSS$	suspendovane materije aktivnog mulja, kgm^{-3}
m	specifična potrošnja supstrata za održavanje života ćelija mikroorganizama, kgkg^{-1}
$\dot{m}_w$	potrošnja rashladnog fluida, $\text{kg}^{\text{h}^{-1}}$
N	broj mikroorganizama u hranljivoj podlozi, m.o. m^{-3}
N_o	početni broj mikroorganizama, 1
N'	broj uništenih ćelija nakon vremena t , 1
N_A	broj teorijskih podova, 1
N_a	aeracioni broj, 1
N_f	broj čestica koje napuštaju filter, 1
N_i	broj obrtaja mešalice, o/min
N_{O_2}	fluks mase kiseonika kroz graničnu površinu, kg h^{-1}
N_p	faktor snage mešanja, 1
n	indeks toka, 1
p_i	parcijalni pritisak kiseonika na granici faza, Pa
P	koncentracija proizvoda, kgm^{-3}
P	spoljna snaga mešanja, W

P_0	koncentracija proizvoda na početku bioprocesa, kgm^{-3}
P_{opt}	hidraulično opterećenje, $\text{m}^3\text{m}^{-2}\text{dan}^{-1}$
P_r	produktivnost bioreaktora, $\text{kgm}^{-3}\text{h}^{-1}$
ΔP	pad pritiska kroz filter, Pa
p	parcijalni pritisak kiseonika u gasnoj fazi, Pa
Q	toplota razmenjena između sistema i okoline, J
Q	srednja dnevna masa zagađenih voda, $\text{m}^3\text{dan}^{-1}$
Q	ulazni protok vode, m^3h^{-1}
Q_a	brzina razvijanja toplote zbog aeracije, J
Q_F	brzina oslobađanja toplote zbog mikrobnog rasta, J
Q_e	protok efluenta, m^3h^{-1}
Q_{izl}	zapreminski protok fluida na izlazu, m^3s^{-1}
Q_i	brzina kojom se toplota gubi isparavanjem, J
Q_{iz}	zapreminski protok na izlazu iz bioreaktora, m^3h^{-1}
Q_k	brzina kojom se toplota gubi u okolinu, J
Q_m	brzina razvijanja toplote zbog mehaničkog mešanja, J
Q_0	protok fermentacione tečnosti, m^3s^{-1}
Q_r	protok reciklata, m^3h^{-1}
Q_r	razmenjena toplota koju odnosi rashladni fluid, J
Q_{ul}	zapreminski protok fluida na ulazu, m^3s^{-1}
Q_v	zapreminski protok vazduha, m^3s^{-1}
Q_w	kritični protok fermentacione tečnosti, m^3s^{-1}
ΔQ_0	razlika osetne toplote fermentacione tečnosti na izlazu i hranljive podloge na ulazu, J
ΔQ_v	razlika toplote vazduha na izlazu i ulazu iz bioreaktora, J
q_p	specifična brzina stvaranja proizvoda, $\text{kgkg}^{-1}\text{h}^{-1}$
q_s	specifična brzina trošenja supstrata, $\text{kgkg}^{-1}\text{h}^{-1}$
R	recirkulacioni odnos
R	gasna konstanta, $\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$
R	masa oslobođenih proteina, kg
R_m	maksimalna masa proteina koja se može osloboditi, kg
R_m	specifična otpornost filtracionog medijuma, mkg^{-1}
RAS	masa suspendovanih materija recirkulisanog mulja, kg
r	opšti izraz za brzinu reakcije, $\text{molm}^{-3}\text{h}^{-1}$
r_p	brzina nastajanja proizvoda, $\text{kgm}^{-3}\text{h}^{-1}$
r_s	brzina trošenja supstrata, $\text{kgm}^{-3}\text{h}^{-1}$
r_x	brzina rasta mikroorganizama, $\text{kgm}^{-3}\text{h}^{-1}$
S	koncentracija limitirajućeg supstrata; termolabilne komponente u podlozi, kgm^{-3}
Sc	Schmidt-ov broj ($= \frac{\mu_L}{\rho_L D_L}$)
Sh	Sherwood-ov broj ($= \frac{k_L d_b}{D_L}$)
S_{izl}	koncentracija limitirajućeg supstrata na izlazu, kgm^{-3}
S_0	koncentracija limitirajućeg supstrata na početku procesa, kgm^{-3}
S_r	koncentracija supstrata u reciklatu, kgm^{-3}
S_t	koncentracija limitirajućeg supstrata na kraju procesa, kgm^{-3}
S_{ul}	koncentracija limitirajućeg supstrata na ulazu, kgm^{-3}
ΔS	promena entropije, $\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$

SS_e	suspendovane materije u efluentu otpadne vode, kg
SS_w	suspendovane materije otpadnog mulja, kg
s	kompresibilnost pogače (jednaka je 0 za čvrste nekompresibilne medijume), l
s_i	parcijalna molarna entropija, $\text{kgm}^2 \text{K}^{-1} \text{h}^{-2} \text{mol}^{-1}$
T	apsolutna temperatura; temperatura, K, °C
T	apsolutna temperatura, K
T_0	početna temperatura podloge, K
T_f	srednja temperatura hranljive podloge, K
T_g	temperatura medijuma za zagrevanje, K
T_h	temperatura medijuma za hlađenje, K
T_{iz}	izlazna temperatura rashladnog fluida, °C
T_r	srednja temperatura rashladnog fluida, K
T_{sl}	srednja logaritamska temperaturna razlika, K
T_{ul}	ulazna temperatura rashladnog fluida, °C
t	vreme, s, h
$t_1, t_2 \dots$	vremena u odgovarajućim jednačinama, s, h
t_c	cirkulaciono vreme, h
t_g	generaciono vreme, s, h
t_D	decimalno vreme odumiranja mikroorganizama, s, h
t_d	vreme udvostručenja mase mikroorganizama, s, h
t_m	vreme mešanja, h
U	opterećenje bioreaktora, $\text{kgkg}^{-1} \text{h}^{-1}$
ΔU	promena unutrašnje energije između krajnjeg i početnog stanja sistema, $\text{kgm}^2 \text{h}^{-2}$
u_i	brzina intermedijarnih vrtloga, mh^{-1}
$u_{\max}$	maksimalna brzina fluida koji struji oko cevi, mh^{-1}
V	zapremina, m^3
V_{gasa}	količina produkovanog gasa, m^3
V_L	radna zapremina bioreaktora; zapremina fermentacione tečnosti, m^3
v	brzina enzimske reakcije, $\text{kgm}^{-3} \text{h}^{-1}$
v_b	brzina dizanja gasnih mehura, ms^{-1}
v_m	maksimalna brzina enzimske reakcije, $\text{kgm}^{-3} \text{h}^{-1}$
v_s	brzina trošenja supstrata u enzimskim reakcijama, $\text{kgm}^{-3} \text{h}^{-1}$
W	rad koji obavlja sistem, J
WAS	masa suspendovanih materija otpadnog mulja, kg
We_b	Weber-ov broj ($We_b = \frac{\tau}{\sigma/d_b}$)
X	koncentracija biomase mikroorganizama, kgm^{-3}
X_0	koncentracija biomase mikroorganizama na početku rasta, kgm^{-3}
X_r	koncentracija biomase mikroorganizama u reciklatu, kgm^{-3}
X_t	koncentracija biomase mikroorganizama na kraju rasta, kgm^{-3}
X_{izl}	koncentracija biomase mikroorganizama na izlazu, kgm^{-3}
X_{sr}	srednja koncentracija biomase mikroorganizama, kgm^{-3}
X_{ul}	koncentracija biomase mikroorganizama na ulazu, kgm^{-3}
x	eksponent u odgovarajućim jednačinama
Y	prinos, kgkg^{-1}
$Y_{X/S}$	prinos biomase po jedinici utrošenog kiseonika, kgkg^{-1}
$Y_{P/S}$	prinos proizvoda po jedinici utrošenog supstrata, kgkg^{-1}

$Y_{P/X}$	prinos proizvoda po jedinici biomase, kgkg^{-1}
$Y_{X/S}$	prinos biomase po jedinici utrošenog supstrata, kgkg^{-1}
$(Y_{X/R})_R$	prinos biomase po jedinici utrošenog supstrata za rast ćelija, kgkg^{-1}
Y_{kJ}	prinos biomase u odnosu na ukupnu raspoloživu energiju, kgJ^{-1}
$Y_{X/ATP}$	prinos biomase u odnosu na ATP, kgmol^{-1}
Y_{ob}	uočeni prinos mulja, kgkg^{-1}
Z_i	valenca (naelektrisanje) jona, 1

Grčki simboli

α	specifična otpornost filtracione pogače, mkg^{-1}
β	koeficijent toplotnog širenja fluida, K^{-1}
β	stepen koncentrisanja biomase, 1
$\beta_{i,j}$	koeficijent selektivnosti, 1
∇	kriterijum sterilizacije ili del-faktor, 1
ε	poroznost pogače, 1
Φ	koeficijent aktivnosti utroška supstrata, 1
γ	brzina smicanja, h^{-1}
λ	kriterijum kvaliteta hranljive podloge, 1
λ	konstanta (najčešće manja od 1), 1
μ	specifična brzina rasta mikroorganizama, h^{-1}
μ	viskozitet fluida, Pam
μ_a	tzv. „prividni viskozitet” fluida, Pam
μ_d	specifična brzina odumiranja mikroorganizama, h^{-1}
μ_m	maksimalna specifična brzina rasta mikroorganizama, h^{-1}
μ_N	specifična brzina rasta mikroorganizama u odnosu na broj mikroorganizama, h^{-1}
v	eksponent u empirijskim jednačinama
v	brzina strujanja fluida, m/s
v	broj jona nastalih iz svakog rastvorenog molekula, 1
θ	hidrauličko vreme zadržavanja, h
θ_c	srednje vreme zadržavanja ćelija, dan
ρ	gustina fluida, kg/m^3
σ	površinski napon, Nm^{-1}
τ	vreme boravka, h
τ	napon smicanja, $\text{kgm}^{-1}\text{h}^{-2}$
τ_0	početni napon smicanja, Pa
τ_{st}	starost biomase, h
τ_w	kritično vreme boravka, h
Σ	efekat centrifuge ili Σ faktor, 1

1. UVOD U BIOTEHNOLOGIJU I BIOPROCESNO INŽENJERSTVO

1.1. DEFINICIJA BIOTEHNOLOGIJE I BIOPROCESNOG INŽENJERSTVA

Pod pojmom **biotehnologija**, u najširem smislu, podrazumevaju se procesi primenjene biologije. U užem smislu, biotehnologija podrazumeva primenu bioloških sistema i bioprocasa u industrijskoj proizvodnji.

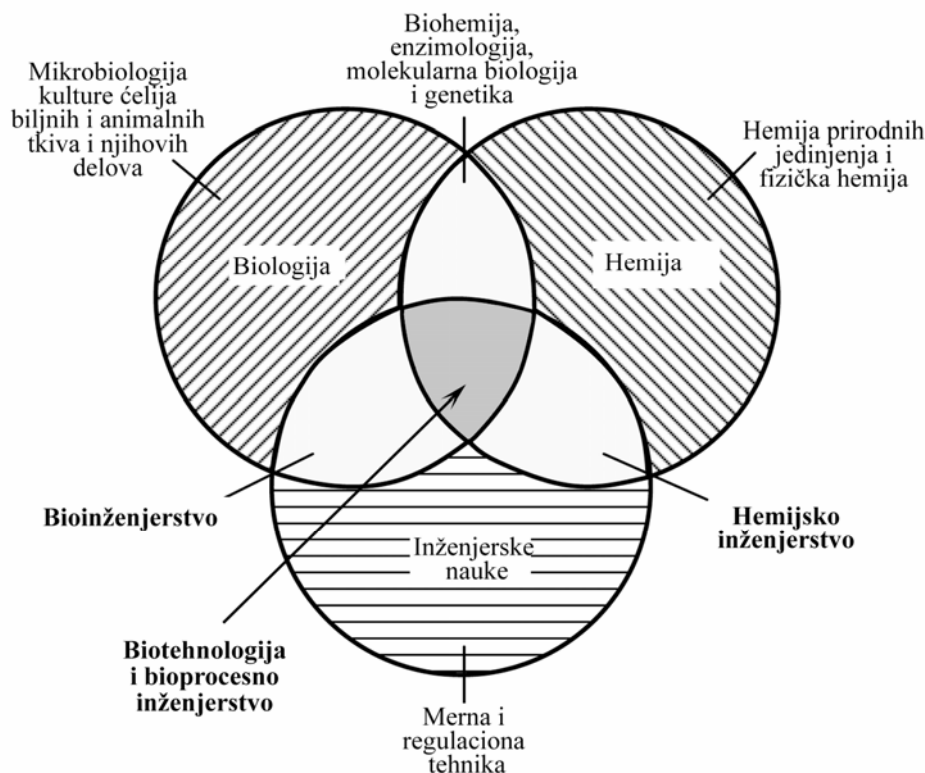
Evropska federacija biotecnologa je 1962. godine definisala biotehnologiju kao „integralnu primenu biohemije, mikrobiologije i inženjerskih znanja u cilju korišćenja mikroorganizama, kultura biljnih i životinjskih ćelija i tkiva ili njihovih delova u industrijskoj proizvodnji”. Ova definicija očigledno implicira izrazitu multidisciplinarnost biotehnologije kao nauke i struke. Primena bioloških procesa u industrijskoj proizvodnji zahteva veoma složene postupke i složenu tehnološku opremu, radi ostvarenja specifičnih proizvodnih uslova (na primer: sterilnost, aerobnost ili anaerobnost i dr.), zatim složenu kontrolu i upravljanje procesima itd. Specifičnost uslova proizilazi iz činjenice da su akteri u bioprocima žive ćelije organizama ili njihovi delovi koji su veoma osetljivi na uslove okoline.

Multidisciplinarnost biotehnologije i biohemijskog inženjerstva je šematski prikazana na slici 1.1. Očigledno je da biotecnolog i bioproceni inženjer mora da poseduju veoma opsežno znanje, kako radi direktnog delovanja u izvođenju industrijskih bioloških procesa, tako i radi uspešne komunikacije sa dodirnim naukama i strukama.

Biohemijsko inženjerstvo mnogi definišu na isti način kao i biotehnologiju i može se postaviti pitanje da li je to adekvatno. Danas se u biotehnologiju uključuju i oblasti koje nisu industrijsko korišćenje bioloških sistema i procesa, poput stočarstva ili poljoprivrede. Nasuprot tome, biohemijsko inženjerstvo se ne definiše tako široko. Ono se, u osnovi, može definisati kao primena inženjerskih znanja u užoj oblasti biotehnologije, tj. industrijskoj proizvodnji zasnovanoj na primeni bioloških katalizatora, kao što su: mikroorganizmi, animalne i biljne ćelije, kulture tkiva i organa i ćelijski delovi.

Nazivi biotehnologija i biohemijsko inženjerstvo, kao i njihove definicije, davno su uvedeni. Zbog intenzivnog razvoja i širine delovanja u tim oblastima, ovi nazivi zahtevaju preciznije definisanje. Na primer, kako pod navedene definicije uklopiti novije termine, koji se odnose na delatnost inženjera u biotehnologiji, kao što su: bioinženjerstvo, biološko inženjerstvo, biomedicinsko inženjerstvo, biomolekularno inženjerstvo i genetičko inženjerstvo. Zbog toga je daleko adekvatnije ove termine objasniti oblašću primene nego jedinstvenom definicijom.

Bioproceno inženjerstvo. Da bi se napravila veća distinkcija u odnosu na hemijsko inženjerstvo, umesto termina biohemijsko inženjerstvo u poslednje vreme se sve više koristi termin bioproceno inženjerstvo, čak i za udžbenike koji su namenjeni biotehnozima. Ovim se želi istaći da biohemijsko inženjerstvo mora rešiti niz sofisticiranih inženjerskih problema u izvođenju bioprocasa koji ne opterećuju hemijsko inženjerstvo. Pre svega, tu je suštinska razlika između procesa sa učešćem živih aktera (bioprocesi) i procesa sa neživom materijom (hemijski procesi). Tu su, takođe, specifičnosti u projektovanju opreme, razvoju senzora, algoritmima vezanih za kontrolu ćelijskog metabolizma (molekularni nivo) i proizvodnim strategijama. Pri tome, intenzivan razvoj u oblasti determinacije kompletne sekvence gena pojedinih bioloških vrsta daje novu dimenziju i složene razvojne zadatke u dizajniranju bioprocasa, koje će rešavati bioproceno inženjerstvo.



Slika 1.1 Šematski prikaz multidisciplinarnosti biotehnologije i bioprocenog inženjerstva

Bioinženjerstvo je širok pojam, koji u sebe uključuje i medicinske i agrarne sisteme, uz poznavanje i elektro-, mašinskog, hemijskog, ekološkog inženjerstva, kao i drugih oblasti u specifičnim slučajevima.

Prehrambeno inženjerstvo je slično bioinženjerstvu, s tim što se odnosi na sisteme za proizvodnju hrane.

Biološko inženjerstvo je, takođe, slično bioinženjerstvu, ali se ovaj naziv odnosi na biljne i animalne sisteme.

Biohemijско inženjerstvo je primena principa hemijskog inženjerstva na sisteme koji koriste biološke katalizatore u cilju industrijske proizvodnje. Ono se ponegde deli na bioreakciono inženjerstvo i bioseparacione procese.

Biomedicinsko inženjerstvo je, u suštini, veoma različito od biohemijскоg inženjerstva, ali ih direktno povezuju kulture animalnih ćelija i tkiva.

Biomolekularno inženjerstvo je domen biohemijскоg inženjerstva fokusiran na molekularni nivo”.¹

Genetsko inženjerstvo predstavlja laboratorijsku tehniku manipulacije genima i sa inženjerstvom, u suštini, nema dodirnih tačaka. Ovaj naziv je nastao u vreme intenzivnog razvoja i značajnih investiranja u hemijsko inženjerstvo posle drugog svetskog rata, da bi istraživanja u oblasti manipulacije genima bila finansijski podržana. Iako nije adekvatan, ovaj naziv je i danas u upotrebi. Ispravan naziv za ovu oblast nauke bio bi tehnika rekombinantne DNK, koji se sve češće koristi u naučnoj i stručnoj literaturi.

1.2. TOKOVI RAZVOJA BIOTEHNOLOGIJE

Iako je biotehnologija mlada nauka i struka, ne treba se iznenaditi kada biotehnolozi tvrde da su prve proizvodne tehnologije, koje je čovek razvio, bile zapravo biotehnologije. Za tu tvrdnju ima dosta osnova. Još iz stare Fenikije (4 milenijum pre Hrista) postoje zapisi o proizvodnji piva, sa opisom tehnologije i zakonskih odredbi vezanih za proizvodnju i distribuciju piva. Ništa manje nisu stari ni podaci o toj proizvodnji nađeni u egipatskim piramidama u obliku slikovitog prikaza postupka proizvodnje. Iz istog vremena potiču i podaci o proizvodnji hleba. Njegovi komadi nađeni su u egipatskim piramidama izgrađenim pre 5 milenijuma. I u proizvodnji hleba čovek je nesvesno koristio kvasce, da bi dobio proizvod boljih organoleptičkih osobina. I drugi narodi širom sveta vekovima su razvijali proizvodnju vina, piva, sirćeta i drugih proizvoda nastalih delovanjem mikroorganizama, poput hleba, jogurta, ukiseljenog povrća itd. Svi ti fermentacioni procesi proizvodnje razvijani su iskustveno, bez naučnog pristupa, pa se nije ni znalo da u njima glavnu ulogu igraju mikroorganizmi.

Nije moguće postaviti precizna razmeđa u razvoju biotehnologije. Postoje periodi koji karakterišu ključna saznanja, prvo u oblasti mikrobiologije, a zatim i u drugim prirodnim naukama i inženjerskim disciplinama, na osnovu kojih se može omeđiti pet karakterističnih etapa razvoja biotehnologije (tabela 1.1).

Prvom etapom u razvoju biotehnologije smatra se vreme pre otkrića da su mikroorganizmi uzročnici fermentacionih procesa (vreme nesvesnog korišćenja mikroorganizama za izvođenje bioprocasa). Otkriće mikroskopa omogućilo je *Leeuwenhoek-u* (1684. godine) da dokaže postojanje

¹ Definicija National Institute of Health, SAD.

nje golim okom nevidljivih organizama, nazvanih mikroorganizmima. Tek nakon toga, pretpostavilo se da oni igraju značajnu ulogu u do tada poznatim fermentacijama.

Druga etapa razvoja biotehnologije počinje 1875. godine, kada je *Louis Pasteur* potvrdio ranije pretpostavke da su kvasci uzročnici alkoholnog vrenja. Od tada se mikroorganizmi svesno koriste u proizvodnji. Tada se još uvek nije znala štetna uloga štetnih mikroorganizama, koji su se razvijali uporedo sa korisnim mikroorganizmima u proizvodnim bioprocima izvedenim u nesterilnim uslovima.

Tabela 1.1. Etape razvoja biotehnologije

I. Etapa pre Pastera (do 1865)	Fermentisana pića i hrana
II. Etapa posle posle Pastera (1865-1940)	Organski rastvarači, organske kiseline, obrada otpadnih voda
III. Etapa antibiotika (1940-1960)	Penicilin, antibiotici širokog spektra, virusne vakcine
IV. Etapa posle antibiotika (1960-1975)	Aminokiseline, proteini jednoćelijskih organizama (SCP), enzimi, imobilisani enzimi i mikrobne ćelije, metanizacija otpada, etanol kao gorivo (gasohol)
V. Etapa nove biotehnologije (1975-...)	Genetičko inženjerstvo, tehnologija hibridoma (1974), monoklonska antitela (1975), monoklonski dijagnostički testovi (1980), humani insulin (1982), humani interferon (1983), nekrozni faktor rasta, imunobiološki regulatori, interleukin, virusne vakcine, hormoni, serum albumini, insekticidi, kompletne ćelije, kulture tkiva i organa itd.

Treća etapa razvoja biotehnologije počinje uvođenjem principa antiseptičnosti u hirurgiji (*Robert Lister*, 1867. godine), koji su ubrzo preneti i u fermentacione procese, a zatim uvođenjem metoda proučavanja bakterija u čistim kulturama (*Robert Koch*, 1881. godine) i tehnike izolacije čistih kultura. To je omogućilo izolaciju potentnijih „proizvodnih” sojeva mikroorganizama iz prirodnih staništa za biotehnošku proizvodnju. Nakon toga, broj industrijskih proizvoda naglo je porastao, a proizvodnja penicilina (*Alexsander Fleming*, 1929. godine) predstavlja kamen temeljac razvoja *biotehnologije, hemijskog i biohemijskog inženjerstva*.

Četvrta etapa razvoja biotehnologije okarakterisana je razvojem tehnike dobijanja mutanata i selekcije oplemenjenih proizvodnih sojeva mikroorganizama kao i uvođenjem imobilisanih bioloških katalizatora.

Peta etapa razvoja biotehnologije počinje od 1975. godine, uvođenjem tehnike rekombinantne DNK u oplemenjivanju postojećih i dobijanju novih, potentnijih bioloških vrsta za biotehnošku proizvodnju. Ova etapa često se naziva **nova biotehnologija**. Sazrela je svest da pred biotehnologijom stoje neslućene mogućnosti razvoja i rešavanja gorućih problema u proizvodnji lekova, hrane, hemikalija, energenata itd. Intenzivan razvoj nove biotehnologije snažno je podržan principima *održivog razvoja* i zaštite životne sredine.

1.3. RAZVOJ BIOPROCESA I BIOPROCESNE TEHNIKE

Uspešan razvoj biotehnologije podstaknut je razvojem biologije, pre svega mikrobiologije, zatim mikrobiološke i analitičke tehnike, upoznavanjem fiziologije i metabolizma ćelije i procesnog inženjerstva. Značajna otkrića tokom razvoja biotehnologije data su hronološki u tabeli 1.2, dok tabela 1.3 prikazuje bitnije etape u razvoju značajnijih karakteristika bioprocasa. I pored kontinualnog razvoja kroz nekoliko vekova, pravi razvoj bioprocasa i procesne tehnike usledio je tokom drugog svetskog rata, kao rezultat potrebe da se intenzivno razvije proizvodnja penicilina, a zatim i streptomicina, kao esencijalno važnih lekova za lečenje tuberkuloze, kao i razvoja naftne industrije u cilju proizvodnje energenata i prekursora za hemijsku industriju. Taj krupan zadatak je izvršilo hemijsko inženjerstvo iz koga je, uvođenjem bioloških principa, proisteklo i razvilo se *biohemijsko inženjerstvo*.

1.4. OBLASTI DELOVANJA I ZNAČAJNIJI PROIZVODI BIOTEHNOLOGIJE

Biotehnologija je ušla u sve najbitnije oblasti materijalne proizvodnje od egzistencijalnog značaja za čoveka, kao što se može videti iz tabela 1.4 do i 1.7. Pre svega, to je proizvodnja hrane, lekova, hemikalija i energenata, iako su specijalizovane biotehnologije našle primenu u oblastima: medicine, agrara, elektronike, metalurgije, zaštite životne sredine, remedijacije zagađenog zemljišta itd.

Tabela 1.2. Značajniji datumi u razvoju mikrobiologije i biotehnologije

<i>Godina</i>	<i>Istraživač</i>	<i>Otkriće</i>
1684	Antoni van Leewenhoek	Bakterije
1798	Edward Jenner	Vakcine protiv boginja
1958	Louis Pasteur	Mlečno kiselinska fermentacija
1860	Louis Pasteur	Uloga kvasca u alkoholnoj fermentaciji
1867	Robert Lister	Principi antiseptičnosti u hirurgiji
1881	Robert Koch	Metod proučavanja u čistim kulturama
1882	Robert Koch	Uzročnik tuberkuloze
1884	Robert Koch	Kohovi postulati
1884	Christian Gram	Bojenje po Gramu
1889	Martinus Beijerinck	Koncept virusa
1892	D. I. Ivanovski	Virusi
1901	Martinus Beijerinck	Metode oplemenjivanja kultura
1901	Karl Landsteiner	Krvne grupe ljudi

Tabela 1.2. Značajniji datumi u razvoju mikrobiologije i biotehnologije (nastavak)

Godina	Istraživač	Otkriće
1908	Paul Ehrlich	Hemoterapeutski agensi
1915		Proizvodnja pekarskog kvasca
1915/16		Proizvodnja acetona i butanola
1915/16		Proizvodnja glicerola
1920		Proizvodnja limunske kiseline
1928	Frederick Griffith	Transformacije pneumokoka
1929	Alexsander Fleming	Penicilin
1944	Oswald Avery, Colin McLeod, Maclin McCarty	DNK je genetski materijal
1944	Sherman Waksman	Streptomycin
1946	Edvard Tatum, Joshua Lederberg	Konjugacija bakterija
1951	Barbara McCarty	Transpozon
1953	James Watson, Francis Crick, Rosalin Franklin	Struktura DNK
1959	Arthur Pardee, Francois Jacob, Jacque Monod	Genetske regulacije represorskim proteinima
1959	Rodney Porter	Struktura imunoglobulina
1959	F. Macfarlane Burnet	Teorija klonske selekcije
1960	Francois Jacob, David Perrin, Carmon Sanches, Jacque Monod	Koncept operona
1960	Rosalin Yalow, Solomon Bernson	Razvoj radioimunološke analize – RIA
1966	Marshall Nirenberg, Gobin Koharn	Genetski kod
1967	Thomas Brock	Rast bakterija u ključalim vodama
1969	Howard Temin, David Baltimore, Renato Dulbexco	Retrovirusi reverzne transkripcije
1969	Thomas Brock, Hudason Freeye	Izolacija <i>Thermus aquaticus</i> , izvora <i>Taq</i> DNK polimeraze
1970	Hamilton Smit	Specifičnost dejstva restrikcionih enzima
1975	Georges Kohler, Cesar Milstein	Monoklonarna antitela
1976	Susumu Tonegawa	Rearanžiranje gena za imunoglobuline
1977	Carl Woese George Fox	Arhaea
1977	Fred Sanger, Steven Niklen, Alan Coulson	Metod sekvencioniranja DNK
1981	Stanley Prusiner	Karakterizacija priona
1982	Karl Stetter	Izolacija prvog prokariota sa optimalnom temperaturom višom od 100 °C
1983	Luc Montagnier	HIV, uzročnik SIDE
1988	Kary Mullis	Lančane reakcije polimerizacije (PCR)
1995	Craig Venter, Hamilton Smith	Kompletno sekvencioniran bakterijski genom
1999	Institut za genetska istraživanja	Senkvencionirano preko 100 mikrobnih genoma
2002		Sekvencioniran genom čoveka

Tabela 1.3. Razvoj značajnijih karakteristika bioprocasa

<i>Karakteristika</i>	<i>Pre 1900</i>	<i>Do 1940</i>	<i>Nakon 1940</i>	<i>Nakon 1960</i>	<i>Nakon 1980</i>
Bioreaktor	Drveni <6 m ³ Bakarni	Čelik <20 m ³ Aeracija i Mešanje	Aseptični uslovi	Sa mlaznicom pod pritiskom	Sa nosačima biokatalizatora, fluidizovani i fontanski sloj
Kontrola procesa	Termometri i razmenjivači toplote	Off-line (pH i temperatura)	Sterilišuće elektrode (pH i kiseonik)	On-line Računari	Biosenzori Biočipovi
Režim rada	Šaržni	Poluprotlačni	Kontinualni	Kontinualni s recirkulacijom	Sve vrste
Korišćenje poluindustrijskih postrojenja	Ne	Ne	Da	Da	Da
Selekcija bioloških katalizatora	Čisti soj kvasca tek 1896.	Čisti sojevi	Mutacije i selekcija	Genetske manipulacije	Transplatacija gena, trans- gene biljke i životinje

Tabela 1.4. Značajniji proizvodi dobijeni mikrobnom biosintezom i oblast njihove primene

<i>Proizvod</i>	<i>Oblast primene</i>
Fermentisana hrana: Jogurt, kefir, sir, biološki konzervisane namirnice	Prehrambena industrija
Mikrobna biomasa: Pekarski kvasac, krmni kvasac, jednoćelijski proteini (SCP)	Prehrambena industrija, proizvodnja stočne hrane
Etanol: Alkoholna pića, intermedijar u hemijskoj sintezi, rastvarač, energent (gasohol)	Industrija alkoholnih pića, hemijska industrija, naftna industrija
Rastvarači: Aceton, butanol	Hemijska industrija
Organske kiseline: Limunska, mlečna, sirćetna, glukonska	Prehrambena i hemijska indudustrija
Antibiotici: Penicilin, streptomycin, tetraciklin	Farmaceutska industrija
Polisaharidi: Ugljenohidratni polimeri, pululan, ksantan	Prehrambena i farmaceutska industrija
Aminokiseline: Glutaminska kiselina, lizin	Prehrambena i farmaceutska industrija
Enzimi: Amilaze, proteaze, lipaze	Prehrambena industrija i biotehnologija

Tabela 1.4. Značajniji proizvodi dobijeni mikrobnom biosintezom i oblast njihove primene (nastavak)

<i>Proizvod</i>	<i>Oblast primene</i>
Fiziološki aktivne supstance: Vitamini, hormoni, vakcine, alkaloidi, insekticidi	Farmaceutska industrija
Izluživanje ruda	Metalurgija
Obrada otpadnih voda i čvrstog otpada	Zaštita životne sredine

Tabela 1.5. Primeri industrijski značajnih primarnih metabolita

<i>Metabolit</i>	<i>Mikroorganizam</i>	<i>Primena</i>
Glutamat	<i>Corinebacterium glutaminicum</i> <i>Brevibacterium sp.</i>	Dodatak hrani (pojačavač ukusa)
Lizin, treonin	<i>Corinebacterium glutaminicum</i> <i>Brevibacterium flavum</i>	Dodatak hrani
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Clostridium thermocellum</i>	Alkoholna pića, rastvarač, energent (gasohol)
Sirćetna kiselina	<i>Acetobacter sp.</i>	Začin, konzervans, intermedijar u hemijskoj sintezi
Limunska kiselina	<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida sp.</i>	Začin, farmaceutska sirovina
Mlečna kiselina	<i>Lactobacillus sp.</i>	Dodatak hrani, konzervans
Vitamin B ₁₂	<i>Propionibacterium shermanii</i>	Dodatak hrani, lek
Vitamin B ₂	<i>Eremothecium ashbyii</i> <i>Ashbyii gossypii</i>	Dodatak hrani, lek

Tabela 1.6. Primeri proizvodnih mikroorganizama i biotransformacija

<i>Supstrat i mikroorganizam</i>	<i>Proces biotransformacije</i>
STEROIDI	
<i>Rhizopus nigricans</i>	Hidroksilacija progesterona
<i>Archrobacter simplex</i>	Dehidrogenacija hidrokortizona
ATIBIOTICI	
<i>Escherichia coli</i>	Deacilacija benzilpenicilina (dobijanje 6-APK)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Acilacija 6-APK
<i>Kluyvera citrophilia</i>	Acilacija 7-APK
UGLJENI HIDRATI	
<i>Acetobacter suboxidans</i>	Oksidacija glicerola u dihidroksiaceton
<i>Acetobacter xylinum</i>	Oksidacija sorbitola u sorbozu
<i>Aspergillus flavus</i>	Oksidacija glukoze u <i>koi</i> kiselinu
<i>Torulopsis sp.</i>	Redukcija manoze u manitol
<i>Bacillus coagulans</i>	Izomerizacija glukoze u fruktozu
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Konverzija glukoze u etanol

Tabela 1.6. Primeri proizvodnih mikroorganizama i biotransformacija (nastavak)

<i>Supstrat i mikroorganizam</i>	<i>Proces biotransformacije</i>
ZAGAĐIVAČI <i>Pseudomonas putida</i> <i>Nocardia restricta</i> <i>Flavobacterium sp.</i>	Degradacija aromatičnih jedinjenja

Tabela 1.7. Značajniji proizvodi dobijeni pomoću kulture biljnih i animalnih ćelija

<i>Kultura</i>	<i>Vrsta proizvoda</i>	<i>Proizvodi</i>
Biljne ćelije	Farmaceutici	Ajmalicin, atropin, kampotothecin, diosquenin, digitoksin, L-dopa, hipercium, hiosciamin, morfin, fototoksin, sangranin, skopolamin, ubihinon-10, vakcine, vincristin, vinblastin
	Prehrambene boje	Antocijanini, betacianin, safron, šikonin
	Arome	Vanila, jagoda, grejp, beli luk, crni luk
	Mirisne supstance	Jasmin, limun, mint, ruža, sandalovina, vetiver
	Zaslađivači	Mirakulin, momelin, steviozid, taumatin
	Hemikalije za poljoprivredu	Aleopatske hemikalije, azodirathtin, nerifolin, hipertrin, rotenon, salanin, tiofen
Animalne ćelije	Imunobiološke supstance	Monoklonarna antitela, interleukini, limfokini
	Ostali proizvodi	Virusne vakcine, antigeni, hormoni, enzimi, insekticidi, faktori rasta, individualne ćelije, tkiva, organi

1.4.1. Proizvodnja hrane

Klasična proizvodnja hrane na bazi poljoprivrede i stočarstva doživela je pravu tzv. “zelenu revoluciju” okarakterisanu usavršenim tehnologijama ratarenja, selekcijom rodnijeg i na klimatske uslove otpornijeg bilja, selekcijom i naprednijim načinom uzgoja stoke, upotrebom mineralnih đubriva i zaštitnih sredstava (insekticida i herbicida), skoro potpunom mehanizacijom, uvođenjem genetski modifikovanih i transgenih vrsta itd. „Zelena revolucija” je dala velike rezultate, ali nije rešila osnovni problem savremenog čovečanstva: kako obezbediti dovoljne količine biološki vredne hrane za stanovništvo koje je u stalnom porastu.

U težnji za što većom proizvodnjom, uvedeno je intenzivno ratarenje koje zahteva veliku mineralizaciju zemljišta (unošenje teških metala preko mineralnog đubriva) i veliku potrošnju zaštitnih sredstava. Ovo je dovelo do dramatičnih poremećaja biološke ravnoteže u zemljištu, sa postepenim opadanjem rodosti i smanjivanjem kvaliteta proizvoda.

U cilju dobijanja organoleptički što kvalitetnijih i za čuvanje što stabilnijih proizvoda, u industrijskoj preradi se poljoprivredni proizvodi podvrgavaju brojnim procesima i operacijama. Ovo je imalo za posledicu razlaganje biološki vrednih, a nedovoljno stabilnih supstanci. Kao rezultat, proizvedena hrana nema biološku vrednost da čoveka podmiri svim neophodnim sastojcima, a posebno se iskazuje manjak biološki aktivnih supstanci, zaštitnika zdravlja. Ta pojava je okarakterisana kao “skrivena glad”, od koje pati stanovništvo ne samo nerazvijenih, već i visoko razvijenih

zemalja. To je nametnulo potrebu da se u hranu moraju dodavati nedostajuće biološki aktivne komponente (vitamini, antioksidansi, aminokiseline, mikroelementi itd.). U proizvodnji ovih prirodnih dodataka hrani, centralno mesto zauzima biotehnologija, sa proizvodnjom vitamina i aminokiselina, proteina i antioksidanasa.

Još jedan od bitnih problema u ishrani svetskog stanovništva je manjak biološki vrednih belančevina u odnosu na ugljenohidratnu hranu biljnog porekla, iz čega proističe veliki debalans u ishrani. Biljni proteini ne poseduju pun spektar esencijalnih aminokiselina (cistin, cistein, treonin, lizin) i taj manjak se mora kompenzovati belančevinama životinjskog porekla. Proizvodnja mesa domaćih životinja ima visoku cenu, pa stanovništvo u nerazvijenim zemljama nije u mogućnosti da finansijski obezbedi potrebne količine. Biotehnologija pruža rešenje ovog problema proizvodnjom mikrobnih proteina (proteini jednoćelijskih organizama) koji u svojoj biomasi sadrže više od 50 % punovrednih belančevina. Značaj mogućnosti biotehnoške proizvodnje proteina jednoćelijskih organizama može se sagledati iz sledeće analize:

Pri tovu goveda: od 500 kg biomase, moguće je postići prinos od 500 g mesa/dan u kome je sadržano 100 g belančevina;

Pri gajenju soje: iz 500 kg biomase dobija se prinos 37 kg belančevina/dan;

Pri gajenju mikroorganizama (kvasaca, nekih plesni i bakterija): iz 500 kg biomase dobija se prinos od 45 tona belančevina/dan.

Razlog ovako visokom prinosu belančevina pri gajenju mikroorganizama je velika mikrobiološka efikasnost u konverziji hrane i kratko vreme umnožavanja (vreme generisanja), što se vidi iz sledećih podataka:

Bakterije za 24 časa mogu metabolizovati 30 – 40 puta veću količinu hrane od vlastite mase;

Od jedne ćelije, čija masa iznosi oko 0,02 mg, posle 16 časova formira se oko 1 mg biomase, a posle 24 časa formira se oko 1 kg;

Pri gajenju kvasaca u biološkom reaktoru, na svaki m³ korisne zapremine reaktora, u optimalnim uslovima, dobije se 3 kg biomase u toku 1 časa.

Mikrobna biomasa dobijena biotehnoškim postupcima u proseku sadrži oko 50 % belančevina pune biološke vrednosti i može se koristiti u ishrani ljudi i stoke. Bitno je što se u ovoj proizvodnji, kao sirovina, koristi ugljenohidratna biomasa uzgajanih biljaka sa visokim sadržajem skroba ili inulina, ali i otpadni proizvodi prehrambene industrije.

1.4.2. Proizvodnja farmaceutika

Korišćenjem, selekcijom i genetskim poboljšavanjem mikroorganizama, biljnih i animalnih ćelija, tkiva i njihovih delova biotehnologija je već dala nemerljiv doprinos farmaceutskoj industriji i medicini. Time su stvoreni uslovi za ostvarenje većitog čovekovog sna: skoro potpune imunizacije, usporavanja, ako ne i zaustavljanja procesa starenja, kao i poboljšavanja fizičkog i umnog potencijala. Dosadašnji rezultati pokazuju da će se daljim razvojem biotehnologije ostvariti još jedan san čoveka: dobijanje tkiva i ljudskih organa, što će dati nove neslućene mogućnosti. Već postignuto poznavanje ljudskog genoma, a buduće utvrđivanje lokacije gena omogućiće pravo vreme utvrđivanje genskih anomalija i njihovo ispravljanje.

1.4.3. Proizvodnja agrohemikalija

Intenzivno ratarstvo i stočarstvo zahtevaju upotrebu velikih količina mineralnih đubriva, bioloških stimulativnih i zaštitnih agenasa nazvanih agrohemikalijama, koji dugom upotrebom zagađuju zemljište i hranu. Zbog toga se u agraru i stočarstvu formira specifična "spiralna hazarda": sve veće potrebe za hranom zahtevaju sve veće potrebe za agrohemikalijama, što ima za posledicu stalno povećanje zagađenja koje ove hemikalije izazivaju. Još je dramatičnija činjenica da štetočine i korovi vremenom postaju otporni na korišćene hemikalije, pa se moraju proizvoditi nove, koje su po delovanju efikasnije, ali i toksičnija za čoveka.

Pošto agrohemikalije ne deluju strogo selektivno na biljne štetočine i korove, već i na biljke koje se štite, genetskim manipulacijama formirane su biljne vrste otporne na određene agrohemikalije. Dobijaju se i transgene vrste biljaka i životinja sa većom otpornošću na uslove okoline i delovanje agrohemikalija. Za sada nema dokaza da takve biljke i životinje konzumirane od strane čoveka neće u perspektivi iskazati štetna dejstva, kao, na primer, mutacije. Otpor njihovom korišćenju u svetu je veoma velik, a u pojedinim zemljama postoje zabrane njihovog korišćenja.

I u rešavanju ovog veoma ozbiljnog problema biotehnologija već daje značajne rezultate. Proizvodnjom bioloških insekticida i pesticida spirala hazarda se za sada može značajno usporiti, a u budućnosti i potpuno izbeći. U proizvodnji bioloških đubriva, koja su najbolja zamena za mineralna, već sada su razvijeni biotehnološki postupci kompostiranja i metanizacije organskog otpada.

1.4.4. Proizvodnja hemikalija

Najveći deo organske hemijske industrije je baziran na fosilnoj sirovinskoj bazi (nafta i zemni gas, a u manjoj meri uglj), koja je iscrpljiva i kojoj cena permanentno raste. Zbog toga je u svetu poslednjih decenija pokrenuta intenzivna aktivnost za prelazak sa neobnovljivih na stalno obnovljive prirodne resurse, što može najuspešnije ostvariti biotehnologija.

U dosadašnjem toku razvoja, biotehnološkim putem proizvode se brojne hemikalije: organske kiseline, ratvarači i alkoholi. Ova vrsta proizvoda nastaje biosintezom pomoću mikroorganizama, i to kao primarni ili sekundarni metaboliti (tabela 1.8) ili se dobijaju postupcima biotransformacije (tabela 1.9).

Kao sirovinska baza za proizvodnju hemikalija koriste se, pre svega, sporedni i otpadni proizvodi prehrambene industrije, koji su bogati ugljenim hidratima ili celulozom, ostaci u preradi drveta (lignoceluloza) i pojedini sastojci nafte (visokomolekularni parafini). Značajna sirovinska baza su viškovi i havarisanih žitarica i poljoprivredne kulture niskih agrotehničkih zahteva (sirak, topinambur). Najveća sirovinska baza za ovu vrstu proizvodnje su stalno obnovljiva lignocelulozna biomasa, koja se dobija kao otpad u poljoprivredi (žitna slama, kukuruzovina, zeleno bilje), otpad drvne industrije i plantažno gajena biomasa visokorodnih stabala.

Bitno je naglasiti da su hemikalije dobijene biotehnološkim putem intermedijari u hemijskoj sintezi, tj. sirovine za tu industriju. Na taj način, biotehnologija čini ranije nedostajući most između hemijske industrije i poljoprivrede, što i jednoj i drugoj grani daje velike razvojne mogućnosti. Ovaj most je od posebnog značaja za zemlje sa dobrom poljoprivrednom osnovom i tradicijom,

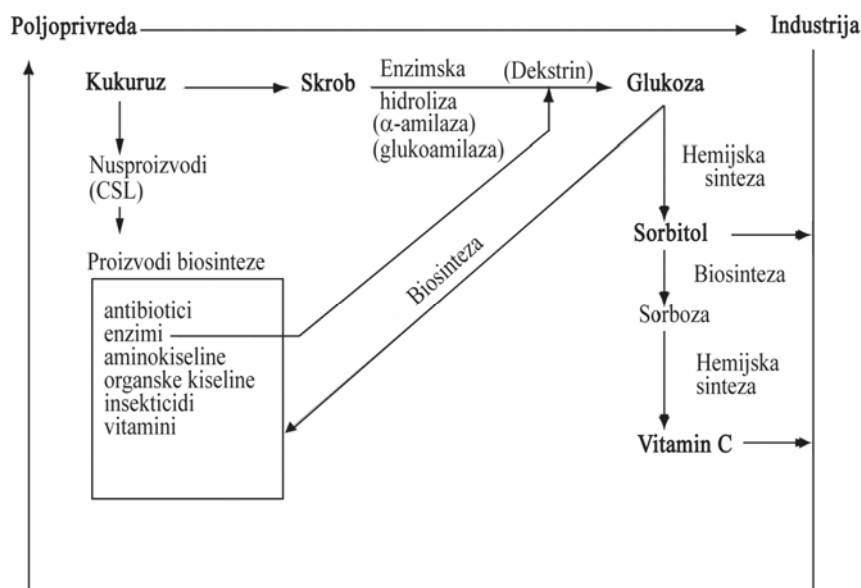
kakva je i naša zemlja. Dobar primer za tu vrstu spoja je biotehnoška proizvodnja na bazi kukuruza sa korišćenjem tih proizvoda u hemijskoj sintezi, što je prikazano na slici 1.2. Treba imati na umu da je ovo samo primer, a broj mostova koji se mogu formirati između poljoprivrede i hemijske industrije je već danas veoma velik. Jedna od mogućnosti koja se odnosi na biotehnošku proizvodnju etanola i njegovog korišćenja u hemijskoj industriji opisana je u poglavlju 7.

Tabela 1.8 Primeri biosinteze industrijski značajnih hemikalija

<i>Metabolit</i>	<i>Mikroorganizam</i>	<i>Primena</i>
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Zimomonas mobilis</i> <i>Clostridium thermocellum</i>	Alkoholna pića, rastvarač, energent (gasohol)
Sirćetna kiselina	<i>Acetobacter sp.</i>	Začin, konzervans, intermedijar u hemijskoj sintezi
Aceton i butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Rastvarač, sirovina za polimere
Limunska kiselina	<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida sp.</i>	Začin, farmaceutska sirovina
Itakonska kiselina	<i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus itaconicus</i>	Sirovina za veštačka vlakna i smole
Fumarna kiselina	<i>Rhizopium arrhizus</i> <i>Rhizopium nigricans</i>	Sirovina za plastične mase

Tabela 1.9. Značajniji proizvodi dobijeni biotransformacijom

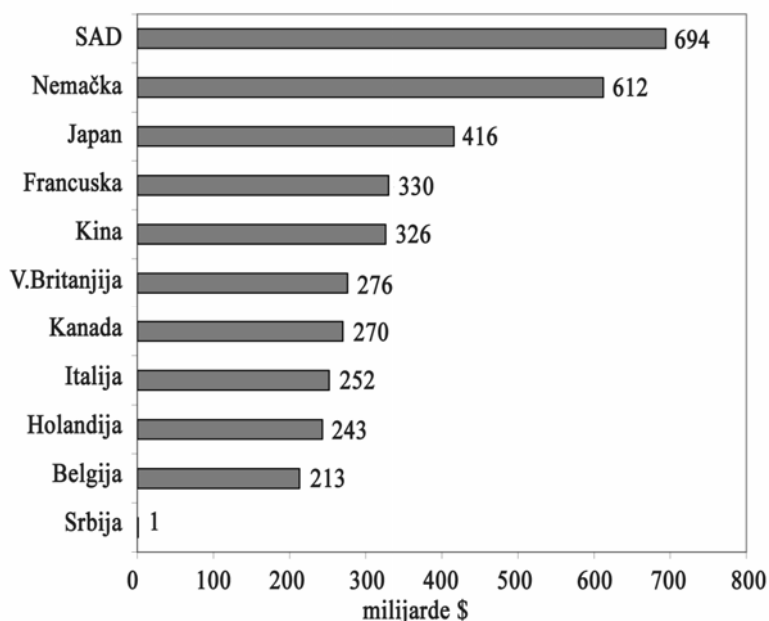
<i>Polazni supstrat (jedinjenje)</i>	<i>Proizvod</i>
Etanol	Sirćetna kiselina
Propanol	Propionska kiselina
Izopropanol	Aceton
Glicerol	Dihiroksiaceton
2,3-Butadiol	Acetoin
Manitol	Fruktoza
Sorbitol	Sorboza
Glukoza	Glukonska kiselina
Glukonska kiselina	5-Ketoglukonska kiselina
Glukonska kiselina	2-Ketoglukonska kiselina
D-fenilalanin	L-Fenilalanin
Maleinska kiselina	Fumarna kiselina
Kortizon	Prednison



Slika 1.2 Šematski prikaz veze između biosinteze i hemijske sinteze

1.5. OBIM BIOTEHNOLOŠKE PROIZVODNJE DANAS

Vrednost proizvoda dobijenih od nafte i zemnog gasa tokom 2000. godine je bila jednaka vrednosti proizvoda biotehnologije. U budućem periodu će ta vrednost biti svakako u korist biotehnologije pa ne iznenađuje da su najrazvijenije zemlje današnjice najviše sredstava uložile upravo u razvoj biotehnologije. Podaci o obimu izvoza najrazvijenijih zemalja sveta u 2002. godini, koji su dati na slici 1.3, pokazuju da vodeće mesto po izvozu imaju upravo one zemlje u kojima je najrazvijenija biotehnoška proizvodnja. Površina zemlje i broj stanovnika nisu limitirajući faktori, već je to samo količina znanja koja se ulaže u proizvodnju uopšte. Na primer, Holandija i Belgija su po broju stanovnika slične našoj zemlji (u milionima: Holandija 15, Belgija 10 i Srbija 9), a po površini su znatno manje (u hiljadama km² približno: Holandija 40, Belgija 30 a Srbija 100). Ovo pokazuje da naša zemlja ima veliku perspektivu u oblasti razvoja biotehnoške proizvodnje. Taj stav snažno podržava činjenica da naša zemlja ima ogromne poljoprivredne potencijale i da razvojem biotehnoške proizvodnje može ostvariti čvrste mostove razvoja hemijske industrije na stalno obnovljivoj sirovinskoj bazi. Razvoj naše zemlje na ovoj osnovi bio bi u potpunosti u kontekstu principa održivog razvoja, što je imperativni zahtev budućnosti.



Slika 1.3 Podaci o vrednosti izvoza najrazvijenijih zemalja u 2002. godini

1.6. STRUKTURA BIOTEHNOLOŠKOG PROCESA

Pod pojmom bioproces podrazumeva se, u principu, hemijska reakcija katalizovana biološkim katalizatorom. Pojedinačni bioprocesi se mogu funkcionalno i strogo sinhronizovano povezivati u složene sisteme. Najsloženiji sistem međusobno povezanih bioprocera na našoj planeti, koji je prirodno nastao, rezultirao je u formiranju živih bića. Iako je taj sistem baziran na mnogobrojnim pojedinačnim bioproceima, zbog uredenog i sinhronizovanog delovanja, on se iskazuje kao jedinstven bioproces.

Za korišćenje bioprocera u industrijskoj proizvodnji, tj. biotehnologiji postoje dve mogućnosti (slika 1.4), i to korišćenje:

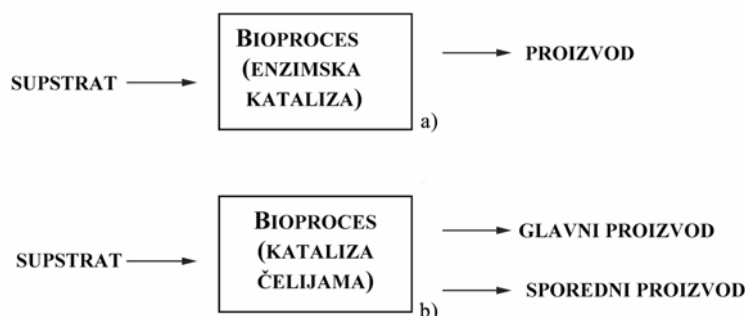
- pojedinačnih bioprocera sa enzimima kao katalizatorima i
- bioprocera u složenim sistemima sa mikrobnim, animalnim ili biljnim ćelijama.

Posmatrano sa inženjerskog aspekta, vidljivo je da se:

- prostor u kome se odvija bioproces može posmatrati kao reaktor, koji se, pošto je proces katalizovan biološkim katalizatorima, naziva se **bioreaktor**;
- kod enzimske katalize supstrat transformiše u proizvod bez sporednih proizvoda, jer je katalizator strogo specifičan;

– kod katalize ćelijama, pored glavnog, nastaje i sporedni proizvod, jer ćelije deluju kao složeni sistemi u kojima se odvija bezbroj bioprocasa nazvanih *metabolizam*.

Enzimski katalizovan bioproces u bioreaktoru je analogan hemijski katalizovanom procesu u hemijskom reaktoru, s tim što je prvi strogo selektivan i daje jedan proizvod, zbog čega je njegova industrijska realizacija jednostavnija (na primer, izostaje izdvajanje željenog proizvoda od sporednih itd.).



Slika 1.4 Šematski prikaz osnovne strukture načina delovanja bioprocasa katalizovanih enzimima (A) i ćelijama (B)

Bioproces katalizovan ćelijama, zbog delovanja mnogobrojnih procesa u metabolizmu ćelije, znatno je složeniji od enzimski katalizovanog bioprocasa. Složenost delovanja ćelija se još više usložnjava činjenicom da one nikada ne deluju samostalno, već u okviru populacije. To znači da bioprocasi katalizovani ćelijama funkcionišu na više nivoa. Da bi ćelija normalno funkcionisala, svi ti nivoi moraju biti međusobno povezani i sinhronizovani. Bez obzira na svu složenost katalize ćelijama, mogu se naznačiti tri bitna nivoa funkcionisanja:

Molekulski nivo u koji spadaju: metaboličke reakcije sa regulacijom i kontrolom i genetska regulacija;

Ćelijski(mikroskopski) nivo u koji spadaju: transport supstrata i metabolita, kompleksna biohemijska mreža, organi i organele, morfološka diferencijacija i ćelijski ciklusi;

Nivo populacije (makroskopski nivo) u koji spadaju: odnos zapremina/površina, starost populacije, stabilnost selekcionisanih i rekombiniranih populacija, mono kultura ili mešana kultura i odnosi u populaciji.

Sva tri nivoa delovanja odigravaju se u životnom prostoru ćelije. U primeru na slici 1.4b taj životni prostor je bioreaktor.

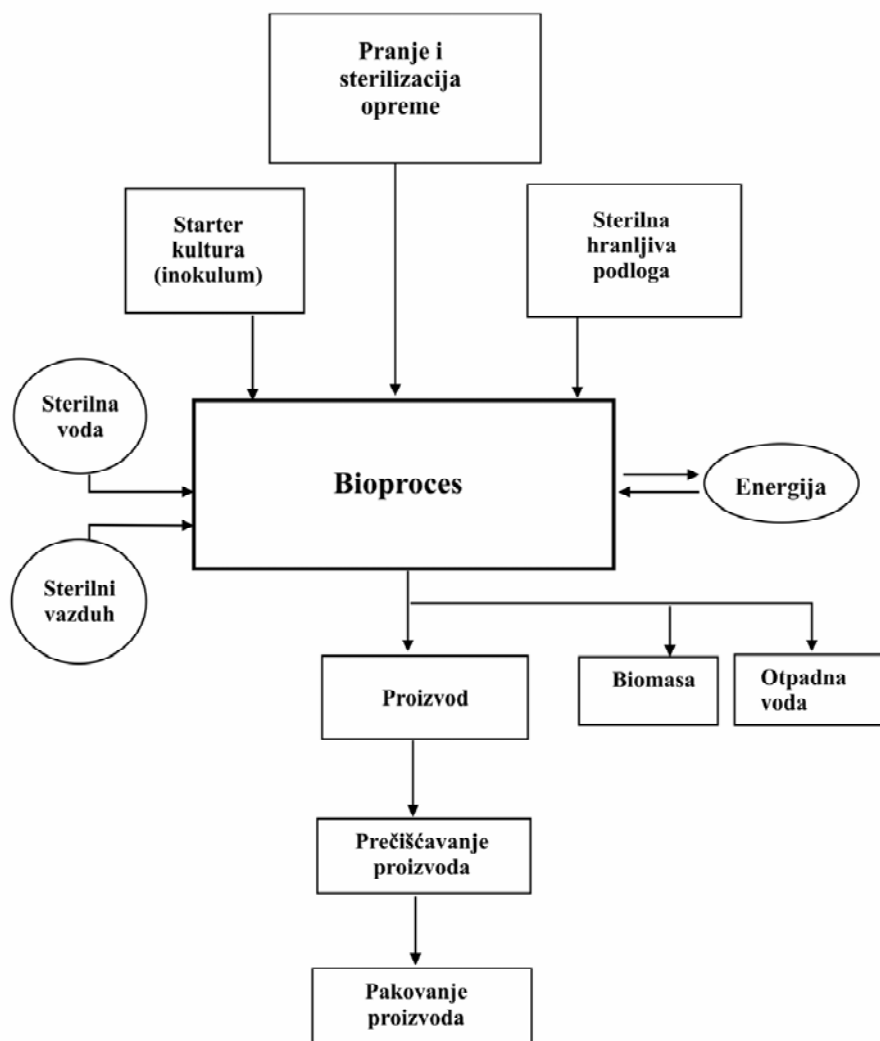
Ako se proces katalizovan ćelijama u bioreaktoru želi preneti u industrijsku proizvodnju, neophodno je uspostaviti još jedan nivo delovanja, tj. **nivo proizvodnje** u koji spadaju:

- faza pripreme za proizvodni bioproces;
- faza izvođenja bioprocasa;
- završna faze izdvajanja i prečišćavanja proizvoda;
- postupci zaštite životne sredine.

Na ovaj način je definisana **osnovna struktura** svakog biotehnološkog postupka zasnovanog na bioprocima koji su katalizovani ćelijama, kao što je prikazano na slikama 1.5 i 1.6.

Pripremna faza u biotehnološkoj proizvodnji uključuje:

- pripremu hranljive podloge,
- pripremu biološkog katalizatora (starter kulture),
- sterilizaciju i čuvanje hranljive podloge i
- sterilizaciju postrojenja, vazduha i dodataka u bioproc.

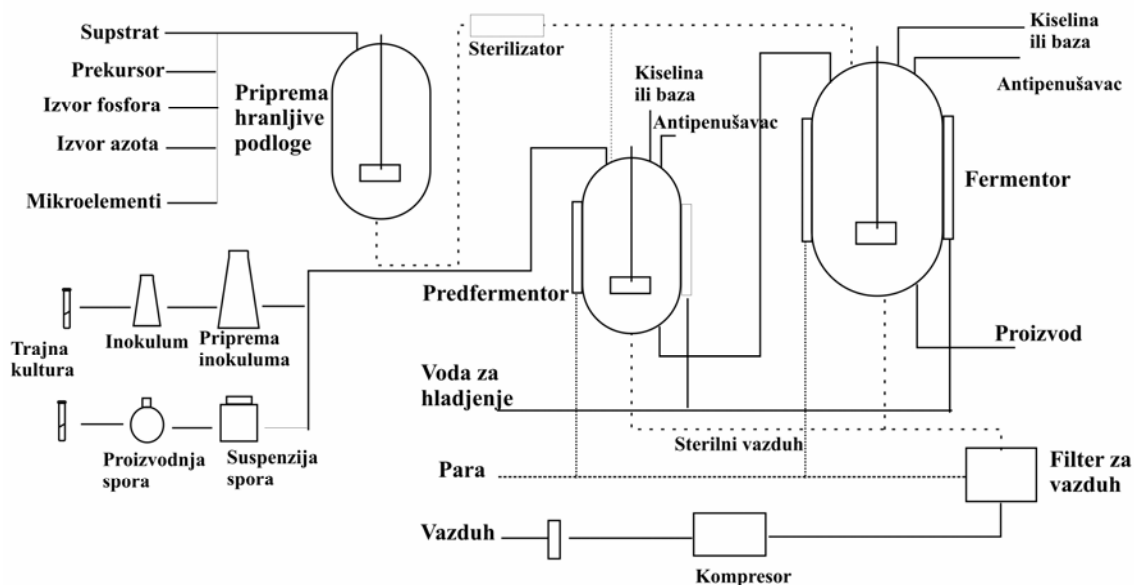


Slika 1.5 Opšta šema biotehnološkog postupka

Faza izvođenja biotehnološkog procesa uključuje izvođenje biotehnološkog procesa u bioreaktoru sa kontrolom i upravljanjem bioprocenom.

Završna faza u biotehnološkoj proizvodnji uključuje:

- obradu finalne fermentacione tečnosti,
- izolaciju proizvoda,
- prečišćavanje proizvoda,
- završnu obradu proizvoda (stabilizacija, pakovanje i čuvanje) i
- postupke zaštite životne sredine.



Slika 1.6 Šematski prikaz jednog hipotetičkog biotehnološkog postupka

Svaka od navedenih faza biotehnološke proizvodnje bitno utiče na uspešnost biotehnološkog postupka, koja se meri *kvalitetom proizvoda* i *produktivnošću*. Pogreške u bilo kojoj od njih mogu imati za posledicu, ne samo umanjeње kvaliteta proizvoda i produktivnosti, već i potpuno skretanje procesa u neželjenom pravcu. Izbor proizvodnog organizma i sastav hranljive podloge, održavanje zahtevanih tehnoloških parametara procesa, uspešna izolacija i prečišćavanje proizvoda sa njegovom završnom obradom, kao i održavanje sterilnih uslova, zahtevaju visok stepen obučenosti, veština i savesnosti radnika uključenih u svim fazama proizvodnje. U skladu sa principima održivog razvoja, svaka proizvodnja mora uključiti principe zaštite životne sredine, ne samo radi izbegavanja sukoba sa zakonodavstvom i ozbiljnim kaznama koje slede ako se principi zaštite ne poštuju, već pre svega radi očuvanja prirode i perspektive opstanka na planeti.

2. BIOLOŠKI KATALIZATORI

Pod biološkim katalizatorima podrazumevaju se biološke vrste i njihovi proizvodi ili delovi koji imaju sposobnost konverzije supstrata (sirovine) u korisne proizvode. U biotehnološkoj proizvodnji koriste se dve grupe bioloških katalizatora:

- mikrobne, animalne i biljne ćelije i tkiva i
- enzimi.

2.1. MIKROORGANIZMI

Rečenica „*mikroorganizmi su veoma mali, ali im je moć veoma velika*“ na pravi način iskazuje potrebu da se toj biološkoj vrsti posveti najveća moguća pažnja. Brojni su oni koji veruju da su mikroorganizmi isključivo uzročnici bolesti, kvarenja hrane i drugih štetnih pojava, a malo je onih koji znaju da se sposobnost mikroorganizama da sintetizuju i transformišu pojedine supstance koristi za dobijanje korisnih proizvoda, kao što su farmaceutici, hemikalije i energenti. Zbog toga se mikroorganizmi mogu svrstati u *štetne (patogene)* i *korisne*. U ovom tekstu pažnja je prvenstveno posvećena korisnim mikroorganizima.

Broj opšte korisnih mikroorganizama nije veliki, a još ih je manje korisnih za industrijsku proizvodnju. Zato je, među brojnim nekorisnim, pa i štetnim mikroorganizmima, potrebno identifikovati korisne, zatim ih izdvojiti iz prirodnih staništa (izolovati), izučiti njihova svojstva i odrediti uslove za njihovo optimalno gajenje radi korišćenja u industrijskoj proizvodnji. Dalji korak je da se oplemene (poboljšaju) njihova prirodna svojstva, koja su korisna za proizvodnju, primenom različitih tehnika.

Među mikroorganizmima ima onih koji mogu živeti u uslovima sličnim za život čoveka ali i onih koji mogu egzistirati u ekstremno nepovoljnim uslovima za život. Ovakve mikrobiološke vrste nazivaju se *ekstremofili* i imaju značajnu ulogu u novoj biotehnologiji, na primer u izluživanju metala iz siromašnih ruda, desulfurizaciji uglja itd.

2.1.1. Taksonomija, nomenklatura i klasifikacija mikroorganizama

S obzirom na veoma veliki broj i raznovrsnost mikroorganizama, postoje značajni problemi u njihovoj klasifikaciji. *Taksonomija* organizuje i sumira saznanja o različitim biološkim vrstama. Iako nije bliska inženjerima, ona je od velikog značaja u komunikaciji među biotehničarima i naučnicima koji izučavaju živi svet.

Nomenklatura utvrđuje aktuelno imenovanje mikroorganizama latinskim jezikom. *Rod* je grupa srodnih mikroorganizama, a *vrsta* uključuje mikroorganizme koji su esencijalno slični. Na primer, kod bakterije *Escherichia coli*, prvi deo imena označava *rod*, a drugi deo vrstu. Vrsta uključuje više mikroorganizama veoma sličnih karakteristika, s tim što svaki od njih poseduje specifične osobine koje su sa određenog stanovišta, posebno primene, veoma bitne i nazivaju se *sojevi*. Sojevi u okviru vrste se označavaju dodatnim slovima i brojevima, na primer, *Escherichia coli* K12.

Klasifikacija. Ne postoji opšta saglasnost u klasifikaciji mikroorganizama, koja je za sada arbitralna. Saglasnost postoji u podeli mikroorganizama prema građi ćelija u dva velika tipa: *eukariote* i *prokariote*. Ova dva tipa mikroorganizama se međusobno razlikuju po prisustvu ili odsustvu membrana oko ćelija i po genetskoj informaciji. *Prokariotske ćelije* imaju jednostavnu strukturu sa jednim hromozomom (molekul DNK), a nemaju nukleusnu membranu i organele, kao što su mitohondrije i endoplazmatični retikulum. *Eukariotske ćelije* su mnogo složenije ćelijske građe. One sadrže veći broj hromozoma u nukleusu, koji ima membranu, mitohondrije, endoplazmatični retikulum, golgi aparat i više različitih organela.

Skorija saznanja o biološkom svetu još su više iskomplikovala situaciju. Danas se polazi od stava da je od zajedničkog pra-pretku razvoj tekao u tri pravca:

- *arhaebakterije* (metanogene, halofilne, termoacidofilne),
- *eubakterije* (većina bakterija) i
- *eukariote* (biljke, životinje, protisti: alge, fungi, protozoe).

Osnovne karakteristike bioloških vrsta date su u tabeli 2.1. i 2.2.

Tabela 2.1. Do sada utvrđena ćelijska suborganizacija eukariota, prokariota. i arhaea bakterija

<i>Grupa</i>	<i>Ćelijska struktura</i>	<i>Karakteristike</i>	<i>Vrste u grupi</i>
Eukariote	Eukariotska	<i>Višećelijska</i> , ekstenzivna diferencijacija ćelija i tkiva <i>Jednoćelijska</i> , koenocitična ili micelijalna, diferencijacija tkiva mala ili bez	<i>Biljke</i> (semenjače, paprat, mahovine) <i>Životinje</i> (vertebrate, nevertebrate) <i>Protisti</i> (alge, gljive, protozoe)
Eubakterije Arhaea bakterije	Prokariotska Prokariotska	Metabolizam sličan eukariotama Specifičan metabolizam	Većina bakterija Metanogeni, halofili, termoacidofili

Arhaebakterije su po izgledu slične eubakterijama, ali se bitno razlikuju na molekularnom nivou po čemu su sličnije eukariotskim vrstama. Ova vrsta bakterija živi u ekstremnom okruženju koje podseća na uslove ranog perioda razvoja planete po čemu su i dobile naziv. Mnoge od njih su značajne u biotehnologiji, na primer metanogene bakterije (proizvodnja biogasa) i sumpor redukujuće vrste (izluživanje metala). Neke od njih produkuju veoma stabilne biološke katalizatore – enzime.

Eubakterije se razvrstavaju u više različitih grupa. Jedan od načina razlikovanja među vrstama je poznato bojenje po Gram-u (bojenje kristal violetom pod određenim uslovima) na *gram pozitivne* (boje se u purpurno) i *gram negativne* (ostaju nebojene). Sposobnost bojenja gram pozitivnih vrsta omogućena je postojanjem spoljašnje membrane od peptidoglukana koji prima boju, dok gram negativne vrste tu membranu nemaju. Neke bakterije se ne mogu razvrstavati po Gram-u, jer nemaju ćelijski zid, kao, na primer, *Mycoplasma* koja izaziva pneumoniju, a može izazvati i kontaminaciju u bioreaktorima za animalne ćelije.

Tabela 2.2. Uporedni prikaz osobina prokariota i eukariota

<i>Karakteristike</i>	<i>Prokarioti</i>	<i>Eukarioti</i>
Genom		
Broj DNA molekula	Jedan	Više od jednog
DNA u organelama	Nema	Ima
DNA kao hromozom	Nema	Ima
Nukleusna membrana	Nema	Ima
Mitotička i meiotička deoba nukleusa	Ima	Ima
Organele	Nema	Ima
Mitohondrije	Nema	Ima
Endoplazmatični retikulum	Nema	Ima
Golgi aparat	Hromozomi	Hloroplast
Fotoasintetski aparat	Proteini jednostavne strukture	Kompleksna struktura sa mikrotubulama
Flagele		
Spore		
Vrsta	Endospore	Endo- i egzo spore
Otpornost na toplotu	Visoka	Niska

Neke eubakterije imaju sposobnost fotosinteze. Na primer, *Cyanobacteria* (nazvana plavo – zelena alga) sadrži hlorofil i transformiše CO₂ u šećere. Za razliku od prave fotosinteze, neoksigene fotosintetičke bakterije (ljubičaste i zelene bakterije) sadrže pigment bakteriohlorofil, ne razlažu vodu i ne proizvode kiseonik.

Pojedine eubakterije su od velikog značaja za biotehnološku proizvodnju. Na primer, neke vrste aktinomiceta (*Actinomycetes*), koje su morfološki slične plesnima (*eukariote*), jer formiraju micelijum, dobri su producenti proteaza i amilaza, a neke su producenti antibiotika, amilaza, celulaza, polisaharida ili polipeptida (za proizvodnju kapsula).

Eukariote uključuju biljne i životinjske ćelije, kvasce i gljive (fungi), alge i protozoe. Sadrže pravi nukleus i veći broj organela unutar ćelije. Ćelije eukariota su i do deset puta veće od prokariota, na primer, kod biljaka oko 20 µm, životinja oko 10 µm i kvasaca 5 µm. Struktura ćelijskog zida i membrane je slična prokariotima. Bitna razlika je što eukarioti u citoplazmatičnoj membrani sadrže sterole koji učvršćuju strukturu membrane i daju joj veću elastičnost. U pogledu strukture

ćelijskog zida među eukariotima postoje značajne razlike. Neke vrste u ćelijskom zidu sadrže peptido-glukanski sloj, a neke vrste uključuju polisaharide i celulozu (na primer, alge).

Gljive su veoma rasprostranjene u prirodi, a spadaju u heterotrofe. Najvažnije grupe su kvasci i plesni.

Kvasci su veoma značajna grupa mikroorganizama u biotehnološkoj proizvodnji. Najviše se koristi fakultativna vrsta *Saccharomyces cerevisiae*. U anaerobnim uslovima oni se koriste za proizvodnju etanola i pića (vino, pivo, voćne rakije), a u aerobnim uslovima za proizvodnju pekarskog kvasca. Čelije kvasaca su pojedinačne, pod određenim uslovima se povezuju u lažni micelijum, oblik im je sferan, ovalan ili cilindričan. Malih su dimenzija – 5 do 10 μm .

Plesni su, kao i kvasci, od velikog značaja za biotehnološku proizvodnju, na primer limunske kiseline (*Aspergillus niger*) i mnogih antibiotika, kao što je penicilin (*Penicillium chrysogenum*). Imaju micelarnu, često veoma razgranatu strukturu. Filamentozne forme imaju veličinu 5–20 μm . Mogu rasti suspendovani u tečnom supstratu (*submerzno*) i na površini supstrata (*imerzno*). Kada rastu submerzno, često formiraju ćelijske agregate i pelete. Ova osobina može uticati na prenos mase nutrijenata i kiseonika do ćelija unutar agregata. Formiranje peleta može imati pozitivnu stranu za njihovo gajenje u bioreaktorima jer smanjuju viskozitet tečnog supstrata, što doprinosi povećanju brzine prenosa mase i sprečava kidanje micela usled mešanja.

Alge su, u principu, jednoćelijski organizmi, iako ima i višećelijskih, koje žive u morskoj vodi. Tipična veličina ćelija je 10 – 30 μm . Sve alge sadrže pigment hloroplast, koji omogućava fotosintezu i daje im zelenu boju. Za biotehnološku proizvodnju značajne alge su: *Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus* i *Dunaliella*, koje se koriste u tretmanu određenih vrsta otpadnih voda uz paralelnu proizvodnju proteina jednoćelijskih organizama. Mnogi želirajući materijali, na primer agar i algininska kiselina, dobijaju se iz morskih algi. Neke alge sadrže silicijum u ćelijskom zidu (*diatomeji*), pa se njihove naslage koriste kao pomoćni filtracioni materijali u prehrambenoj industriji i biotehnologiji.

Protozoe su uglavnom pokretni jednoćelijski organizmi relativno velikih dimenzija (1 – 50 μm). Razvrstavaju se u grupe na osnovu načina kretanja. *Ameba* se kreće tako što citoplazma izduživanjem formira lažno stopalo, koje za sobom povlači ostatak ćelije. *Flagellate* se kreću pomoću flagela. Ovde spada *Trypanosomes* izazivač mnogih bolesti kod ljudi. *Ciliate* se kreću pomoću cilija. Nepokretna vrsta *Sporozoa* je ljudski i životinjski parazit. Protozoe su izazivači malarije i dizenterije, ali sa značajnom ulogom u biološkim postupcima za prečišćavanje otpadnih voda. Hraneći se mikroorganizmima i suspendovanim organskim zagađenjem, protozoe redukuju količinu biološkog mulja i pomažu u dobijanju bistrijeg efluenta.

Viruse mnogi označavaju kao „supstance sa znacima života“, jer nemaju sposobnost samoreprodukcije. Zbog toga se ne mogu svrstati ni u jednu od navedenih kategorija. Oni su obligatni paraziti koji se reprodukuju, zavisno od vrste, u tkivima biljaka, životinja i ćelijama bakterija. Virusi koji se reprodukuju u bakterijama nazivaju se *bakteriofagi*. Pošto nemaju sposobnost da akumuliraju ili oslobađaju energiju, neaktivni su van ćelija domaćina. Oni nemaju ćelijsku strukturu i sadržaj. Sadrže DNK (DNK virusi) ili RNK (RNK virusi) kao genetski materijal. Po sposobnosti da mogu prenositi genetski materijal i preko RNK, virusi se razlikuju od ostalih ćelijskih vrsta. U većini slučajeva genetski materijal virusa prekriven je proteinskim slojem nazvanim *kapsid*. Pošto su virusi uzročnici mnogih obolenja, od posebnog je značaja proizvodnja *antiviralnih agenasa*. Viru-

si su veoma značajni za biotehnologiju, bilo sa aspekta njihove štetnosti (infekcija proizvodnih bakterija u pogonu) ili korisnosti (proizvodnja vakcina ili viralnih kapsida).

2.1.2. Tipovi ishrane mikroorganizama

Prema vrsti izvora osnovnog biogenog elementa ugljenika, mikroorganizmi se dele na *autotrofe* i *heterotrofe*.

Autotrofi (grč. *autos* – sam, *trophe* – hrana) kao izvor ugljenika koriste CO₂ i karbonate, a kao izvor azota neorganska (amonijak, nitrati ili azot iz vazduha – azotofiksacija) ili jednostavna organska jedinjenja, na primer ureu. Iz ovih prostih jedinjenja oni mogu sintetizovati sve organske komponente svoje biomase. Ovde spadaju alge, cijanobakterije i još neke bakterijske vrste.

Heterotrofi (grč. *heteros* – različit) kao izvor ugljenika koriste organska jedinjenja: ugljene hidrate, belančevine i aminokiseline, alkohole, organske kiseline, ugljovodonike itd. Oni, takođe, koriste azot iz organskih jedinjenja, najčešće iz aminokiselina i belančevina. Mnogi mikroorganizmi, koji su heterotrofi u odnosu na ugljenik, mogu biti autotrofi u odnosu na azot.

Heterotrofi se dele na: *saprofite*, koji koriste neživu organsku supstancu, i *parazite*, koji koriste proizvode metabolizma domaćina (*obligatni paraziti*) ili su, alternativno, zavisno od uslova, i *saprofiti* (*fakultativni paraziti*).

2.1.3. Energetski metabolizam mikroorganizama

Prema vrsti izvora energije mikroorganizmi se dele na *fototrofe* i *hemotrofe*.

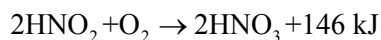
Fototrofi (alge, cijanobakterije i sumporne purpurne i zelene bakterije) koriste energiju sunčeve svetlosti. Ovde spadaju *fotoautotrofi* koji akumuliraju energiju sunčeve svetlosti u obliku visokoenergetskog jedinjenja ATP (adenozintrifosfat) iz kojeg se energija koristi u endergoničnim reakcijama anabolizma. Zelene biljke, alge i cijanobakterije koriste CO₂ kao donor ugljenika, a vodu kao donor elektrona. U procesu fotolize oslobađa se kiseonik. Ovaj proces se naziva *fotosinteza*. Slično, purpurne i zelene sumporne bakterije koriste CO₂ kao izvor ugljenika, a H₂S kao donor elektrona, dok se, kao proizvodi, oslobađaju sumporna jedinjenja različitog stepena oksidacije. Ovaj proces se naziva *fotoredukcija*. Rast *fotolitotrofa* zavisi od neorganskog davaoca elektrona, a *fotoorganotrofa* od organskog davaoca elektrona.

Fototrofi su izuzetno važni u opštem ciklusu ishrane u prirodi, jer su osnovna karika prenosa sunčeve energije u živi svet i omogućavaju kruženje biogenih elemenata, posebno ugljenika i kiseonika. Sva slobodna energija kojom raspolaže živi svet direktno ili indirektno potiče od sunca. Takođe, sav kiseonik u vazduhu potiče iz fotolize vode, koju su obavili ovi organizmi. Pojava ovih organizama pre oko 2 milijarde godina omogućila je razvoj aeroba, pa i pojavu čoveka na planeti.

Hemotrofi (najveći broj bakterija, protozoe i plesni) koriste energiju biohemijskih, kataboličkih procesa. Oni se dele na *hemolitotrofe* i *hemoheterotrofe*.

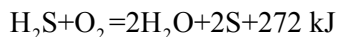
Hemolitotrofi sintetizuju organska jedinjenja koristeći energiju iz procesa oksidacije neorganskih jedinjenja. Ovde spadaju *nitrifikujuće bakterije*, koje su od posebnog značaja za kruženje azota u prirodi i prečišćavanje otpadnih voda zagađenih neorganskim azotnim jedinjenjima. Dva

roda bakterija *Nitrosomonas* i *Nitrobacter* obezbeđuju energiju oksidacijom amonijaka i nitrita prema jednačinama, respektivno:

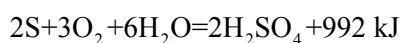


Stepen iskorišćenja energije od strane nitrifikujućih bakterija je veoma mali, u oksidaciji amonijaka do nitrita 5% a u oksidaciji nitrita do nitrata 7%. Rezultat je veoma mala brzina rasta ovih bakterija, pa proces nitrifikacije traje veoma dugo.

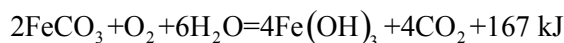
U hemotrofe spadaju i bezbojne sumporne bakterije, koje vrše oksidaciju H_2S prema jednačini:



Nastali sumpor se akumulira u citoplazmi u obliku granula i u nedostatku H_2S koristi se prema jednačini:



Gvožđevite bakterije kao izvor enegije koriste oksidaciju fero-jona prema jednačini:



Hemoheterotrofi obuhvataju veliki broj mikroorganizama koji energiju obezbeđuju oksidacijom složenih organskih jedinjenja. Ovakav način obezbeđenja energije obično se naziva *disanje*, koje se deli na *aerobno*, *anaerobno* i *fakultativno*.

Kod *aerobnog disanja* je molekularni kiseonik krajnji akceptor elektrona i vodonika u reakcijama katabolizma. Najveći broj mikroorganizama pripada ovakvim vrstama. Krajnji akceptori elektrona i vodonika kod *anaerobnog disanja* su jedinjenja azota (nitriti i nitrati), sumpora (sulfati) ili ugljenika (CO_2). *Fakultativno disanje* je poseban oblik disanja hemoheterotrofnih mikroorganizama, koje se odvija u odsustvu kiseonika. Pojedine vrste koriste ovaj oblik disanja kao alternativu, tj. u prisustvu kiseonika koriste aerobno disanje, a u odsustvu kiseonika anaerobno disanje (fermentaciju). Ovde spadaju *fakultativni anaerobi*. Tipičan primer su pojedine vrste kvasaca, koje se u prisustvu kiseonika uspešno razmnožavaju, a bez prisustva kiseonika izazivaju alkoholno, metansko, mlečnokiselo, propionsko ili drugo vrenje. Kranji akceptor elektrona i vodonika je neko organsko jedinjenje.

Kada se u okolini ne nalazi dovoljno hrane za rast i razmnožavanje mikroorganizama, tj. u odsustvu *egzogenog supstrata* (hrane), ćelije, da bi opstale, prelaze na *endogeni metabolizam*, tj. korišćenje endogenog supstrata. Endogeni supstrati su rezervne supstance, koje je ćelija akumulirala u uslovima dovoljnih količina egzogene hrane. Zavisno od vrste mikroorganizama, to su: polisaharidi (skrob, glikogen), lipidi, sumpor i fosfor. Nakon iscrpljenja rezerve hrane, ćelije odumiru. Ovaj proces se naziva *autoliza*. Oslobođeni konstituenti njihove biomase služe preživelim ćelijama kao hrana. Autoliza se nastavlja sve do samouništenja kulture. Ovaj prirodni proces je u većini biotehnoloških procesa štetan, ali se koristi u biološkom prečišćavanju otpadnih voda kao jedna od mogućnosti stabilizacije bioloških muljeva.

2.1.4. Uslovi u životnoj sredini i aktivnost mikroorganizama

Ukupna aktivnost mikroorganizama, uključujući njihov opstanak, direktno zavisi od uslova u okruženju, a posebno u neposrednoj životnoj sredini (okolini). Iz okolne (spoljne) sredine mikroorganizmi uzimaju potrebna jedinjenja za sintezu ćelijskih komponenti i generisanje energije neophodne za biohemijske procese. Mnogi fizički (temperatura, pH, aktivnost vode, turbulencija, pritisak) i hemijski (koncentracija kiseonika, prisustvo toksika) faktori životne sredine mogu stimulirati ili u potpunosti onemogućiti životnu aktivnost mikroorganizama. Takođe, mikroorganizmi, svojom aktivnošću, mogu znatno da utiču na okolnu sredinu, na primer, da menjaju sastav i fizičke osobine okolne sredine. Jednom rečju, između mikroorganizma i okolne sredine postoji bliska, uzajamna veza od koje, u slučaju industrijskih mikroorganizama, u velikoj meri zavisi njihova produktivnost, a i ekonomičnost biotehnološkog procesa.

Hemijski faktori životne sredine (okoline)

Vrsta i koncentracija nutrijenata. Pod nutrijentima se podrazumevaju proste i složene organske i neorganske supstance, koje su neophodne za rast i razmnožavanje mikroorganizama. Nutrijenti se dele na:

- izvore biogenih elemenata,
- izvore oligo- i mikroelemenata i
- biotike.

Biogeni elementi (makroelementi) su esencijalni (neophodni) elementi koji ulaze u sastav biomase. Sledećih pet su najbitniji: C, H, O, N i P, jer ulaze u sastav osnovnih jedinjenja živih ćelija. Većina mikroorganizama koristi C, H i O iz istog organskog izvora, a N i P iz organskih ili mineralnih supstanci. Pored organskih supstanci bitan izvor H i O je voda. Organske supstance, koje su izvor biogenih elemenata (ugljeni hidrati, belančevine, lipidi), imaju dvostruku ulogu: one su ujedno izvor C, H, i O i energije.

Pored prisustva, veoma je bitan i međusobni kvantitativni odnos izvora biogenih elemenata. Taj odnos je određen hemijskim sastavom mikrobne biomase. Približan odnos tri ključna biogena elemenata u mikrobnoj masi je $C : N : P = 50 : 7 : 1$. Svaki poremećaj tog odnosa u raspoloživoj hrani ima za posledicu poremećaj u rastu i razmnožavanju mikroorganizama. Zakonom minimuma određena je minimalna potrebna količina svakog biogenog elementa u odnosu na ostale biogene elemente. To znači da će ako je jedan od biogenih elemenata u manjku prema drugima, procesi biosinteze prestati kada se taj biogeni element utroši. Takav supstrat se naziva *limitirajućim*. Gajenje ćelija u uslovima limitirajućeg supstrata koristi se u biotehnologiji za indukciju proizvodnje metabolita.

Oligoelemente čini veća grupa elemenata: K, Ca, Mg, S i Fe, koji ulaze u sastav mikrobne biomase, ali u količini koja je znatno manja od količine biogenih elemenata.

Mikroelementi su najraznovrsnija grupa elemenata, koji se uglavnom obezbeđuju iz mineralnih supstanci. Smatra se da većina metalnih jona ulazi u sastav živih organizama. Oni uglavnom ulaze u sastav enzima, pa im je, i pored učešća u vrlo malim količinama, uloga veoma značajna. Njihov deficit sprečava aktivnost i sintezu enzima, što remeti metabolizam ćelija.

Kontrola i regulacija pH je od velike važnosti za postizanje optimalne proizvodnosti u mnogim bioprocesima. Tokom rasta, mikroorganizmi različito koriste pojedine hranljive komponente, a istovremeno izlučuju metabolite. Zavisno od vrste zaostalih komponenti u hranljivoj podlozi i vrste nastalih metabolita (na primer, organske kiseline), pH vrednost podloge se može značajno menjati. U cilju korekcije pH vrednosti bazna sredina se neutrališe kiselinom, a kisela sredina bazom. Drugi, često korišćen način, je da se hranljivoj podlozi dodaju jedinjenja koja služe kao puferi. Najznačajniji puferi su fosfati, koji istovremeno služe i kao izvor fosfora. U izvesnom broju slučajeva, izbalansiranom smešom izvora ugljenika i azota, može se održavati određena pH vrednost hranljive podloge, jer proteini, peptidi i aminokiseline imaju puferski kapacitet.

Fizički faktori životne sredine

Hranljiva podloga. Sastav hranljive podloge (izvori biogenih, makro- i mikro-elemenata, energetski izvori, pomoćni faktori rasta) je od esencijalnog značaja za opstanak mikroorganizama u životnoj sredini. Opis hranljivih podloga dat je u poglavlju 3.2.

Kiseonik. Kod aerobnih mikroorganizama smanjenje koncentracije rastvorenog kiseonika u vodi ima za posledicu smanjenje njihove aktivnosti, a odsustvo kiseonika izaziva prestanak aktivnosti i odumiranje. Donja granica koncentracije kiseonika u hranljivoj podlozi za aerobne bakterije je u oblasti 5 – 10% od zasićenja vode kiseonikom (tj. 0,4 do 0,8 mg O₂/dm³ na 20 °C). Naravno, vrednost 0,8 mg O₂/dm³ je povoljnija, jer postojeća rezerva sprečava brz ulazak sistema u anaerobno stanje. Iz toga sledi zahtev da se u aerobnim biotehnološkim postupcima vrši što bolja *aeracija* ili *oksigenacija*, što podrazumeva unošenje vazduha ili čistog kiseonika u hranljivu podlogu. Kako je koncentracija kiseonika oko pet puta manja u vazduhu u odnosu na čist kiseonik, sledi da će pogonska sila prenosa mase kiseonika biti veća iz atmosfere čistog kiseonika nego iz vazduha. To je razlog što se u velikim bioreaktorima (na primer, u biološkom prečišćavanju otpadnih voda) umesto vazduha koristi čist kiseonik ili njegova smeša sa vazduhom.

Aktivnost vode. Voda čini 80-90% mase mikroorganizama. U njoj se odvijaju sve metaboličke reakcije u živoj ćeliji. Samo rastvorene hranjive supstance mogu biti transportovane u ćeliju i iz ćelije u okolnu sredinu. Voda je istovremeno katalizator brojnih reakcija, reaktant u procesima hidrolize itd. Potreba mikroorganizama za vodom, kvantitativno se izražava kao *aktivnost vode* (a_v) pomoću sledećeg izraza:

$$\ln a_v = - \frac{v \cdot m \cdot f}{55,5} \quad (2.1)$$

gde je: v – broj jona nastalih iz svakog rastvorenog molekula, m – molarnost rastvora i.. f - molarni osmotski koeficijent.

Aktivnost čiste vode je jednaka jedinici. Rastvaranjem supstanci u vodi smanjuje se njena aktivnost. Mikroorganizmi mogu rasti u vodenoj sredini u kojoj se vrednost aktivnosti vode nalazi u opsegu od 0,65 do 0,99. Bakterije zahtevaju visoku vrednost aktivnosti vode (0,93 do 0,99), neki viši oblici mikroorganizama (kvasci ili plesni) podnose niže vrednosti (0,80 do 0,91), a neki osmofilni mikroorganizmi znatno niže (čak do 0,3).

Temperatura. Rast mikroorganizama i formiranje proizvoda njihovog metabolizma su rezultat niza biohemijskih reakcija zavisnih od temperature u ćeliji. Pošto ćelije mikroorganizama nemaju sposobnost samoregulacije temperature, ćelijska temperatura direktno zavisi od temperature

okoline. Prema vrednosti potrebne temperature za njihov optimalan rast, mikroorganizmi se dele na:

- *psihrofilne* (optimalna temperaturna oblast 0 do 25 °C)
- *mezofilne* (15 do 45 °C)
- *termofilne* (45 do 65 °C)

Svaka mikrobiološka vrsta ima *minimalnu, optimalnu i maksimalnu temperaturu rasta*, pa je raspon temperature za rast i intenzivne aktivnosti uži od navedenih granica. Većina mikroorganizama optimalno raste između 20 i 30 °C.

Biosinteza proizvoda metabolizma je, takođe, zavisna od temperature na sličan način kao i rast ćelija, s tim što optimalne temperature ne moraju biti iste. Uticaj temperature na biosintezu proizvoda treba posmatrati ne samo sa aspekta brzine biosinteze već i sa aspekta konverzije supstrata u proizvod ili stepena iskorišćenja supstrata. Sa povećanjem temperature povećava se energija aktivacije poželjnih, ali i nepoželjnih biohemijskih reakcija, tako da zbirni efekat na prinos proizvoda i iskorišćenost supstrata može biti negativan.

Treba imati na umu da temperatura utiče i na druge aspekte rasta mikroorganizama: iskorišćenje pojedinih nutrijenata, konverziju supstrata u mikrobnu biomasu i metabolite itd. Takođe, temperatura ima značajan uticaj na brzinu difuzije u biloškim reaktorima.

Koncentracija vodoničnih jona – pH. Vodonični joni imaju značajan uticaj na *konformaciju* (prostornu strukturu) *enzima* i na tok biohemijskih reakcija koje oni katalizuju. Mikroorganizmi su najaktivniji u oblasti optimalnih vrednosti pH za delovanje ključnih enzima. Postoje minimalne i maksimalne vrednosti pH pri kojima je još moguć opstanak mikroorganizama. Krive koje prikazuju zavisnost aktivnosti (rasta) mikroorganizama od pH vrednosti po obliku su slične krivama zavisnosti rasta od temperature (slika 2.1). Neki mikroorganizmi imaju optimum pH između 1 i 2 (*acidofili*), drugi iznad 9 (*alkalofili*), dok je za većinu optimalna neutralna oblast od 6 do 8 (*neutrofili*). Citoplazmatična membrana je relativno nepropusna za H^+ i OH^- jone, tako da se pH vrednost u citoplazmi manje menja nego u okolini. Zbog toga, mikroorganizmi bolje podnose promene pH nego promene temperature.

Pritisak. Većina mikroorganizama ima dobar rast i aktivnost na normalnom atmosferskom pritisku. Većina mikroorganizama ne može da raste na pritisku većem od 500 bar, a pritisci od 100 – 500 bar obično sprečavaju rast mikroorganizama. Povećani pritisak izaziva produženje takozvane *lag* faze rasta i usporava deobu ćelija.

Mehanička delovanja. Otpornost ćelija različitih mikrobioloških vrsta na mehaničko delovanje iz spoljne sredine (na primer, smicanje u biološkim reaktorima) je različita. U principu, ova otpornost nije velika, pa predstavlja jedan od problema u biorektorskoj tehnici.

Antipenušavci. Penušanje često prati bioprocese, naročito ako hranljiva podloga sadrži sirovine bogate proteinima. Penušanje izaziva velike probleme (izlivanje iz biološkog reaktora, ometanje prenosa mase i toplote), koji mogu uticati na stabilnost procesa biosinteze. Da bi se suzbilo nastajanje pene tokom procesa, potrebno je dodavati jedinjenja (tzv. *antipenušavce*), koja smanjenjem površinskog napona tečnosti, onemogućavaju formiranje pene. Za tu svrhu se koriste: alkoholi, estri, masne kiseline, silikoni, sulfonati itd.

2.1.5. Izolacija i oplemenjivanje proizvodnih mikroorganizama

Mikroorganizmi koji se koriste kao biološki katalizatori u biotehnološkoj proizvodnji nazivaju se *proizvodni mikroorganizmi*. Da bi biotehnološki proces bio uspešan, proizvodni soj odabrane mikrobiološke vrste mora ispuniti sledeće uslove:

- da je čista kultura bez stranih mikroorganizama i/ili faga,
- da se može dugo čuvati kao čista kultura pod što jednostavnijim uslovima,
- da soj nije patogen, kao i da proizvodi biosinteze nisu toksični,
- da ima visoku reproduktivnu vitalnost,
- da se odlikuje visokom genetskom stabilnošću,
- da se pomoću mutagenih agenasa ili tehnikom rekombinantne DNK može *oplemeniti*, tj. da mu se prirodna, za biotehnologiju korisna svojstva, mogu poboljšati,
- da što brže ulazi u eksponencijalnu fazu razmnožavanja i fazu produkcije željenog proizvoda (metabolita),
- poželjno je da ima sposobnost samozaštite od infektivnih mikroorganizama,
- da se može gajiti na što jeftinijim i što pristupačnijim sirovinama,
- da se uslovi gajenja u industrijskim razmerama mogu što lakše ostvariti (na primer, da je temperatura gajenja što viša, a pH što niži),
- da ima visoku produktivnost željenog proizvoda, a što manju produkciju sporednih metabolita i
- da se željeni proizvod biosinteze može lako izolovati iz podloge.

Mikrobiološke vrste koje ispunjavaju sve navedene uslove ne postoje u prirodi. Neke od mikrobioloških vrsta u manjoj ili većoj meri ispunjavaju ove uslove, pa ih je potrebno izolovati iz njihovih prirodnih staništa.

Izolacija proizvodnih mikroorganizama

Mikroorganizmi naseljavaju različita prirodna staništa (zemljište, vodu, vazduh, biljni i životinjski materijal organskog karaktera) u kojima nalaze potrebnu hranu za rast i razmnožavanje. Prirodna staništa se međusobno razlikuju po uslovima za opstanak bioloških vrsta. Priroda staništa je prvi pokazatelj o vrsti mikroorganizama koja se iz tog staništa mogu izolovati. Na primer, za proizvodnju vina i rakija korisne mikroorganizme je moguće izolovati iz plodova voća, za mlečno-kiselo vrenje iz turšije i kiselog kupusa itd.

Izolacija mikroorganizama se obavlja na sledeći način:

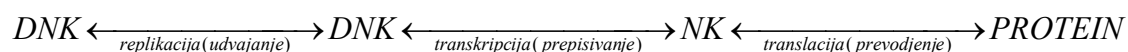
- metodom iscrpljivanja,
- metodom uzastopnog razređenja,
- primenom selektivnih podloga,
- primenom specifičnih uslova gajenja i
- metodom mikromanipulacije.

Ovi postupci su opšte poznati i široko primenjeni u mikrobiološkim laboratorijama. Pomoću prva četiri postupka su iz prirodnih staništa izolovani sojevi proizvodnih mikroorganizama koji se primenjuju u klasičnim biotehnologijama. Metod mikromanipulacije je novijeg datuma i razvijen je pošto su razvijeni mikromanipulatori (mikroskopi velikog uvećanja i uređaji za izdvajanje željene mikrobiološke jedinice).

Tehnike oplemenjivanja mikroorganizama

Razvoj biotehnoške proizvodnje prvenstveno je zavisio od raspoloživih proizvodnih organizama. Stalna težnja da se dobiju što kvalitetniji sojevi inicirala je razvoj postupaka za *poboljšanje (oplemenjivanje)* proizvodnih sojeva u cilju ispunjenja što većeg broja biotehnoških zahteva. Prvi razvijeni postupci oplemenjivanja bili su *izazivanje mutacija*, tj. dobijanje mutanata sa oplemenjenim svojstvima. Danas su opšte prihvaćene *tehnike rekombinantne DNK*.

Sve tehnike oplemenjivanja bazirane su na osnovnom biološkom principu prenosa genetskih informacija sa jedinice na jedinku u okviru vrste, što se može prikazati sledećom opšte prihvaćenom relacijom:



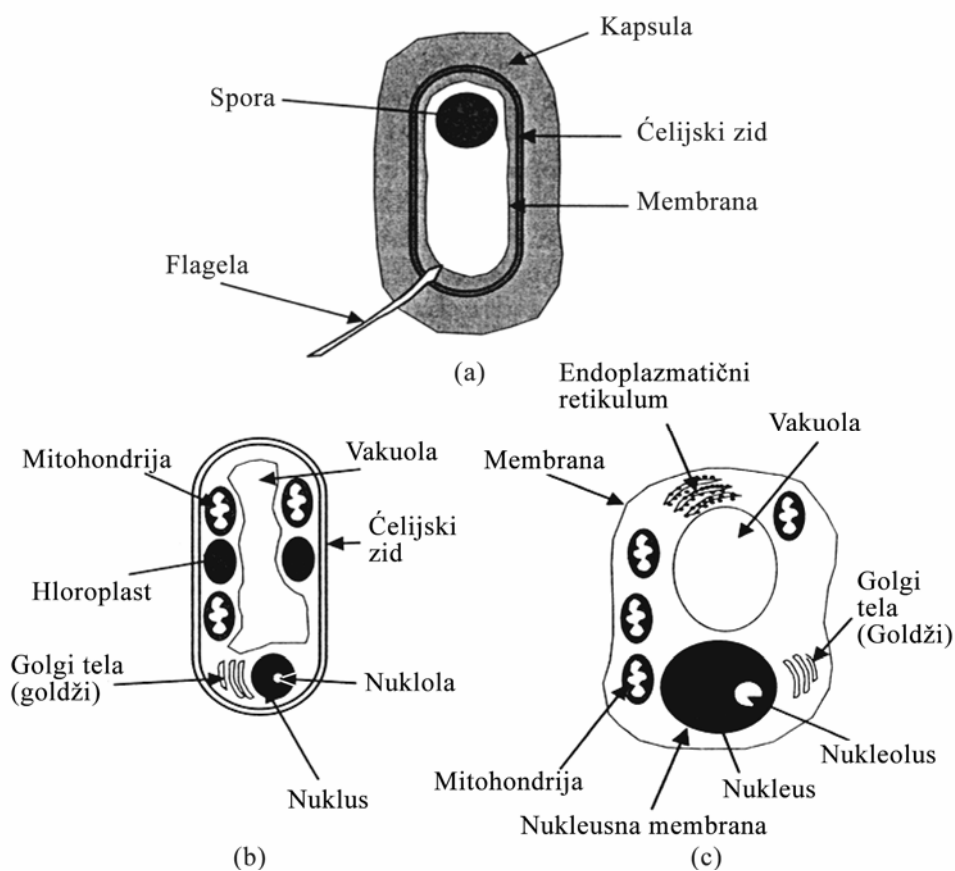
Nukleinske kiseline (DNK i RNK) su nosioci naslednih informacija, a proteini (enzimi, strukturni, regulatorski, zaštitni, transportni i dr.) su realizatori informacija. Prema tome, ako se izmeni genetska informacija spoljašnjim delovanjem na DNK, potomstvo će dobiti nova svojstva. Ako su ova svojstva pozitivna sa aspekta biotehnologije ili uopšte, potomstvo će predstavljati oplemenjeni soj.

Mutacije mikroorganizama. Najstarija tehnika oplemenjivanja koristila je mutagena sredstva koja su izazivala promene na genima u molekulu DNK (promene vrste nukleotida i/ili redosleda povezivanja nukleotida u genima). Kao mutageni agensi korišćene su toksične supstance, UV zračenje i jonizujuća zračenja. Pošto se promene u strukturi gena, koje su izazivane na ovaj način nisu mogle usmeravati, kao proizvod delovanja na određenu mikrobiološku vrstu dobijani su: *pozitivni* ili korisni (mutanti oplemenjenih osobina), *negativni* ili štetni (sa nekorisnom, pa i štetnom mutacijom) i *ćutljivi* (mutanti bez ekspresije izazvane promene) mutanti. Iz ove smeše potrebno je izolovati pozitivne, oplemenjene mutante. S obzirom na ogroman broj mutanata, raznih karakteristika, izolacija oplemenjenih je zametan posao. Obično su ovako oplemenjeni sojevi vremenom gubili stečena svojstva i postajali nekorisni. To je razlog što se danas ova tehnika praktično ne koristi.

Tehnike rekombinantne DNK. Razvoj ovih tehnika zadnjih decenja dao je biotehnologiji neslućeni razvojni impuls. Zahvaljujući oplemenjenim sojevima različitih bioloških vrsta (mikrobnih, animalnih i biljnih) dobijeni su biološki katalizatori koji biotehnošku proizvodnju dovode u paralelu sa hemijskom, a u mnogim slučajevima joj daju značajnu prednost. Tehnike rekombinantne DNK ne pružaju samo velike mogućnosti oplemenjivanja u okviru jedne vrste i dobijanje neograničene količine istovetnih ćelija (*klonovi*), već pružaju mogućnost ukrštanja gena, ne samo srodnih, već i udaljenih bioloških vrsta.

2.2. BILJNE I ANIMALNE ĆELIJE I TKIVA

Biljne i animalne ćelije, kao i ostale eukariotske vrste, imaju složenu građu, koja uključuje nukleus i brojne organele. Ove dve vrste ćelija međusobno se razlikuju po građi ćelijskog zida. Ćelijski zid biljaka je sastavljen od celuloznih vlakana „cementiranih“ pektinom, što mu daje veliku čvrstinu. Animalne ćelije nemaju ćelijski zid, već samo citoplazmatičnu membranu, zbog čega su neotporne na spoljašnja mehanička delovanja i teško ih je gajiti u klasičnim bioreaktorima. Skica izgleda mikrobne, animalne i biljne ćelije data je na slici 2.1.



Slika 2.1 Skica strukture a) mikrobne, b) biljne i c) animalne

2.2.1. *Animalne ćelije i tkiva*

Animalne ćelije se koriste kao veoma značajni biološki katalizatori u biotehnologiji jer mogu proizvesti veliki broj veoma značajnih terapijskih proteina. Sigurno je da će se oblast njihove primene u biotehnologiji sve više povećavati. U tome će veliku ulogu imati tehnika rekombinantne DNK, koja će omogućiti uvećanje produktivnosti (oplemenjivanje) nativnih ćelija. Najznačajniji biotehnološki proizvodi dobijeni pomoću animalnih ćelija su: monoklonarna antitela, imunobioregulatori (interferon, limfokini, interleukin, ćilijski plazmogeni regulatori), virusne vakcine, hormoni, enzimi, insekticidi, pojedinačne ćelije i tkiva (polusintetska kožna i koštana tkiva). Ovoj grani biotehnologije predstoji ogroman razvoj u budućnosti.

Animalne ćelije su tipični eukarioti. Sfernog su ili elipsoidnog oblika, veličine 10 – 30 μm . Okružuje ih tanka plazmina membrana sastavljena od proteina, lipida i ugljenih hidrata, a ćelijski zid ne poseduju. Na membrani nekih ćelja formiraju se specifične zone nazvane *mikrofile*, koje povećavaju površinu dodira sa okolinom i time povećavaju transport materijala. Površina animalnih ćelija je negativno naelektrisana zbog čega pokazuje afinitet za vezivanje na pozitivno naelektrisane površine, na primer, sefideks ili kolagen. Ova osobina se koristi u tehnici imobilizacije animalnih ćelija. Mnoge animalne ćelije poseduju specifične površinske receptore kojima se vezuju za ligande nosača. Neke animalne ćelije nemaju težnju vezivanja za nosače i uspešno mogu rasti u suspendovanoj kulturi. Animalne ćelije imaju *citoskeleton* koga čine tri vrste proteinskih filamenata (aktin filament, intermedijarni filament i mikrotubule) pomoću kojih se kontrolišu mehanička otpornost, oblik, kretanje i deoba ćelija. Ćelijska deoba i kretanje se kontrolišu polimerizacijom ili depolimerizacijom *mikrotubula*. Zahvaljujući tom mehanizmu kontrole rasta i umnožavanja animalnih ćelija, antikancerogeno delovanje nekih lekova zasnovano je na sprečavanju depolimerizacije mikrotubula što zaustavlja deobu ćelija.

Sastav nutrijenata u podlozi za gajenje animalnih ćelija bitno se razlikuje od sastava podloga za gajenje ostalih ćelija. U podlozi treba da se nalazi glukoza, glutamin, esencijalne i neesencijalne aminokiseline, serum (konjski ili teleći) i mineralne soli. Animalne ćelije glukozu i glutamin koriste kao izvor energije i prekursor za sintezu konstituenta biomase preko glikolize, pentozo-fosfatnog puta i ciklusa trikarbonskih kiselina, dok se u respiratornom lancu oslobađa energija koja se akumulira u obliku adenozintrifosfata (ATP). Takođe, animalne ćelije mogu sintetizovati glukozu iz piruvata putem glukoneogeneze. Međuprodukti metabolizma, mlečna kiselina i amonijum jon, toksični su za ćeliju u većoj koncentraciji, prvenstveno zbog uticaja na pH ćelijske citoplazme.

Za dobijanje animalnih ćelija kao polazni materijal koriste se tkiva određenih organa životinja, na primer, bubrega ili pluća. Za propagaciju animalnih ćelija uzima se *eksplant* (komadići tkiva). Sve dok eksplant zadržava svoju strukturu i funkciju, govori se o *kulturi tkiva* ili *organa*. Ako se izvrši dezintegracija tkiva enzimima (na primer, tripsinom), hemijskom razgradnjom helatnim agensima (na primer, EDTA) ili mehaničkim usitnjavanjem, govori se o *kulturi animalnih ćelija*. Zasejavanjem ćelija u definisanu hranljivu podlogu dobija se *primarna kultura* (*primarna linija*) koja, za razliku od biljnih ćelija, ne formira agregate već na zidovima staklenog suda formira tanak sloj. Pojedinačne ćelije primarne linije se oslobađaju iz formiranog sloja pomoću proteoliznog enzima tripsina.

U sledećoj fazi gajenja dobijaju se ćelije *sekundarne kulture* (*sekundarna linija*). O soju animalnih ćelija može se govoriti ako se selekcijom ili kloniranjem dobiju ćelije sa definisanim i stabilnim osobina. Alteracijom, ćelijska linija može postati *kontinualna* i gajiti se uslovno neograničeno. Kada i kako ćelijska linija prelazi u kontinualnu za sada nije moguće tačno utvrditi ali je kao kriterijum usvojeno sedmostruko subgajenje u intervalima od tri dana. Alteracija kulture može se izvršiti unošenjem stranog genetskog materijala (transformacija).

Mnoge ćelije sekundarne kulture mogu se adaptirati za rast u suspendovanoj kulturi. Animalne ćelije koje zahtevaju nosač za razvoj nazivaju se *ćelije zavisne od nosača*. Suprotno njima, neke animalne ćelije mogu rasti u suspendovanoj kulturi; one se nazivaju *ćelije nezavisne od nosača*.

Mnoge diferencirane animalne ćelije (na primer, ljudski fibroplasti WI-38 i MRC-5, koji se koristi za dobijanje humanih vakcina) jesu *mortalne* ili *netransformisane*, jer se mogu deliti ograničen broj puta (na primer, 30 deoba kod fibroplasta MRC-5). Ovaj fenomen nije dovoljno izučen. Za razliku od njih, ćelije koje se mogu dugoročno deliti nazivaju se *kontinualne*, *nemortalne ćelije* ili *transformisane ćelije*. Ćelije kancera su prirodno transformisane, ali nije sigurno da su sve transformisane ćelije kancerogene.

Između netransformisanih i transformisanih ćelija postoje bitne razlike. Prve se uspešno dele u suspendovanoj kulturi, dok je za druge potrebna prethodna adaptacija, što je od posebnog značaja za biotehnošku proizvodnju u industrijskim razmerama. Bitan fenomen kod animalnih ćelija je *kontaktna inhibicija*, zbog koje netransformisane ćelije na nosaču formiraju samo dvodimenzionalni tanak sloj, jer se deoba ćelija inhibira kada površina jedne ćelije dođe u kontakt sa drugom. Suprotno tome, transformisane ćelije su neosetljive na dodir sa drugim ćelijama, pa mogu rasti i u suspendovanoj kulturi.

Zahvaljujući povoljnim svojstima za gajenje i produkciju, ćelije pojedinih insekata, riba i bacilo-virusi su značajne za biotehnologiju. Tako su, na primer, bacilo-virusi, koji inficiraju insekte, idealan vektor za genetsko inženjerstvo, a nisu patogeni za čoveka.

Kultura hibridoma je značajna kategorija animalnih ćelija za biotehnologiju. Hibridoma (hibridne) ćelije dobijaju se pomoću limfocita (ćelije krvi koje formiraju antitela) sa kancerogenim *melanoma* ćelijama. Normalni limfociti su mortalni, rastu polako i produkuju antitela. Kada se izvrši njihova fuzija sa melanoma ćelijama, oni postaju nemortalni i kontinualno produkuju antitela. Korišćenjem specifičnih monoklonarnih (nastalih iz jedne ćelije) hibridoma ćelije, moguće je dobiti antitela za specifične antigene.

Za dobijanje hibridoma ćelija, životinje se imuniziraju različitim antigenima. Kao reakcija na antigene, životinje produkuju antitela. Ćelije koje produkuju antitela (na primer, B limfociti slezine) izoluju se i fuzionišu sa ćelijama tumora. Dobijene hibridne ćelije poseduju veliku produkciju specifičnih antitela protiv imunogenih agenasa.

Uslovi gajenja animalnih ćelija

Animalne ćelije se kultivisu u hranljivim podlogama specifičnog sastava. Optimalna temperatura za razvoj varira u oblasti od 25 do 35 °C zavisno od vrste, a pH vrednost se održava približno 7,3 pomoću pufera, najčešće karbonatnog. Vreme udvostručenja im je 10 – 50 h, a tipična vrednost je 20 h. Zahtev za kiseonikom iznosi 0,06 do 0,2 mol O₂/h po ćeliji, što je manje od mikrobnih i biljnih (oko 10 puta) ćelija. Tipična koncentracija ćelija u suspendovanoj kulturi iznosi 0,1 do 1 g/dm³ (5·10⁵ – 5·10⁶ ćelija/cm³), što je 10 do 50 puta više nego kod monoslojne kulture na

nosaču. Suspendovana kultura 5×10^6 ćelija/dm³ zahteva 0,1 do 0,6 mmol O₂/dm³ h. Za obezbeđenje ove količine kiseonika, koristi se aeracija vazduhom obogaćenim sa 5 % CO₂, koji kompenzuje njegovu asimilaciju od strane ćelija, čime se karbonatni pufer održava aktivnim. U biološkim reaktorima potrebno je ostvariti zadovoljavajući prenos mase kiseonika (vrednost $k_L a$ reda 5 do 25 h⁻¹ za koncentraciju suspendovanih ćelija 10⁶/cm³). Pri tome se mora uzeti u obzir činjenica da su animalne ćelije neotporne na mehanička delovanja. U laboratorijskim uslovima koriste se stakleni sudovi učvršćeni na tresilici, stakleni sudovi sa magnetnom mešalicom ili tave sa tankim slojem hranljive podloge (2 do 5 cm). U industrijskim uslovima koriste se biološki reaktori posebnih konstrukcija, a u hranljivu podlogu se dodaju protektori mehaničkog delovanja. Na mehaničko delovanje otpornije su imobilisane animalne ćelije od suspendovanih ćelija.

Kinetika rasta animalnih ćelija slična je kinetici rasta mikrobnih ćelija. *Lag* faza je relativno kratka, maksimum rasta se postiže u toku 3 do 5 dana, nakon čega broj ćelija naglo opada kao posledica toksičnog delovanja metabolita, mlečne kiseline i amonijaka. Opadanju broja ćelija doprinosi njihova *liza*, koja je prouzrokovana mešanjem u bioreaktoru.

2.2.2. Biljne ćelije i tkiva

U Zapadnom svetu proizvodi se više od 25 % farmaceutskih preparata na bazi biljaka, dok je na Istoku taj procenat znatno veći.

Biljke su značajan izvor različitih hemikalija, poznatih kao fitohemikalije, sa najraznovrsnijom primenom, na primer, kao lekovite supstance, pesticidi, mirisi, fine hemikalije itd. Ove supstance se tradicionalno ekstrahuju iz čitave biljke ili njenih delova pogodnim rastvaračem, a zatim izoluju i prečišćavaju do tržišnog kvaliteta. Kod komercijalne proizvodnje, ovaj pristup podrazumeva plantažno gajenje biljne vrste sa velikom produktivnošću. Mnoge od navedenih supstanci se mogu dobiti hemijskom sintezom, koja je pouzdanija i jeftinija od tradicionalnog postupka dobijanja biohemikalija.

Pored lekovitih supstanci, biljke proizvode: prehrambene boje, arome, začine, zaslađivače i dr. Ti proizvodi imaju složen hemijski sastav i načelno nisu proteinskog karaktera. Dobijaju se ekstrakcijom iz plodova, kore, lišća ili korena biljaka. Većina ekstrahovanih supstanci se koriste kao proizvodi, bez hemijske transformacije, a neke se koriste kao prekursori za hemijske sinteze za dobijanje polusintetskih proizvoda.

Klasična proizvodnja zahteva plantažno gajenje biljaka, što je povezano sa nizom problema, kao što su: karakteristike podneblja, nekontrolisani uslovi, dug period vegetacije, napadi štetočina itd. Pojedine biljke se mogu gajiti na otvorenom prostoru samo u određenim klimatskim uslovima.

Poslednjih 40-tak godina kulture biljnih tkiva predstavljaju alternativni izvor fitohemikalija, koji može biti opravdan ako se određena biljka teško gaji, ako ima dugačak period gajenja ili daje mali prinos željene supstance ili kad hemijska sinteza željene supstance nije izvršena ili njeno izvršenje prate tehnički problemi, a cena proizvoda je vrlo visoka (veća od 1000 US\$/kg). Osim toga što se kulturama biljnih tkiva dobijaju biohemikalije pod kontrolisanim uslovima, nezavisno od geografskih i klimatskih faktora, u mnogim slučajevima, pomoću njih se ostvaruju veći prinosi proizvoda nego plantažnim gajenjem. Uporedne vrednosti prinosa nekih jedinjenja dobijenih pomoću biljaka i kulture biljnih ćelija date su u tabeli 2.3. Njihova primena je ograničena sporim

rastom i genetičkom nestabilnošću biljnih ćelija, lošom kontrolom diferencijacije ćelija i nemogućnošću održavanja fotoautotrofnog rasta. Kulturama biljnih ćelija mogu se dobiti proizvodi kojih nema u prirodi. Tome treba dodati mogućnost dobijanja i korišćenja transgenih biljnih ćelija i tkiva sa velikim potencijalom za proizvodnju niza novih proizvoda, nekarakterističnih za biljni svet, na primer vakcina.

Tabela 2.3. Uporedne vrednosti prinosa nekih jedinjenja dobijenih pomoću biljaka i kulture biljnih ćelija

Proizvod	Biljna vrsta	Prinos, mg/g _{ss}	
		Ćelijska kultura	Biljka
Antrahinon	<i>Morianda citrifolia</i>	0,19	0,02 (koren)
Ajmalicin, serpentin	<i>Catharanthus roseus</i>	13	2,6
Diosfenin	<i>Dioscorea deltoidea</i>	26	20 (krtola)
Saponin	<i>Panax ginseng</i>	3,8	3-33
Nikotin	<i>Nicotina tabacum</i>	30-40	20-50
Ubihinon	<i>Nicotina tabacum</i>	0,5	16 (list)
Teabin	<i>Papaver bracteatum</i>	130	1.400 (koren)

Nažalost, genetika i fiziologija biljaka su, za sada, znatno manje izučene kod životinja i mikroorganizama. Zbog toga, tehnika rekombinantne DNK još nije dala rezultate koji bi mogli biti preneti u industrijsku proizvodnju. Za sada se pokazalo da je ekonomski i tehnološki opravdanije pomoću biljaka proizvoditi specifične intermedijare, a zatim iz njih hemijskom sintezom dobijati konačne proizvode. Dobar primer za to je polusintetska proizvodnja antikancerogenog agensa *paclitaxela* (*taksola*), koji se dobija hemijskom sintezom iz prekursora ekstrahovanog iz kore stabla *Taxus brevifolia*. Pre ovoga, *Paclitaxel* se odobijao ekstrakcijom iz biljke, ali je za dobijanje potrebne količine za lečenje jednog pacijenta bilo potrebno celo stablo staro 10 godina.

Karakteristike kulture biljnih ćelija

Ćelije viših biljaka ne postoje prirodno izolovane, već su deo organizovane stukture čitave biljke. Deoba ćelija normalno nije praćena razdvajanjem nastalih ćelija, već one ostaju u kontaktu sa susednim ćelijama, koji dopušta direktnu indirektnu hemijsku komunikaciju između njih, preko protoplazmine veze i gradijenata koncentracije hormona i električnog potencijala. U suspenziji individualnih ćelija ove hemijske komunikacije se uglavnom prekidaju, tako da ćelije nastale deobom ne imitiraju morfološki tip ćelija od kojih su nastale. Šta više, čest je slučaj da ponovljeno subgajenje jedne ćelijske linije vodi odabiru brže-rastućih ćelija. Ovi određeni morfološki tipovi ćelija su vezani sa modelima ekspresije gena, koji nisu, verovatno, oni koji su vezani sa produkcijom metabolita. Na osnovu ove činjenice, kod industrijskog gajenja biljnih ćelija, često je sastav tečne podloge u fazi produkcije metabolita drugačiji nego u fazi rasta ćelija, da bi se ćelije održale u biosintetski aktivnom stanju, bez aktivnog rasta.

Agregacija biljni ćelija u suspenziji je uobičajena pojava, koja zavisi od ćelijske linije, starosti kulture i uslova gajenja. Promena oblika rasta se može desiti pri povećanju razmera bioreaktora,

što ukazuje na značaj identifikovanja morfolološkog oblika u aktuelnim uslovima rasta i sa starošću kulture.

Individualne biljne ćelije su sfernog do cilindričnog oblika, karakteristične dimenzije 10 do 100 μm . One imaju tanke zidove, jer se ćelijski materijal koji gradi zid ćelije (polisaharidi i gliko-proteini) izlučuje u tečnu podlogu. U odsustvu razdvajanja posle deobe, grade se agregati sa oko stotinak ćelija, veličine do nekoliko milimetara. Zbog veličine i tankih zidova, biljne ćelije su sklone mehaničkom oštećenju dejstvom smicajnih sila i turbulentnih vrtloga, kao i sudarima sa pokretnim i nepokretnim delovima bioreaktora. Na drugoj strani, njihova brzina taloženja je relativno velika, što ubrzava njihovo odvajanje od tečne podloge.

Agregacija, interakcija agregata, morfološki oblik agregata i individualnih ćelija, velike koncentracije ćelija (i do 70 g/dm^3 računato na suhu masu) i sekrecija polimera imaju za posledicu veliki prividni viskozitet tečne podloge. Većina suspenzija biljnih ćelija pokazuje vremenski nezavisne nenjutnovske osobine, i to: osobine pseudoplastičnog (sa indeksom toka najčešće 0,5 do 0,8) ili Bingamovog plastičnog fluida.

Spor rast, koji uslovljava male brzine potrošnje hranljivih komponenti i produkcije metabolita, je karakteristika kultura biljnih ćelija, koja ne zavisi od veličine bioreaktorskog sistema. Većina hranljivih komponenata neophodnih za rast i metaboličku aktivnost su dobro rastvorne u vodi (sa izuzetkom kiseonika).

Veliki problem koji se sreće pri industrijskom gajenju biljnih ćelija je kontaminacija. Gljivice, bakterije, kvasci i insekti mogu izazvati kontaminaciju koja znači gubitak i tečne podloge i biljnih ćelija. Uzrok kontaminaciji je nepravilno manipulisanje bioreaktorom. Da bi se smanjio rizik od kontaminacije, preporučuje se stalna kontrola biljne kulture na kontaminante.

Biljne ćelije mogu biti veoma velike (10 – 100 μm). Rastu veoma sporo (vreme udvostručenja im je između 20 i 100 h). Rast im nije fotosintetičan i zahtevaju ugljenohidratni izvor energije i ugljenika. Tipična vrednost respiracionog koeficijenta im je 0,5 $\text{mmol O}_2/\text{g/h}$. Mogu se gajiti u veoma gustoj suspenziji, tako da ćelije zauzimaju i više od 70% zapremine bioreaktora. Zbog toga je, bez obzira na malu vrednost koeficijenta respiracije, u biorekatoru potrebno postići veliku brzinu prenosa mase kiseonika. Biljne ćelije su karakteristične po velikom sadržaju vode (90 – 95%) koja je smeštena u centralnoj vakuoli. Biljne ćelije mogu formirati mnoge supstance koje izlučuju u vakuolu. Neke od ovih supstanci su sekundarni metaboliti, koji su od interesa za biotehnološku proizvodnju, ali njihova lokacija predstavlja jedan od problema za biotehnološku proizvodnju.

Među značajnim osobinama biljnih ćelija je posedovanje brojnih mehanizama za odbranu, koji se aktiviraju napadom najčešće toksina plesni, bakterija ili virusa na ćeliju. Aktivaciju tih mehanizama mogu izazvati određene organske i neorganske supstance. Te supstance se nazivaju *aktivatori*. U funkciji odbrane ćelija proizvode određenu vrstu sekundarnih metabolita. Ova mogućnost indukovanja sinteze sekundarnih metabolita od velikog je značaja za biotehnološku proizvodnju. Delovanjem aktivatora odbrambenih mehanizama na suspenziju biljnih ćelija u biološkom reaktoru može se postići povećana produkcija željenog metabolita.

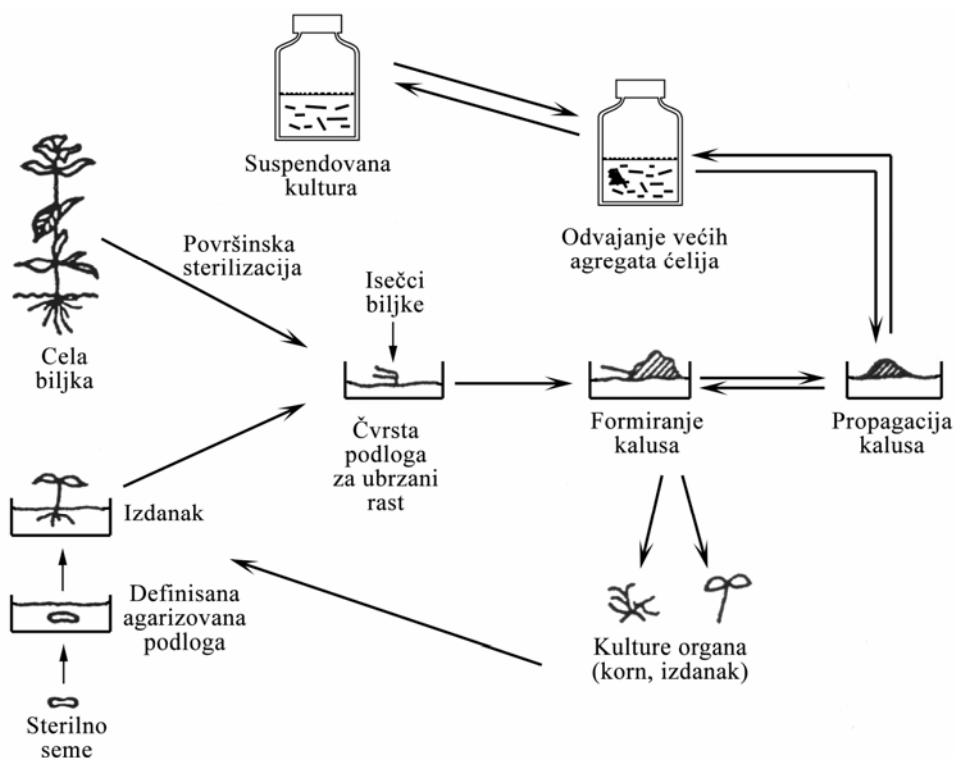
Za razliku od mikrobnih ćelija, biljne ćelije imaju sposobnost diferencijacije i organizacije izdvojenih nediferenciranih ćelija u određenim uslovima. To omogućava da se iz njih regeneriše cela biljka. Ova sposobnost se naziva *totipotencija* i veoma je bitna sa aspekta biotehnologije, jer je osnova za mikropropagaciju biljaka i produkciju sekundarnih metabolita.

Dobijanje kultura biljnih tkiva

Sa terminom kulture biljnih tkiva podrazumeva se gajenje *in vitro* bilo kog segmenta biljke – ćelije, tkiva ili organa. Otuda, moguće je razlikovati pet tipova kultura biljnih tkiva:

- kulture biljaka (podizanje biljaka iz semena),
- kulture biljnih embriona (izolovani embrioni),
- kulture biljnih organa (izolovani biljni organi),
- kulture biljnih tkiva ili kalusa (kulture eksplantata) i
- kulture biljnih ćelija ili suspenzijske kulture (individualne ćelije ili agregati ćelija suspendovani u tečnoj podlozi).

Jedinstveni postupak koji se primenjuje kod velikog broja različitih biljaka za dobijanje kulture biljnih ćelija i tkiva prikazan je šematski na slici 2.2. Biljne ćelije se dobijaju preko *kalusa*, koji se može formirati iz bilo kog dela biljke koji sadrži ćelije u deobi. Isečci (eksplanti) biljaka ili sterilne semenke se nanose na podlogu sa agarom za razvijanje kalusa. Podloga treba da sadrži nutrijente i hormone supstance za ubrzanje rasta kalusa. Kalus se razvija na mestu ozlede ili preseka. Dobijeni kalus nema organizovanu strukturu i sastavljen je od smeše *dediferenciranih ćelija*.



Slika 2.2 Šematski prikaz opšteg postupka za dobijanje kulture biljnih ćelija i tkiva (kalusa)

Od izbora inicijalnog tkiva zavise karakteristike kalusa. Iz kalusa se mogu dobiti suspendovane biljne ćelije ili *organi biljne kulture* (koren, izdanak – lastar). Za dobijanje ćelija ili tkiva sa povećanom produkcijom određene supstance izbor treba da bude biljka koja poseduje sposobnost te produkcije. Načelno, kulture tkiva i suspendovane ćelije se dobijaju u mraku. Osvetljavanjem, posebno kulture koja nema izraženu sposobnost autotrofnog rasta, mogu se inicirati specifični sintetski putevi.

Za dobijanje suspendovane kulture iz kalusa, komadići kalusa se stavljaju u hranljivu podlogu. Tipični uslovi su mrak, temperatura 27 °C, pH 5,5 i slabo mešanje. Dobijene suspendovane ćelije se repliciraju u istoj podlozi. Nakon dve do tri nedelje, dobijene ćelije se prenose u svežu podlogu u kojoj se postiže velika koncentracija ćelija, uz obavezno formiranje agregata. Agregati se odvajaju i koriste za sledeći ciklus propagacije ćelija. Ćelije u suspenziji mogu se u specifičnim uslovima dovesti u stanje diferencijacije i organizacije tako da se mogu dobiti embrioni, korenje i klice.

Tipična podloga za gajenje biljnih ćelija i tkiva sadrži ugljenohidratni izvor energije, organske nutrijente, vitamine i regulatore rasta – hormone (citokinini, giberelini, auksini ili biljni hormon – etilen, koga produkuje sama kultura).

U biljnom svetu izuzetno je važna komunikacija među ćelijama. U celoj biljci ćelije komuniciraju preko sitnih pora nazvanih *plasmodesmata* kroz koje se razmenjuju mali molekuli iz citoplazme jedne ćelije u drugu. U ćelijskim agregatima ćelije komuniciraju preko plazmodelmata ili difuzijom specifičnih supstanci. Na primer, ćelije proizvode etilen, koji deluje kao hormon.

U velikim agregatima nastaju gradijenti koncentracija etilena i nutrijenata (kiseonik, hormoni), što ima za posledicu različitost uslova rasta ćelija. Zbog toga, iako ćelije potiču iz tkiva jedne biljne vrste (*genotipa*), one se mogu ponašati kao *mešana ćelijska kultura*. Ne postoji opšti put da se nediferencirane ćelije diferenciraju u pravcu sinteze željenog jedinjenja. Način indukcije željene diferencijacije često se otkriva empirijski.

Kulture biljnih organa

Pored biljnih ćelija i kalusa, za biotehnošku proizvodnju su značajne i kulture biljnih organa (koren, ponici – klice, somatski embrioni), jer mogu proizvoditi zadovoljavajuće količine metabolita. Njihova primena u biotehnoškoj proizvodnji pruža brojne pogodnosti. U poređenju sa kalusom i suspendovanim ćelijama, kulture biljnih organa imaju veću genetsku stabilnost i veću produktivnost željenog proizvoda (posebno kod kulture korena), a oblik u kome se nalaze („samoimobilizacija“) obezbeđuje optimalniju smešu ćelijskih tipova itd. Od posebne je koristi činjenica da se na kulturu biljnih organa može delovati aktivatorima i/ili prekursorima sinteze željenog proizvoda što omogućava povećanje produktivnosti kulture.

Među nedostacima kultura biljnih organa najbitnije su mala specifična brzina rasta i problemi konstrukcije bioreaktora za njihovo gajenje. Tako je, na primer, kod gajenja kulture korena veliki problem njihova težnja da stvaraju isprepletene formacije unutar kojih je otežan prenos mase, pa se formiraju zone „mikroklima“, koje utiču na fiziologiju i biohemiju kulture.

Poseban problem je gajenje klica (ponika). Za neke kulture klica potrebna je dnevna svetlost, dok kulture korena uspešno rastu u mraku. Kulture klica mogu biti *miksotrofične*, tj. zahtevaju eksterni izvor ugljenih hidrata i uslove za fotosintezu sa potrebom kontrole dužine ekspozicije svetlosti. Izlaganje svetlosti je neophodno da bi neke kulture proizvodile enzime koji imaju

esencijalnu ulogu u sintezi sekundarnih metabolita. Potreba izlaganju svetlosti kulture klica je jedan od problema u biorektorskoj tehnici. Problem je i to što se pojedine kulture klica ne mogu kontinualno gajiti u suspendovanoj kulturi.

Generalno posmatrano, primena kulture biljnih ćelija, kalusa i organa u biotehnologiji nema obim koji zaslužuje. Neka primenjena rešenja dala su značajan pomak u korišćenju ove vrste bioloških katalizatora. Spor rast i činjenica da sinteza nekih sekundarnih metabolita ne teče u fazi rasta rešena je primenom dvofaznog postupka kod koga se u prvoj fazi optimizuju uslovi za rast ćelija, odnosno kulture, a u drugoj fazi se optimizuju uslovi za sintezu metabolita. Dokazano je da se suspendovana kultura može gajiti slično submerznom gajenju mikroorganizama. Veliku šansu u daljoj primeni ovoj vrsti bioloških katalizatora daje tehnika imobilizacije.

2.3. ENZIMI

Enzimi su prvi put izolovani u čistom obliku 1928. godine, od kada broj poznatih enzima raste. Danas je njihov broj veći od 2000. To su proteini sa molskom masom od 15.000 pa čak i do milion (tabela 2.4).

Tabela 2.4. Molske mase nekih enzima

<i>Enzim</i>	<i>Klasifikacioni broj enzima (E.C. broj)</i>	<i>Molska masa</i>	<i>Podjedinice</i>	
			<i>Broj</i>	<i>Molska masa</i>
Ribonukleaze	2.7.7.16	13.700	-	-
Tripsin	3.4.4.4	23.800	-	-
α - Amilaze	3.2.1.1	50.000	2	25.000
Alkohol-dehidrogenaze (kvasac)	1.1.1.1	150.000	4	37.000
Aldolaze (kvasac)	4.1.2.13	80.000	2	40.000
Katalaze	1.11.1.6	232.000	4	57.000
RNA - polimeraze (<i>Azotobacter</i>)	2.7.7.6	782.000	2	391.000

Enzimi su biološki katalizatori koji katalizuju hemijske reakcije metabolizma svih bioloških vrsta. Po delovanju su veoma slični hemijskim katalizatorima, ali su u odnosu na njih u ambijentalnim uslovima znatno efikasniji i specifičniji. Suština njihovog katalitičkog delovanja je smanjenje slobodne energije aktivacije hemijskih reakcija. Na primer, na 20 °C, aktivaciona energija razlaganja vodonikperoksida iznosi:

- u odustvu katalizatora 75,4 kJ/mol,
- u prisustvu hemijskog katalizatora (koloidna platina) 54,4 kJ/mol i
- u prisustvu enzimskog katalizatora 33,5 kJ/mol.

Pri tome, smanjenje energije aktivacije za male vrednosti ima veliki efekat povećanja brzine reakcije, koje je u ovom slučaju reda 10^8 .

Hemijska priroda enzima

Enzimi koji se sastoje od jednog polipeptidnog lanca (što je ređi slučaj) nazivaju se *monomerni enzimi*, dok se oni sa dva ili više polipeptidnih lanaca (podjedinice) nazivaju *oligomerni enzimi*. Složeni enzimski kompleksi proteina (oligomeri) se uglavnom izoluju u obliku svojih podjedinica, koje mogu da se razlikuju međusobno po molskim masama i sastavu aminokiselina. U nekim slučajevima, enzimi u ćelijama se grupišu i obrazuju multipleks, koji katalizuje specifične reakcije i najčešće se veoma teško izoluje iz ćelije u aktivnom obliku.

Enzim je u aktivnom stanju kada dolazi do spajanja između proteinskog dela i nekog "kofaktora" (metalni jon ili organski molekul – "koenzim") tj. kada se obrazuje "aktivni kompleks". Od metalnih jona, u enzimskim kompleksima kao kofaktori učestvuju najčešće: Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} ili Fe^{3+} , Cu^{2+} , K^+ , Na^+ , a od organskih molekula NAD, FAD, CoA, ATP itd. Svi katalizatori gube svoju aktivnost tokom učestvovanja u reakcijama transformisanja hemijskih reaktanata u različite proizvode, s tim što je to izraženije kod enzima.

Za enzim koji katalizuje određenu hemijsku reakciju karakteristični su hemijski sastav i konformacija. Postoje i enzimi koji katalizuju istu reakciju, a drugačijeg su hemijskog sastava. Takvi enzimi se nazivaju *izoenzimi*. Većina enzima katalitički deluje individualno, ali postoje i *enzimski kompleksi* koji katalizuju kompleksne hemijske reakcije.

Nazivi enzima se izvode iz naziva hemijskog jedinjenja na koje deluju ili naziva reakcije koju katalizuju, uz sufiks „-aza“. Hemijsko jedinjenje čije reagovanje enzim katalizuje naziva se *supstrat*.¹ Međunarodna organizacija za enzime (EIUB) je 1961. godine uvela klasifikaciju enzima, dodelila broj (kod) svakom enzimu, tj. E.C. broj.² Prvi broj predstavlja osnovnu klasu enzima. Podela enzima po osnovnim klasama je data u tabeli 2.5. Svaki enzim, koji je otkriven pre 1961. godine, ima trivijalno ime i ime po klasifikaciji Komisije EIUB, što ponekad može da dovede do zabune pri upotrebi različitih imena.

Podela enzima se vrši preme tipu reakcija koje katalizuju. (tabela 2.5).

Katalitička sposobnost enzima vezana je za njihovu hemijsku građu i prostornu orijentaciju molekula, koja se naziva *konformacija*. Konformacija enzima se formira zahvaljujući *primarnoj, sekundarnoj, tercijalnoj i kvaternoj strukturi*. Primarnu strukturu čini visokomolekularni peptidni niz, tj. veliki broj aminokiselina povezan peptidnom vezom. Peptidni niz se specifično orijentiše u prostoru formirajući prvo sekundarnu, zatim tercijernu i na kraju kvaternu strukturu. Prostorna struktura se stabilizuje pomoću vodoničnih mostova, jonskih veza i van der Waals-ovih sila. Od svih struktura najstabilnija je primarna, jer je čine prave hemijske (peptidne) veze. Sve ostale veze u konformaciji su nedovoljno stabilne i relativno se lako raskidaju nepovoljnim faktorima okoline. Zbog toga, enzimi imaju *optimalnu katalitičku efikasnost* u uslovima optimalne temperature, pH vrednosti, koncentracije jona, posebno teških metala. Iz toga sledi da postoje fizički i hemijski *inhibitori* enzimске katalize.

¹ U mikrobiološkoj praksi i biotehnologiji pod pojmom *supstrat* često se podrazumeva i složena hranljiva podloga za gajenje mikroorganizama.

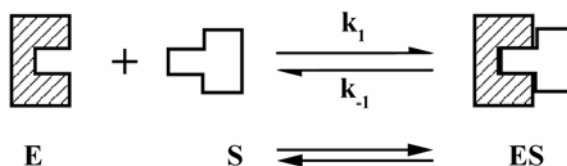
² Enzyme Commission Number.

Tabela 2.5 Klasifikacija enzima prema Komisiji za enzime

<i>Klasa</i>	<i>Klasifikacioni broj (E.C.)</i>	<i>Katalizovana reakcija</i>
Oksido-reduktaze	1.	Oksido-redukcija
	1.1.	
	1.2.	
	1.3.	
	1.4.	
	1.5.	
	1.6.	
Transferaze	2.	Prenos funkcionalnih grupa
	2.1.	Jedna grupa jedinjenja ugljenika
	2.2.	Aldehidna i keto grupa
	2.3.	Acil grupa
	2.4.	Glikozna grupa
Hidrolaze	3.	Reakcije hidrolize
	3.1.	Estri
	3.2.	Glikozidna veza
	3.3.	
	3.4.	Peptidna veza
	3.5.	Druge C – N veze
Liaze	4.	Dodavanje ili izuzimanje grupa kod jedinjenja sa dvostrukim vezama
	4.1.	
	4.2.	
	4.3.	
Izomeraze	5.	Reakcije izomerizacije
	5.1.	Recemaze
Ligaze (sintetaze)	6.	Obrazovanje veze (spajanje dva jedinjenja) sa ATP
	6.1.	
	6.2.	
	6.3.	
	6.4.	

Mehanizam enzimskog delovanja nije, za sada, u potpunosti izučen i u osnovi se objašnjava modelom „ključ u bravu“ (slika 2.3). Naime, enzim (E) i supstrat (S) prvo formiraju kompleks (ES) tako što se supstrat veže za *aktivni centar* enzima. To vezivanje se ostvaruje pomoću relativno slabih veza (van der Waals sile, vodonični mostovi, jonske veze). Formiranje ovog kompleksa ima za posledicu snižavanje energije aktivacije date hemijske reakcije nakon čega se kompleks raspada na produkt (P) uz oslobađanje enzima za dalju katalizu.

Kinetika enzimski katalizovanih reakcija od posebnog je značaja sa inženjerskog aspekta, jer služi kao osnova za projektovanje procesa. Kinetika enzimski katalizovanih reakcija opisana je u poglavlju 3.1. Enzimi koji su stalno prisutni u ćelijama nazivaju se *konstitutivni enzimi*. Pojedine vrste ćelija, u uslovima postojanja specifičnih supstrata u životnoj sredini, sintetizuju nekonstitutivne enzime, da bi mogle koristiti i te supstance.



Slika 2.3 Šematski prikaz enzimske katalize po modelu "ključ u bravu"

Ovi enzimi se nazivaju *induktivni enzimi*. Najveći broj enzima deluju unutar ćelije i oni se nazivaju *intraćelijski enzimi*. Da bi mogla iskoristiti supstrate složene građe koji se ne mogu asimilovati, tj. koji ne mogu proći kroz ćelijski zid i membranu, pojedine vrste mogu izlučivati u okolnu sredinu *hidrolaze*, tj. enzime koji razlažu složene supstrate najčešće do monomera, koji se mogu asimilovati. Ovi enzimi se nazivaju *ekstraćelijski enzimi*.

Da bi se mogli koristiti ekstraćelijski, *in vitro*, u bireaktorima za enzimске procese (*enzimski reaktori*), intraćelijske enzime treba izdvojiti iz ćelija, a ekstraćelijske ekstrahovati iz sredine u koju su izlučeni.

Primena enzimskih procesa

Primena enzima u biotehnologiji za proizvodnju velikog boja hemikalija intenzivno se razvija, jer pruža niz prednosti u odnosu na hemijsku sintezu, kao što su: velika efikasnost, potpuna reakciona selektivnost bez nastajanja sporednih proizvoda i praktično ambijentalni uslovi izvođenja. Reakcije se izvode sa čistim supstratima te, pošto nema sporednih proizvoda reakcije, izolovanje i prečišćavanje su jednostavniji. Broj korisnih enzimskih sinteza i transformacija je veoma velik i stalno se povećava, tako da one sve više potiskuju hemijsku sintezu. Tome je najviše doprineo intenzivan razvoj biotehnološke proizvodnje enzima. Danas na tržištu postoji veliki broj enzima, koji se nabavljaju se u tečnom ili sprašenom obliku, najčešće pripremljenom za upotrebu.

U biotehnološkoj proizvodnji, enzimi, kao i mikrobne, animalne i biljne ćelije, mogu se primeniti na dva načina:

- suspendovani u rastvoru supstrata ili
- imobilisani.

2.4. IMOBILIZACIJA BIOLOŠKIH KATALIZATORA

Pod imobilizacijom bioloških katalizatora podrazumeva se postupak kojim se oni, fizičkim ili hemijskim putem, vezuju za površinu nosača ili se „zarobljavaju“ unutar strukture nosača. Razvoj tehnike imobilizacije bioloških katalizatora dao je biotehnološkoj proizvodnji snažan raz-

vojni impuls i doveo do pojednostavljenja biotehnoških postupaka. Osnovne prednosti imobilizacije su:

- povećana koncentracija katalizatora,
- eliminacija skupog postupka recirkulacije katalizatora,
- zaštita ćelija od oštećenja silama smicanja usled mešanja,
- povećanje genetske stabilnosti mikrobnih, animalnih i biljnih ćelija,
- izvođenje kontinualnih procesa bez opasnosti od ispiranja katalizatora,
- veća uniformnost procesnih parametara u biohemijskim reaktorima,
- veća zapreminska produktivnost biohemijskih reaktora zbog moguće primene većeg protoka i veće koncentracije supstrata.

U primeni imobilisanih bioloških katalizatora postoje problemi, kao što su:

- željeni proizvod mora biti izlučen iz ćelije u okolnu sredinu,
- neuniformnost u bioreктору zbog neadekvatnog mešanja,
- razaranje strukture nosača imobilisanih ćelija zbog izdvajanje gasa (na primer CO_2) i dr.

Imobilizacija može biti *pasivna* i *aktivna*.

2.4.1. Pasivna imobilizacija

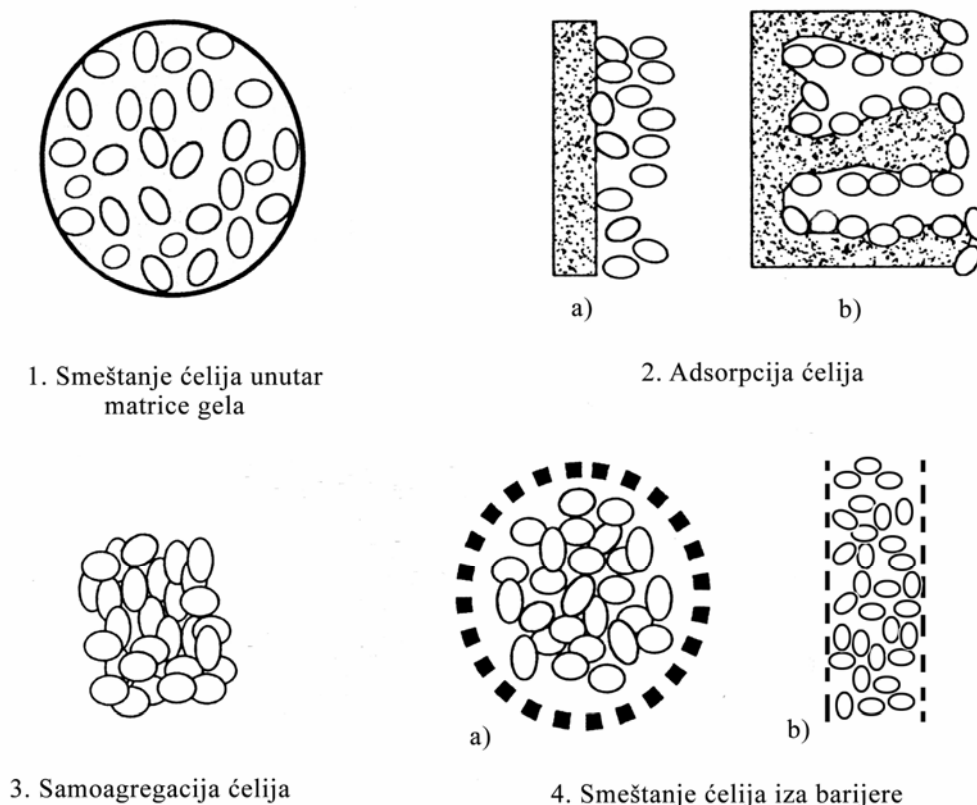
Pasivna imobilizacija je prirodna pojava povezana sa sposobnošću pojedinih mikroorganizama i nekih animalnih ćelija da se vežu za površinu čvrstog nosača u vodenoj sredini. Ona se manifestuje višeslojnim rastom ćelija na površini čvrstog nosača. U prirodi to je način opstanka mikrobioloških vrsta u tekućim vodama, a u biotehnologiji se koristi u biološkim sistemima za prečišćavanje otpadnih voda i za pojedine fermentacione procese.

Ovaj način imobilizacije može biti od značaja za biotehnošku proizvodnju, jer uslovi limitirajuće difuzije nutrijenata i kiseonika u biofilmu bitno utiču na fiziologiju mikrobioloških vrsta, što se može iskoristiti za dobijanje korisnih metabolita. Za ovu vrstu proizvodnje treba izvršiti selekciju proizvodnih mikroorganizama i razviti pogodne bioreaktore.

2.4.2. Aktivna imobilizacija

Pod aktivnom imobilizacijom bioloških katalizatora podrazumevaju se specifični postupci za njihovo vezivanje za posebno pripremljene nosače, nezavisno od toga da li oni imaju prirodnu sklonost za imobilizaciju. Iako se postupci imobilizacije pojedinih bioloških katalizatora (ćelija i enzima) mogu razlikovati u detaljima, sve ih je moguće svrstati u tri osnovne grupe (slika 2.4):

- smeštanje unutar matrice nosača,
- adsorpcija na nosaču,
- smeštanje iza membrane (barijere) i
- samoagregacija ćelija.

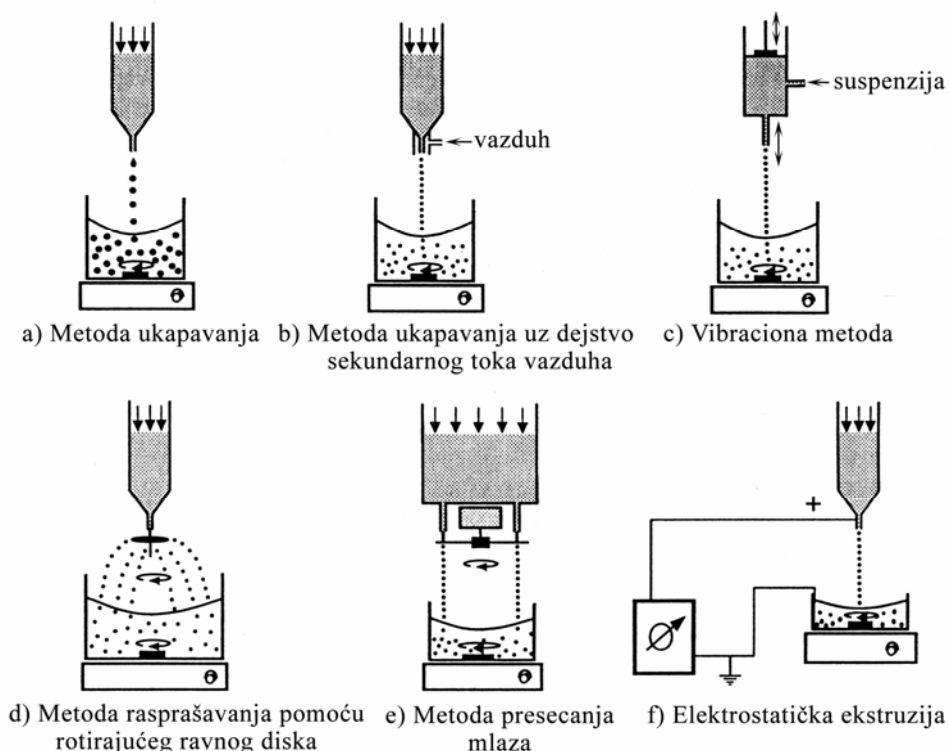


Slika 2.4. Šematski prikaz osnovnih načina imobilizacije ćelija i enzima

Smeštanje unutar matrice nosača. Kao nosači, najčešće se koriste polisaharidi (alginati, agar, škrob, pektin) ili proteinske supstance (kolagen, želatin). Radi imobilizacije, suspenzija ćelija ili enzima meša se sa rastvorom nosača. Dobijena smeša se disperguje u kapljice (matrica gela), postupcima prikazanim na slici 2.5 ili emulgovanjem. Kapljice se, zatim, podvrgavaju postupku očvršćavanja, dodatkom pogodnog agensa. Formirane kapljice, u koje je zarobljen biološki katalizator, moraju biti dovoljno porozne, da bi se kroz njih nesmetano odvijao prenos mase (difuzija). Prednost ovog postupka je velika koncentracija biološkog katalizatora po jedinici mase nosača, a nedostatak je nedovoljna mehanička otpornost čestica i problemi prenosa mase u dublje slojeve matrice nosača. Zbog jednostavnosti izvođenja i visoke koncentracije biološkog katalizatora u nosaču, ovaj postupak imobilizacije se u praksi najčešće primenjuje.

Adsorpcija na nosaču. Ovim postupkom se ne postiže visoka stabilnost imobilisanog biološkog katalizatora, ali je zbog toga manji problem prenosa mase u bioreaktoru. Razlog tome je što se katalizator adsorbuje na površinu nosača i za njega vezuje slabim van der Waals-ovim silama, vodoničnim mostovima i jonskim vezama. Zbog slabe povezanosti tokom primene, deo katalizatora se spira sa nosača, što smanjuje efikasnost bioprocesa po jedinici mase nosača. Spiranju

katalizatora može doprineti i promena uslova u bioreaktoru koji utiču na vezu nosač – katalizator (pH, temperatura, smicanje usled mešanja). Pozitivno je to što se nosač može regenerisati.



Slika 2.5. Šematski prikaz postupaka za dobijanje čestica imobilisanog biokatalizatora

Za ovu vrstu imobilizacije koriste se nosači sa malim porama, koji ne omogućavaju penetraciju katalizatora u njegovu unutrašnjost, i nosači sa dovoljno velikim porama u koje katalizator može penetrirati. Po prirodi, nosači su neorganskog (metali, oksidi metala, staklo, staklena vlakna, diatomejske zemlje i zeoliti, sinterovani porozni materijali, keramika itd.) i organskog (celuloza i njeni derivati, pamučna vlakna, drvene strugotine, jonoizmenjivačke smole, želatin, agar, dekstran itd.) karaktera.

Smeštanje iza barijere. Ova vrsta imobilizacije se izvodi na dva načina: 1) *mikroinkapsulacijom*, kod koje je katalizator suspendovan u sfernoj mikrokapsuli, koja je omotana polupropusljivom membranom, ili 2) smeštanjem biološkog katalizatora unutar sfernog matriksa sintetičkih membrana ili vezivanjem za unutrašnju stranu nosača, koji imaju oblik cevi ili ploča. *Mikroinkapsulacija* je složena tehnika dobijanja imobilisanih bioloških katalizatora, koja je prvobitno razvijena za potrebe medicine, ali se danas intenzivno razvija u biotehnološkoj proizvodnji za

dobijanje visokovrednih bioloških materijala imobilizacijom animalnih i biljnih ćelija (monoklonarna antitela, humani interleukin, alfa- i beta- interferon, bioinsekticidi, itd.).

Fiksiranje na polupropusnim membranama. Ova tehnika fiksiranja bioloških katalizatora na polupropustljive membrane pruža šansu primeni bioreaktora u kojima će se, na membrani sa imobilisanim katalizatorom, odvijati biosintetski proces. Zahvaljujući selektivnoj propustljivosti membrane, kroz nju će na suprotnu stranu prolaziti metabolit. Ovo je tip *hibridnog bioreaktora* u kome su povezane faze biosinteze i separacije proizvoda. U ovim reaktorima moguće je ostvariti veću biosintezu metabolita, bez inhibicije metaboličkog puta povratnom spregom.

Samoagregacija ćelija. Ovo je prirodni oblik imobilizacije, koji poseduju određene vrste mikroorganizama, kod koje se ćelije međusobno povezuju slabim vezama. Zbog slabe povezanosti ćelija, agregati se lako raspadaju. Za održavanje ćelijskih agregata, u bioreaktorima su potrebni strogo kontrolisani uslovi, a posebno kontrola sile smicanja. Zbog nestabilnosti, ova vrsta imobilizacije se ređe primenjuje. Specifičan oblik samoagregacije je, na primer, formiranje „peleta“ kod plesni.

Bioreaktori za imobilisane biološke katalizatore. Kako je ranije navedeno, jedan od najznačajnijih problema u korišćenju imobilisanih bioloških katalizatora u industrijskim razmerama je prenos mase i toplote, kao i sile smicanja u bioreaktorima. Specifične konstrukcije bioreaktora za ovu namenu opisane su u poglavlju 4.

2.5. ČUVANJE ČISTIH KULTURA

Bez obzira na koji način su dobijeni sojevi proizvodnih mikroorganizama, izolacijom ili oplemenjivanjem, jedan od značajnih problema je kako sačuvati njihova svojstva u što dužem vremenskom periodu, po mogućnosti za stalno. Tokom čuvanja, kod mikroorganizama može doći do značajnih promena, pa i do gubitka oplemenjenih svojstava. Do tih promena može doći ako su ćelije životno aktivne, kad je moguće polno ili vegetativno razmnožavanje koje može dovesti do novih genskih kombinacija. Te promene mogu biti stimulisane nepovoljnim uslovima životne sredine. Što je vreme čuvanja duže i brzina umnožavanja veća (vreme generacije kraće), mogućnost promene svojstava soja je veća.

Da ne dođe do promena, čiste kulture proizvodnih mikroorganizama treba čuvati u uslovima koji obezbeđuju:

- visok stepen preživljavanja,
- zaštitu od delovanja mutagenih agenasa i
- zaštitu od kontakta sa drugim (infektivnim) mikroorganizmima.

Očigledno je da je za dugotrajno čuvanje proizvodnih sojeva imperativno usporiti ili, ako je moguće, potpuno sprečiti proces umnožavanja. Evidentno je da je to najlakše postići kod sporogenih vrsta. Njih treba dovesti u stanje sporulacije, nastale spore odvojiti i čuvati ih u uslovima snižene temperature bez mogućnosti apsorpcije vlage, obično u zatopljenim epruvetama smeštenim u hladnjak.

Za čuvanje nesporogenih vrsta razvijen je veći broj postupaka. Najčešće se primenjuju:

- čuvanje u hranljivim podlogama na niskim temperaturama,
- zamrzavanje kultura i čuvanje na niskim temperaturama i
- sušenje ćelija proizvodnih sojeva.

Čuvanje u hranljivim podlogama (tečnim ili sa agarom) na niskoj temperaturi (u hladnjaku na oko 5 °C) koristi se za kratkotrajno čuvanje, obično u pogonskim laboratorijama. Dugotrajnije čuvanje na ovaj način nije pouzdano.

U *anabiotičko stanje* nesporogene vrste najlakše se mogu dovesti oduzimanjem vode sušenjem ili zamrzavanjem.

Postupak sušenja sublimacijom tj. liofilizacijom. Potpuno oduzimanje vode iz ćelija u principu dovodi do njihovog odumiranja. Zbog toga sušenje mora da se izvrši kontrolisano, tako da se ne oduzme konstitutivna voda. Razvijeno je više postupaka sušenja, a najpouzdanije je sušenje *sublimacijom (liofilizacijom)*. Tečna kultura u epruveti, kojoj su dodati protektori (glicerol, obrano mleko, dimetilsulfoksin – DMSO), prvo se zamrzne na temperaturu –60 °C, a zatim se u vakuumu (oko 4 Pa) voda otpari sublimacijom. Liofilizovana kultura se čuva u hladnjaku u zatvorenoj epruveti sa silikagelom. Pre upotrebe liofilizovana kultura se aktivira u tečnoj hranljivoj podlozi optimalnog sastava i u optimalnim uslovima.

Postupak zamrzavanja. Kod ovog postupka, tečna kultura se zatapa u epruvete, koje se ohlade do oko –40 °C, a zatim čuvaju u tečnom azotu (–192 °C). Hlađenje se mora obaviti polako. Brzina zamrzavanja ne sme biti veća od snižavanja temperature 2 °C/min, da bi se sprečilo nastajanje krupnih kristala vode koji mogu razoriti strukturu ćelija.

2.6. ZBIRKE BIOLOŠKIH KATALIZATORA

U pogonskim uslovima jedino je prihvatljiv postupak čuvanja kultura proizvodnih organizama u hranljivim podlogama na sniženoj temperaturi. Dugotrajno čuvanje se primenjuje u specijalizovanim laboratorijama i institucijama.

Da bi se sačuvali vredni proizvodni sojevi mikrobnih, animalnih i biljnih ćelija, formirane su zbirke, tzv. „banke“ referentnih i proizvodnih kultura ćelija. Željene kulture bioloških katalizatora mogu se kupiti od tih „banaka“ po ceni koja zavisi od vrste i kvaliteta soja i u principu je velika.

Najvažnije zbirke proizvodnih sojeva su:

American Type Collection (ATCC, Rokvil, SAD),

Northhern Regional Research Center (NRRL, Peoria, SAD),

Kolekcija sojeva mikroorganizama, Institut za mikrobiologiju Akademije nauka (Rusija, Moskva),

National Collection of Type Culture (NCTC, London, Velika Britanija),

Deutsches Sammlung von Microorganismen (DSM, Getingen, Nemačka),

Collection Nationale de Cultures de Microrganismes (Pariz, Francuska),

Central Bureau vor Schimmelcultures (SCB, Bern, Švajcarska) i

Culture Collection of Institute for Fermentation (Osaka, Japan).

2.7. INOKULUM

Pod inokulumom ili starter kulturama podrazumevaju se polazne kulture proizvodnih organizama kojima se zasejavaju (inokulišu) bioreaktori u biotehnološkoj proizvodnji. Pojam starter kulture koriste bioinženjeri u žargonu. Inokulum je, pre svega, čista kultura proizvodnog organizama. Pod čistom kulturom se podrazumeva kultura koja je razvijena iz jedne polazne ćelije proizvodnog organizama. Treba se podsetiti da postoji *čista monokultura* i *čista mešana kultura*. Čistu monokulturu čine samo ćelije jednog odabranog soja proizvodnog organizma, a čistu mešanu kulturu čine ćelije više sojeva proizvodnih organizama udruženih radi postizanja određenih efekata. U slučaju čiste mešane kulture, reči čista kultura označavaju da se u smeši nalaze samo ćelije odabranih sojeva proizvodnih organizama, a ne i neželjeni, infektivni organizmi. Za pripremu čistih mešanih kultura potrebno je poznavati međusoban odnos bioloških vrsta u životnoj sredini.

Ako se nađu u istoj životnoj sredini, prisutne biološke vrste ne deluju nezavisno. Među njima se uspostavljaju *simbiotski* ili *antagonistički* odnosi.

Simbioza predstavlja oblik zajedničkog življenja dve ili više različitih bioloških vrsta u istoj sredini, a biološka posledica je korist za svaku vrstu. Na primer, metabolit jedne biološke vrste, čije nagomilavanje može biti štetno za producenta (inhibicija povratnom spregom), druge biološke vrste koriste kao hranljivi supstrat ili bios. U biotehnološkoj praksi, simbioza se koristi kad se udruživanjem više mikrobioloških vrsta postiže bolja biološka aktivnost proizvodnog soja. Dobar primer za simbiotsko delovanje velikog broja bioloških vrsta (većina su mikroorganizmi) su biološki postupci prečišćavanja otpadnih voda.

Antagonizam je po delovanju suprotan simbiozi. U ovom slučaju, dve ili više bioloških vrsta deluju suprotno jedna drugoj u težnji da iz sredine potisnu konkurenciju za hranom. Jedan od oblika antagonističkog delovanja je produkcija antibiotika od strane jedne vrste, radi usporavanja ili potpunog sprečavanja rasta drugih vrsta.

Proizvodnja inokuluma. Količina inokuluma koju treba pripremiti mora da zadovolji potrebe zasejavanja (inokulacije) određene zapremine hranljive podloge u jednom ili više bioreaktora. Kad je inokulum čista monokultura, koncentracija ćelija, zavisno od vrste bioprocesa, obično se kreće između 10^6 i 10^{12} ćelija/cm³. Inokulum se, u principu, proizvodi u pogonu, a znatno ređe se preuzima iz drugih pogona sa identičnom proizvodnjom, jer je u toj manipulaciji teško očuvati njegovu sterilnost i proizvodnu stabilnost. U postupku umnožavanja broja ćelija inokuluma najpre se u pogonskoj laboratoriji proizvodi *laboratorijska čista kultura*, a zatim u pogonu *pogonska čista kultura*. Postupak njihove proizvodnje opisan je u poglavlju 6.4.

3. INŽENJERSKI ASPEKTI BIOPROCESA

Kinetika, termodinamika, zajedno sa stehiometrijom bioprocesa predstavljaju osnovu reakcionog inženjerstva. Kinetika proučava hemijske reakcije s aspekta njihove brzine i faktora koji na nju utiču. Stehiometrija se bavi kvantitativnim sastavom hemijskih jedinjenja i konverzijom reaktanata u proizvode u hemijskim reakcijama. Termodinamika se, pak, bavi transformacijama energije i omogućuje da se dođe do podataka o toploti reakcije. Termodinamička, stehiometrijska i kinetička analiza bioprocesa zasniva se na razmatranju izmene mase i energije između živog organizma i njegove okoline. U tom kontekstu živa ćelija se posmatra kao hemijski reaktor koji vrši razmenu energije u obliku hemijskih jedinjenja i toplote.

Bioprocen predstavlja proces u kome se organska sirovina (supstrat) prevodi u proizvod delovanjem živih ćelija mikroorganizama ili viših organizama ili enzima¹.

Enzimski bioproceni se mogu prikazati pomoću jednačine:



a bioprocen pomoću živih ćelija sa:



gde je S – supstrat (organska supstanca), P – proizvod, E – enzim i X – živa ćelija.

Osnovna razlika između ova dva bioprocesa je u tome što enzim deluje na supstrat tokom nastajanja proizvoda i ne povećava mu se količina, dok se u drugom slučaju žive ćelije reprodukuju i povećava im se koncentracija tokom izvođenja bioprocesa.

Izučavanje kinetike bioprocesa je značajno da bi se razumelo na koji način se on odvija. Kad se govori uopšteno o kinetici bioprocesa, onda se razlikuje:

- makrokinetika (na nivou ćelija, tj. bioreaktora) i
- mikrokinetika (na nivou molekula, tj. procesa koji se odvijaju unutar ćelija).

Bioproceno inženjerstvo razmatra uglavnom makrokinetiku, tj. zbirne događaje koji se odigravaju u bioreaktoru, kao rezultat delovanja biokatalizatora. Makrokinetika se može odnositi na *nestacionarne procese*, čije se promenljive menjaju sa vremenom, i *stacionarne procese*, čije se promenljive ne menjaju sa vremenom, tj. *kontinualne procese*. *Diskontinualni (šaržni) procesi* su, po svojoj prirodi, nestacionarni, dok *kontinualni procesi* mogu biti stacionarni. U diskontinual-

¹ Često se u značenju bioprocen koristi termin „fermentacija”, koja se striktno odnosi na alkoholnu fermentaciju. Pod ovim terminom mogu se podrazumevati jednostavne i kompleksne biološke procese koji se dele u dve osnovne grupe: (1) oni koji se odvijaju pomoću mikroorganizama (kvasci, bakterije, plesni, alge itd.) ili ćelija tkiva viših organizama i (2) procesi koji se odigravaju pomoću enzima (hemijaska jedinjenja kompleksnog sastava) koji su dobijeni mikrobiološkim putem.

nim procesima koriste se *diskontinualni (šaržni) bioreaktori*, a u kontinualnim – *protočni bioreaktori*. U kintekskim analizama se, najčešće, koriste modeli idealnih bioreaktora.

Idealni diskontinualni (šaržni) bioreaktor se odlikuje idealnim mešanjem reakcione smeše, što ima za posledicu homogen sastav i uniformnu temperaturu reakcione smeše. U ovaj bioreaktor ne dovode se reaktanti, niti se odvodi reakciona smeša.

Osnovni tipovi idealnih protočnih reaktora su *bioreaktor sa potpunim mešanjem* i *cevni bioreaktor*. Model prvog bioreaktora zasniva se na pretpostavci o *proticanju sa perfektnim mešanjem*, koja podrazumeva: idealno mešanje reakcione smeše, nepromenljivu zapreminu reakcione smeše (tj. jednakost brzine priticanja i isticanja reakcione smeše), homogen sastav i uniformnu temperaturu reakcione smeše i identičnost sastava reakcione smeše u bioreaktoru i reakcione smeše koja ističe iz njega. Model drugog bioreaktora odlikuje se *klipnim proticanjem*, koje znači da ne postoji promena aksijalne brzine po poprečnom preseku (tj. ne postoji povratno mešanje).

Kinetika bioprocasa se najčešće proučava u diskontinualnim bioreaktorima, ali zbog toga nije moguće pratiti promene u ćelijama, tj. na molekulskom nivou (mikrokinetika). Kinetički parametri, koji se određuju na ovaj način, imaju svoju vrednost za projektovanje industrijskih bioreaktora, koji rade diskontinualno, pa čak i kontinualno.

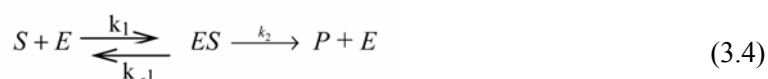
3.1. KINETIKA ENZIMSKIH REAKCIJA.

3.1.1. Kinetika jednostavnih enzimskih reakcija bez inhibicije

Predmet analize je brzina nastajanja proizvoda P iz supstrata S u reakciji katalizovanoj nekim enzimom E , saglasno jednačini (3.1). Brzina ove reakcije v u šaržnom bioreaktoru definiše se kao brzina nestajanja supstrata ili brzina nastajanja proizvoda pomoću sledeće jednačine:

$$v = - \frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} \quad (3.3)$$

Reakcija (3.1) odvija se u nekoliko koraka, po mehanizmu “korak po korak”. Za enzimске reakcije je predložen jednostavan mehanizam, poznat kao model *Michaelis-Menten-a*, u obliku:



Po predloženom modelu enzim gradi sa supstratom kompleks enzim – supstrat ES u povratnoj reakciji, a zatim u nepovratnoj reakciji iz kompleksa ES nastaju proizvod i slobodni enzim. Ako je početna koncentracija supstrata S_0 mnogo veća od početne koncentracije enzima E_0 , onda je brzina nastajanja proizvoda data izrazom:

$$v = - \frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = k_2 [ES] \quad (3.5)$$

Brzina nastajanja kompleksa ES je:

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1 \cdot S \cdot E - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3.6)$$

a brzina nestajanja supstrata:

$$-\frac{dS}{dt} = k_1 \cdot S \cdot E - k_{-1}[ES] \quad (3.7)$$

Ukupna koncentracija enzima u svakom trenutku tokom odvijanja reakcije je:

$$E_0 = E + [ES] \quad (3.8)$$

Jednačine (3.5), (3.6) i (3.7) su simultane diferencijalne jednačine koje se, uz početne uslove:

$$t = 0, S(0) = S_0, P(0) = 0 \text{ i } [ES]_0 = 0 \quad (3.9)$$

moгу rešiti na računaru. Rešenjem ovih jednačina, uz pretpostavku da je $k_1 \approx k_{-1} \approx k_2$, dobijaju se profili koncentracija enzima, supstrata, kompleksa ES i proizvoda, koji su prikazani na slici 3.1.

Analizom slike 3.1 može se zaključiti da ваži aproksimacija:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (3.10)$$

Ova aproksimacija ne ваži samo za kratak početni period odvijanja enzimske reakcije i poznata je u literaturi kao “kvazi stacionarna aproksimacija”. Ona ваži jedino pod uslovom da je $S_0 \gg E_0$. Kad se uzme u obzir jednačina (3.10) onda jednačina (3.6) postaje:

$$\frac{d(ES)}{dt} = 0 = k_1 \cdot S \cdot E - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3.11)$$

odakle se dobija:

$$E = \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right) \frac{1}{S} [ES] \quad (3.12)$$

Zamenom jednačine (3.12) u jednačini (3.8) dobija se:

$$E_0 = [ES] \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \frac{1}{S} + 1 \right) \quad (3.13)$$

Ako se količnik tri konstante u jednačini (3.13) označi sa K_m , onda je:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} \quad (3.14)$$

odnosno:

$$K_m = K_s + \frac{k_2}{k_1} \quad (3.15)$$

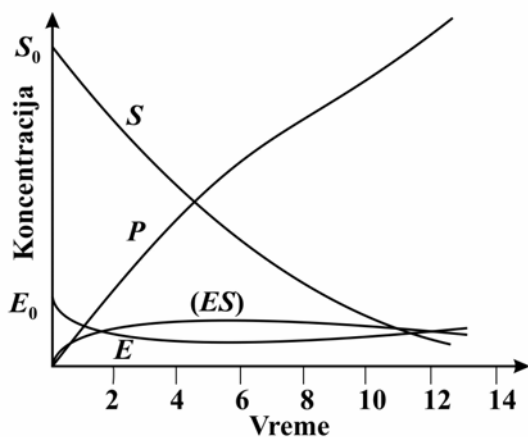
gde je: K_m - *Michaelis-Menten*-ova konstanta, a $K_s = k_{-1}/k_1$ - konstanta disocijacije kompleksa enzim – supstrat. Ako je $k_2 \ll k_1$, onda je $K_m = K_s$.

Kad se jednačina (3.13) reši po $[ES]$ dobija se:

$$[ES] = \frac{E_0}{K_m \frac{1}{S} + 1} \quad (3.16)$$

Zamenom jednačine (3.16) u jednačinu (3.5) dobija se jednačina za brzinu enzimske reakcije u obliku:

$$v = \frac{dP}{dt} = \frac{k_2 \cdot E_0 \cdot S}{K_m + S} \quad (3.17)$$



Slika 3.1 Promena koncentracija enzima, supstrata, kompleksa ES i proizvoda sa vremenom uz pretpostavku da je $k_1 \approx k_{-1} \approx k_2$

odnosno:

$$v = v_m \frac{S}{K_m + S} \quad (3.18)$$

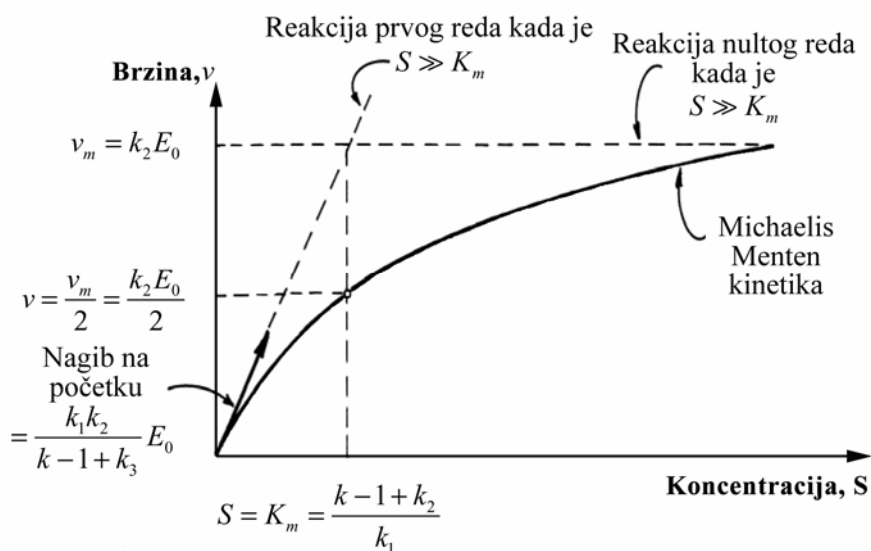
gde je: $v_m = k_2 E_0$ – maksimalna brzina enzimske reakcije. Jednačina (3.18) je poznata u literaturi kao *Michaelis-Menten*-ov kinetički model za odvijanje enzimskih reakcija.

Ako se u jednačinu (3.18) stavi da je $v = v_m/2$, dobija se da je $K_m = S$. Prema tome, K_m je ona koncentracija supstrata pri kojoj je brzina odvijanja enzimske reakcije jednaka polovini maksimalne brzine. Vrednosti za K_m su obrnuto proporcionalne “hemijском afinitetu” enzima prema supstratu. Manje vrednosti za K_m govore da se enzimska reakcija odvija brže. U tabeli 3.1 su date neke vrednosti za (K_m).

Tabela 3.1 Vrednosti K_m za neke enzime

Enzim	Supstrat	K_m (mol/dm ³)
Maltaza	Maltoza	10^{-1}
Saharaza	Saharoza	10^{-2}
Fosfataza	Gliceroza	10^{-3}
Laktat-dehidrogenaza	Piruvat	10^{-4}

Jednačina (3.18) je nelinearna, a na slici 3.2 prikazana je funkcionalna zavisnost brzine reakcije od koncentracije supstrata.



Slika 3.2 Grafički prikaz Michaelis-Menten-ovog kinetičkog modela

Iz jednačine (3.12) dobija se jednačina:

$$\frac{[ES]}{E} = \frac{S}{K_m} = \frac{\text{enzim vezan u kompleksu}}{\text{enzim u slobodnom stanju}} \quad (3.19)$$

Na osnovu jednačine (3.19) i slike (3.2) mogu se izvesti sledeći zaključci:

- kad je $S = K_m$, onda je polovina enzima vezana, a polovina slobodna ($[ES] = E$),
- kad je $S \gg K_m$, enzim je većim delom vezan u kompleksu i
- kad je $S \ll K_m$, enzim je uglavnom u slobodnom obliku.

Generalno uzevši, eliminacija koncentracije intermedijernog kompleksa ES po pretpostavljenom mehanizmu delovanja enzima, jednačina (3.4), može se izvesti na nekoliko načina:

- I 1. $[ES] \cong 0$, enzim je uglavnom u slobodnom obliku, tj. ($E = E_0$) i
 2. $[ES] > 0$, veći deo enzima je u vezanom obliku, tj. $E_0 = E + [ES]$ $E_0 = E + (ES)$;
 II 3. Koristeći se konceptom odvijanja reakcije "korak po korak", tj. da ukupnu brzinu određuje najsporija reakcija, a da su sve druge u ravnoteži, tj.:

$$K = \frac{[ES]}{S \cdot E} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (3.20)$$

Ovaj koncept se koristi u "heterogenoj" katalizi.

- III 4. U stacionarnom stanju važi jednačina

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (3.21)$$

odakle sledi da je $[ES] = \text{const}$. Ovaj koncept izvođenja jednačine za brzinu reakcije se koristi u "homogenoj" katalizi.

Kad se uzmu u obzir prva i treća pretpostavka, onda se dobija:

$$v = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1}} \cdot S \cdot E_0 \quad (3.22)$$

dok se prvom i četvrtom pretpostavkom dobija sledeća jednačina za brzinu reakcije:

$$v = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1} + k_2} \cdot S \cdot E_0 \quad (3.23)$$

Jednačinu za brzinu reakcije ne daju reakcije *nultog* i *prvog* reda u odnosu na supstrat.

Uzimanjem u obzir druge i treće pretpostavke, jednačina za brzinu reakcije postaje:

$$v = \frac{k_2 \cdot S \cdot E_0}{\frac{k_{-1}}{k_1} + S} \quad (3.24)$$

odnosno druge i četvrte pretpostavke:

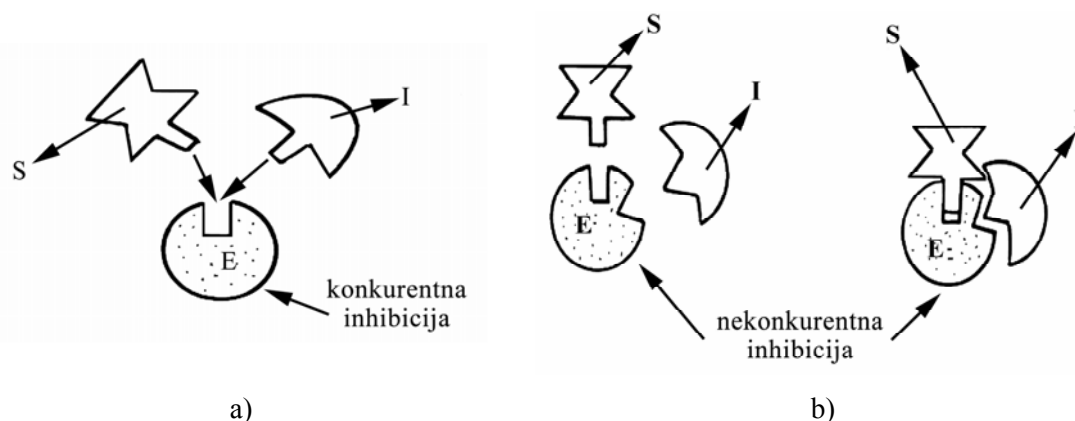
$$v = \frac{k_2 \cdot S \cdot E_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + S} \quad (3.25)$$

Jednačine (3.24) i (3.25), poznate kao *Michaelis-Menten*-ova i *Briggs-Haldane*-ova, dobro se slažu sa eksperimentalnim podacima, što znači da se enzimski katalizovane reakcije verovatno odvijaju po pretpostavljenom mehanizmu. Jednačina (3.24) se danas najčešće koristi za praktična izračunavanja.

3.1.2. Kinetika enzimskih reakcija sa inhibicijom

Kada je, pored supstrata, u reakcionom sistemu prisutna neka druga supstanca, recimo, I , onda najčešće dolazi do sporijeg odigravanja osnovne reakcije u kojoj nastaje željeni proizvod. Supstanca I se naziva „inhibitor” osnovne enzimске reakcije. Postoje različiti mehanizmi inhibicije, a oni se najčešće svode na dva osnovna, i to: *nepovratna (konkurentna)* i *povratna (nekonkurentna) inhibicija*. Inhibitor nepovratne inhibicije obrazuje stabilne komplekse sa enzimom i najčešće se ne može vratiti u aktivno stanje. Primeri za ovakve inhibitore su: teški metali, olovo, živa, kadmijum i sl., ili kompleksirajuća jedinjenja, na primer, cijanidi. Povratna inhibicija se karakteriše konstantom ravnoteže K_i , koja pokazuje afinitet inhibitora prema enzimu. Specijalan slučaj je inhibicija supstratom, koja se javlja kad je supstrat prisutan u velikoj koncentraciji.

Kod konkurentne inhibicije supstrat i inhibitor stvaraju intermedijerne komplekse ES i EI na istom aktivnom centru enzima, kako je to šematski prikazano na slici 3.3a. Nekonkurentna inhibicija se dešava kad supstrat i inhibitor ne stvaraju intermedijerne komplekse na istom aktivnom centru enzima, ali se osnovna reakcija usporava zbog steričnih i drugih smetnji (slika 3.3b).



Slika 3.3 Šematski prikaz a) konkurentne i b) nekonkurentne inhibicije

Proučavanje mehanizma inhibicije je jedan od osnovnih načina da se utvrdi delovanje lekova, ali i da se razviju novi. U novije doba je usvojen sledeći koncept razvoja novih lekova:

- izučavanje bolesti sa biohemijskog aspekta i
- sinteza hemijskih jedinjenja koja će suzbiti (inaktivirati) delovanje osnovnog enzima u biohemijskoj reakciji.

Konkurentna ili nepovratna inhibicija

Konkurentna (nepovratna) inhibicija, kad supstrat i inhibitor napadaju isti aktivni centar enzima, može se prikazati modelom:

$$v = \frac{k_2 S E_0}{K_m + S + N \cdot K_m \cdot I} = v_m \frac{S}{K_m + S + \frac{K_m I}{K_i}} \quad (3.33)$$

gde je: $N = \frac{k_i}{k_{-i}}$ i $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$.

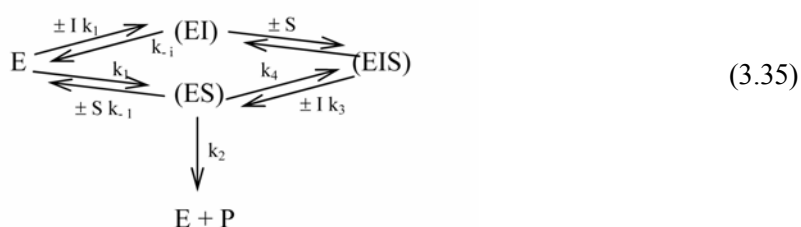
Jednačina (3.33) može da se napiše u obliku:

$$v = \frac{k_2 S E_0}{K_m (1 + NI) + S} = v_m \frac{S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S} \quad (3.34)$$

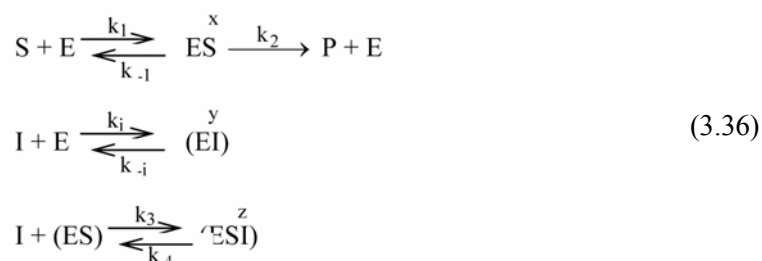
Jednačina (3.34) proizilazi iz *Michaelis-Menten*-ove jednačine bez inhibicije, jednačina (3.18), ako se K_m zameni sa $K_m (1 + N \cdot I)$.

Nekonkurentna ili povratna inhibicija

Nekonkurentna (povratna) inhibicija, kad supstrat i inhibitor ne napadaju isti aktivni centar enzima, može se prikazati sledećim mehanizmom:



Prikazani mehanizam se može opisati sledećim jednačinama:



Brzina nastajanja proizvoda je definisana jednačinom (3.30). Uzimajući u obzir pretpostavku definisanu jednačinom (3.21) za intermedijere $[ES]$, $[EI]$ i $[ESI]$ dobijaju se izrazi:

$$\frac{dx}{dt} = 0 = k_1 S E + k_4 z - (k_{-1} + k_2) x - k_3 I x$$

$$\frac{dy}{dt} = 0 = k_i IE - k_{-i} y \quad (3.37)$$

$$\frac{dz}{dt} = 0 = k_3 Ix - k_4 z$$

Ukupna koncentracija enzima (E_0) u svakom trenutku je:

$$E_0 = E + x + y + z \quad (3.38)$$

Ako pretpostavimo da važi:

$$I_0 \gg E_0 \text{ i } S_0 \gg E_0 \quad (3.39)$$

onda se, eliminisanjem E , x , y i z iz jednačina (3.37) do (3.39,) dobija izraz za brzinu enzimske reakcije sa nekonkurentnom inhibicijom:

$$v = \frac{k_2 S E_0}{K_m + S + N \cdot K_m \cdot I + L \cdot S \cdot I} = v_m \frac{S}{(K_m + S) \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad (3.40)$$

gde je: $N = \frac{k_i}{k_{-i}}$, $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ i $L = \frac{k_3}{k_4}$.

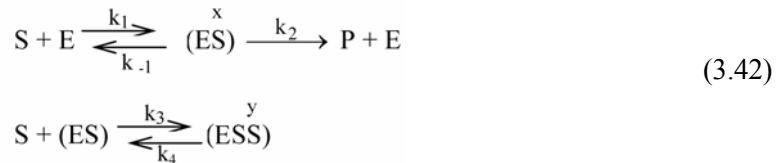
Jednačina (3.40) može da se napiše u obliku:

$$v = \frac{\frac{k_2}{1 + LI} \cdot E_0 \cdot S}{K_m \left(\frac{1 + NI}{1 + LI} \right) + S} \quad (3.41)$$

Jednačina (3.41) proizilazi iz *Michaelis-Menten*-ove jednačine bez inhibicije, jednačina (3.18), ako se K_m zameni sa $\left(\frac{1 + NI}{1 + LI} \right)$, a k_2 sa $\left(\frac{k_2}{1 + LI} \right)$.

Inhibicija supstratom

U nekim slučajevima, kad je koncentracija supstrata suviše velika, dolazi do ometanja spajanja na aktivnom centru enzima i smanjenja brzine reakcije. Jednostavni mehanizam ove inhibicije je:



Brzina nastajanja proizvoda je definisana jednačinom (3.30), pa se, uzimajući u obzir pretpostavku definisanu jednačinom (3.21) za intermedijere $[ES]$ i $[ESS]$, dobija:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= 0 = k_1SE + k_4y - (k_{-1} + k_2)x - k_3Sx \\ \frac{dy}{dt} &= 0 = k_3Sx - k_4y\end{aligned}\quad (3.43)$$

Ukupna koncentracija enzima u bilo kom trenutku je:

$$E_0 = E + x + y \quad (3.44)$$

Kombinovanjem jednačina (3.30) sa jednačinama (3.43) i (3.44), mogu se eliminisati E , x i y , tako da se dobija jednačina za brzinu reakcije u obliku:

$$v = \frac{k_2SE_0}{K_m + S + N \cdot S^2} = v_m \frac{S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_s}} \quad (3.45)$$

gde je: $N = \frac{k_3}{k_4} = \frac{1}{K_s}$. Konstanta N govori o intenzitetu inhibicije, tako da njena visoka vrednost govori da se radi o reakciji sa izraženom inhibicijom supstratom.

3.1.3. GRAFIČKI PRIKAZ KINETIČKIH MODELA ENZIMSKIH REAKCIJA

Osnovni kinetički parametri *Michaelis-Menten*-ovog modela, jednačina (3.18), jesu K_m i v_m . Sa slike 3.2 se vidi da je v_m asimptota ove jednačine, tj. kada $S \rightarrow \infty$ i $v \rightarrow v_m$, kao i da je $K_m = S$ za $v = v_m/2$. Jednačina (3.18) nije pogodna za precizno grafičko određivanje njenih kinetičkih parametara. Zbog toga se razni modifikovani oblici ove jednačine koriste za precizno određivanje K_m i v_m na osnovu eksperimentalnih podataka kinetičkih ispitivanja koji su dobijeni u diskontinualnim ili kontinualnim bioreaktorima. Pošto postoji jednostavna veza između brzine nastajanja proizvoda v i brzine nestajanja supstrata ($-v_s$) u diskontinualnom bioreaktoru u obliku:

$$v = (-v_s) = \frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} \quad (3.46)$$

onda je relativno lako pratiti tok reakcije merenjem koncentracije supstrata.

Reakcije bez inhibicije

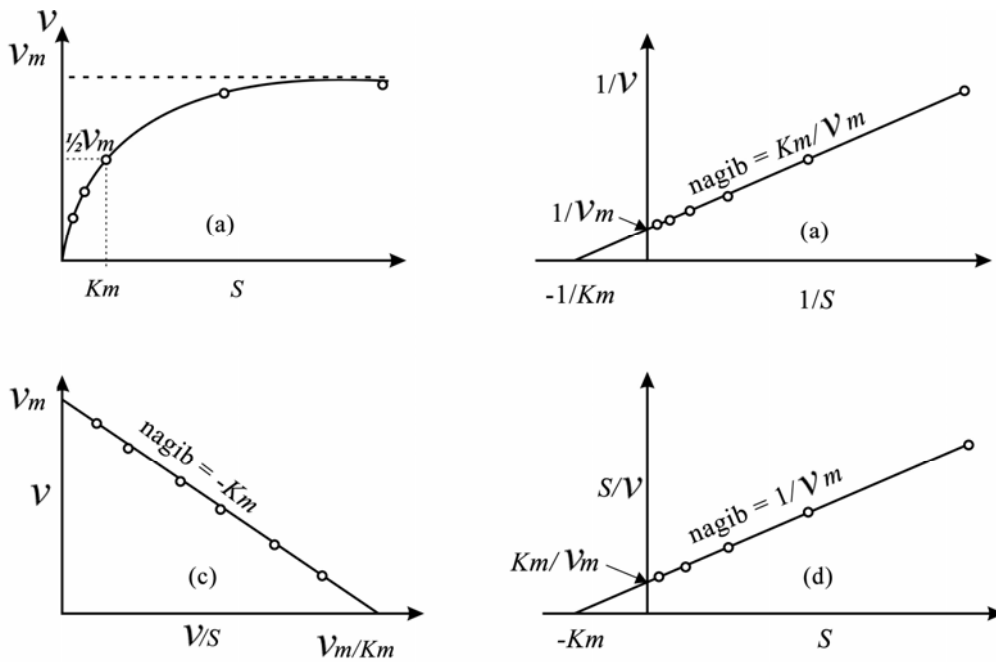
Jednačina (3.18) se lako linearizuje u jedan od sledećih oblika:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{v_m} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{v_m} \quad (3.47)$$

$$\frac{S}{v} = \left(\frac{1}{v_m} \right) S + \frac{K_m}{v_m} \quad (3.48)$$

$$v = -K_m \frac{v}{S} + v_m \quad (3.49)$$

koje su poznate kao *Lineweaver-Burk*-ova, *Hanes*-ova i *Eadie-Hofste*-ova jednačina, respektivno. U odgovarajućim koordinatama, ove jednačine su prave linije, kao što je prikazano na slici (3.4).



Slika 3.4 Grafički prikaz *Michaelis-Menten*-ove jednačine bez inhibicije

U praksi se najčešće koriste koordinate $(1/v, 1/S)$ i $(v, v/S)$. Eksperimentalni kinetički podaci se prikazuju na jedan od navedenih načina, pa se iz odsečaka na ordinati ili apscisi i nagiba pravih linija izračunavaju K_m i v_m . Kod dileme koje od koordinata koristiti, korisne su sledeće preporuke:

– Širok opseg koncentracije supstrata, od visokih do veoma niskih, u slučaju *Lineweaver-Burk*-ovih koordinata često izaziva odstupanje tačaka od prave linije, pa je tada bolje koristiti *Eadie-Hofste*-ove koordinate.

– Ako postoji veliko rasipanje podataka, onda će *Lineweaver-Burk*-ove koordinate dati manje rasipanje od *Eadie-Hofste*-ovih koordinata.

– Kada postoji inhibicija, onda *Eadie-Hofste*-ove koordinate daju oštrije razlike u mehanizmima odvijanja reakcija.

Može se zaključiti da je, izuzev u slučaju velikog rasipanja podataka, bolje koristiti *Eadie-Hofste*-ove koordinate, iako ima i suprotnih mišljenja.

Reakcije sa inhibicijom

Jednačine za brzinu reakcije sa inhibicijom, koje su, takođe, nelinearne, mogu da se linearizuju i prikažu u nekim od karakterističnih koordinata. Za ove reakcije se najčešće koriste *Lineweaver-Burk*-ove koordinate ($1/v$, $1/S$).

Linearizovani oblik jednačine za brzinu reakcije sa *konkurentnom* inhibicijom u *Lineweaver-Burk*-ovim koordinatama je:

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \frac{K_m}{v_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_m} \quad (3.50)$$

Ova prava je parametarska u odnosu na koncentraciju inhibitora. Sve ove prave imaju zajedničku tačku na ordinati, tj. kada je $1/S = 0$, onda je $v = 1/v_m$, pa se tako i prepoznaje ovaj tip inhibicije.

Nagib prave $\left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \frac{K_m}{v_m}$ raste sa porastom koncentracije inhibitora, kao i odsečak na apscisi - $\frac{1}{K_m} \frac{1}{1 + \frac{I}{K_i}}$. Korišćenjem odsečaka na ordinati $1/v_m$, nagiba prave i odsečka na apscisi moguće je jednoznačno odrediti sva tri kinetička parametra jednačine brzine reakcije sa ovim tipom inhibicije, tj. K_m , v_m i K_i .

guće je jednoznačno odrediti sva tri kinetička parametra jednačine brzine reakcije sa ovim tipom inhibicije, tj. K_m , v_m i K_i .

Kod *nekonkurentne* inhibicije, linearizovani oblik jednačine za brzinu reakcije u *Lineweaver-Burk*-ovim koordinatama je:

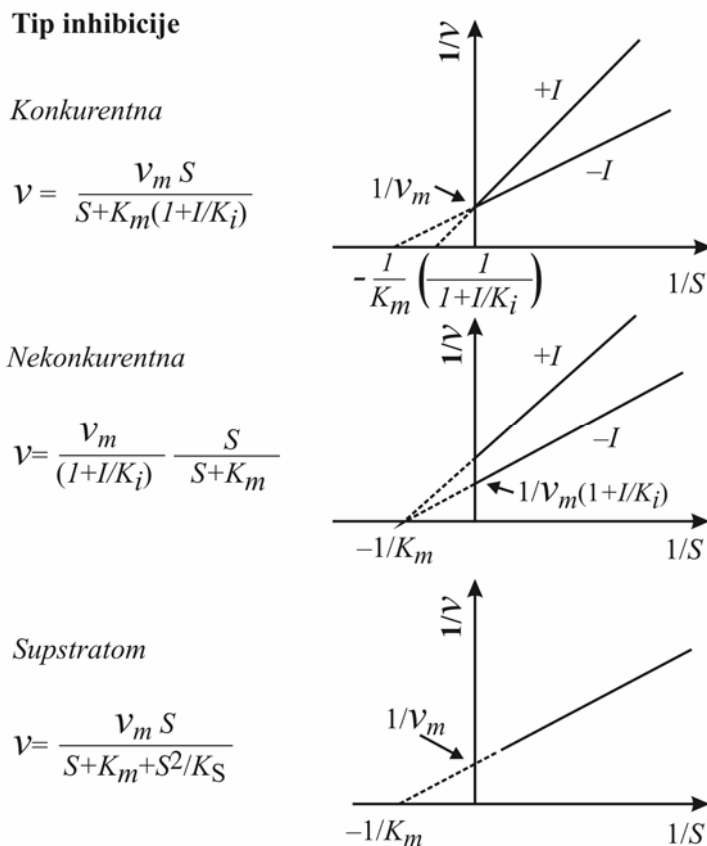
$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \left(\frac{K_m}{v_m}\right) \frac{1}{S} + \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \frac{1}{v_m} \quad (3.51)$$

Ako se u jednačinu (3.51), koja je takođe parametarska u odnosu na koncentraciju inhibitora, stavi da je $1/v = 0$, dobija se:

$$\frac{1}{S} = - \frac{1}{K_m} \quad (3.52)$$

Sve prave jednačine (3.51) u odnosu na parametar I se seku na apscisi, pa se tako i prepoznaju reakcije sa *nekonkurentnom* inhibicijom. I u ovom slučaju se iz odsečaka na apscisi i ordinati,

odnosno nagiba prave jednoznačno određuju K_m , v_m i K_i . Na slici 3.5 su prikazana sva tri tipa inhibicije u *Lineweaver-Burk*-ovim koordinatama.



Slika 3.5 Grafički prikaz enzimskih reakcija sa inhibicijom u *Lineweaver-Burk*-ovim koordinatama

3.1.4. Integrirani oblici kinetičkih modela enzimskih reakcija

Diskontinualni i cevni bioreaktor

Polazeći od jednačine (3.46), jednačina (3.18) postaje:

$$v = (-v_s) = -\frac{dS}{dt} = v_m \frac{S}{K_m + S}$$

koja može da se reši uz granične uslove:

za $t = 0$, $S(0) = S_0$, $E(0) = E_0$ i $P(0) = 0$

za $t = t$, $S(t) = S_t$, $E(t) = E_0$ i $P(t) = P_t$ (3.54)

Razdvajanjem promenljivih i integrisanjem u postavljenim granicama, dobija se:

$$\int_0^t v_m dt = - \int_{S_0}^{S_t} \frac{K_m + S}{S} dS \quad (3.55)$$

Kada se reši jednačina (3.55), dobija se integrisani oblik *Michaelis – Menten*-ove jednačine za reakciju bez inhibicije u obliku:

$$v_m t = (S_0 - S_t) + K_m \ln \frac{S_0}{S_t} \quad (3.56)$$

ili kao izraz koji se češće koristi u reaktorskom inženjerstvu:

$$k_2 E_0 t = (S_0 - S_t) + K_m \ln \frac{S_0}{S_t} \quad (3.57)$$

Jednačine (3.56) ili (3.57) služe za izračunavanje:

dužine trajanja enzimske reakcije u diskontinualnom ili kontaktnom vremenu u cevnom bioreaktoru za zadatu krajnju koncentraciju supstrata, odnosno *stepena konverzije supstrata*, koja se definiše jednačinom:

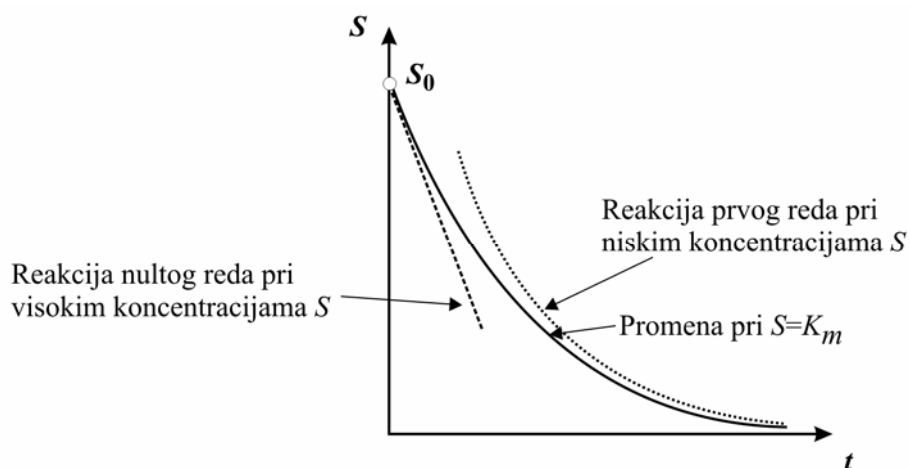
$$K = \left(\frac{S_0 - S_t}{S_0} \right) 100 = \left(1 - \frac{S_t}{S_0} \right) 100 \quad (3.58)$$

tj. stepena konverzije supstrata za zadatu dužinu trajanja enzimske reakcije bez inhibicije.

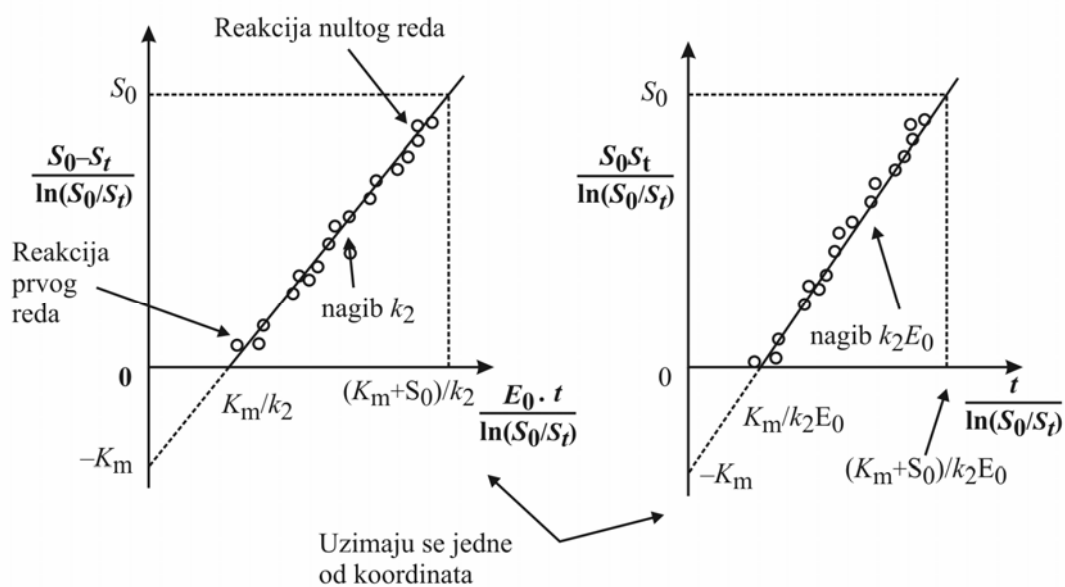
Na slici 3.6 je dat grafički prikaz promene koncentracije supstrata sa vremenom. Kao što je već rečeno, ovaj oblik jednačine nije pogodan za određivanje K_m i v_m , nego se jednačina (3.57) prevodi u oblik:

$$\frac{S_0 - S_t}{\ln \left(\frac{S_0}{S_t} \right)} = -K_m + k_2 \cdot E_0 \frac{t}{\ln \left(\frac{S_0}{S_t} \right)} \quad (3.59)$$

Jednačina (3.59) je prava linija sa odsečkom na ordinati $-K_m$ i nagibom k_2 ili $k_2 E_0$, a prikazana je na slici 3.7.



Slika 3.6 Promena koncentracije supstrata (S) sa vremenom

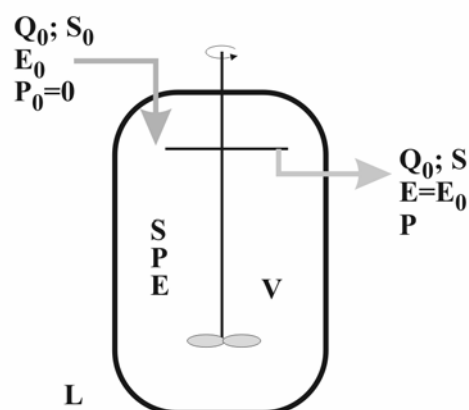


Slika 3.7 Grafički prikaz jednačine (3.59)

Protočni bioreaktor sa mešanjem

U protočnom bioreaktoru sa mešanjem odvija se reakcija bez inhibicije, koja se opisuje sa *Michaelis – Menten*-ovim kinetičkim modelom (slika 3.8).

Slika 3.8 Protočni bioreaktor sa mešanjem



Bilans mase supstrata za bioreaktor daje:

$$S_0 Q_0 - S Q_0 - (-v_s) V = 0 \quad (3.60)$$

Ako se zapreminsko (kontaktno) vreme bioreaktora definiše kao odnos zapremine i zapreminskog protoka reakcione smeše:

$$\tau = \frac{V}{Q_0} \quad (3.61)$$

onda iz bilansa mase supstrata sledi:

$$\tau = \frac{S_0 - S}{(-v_s)} = \frac{(S_0 - S)(K_m + S)}{k_2 \cdot E_0 \cdot S} \quad (3.62)$$

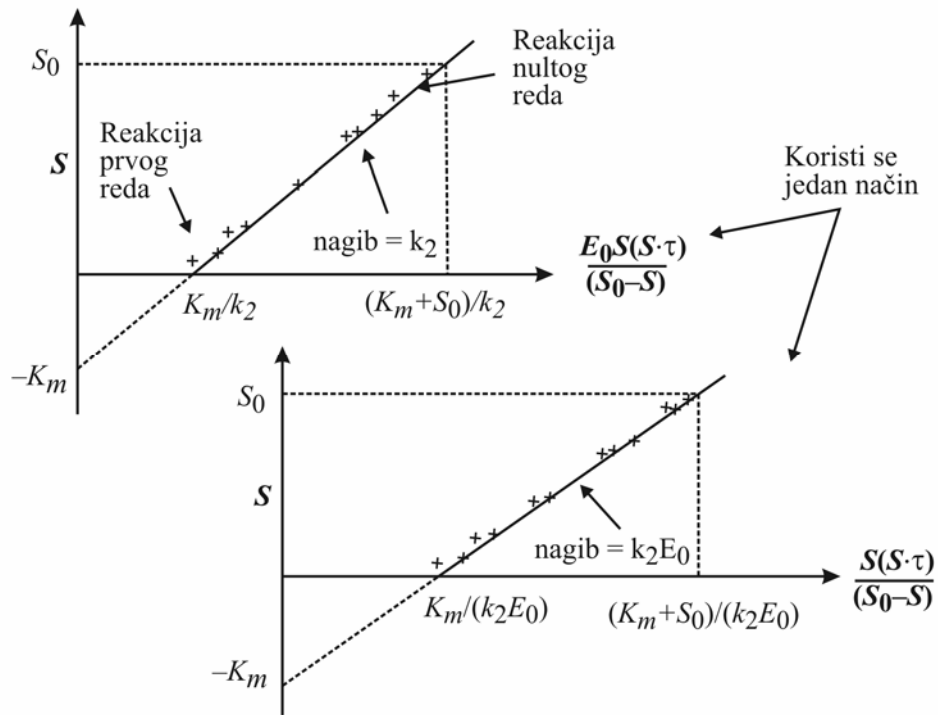
odnosno:

$$k_2 \cdot E_0 \cdot \tau = \frac{(S_0 - S)(K_m + S)}{S} \quad (3.63)$$

Pošto jednačina (3.62) nije pogodna za određivanje K_m i v_m , ona se transformiše u linearizovani oblik:

$$S = -K_m + k_2 \left(\frac{E_0 \cdot S \cdot \tau}{S_0 - S} \right) \quad (3.64)$$

Grafički prikaz jednačine (3.64) je dat na slici 3.9.



Slika 3.9 Grafički prikaz jednačine 3.64

Reakcije sa inhibicijom

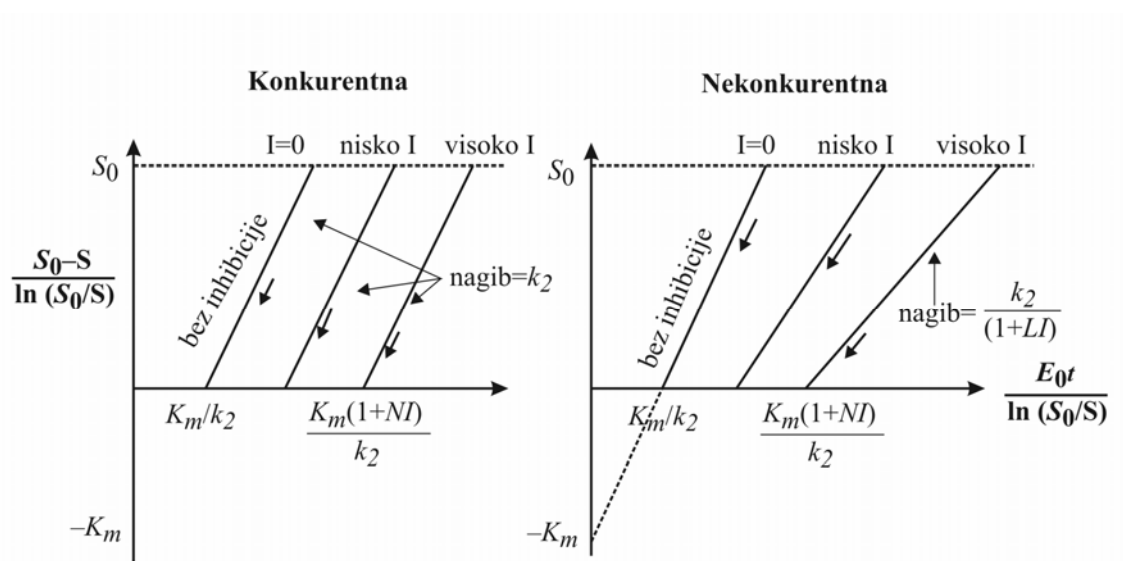
Integrirani oblik kinetičke jednačine za konkurentnu inhibiciju u diskontinualnom bioreaktoru je dat pomoću jednačine:

$$v_m \cdot t = \left(1 - \frac{K_m}{K_i}\right)(S_0 - S_t) + K_m \left(1 + \frac{A}{K_i}\right) \cdot \ln \frac{S_0}{S_t} \quad (3.65)$$

Slično kao jednačina (3.65), dobija se integrirani oblik kinetičke jednačine za nekonkurentnu inhibiciju koja se odigrava u diskontinualnom bioreaktoru:

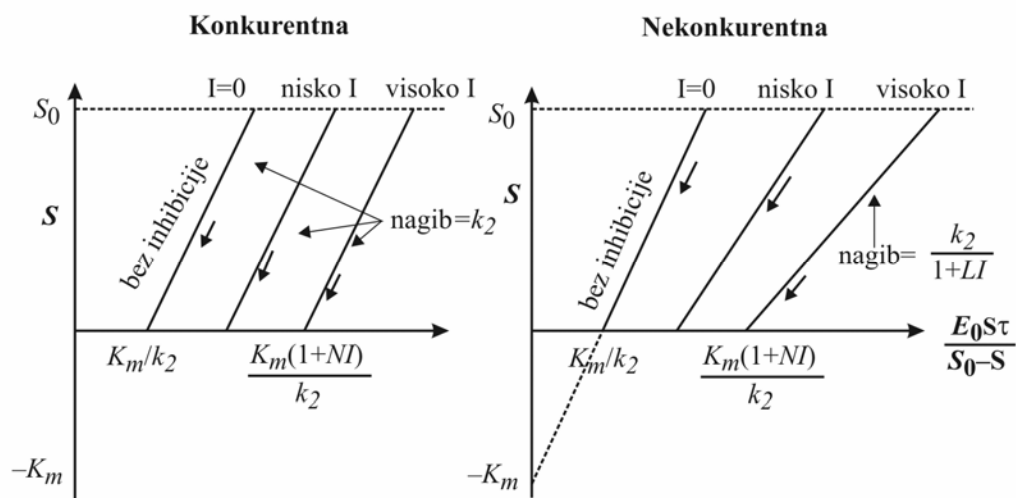
$$v_m \cdot t = \left(1 + \frac{A - K_m}{K_i}\right)(S_0 - S_t) - \frac{S_0^2 - S_t^2}{2K_i} + K_m \left(1 + \frac{A}{K_i}\right) \cdot \ln \frac{S_0}{S_t} \quad (3.66)$$

U jednačinama (3.65) i (3.66) je $A = S_0 + P_0 = S_t + P_t$. Ako se ove reakcije izvođe u cevnom bioreaktoru, jednačine (3.65) i (3.66) važe, s tim što t označava zapreminsko vreme. Preuređene jednačine (3.65) i (3.66) u pogodnim koordinatama (slično kao jednačina 3.59) su prikazane na slici 3.10., pri čemu su veličine N i L , definisane u jednačinama (3.33), odnosno (3.40).



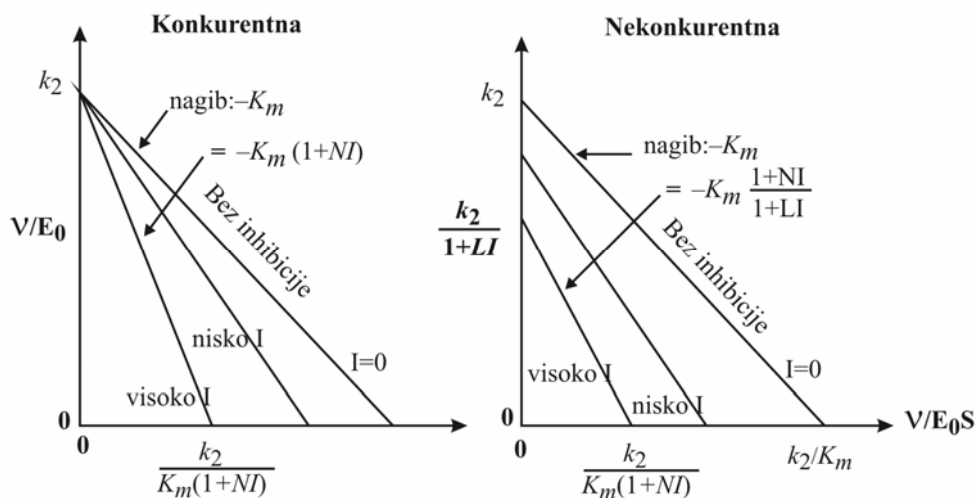
Slika 3.10 Grafički prikaz jednačina (3.65) i (3.66) za reakcije sa konkurentnom i nekonkurentnom inhibicijom

Za protočni bioreaktor sa mešanjem, kinetičke jednačine za reakcije sa konkurentnom i nekonkurentnom inhibicijom prikazane na slici 3.11.



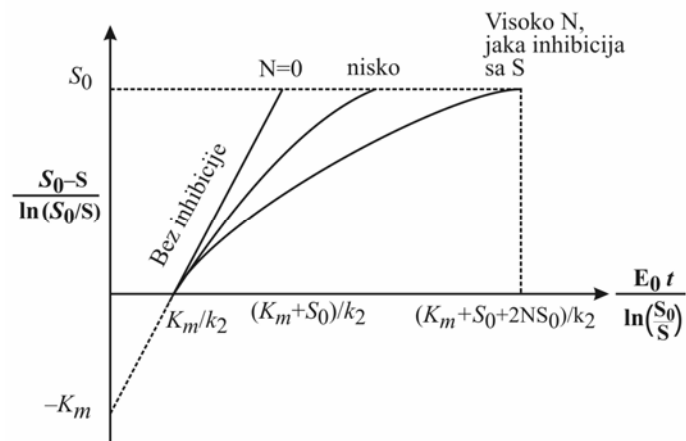
Slika 3.11 Kinetičke jednačine za reakcije sa konkurentnom i nekonkurentnom inhibicijom u ptoročnom bioreaktoru sa mešanjem

Kinetičke jednačine za reakcije sa konkurentnom i nekonkurentnom inhibicijom mogu da se prikažu u *Eadie-Hofste*-ovim koordinatama, kako je to prikazano na slici 3.12.



Slika 3.12 Kinetičke jednačine za reakcije sa konkurentnom i nekonkurentnom inhibicijom u ptočnoj bioreaktoru sa mešanjem prikazane *Eadie-Hofste*-ovim koordinatama

Integrirani oblik kinetičke jednačine za reakcije inhibirane supstratom u diskontinualnom bioreaktoru, jednačina (3.45), prikazan je na slici 3.13.



Slika 3.13 Grafički prikaz integriranog oblika kinetičke jednačine za reakcije inhibirane supstratom u diskontinualnom bioreaktoru

3.2. KINETIKA MIKROBIOLOŠKIH PROCESA

U bioprocima, gde su biokatalizatori žive ćelije mikroorganizama, odigravaju se istovremeno i međusobno povezano rast, razmnožavanje, trošenje supstrata i sinteza primarnih i sekundarnih metabolita. Kinetika ovih procesa proučava brzine rasta ćelija mikroorganizama, trošenja limitirajućeg supstrata iz hranljive podloge i sinteze metabolita, kao i uticaj faktora okoline na njih. Jasno je da se mikrobiološki procesi sastoje, u principu, od dva međusobno veoma zavisna sistema, i to:

- žive ćelije mikroorganizama i
- okolne sredine, gde se odvijaju svi navedeni procesi.

Komponente hranljive podloge (nutrienti, supstrati) se prenose iz okolne sredine u ćeliju, a različiti proizvodi metabolizma i višak energije iz ćelije u okolinu. Ako se želi da se u potpunosti opišu sve pojave koje se dešavaju između ćelija, okoline i bioreaktora, onda bi matematički model bio veoma komplikovan i praktično nerešiv. U praksi se koriste dosta pojednostavljeni modeli, koji približno realno opisuju mikrobiološke procese. Obično se koriste modeli sa idealizovanom interakcijom između biokatalizatora, faktora okoline i bioreaktora.

Mikrobiološki proces počinje inokulacijom hranljive podloge koja se nalazi u bioreaktoru. Nakon adaptacije inicijalne količine čiste kulture mikroorganizama (inokulum), dolazi do rasta i razmnožavanja ćelija i konverzije supstrata iz hranljive podloge u:

- biomasu, zbog čega se količina mikroorganizama povećava i
- željeni proizvod, tj. primarni ili sekundarni metabolit.

U oba slučaja, brzina nastajanja biomase i proizvoda je funkcija koncentracije i biohemijske aktivnosti ćelija mikroorganizama.

Za uspešno izvođenje mikrobioloških procesa potrebno je poznavanje brzine rasta mikroorganizama u datim uslovima. Drugim rečima, potrebno je da se zna kako se odabrani mikroorganizam uzgaja od laboratorijskih do industrijskih uslova, kao i da se dobiju ćelije odgovarajućeg fiziološkog stanja za odvijanje željenog procesa. Merenjem koncentracije ključnog (limitirajućeg) supstrata i biomase mikroorganizma dolazi se do osnovnih kinetičkih podataka o ispitivanom bioprocima. Ako se tokom aktivnosti ćelija luči neki metabolit, koji predstavlja željeni proizvod, onda se u kinetička razmatranja uključuje brzina nastajanja proizvoda. Najbrži rast se odvija u eksponencijalnoj fazi rasta u kojoj se broj ćelija udvostručava stalnom brzinom, dok postoji dovoljna količina limitirajućeg supstrata (izvora ugljenika), a koncentracije otrovnih proizvoda metabolizma ne narastu do vrednosti koje usporavaju ili onemogućavaju rast.

3.2.1. Kinetika rasta mikroorganizama u diskontinualnim bioreaktorima

Mikroorganizmi rastu i razmnožavaju se u veoma širokom spektru fizioloških stanja ćelije i faktora okoline. Tako, na primer, ako se u hranljivu podlogu doda mala količina živih ćelija

mikroorganizma, onda u odgovarajućim uslovima okoline ćelije počinju da rastu, tj. povećavaju se svi sastojci žive ćelije. Direktna posledica rasta ćelije je njihovo razmnožavanje.

Ako se zanemare druge aktivnosti ćelija, onda se kinetika rasta i razmnožavanja ćelija može definisati preko veličina kao što su:

- specifična brzina rasta,
- generaciono vreme i
- vreme udvostručenja mase mikroorganizama.

Rast mikroorganizama se obično definiše vremenom potrebnim da se udvostruči masa mikroorganizama (t_d) ili broj ćelija (t_g), koja se mogu međusobno razlikovati, jer se često dešava da se masa ćelija povećava pri istom broju ćelija. Ako se u nekom mikrobiološkom procesu vreme udvostručenja mase ili broja ćelija ne menja sa vremenom, onda se proces rasta odvija u eksponencijalnoj fazi. Pri takvim uslovima se brzina odvijanja rasta, tj. promena koncentracije biomase X opisuje jednačinom:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (3.67)$$

ili preko broja ćelija N :

$$\frac{dN}{dt} = \mu_N \cdot N \quad (3.68)$$

Specifične brzine rasta mikroorganizama, μ i μ_N , definišu se pomoću izraza:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{d \ln X}{dt} \quad (3.69)$$

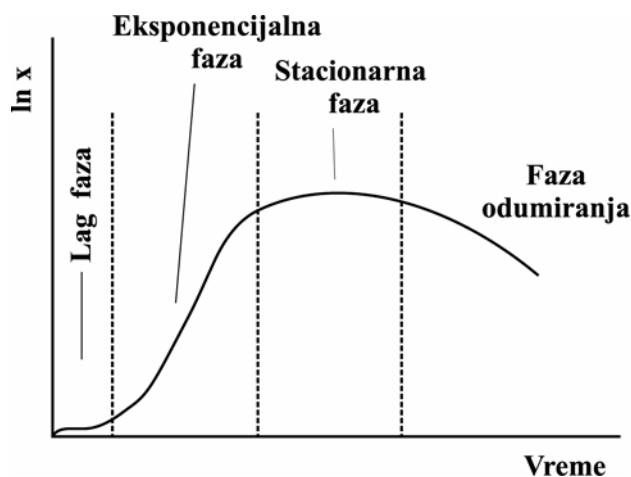
$$\mu_N = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} = \frac{d \ln N}{dt} \quad (3.70)$$

Pri rastu mikroorganizma u diskontinualnom bioreaktoru obično su prisutni neki inhibitori u koncentraciji I , tako da se brzina rasta mikroorganizama piše u opštem obliku:

$$\frac{dX}{dt} = f(X, S, I) \quad (3.71)$$

Ovako definisana jednačina za rast mikroorganizama je obično nelinearnog karaktera, pa se pri njenom rešavanju javljaju slični problemi kao kod enzimskih reakcija. Kad se prati promena koncentracije mikroorganizama ili broja ćelija sa vremenom u diskontinualnom bioreaktoru, onda se dobija kriva rasta, čiji je tipičan izgled prikazan na slici 3.14. Analizom krive rasta, zapažaju se četiri faze, i to:

- lag ili faza adaptacije,
- eksponencijalna faza,
- stacionarna faza i
- faza odumiranja.



Slika 3.14 Diskontinualni rast mikroorganizama

Lag faza je logična posledica šoka koji ćelije *inokuluma* dožive kad se zaseju na svežu hranljivu podlogu, tako da je potrebno da prođe određeno vreme za njihovu adaptaciju. Mikroskopski posmatrano, broj i masa ćelija se ne menjaju, ali se zato ćelija veoma intenzivno priprema za deobu.

Početkom deobe ćelija, nastaje *eksponencijalna faza*, tj. povećanje koncentracije biomase se odigrava eksponencijalno sa vremenom. Brzina rasta mikroorganizama (r_x) u ovoj fazi je najveća i definiše se pomoću jednačine:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (3.72)$$

Jednačina (3.72) može da se integriše uz uslove:

$$\text{za } t = 0, X = X_0, \text{ a za } t = t, X = X_t \quad (3.73)$$

Ako se pretpostavi da je $\mu = \mu_m = \text{const.}$, što važi samo u eksponencijalnoj fazi rasta, kada je specifična brzina rasta maksimalna, onda je:

$$\int_{X_0}^{X_t} \frac{dX}{X} = \mu_m \int_0^t dt \quad (3.74)$$

odnosno

$$\ln \frac{X_t}{X_0} = \mu_m \cdot t \quad (3.75)$$

Jednačina (3.75) je prava linija u koordinatama ($\ln X, t$), pa se iz nagiba ove prave određuje vrednost za μ_m .

Pošto je za $t = t_g$, $X_t = 2X_0$, onda iz jednačine (3.75) sledi veza između μ_m i t_g :

$$t_g = \frac{\ln \frac{2X_0}{X_0}}{\mu_m} = \frac{\ln 2}{\mu_m} \quad (3.76)$$

Pošto se rastom mikroorganizama iscrpljuje limitirajući supstrat, a nagomilavaju metaboliti (inhibitori), dolazi do smanjenja brzine rasta i početka odumiranja mikroorganizama. Brzina odumiranja mikroorganizama se definiše pomoću jednačine:

$$r_d = \frac{dX}{dt} = -\mu_d \cdot X \quad (3.77)$$

odakle je specifična brzina odumiranja:

$$\mu_d = - \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.78)$$

Pošto se istovremeno sa rastom odigrava i odumiranje ćelija, brzina rasta mikroorganizama zavisi od oba procesa, tj.:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \mu_d \cdot X \quad (3.79)$$

ili

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu - \mu_d \quad (3.79)$$

Kada se specifična brzina rasta i specifična brzina odumiranja izjednače ($\mu = \mu_d$), nastaje *stacionarna* faza rasta mikroorganizama.

Poslednja faza rasta, koja se naziva *deklinaciona faza* ili *faza odumiranja*, nastaje kada je specifična brzina rasta manja od specifične brzine odumiranja mikroorganizma ($\mu < \mu_d$).

Razmnožavanje mikroorganizama

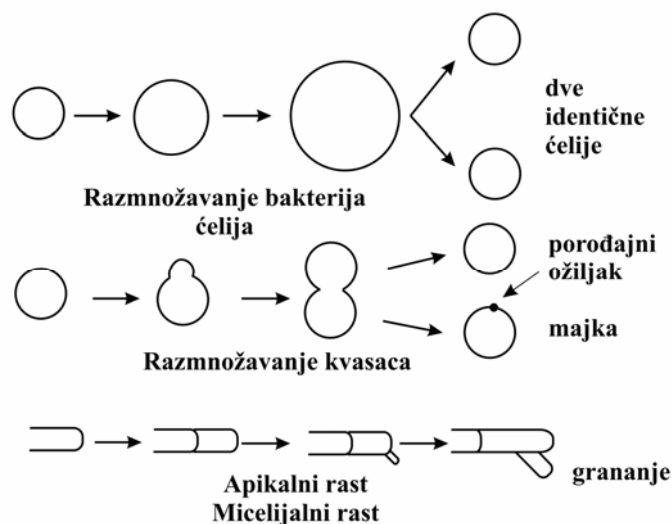
Kad se dostigne određena fiziološki karakteristična masa ćelija (fiziološka zrelost), dolazi do razmnožavanja, tj. povećanja broja ćelija mikroorganizma. Postoje četiri osnovna tipa povećanja broja ćelija tokom rasta mikroorganizama, i to:

- prostom deobom (tipični predstavnici: *bakterije*),
- pupljenjem (tipični predstavnici: *kvasci*),
- izduživanjem i grananjem (tipični predstavnici: *plesni* i *aktinomicete*) i
- parazitsko razmnožavanje u živoj ćeliji druge vrste (tipični predstavnici: *virusi*).

Šema razmnožavanja bakterija, kvasaca i plesni je prikazana na slici 3.15.

Razmnožavanje bakterija se može opisati pomoću jednačine prvog reda. Rast počinje povećanjem mase ćelija, a kada se udvostruče svi njeni sastavni elementi, dolazi do cepanja, tj. deobe u

dve potpuno identične ćelije. Ovako dobijene ćelije se kasnije nezavisno dele, pa je nemoguće odrediti starost ćelija. U ovim slučajevima kad se kaže da je neka kultura mlada ili stara, onda se pod tim podrazumeva vreme provedeno na kosom agaru, tresilici ili bioreaktoru, a ne koliko su pojedine ćelije stare. Generaciono vreme za bakterije u optimalnim uslovima iznosi 20 do 60 minuta.



Slika 3.15 Šematski prikaz faza razmnožavanja bakterija, kvasaca i plesni

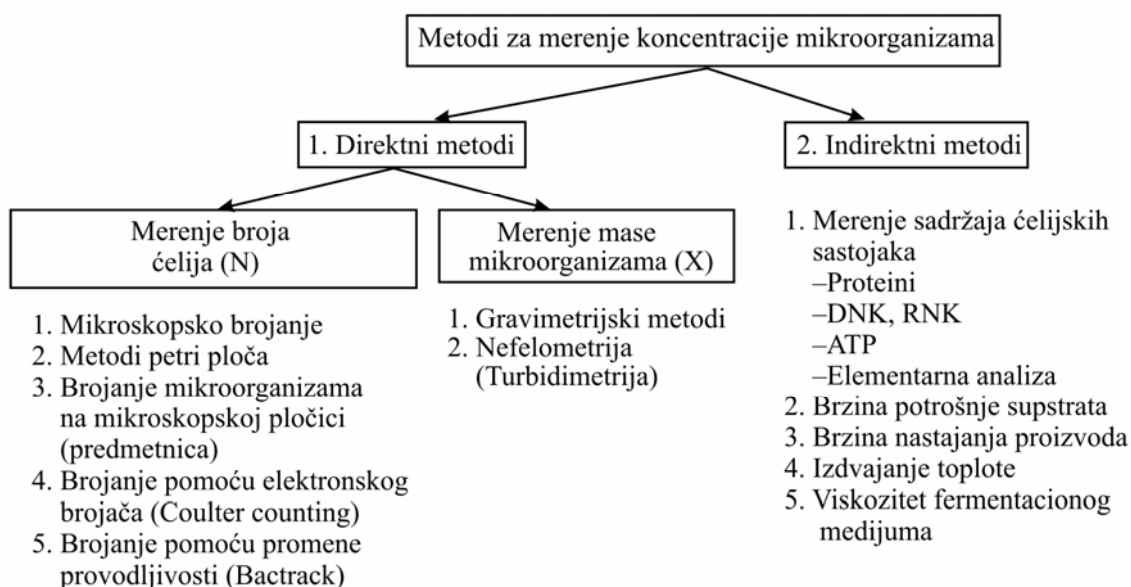
Kvasci se uglavnom razmnožavaju pupljenjem, iako mogu i putem spora ili hifa (pseudomicelijuma). Kad ćelija dostigne određenu fiziološku zrelost, počinje na ćeliji majci da se stvara pupoljak. Kad pupoljak dostigne približno veličinu majke, odvaja se od nje, a na majci ostaje ožiljak (porodajni šav). Na osnovu broja porodajnih šavova, moguće je odrediti starost ćelije. Porastom broja ćelija stalno se menja raspodela starosti ćelija. Kod nekih vrsta kvasaca pupoljak se ne odvaja od majke, pa dolazi do grananja i obrazovanja pseudomicelijuma. Pri optimalnim uslovima generaciono vreme za kvasce iznosi 90 do 120 minuta.

Rast plesni se karakteriše izduživanjem i grananjem. Rast počinje od vrha hife njenim izduživanjem i obrazovanjem pregrada. Novoformirana ćelija se ne odvaja od hife, tj. grane. Izduživanje može da bude i bočno, pa tako dolazi do isprepletanja hifa i obrazovanja micelijuma. Rast se registruje povećanjem mase micelijuma, a ovaj tip rasta se naziva *micelijumski rast*. U submerznim uslovima, u zavisnosti od faktora okoline, micelijum može da bude rasplinut ili *filamentozan* ili kompaktan u vidu sfernih pahuljica, tj. *peleta*, ili smeša ova dva tipa. Pelete su prečnika 0,1–10 mm. Pošto je nemoguće pratiti rast preko povećanja broja ćelija, najčešće se kod plesni kao pokazatelj rasta uzima povećanje mase micelijuma. Raspodela starosti ćelija i morfologija plesni su veoma važni parametri za definisanje kinetike razmnožavanja. Tako, na primer, pri proizvodnji antibiotika, nekada metabolite obrazuju mlade, a nekada stare ćelije, pa te faktore treba uključiti u kinetičke modele bioprocasa. Pri optimalnim uslovima, tipično generaciono vreme za plesni iznosi 4 do 8 h. Rast *aktinomiceta* može se opisati slično kao kod plesni, pošto rastu u obliku micelijuma.

Virusi i fagovi nemaju normalan put rasta. Oni zahvataju ćeliju domaćina, a to mogu da budu bakterije, kvasci, plesni ili ćelije biljaka ili životinja. Oni imaju veoma jednostavnu građu, tj. sadrže samo genetski materijal (DNK ili RNK) u proteinskom omotaču. Za razmnožavanje oni moraju da uđu u ćeliju domaćina i da koriste hemijska jedinjenja ćelije domaćina za obrazovanje sopstvenih gradivnih elemenata. Pre nego što ćelija domaćina uginge, tj. raspukne se, virusi su sposobni da se reprodukuju u 50 do 300 novih virusa. Rast virusa se, takođe, pokorava eksponencijalnom zakonu, ali je eksponent veći od dva.

3.2.2. Metodi merenja rasta

Postoje brojni metodi merenja rasta mikroorganizama, ali ne postoji univerzalni metod, koji je opšte primenljiv. Koji će metod biti odabran zavisi od bioprocesa i raspoložive tehnike. U osnovi, svi metodi mogu se podeliti na direktne i indirektne. Pošto se rast manifestuje kroz povećanje mase ili broja ćelija, direktni metodi se dele u dve podgrupe. Praktično se merenje rasta svodi na određivanje koncentracije mase ili broja ćelija mikroorganizma u fermentacionom medijumu. Na slici 3.16 su navedeni metodi merenja koncentracije mase i broja mikrobnih ćelija.



Slika 3.16 Metodi za merenje biomase mikroorganizama

Direktni metodi

Metod brojanja ćelija pomoću mikroskopa zasniva se na upotrebi specijalnih mikroskopskih pločica, na primer, *hemocitometra* (Petroff-Housser-ova pločica), koje imaju udubljenje poznate zapremine. U to udubljenje se stavi tečnost koja sadrži mikroorganizme, a preko nje pokrovnica. Pločica je izdijeljena pomoću mreže na velike i male kvadrate, pa se pomoću mikroskopa broje

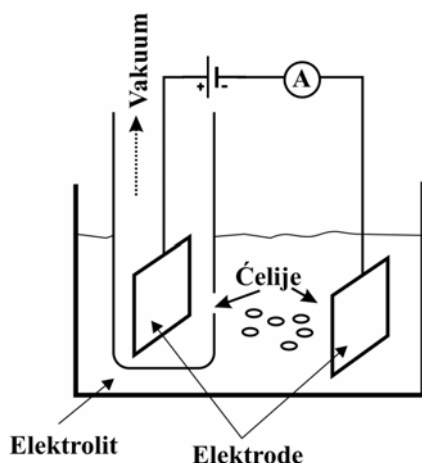
ćelije u kvadratićima. Minimalno se broji oko dvadeset kvadratića, a za rezultat se uzima prosečna vrednost. Nekada je moguće razlikovati žive od mrtvih ćelija upotrebom odgovarajućih reagensa, kao, na primer, metilensko plavo za kvasce. Pri brojanju bakterija javlja se problem zbog veličine ćelija, a kod kvasaca i plesni zbog stvaranja višećelijskih nizova.

Brojanje pomoću petri ploča je metod koji se veoma mnogo koristi u mikrobiološkim laboratorijama, i to naročito kada se određuje mikrobiološka ispravnost namirnica. Metod je veoma pogodan za bakterije i kvasce i relativno je jeftin. Princip metoda je da se u sterilne petri ploče, koje sadrže hranljivu podlogu sa agarom doda odgovarajuće pripremljen uzorak u kome se određuje broj živih ćelija mikroorganizama. Ploče se, zatim, inkubiraju na odgovarajućoj temperaturi jedan ili više dana, a nakon toga se broje izrasle kolonije. Pod pretpostavkom da se od jedne ćelije obrazuje jedna kolonija i uzimajući u obzir razređenje uzoraka, izračunava se broj ćelija u uzorku. Pri upotrebi ovog metoda javljaju se teškoće ukoliko ćelije pri rastu obrazuju lance i kolonije u obliku micelijuma, jer se ne zna da li kolonije potiču od jedne ili više ćelija. Pored toga, moraju se obezbediti povoljni uslovi za rast i razmnožavaje ćelija.

Brojanje mikrokolonija na mikroskopskoj pločici (predmetnici) je, u stvari, modifikacija metoda brojanja pomoću petri ploča. Postupak brojanja se sastoji u tome da se na pločicu nanese tanak mali prsten hranljive podloge zajedno sa agarom, i to pod sterilnim uslovima. Na taj prsten se stavi kap uzorka, a onda se pločica inkubira tri do četiri generaciona vremena. Nakon toga se, pomoću mikroskopa, broje izrasle mikrokolonije, koje nisu vidljive golim okom. Metod ima izvesnih ograničenja u odnosu na metod sa petri pločama, ali ima i prednosti jer je mnogo brži, tako da analiza gotova za 3 do 4 sata.

Brojanje pomoću elektronskog brojača (Coulter-ov brojač), koji je prikazan šematski na slici 3.17, sastoji se u tome da se razblaženi uzorak stavi u posudu u kojoj se nalazi neki elektrolit. U posudi sa elektrolitom se nalaze dve elektrode, od kojih je jedna smeštena u cilindru koji je pod vakuumom. Na tom cilindru se nalazi mali otvor, pa se deo elektrolita uvlači unutra. Elektrode su pod određenim naponom. Prolaskom mikroorganizama kroz otvor cilindra, menja se elektrolitički otpor i prouzrokuju se pulzirajuće struje. Ove pulzacije se pojačavaju i registruju na instrumentu kao mikroorganizmi, tj. čvrste čestice koje su prošle kroz mali otvor. Veličina otvora je proporcionalna veličini čestice mikroorganizma koji se broji, pa je moguće da se pomoću pulsno analizatora odredi i raspodela veličina ćelija. Pošto je moguće da se menja veličina otvora, ovaj uređaj može da se koristi za određivanje broja različitih vrsta mikroorganizama (bakterije, kvasci itd.). Tako, na primer, veličina otvora za bakterije je 30 μm , pošto je prosečni prečnik različitih bakterija 1 do 3 μm . Pošto je ovo veoma mali otvor, često dolazi do zapušavanja česticama prašine ili konglomeratima ćelija, pa se onda za efikasan rad preporučuje upotreba većih otvora.

Brojanje pomoću promene provodljivosti se izvodi pomoću uređaja koji je poznat pod imenom *Bactrack*. Uređaj se sastoji od kućišta sa različitim brojem otvora (18 do 36). Svako kućište ima elektrode i mogućnost podešavanja željene temperature. Osim kućišta, vitalni deo je kiveta u kojoj su ugrađene elektrode u kućistima po principu "muško – žensko". Kućište, tj. svaki otvor je spojen sa personalnim računom, koji je sastavni deo ovog uređaja. U računaru se nalaze podaci o provodljivosti rastvora u funkciji koncentracije i vrste mikroorganizma. Princip merenja se sastoji u tome da se kivete pune različitim podlogama, koje su specifične za određeni mikroorganizam i u njih doda određena količina ispitivanog uzorka. Tako pripremljena kiveta se stavlja u otvor kućišta, sa prethodno podešenom temperaturom.



Slika 3.17 Šema elektronskog brojača za određivanje broja ćelija mikroorganizama

Nakon toga se prati promena provodljivosti rastvora u kiveti sa vremenom. Pošto će se mikroorganizam razmnožavati u povoljnim uslovima, doći će do promene provodljivosti rastvora. Stalnim poređenjem trenutne vrednosti provodljivosti u kiveti sa kalibracionom krivom, koja se nalazi u računaru, moguće je odrediti broj mikroorganizama u uzorku. Pogodnost uređaja je što analiza traje relativno kratko i moguće je istovremeno odrediti koncentraciju različitih mikroorganizama u istom uzorku i obrnuto. Jedini nedostatak ovog uređaja je što je dosta skup, pa nije racionalno da se nalazi u laboratorijama koje obrađuju mali broj uzoraka.

Gravimetrijsk metod, tj. sušenje uzorka do konstantne mase, jedan je od najstarijih metoda za određivanje mase mikroorganizama. Po ovom postupku, uzorak se centrifugiše ili filtrira u cilju odvajanja biomase (svi čvrsti delovi) od fermentacione tečnosti.

Dobijeni talog se nekoliko puta resuspenduje u puferu (2 do 3 puta) i ponovo centrifugira, a zatim se suši 24 časa na 80 °C ili 8 časova na 121 °C. Ovaj metod je pogodan za analizu tečnih uzoraka koji ne sadrže čvrste delove. Ako su prisutni nećelijski čvrsti delovi (kalcijumkarbonat, čestice iz melase, celulozna vlakna itd.), koji se praktično ne izdvajaju pranjem, onda se mora koristiti neki drugi metod. I pored navedenih nedostataka, ovaj metod se veoma često koristi u praksi, a eventualne greške koje proizilaze iz prisustva drugih čvrstih delova ili autolize ćelija se otklanjaju primenom uvek iste, unapred propisane procedure za analizu.

Modifikacija ovog metoda je *centrifugisanje uzoraka u specijalnim graduisanim kivetama*, posle čega se očitava visina taloga i na osnovu toga iz kalibracione krive odredi sadržaj biomase u uzorku. Ovaj metod se često koristi u proizvodnji pekarskog kvasca, a osnovna prednost mu je relativno brz odgovor i mogućnost intervencije u pogonu tokom proizvodnje.

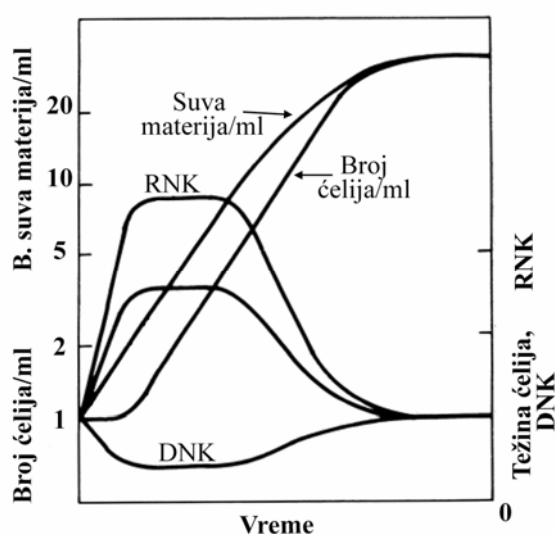
Određivanje mutnoće rastvora se zasniva na proporcionalnosti između mutnoće rastvora u kome se nalaze mikroorganizmi (bakterije i plesni) i koncentracije ćelija. Uzorak se stavi u kivetu i kroz njega propušta svetlost. Merenjem intenziteta rasute svetlosti nakon prolaska kroz kivetu, dolazi se do vrednosti koncentracije ćelija. Merenje se obavlja pomoću uređaja koji se naziva nefelometar. Pored toga što se koristi za određivanje biomase u uzorku, ovaj uređaj, uz upotrebu specijalnih kiveta za merenje, sastavni je deo bioreaktora koji rade kontinualno po principu "turbidostata".

Indirektni metodi

Priroda mikroorganizama, kao i sastav hranljive podloge, bitno utiču na izbor metoda za merenje koncentracije biomase. Postoji mnogo slučajeva gde je nemoguće da se odvoji biomasa od sastojaka hranljive podloge, na primer, pri rastu plesni, pa onda nije moguće da se primeni nijedna

od opisanih direktnih metoda. U tim slučajevima pribegava se korišćenju indirektnih metoda, koje se zasnivaju na opštoj stehiometrijskoj jednačini mikrobiološkog procesa. Pošto je većina učesnika u sintezi u stehiometrijskom odnosu, onda se merenjem neke od njih može izračunati koncentracija biomase.

Merenje sadržaja ćelijskih sastojaka. Opšte je poznato da je sastav ćelija određenih vrsta mikroorganizama uglavnom konstantan. To se, pre svega, odnosi na sadržaj proteina, RNK, DNK, ATP i sl. Ova konstatacija važi samo za “zrele” ćelije, koje se nalaze u određenom fiziološkom stanju. Kad se rast i razmnožavanje mikroorganizama odvija u diskontinualnim uslovima, neki od navedenih pokazatelja menjaju se sa vremenom, što se mora uzeti u obzir pri interpretaciji dobijenih rezultata. U toku eksponencijalne faze rasta u diskontinualnim uslovima sastav ćelija je konstantan, kao i kod kontinualnih procesa. Promene sadržaja nekih od sastojaka ćelije pri diskontinualnom rastu su prikazane na slici 3.18. U početku i na kraju bioprocasa sastav ćelija se menja. Sadržaj proteina i DNK se praktično ne menja u eksponencijalnoj fazi, dok to nije slučaj sa RNK.



Slika 3.18 Promene sastava ćelija tokom diskontinualnog rasta

DNK se ne nalazi u hranljivoj podlozi, nego samo u živim ćelijama, pa je zato reprezentativan pokazatelj porasta biomase mikroorganizama. Nedostatak primene ovog postupka je relativno komplikovano određivanje DNK u ćelijama.

Analiza sadržaja proteina u ćelijama mikroorganizama se veoma često koristi za određivanje koncentracije biomase. Postoji mnogo metoda za određivanje proteina, a u praksi se najčešće koriste biuret, Kjeldahl, ukupna aminokiselnska analiza i sl. Svaki od navedenih metoda daje različite vrednosti za sadržaj ćelijskih proteina, pošto se zasniva na različitim specifičnim reakcijama proteina sa nekim reagensom. Postoje potpuno automatizovani uređaji za određivanje sadržaja organskog azota (u direktnoj korelaciji sa sadržajem proteina u ćeliji). Jedan od najpoznatijih uređaja za određivanje organskog azota je poznat pod komercijalnim imenom KJELFOSS.

ATP se koristi za prenos energije u toku biosinteze pojedinih gradivnih elemenata žive ćelije mikroorganizma. On se nalazi jedino u živim ćelijama, a njegova koncentracija je približno konstanta po jedinici mase ćelije. Određivanje ATP se zasniva na katalizovanoj reakciji oksidacije organskog jedinjenja luciferina pomoću enzima luciferaze i uz utrošak kiseonika i ATP. Rezultat reakcije je izdvajanje fotona svetlosti koji je u stehiometrijskoj korelaciji sa ATP u odnosu (1:1). Merenjem izdvojene svetlosti određuje se sadržaj ATP u ćelijama. Za merenje emisije svetlosti mogu da se koriste fotometri ili scintilacioni brojači, koji su veoma osetljivi i mogu da odrede koncentracije do 10 do 12 g ATP/dm³. Sadržaj ATP u živim ćelijama bakterija je približno 1 mg ATP/ dm³. Pomoću ovog metoda moguće je odrediti sadržaj ATP sa visokom preciznošću. Postoje konstruisani senzori za merenje ATP, koji se ugrađuju u bioreaktore, pa je moguće meriti sadržaj živih ćelija tokom izvođenja mikrobiološkog procesa.

Elementarna analiza može, takođe, da se koristi za određivanje koncentracije biomase. Metod je veoma precizan, ali je oprema veoma skupa, pa se rede.

Brzina trošenja supstrata. Hranljiva podloga je veoma složenog sastava, a najčešće je limitirajući supstrat izvor ugljenika. Pošto su izvori ugljenika organskog porekla (ugljeni hidrati), za praćenje trošenja limitirajućeg supstrata koriste se poznati metodi za određivanje šećera. Trošenje izvora ugljenika je u korelaciji sa biomasom, pa se iz stehiometrijskog odnosa lako izračunava koncentracija biomase u fermentacionom medijumu.

Brzina nastajanja proizvoda. Često je veoma pogodno da se rast mikroorganizama prati preko sinteze proizvoda. Tako, na primer, izdvojeni CO₂ može da se koristi za određivanje biomase mikroorganizama, jer su ove dve veličine u međusobnoj vezi preko stehiometrijske jednačine. Pri korišćenju nekog metabolita za izračunavanje biomase mora se voditi računa da li postoji povezanost između ove dve veličine, jer to kod sekundarnih metabolita često nije slučaj. Koncentracija H⁺ jona može, takođe, da se koreliše sa sadržajem biomase u fermentacionoj tečnosti. Poznato je da ćelije mikroorganizama usvajaju izvore azota kao NH₄⁺ jone, pa se na svaki mol utrošenog amonijaka obrazuje jedan H⁺ jon. Ako se pH fermentacione tečnosti održava konstantnim dodavanjem odgovarajuće količine OH⁻, onda količina utrošene baze može da bude pokazatelj rasta. U ovom slučaju se mora voditi računa da se OH⁻ joni mogu trošiti i na neutralizaciju metabolita, na primer, sirćetne, mlečne, limunske i drugih kiselina.

Merenje brzine generisanja toplote. U toku odvijanja mikrobiološkog procesa generiše se toplota. Količina izdvojene toplote zavisi od vrste izvora ugljenika i proizvodnog mikroorganizma. Postoje brojni metodi za merenje toplote tokom odvijanja mikrobiološkog procesa, ali se u praksi najčešće koriste dva, i to:

- merenje potrošnje rashladnog (grejnog) medijuma i
- metod dinamičke kalorimetrije.

U prvom slučaju, toplota bioprocasa se može odrediti na osnovu toplotne ravnoteže između brzine razvijanja toplote u bioreaktoru i brzine odvođenja toplote rashladnim fluidom:

$$Q_F = Q_r \quad (3.81)$$

gde je Q_F - toplota bioprocasa, a Q_r - razmenjena toplota koju odnosi rashladni fluid:

$$Q_r = \dot{m}_w c_p (T_{iz} - T_{ul}) \quad (3.82)$$

gde je: $\dot{m}_w$ - potrošnja rashladnog fluida, c_p - specifična toplota rashladnog fluida, a T_{iz} i T_{ul} - ulazna i izlazna temperatura rashladnog fluida. Jednačina (3.81) proizilazi iz jednačine toplotnog bilansa u kojoj su zanemareni svi članovi čiji je doprinos relativno mali u odnosu na toplotu bioprocesa. Zbog toga je ovaj pristup teško primenljiv na bioreaktore čija je zapremina manja od 50 dm³, zbog značajnih toplotnih gubitaka u odnosu na razvijenu toplotu.

Merenje viskoziteta fermentacionog medijuma. Merenjem viskoziteta fermentacione tečnosti može se indirektno doći do podataka o rastu mikroorganizama tokom mikrobiološkog procesa. Tako, na primer, pri rastu plesni u submerznim uslovima dolazi do promene reoloških osobina fermentacione tečnosti od njutnovskih (na početku) do tipično nenjutnovskih karakteristika (na kraju). Ako je izvor ugljenika u hranljivoj podlozi neki polisaharid (skrob, inulin, celuloza i sl.), onda viskozitet fermentacione tečnosti opada tokom procesa. Promene viskoziteta fermentacione tečnosti su u korelaciji sa rastom proizvodnog mikroorganizma.

3.2.3. Kinetički modeli rasta mikroorganizma

Tipična kriva rasta mikroorganizama u diskontinualnim uslovima, koja je prikazana na slici 3.14, dobija se kad je brzina razmnožavanja ograničena koncentracijom jednog (limitirajućeg) supstrata u hranljivoj podlozi. Specifična brzina rasta zavisi od koncentracije limitirajućeg supstrata u hranljivoj podlozi. Limitirajući supstrat kod procesa koji se odvijaju uz pomoć živih ćelija je obično izvor ugljenika, a ostali supstrati su u višku i ne utiču na brzinu rasta. Iscrpljivanjem limitirajućeg supstrata u hranljivoj podlozi završava se eksponencijalna faza i počinje stacionarna faza ili faza odumiranja. Matematički modeli rasta mikroorganizama u diskontinualnim uslovima se uglavnom svode na određivanje funkcionalne zavisnosti koja je opisana jednačinom (3.71).

Monodov model rasta mikroorganizama

Ako se pretpostavi da se aktivnost mikroorganizama odvija jedino u pravcu rasta, tj. u povećanju koncentracije biomase, i da se u podlozi nalazi limitirajući supstrat, onda se može poći od *Michaelis-Menten*-ove jednačine, tj.:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = v_m \frac{S}{K_m + S} \quad (3.83)$$

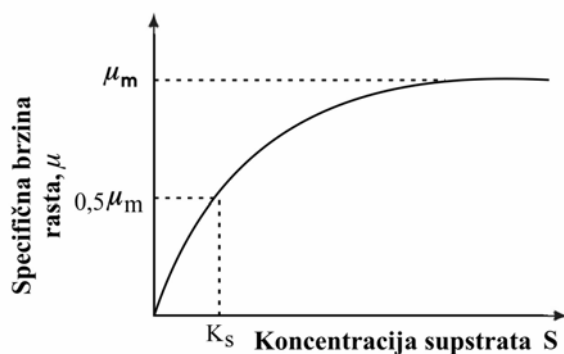
Jednačina (3.83) je nelinearna u odnosu na koncentraciju supstrata S . Uvođenjem sledećih oznaka u jednačini (3.83): $K_m = K_s$, $P = X$ i $v_m = \mu_m X$, dobija se:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S \cdot X}{K_s + S} \quad (3.84)$$

Deljenjem jednačine (3.84) sa X , dobija se:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (3.85)$$

Jednačina (3.85) je poznata kao *Monodov* model diskontinualnog rasta mikroorganizama bez inhibicije. Ona je nelinearnog karaktera, a veoma je slična Langmuir-ovoj jednačini za monomolekularnu adsorpciju na konstantnoj temperaturi.



Slika 3.19 Monodov model diskontinualnog rasta mikroorganizama

Tabela 3.2 Vrednosti konstante zasićenja za neke supstrate i mikroorganizme

Supstrat	Mikroorganizam	K_s , mg/l
Glukoza	<i>E. aerogenes</i>	1,0
	<i>E. coli</i>	2,0 – 4,0
	<i>S. cerevisiae</i>	25,0
Riboza	<i>H. polymorpha</i>	3,0
Metanol	<i>H. polymorpha</i>	120,0
Amonijak	<i>E. aerogenes</i>	0,1
Magnezijum		0,6
Sulfat		3,0

Ako se stavi da je:

$$\mu = \frac{\mu_m}{2} = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (3.86)$$

onda sledi da je $K_s = S$. Veličina K_s se naziva *konstanta zasićenja supstratom* i predstavlja meru afiniteta mikroorganizma prema limitirajućem supstratu. To je ona koncentracija supstrata pri kojoj je specifična brzina rasta jednaka polovini maksimalne brzine. Niže vrednosti za K_s govore o većem afinitetu mikroorganizma prema supstratu i obrnuto. Ona zavisi od vrste mikroorganizma i limitirajućeg supstrata i predstavlja kinetički parametar za konkretan sistem mikroorganizam/supstrat (izvor ugljenika). Funkcionalna zavisnost specifične brzine rasta od koncentracije supstrata je prikazana na slici 3.19. Tipične vrednosti za konstantu zasićenja za različite supstrate i mikroorganizme su prikazane u tabeli 3.2. Praktično je $\mu = \mu_m$, ako je $S > 10K_s$. Neke vrednosti za maksimalnu specifičnu brzinu rasta su prikazane u tabeli 3.3.

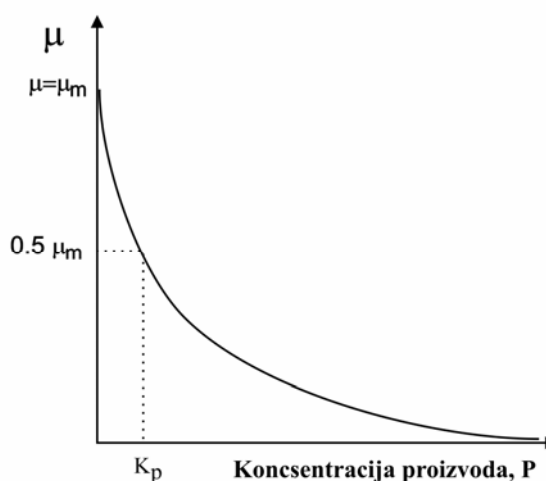
Tabela 3.3 Vrednosti za maksimalnu specifičnu brzinu rasta za neke mikroorganizme

<i>Mikroorganizam</i>	μ_m, h^{-1}
<i>Banckia natriegens</i>	4,24
<i>Methylobacterium metanolytica</i>	0,53
<i>Aspergillus nidulans</i>	0,36
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,12

Na brzinu rasta često utiče koncentracija metabolita, i to tako što je usporava, tj. inhibira (etanol, sirćetna kiselina, mlečna kiselina itd.). Prema *Jeruzalemskom*, zavisnost između specifične brzine rasta i koncentracije proizvoda ima sledeći oblik:

$$\mu = \mu_m \frac{K_p}{K_p + P} \quad (3.87)$$

gde je: P - koncentracija proizvoda koji inhibira rast mikroorganizma. Ako je $\mu = \mu_m/2$, onda je $K_p = P$. U ovom slučaju je $\mu = \mu_m$ kad je $P = 0$. Funkcionalna zavisnost specifične brzine rasta od koncentracije proizvoda je prikazana na slici 3.20.

Slika 3.20 Funkcionalna zavisnost $\mu = f(P)$ 

Ako se uzme u obzir inhibicija rasta proizvodom, onda je specifična brzina rasta definiše sledećom jednačinom:

$$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right) \quad (3.88)$$

Monodov model rasta sa inhibicijom

Kao i kod enzimskih reakcija, pri rastu mikroorganizama inhibicija može da bude:

– konkurentna ili nepovratna i

– nekonkurentna ili povratna.

Konkurentna inhibicija se može prikazati sledećim kinetičkim modelom

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S + \left(\frac{K_s}{K_i}\right) \cdot I} \quad (3.89)$$

odnosno u linearizovanom obliku:

$$\frac{1}{\mu} = \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \left(\frac{K_s}{\mu_m}\right) \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m} \quad (3.90)$$

Jednačina (3.90) je prava linija u koordinatama $(1/S, 1/\mu)$, pa se iz odsečaka na apcisi, ordinati i nagiba mogu izračunati kinetički parametri rasta mikroorganizama μ_m , K_s i K_i . Ako se u jednačinu (3.90) stavi da je $I = 0$, dobija se linearizovani oblik Monodove jednačine:

$$\frac{1}{\mu} = \left(\frac{K_s}{\mu_m}\right) \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m} \quad (3.91)$$

Nekonkurentna inhibicija se prikazuje pomoću kinetičkog modela oblika:

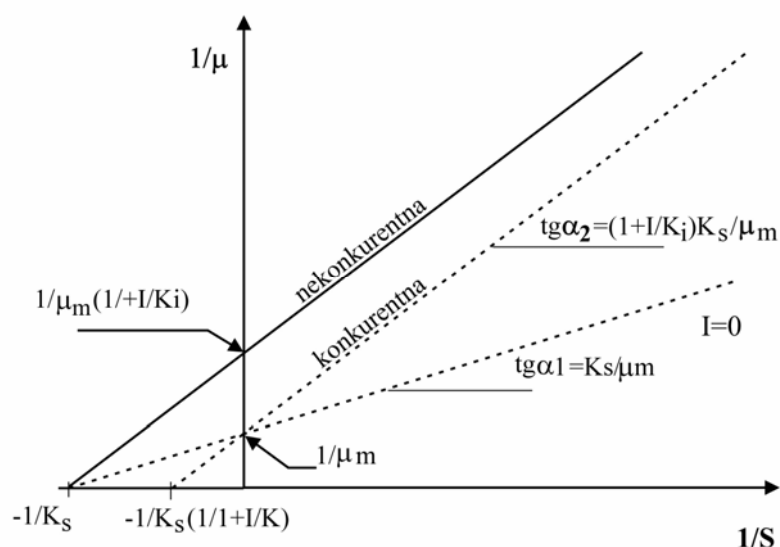
$$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S}\right) \left(\frac{K_i}{K_i + I}\right) = \mu_m \frac{S}{(K_s + S) \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad (3.92)$$

Jednačina (3.92) je ista kao i jednačina (3.88), pa se može zaključiti da se neki proizvodi metabolizma ponašaju kao nekonkurentni inhibitori. Linearizovani oblik jednačine (3.92) je:

$$\frac{1}{\mu} = \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \left(\frac{K_s}{\mu_m}\right) \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \quad (3.93)$$

Ova jednačina je, takođe, prava linija u koordinatama $(1/S, 1/\mu)$ i služi za izračunavanje μ_m , K_s i K_i . Jednačine (3.90), (3.91) i (3.93) su prikazane na slici 3.21.

Prema tome, između kinetičkih modela enzimskih reakcija, tj. *Michaelis-Menten*-ovog modela, i kinetičkih modela rasta, tj. *Monod*-ovog modela, postoji potpuna analogija.



Slika 3.21 Grafički prikaz Monod-ovog linearizovanog modela rasta

Ostali modeli rasta mikroorganizama

Iz jednačina Monod-ovog modela rasta može se izvući pogrešan zaključak da na specifičnu brzinu rasta utiču samo koncentracije supstrata i inhibitora, odnosno proizvoda. Na brzinu rasta mikroorganizama utiču još i vrsta izvora ugljenika, koncentracija rastvorenog kiseonika, temperatura, pH i sl. Očigledno da je *Monod*-ov model suviše pojednostavljen da bi mogao da uzme u obzir sve promene koje se dešavaju tokom rasta mikroorganizama u diskontinualnim uslovima. Poznato je da postoje četiri faze rasta, tako da je praktično nemoguće jednom opštom jednačinom realno opisati sve faze.

Zavisnost specifične brzine rasta od koncentracije supstrata po *Monod*-ovom modelu u realnim uslovima prikazana je na slici 3.22. Ova slika ilustruje postojanje tri oblasti, i to:

1) oblast (a) kad je $S \ll K_s$, pa se jednačina (3.85) uprošćava i postaje linearna:

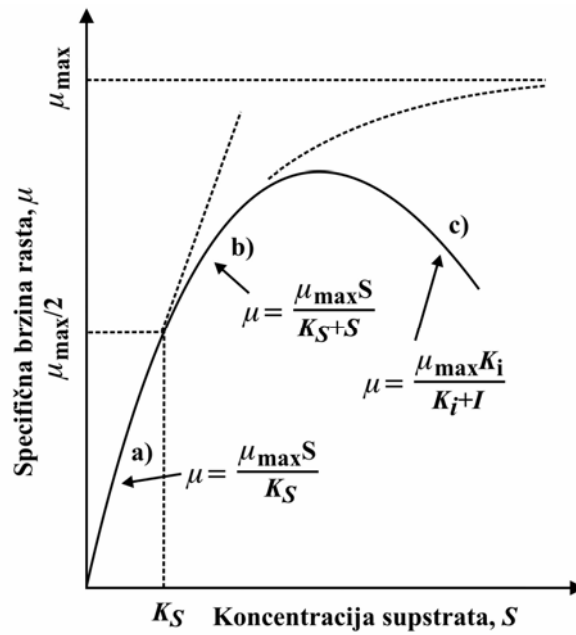
$$\mu = \frac{\mu_m}{K_s} \cdot S \quad (3.94)$$

2) oblast (b), kad je $S \approx K_s$, pa važi jednačina (3.85), i

3) oblast (c) kad je $S \gg K_s$ pa je $\mu = \mu_m$.

Ako postoji inhibiciju supstratom, tada je:

$$\mu = \mu_m \frac{K_i}{K_i + I} \quad (3.95)$$



Slika 3.22 Opšta zavisnost specifične brzine rasta od koncentracije supstrata u realnim uslovima rasta

Relativno dobra modifikacija *Monod*-ovog modela, koja obuhvata sve oblasti rasta, je model *Kono*-a i *Asai*-a u obliku:

$$\frac{dX}{dt} = \Phi \cdot \mu \cdot X \quad (3.96)$$

Koeficijent aktivnosti utroška supstrata Φ zavisi od faze rasta mikroorganizma. Tako je, na primer, za lag fazu $\Phi = 0$, za eksponencijalnu fazu $\Phi = 1$, a za druge faze $0 < \Phi < 1$.

Ako je brzina trošenja supstrata velika, onda je sigurno da je koncentracija limitirajućeg supstrata različita unutar ćelija i u okolnom medijumu. Tada u jednačini za brzinu rasta bitnu ulogu ima početna koncentracija limitirajućeg supstrata S_0 , a jednačina rasta je:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s \cdot S_0 + S} \quad (3.97)$$

Na osnovu jednačine (3.97) za “brzi rast” se može zaključiti da sa povećanjem početne koncentracije limitirajućeg supstrata dolazi do odstupanja specifične brzine rasta od striktno eksponencijalnog, tj. vrednosti koncentracije limitirajućeg supstrata S postaju progresivno veće.

U praksi se koriste i drugi kinetički modeli rasta, kao što su modeli *Tessier*-a, *Moser*-a i *Contois*-a, respektivno:

$$\mu = \mu_m \left[1 - \exp \left(-\frac{S}{K_s} \right) \right] \quad (3.98)$$

$$\mu = \mu_m \frac{S^\lambda}{K_s + S^\lambda} \quad (3.99)$$

$$\mu = \mu_m \frac{S}{S + B \cdot S} \quad (3.100)$$

gde je: λ – konstanta (najčešće manja od 1) i B – konstanta u odgovarajućim jedinicama.

Ako se koriste kinetički modeli rasta opisani jednačinama (3.98) i (3.99), mnogo je teže doći do algebarskog rešenja masenog bilansa rasta, nego pri korišćenju *Monod*-ovog modela. Koja će se jednačina koristiti za projektovanje bioreaktora često zavisi od sistema koji se proučava. Nije redak slučaj da biohemijski inženjer mora sam da definiše empirijsku jednačinu za adekvatno opisivanje eksperimentalnih podataka.

Brzina rasta može da bude inhibirana visokom koncentracijom supstrata. Za ovaj slučaj *Andrews* je pretpostavio kinetički model rasta u obliku:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (3.101)$$

Ako proizvodi metabolizma inhibiraju rast onda se primenjuje jednačina (3.88).

Sigurno je da se izvesna količina supstrata troši na “održavanje života”, tj. *endogeni metabolizam*. Ova energija se troši na aktivni transport komponenata hranljive podloge kroz membranu, obnavljanje ili zamenu oštećenih DNK i RNK, enzima ili drugih sastavnih delova ćelije. Opšti oblik jednačine specifične brzine rasta u tom slučaju je:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} - m \quad (3.102)$$

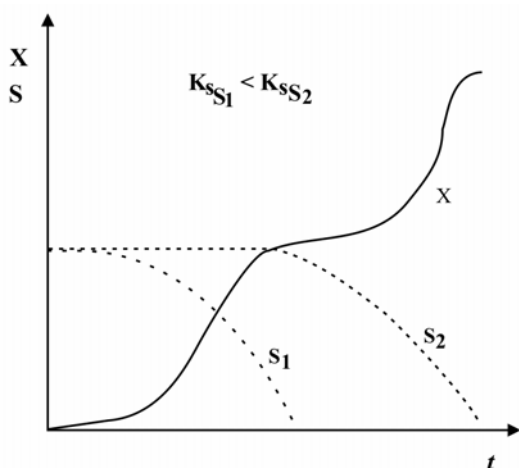
gde je: m – specifična potrošnja supstrata za održavanje života, koja se definiše pomoću jednačine:

$$m = \frac{1}{X} \left(\frac{dS}{dt} \right)_m \quad (3.103)$$

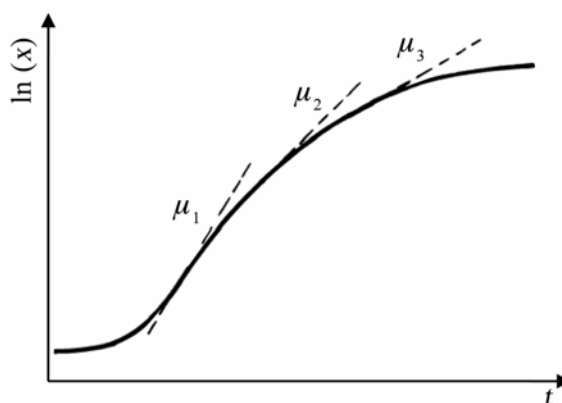
Rast u prisustvu više izvora ugljenika

U diskontinualnim uslovima, kada u podlozi ima više izvora ugljenika, obično se prvo koristi onaj sa najmanjom vrednošću konstante zasićenja, pa tek kasnije ostali po hijerarhiji povećanja vrednosti ove konstante. Kada u podlozi ima dva izvora ugljenika, onda se ovakav rast naziva *diauksični rast*. Promene koncentracije supstrata i biomase pri diauksičnom rastu prikazane su na slici 3.23.

Ako podloga sadrži veći broj različitih izvora ugljenika, onda se faze rasta odigravaju sukcesivno, pa se prelazi sa supstrata na supstrat neće zapaziti, kao kod dva supstrata. Posledica pojave je smanjenje brzine rasta tokom vremena, ako se porede brzinom rasta u prisustvu samo jednog izvora ugljenika. Kod veoma složenih podloga, koje sadrže, pored više izvora ugljenika, i druge komponente, na primer, aminokiseline, nukleotide, vitamine i druge intermedijere metabolizma, ćelije prolaze kroz mnoga prelazna stanja tokom rasta. Tako, ako ćelije rastu u podlozi koja sadrži intermedijer koje mogu same da sintetišu, do njegove sinteze neće doći dok se on ne iscrpi iz fermentacione tečnosti. Rezultat rasta mikroorganizama na kompleksnim hranljivim podlogama je prikazan na slici 3.24. Na osnovu izgleda krive rasta se može pogrešno zaključiti da nema eksponencijalnog rasta. To je samo prividno, jer postoje eksponencijalne faze koji su spojene u nizu, što je prikazano sa isprekidanim linijama.



Slika 3.23 Diskontinualni rast u prisustvu dva različita izvora ugljenika (diauksični rast)



Slika 3.24 Rast mikroorganizama na složenim podlogama

Ovakav izgled krivih rasta je rasprostranjen kod industrijskih bioprocasa u kojima se koriste podloge složenog sastava. Kod bioprocasa, gde više različitih supstrata ograničava brzinu rasta, važi sledeća jednačina:

$$\mu = \left(\frac{S_1}{K_{s1} + S_1} \right) \cdot \left(\frac{S_2}{K_{s2} + S_2} \right) \dots \quad (3.104)$$

gde je: $S_1, S_2, \dots$ – koncentracije, a $K_{s1}, K_{s2}, \dots$ – konstante zasićenja limitirajućih supstrata.

3.2.4. Uticaj okoline na brzinu rasta mikroorganizama

Uspešno izvođenje mikrobioloških procesa je uslovljeno ne samo vrstom mikroorganizma, koji poseduje odgovarajuće genetske osobine, nego i uticajem faktora okoline na brzinu rasta i

razmnožavanja. Najbitniji parametri okoline su: temperatura, pH, koncentracija limitirajućeg supstrata i komponenata hranljive podloge koje su nerastvorne ili slabo rastvorne u vodi (kiseonik, celuloza, skrob i dr.).

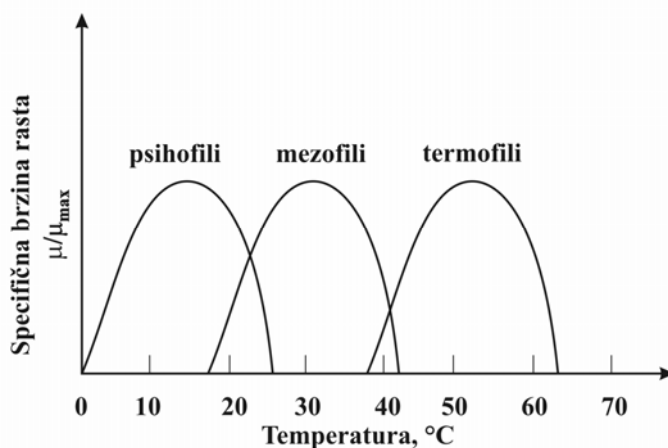
Uticaj temperature

Rast mikroorganizama i sinteza proizvoda je rezultat složenih biohemijskih reakcija koje se odigravaju u ćelijama. Opšte je poznato da temperatura bitno utiče na brzinu hemijskih reakcija, pa se, prema tome, može sigurno očekivati i njen značajan uticaj na brzinu rasta mikroorganizama. U svakom trenutku neto rast mikroorganizama predstavlja razliku između rasta i odumiranja, tj.:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \mu_d \cdot X = (\mu - \mu_d) \cdot X \quad (3.105)$$

Prema tome, izmerena brzina rasta je, u stvari, razlika brzina rasta i odumiranja. $\mu \gg \mu_d$, tako da se odumiranje ćelija zanemaruje.

Specifične brzine rasta i odumiranja ćelija zavise od temperature. Zavisnost specifične brzine rasta od temperature ima tipičan izgled prikazan na slici 3.25. Sa porastom temperature specifična brzina rasta se povećava, dostiže maksimalnu vrednost, a zatim opada. Načelno, specifična brzina rasta se povećava dva puta za svakih 10°C povišenja temperature. Takođe, u određenom temperaturnom opsegu, metabolička aktivnost ćelija se povećava sa povišenjem temperature, što je posledica povećanja aktivnosti enzima. Na povišenim temperaturama, kad toplotno najosetljiviji esencijalni proteini počnu da se denurišu, ćelije počinju da odumiru. Temperatura pri kojoj specifična brzina rasta ima maksimalnu vrednost je optimalna temperatura za rast mikroorganizma.



Slika 3.25 Uticaj temperature na specifičnu brzinu rasta

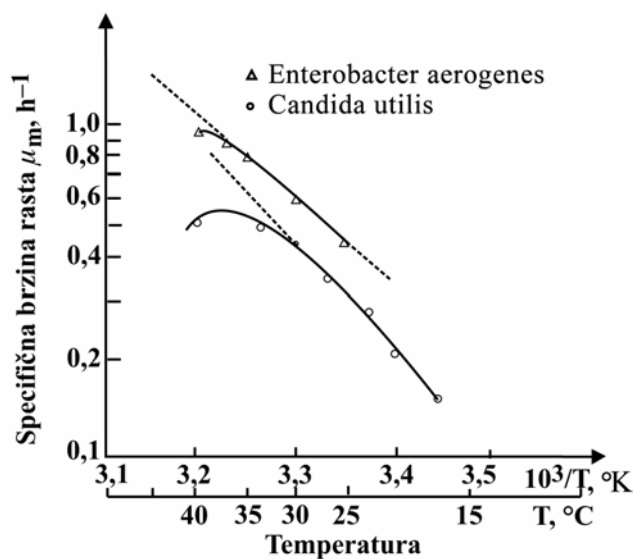
Promena specifičnih brzina rasta i odumiranja sa temperaturom može se izraziti Arenijusovom jednačinom:

$$\mu_m = A_g \cdot \exp\left(-\frac{E_{a,g}}{RT}\right) \quad (3.106)$$

$$\mu_d = A_d \cdot \exp\left(-\frac{E_{a,d}}{RT}\right) \quad (3.107)$$

gde je: A_g i A_d – predekspencijalne konstante, a $E_{a,g}$ i $E_{a,d}$ – energije aktivacije rasta i odumiranja, čije su tipične vrednosti 62,8 – 83,7 kJ/mol i 251– 293 kJ/mol, respektivno. Dakle, temperatura više utiče na brzinu odumiranja nego na brzinu rasta.

Promene maksimalne specifične brzine rasta sa temperaturom za bakteriju *Enterobacter aerogenes* i kvasac *Candida utilis* u Arenijusovim koordinatama su prikazane na slici 3.26. Nelinearni deo je posledica odumiranja mikroorganizama iznad optimalne temperature za rast.



Slika 3.26 Uticaj temperature na μ_m u Arenijusovim koordinatama

Uticaj pH

Najveći broj mikroorganizama raste u opsegu 3 – 4 pH jedinice, a optimalna vrednost pH je obično u opsegu 1 – 1,5 pH jedinica. Pošto je pH važan za odvijanje bioprocesa, potrebno ga je održavati u optimalnom opsegu. Bakterije obično rastu u opsegu pH = 4 – 8, kvasci pH = 3 – 6 i plesni pH = 3 – 7.

Uticaj u vodi nerastvornih ili slabo rastvornih komponenata

Kada mikroorganizam za svoj rast koristi komponente nerastvorne ili slabo rastvorne u vodi, onda je ograničavajući faktor za brzinu rasta brzina rastvaranja supstrata. To se obično dešava kod

aerobnih procesa, gde je brzina trošenja rastvorenog kiseonika veća od brzine apsorpcije kiseonika iz vazduha u hranljivu podlogu. Brzina rasta zavisi od koncentracije rastvorenog kiseonika, slično *Monod*-ovoj jednačini u odnosu na limitirajući supstrat. Ispod neke kritične koncentracije kiseonika u podlozi dolazi do smanjenja specifične brzine rasta. Za bakterije i kvasce je kritična koncentracija 3–10 % od maksimalne moguće, a za plesni 20–50%. Kod plesni je širi opseg, jer one u submerznim uslovima rastu u različitim morfološkim oblicima. Ako je koncentracija rastvorenog kiseonika u hranljivoj podlozi ispod neke kritične vrednosti, onda brzina rasta zavisi od brzine difuzije kiseonika.

Brzina prenosa kiseonika *OTR* je data pomoću jednačine:

$$OTR = k_l a (c^* - c) \quad (3.108)$$

gde je: $k_l a$ – zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika, a c i c^* – koncentracija rastvorenog kiseonika i koncentracija zasićenog rastvora (rastvorljivost kiseonika).

Brzina potrošnje kiseonika od strane mikroorganizama *OUR* je:

$$OUR = \frac{\mu \cdot X}{Y_{O_2}} \quad (3.109)$$

gde je: Y_{O_2} – koeficijent prinosa biomase mikroorganizama po jedinici mase utrošenog kiseonika.

U stacionarnom stanju je brzina potrošnje jednaka brzini prenosa mase kiseonika ($OUR = OTR$), pa je:

$$\frac{\mu \cdot X}{Y_{O_2}} = k_l a (c^* - c) \quad (3.110)$$

odnosno

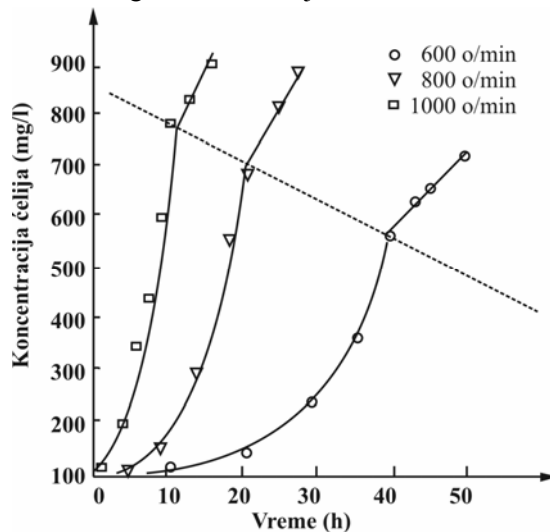
$$\frac{dx}{dt} = Y_{O_2} \cdot k_l a (c^* - c) \quad (3.111)$$

Jednačina (3.111) pokazuje da je brzina rasta mikroorganizama linearno zavisna od pogonske sile prenosa mase kiseonika ($c^* - c$).

Slična pojava se dešava kada se za rast koriste izvori ugljenika koji su nerastvorni u vodi, na primer, viši ugljenovodoni ili celuloza. Na slici 3.27 je prikazan rast kvasca *Candida lipolytica* na n-alkanima kao izvorom ugljenika. Rast ćelija kvasca je u početku eksponencijalan, jer se slobodna površina kapljica n-alkana polako zasićuje ćelijama. Kada se površina kapljica zasiti ćelijama, brzina rasta se linearno povećava i zavisi od brzine mešanja. Ovo govori da je difuzija limitirajući faktor za ukupnu brzinu rasta mikroorganizama.

Kada je celuloza izvor ugljenika, onda limitirajući faktor za rast može da bude hidroliza celuloze do rastvorljivih ugljenih hidrata. Pošto brzina hidrolize celuloze zavisi od površine, onda je i u ovom slučaju rast linearan.

Slična zavisnost se dobija ako su ćelije obmotane kapsulama ili kada plesni rastu u obliku peleta, kroz koje hranljive materije moraju da difunduju. U slučajevima kada difuzija ograničava rast ćelija, ne važi *Monod*-va jednačina, nego važe složeniji kinetički modeli.



Slika 3.27 Rast *Candida lipolytica* na n-alkanima pri različitim brzinama mešanja podloge

3.2.5. Kinetika trošenja supstrata

Razmnožavanje mikroorganizama je u direktnoj vezi sa trošenjem hranljivih sastojaka iz podloge. Tehnološki i ekonomski je najvažniji limitirajući supstrat, tj. izvor ugljenika. Izvor ugljenika se u principu troši za:

- biosintezu konstituenata ćelije,
- proizvodnju energije i održavanje fiziološke aktivnosti ćelije i
- sintezu metabolita (proizvoda).

Maseni bilans utroška supstrata je:

$$-\text{[Akumulacija supstrata]} = \text{[Utrosak za rast]} + \text{[Utrosak za održavanje]} + \text{[Utrosak za proizvod]}$$

Trošenje supstrata se može povezati sa rastom pomoću tzv. koeficijenta prinosa biomase u odnosu na supstrat $Y_{X/S}$:

$$\frac{dX}{dt} = -Y_{X/S} \frac{dS}{dt} \quad (3.112)$$

pri čemu je:

$$Y_{X/S} = \frac{\text{masa nastalih ćelija}}{\text{masa utrošenog supstrata}} = \frac{\Delta X}{(-\Delta S)} \quad (3.113)$$

Ako se posebno izrazi deo supstrata koji se troši na održavanje života, onda jednačina (3.112) ima sledeći oblik:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{(Y_{X/S})_g} \cdot \frac{dX}{dt} + m \cdot X \quad (3.114)$$

gde je $(Y_{X/S})_g$ – „pravi” koeficijent prinosa biomase u odnosu na supstrat, koji se računa na osnovu mase supstrata koja je utrošena samo za rast mikroorganizma. Pod održavanjem života ćelija podrazumevaju se energetske potrebe za preživljavanje i očuvanje određenog stanja ćelije, koje nisu direktno vezane sa sintezom biomase (na primer, aktivan transport jona kroz ćelijsku membranu, kretanje ćelije). Ovaj koeficijent je konstantan i veći od „prividnog” koeficijenta prinosa biomase u odnosu na supstrat, koji se izračunava pomoću jednačine (3.113). Jednačina (3.114) važi pod pretpostavkom da se zanemaruje utrošak supstrata na stvaranje nekog proizvoda.

Ako se rast odvija po *Monod*-ovom modelu, dobija se:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_m}{(Y_{X/S})_g} \cdot \frac{X \cdot S}{(K_S + S)} + m \cdot X \quad (3.115)$$

Ako se specifična brzina trošenja supstrata q_s definiše pomoću jednačine:

$$q_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (3.116)$$

jednačina (3.114) za maseni bilans supstrata dobija oblik:

$$-q_s = \frac{\mu}{(Y_{X/S})_g} + m \quad (3.117)$$

Ako se utrošci supstrata na održavanje i sintezu proizvoda mogu zanemariti, onda jednačina (3.115) postaje:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} = \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} \cdot \frac{X \cdot S}{(K_S + S)} \quad (3.118)$$

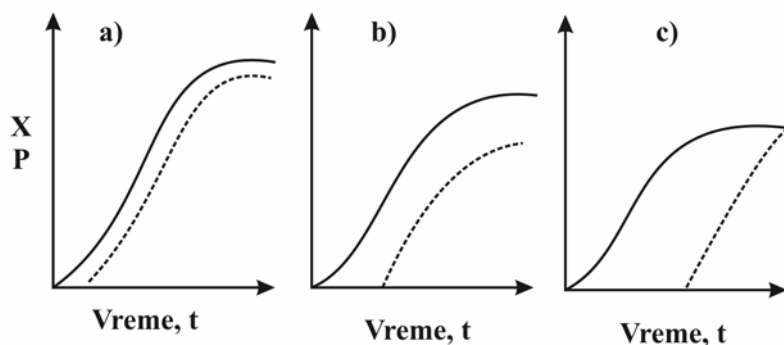
pošto je $Y_{X/S} = (Y_{X/S})_g$.

3.2.6. Kinetika nastajanja proizvoda

Na osnovu povezanosti specifične brzine rasta μ i specifične brzine utroška supstrata q_s , može se pretpostaviti da će i specifična brzina nastajanja proizvoda q_p biti u tesnoj vezi sa ove dve veličine. U zavisnosti od vrste proizvoda, tj. metabolizma ćelija, mogu se javiti sledeći slučajevi (slika 3.28):

– nastajanje proizvoda povezano sa rastom (na primer, alkoholna fermentacija),

- nastajanje proizvoda povezano sa rastom i koncentracijom biomase (na primer, mlečno-kiselinska fermentacija) i
- nastajanje proizvoda nije povezano sa rastom (na primer, biosinteza penicilina).



Slika 3.28 Kinetika rasta i nastajanja proizvoda: a) nastajanje proizvoda povezano sa rastom, b) nastajanje proizvoda povezano sa rastom i koncentracijom biomase i c) nastajanje proizvoda nije povezano sa rastom

Kada je nastajanje proizvoda direktno povezano sa rastom, kao što je kod nastajanja primarnih metabolita, onda važi sledeća jednačina:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} \quad (3.119)$$

gde je $Y_{P/X}$ - koeficijent prinosa proizvoda u odnosu na biomasu, koji je definisan kao:

$$Y_{P/X} = \frac{\text{masa stvorenog proizvoda}}{\text{masa ćelija}} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (3.120)$$

Za nastajanje primarnih metabolita značajna veličina je koeficijent prinosa proizvoda u odnosu na supstrat $Y_{P/S}$, koji se definiše kao:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{masa stvorenog proizvoda}}{\text{masa utrošenog supstrata}} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} \quad (3.121)$$

Između tri koefijenta prinosa postoji sledeća veza:

$$Y_{P/S} = Y_{X/S} \cdot Y_{P/X} \quad (3.122)$$

Jednačina (3.122) pruža mogućnost da se izračuna jedna veličina, ako se znaju druge dve.

Specifična brzina nastajanja proizvoda q_P definiše se pomoću jednačine:

$$q_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (3.123)$$

Kada je brzina nastajanja proizvoda direktno povezana sa brzinom rasta, onda važi jednačina:

$$\frac{dP}{dt} = \mu X = Y_{P/X} \cdot \mu_m \frac{SX}{(K_s + S)} \quad (3.124)$$

Ako je brzina stvaranja proizvoda vezana za rast i koncentraciju biomase, onda vazi opšta jednačina:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \cdot \frac{dX}{dt} + b \cdot X \quad (3.125)$$

odnosno:

$$q_n = Y_{P/X} \cdot \mu + b \quad (3.126)$$

Prvi član jednačine (3.126) govori o zavisnosti nastajanja proizvoda od brzine rasta, a drugi o nezavisnosti.

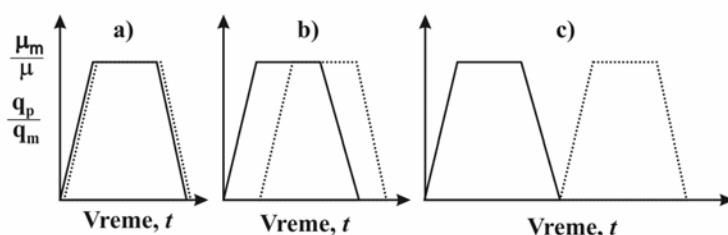
Proizvodi koji nastaju nezavisno od brzine rasta obično se nazivaju “sekundarni metaboliti”. Ova definicija nije u potpunosti primenljiva u svim slučajevima, jer nekad sekundarni metaboliti nastaju i tokom rasta ćelija (antibiotici, toksini itd.). Bitno je da se istakne da ova jedinjenja nisu potrebna za rast ćelija. Brzina nastajanja proizvoda je tada:

$$\frac{dP}{dt} = b \cdot X \quad (3.127)$$

odnosno:

$$q_p = b \quad (3.128)$$

Specifična brzina nastajanja proizvoda je zgodna veličina za poređenje različitih mikrobioloških procesa, pošto je eliminisan uticaj koncentracije biomase. Poznavanje kinetike rasta, potrošnje supstrata i nastajanja proizvoda u diskontinualnom procesu omogućava da se proces vodi tako da se ostvare maksimalni prinosi željenih proizvoda. Povezanost specifične brzine rasta i specifične brzine nastajanja proizvoda je prikazana na slici 3.29.



Slika 3.29 Povezanost specifične brzine rasta i specifične brzine nastajanja proizvoda: a) povezanost sa rastom, b) delimična povezanost sa rastom i c) nezavisnost od rasta

3.2.7. Maseni bilansi pri diskontinualnom rastu mikroorganizama

Maseni bilans potrošnje supstrata na rast, održavanje i sintezu proizvoda pri diskontinualnom rastu mikroorganizama može se predstaviti jednačinom:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{(Y_{X/S})_g} \cdot \frac{dX}{dt} + mX + \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} \quad (3.129)$$

Deljenjem prethodne jednačine sa koncentracijom biomase, x , dobija se:

$$-q_s = \frac{\mu}{(Y_{X/S})_g} + m + \frac{q_p}{Y_{P/S}} \quad (3.130)$$

Jednačina (3.130) opisuje promenu koncentracije supstrata pri diskontinualnom rastu mikroorganizama kada nastaje proizvod.

Ako se utrošak supstrata na održavanje može zanemariti, onda se jednačina (3.130) uprošćava:

$$-q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_p}{Y_{P/S}} \quad (3.131)$$

Ako je brzina rasta mnogo veća od brzine stvaranja proizvoda, tako da je $q_p = 0$, onda je:

$$-q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} = \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} \frac{S}{K_s + S} \quad (3.132)$$

odnosno:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} \frac{SX}{K_s + S} \quad (3.133)$$

Jednačina (3.133) predstavlja promenu koncentracije supstrata sa vremenom u diskontinualnom bioreaktoru. Ona se rešava zajedno sa jednačinom rasta:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{SX}{K_s + S} - \mu_d \cdot X \quad (3.134)$$

odnosno:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} - \mu_d \quad (3.135)$$

Jednačine (3.133) i (3.134) predstavljaju matematički model diskontinualnog bioreaktora uz pretpostavku da je $q_p = 0$. One mogu da se reše jedino ako se poznaju svi kinetički parametri:

μ_m , μ_d , K_s i $Y_{X/S}$.

Određivanje kinetičkih parametara rasta u diskontinualnom bioreaktoru

U lag fazi nema porasta biomase, $S \ll K_S$ i uz pretpostavku da je $\mu_m \gg \mu_d$, jednačina (3.134) postaje:

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad X = X_0 = \text{const.} \quad (3.136)$$

Kombinovanjem jednačine (3.136) sa jednačinom (3.133) dobija se:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} \frac{SX_0}{K_S + S} \quad (3.137)$$

Za početni uslov $t = 0$ i $S(0) = S_0$, integrisani oblik jednačine (3.137) je:

$$\ln \frac{S_0}{S} = \frac{\mu_m \cdot X_0}{K_S \cdot Y_{X/S}} t \quad (3.138)$$

Jednačina (3.138) je prava linija u koordinatama $(\ln S_0/S, t)$ iz čijeg nagiba se može izračunati jedan kinetički parametar rasta.

Kada je $S \ll K_S$, uz pretpostavku da je $\mu_m \gg \mu_d$, onda jednačine (3.133) i (3.134) postaju:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} \frac{SX}{K_S + S} = \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} X \quad (3.139)$$

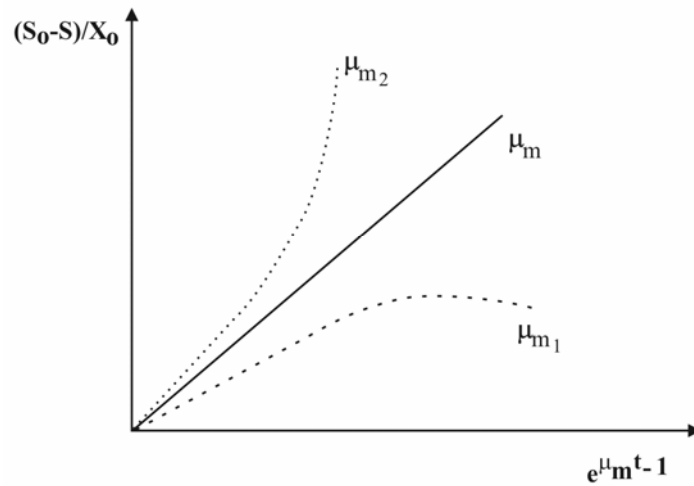
i

$$-\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{SX}{K_S + S} - \mu_d \cdot X = \mu_m \cdot X \quad (3.140)$$

Ove jednačine mogu da se reše uz početni uslov $t = 0$, $X(0) = X_0$ i $S(0) = S_0$, pri čemu se dobija:

$$\frac{S_0 - S}{X_0} = \frac{1}{Y_{X/S}} (e^{\mu_m t} - 1) \quad (3.141)$$

Jednačina (3.2.81) je prava linija u koordinatama $[(S_0 - S)/X_0, (e^{\mu_m t} - 1)]$ sa nagibom $1/Y_{X/S}$. Konstanta μ_m se može odrediti tako što se pretpostave različite vrednosti za $\mu_{m,1}$, $\mu_{m,2}$ itd., a zatim se izračunate tačke predstave na dijagramu. Rešenje je ono $\mu_{m,n}$ za koje se dobija prava linija iz čijeg nagiba se određuje $Y_{X/S}$. Opisani postupak je prikazan na slici (3.30).



Slika 3.30 Određivanje μ_m i $Y_{X/S}$ u diskontinualnom bioreaktoru

Ako je $S \approx K_S$ i $\mu_m \gg \mu_d$, onda jednačina bilansa supstrata (3.133), nakon razdvajanja promenljivih, postaje:

$$-\int_{S_0}^S \frac{K_S + S}{S} dS = \int_0^t \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} X dt \quad (3.142)$$

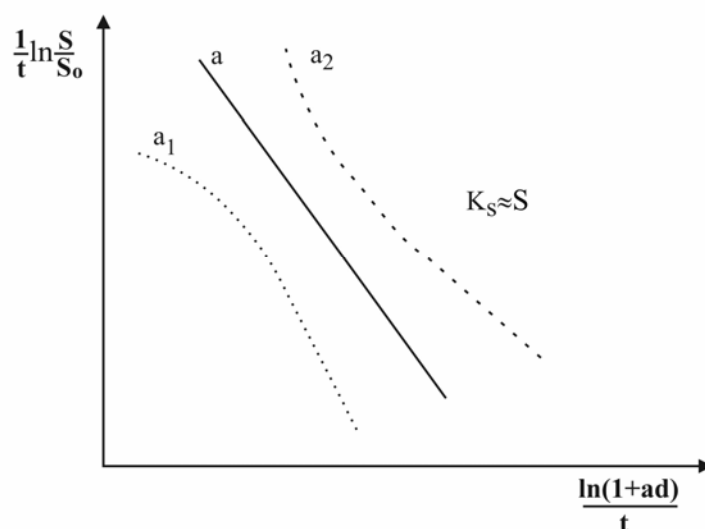
Kada se jednačina (3.134) reši po X i zameni u (3.142) dobija se rešenje u obliku:

$$\frac{1}{t} \ln \frac{S}{S_0} = c \frac{\ln(1+ad)}{t} - b \quad (3.143)$$

gde je:

$$\begin{aligned} a &= \frac{Y_{X/S}}{X_0} \\ b &= \frac{\mu_m}{Y_{X/S} \cdot K_S} (X_0 + Y_{X/S} \cdot S_0) \\ c &= 1 + \frac{X_0 + Y_{X/S} \cdot S}{Y_{X/S} \cdot K_S}, \quad d = S_0 - S \end{aligned} \quad (3.144)$$

Jednačina (3.143) je prava linija U koordinatama $\left[\frac{1}{t} \ln \frac{S}{S_0}, \frac{\ln(1+ad)}{t} \right]$ samo za jednu vrednost a . Predloženi metod se sastoji u tome da se pretpostavljaju vrednosti a_1, a_2 itd., pa kada se dobije prava linija, onda se mogu odrediti nagib c i odsečak b . Metodologija izračunavanja koja je opisana je prikazana na slici 3.31.



Slika 3.31 Grafički prikaz metoda Gates i Marlar-a za određivanje parametara rasta

Kada se znaju a , b , i c , mogu se izračunati kinetički parametri μ_m , K_s i $Y_{X/S}$ pomoću sledećih jednačina:

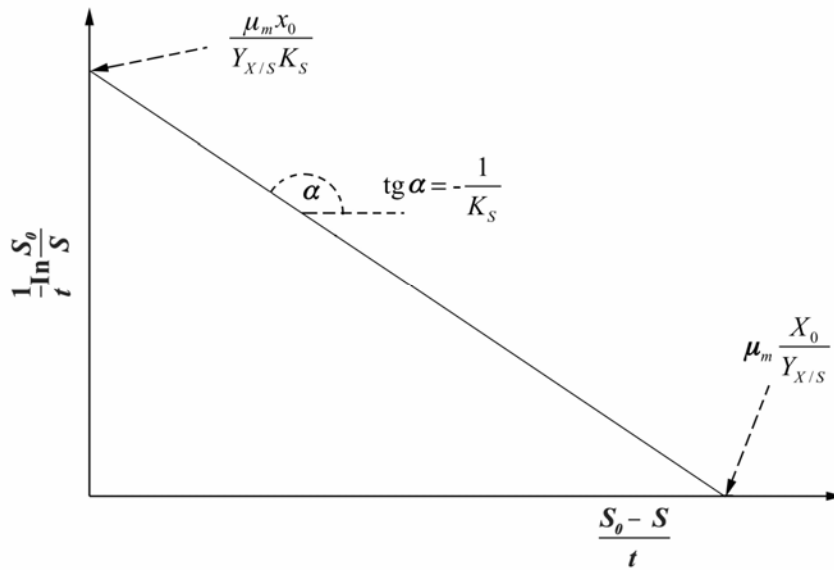
$$\begin{aligned}\mu_m &= \frac{b}{c-1} \\ K_s &= \frac{\frac{1}{c} + S_0}{c-1} \\ Y_{X/S} &= a \cdot X_0\end{aligned}\tag{3.145}$$

Jednačine (3.133) i (3.134) se, takođe, mogu rešiti na računaru pomoću nekog od metoda za rešavanje nelinearnih diferencijalnih jednačina. Ako se pretpostavi da je $X \approx X_0$, onda se jednačina (3.142) može integrisati, pri čemu se dobija Henry-eva jednačina:

$$\frac{1}{t} \ln \frac{S_0}{S} = \frac{S - S_0}{K_s t} + \frac{\mu_m X_0}{Y_{X/S} K_s}\tag{3.146}$$

Jednačina je prava linija u kordinatama $\left(\frac{1}{t} \ln \frac{S_0}{S}, \frac{S - S_0}{t}\right)$ i prikazana je na slici 3.32.

Na osnovu nagiba, odsečaka na apscisi i ordinati moguće je odrediti K_s , μ_m i $Y_{X/S}$, ako se zna početna koncentracija mikroorganizama.



Slika 3.32 Henry-eva jednačina za diskontinualni rast

Proračun diskontinualnog bioreaktora

Pri proračunu diskontinualnog bioreaktora izračunavaju se sledeće veličine:

- dužina trajanja rasta za zadatu konverziju supstrata i
- stepen konverzije supstrata za zadato vreme.

Da bi jednačine (3.133) i (3.134) masenog bilansa diskontinualnog bioreaktora mogle da se integrišu, uvode se sledeće pretpostavke:

- kinetika rasta se opisuje pomoću Monod-ovog modela;
- jedan supstrat limitira rast, dok su svi ostali supstrati u višku;
- kinetički parametri rasta ne zavise od koncentracije supstrata ili stepena konverzije;
- koeficijent prinosa biomase u odnosu na supstrat ne zavisi od starosti mikroorganizma;
- proces se odvija izotermски; i
- fizičke osobine fluida su konstantne tokom rasta.

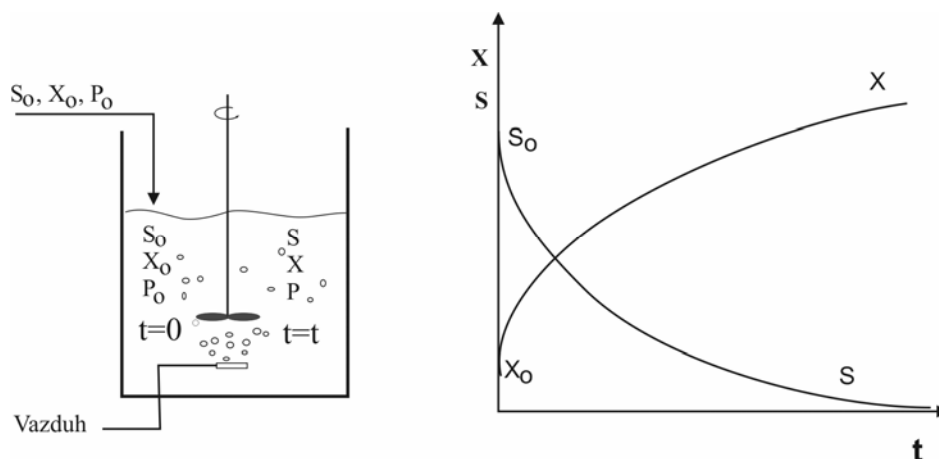
Ako se pretpostavi da je $q_p = 0$ i $\mu_d = 0$, onda je rešenje jednačina (3.133) i (3.134) u obliku:

$$\ln S = \ln \left[S_0 + Y_{X/S} (S_0 - S) \frac{S_0}{X_0} \right] + \left(\frac{X_0 + Y_{X/S} \cdot S_0}{Y_{X/S} \cdot K_s} \right) \ln \left[\frac{X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)}{X_0} \right] - \frac{\mu_m t (X_0 + Y_{X/S} S_0)}{Y_{X/S} \cdot K_s} \quad (3.147)$$

i

$$\ln X = \mu_m t + \ln X_0 - \left(\frac{Y_{X/S} \cdot K_s}{X_0 + Y_{X/S} \cdot S_0} \right) \ln \left[\left(\frac{X}{X_0} \right) \left(\frac{Y_{X/S} \cdot S_0}{Y_{X/S} \cdot S_0 + X_0 - X} \right) \right] \quad (3.148)$$

Jednačine (3.147) i (3.148) su implicitna rešenja po X i S , pa se one rešavaju numeričkim metodom za rešavanje nelinearnih algebarskih jednačina. Koncentracioni profili $\ln X$ i $\ln S$ sa vremenom prikazani su na slici 3.33.



Slika 3.33 Diskontinualni rast mikroorganizama uz pretpostavku $\mu_d = 0$

3.3. Kinetika rasta mikroorganizama u kontinualnim i polukontinualnim bioreaktorima

Kod diskontinualnih bioprocasa rast mikroorganizama i sinteza proizvoda se završavaju posle nekog konačnog vremena, a sve operacije ponavljaju se za svaku šaržu. Negde oko 1950. godine počeli su da se razvijaju procesi u kojima se, nakon završenog diskontinualnog rasta, u bioreaktor uvodi sveža hranljiva podloga i istovremeno iz njega izvodi fermentaciona tečnost. Ovakav način izvođenja bioprocasa se naziva *kontinualni rast mikroorganizama*. Pri kontinualnom izvođenju mikrobioloških procesa vreme trajanja nije ograničeno, a parametri procesa se ne menjaju, tj. rast i sinteza proizvoda se izvodi u stacionarnim uslovima. U kontinualnim procesima mogu se koncentracija biomase, specifične brzine rasta i sinteze proizvoda, faktori okoline i sl. održavati na željenim vrednostima. Kontinualni rast mikroorganizama se u prirodnim uslovima sreće u rekama, u sistemu za varenje životinja i ljudi itd. Nakon početnih istraživanja teorije kontinualnog rasta, u novije doba se ovi procesi naglo razvijaju i počinju da primenjuju u praksi, iako su i danas procentualno u industriji znatno više zastupljeni diskontinualni procesi. Razloga za to

ima više, a glavni su: 1) genetske promene kod mikroorganizama tokom dužeg izvođenja procesa, 2) tehnički problemi za održavanje sterilnih uslova tokom dužeg perioda i 3) nedostatak pravih informacija o ponašanju mikroorganizama u prelaznom, tj. nestacionarnom stanju. I pored navedenih nedostataka, kontinualni procesi se masovno koriste u proizvodnji stočnog kvasca, pekarskog inaktivnog kvasca, anaerobnoj i aerobnoj obradi otpadnih voda itd. Proizvodnost kontinualnih procesa je znatno veća nego kod polukontinualnih i diskontinualnih procesa. U tabeli 3.4. su dati neki mikroorganizmi koji mogu da rastu i stvaraju proizvode u kontinualnim uslovima.

Tabela 3.4 Neki mikroorganizmi koji mogu da rastu kontinualno

<i>Mikroorganizam</i>	<i>Proizvod</i>
<i>Streptomyces</i>	Streptomycin
<i>Acetobacter</i>	Sirćetna kiselina
<i>Clostridium</i>	Aceton i butanol
<i>Bacillus</i>	Mlečna kiselina
<i>Saccharomyces</i>	Etanol
	Pekarski kvasac
<i>Candida</i>	Stočni kvasac
<i>Penicillium</i>	Penicilin
<i>Scenedesmus</i>	SCP

Danas se kontinualni rast mikroorganizama koristi za:

Proizvodnju biomase mikroorganizama sa tačno definisanim biohemijskim i fiziološkim osobinama za proučavanje: mehanizama razmnožavanja, regulacije sinteze enzima i ćelijskih konstituenata, transporta hranljivih sastojaka iz okoline u ćeliju, parametara rasta u cilju optimizacije procesa, tehnoloških osobina mutanata itd.;

Praktičnu primenu u proizvodnji: proteinske biomase, primarnih i sekundarnih metabolita, klasičnih fermentacionih proizvoda (pivo, vino, sirćetna i mlečna kiselina, itd.); i

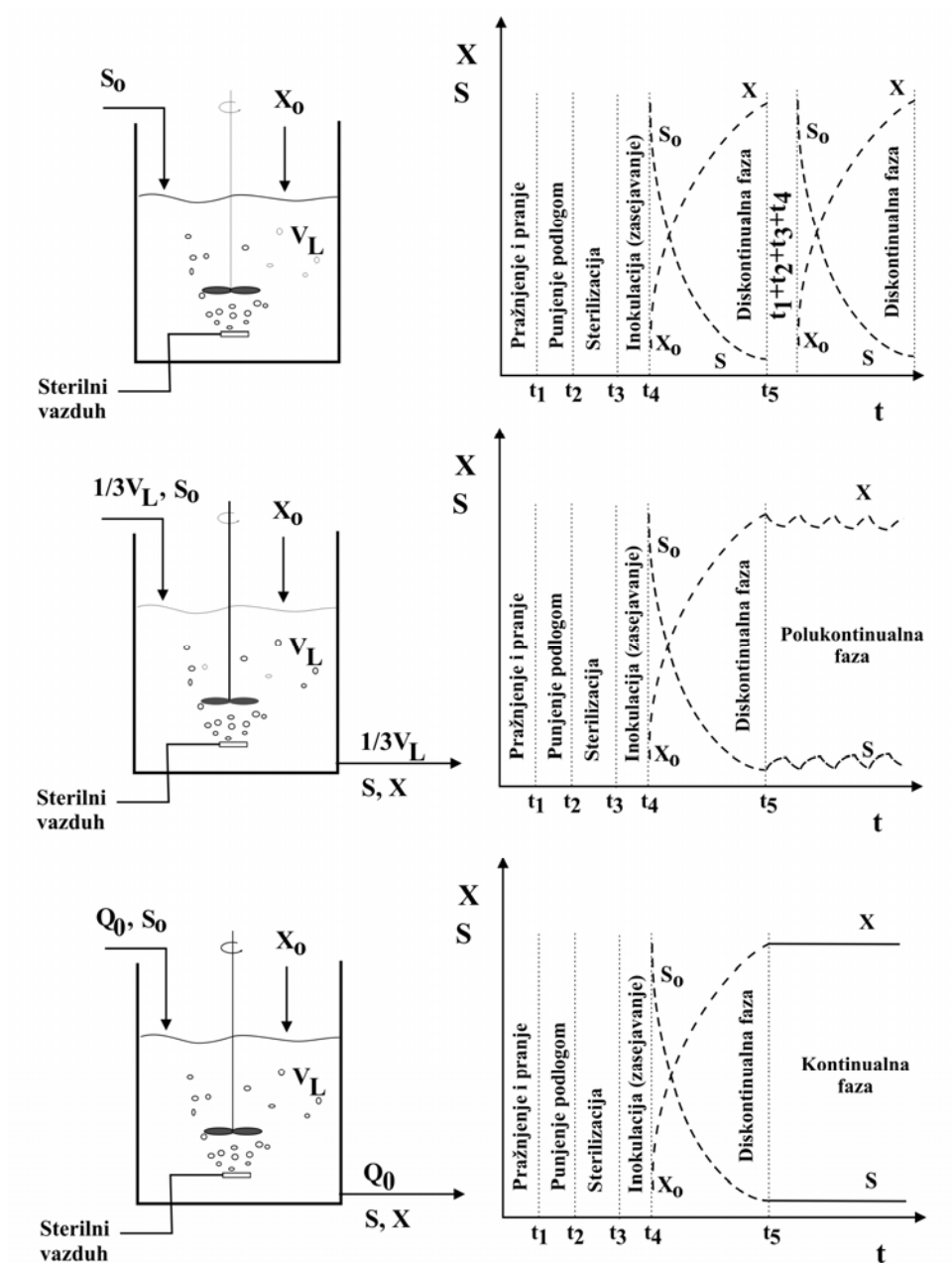
Biološku obradu otpadnih voda.

Šematski prikaz mikrobioloških procesa po operacijama pripreme i izvođenja za diskontinualni i kontinualni način rada dat je na slici 3.34.

Kada se proces izvodi kontinualno, obično se teži da rast mikroorganizama bude u eksponencijalnoj fazi. Doziranje sveže hranljive podloge (supstrata) i izvođenje bioprocesa zavisi od brzine rasta, trošenja limitirajućeg supstrata i brzine sinteze proizvoda. Kontinualni rast se izvodi obično sa konstantnim protokom svežeg supstrata (Q) i fermentirane tečnosti. Ovakvim načinom izvođenja procesa se održava "stacionarno stanje" u sistemu. Kontinualni rast mikroorganizama se može izvoditi na tri načina:

- u hemostatu – održavanje konstantne zapremine tečnosti u bioreaktoru,
- u turbidostatu – održavanje konstantne koncentracije biomase u bioreaktoru i
- u cevnom bioreaktoru.

U praktičnoj primeni se najviše koristi hemostat i donekle cevni bioreaktor, i to naročito kod imobilizovanih bioreaktora.



Slika 3.34 Prikaz diskontinualnog, polukontinualnog i kontinualnog rasta mikroorganizama

3.3.1. Sistemi za izvođenje kontinualnih mikrobioloških procesa

Protočni bioreaktori sa mešanjem

U ovu grupu bioreaktora spadaju sistemi za kontinualne procese koji se baziraju na principima hemostata i turbidostata. Obično se u teorijskim razmatranjima proučava “idealni bioreaktor sa mešanjem”, koji se zasniva na sledećim pretpostavkama:

- idealno (potpuno) mešanje fermentacionog medijuma,
- sastav fermentacionog medijuma u bioreaktoru se praktično ne menja sa dodatkom sveže hranljive podloge,
- temperatura u bioreaktoru je konstantna i
- sastav fermentisane tečnosti koja napušta bioreaktor je identičan sa sastavom hranljive podloge u bioreaktoru.

Kod hemostata je zapremina fermentacione tečnosti V_L u bioreaktoru konstantna. To se postiže tako što je dotok sveže hranljive podloge Q_{ul} jednak protoku fermentacione tečnosti koja se izvodi iz bioreaktora Q_{iz} . Bilans zapremine fermentacione tečnosti u nestacionarnom stanju je:

$$\frac{dV_L}{dt} = Q_{ul} - Q_{izl} \quad (3.149)$$

Pošto je $Q_{ul} = Q_{izl} = Q_0$, onda je:

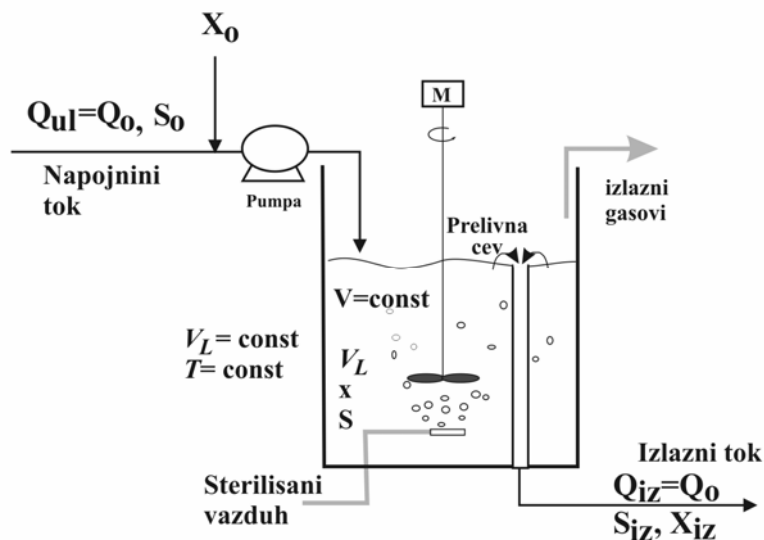
$$\frac{dV_L}{dt} = 0 \text{ i } V_L = const. \quad (3.150)$$

Brzina rasta mikroorganizama u kontinualnim uslovima po principu hemostata se reguliše pomoću sveže hranljive podloge, koja je formulisana tako da su svi hranljivi sastojci osim jednog (limitirajući supstrat) u višku. Izvođenje kontinualnog rasta mikroorganizama je prikazano na slici 3.35.

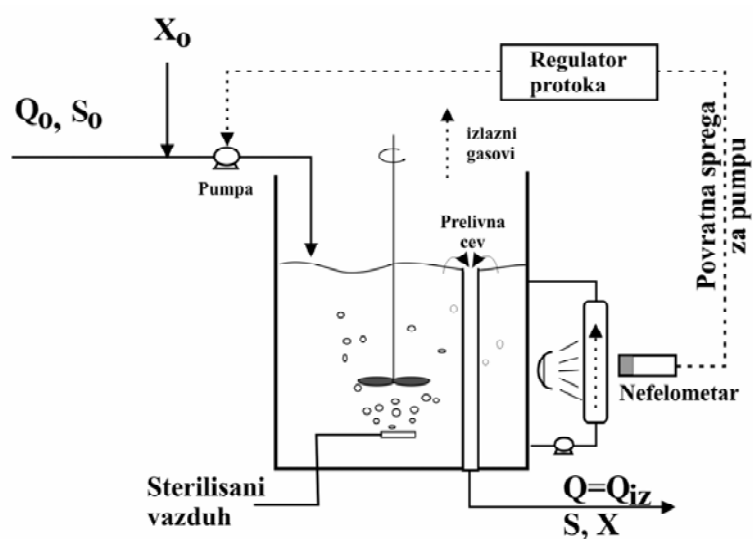
Pošto je brzina rasta ograničena koncentracijom limitirajućeg supstrata, onda je praktično i koncentracija biomase u bioreaktoru konstantna. I samo ime hemostat označava da su hemijski sastojci u fermentacionoj tečnosti nepromenjeni za odabrane uslove izvođenja procesa. Limitirajući supstrat može da bude bilo koji sastojak hranljive podloge, ali to je najčešće izvor ugljenika. Protok tečnosti kroz bioreaktor sa mešanjem se definiše preko zapreminskog vremena boravka τ ili brzine razblaženja D , koje su međusobno povezane pomoću jednačina:

$$\begin{aligned} \tau &= \frac{V_L}{Q_0} \\ D &= \frac{Q_0}{V_L} \\ D &= \frac{1}{\tau} \end{aligned} \quad (3.151)$$

Kontinualni rast po principu hemostata se izvodi tako da je $D \leq \mu$, jer mora biti dovoljno vremena da se mikroorganizam razmnoži u količini koja je veća od one koja se izvodi iz bioreaktora. Zato se koncentracija biomase mikroorganizama ustaljuje na vrednosti koja odgovara koncentraciji limitirajućeg supstrata.



Slika 3.35 Kontinualni rast mikroorganizama po principu hemostata

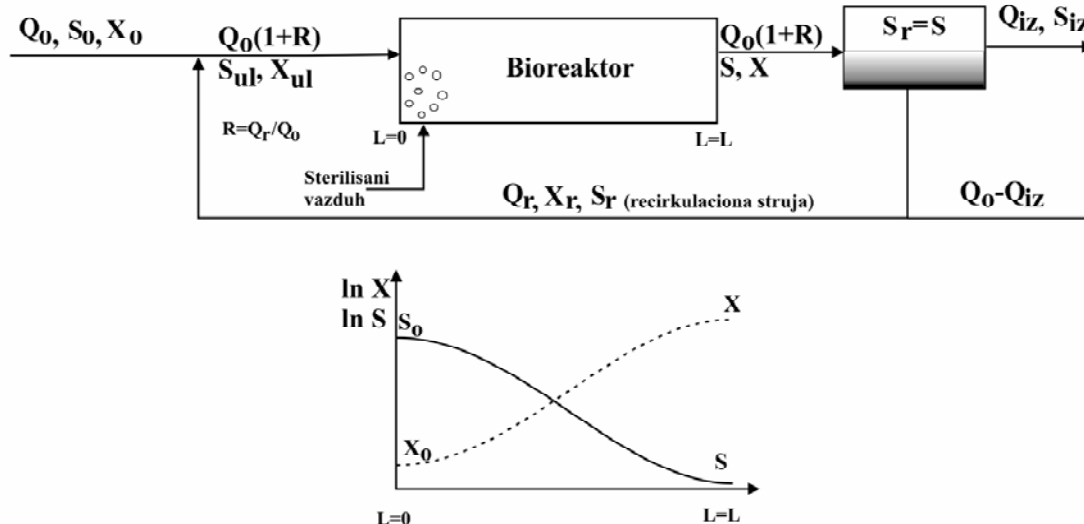


Slika 3.36 Kontinualni rast mikroorganizama po principu turbidostata

Kod *turbidostata* se proces kontinualnog rasta izvodi tako da je koncentracija ćelija na izlasku iz bioreaktora stalna. Izvođenje kontinualnog rasta mikroorganizama, po principu turbidostata je šematski prikazano na slici 3.36. Koncentracija ćelija u bioreaktoru se meri pomoću nefelometra, tj. mutnoće. Ako se mutnoća povećava i pređe neku željenu vrednost, onda se uključi pumpa i dovodi se sveža podloga u bioreaktor, a izvodi fermentisana tečnost istim protokom. Kada koncentracija ćelija padne ispod zadate, onda se prestaje sa doziranjem hranljive podloge ili se ono smanji na neku vrednost. Znači da protok nije stalan, nego se menja u nekim granicama. Obično se i ovaj način kontinualnog rasta izvodi pri konstantnoj zapremini tečnosti u bioreaktoru. Iako izgleda da je ovaj način izvođenja bioprocasa bolji od hemostata, on se retko primenjuje u praksi (laboratorija, industrija) zbog teškoća oko merenja koncentracije biomase u bioreaktorima.

Protočni bioreaktori sa klipnim proticanjem

Kontinualni rast mikroorganizama je moguće izvoditi bez mešanja, tj. klipnim proticanjem kroz cev, pa se ovi bioreaktori nazivaju *cevni bioreaktori*. Izvođenje kontinualnog rasta mikroorganizama u cevnom bioreaktoru je šematski prikazano na slici 3.37. Pri teorijskim razmatranjima ovog načina kontinualnog rasta pretpostavlja se *idealno klipno proticanje*, kod koga nema povratnog mešanja fluida, tj. sve lokalne brzine su iste na poprečnom preseku cevi.



Slika 3.37 Kontinualni rast mikroorganizama u cevnom bioreaktoru

Iz prakse se zna da to nije tačno i da je najveća brzina fluida u centru cevi. Karakteristično kod idealnog cevnog bioreaktora je da svi elementi tečnosti imaju isto vreme boravka. U stacionarnom stanju sastav fermentacione tečnosti se ne menja sa vremenom, nego samo sa dužinom bioreaktora. Na slici 3.37 su, takođe, prikazane promene koncentracije supstrata i biomase duž bioreaktora. Na osnovu izgleda ovih krivih može se zaključiti da se radi o analognom ponašanju kao kod diskontinualnog rasta mikroorganizama. Kod cevnog bioreaktora nezavisno

promenljiva veličina je dužina cevi, a kod diskontinualnih bioreaktora vreme. Pošto je koncentracija biokatalizatora na početku bioreaktora mala, ovi procesi se obično izvode uz recirkulaciju biomase mikroorganizama, tj. izvodi se kontinualna inokulacija. Sterilna hranljiva podloga i reciklat se mešaju neposredno pre ulaska u bioreaktor, tako da se koncentracije supstrata i biomase na ulazu u bioreaktor dobijaju iz masenog bilansa čvorne tačke. Bilans čvorne tačke je šematski prikazan na slici 3.38.

Maseni bilans supstrata u čvornoj tački je:

$$Q_0 S_0 + Q_r S_r = (Q_0 + Q_r) S_{ul} \quad (3.152)$$

gde je: Q_r i S_r - zapreminski protok i koncentracija supstrata u reciklatu, a S_{ul} - koncentracija supstrata na ulazu u bioreaktor. Koncentracija supstrata na ulazu u bioreaktor je:

$$S_{ul} = \frac{Q_0 \cdot S_0 + Q_r \cdot S_r}{(Q_0 + Q_r)} = \frac{S_0 + R \cdot S_r}{1 + R} \quad (3.153)$$

gde je: $R = Q_r / Q_0$ - recirkulacioni odnos.

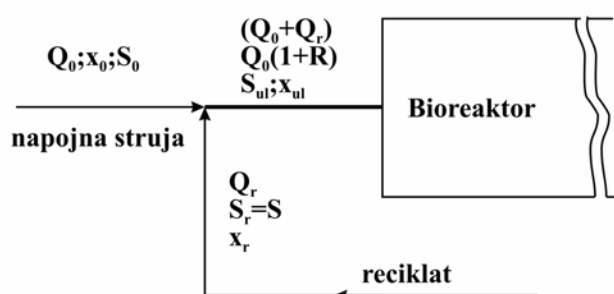
Maseni bilans biomase u čvornoj tački je:

$$Q_0 X_0 + Q_r X_r = (Q_0 + Q_r) S_{ul} \quad (3.154)$$

gde je: X_r - koncentracija biomase u reciklatu.

Koncentracija biomase na ulazu u bioreaktor je:

$$X_{ul} = \frac{Q_0 \cdot S_0 + Q_r \cdot X_r}{(Q_0 + Q_r)} = \frac{X_0 + R \cdot X_r}{1 + R} \quad (3.155)$$



Slika 3.38 Bilans čvorne tačke na ulazu u cevni bioreaktor

Često se analogija između rasta u diskontinualnom i kontinualnom cevnom bioreaktoru koristi za teorijsko i eksperimentalno proučavanje fenomena koji se dešavaju u njima. Za teorijsko izučavanje procesa koji bi se dešavali u cevnom bioreaktoru, eksperimenti se obično izvode u diskontinualnom bioreaktoru sa idealnim mešanjem, jer je u cevnom bioreaktoru veoma teško postići idealno klipno proticanje. Takođe, javljaju se problemi sa održavanjem optimalne koncentracije rastvorenog kiseonika kod aerobnih bioprocasa.

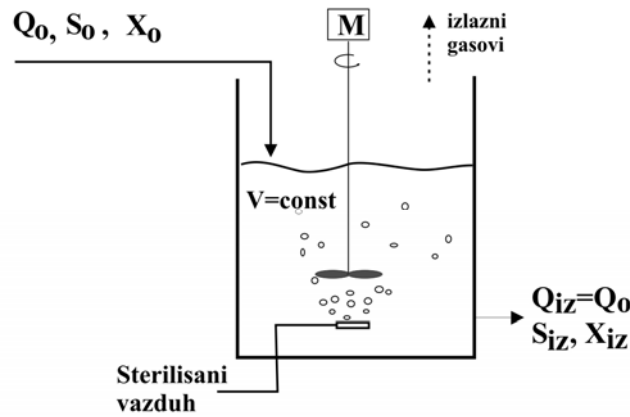
3.3.2. Primena hemostata za određivanje kinetičkih parametara rasta

Očekuje se da primena kontinualnog bioreaktora, u kome relevantni parametri ne zavise od vremena, olakša određivanje kinetičkih parametara rasta mikroorganizama. Kod idealnog hemostata, kinetički parametri rasta mogu se odrediti iz masenih bilansa za biomasu i limitirajući supstrat (slika 3.39).

Verbalni model za protočni bioreaktor sa mešanjem daje:

$$[\text{akumulacija}] = \sum_{i=1}^n (\text{ulaza})_i - \sum_{i=1}^n (\text{izlaza})_i \pm [\text{generisanje}]$$

Ako se pretpostavi da je proticanje kroz bioreaktor proticanje sa idealnim mešanjem i da je zapremina fermentacione tečnosti konstantna, onda je $S_{iz} = S$ i $X_{ul} = X$.



Slika 3.39 Šema hemostata bez recirkulacije

U nestacionarnom stanju bilansi biomase i supstrata daju:

$$V_L \frac{dX}{dt} = Q_0 X_0 - Q_0 X + V_L r_x \quad (3.156)$$

$$V_L \frac{dS}{dt} = Q_0 S_0 - Q_0 S - V_L (-r_s) \quad (3.157)$$

U stacionarnom stanju je $\frac{dX}{dt} = 0$ i $\frac{dS}{dt} = 0$, a u napojnoj struji nema mikroorganizama ($X_0 = 0$), pa jednačina (3.157) postaje

$$(-r_s) = \frac{Q_0}{V_L} (S_0 - S) \quad (3.158)$$

Kombinovanjem jednačina (3.151) i (3.158) dobija se:

$$(-r_s) = D(S_0 - S) = \frac{S_0 - S}{\tau} \quad (3.159)$$

Pod pretpostavkom da važi Monod-ov model rasta mikroorganizama, brzina trošenja supstrata se može napisati u obliku:

$$-r_s = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_m SX}{K_s + S} \quad (3.160)$$

Ako se jednačine (3.159) i (3.160) izjednače, dobija se:

$$-r_s = \frac{S_0 - S}{\tau} = \frac{r_x}{Y_{X/S}} = \frac{\mu_m SX}{Y_{X/S}(K_s + S)} \quad (3.161)$$

Ako se recipročni oblik jednačine (3.161) pomnoži sa X dobija se:

$$\frac{\tau X}{S_0 - S} = \left(\frac{K_s \cdot Y_{X/S}}{\mu_m} \right) \frac{1}{S} + \frac{Y_{X/S}}{\mu_m} \quad (3.162)$$

Jednačina (3.162) je prava linija u koordinatama $\left(\frac{1}{S}, \frac{\tau X}{S_0 - S} \right)$. Iz nagiba $\frac{K_s \cdot Y_{X/S}}{\mu_m}$ i odsečka $\frac{Y_{X/S}}{\mu_m}$ ove prave mogu se odrediti dva kinetička parametra rasta, slika 3.40 (a). Pošto postoje dva podatka, a tri nepoznate veličine, za potpuno rešenje problema treba uzeti u obzir maseni bilans za biomasu. Iz jednačine (3.161) sledi:

$$r_x = Y_{X/S}(-r_s) = \frac{Y_{X/S}(S_0 - S)}{\tau} \quad (3.163)$$

Ako se jednačina (3.163) podeli sa X , a zatim nađe recipročna vrednost, dobija se:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{\tau X}{Y_{X/S}(S_0 - S)} \quad (3.164)$$

Sada, ako se jednačina (3.162) sa $Y_{X/S}$, dobija se:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m} \quad (3.165)$$

Jednačina (3.165) je prava linija u Lineweaver–Burk-ovim koordinatama $(1/S, 1/\mu)$. Kinetički parametri K_s i μ_m određuju se promenom zapreminskog vremena, odnosno protoka, slika 3.40 (b). Vidi se da koncentracije biomase i supstrata ne zavise od početne koncentracije supstrata, pa se govori da je sistem „autonoman” u odnosu na početnu koncentraciju limitirajućeg supstrata (S_0).

U stacionarnom stanju i uz uslov $X_0 = 0$, jednačina (3.156) postaje:

$$r_x = \frac{Q_0 X}{V_L} = \frac{X}{\tau} = Y_{X/S} (-r_s) \quad (3.166)$$

Pod pretpostavkom da važi Monod-ov kinetički model u obliku:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{SX}{K_s + S} - \mu_d X \quad (3.167)$$

i zamenom jednačina (3.163) i (3.166) sa odgovarajućim članovima u jednačini (3.167) dobija se:

$$\frac{X}{\tau} = \frac{(S_0 - S)Y_{X/S}}{\tau} - \mu_d X \quad (3.168)$$

Množenjem jednačine (3.168) sa $\frac{\tau}{X \cdot Y_{X/S}}$ i preuređenjem, dobija se:

$$\frac{S_0 - S}{X} = \frac{\mu_d}{Y_{X/S}} \tau + \frac{1}{Y_{X/S}} \quad (3.169)$$

Jednačina (3.169) je prava linija u koordinatama $\left(\tau, \frac{S_0 - S}{X} \right)$. Na osnovu odsečka $\frac{1}{Y_{X/S}}$ i nagiba $\frac{\mu_d}{Y_{X/S}}$ mogu se odrediti kinetički parametri rasta μ_d i $Y_{X/S}$, slika 3.40 (c). Znači, na osnovu jednačina (3.169), (3.162) i (3.165) mogu se odrediti sva četiri kinetička parametra rasta, ako se ogledi izvode u hemostatu. Na slici 3.40 je dat grafički prikaz određivanja μ_m , K_s , $Y_{X/S}$ i μ_d u kontinualnom bioreaktoru.

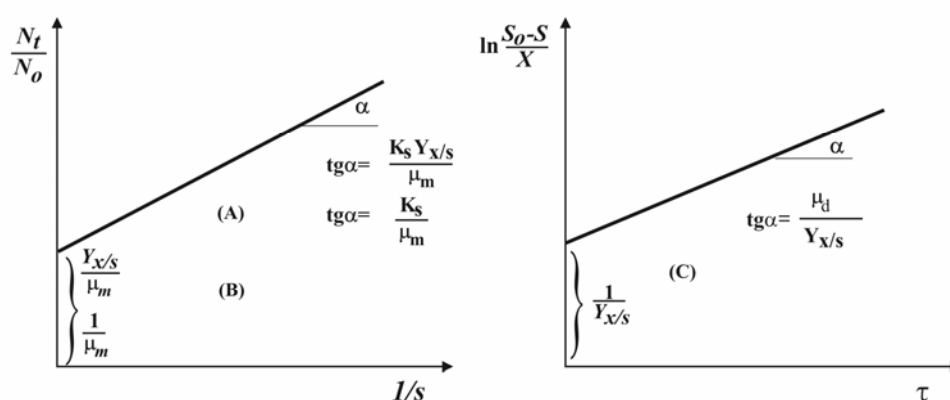
Kod rasta mikroorganizama sa inhibicijom u kontinualnom bioreaktoru važe jednačine (3.90) i (3.93) za modele rasta sa konkurentnom i nekonkurentnom inhibicijom u Lineweaver–Burk-ovim koordinatama, respektivno:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m} \quad (3.90)$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \frac{1}{S} + \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \frac{1}{\mu_m} \quad (3.93)$$

Jednačine (3.165), (3.90) i (3.93) su grafički prikazane na slici 3.21. Ako treba odrediti konstantu inhibicije K_i , onda mora da se izvedu dva eksperimenta, i to:

- bez prisustva inhibitora, kada se određuju kinetički parametri μ_m , K_s , $Y_{X/S}$ i μ_d , i
- u prisustvu inhibitora, kada se određuje K_i .



Slika 3.40 Određivanje kinetičkih parametara rasta u hemostatu

3.3.3. Idealni protočni bioreaktor sa mešanjem

Idealni hemostat

Kontinualni način rasta mikroorganizama je najlakše razumeti razmatranjem hemostata sa idealnim mešanjem bez recirkulacije biomase iz uređaja za separaciju. U bioreaktoru sa idealnim mešanjem je raspodela koncentracija uniformna po celoj zapremini bioreaktora. Ponašanje hemostata u nestacionarnom stanju se opisuje pomoću skupa diferencijalnih jednačina koje povezuju koncentracije biomase i limitirajućeg supstrata sa zapreminskim protokom sveže podloge, tj. zapreminskim vremenom. Proračun bioreaktora se svodi na određivanje potrebne zapremine fermentacione tečnosti za zadati stepen konverzije supstrata i obrnuto. Maseni bilans supstrata i biomase u nestacionarnom stanju je (slika 3.39):

$$\frac{d(V_L X)}{dt} = Q_0 X_0 - Q_0 X + V_L (r_x) \quad (3.170)$$

$$\frac{d(V_L S)}{dt} = Q_0 S_0 - Q_0 S + V_L (-r_s) \quad (3.171)$$

Ako je u pitanju hemostat, onda je $V_L = \text{const.}$, pa jednačine masenog bilansa postaju:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{Q_0}{V_L} (X_0 - X) + \left(\frac{\mu_m S X}{K_s + S} - \mu_d X \right) \quad (3.172)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{Q_0}{V_L} (S_0 - S) - \left[\frac{\mu_m S X}{(Y_{x/s})_R (K_s + S)} + mX + \frac{q_p X}{Y_{p/s}} \right] \quad (3.173)$$

Jednačinama (3.172) i (3.173) je dat opšti maseni bilans biomase i supstrata za hemostat, uz pretpostavku Monod-ovog modela rasta i sinteze proizvoda.

U stacionarnom stanju, jednačine masenog bilansa hemostata postaju:

$$\frac{Q_0}{V_L}(X_0 - X) + \frac{\mu_m SX}{K_s + S} - \mu_d X = 0 \quad (3.174)$$

$$\frac{Q_0}{V_L}(S_0 - S) - \left[\frac{\mu_m SX}{(Y_{X/S})_R(K_s + S)} + mX + \frac{q_p X}{Y_{P/S}} \right] = 0 \quad (3.175)$$

Jednačine (3.174) i (3.175) se koriste za izračunavanje zapremine fermentacione tečnosti u bioreктору ili stepena konverzije supstrata, odnosno koncentracija biomase i supstrata na izlazu iz hemostata. Ove jednačine se mogu pojednostaviti ako se obezbede uslovi rada bioreaktora tako da

je $X_0 = 0$, $\mu \gg \mu_d$, $\frac{\mu X}{(Y_{X/S})_g} \gg mX$ i $q_p = 0$. Ako se u jednačine (3.174) i (3.175) uvede zapreminsko vreme, onda bilansi biomase i supstrata za hemostat postaju:

$$-X + \mu X \tau - \mu_d X \tau = 0 \quad (3.176)$$

$$(S_0 - S) - \frac{\mu X \tau}{Y_{X/S}} = 0 \quad (3.177)$$

Analizom jednačine (3.176) dolazi se do uslova za rast mikroorganizama u hemostatu:

$$\text{za } \mu_d > 0, \quad D = (\mu - \mu_d) = \frac{1}{\tau} \quad (3.178)$$

$$\text{za } \mu_d = 0, \quad D = \mu = \frac{1}{\tau} \quad (3.179)$$

Ako se zna specifična brzina rasta mikroorganizama za zadatu konveziju supstrata:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} = D = \frac{1}{\tau} \quad (3.180)$$

jednačine (3.178) i (3.179) omogućavaju izračunavanje i potrebne zapremine fermentacione tečnosti:

$$V_L = Q_0 \tau = \frac{Q_0}{D} \quad (3.181)$$

Iz jednačine (3.177) se izračunava koncentracija biomase na izlazu iz bioreaktora:

$$\frac{\mu X}{Y_{X/S}} = D(S_0 - S) \quad (3.182)$$

Pošto važi jednačina (3.179), dobija se:

$$X = Y_{X/S} (S_0 - S) \quad (3.183)$$

Jednačinom (3.183) se povezuju koncentracije biomase i limitirajućeg supstrata. Ova međusobna zavisnost važi pod uslovom da koeficijent prinosa biomase u odnosu na supstrat ne zavisi od zapreminskog vremena, tj. brzine razblaženja, što je samo približno tačno. Takođe, mora se uzeti u obzir da je pretpostavljeno da su svi sastojci hranljive podloge, osim limitirajućeg supstrata, u višku, kao i da se faktori okoline održavaju na optimalnim vrednostima tokom kontinualnog rasta.

Pošto u napojnoj struji nema mikroorganizama ($X_0 = 0$), onda postoji neki „kritični protok” svežeg supstrata Q_w kada se mikroorganizmi brže iznose iz bioreaktora nego što se generišu rastom. Iz jednačine (3.178) dobija se:

$$\tau = \frac{1}{D} = \frac{1}{\frac{\mu_m S}{K_s + S} - \mu_d} = \frac{1}{\mu - \mu_d} \quad (3.184)$$

$$\tau = \frac{1}{\mu} = \frac{K_s + S}{\mu_m S} \quad (3.185)$$

Kritično zapreminsko vreme $\tau = \tau_w$ se ostvaruje kada nema konverzije supstrata u bioreaktoru, tj. kada je

$$S = S_0 \quad (3.186)$$

Uzimanjem u obzir (3.186), jednačine za izračunavanje kritičnog zapreminskog vremena su:

$$\tau_w = \frac{1}{\frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0} - \mu_d} \quad \text{za } \mu_d \neq 0, \quad (3.187)$$

$$\tau_w = \frac{K_s + S_0}{\mu_m S_0} \quad \text{za } \mu_d = 0, \quad (3.188)$$

Iz jednačine (3.184) može se izračunati koncentracija supstrata:

$$S = \frac{(1 + \mu_d \tau) K_s}{\mu_m \tau - 1 - \mu_d \tau} \quad (3.189)$$

Iz jednačine (3.189) može se zaključiti da koncentracija supstrata u bioreaktoru ne zavisi od njegove koncentracije na ulazu u bioreaktor, što je i ranije konstatovano, tako da postoji “autonomnost S u odnosu na S_0 ”.

Zavisnost koncentracije supstrata od brzine razblaženja, uz uslov da je $\mu_d = 0$, ima oblik:

$$\mu = D = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (3.190)$$

Iz jednačine (3.190) se vidi da je $D < \mu_m$, pošto je $\frac{S}{K_s + S} < 1$. Kada se jednačina (3.190) reši po S , dobija se:

$$S = \frac{\mu \times K_s}{\mu_m - \mu} = \frac{K_s}{\frac{\mu_m}{D} - 1} \quad (3.191)$$

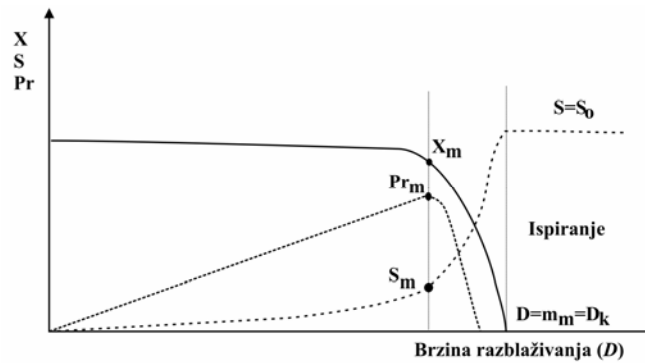
Ako se jednačina (3.191) zameni u jednačinu (3.183) dobija se:

$$X = Y_{X/S} \left(S_0 - \frac{D \cdot K_s}{\mu_m - D} \right) \quad (3.192)$$

Iz jednačine (3.191) se vidi da koncentracija supstrata sa porastom brzine razblaženja raste 0 do S_0 . Kada je $D = \mu_m$, onda se koncentracija supstrata naglo povećava. Pod uslovom da $D \rightarrow \mu_m$, onda $S \rightarrow S_0$, a $X \rightarrow 0$, pa se postiže „kritično stanje” u bioreктору, tj. dolazi do „ispiranja” biomase, pa nema konverzije supstrata. Primenom jednačina (3.191) i (3.192) može se prikazati teoretsko ponašanje hemostata (slika 3.41). Proizvodnost kontinualnog bioreaktora se, u tom slučaju, definiše preko jednačine:

$$P_r = X \cdot D = D \cdot Y_{X/S} \left(S_0 - \frac{D \cdot K_s}{\mu_m - D} \right) \quad (3.193)$$

Kada se biomasa proizvodi u hemostatu, onda proizvodnost predstavlja količinu proizvedene biomase po jedinici zapremine i vremena. Maksimalna proizvodnost se može odrediti pod uslovima $\frac{d(XD)}{dD} = 0$ i $\frac{d^2(XD)}{dD^2} < 0$.



Slika 3.41 Zavisnost koncentracije biomase, supstrata i proizvodnosti od brzine razblaživanja u hemostatu

Kada se nađe izvod jednačine (3.193), dobija se da funkcija $P_r = f(D)$ ima ekstremnu vrednost za:

$$D = D_m = \mu_m \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_0}} \right) \quad (3.194)$$

Proverom drugog izvoda za $D = D_m$, dobija se da je manji od nule, što potvrđuje da je ekstrem ove funkcije u stvari maksimum. Ako se zameni jednačina (3.194) u jednačinu (3.192), dobija se maksimalna koncentracija biomase X_m u hemostatu:

$$X_m = Y_{X/S} \left(S_0 + K_s - \sqrt{K_s(S_0 + K_s)} \right) \quad (3.195)$$

Mora se još jednom naglasiti da su jednačine (3.184) do (3.195) izvedene pod uslovima: $\mu_d = 0$, $X_0 = 0$ i kinetički parametri rasta mikroorganizama ne zavise od brzine razblaženja.

Idealni hemostat sa recirkulacijom

Recirkulacija biomase iz izlaznog toka u napojni tok svežeg supstrata ima za cilj da poveća stabilnost kontinualnog sistema i umanjí posledice poremećaja u procesu do kojih može doći tokom rasta mikroorganizama. Time se povećava koncentracija mikroorganizama, tako da se sa recirkulacijom može raditi sa brzinama razblaženja koje su veće od maksimalne brzine rasta mikroorganizama pri diskontinualnom rastu. Pošto sistem radi sa brzinom razblaženja koja je znatno veća od specifične brzine rasta, postići će se veća proizvodnost u odnosu na hemostat bez recirkulacije.

Šema hemostata sa recirkulacijom je prikazana na slici 3.42. Ako se zanemari razmnožavanje mikroorganizama u separatoru, onda je koncentracija supstrata u reciklatu $S_r = S$. Maseni bilans u opštem obliku je u ovom slučaju:

$$[\text{akumulacija}] = [\text{ulaz supstrata}] + [\text{ulaz reciklata}] - [\text{izlaz iz bioreaktora}] \pm [\text{generisanje}]$$

Maseni bilans supstrata i biomase za hemostat u nestacionarnom stanju, sa recirkulacijom biomase, daje:

$$V_L \frac{dS}{dt} = Q_0 S_0 + Q_r S - (Q_0 + Q_r) S - \left(\frac{\mu_m S X}{(Y_{X/S})_g (K_s + S)} + mX + \frac{q_p X}{Y_{P/S}} \right) \quad (3.196)$$

$$V_L \frac{dX}{dt} = Q_0 X_0 + Q_r X_r - (Q_0 + Q_r) X - \left(\frac{\mu_m S X}{K_s + S} - \mu_d X \right) V_L \quad (3.197)$$

Ako je:

$$X_0 = 0, \quad mX \ll \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \quad \text{i} \quad q_p = 0 \quad (3.198)$$

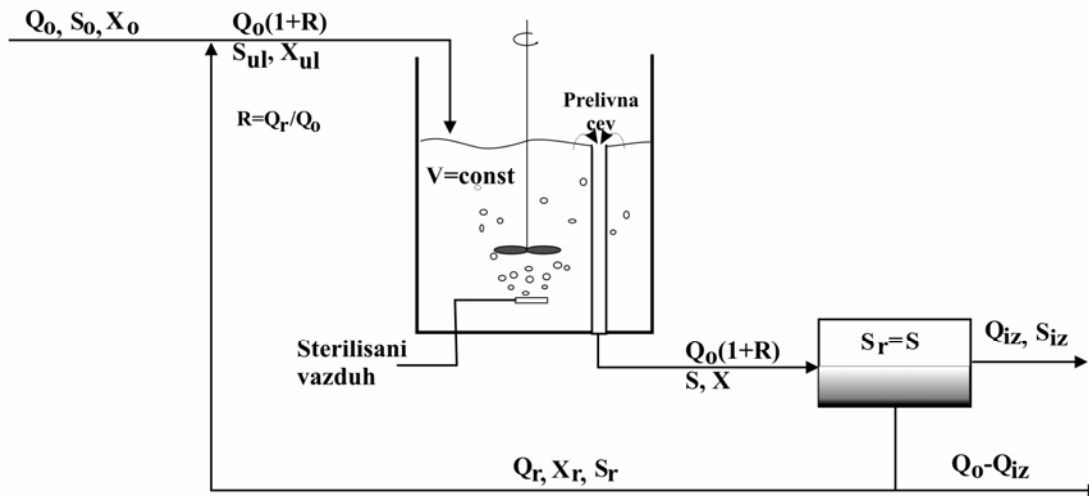
kao i

$$R = \frac{Q_r}{Q_0} \text{ i } \tau = \frac{V_L}{Q_0} \quad (3.199)$$

onda matematički model hemostata sa recirkulacijom, u stacionarnom stanju, obuhvata sledeće dve jednačine:

$$(S_0 - S) - \frac{\mu_m SX \tau}{Y_{X/S}(K_s + S)} = 0 \quad (3.200)$$

$$RX_r - (1 + R)X + \left(\frac{\mu_m SX}{K_s + S} - \mu_d X \right) \tau = 0 \quad (3.201)$$



Slika 3.42 Šema hemostata sa recirkulacijom biomase

Jednačina (3.200) je ista kao kod hemostata bez recirkulacije (pretpostavka $S \approx S_r$), dok se bilans za biomasu, jednačina (3.201), znatno razlikuje. Takođe, mora se voditi računa da je zapreminsko vreme definisano na ulazni protok (3.199), a pravo zapreminsko vreme u bioreaktoru je u stvari:

$$\tau = \frac{V_L}{Q_0 + Q_r} = \frac{V_L}{Q_0(1 + R)} \quad (3.202)$$

Kod projektovanja hemostata obično se izračunavaju dva parametra, i to: opterećenje bioreaktora i starost biomase.

Opterećenje bioreaktora U se definiše kao masa utrošenog supstrata po masi prisutnih mikroorganizama i jedinici vremena, odnosno:

$$U = \frac{\frac{\mu_m SX\tau}{Y_{X/S}(K_s + S)}}{X \cdot V_L} = \frac{\mu_m S}{Y_{X/S}(K_s + S)} \quad (3.203)$$

Starost biomase τ_{st} u bioreaktoru se definiše kao odnos prisutne biomase u bioreaktoru i biomase generisane rastom:

$$\tau_{st} = \frac{X \cdot V_L}{\frac{\mu_m SX\tau}{K_s + S} - \mu_d X V_L} = \frac{K_s + S}{\mu_m S - \mu_d (K_s + S)} \quad (3.204)$$

Poređenjem jednačina (3.203) i (3.204) dolazi se do veze između opterećenja bioreaktora i starosti biomase:

$$\frac{1}{\tau_{st}} = Y_{X/S} \cdot U - \mu_d \quad (3.205)$$

Koncentracija supstrata izražena preko opterećenja bioreaktora i starosti biomase je data sledećom jednačinom:

$$S = \frac{Y_{X/S} \cdot U \cdot K_s}{\mu_d - Y_{X/S} \cdot U} = \frac{K_s + K_s \mu_d \tau_{st}}{\mu_m \tau_{st} - \mu_d \tau_{st} - 1} \quad (3.206)$$

Na osnovu poznate vrednosti za koncentraciju supstrata, može se izračunati stepen konverzije supstrata.

Izbor separatora za izdvajanje biomas

Kada se projektuje hemostat sa recirkulacijom biomase, veoma je značajno izabrati pravi separator za izdvajanje biomase iz fermentirane tečnosti komine. Separator utiče na ceo proces, uticajem na R i X_r . U teorijskim razmatranjima sistema sa recirkulacijom, obično se uzimaju dva slučaja:

1. separator koji obezbeđuje konstantan stepen koncentrisanja biomase

$$\beta = \frac{X_r}{X} = const. \quad (3.207)$$

što se postiže *taložnikom* i

2. separator koji obezbeđuje konstantnu koncentraciju biomase u reciklatu

$$X_r = const \quad (3.208)$$

što obezbeđuje *centrifugalni separator*.

Ako separator obezbeđuje $\beta = const$, onda je maseni bilans za biomasu

$$R(\beta - 1) - 1 + \frac{\mu_m S\tau}{K_s + S} - \mu_d \tau = 0 \quad (3.209)$$

Pod uslovima da je $\mu_d = 0$, koncentracija supstrata je:

$$S = \frac{K_s(1 + R - \beta R)}{\mu_m \tau - (1 + R - \beta R)} \quad (3.210)$$

Koncentracija biomase se određuje pomoću sledeće jednačine:

$$X = \frac{(S_0 - S)(K_s + S \cdot Y_{X/S})}{\mu_m S \tau} \quad (3.211)$$

Uslovi ispiranja se ostvaruju kada $X \rightarrow 0$, tj. kada je $S \rightarrow S_0$. Kritično vreme boravka τ_w se određuje ako se u jednačinu (3.210) stavi da je $S = S_0$:

$$\tau_w = \frac{(K_s + S_0)(1 + R - \beta R)}{S_0 \mu_m} \quad (3.212)$$

Kada separator obezbeđuje $X_r = \text{const.}$, onda važe obe jednačine masenog bilansa, a kada je $X_0 = 0$ i $\tau_d = 0$, tada je koncentracija supstrata na izlazu iz bioreaktora:

$$S_{1,2} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (3.213)$$

gde je:

$$\begin{aligned} a &= 1 + R - \mu_m \tau \\ b &= \mu_m \tau \left(S_0 + \frac{RX_r}{Y_{X/S}} \right) + (K_s - S_0)(1 + R) \\ c &= -S_0 K_s (1 + R) \end{aligned} \quad (3.214)$$

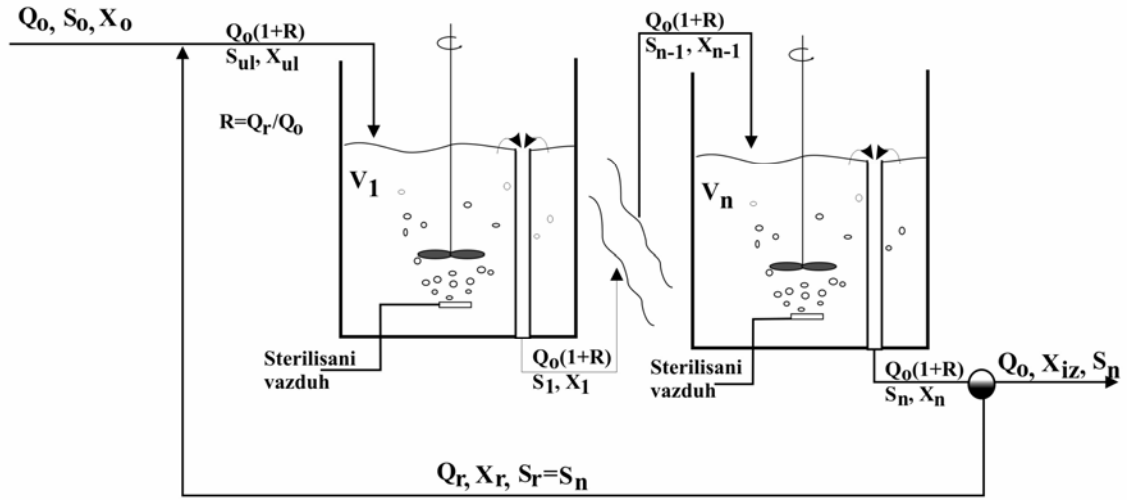
Najpre se izračuna S iz (3.213), a zatim X pomoću jednačine (3.211). U slučaju $X_r = \text{const.}$ i $X_0 = 0$ nije moguće u potpunosti ostvariti ispiranje iz bioreaktora.

Bioreaktori sa idealnim mešanjem povezani u seriji

Ako se povežu u seriju (niz) dva ili više hemostata, onda se dobija “kaskada” bioreaktora. U ovakvim sistemima se postiže veća konverzija supstrata nego u jednom bioreaktoru sa istom zapreminom. Šema niza od N hemostata sa recirkulacijom je prikazana na slici 3.43. Maseni bilans koncentracija supstrata i biomase u n -tom bioreaktoru je:

$$V_n \frac{dS_n}{dt} = Q_0(1 + R)(S_{n-1} - S_n) - \left(\frac{\mu_m S_n X_n}{(Y_{X/S})_R (K_s + X_n)} + X_n m + \frac{q_P X_n}{Y_{P/S}} \right) V_n \quad (3.215)$$

$$V_n \frac{dX_n}{dt} = Q_0(1 + R)(X_{n-1} - X_n) - \left(\frac{\mu_m S_n X_n}{K_s + X_n} - \mu_d X \right) V_n \quad (3.216)$$



Slika 3.43 Šema hemostata povezanih u seriju

Ako su zadovoljeni uslovi: $X \ll \frac{\mu X}{Y_{X/S}}$ i $q_p = 0$, a zapreminsko vreme τ_n je:

$$\tau_n = \frac{V_n}{Q_n} \quad (3.217)$$

onda su jednačine masenog bilansa u stacionarnom stanju:

$$(S_{n-1} - S_n) - \frac{\mu_m S_n X_n \tau_n}{Y_{X/S} (K_s + S_n)(1+R)} = 0 \quad (3.218)$$

$$(X_{n-1} - X_n) + \frac{\mu_m S_n X_n \tau_n}{(K_s + S_n)(1+R)} - \frac{\mu_d X_n \tau_n}{1+R} = 0 \quad (3.219)$$

Obično je u kaskadi zadovoljen uslov:

$$V_1 = V_2 = \dots = V_n = \dots = V_N = V \quad (3.220)$$

Direktna posledica ovoga je:

$$\tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_n = \dots = \tau_N = \tau \quad (3.221)$$

Ukupno zapreminsko vreme za kaskadu od N bioreaktora je:

$$\tau_{uk} = \sum_{i=1}^N \tau_i \quad (3.222)$$

Koncentracije supstrata i biomase na ulazu u niz bioreaktora su date jednačinama (3.153) i (3.155). Za kaskadu od N hemostata iste zapremine, ispiranje nastupa kada je $S = S_0$, tj.:

$$\tau_w = \frac{(1+R) \left[1 - \left(\frac{R\beta}{1+R} \right)^{\frac{1}{N}} \right]}{\frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0} - \mu_d} \quad (3.223)$$

Za zadati stepen konverzije supstrata, ukupna zapremina bioreaktora u nizu se smanjuje sa povećanjem broja bioreaktora. Nekoliko manjih bioreaktora povezanih u seriju daju bolji efekat od jednog velikog bioreaktora sa istom ukupnom zapreminom. Pošto je cena nekoliko manjih bioreaktora veća od cene jednog velikog, broj bioreaktora u kaskadi se optimizuje u odnosu na ekonomski kriterijum. U praksi se obično ne ide na veći broj od četiri.

3.3.4. Idealni protočni bioreaktor sa klipnim proticanjem (cevni bioreaktor)

Karakteristika ovih bioreaktora je da se fermentaciona tečnost kreće klipno, tj. potiskuje se u jednom pravcu. Ako nema promene brzine po poprečnom preseku, onda se govori o "idealnom" proticanju. Kod idealnog proticanja ne postoji promena aksijalne brzine po poprečnom preseku, odnosno ne postoji "povratno mešanje" fluida tokom proticanja. Svi elementi fermentacione tečnosti imaju isto vreme boravka u bioreaktoru. Fermentaciona tečnost menja svoj sastav po dužini bioreaktora, ali se koncentracioni profili biomase i limitirajućeg supstrata ne menjaju sa vremenom. Znači, pretpostavlja se da ovi uređaji rade u stacionarnom stanju. Ako se razmatra nestacionaran režim rada bioreaktora, onda su jednačine masenog bilansa "parcijalne" diferencijalne jednačine, pošto se tada koncentracije supstrata, biomase i proizvoda zavise od položaja u bioreaktoru i vremena.

Idealni cevni bioreaktor bez recirkulacije

Pošto se kod cevnih bioreaktora koncentracije biomase i limitirajućeg supstrata menjaju po dužini bioreaktora l , maseni bilans se pravi za diferencijalni elemenat fluida u cevi, tj. dV_L , koja za cev kružnog preseka iznosi:

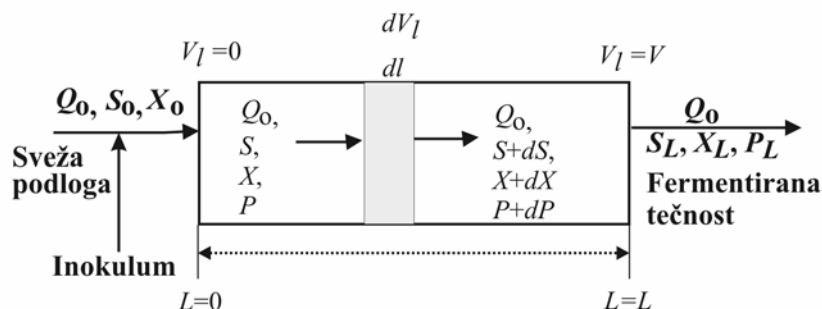
$$dV_L = A \cdot dl \quad (3.224)$$

gde je: A - površina poprečnog preseka cevi.

Na slici 3.44 je šematski prikazan idealni cevni bioreaktor bez recirkulacije. Sterilna hranljiva podloga i inokulum se mešaju neposredno pre ulaska u bioreaktor, a zatim fermentaciona tečnost protiče sa konstantnom brzinom kroz cev bez povratnog mešanja. U stacionarnom stanju bilansne jednačine za biomasu i supstrat su:

$$Q_0 X - Q_0 (X + dX) + (r_X) dV_L = 0 \quad (3.225)$$

$$Q_0 S - Q_0 (S + dS) - (-r_s) dV_L = 0 \quad (3.226)$$



Slika 3.44 Idealni cevni bioreaktor bez recirkulacije

Ako se u bioreaktoru odigrava sinteza proizvoda, onda je materijalni bilans za proizvod u diferencijalnoj zapremini:

$$Q_0 P - Q_0 (P + dP) + (r_p) dV_L = 0 \quad (3.227)$$

Preuređenjem jednačine masenog bilansa za biomasu, supstrat i proizvod u diferencijalnoj zapremini idealnog cevnog bioreaktora, dobija se

$$\frac{dX}{d\tau} = r_x \quad (3.228)$$

$$-\frac{dS}{d\tau} = (-r_s) \quad (3.229)$$

$$\frac{dP}{d\tau} = r_p \quad (3.230)$$

gde je: $d\tau = \frac{dV_L}{Q_0}$.

Analizom jednačina (3.228) do (3.230) dolazi se do zaključka da su one analogne sa bilansnim jednačinama diskontinualnog bioreaktora, gde je nezavisno promenljiva vreme trajanja bioprocesa. Ova konstatacija važi jedino ako nema interakcije između susednih elemenata fermentacione tečnosti, tako da cevni bioreaktor predstavlja niz malih diskontinualnih bioreaktora.

Zapreminsko (kontaktno) vreme fermentacione tečnosti u idealnom cevnom bioreaktoru, koje se dobija integrisanjem jednačine (3.228)

$$\tau = \int_{X_0}^X \frac{dX}{r_x} \quad (3.231)$$

jednako je dužini trajanja bioprocesa u idealnom diskontinualnom bioreaktoru koje je potrebno da se postigne ista koncentracija biomase u oba uređaja pod uslovom da je početna koncentracija biomase jednaka za oba bioreaktora.

Jednačina (3.231) je često veoma komplikovana za analitičko rešavanje, pa se često pribegava numeričkom integrisanju. Ako rast mikroorganizama nije limitiran, tada je $r_X = \mu_m X$, pa se jednačina (3.231) može rešiti analitički, tj.:

$$\tau = \frac{1}{\mu_m} \ln \frac{X}{X_0} \quad (3.232)$$

Sveža hranljiva podloga na ulazu u bioreaktor mora da sadrži ćelije (dodaje se inokulum), jer ako je $X_0 = 0$, onda jednačina (3.232) nema rešenja.

Veza između promena koncentracije biomase i supstrata je data pomoću izraza:

$$dX = -Y_{X/S} \cdot dS \quad (3.233)$$

Integrisanjem jednačine (3.233) dobija se:

$$X = X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S) \quad (3.234)$$

Zamenom jednačine (3.234) u jednačinu (3.232) dobija se:

$$\tau = \frac{1}{\mu_m} \ln \frac{X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)}{X_0} \quad (3.235)$$

Kada je rast mikroorganizama limitiran, onda je:

$$-\frac{dS}{d\tau} = \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} \frac{SX}{K_s + S} \quad (3.236)$$

ili, uzimajući u obzir jednačinu (3.234):

$$-\frac{dS}{d\tau} = \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} \frac{S}{K_s + S} [X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)] \quad (3.237)$$

Integraljenjem jednačine (3.237) dobija se:

$$\mu_m (X_0 + Y_{X/S} S) \tau = [X_0 + Y_{X/S} (K_s + S)] \ln \frac{X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)}{X_0} - K_s Y_{X/S} \ln \frac{S}{S_0} \quad (3.238)$$

Kada se uzmu u obzir konstrukcione pogodnosti cevnog bioreaktora u odnosu na bioreaktore sa mehaničkim mešanjem, onda bi on trebalo da ima prednost za primenu u industriji. Međutim, do sada, osim kod imobilisanih enzimskih bioreaktora, oni nisu našli primenu u praksi. Razloga za to ima više, a osnovni su:

- pošto tečnost struji linearno kroz cev dolazi do lepljenja ćelija na zidove (zidni rast), što nakon izvesnog vremena dovodi do začepjenja cevi; i
- ako se bioreaktor aeriše, onda je praktično nemoguće obezbediti klipno proticanje fermentacione tečnosti kroz cev.

Idealni cevni bioreaktor sa recirkulacijom

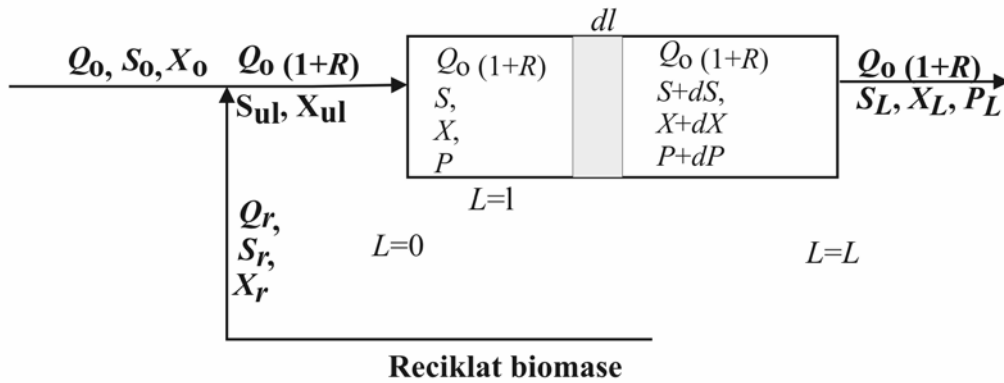
U cilju obezbeđivanja stalne, tj. kontinualne inokulacije, kod cevnih bioreaktora se, po pravilu, skoro uvek vrši recirkulacija biomase iz separatora. Osnovni razlog je da se smanji potrebna zapremina, odnosno dužina bioreaktora za zadatu konverziju putem povećanja koncentracije biomase. Šema cevnog bioreaktora sa recirkulacijom biomase je prikazana na slici 3.45.

Maseni bilans u stacionarnom stanju za biomasu, supstrat i proizvod je prikazan jednačinama:

$$Q_0(1+R)X - Q_0(1+R)(X+dX) - (r_x)dV_L = 0 \quad (3.239)$$

$$Q_0(1+R)S - Q_0(1+R)(S+dS) - (-r_s)dV_L = 0 \quad (3.240)$$

$$Q_0(1+R)P - Q_0(1+R)(P+dP) - (r_p)dV_L = 0 \quad (3.241)$$



Slika 3.45 Šema cevnog bioreaktora sa recirkulacijom biomase

Ako se pretpostavi da je $q_p \gg 0$ i brzina trošenja supstrata mnogo veća od održavanja života, kao i da važi Monodova jednačina, dobija se:

$$Q_0(1+R)dS + \frac{\mu_m SX}{Y_{X/S}(K_s + S)}dV_L = 0 \quad (3.242)$$

$$Q_0(1+R)dX - \left(\frac{\mu_m SX}{K_s + S} - \mu_d X \right) dV_L = 0 \quad (3.243)$$

Jednačine (3.242) i (3.243) mogu da se preurede ako se uzme u obzir jednačina (3.224):

$$\frac{dS}{dl} = - \frac{\mu_m ASX}{Y_{X/S}(K_s + S)(1+R)Q_0} = f(l) \quad (3.244)$$

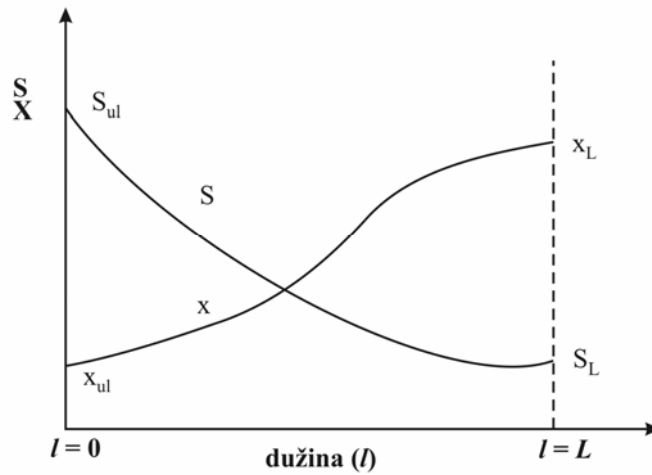
$$\frac{dX}{dl} = \left(\frac{\mu_m ASX}{K_s + S} - \mu_d X \right) \frac{A}{(1+R)Q_0} = f(l) \quad (3.245)$$

Jednačine (3.244) i (3.245) se mogu integrirati, ako se uzmu u obzir granični uslovi

za $l = 0$, $S = S_{ul} = \frac{S_0 + RS_r}{1+R}$ i $X = X_{ul} = \frac{X_0 + RX_r}{1+R}$ (3.246)

za $l = L$, $S = S_L$ i $X = X_L$

Rešavanjem jednačina masenog bilansa za idealni cevni bioreaktor sa recirkulacijom dobija se koncentracioni profili za supstrat i biomasu, koji su prikazani na slici 3.3.13.



Slika 3.46 Koncentracioni profili za supstrat i biomasu u idealnom cevnom bioreaktoru sa recirkulacijom

Nelinearne diferencijalne jednačine (3.244) i (3.245) mogu se rešiti analitički, ako se pretpostavi da se biomasa relativno malo menja po dužini bioreaktora. Tada se može uzeti da je srednja koncentracija biomase X_{sr} u cevnom bioreaktoru:

$$X_{sr} = \frac{X_{ul} + X_L}{2} = const. \quad (3.247)$$

Tada jednačina (3.244) ima oblik:

$$Q_0(1+R)dS + \frac{\mu_m SX_{sr}}{Y_{X/S}(K_s + S)} Adl = 0 \quad (3.248)$$

Integrisanjem jednačine (3.248), uz granične vrednosti (3.246), dobija se:

$$(S_{ul} - S) + K_s \ln \frac{S_{ul}}{S} = \frac{\mu_m \cdot X_{sr} \cdot A \cdot l}{Q_0(1+R)Y_{X/S}} = f(l) \quad (3.249)$$

Promena biomase po dužini bioreaktora dobija se iz ukupnog masenog bilansa:

$$\underbrace{(X - X_{ul})}_{\text{ukupni neto rast}} = \underbrace{Y_{X/S}(S_{ul} - S)}_{\text{konverzija supstrata u biomasu}} - \underbrace{\frac{\mu_d \cdot X_{sr} \cdot A \cdot l}{Q_0(1+R)}}_{\text{odumiranje biomase}} \quad (3.250)$$

Zamenom jednačine (3.249) u jednačinu (3.250) dobija se:

$$(X - X_{ul}) = \frac{\mu_m \cdot X_{sr} \cdot A \cdot l}{Q_0(1+R)} - K_s Y_{X/S} \ln \frac{S_{ul}}{S} - \frac{\mu_d \cdot X_{sr} \cdot A \cdot l}{Q_0(1+R)} \quad (3.251)$$

Valjanost pretpostavke (3.247) se proverava tako da se za $l = L$ izračuna X_L i uporedi sa X_{ul} .

Kada bioreaktor sa klipnim proticanjem radi sa recirkulacijom pod uslovom $X_0 = 0$ i $\beta = \text{const.}$, ispiranje se postiže kada je kritično zapreminsko vreme:

$$\tau_w = \frac{(1+R)(S_0 + K_s)}{\mu_m S - \mu_d(S_0 + K_s)} \ln \frac{1+R}{R\beta} \quad (3.252)$$

Za alkoholnu fermentaciju, koja se izvodi pomoću imobilisanih ćelija, može se veoma dobro primeniti pretpostavka da je $X_{sr} = \text{const.}$, pa se koncentracioni profili supstrata i biomase izračunavaju pomoću jednačina (3.249) i (3.250).

3.3.5. Selekcija mikroorganizama pri kontinualnom rastu

Mnogi mikroorganizmi mogu da rastu pri različitim uslovima okoline. Ako se žele mikroorganizmi koji mogu da obavljaju različite "poslove" (proizvodnja proteina, metabolita, razgradnja toksičnih materija itd.), onda treba odabrati uslove koji će da izvrše selekciju mikroorganizama za željeni proces. Ovi odabrani uslovi treba da favorizuju rast i razmnožavanje mikroorganizama, a da spreče ili uspore rast neželjenih kontaminanata. Rastom mikroorganizama u kontinualnim uslovima je moguće izvršiti selekciju i obogaćenje kulture podešavanjem parametara okoline. Na primer, ako se izoluju mikroorganizmi koji su sposobni da koriste metanol kao izvor ugljenika, onda se koriste nesterilni uslovi u bioreaktoru u koji se uvodi hranljiva podloga limitirana sa metanolom. Tada se odabere odgovarajuća brzina razblaženja i nakon određenog vremena u bioreaktoru će doći do nagomilavanja mikroorganizama, koji koriste metanol kao izvor ugljenika i čija je brzina rasta veća od odabrane brzine razblaženja. Na osnovu opisanog primera može se zaključiti da se nizom ograničenja može postići visoka selekcija i dobijanje obogaćene kulture u kontinualnim uslovima.

Jedna od glavnih opasnosti pri izvođenju kontinualnog rasta je mogućnost kontaminacije, pošto se u sistem stalno dovodi sveža podloga i uduvava vazduh (aerobni procesi). Pošto se ovi procesi obavljaju tokom dužeg vremenskog perioda, jasno je da je rizik za kontaminaciju veći. U laboratorijskim uslovima je moguće izvoditi kontinualan rast bez kontaminacije 1000 sati, pa i duže. U mnogim slučajevima je pri projektovanju bioreaktora moguće minimizirati verovatnoću kontaminacije, ako se poštuju odgovarajuća pravila. Prilikom izbora procesnih parametara

(pH, T, C_L itd.) moguće je, takođe, smanjiti rizik od kontaminacije, na primer, pri rastu kvasca držati $pH \approx 4,0$.

Za bolje razumevanje kontaminacije pri kontinualnom izvođenju procesa treba videti šta se dešava kada se kontaminant nađe zajedno sa proizvodnim mikroorganizmom. Neki bioproces se obavlja pomoću kontinualnog rasta proizvodnog mikroorganizma, a u podlozi je ugljenik limitirajući supstrat. Neka je proizvodna kultura kontaminirana kontaminantima Y, Z i W . Brzina akumulacije kontaminanata u kontinualnom sistemu je:

$$\frac{dX'}{dt} = D(X'_0 - X') + \mu X' \quad (3.253)$$

gde je: X' - koncentracija kontaminanta Y, Z i W . Specifične brzine rasta proizvodnog mikroorganizma X i kontaminanta Y, Z i W u odnosu na koncentracije limitirajućeg supstrata su prikazane na slici 3.47. Neka je limitirajući supstrat isti za sve mikroorganizme. U slučaju da je pored proizvodnog mikroorganizma prisutan kontaminant Y , onda on može da raste jedino brzinom koja je manja od brzine razblaženja, tj. $\mu_Y < D$. U tom slučaju se kontaminant Y ispira iz sistema i do kontaminacije ne dolazi (slika 3.47a). Prema tome, brzina akumulacije kontaminanta Y je data jednačinom:

$$\frac{dY}{dt} = (\mu_Y Y - DY) < 0 \quad (3.254)$$

pa, pošto je ona negativna, kontaminant se iznosi iz sistema brže nego što se razmnožava.

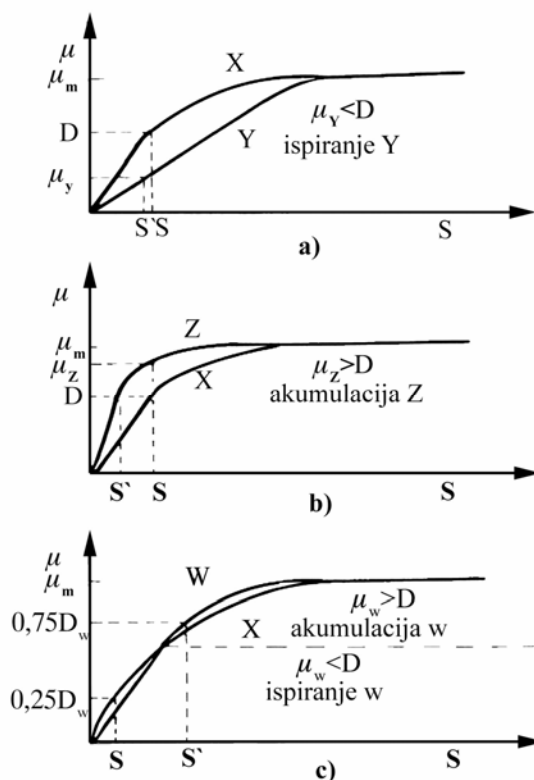
Odnosi između koncentracije supstrata i brzina rasta proizvodnog mikroorganizma i kontaminanta Z su potpuno drugačiji nego u prethodnom slučaju (slika 3.47b). Mikroorganizam Z može da raste brzinom μ_Z koja je veća od brzine razblaženja, odnosno akumulacija kontaminanta je data jednačinom:

$$\frac{dZ}{dt} = (\mu_Z Z - DZ) > 0 \quad (3.255)$$

Prema tome, kontaminant Z se tokom vremena nakuplja u sistemu i u jednom momentu će doći do ispiranja proizvodnog mikroorganizma iz bioreaktora.

Da li će kontaminant W preovladati u bioreaktoru zavisi od brzine razblaženja koja se bira. Tako, na primer, pri $D = 0,25 \cdot D_W$ mikroorganizam W sporije raste od proizvodnog mikroorganizma i iznosi se iz sistema. Ako se pak, radna brzina poveća na $D = 0,75 \cdot D_W$, tada će kontaminant W brže da raste od proizvodnog mikroorganizma, koji će se ispirati iz bioreaktora (slika 3.47c).

Kod diskontinualnog rasta doći će do povećanja koncentracije bilo kog kontaminanta, tj. rast se uvek odvija paralelno sa željenim mikroorganizmom. Kod kontinualnih procesa uspešan ili neuspešan rast ne zavisi samo od toga da li mikroorganizam može da raste, nego i da li uspešno može da se nadmeće sa okolinom. Iz tih razloga kontinualni rast ima prednost pri izboru uslova okoline, pri kojima je favorizovan rast željenog mikroorganizma u odnosu na kontaminante. Osim toga, moguće je da se kontinualnim obogaćenjem kulture izvrši selekcija mikroorganizama koji su sposobni da efikasno koriste limitirajući supstrat.



Slika 3.47 Specifične brzine rasta proizvodnog mikroorganizma X i kontaminanata Y , Z i W

3.3.6. Mutacije mikroorganizama pri kontinualnom rastu

Stvaranje replike DNK ćelija mikroorganizama, koje rastu i razmnožavaju se, veoma je složen proces koji zahteva veliku preciznost, zbog čega se dešavaju određene greške. Učestalost specifičnih grešaka je manja od jedne na 10^6 pravilno odabranih replika DNK. Iako je ovo relativno velika preciznost, greške kod deobe mikroorganizama pri kontinualnom rastu se dešavaju, jer je prosečna koncentracija 10^9 ćelija/cm³. Kao posledica, dolazi do nagomilavanja mutanata pri dužem izvođenju kontinualnog procesa. Mutacija je štetna jedino ako vodi ka promenama koje nisu poželjne u odnosu na bioproces koji se izvodi. Naročito je nepoželjna ako je mutant sposoban da se nekontrolisano razmnožava i time takmiči sa matičnim ćelijama koje uspešno obavljaju željenu biotransformaciju. Kriterijum za uspešnu konkurenciju sa roditeljima je potpuno isti kao kod kontaminacije. Ako je mutant sposoban da koristi limitirajući supstrat mnogo brže od roditelja, tada će se sa vremenom on akumulirati u bioreaktoru, a roditelji će se ispirati iz sistema. Kao direktna posledica ovoga može da dođe do smanjenja ili potpunog prestanka sinteze željenog proizvoda. Mada se mutacije stalno događaju kod kontinualnog rasta, mutant će jedino pod selektivnim uslo-

vima da nadvlada roditelje. Ova pojava je naročito značajna kada se proizvod dobija pomoću mikroorganizama u industrijskim uslovima, jer se mogu dobiti sojevi koji brže rastu i stvaraju proizvod od roditelja.

3.3.7. *Sinteza proizvoda u kontinualnim uslovima rasta mikroorganizama*

Kontinualni rast mikroorganizama nije samo interesantan za proizvodnju biomase kao krajnjeg proizvoda bioprocasa (stočni kvasac, SCP itd.), nego i sa aspekta proizvodnje različitih metabolita. Postoje tri grupe proizvoda koji se dobijaju kao rezultat metabolizama mikroorganizama, i to:

1.– *Direktni proizvodi katabolizma* izvora ugljenika, kao što su: etanol, sirćetna i mlečna kiselina, aceton, butanol, metan, limunska i glukonska kiselina itd. Svi ovi proizvodi su povezani sa rastom mikroorganizama, pa se može očekivati određena veza između specifične brzine njihove sinteze i brzine razblaženja. Neki od navedenih proizvoda su konačni proizvodi kompleksnih oksidoredukcionih transformacija supstrata, dok su u nekim slučajevima intermedijeri. U prvom slučaju su olakšani izbor mikroorganizama i uslovi odvijanja procesa (etanol, mlečna kiselina), dok kada su proizvodi intermedijerna jedinjenja kataboličkog puta (limunska, glukonska kiselina itd.) potrebno je genetskim zahvatima sprečiti njihovu razgradnju i omogućiti nakupljanje u bioreaktoru.

2.– Kontinualnim postupcima je moguće ne proizvoditi mnoge *sekundarne metabolite* (antibiotici i sl.), koji se nazivaju sekundarnim ne zato što se pojavljuju nakon prestanka rasta, već zato što nastaju uporedo sa rastom, a nisu potrebni za rast. Oni su, ustvari, rezultat anabolizma u primarnim i sekundarnim biohemijskim putevima. U kontinualnim uslovima se mnogi sekundarni metaboliti obrazuju brzinama koje su veće nego kod diskontinualnih procesa. Uloga sekundarnih metabolita u fiziologiji ćelija je još nedovoljno poznata. Očigledno je da u uslovima ograničenog rasta u hemostatu (limitirajući supstrat) ćelije mogu da stvaraju enzime koji su sposobni da sintetišu sekundarne metabolite. Prema tome, sa aspekta proizvodnosti je hemostat vrlo često pogodniji za sintezu sekundarnih metabolita. Iako se mnogi antibiotici mogu proizvesti kontinualno (penicilin, tetraciklin, eritromicin) u industrijskim uslovima se isključivo koriste diskontinualni procesi. Uzroka za to ima više, a najverovatnije su razlog kontaminacije i mutacije.

3.– Kontinualni rast mnogo obećava i na području proizvodnje *enzima*. Variranje sastava ćelija mikroorganizama u hemostatu je odgovor na promene parametara okoline u uslovima ograničene brzine rasta. Kao posledica ovih promena menjaju se količine i vrste *enzima* koji su potrebni ćeliji za njene normalne aktivnosti. Postoji dosta prednosti kontinualnih procesa za proizvodnju enzima. Tako, na primer, jedna od najbitnijih prednosti je veća proizvodnost u odnosu na diskontinualne procese.

3.3.8. *Idealni polukontinualni bioreaktori*

Idealni polukontinualni bioreaktor ili “feed – batch” je specijalan slučaj hemostata, a odnosi se na diskontinualni bioproces, gde se kontinualno ili povremeno dozira sveža podloga, dok se ne napuni bioreaktor do radne zapremine. Znači da kod ovih sistema nema isticanja fermentacione tečnosti tokom dotoka sveže podloge. Kod ovih sistema se zapremina fermentacione tečnosti u bioreaktoru menja sa vremenom.

Polukontinualni protočni bioreaktori imaju značajnu primenu u industrijskim uslovima. Ovi sistemi se primenjuju kada je u diskontinualni bioreaktor potrebno da se dodaje prekursor za sintezu nekog proizvoda. Ako je potrebno da se održava niska koncentracija supstrata zbog sprečavanja katabolitičke represije ili produžetka stacionarne faze, onda ovaj način izvođenja rasta mikroorganizama ima ključnu ulogu.

U praksi postoji nekoliko načina izvođenja polukontinualnog rasta mikroorganizama, i to:

1) Ciklični diskontinualni (repeated feed – batch) bioproces, kada se kompletna sveža hranljiva podloga dodaje u diskontinualni bioreaktor, a fermentaciona tečnost povremeno odvodi i postupak se ponavlja više puta;

2) Dolivni postupak, kada se sveža hranljiva podloga dodaje kontinualno u diskontinualni bioreaktor, a dotok hranljive podloge može da bude linearan ili eksponencijalan u odnosu na vreme. Bioproces se prekida kada se bioreaktor napuni do radne zapremine.

Matematički model rasta za ove sisteme, takođe, polazi od opšte jednačine masenog bilansa:

$$[akumulacija] = [ulaz] \pm [generisanje]$$

Bilansi za promene koncentracija biomase, limitirajućeg supstrata i proizvoda su:

$$\frac{d(V_L X)}{dt} = Q_0 X_0 + r_x V_L \quad (3.256)$$

$$\frac{d(V_L S)}{dt} = Q_0 S_0 - (-r_s) V_L \quad (3.257)$$

$$\frac{d(V_L P)}{dt} = Q_0 P_0 + r_p V_L \quad (3.258)$$

Početni uslovi za integrisanje jednačina (3.256) do (3.258) su:

$$\text{za } t = 0, S(0) = S_0, X(0) = X_0 \text{ i } P(0) = 0 \quad (3.259)$$

Ako se fizičke osobine fermentacione tečnosti ne menjaju tokom procesa, promena njene zapremine je:

$$\frac{dV_L}{dt} = Q_0 \quad (3.260)$$

Dotok svežeg supstrata u bioreaktor može da bude: konstantan, linearan ili eksponencijalan u odnosu na vreme.

Ako je $X_0 = 0$, onda jednačina (3.256) postaje:

$$\frac{d(V_L X)}{dt} = r_x V_L \quad (3.261)$$

Dalje, ako važi Monod-ov model rasta

$$X \frac{dV_L}{dt} + V_L \frac{dX}{dt} = \mu X V_L \quad (3.262)$$

Ako se uzme u obzir jednačina (3.260) i preuređeni oblik jednačine (3.262) dobija se:

$$\frac{dX}{dt} = \left[-\frac{Q_0}{V_L} + \mu_m \frac{S}{K_s + S} \right] X \quad (3.263)$$

Analognim izvođenjem, iz osnovnih jednačina za promene koncentracija supstrata i proizvoda, dobija se:

$$\frac{dS}{dt} = (S_0 - S) \frac{Q_0}{V_L} - \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) X \quad (3.264)$$

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{Q_0}{V_L} P - Y_{X/S} \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right) X \quad (3.265)$$

Jednačine koje opisuju promene koncentracija biomase, supstrata i proizvoda su nelinearne diferencijalne jednačine i mogu se analitički rešiti samo za neke specijalne slučajeve. Ako je proces ograničen sa jednim supstratom, onda je koncentracija biomase u diskontinualnom bioreaktoru u bilo kom trenutku data jednačinom:

$$X = X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S) \quad (3.266)$$

Krajnja koncentracija biomase se ostvaruje kada $S \gg 0$, a to je maksimalna vrednost X_m . Pošto je $X_m \gg X_0$, onda se dobija:

$$X_m \approx Y_{X/S} \cdot S_0 \quad (3.267)$$

Ako se počne doziranje sveže hranljive podloge u bioreaktor na kraju diskontinualnog rasta, tj. kada je $X = X_m$, i to tako da je $D < \mu_m$, onda je bilans supstrata dat jednačinom:

$$Q_0 S_0 = \mu \frac{X}{Y_{X/S}} V_L \quad (3.268)$$

Na osnovu jednačine (3.268), može se zaključiti da je uneta količina supstrata proporcionalna količini utrošenog supstrata od strane ćelija. Prema tome, akumulacija supstrata u ovom sistemu je:

$$\frac{dS}{dt} = 0 \quad (3.269)$$

Ako se označi *ukupna količina biomase* u bioreaktoru sa $X' = X \cdot V_L$, onda se dolazi do zaključka da ona raste sa vremenom, dok je koncentracija X približno konstantna:

$$\frac{dX}{dt} \approx 0 \quad (3.270)$$

Prema tome, u ovom slučaju važi uslov za hemostat:

$$\mu \approx D \quad (3.271)$$

Ovakav slučaj se u literaturi opisuje kao “kvazi – stacionarno” stanje. Sa porastom vremena brzina razblaženja opada, a zapremina fermentacione tečnosti raste. Ako se održava $S \approx const.$, onda se iz jednačine (3.264), uzimanjem u obzir (3.269), dobija zapreminski protok:

$$Q_0 = \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} \frac{S}{K_s + S} \frac{1}{S_0 - S} V_L X \quad (3.271)$$

Na osnovu Monodove kinetike, koncentracija limitirajućeg supstrata opada sa smanjenjem zapreminskog protoka, dok istovremeno koncentracija biomase raste. Mora se, takođe, naglasiti da kod ovih sistema treba da bude ispunjen uslov $S_0 \gg K_s$, jer je tada $S \ll S_0$. Kada su ispunjeni uslovi $D < \mu_m$ i $S_0 \gg K_s$, može se reći da su ispunjeni uslovi za “kvazi - stacionarno” stanje.

Osnovna razlika između hemostata i polukontinualnog (feed – batch) načina izvođenja bioprocasa je da je kod prvog načina $\mu = const.$, a kod drugog μ stalno opada tokom izvođenja procesa.

Polukontinualni način rasta je posebno značajan kada je potrebno održavati koncentraciju limitirajućeg supstrata na *malim vrednostima*. Ovo je naročito značajno kod sistema gde je:

- potrebno odstraniti efekte brzog trošenja supstrata zbog aeracionog kapaciteta bioreaktora i
- neophodno da se umanje toksični efekti nekih komponenti iz hranljive podloge.

Tipičan primer za prvi slučaj je proizvodnja *pekarskog kvasca*. Ako bi u toj proizvodnji podloga bila prebogata izvorom ugljenika (diskontinualni način rasta), onda bi ćelije kvasca brzo rasle i sistem za aeraciju ne bi uspeo da obezbedi dovoljne količine rastvorenog kiseonika. Direktna posledica bi bila nagomilavanje etanola zbog anaerobnih uslova i smanjeni prinos kvasca. Ovi efekti se izbegavaju upotrebom polukontinualnog rasta, tj. “dolivnog” postupka.

Proizvodnja penicilina je, takođe, primer za ovakav način izvođenja procesa. Proizvodnja penicilina se deli na fazu „brzog” i fazu “sporog” rasta. U fazi brzog rasta, mikroorganizam raste sa približno $\mu \gg \mu_m$. Doziranjem *glukoze* može da se reguliše metabolizam u obe faze. Tokom brze faze rasta dolazi do nagomilavanja kiselina, pošto višak glukoze izaziva nedostatak kiseonika.

Polukontinualni način rasta ima, takođe, primenu kod procesa u kojima je neka od komponenti podloge toksična za proizvodni mikroorganizam. To je, takođe, slučaj kod proizvodnje penicilina, gde se *natrijumfenilacetat* koristi kao prekursor za sintezu penicilina, koji se ujedno toksičan za *Penicillium chrysogenum*. Pri proizvodnji glutaminske kiseline, polako doziranje podloge smanjuje uticaj supstrata na rast proizvodnog mikroorganizma i na prinos proizvoda u poređenju sa tradicionalnim diskontinualnim načinom proizvodnje.

3.3.9. Poređenje idealnih bioreaktora

Svaki tip bioreaktora ima određene pozitivne i negativne karakteristike, pa je korisno izvršiti njihovo poređenje sa aspekta mogućnosti industrijske primene. Najvažnije prednosti i nedostaci, diskontinualnih, polukontinualnih i kontinualnih bioreaktora dati su u tabeli 3.4.

Tabela 3.4 Poređenje karakteristika bioreaktora

<i>Tip bioreaktora</i>	<i>Prednost</i>	<i>Nedostatak</i>
Diskontinualni	– Relativno mali investicioni troškovi zbog nižeg stepena kontrole – Fleksibilnost – Mali rizik od infekcije zbog kratkog trajanja procesa	– Relativno veliko neproizvodno vreme – Negativan uticaj česte sterilizacije <i>in situ</i> na merne instrumente – Veći troškovi pripreme inokuluma – Veći troškovi radne snage – Veća opasnost po radnike od infekcije
Polukontinualni	– Fleksibilnost – Mali rizik infekcije i mutacije – Veliki prinos proizvoda – Mogućnost optimizacije uslova okoline	– Neproizvodno vreme – Troškovi radne snage i kompjuterski vođene kontrole procesa – Veća opasnost po radnike od infekcije – Negativan uticaj česte sterilizacije <i>in situ</i> na merne instrumente
Kontinualni	– Mogućnost automatizovanja operacija – Mali troškovi radne snage – Manja zapremina zbog kraćeg neproizvodnog vremena – Konstantan kvalitet proizvoda – Manja opasnost po radnike od infekcije	– Nije fleksibilan – Zahteva ujednačen kvalitet ulaznih sirovina – Velika investiciona ulaganja – Vrlo veliki rizik infekcije i mutacije

U tabeli 3.5 nabrojani su najvažniji uslovi primene različitih tipova bioreaktora u industrijskim biotehnološkim procesima.

Tabela 3.5 Primena bioreaktora u industrijskim biotehnološkim procesima

<i>Tip bioreaktora</i>	<i>Uslov primene</i>
Diskontinualni	– Mali kapacitet – Veliki broj različitih proizvoda – Vrlo veliki rizik infekcije i mutacije – Diskontinualno izdvajanje proizvoda
Polukontinualni	– Kad kontinualan rad nije primenljiv, a diskontinualni proces ima malu produktivnost – Veliki rizik infekcije i mutacije
Kontinualni	– Veliki kapacitet – Stabilan mikroorganizam – Mali rizik infekcije i mutacije

3.4. REGULACIJA METABOLIZMA

Biološke ćelije deluju kao složeni hemijski reaktori u kojima se odvija veliki broj hemijskih reakcija katalizovanih enzimima. Ove reakcije omogućavaju razvoj i razmnožavanje ćelija i nazivaju se *reakcije metabolizma*. Reakcije metabolizma dele se na reakcije:

- **katabolizma** u kojima se obavlja razgradnja organskih jedinjenja sa ciljem dobijanja energije i jedinjenja male molekulske mase (*primarni metaboliti*), koja služe kao ishodne supstance za sinteze sastojaka ćelijske biomase, i

- **anabolizma** u kojima se, uz trošenje energije, obavlja biosinteza sastojaka ćelijske biomase i sinteza sekundarnih metabolita.

Imajući u vidu da u sastav ćelija ulazi veliki broj različitih jedinjenja, kao i činjenicu da ih ćelija može skoro sve sintetizovati iz malog broja prostih jedinjenja, može se zaključiti da su anaboličke reakcije daleko brojnije i složenije.

Sve reakcije koje su vezane za rast ćelije, i kataboličke i anaboličke, čine *primarni metabolizam*. Na ovim reakcijama bazirana je industrijska proizvodnja ćelijske biomase koja se direktno koristi za potrebe čoveka (na primer, pekarski kvasac) ili se koristi kao izvor proteina jednoćelijskih mikroorganizama. Međutim, mnoge ćelije na prelazu iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta (*idio fazu*), počinju sintetizovati i izlučivati u okolinu jedinjenja koja nemaju vidljivu ulogu u rastu ćelije, ali njihova sinteza može biti veoma obilna. Sinteza ovih jedinjenja naziva se *sekundarni metabolizam*, a nastala jedinjenja *sekundarni metaboliti* ili *idioliti* (jer nastaju u idio fazi rasta ćelije). Preovlađujući deo biotehnoške proizvodnje baziran je na proizvodnji sekundarnih metabolita.

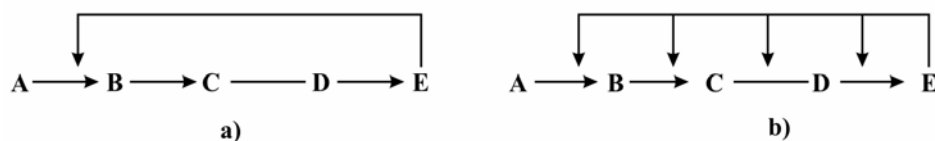
Regulacija metabolizma od životnog je značaja za ćelije bioloških vrsta, ali i za biotehnošku proizvodnju. Poremećaj metabolizma izazvan spoljašnjim uticajem može imati pozitivan ili negativan uticaj na razvoj i razmnožavanje ćelija. Međutim, usmeravanje ćelijskog metabolizma, uz očuvanje životnih funkcija, koristi se u biotehnologiji za proizvodnju i primarnih (aminokiseline, organske kiseline, etanol, aceton i butanol, vitamini B₂ i B₁₂ itd.) i sekundarnih (aminošećeri, hinoni, epoksidi, ergotalkaloidi, glutaridi, laktami, naftaleni, peptidi, polieni, terpeni, tetraciklini itd.) metabolita. Zapravo, sa aspekta biotehnoške proizvodnje, namerno izazvane pozitivne mutacije i genetske transformacije imaju, između ostalog, za cilj da metabolizam ćelija usmeri ka povećanoj produkciji metabolita koji predstavljaju korisne proizvode. Imajući u vidu navedeno, inženjeri biotehnologije treba da poznaju osnovne mehanizme regulacije metabolizma.

Pomoću dva osnovna sistema regulacije kontroliše se sinteza primarnih metabolita koji su zasnovani na aktivnosti induktivnih enzima. To su:

- kontrola enzimske aktivnosti (povratna inhibicija), i
- kontrola sinteze enzima (povratna represija).

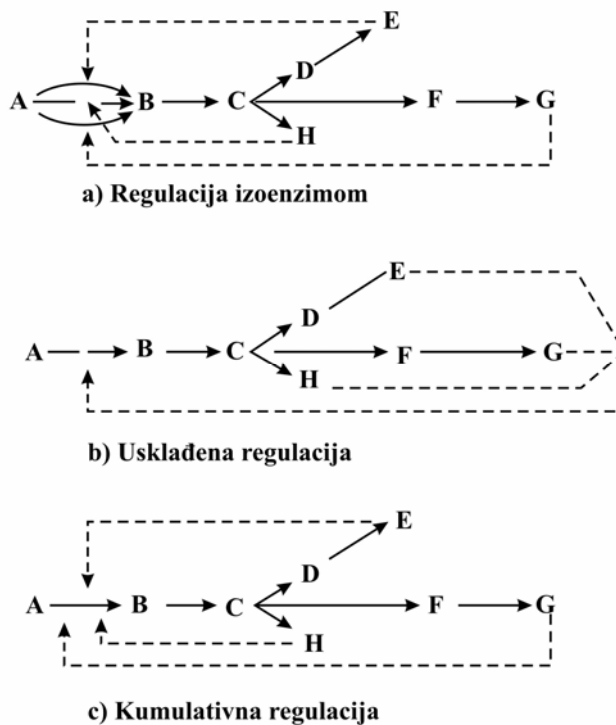
Povratnom inhibicijom (slika 3.48a), krajnji metabolit metaboličkog puta *E* inhibira aktivnost enzima koji katalizuje jednu od reakcija tog puta, obično prvu ($A \rightarrow B$). Kada krajnji metabolit dostigne kritičnu koncentraciju, on se vezuje za enzim na alosteričnom mestu, čime se one-

mogućava vezivanje enzima za supstrat i metabolički put se prekida. Ovo vezivanje je reverzibilno i kada koncentracija kranjeg metabolita opadne, enzim se ponovo oslobađa i omogućava nastavak reakcije metaboličkog puta.



Slika 3.48 Kontrola sinteze primarnih metabolita: povratna
a) inhibicija i b) represija

Povratnom represijom (slika 3.48b) ostvaruje se kontrola metabolizma na nivou gena. U ovom slučaju, krajnji proizvod metaboličkog puta *E* sprečava sintezu jednog ili više enzima koji katalizuju reakcije tog metaboličkog puta. Sprečavanje sinteze enzima ostvaruje se tako što se krajnji proizvod metabolizma kombinuje sa genomom koji je odgovoran za sintezu enzima.



Slika 3.49 Regulacija u razgranatom metaboličkom putu povratnom spregom:
a) izoenzimom, b) usklađenom regulacijom, c) kumulativnom regulacijom

Kontrola složenijih, razgranatih biosintetskih puteva u kojima nastaje više proizvoda, znatno je složenija. U principu svi krajnji proizvodi tog puta nisu iste važnosti za ćeliju. Zbog toga inhibicija prostom povratnom spregom ili povratnom represijom od strane samo jednog manje bitnog krajnjeg proizvoda nastalog u višku, dovela bi ćeliju u situaciju da prestane sinteza i za nju bitnih krajnjih proizvoda, što bi imalo za posledicu zaustavljanje njenog rasta. Za sprečavanje takvog slučaja ćelija raspolaže sa više mehanizama regulacije, koji su prikazani na slici 3.49.

Regulacija izoenzimima. Izoenzimi katalizuju istu reakciju $A \rightarrow B$ u metaboličkom nizu ali su kontrolisani drugim krajnjim proizvodom. Prema slici 3.49a zajednička reakcija je $A \rightarrow B$ i nju katalizuju tri izoenzima koje pojedinačno inhibiraju krajnji produkti G , H i E .

Usklađena regulacija. U ovom slučaju metabolički put je regulisan samo jednim enzimom. Međutim, za inhibiciju tog enzima, potrebno je da u višku bude više od jednog krajnjeg proizvoda, koji zajedno sprovode regulaciju.

Kumulativna regulacija. Kod ove regulacije svaki krajnji proizvod parcijalno inhibira metabolički put ako je u višku. Za potpunu inhibiciju potrebno je kumulativno delovanje više krajnjih proizvoda.

3.4.1. Produkcija metabolita

Kod neizmenjenih prirodnih bioloških vrsta ne dolazi do hiperprodukcije (nagomilavanja) proizvoda metabolizma jer je to neracionalno za ćeliju, a mnogi od metabolita, nagomilani u ćeliji, deluju kao toksici ili povećavaju osmotski pritisak u citoplazmi, što vodi ka inhibiciji rasta, pa i smrti ćelije. Da do takve situacije ne dođe ćelije poseduju mehanizme regulacije biosinteze.

Kao mera hiperprodukcije uzima se prinos konkretnog metabolita po jedinici biomase ćelija ili specifična brzina biosinteze metabolita.

Pod dejstvom određenih faktora životne sredine u prirodi, kao posledica oštećenja mehanizma regulacije, nastaju mutanti koji sintetizuju neki metabolit u povećanoj meri. Postojanje ovakvih mutanata u prirodi je potencijalno značajno za biotehnošku proizvodnju jer njihovom izolacijom se mogu dobiti vredni proizvodni sojevi. Nažalost, najčešće je njihova stabilnost mala, što ograničava njihovu primenu. Veštački izazvana mutacija i selekcija pozitivnih mutanata daleko je sigurniji način dobijanja stabilnih oplemenjenih proizvodnih sojeva. Najlakši način izolovanja pozitivnih mutanata je korišćenje *antimetabolita*.

Antimetaboliti su toksični analozi željenog proizvoda. Na primer, ako određena aminokiselina vrši regulaciju metaboličkog puta povratnom inhibicijom ili represijom sinteze enzima, ovom slučaju antimetabolit je jedinjenje koje, takođe, inhibira metabolički put kao i konkretna aminokiselina. Ako se u hranljivu podlogu, u koju je zasejana kultura na koju je delovano mutagenim agensom radi dobijanja pozitivnog mutanta za produkciju željene aminokiseline, doda antimetabolit te aminokiseline, mutanti koji prežive neosetljivi su na antimetabolit, a to znači i na povećanu produkciju željene aminokiseline. Povećana produkcija te aminokiseline neće inhibitorno delovati na njenu biosintezu. Iz grupe preživelih mutanata izoluje se najproduktivniji mutant koji se zatim koristi kao proizvodni mikroorganizam.

3.4.2. Regulacija biosinteze primarnih i sekundarnih metabolita

Sekundarni metaboliti najčešće nisu bitni za rast i razmnožavanje ćelija, iako imaju funkciju u njenom preživljavanju. Za razliku od primarnog metabolizma, gde su greške (mutacije) u biosintetskoj osnovi najčešće smrtonosne za ćeliju, gubitak sposobnosti sinteze sekundarnih metabolita nije životno bitan. Značajno za sekundarni metabolizam je da se on događa pri nižoj specifičnoj brzini rasta ćelije u *idio fazi* razvoja.

Za sekundarni metabolizam polazna jedinjenja su ista kao i za primarni metabolizam. To znači da su ova dva metabolizma usko povezana i da je sekundarni metabolizam regulisan na isti način kao i primarni. Klasičan primer je biosinteza peptidnih antibiotika (bacitracin, geramicin S) koje sintetizuju bakterije iz roda *Bacillus* kao sekundarni metabolit.

Tabela 3.6. Karakteristike primarnog i sekundarnog metabolizma

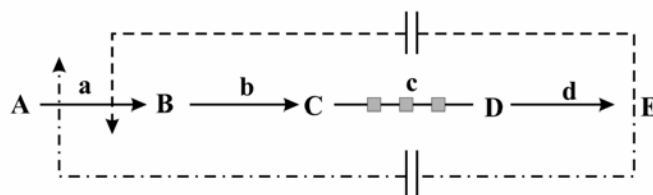
<i>Primarni metabolizam</i>	<i>Sekundarni metabolizam</i>
– Prisutan kod svih mikroorganizama – Značajan za rast mikroorganizama – Biosinteza u različitim uslovima rasta – Prisutan tokom celog ciklusa rasta – Fiziološka uloga poznata – Dobija se jedan određeni proizvod – Proizvodi su u principu jednostavne hemijske strukture – Generalni način rešavanja proizvodnih (bioloških) problema	– Specifičan za mikrobiološku vrstu – Nije neophodan za rast mikroorganizama – Biosinteza zavisna od uslova rasta – Nastaje u kasnijoj fazi rasta (obično u <i>idio fazi</i>) – Fiziološka uloga u principu nepoznata – Nastaje više sličnih proizvoda – Proizvodi su u principu složene hemijske strukture – Specifno rešavanje proizvodnih (bioloških) problema

Kako su za njihovu biosintezu potrebne aminokiseline koje su produkti primarnog metabolizma, narušavanje kontrole njihove biosinteze u primarnom metabolizmu može imati za posledicu povećanu biosintezu antibiotika. Drugi primer je kod biosinteze penicilina pomoću plesni *Penicillium chrysogenum* u koju su uključeni cistein, valin i α -aminoadipinska kiselina koji su produkti primarnog metabolizma. Poremećaj regulacije njihove biosinteze značajno utiče na sintezu penicilina.

Postoji i niz drugih načina regulacije biosinteze sekundarnih metabolita. Najznačajniji su: *indukcija enzima* koji učestvuju u biosintezi, *regulacija povratnom spregom* krajnjeg proizvoda sekundarnog metabolizma (njegovo kontinualno izdvajanje), *katabolička regulacija* supstrata koji se troši brzo u metabolizmu (zamena inhibirajućeg supstrata neinhibirajućim, na primer, glukoze fruktozom ili amonijum jona drugim izvorom azota).

Za proizvodnju primarnih metabolita korisni su tzv. *auksotrofni mutanti* koji su izgubili sposobnost biosinteze nekog enzima. Primer za ovo je pokazan regulacijom prikazanom na slici 3.4.3. Mutant je izgubio biosintezu enzima *C* i za rast zahteva jedinjenje *E*. Ako se ovo jedinjenje dodaje u hranljivu podlogu u maloj količini koja neće izazvati regulaciju inhibicijom ili represijom en-

zima a , doći će do povećane biosinteze jedinjenja C . Na primer, mutant takvih karakteristika do-bijen je kod bakterije *Bacillus subtilis*. On je zavisan od arginina i njegovim dodavanjem u podlo-gu mutant biosintetizuje L-citrulin u količini 16 g/dm^3 .



Slika 3.50 Hiperprodukcija međuproizvoda C pomoću auktrofno mutanta

Prekursori. Prekursori su jedinjenja koja se mogu uključiti u metabolički put biosinteze kranjeg metabolita koji je željeni proizvod. Pošto ne deluju inhibitorno, dodatkom prekursora u hranljivu podlogu moguće je izazvati povećanu produkciju metabolita i kod normalnih sojeva. Poznati prekursor za sintezu benzilpenicilina je fenilsirćetna kiselina, a za vitamin B_{12} – 5,6-dime-tilbenzimidazol.

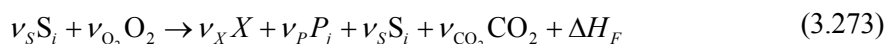
3.5. STEHIOMETRIJA BIOPROCESA

Stehiometrijski proračuni zasnivaju se na bilansu mase značajnih jedinjenja ("ključne pro-menljive"). Opšti oblik zakona o održanju mase atomske vrste u slučaju paralelnih reakcija je:

$$\sum_j \nu_j r = 0 \quad (3.272)$$

gde je: ν_j - stehiometrijski koeficijent (s negativnim predznakom za reaktante i pozitivnim predznakom za proizvode reakcije) i r – opšti oblik izraza za brzinu reakcije.

Direktna primena ove jednačine na biološke procese je složena zbog velikog broja jedinjenja koja učestvuju u metabolizmu. Ovaj problem se prevazilazi tako što se razmatra samo određen broj jedinjenja na makro nivou (tzv. "formalni makro-pristup"). Naime, metabolizam populacije proizvodnog mikroorganizma posmatra se makroskopski preko promena sastojaka biomase X , supstrata S , kiseonika O , proizvoda P , ugljenikdioksida CO_2 i toplote fermentacije ΔH_F . Ukupna reakcija u šaržnim uslovima može se prikazati na sledeći način:



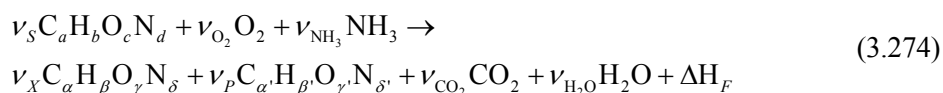
gde su: ν_S , ν_X , ν_P , ν_{O_2} i ν_{CO_2} odgovarajući stehiometrijski koeficijenti.

3.5.1. Maseni bilans rasta biomase

Rast biomase i sa njim povezane metaboličke aktivnosti, međutim, pogodnije je opisati na isti način kako se to radi sa hemijskim reakcijama, tj. preko odgovarajuće stehiometrijske jednačine. Za ovo je, najpre, neophodno utvrditi hemijske formule suve biomase. Ako je poznat elementarni sastav mikroorganizma koji je gajen u određenim uslovima, onda se može odrediti empirijska formula ćelije: $C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$. Kao vrlo pogodno se usvaja da je $\alpha = 1$, dok se β , γ i δ izračunavaju tako da formula biomase bude konzistentna sa poznatim elementarnim sastavom biomase. Na osnovu ovakve formule izračunava se "molska masa" biomase. U tabeli 3.6 dati su podaci o sastavu nekih mikroorganizama.

Po definiciji, jedan C-mol biomase odgovara količini biomase koja sadrži jedan mol atom ugljenika, a odgovara molskoj masi prema formuli u kojoj je broj C-atoma jednak jedinici.

Opšta jednačina biosinteze ima sledeći oblik:



gde su: $C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$ – formula izvora ugljenika, $C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$ – formula biomase i $C_{\alpha'} H_{\beta'} O_{\gamma'} N_{\delta'}$ – formula proizvoda.

Tabela 3.7 Elementarni sastav mikroorganizama

Mikro-organizam	Limitirajući supstrat	Brzina razblaženja, h ⁻¹	Empirijska formula	Molska masa
Bakterije			CH _{1,666} N _{0,20} O _{0,27}	20,7
Klebsiela aerogenes	Glicerol	0,10	CH _{1,666} N _{0,20} O _{0,27}	22,5
	Glicerol	0,85	CH _{1,666} N _{0,20} O _{0,27}	23,7
Kvasci			CH _{1,666} N _{0,20} O _{0,27} P _{0,01} S _{0,003}	26,9
Candida utilis	Glukoza	0,08	CH _{1,666} N _{0,20} O _{0,27}	24,0
	Glukoza	0,45	CH _{1,666} N _{0,20} O _{0,27}	25,6
	Etanol	0,06	CH _{1,666} N _{0,20} O _{0,27}	24,0
	Etanol	0,43	CH _{1,666} N _{0,20} O _{0,27}	24,0

NAPOMENA: brzina razblaženja pri kontinualnoj fermentaciji jednaka je specifičnoj brzini rasta.

U ovom slučaju bilansiranje je ograničeno na četiri najznačajnija elementa: C, H, O i N, što je obično i dovoljno. U posebnim slučajevima elementi sumpor i fosfor mogu, takođe, biti značajni i tada se i oni uključuju u bilansnu jednačinu.

Poznavanje sastava mikroorganizama (izraženo elementarno ili kao hemijsko jedinjenje) je neophodno za stehiometrijsko izračunavanje prinosa i za teorijsko izračunavanje količine ATP potrebne za biosintezu određene količine biomase. Elementarna analiza mikroorganizama je pokazala dve činjenice:

- Ne postoji jedinstvena empirijska formula za mikroorganizme. Elementarni sastav varira sa brzinom rasta i limitirajućim supstratom (vidi tabelu 3.7).
- Ne postoji jedinstvena elementarna bilansna jednačina za mikrobiološki rast, već više takvih jednačina sa različitim numeričkim koeficijentima.

Opšta jednačina biosinteze je neto-bilansna jednačina koja je rezultat metaboličkih reakcija u živoj ćeliji. Različiti biosintetaski putevi u metabolizmu ćelije, uključujući sistem za generisanje ATP i uopšte energije, koji ne rezultuju u formiranju biomase i proizvoda i nisu uključeni u ovu neto bilansnu jednačinu. Zbog toga je opšta jednačina neto bilansa jako uprošćena. Međutim, iskustvo pokazuje da je ovakva analiza vrlo korisna i uspešna u mnogim praktičnim slučajevima.

3.5 2. Koeficijent prinosa biomase

Glavni problem u primeni stehiometrije na bioprocese dolazi od složenosti ukupnih metaboličkih reakcija. Jedan od načina za njegovo prevazilaženje je pristup koji se bazira na koeficijentima prinosa.

Koeficijent prinosa biomase u odnosu na supstrat. Supstrati koje mikroorganizam usvaja iz okolne sredine se inkorporiraju u njegov ćelijski materijal i/ili obezbeđuju energiju neophodnu za biosintezu i održavanje životnih funkcija mikroorganizma. Ako se supstrat samo inkorporira u biomasu, količina nastale biomase se može lako izračunati iz stehiometrije. Međutim, ako se supstrat upotrebljava kao izvor energije za metabolizam, efikasnost sa kojom mikroorganizam koristi ovu energiju postaje faktor koji određuje količinu nastale biomase. U oba slučaja se efikasnost iskorišćavanja supstrata procenjuje preko koeficijenata prinosa biomase koji se mogu definisati na različite načine.

Prvobitno je koeficijent prinosa biomase korišćen u cilju kvantifikovanja efikasnosti sinteze biomase iz izvora ugljenika. Međutim, koeficijent prinosa biomase se generalno može definisati u odnosu na bilo koji supstrat:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{(-\Delta S)} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t} \quad (3.275)$$

gde je: $Y_{X/S}$ - koeficijent prinosa biomase u odnosu na supstrat, X_0 i X_t – količina biomase na početku i kraju reakcionog perioda, S_0 i S_t – količina supstrata na početku i kraju reakcionog perioda, ΔX – povećanje količine biomase i $(-\Delta S)$ – utrošena količina supstrata.

Načelno, koeficijent prinosa biomase izražava se u gramima suve biomase dobijene po gramu ili molu utrošenog supstrata. Vrednosti koeficijenta prinosa biomase $Y_{X/S}$ za neke mikroorganizme date su u tabeli 3.8.

Tabela 3.8 Koeficijenti prinosa biomase u odnosu na supstrat, raspoložive elektrone kiseonik

<i>Mikroorganizam</i>	<i>Supstrat</i>	$Y_{x/s}$, g/g	$Y_{x/e}$, g/e	$Y_{x/o}$, g/g
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Maltoza	0,46	3,11	1,50
	Manitol	0,52	3,67	1,18
	Fruktoza	0,42	3,17	1,46
	Glukoza	0,40	3,00	1,11
<i>Candida utilis</i>	Glukoza	0,51	3,82	1,32
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Glukoza	0,43	3,22	1,35
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Glukoza	0,38	2,85	0,85
<i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	Glukoza	0,45	3,37	1,46
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glukoza	0,50	3,75	0,97
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Riboza	0,35	2,66	0,98
	Sukcinat	0,25	2,12	0,62
	Glicerol	0,45	2,99	0,97
	Laktat	0,18	1,38	0,37
	Piruvat	0,20	1,78	0,48
	Acetat	0,18	1,31	0,31
<i>Candida utilis</i>	Acetat	0,36	2,62	0,70
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Acetat	0,28	2,10	0,46
<i>Candida utilis</i>	Etanol	0,68	2,60	0,61
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Etanol	0,49	1,87	0,42
<i>Klebsiella sp.</i>	Metanol	0,38	2,03	0,56
<i>Methylomonas sp.</i>	Metanol	0,48	2,56	0,53
<i>Pseudomonas sp.</i>	Metanol	0,41	2,18	0,44
<i>Methylococcus sp.</i>	Metan	1,01	2,02	0,29
<i>Pseudomonas sp.</i>	Metan	0,80	1,60	0,20
<i>Pseudomonas methanica</i>	Metan	0,56	1,12	0,17

Koeficijent prinosa biomase iz izvora ugljenika ima veliki praktičan značaj u proizvodnji mikrobnog biomase gde glavni troškovi dolaze od cene ugljenohidratne sirovine. Za komercijalne svrhe treba odabrati proizvodni mikroorganizam koji ima visok koeficijent prinosa biomase jer se na taj način povećava produktivnost biomase i štedi se energija u toku gajenja.

Koeficijent prinosa biomase u odnosu na promenu entalpije bioprocesa. Ovaj se koeficijent prinosa biomase $Y_{x/c}$ definiše kao odnos između sintetizovane biomase (ΔX) i promene entalpije bioprocesa ($-\Delta H_c$):

$$Y_{x/c} = \frac{\Delta X}{(-\Delta H_c)} \quad (3.276)$$

Promena entalpije bioprocesa (toplota bioprocesa) po jedinici zapremine ΔH_c jednaka je razlici između promene entalpije sagorevanja izvora ugljenika i promene entalpije sagorevanja proizvoda.

$$\Delta H_C = (\Delta H_C)_S(-\Delta S) - \sum (\Delta H_C)_P \Delta P \quad (3.277)$$

gde je: $(\Delta H_C)_S$ – promena entalpije reakcije sagorevanja supstrata, $(\Delta H_C)_P$ – promena entalpije reakcije sagorevanja proizvoda, S i P – koncentracije supstrata i proizvoda.

Iz poslednje dve jednačine proizilazi:

$$Y_{X/C} = \frac{Y_{X/S}}{(\Delta H_C)_S - \sum (\Delta H_C)_P Y_{P/S}} \quad (3.278)$$

gde je: $Y_{P/S}$ – koeficijent prinosa proizvoda u odnosu na supstrat definisan kao: $Y_{P/S} = \Delta P / (-\Delta S)$.

Ako su proizvodi bioprocesa biomasa, ugljenikdioksid i voda, onda se jednačina (3.278) može napisati u sledećem obliku.

$$Y_{X/C} = \frac{Y_{X/S}}{(\Delta H_C)_S - \sum (\Delta H_C)_X Y_{P/S}} \quad (3.279)$$

gde je $(\Delta H_C)_X$ – promena entalpije reakcije sagorevanja suve biomase.

Koeficijent prinosa biomase $Y_{X/C}$ zavisi od vrste mikroorganizma – preko $(\Delta H_C)_X$ i supstrata – preko $(\Delta H_C)_S$. U tabeli 3.9 date su vrednosti koeficijenta prinosa biomase $Y_{X/C}$ za bakterije koje su gajene na različitim supstratima. Uočava se da se u slučaju ugljovodonika oslobađa veća količina toplote nego u slučaju delimično oksidovanih jedinjenja. Zbog toga je problem razmene toplote u toku bioprocesa posebno izražen u slučaju redukovanih supstrata.

Koeficijent prinosa biomase u odnosu na ukupnu raspoloživu energiju. Ovaj koeficijent prinosa biomase Y_{kJ} zasniva se na ukupnoj količini energije koja se može dobiti iz određene hranljive podloge. Pošto se ukupna raspoloživa energija sastoji iz energije inkorporirane u ćelijski materijal i energije oslobođene u kataboličkim reakcijama u toku mikrobnog rasta, sledi da je:

$$Y_{kJ} = \frac{\Delta X}{(\Delta H_C)_X \Delta X - \Delta H_C} \quad (3.280)$$

Tabela 3.9 Koeficijent prinosa biomase u odnosu na promenu entalpije bioprocesa

<i>Supstrat</i>	$Y_{X/C}$, g/kJ
Malat	0,072
Acetat	0,050
Glukoza	0,100
Metanol	0,029
Etanol	0,043
<i>i</i> -Propanol	0,018
<i>n</i> -Parafini	0,038
Metan	0,015

Koeficijent prinosa biomase u odnosu na ATP. On se bazira na količini ATP koji se dobija u kataboličkim reakcijama:

$$Y_{X/ATP} = \frac{\Delta X}{\Delta c_{ATP}} = \frac{Y_{X/S}}{Y_{ATP/S}} \quad (3.281)$$

gde je: $Y_{X/ATP}$ – koeficijent prinosa biomase u odnosu na ATP, $Y_{ATP/S}$ – koeficijent prinosa ATP u odnosu na supstrat, c_{ATP} – koncentracija ATP. Vrednost $Y_{X/ATP}$ iznosi oko 10,7 g_{s.b.}/mol ATP, nezavisno od vrste mikroorganizma i okolnih uslova.

Koeficijent prinosa biomase u odnosu na raspoložive elektrone. Ovaj koeficijent prinosa biomase $Y_{X/e}$ definisan je sledećim izrazom:

$$Y_{X/e} = \frac{Y_{X/S}}{Y_{e/S}} \quad (3.282)$$

gde je $Y_{e/S}$ – broj raspoloživih elektrona po molu supstrata. Broj raspoloživih elektrona po molu supstrata se može izračunati množenjem broja molova kiseonika potrebnih za potpuno sagorevanje jednog mola supstrata sa četiri, tj. s brojem elektrona potrebnih za redukciju jednog molekula kiseonika. Srednja vrednost koeficijenta prinosa biomase $Y_{X/e}$ u slučaju supstrata sa 4–6 ugljenikovih atoma iznosi 3,07 g suve biomase po raspoloživom elektronu, dok je mnogo manja u slučaju supstrata sa 1–3 ugljenikova atoma (tabela 3.9).

Koeficijent prinosa biomase u odnosu na kiseonik. Koeficijent prinosa biomase u odnosu na kiseonik $Y_{X/O}$ definisan je kao količina sintetizovane biomase po jedinici mase utrošenog kiseonika:

$$Y_{X/O} = \frac{\Delta X}{\Delta c_{O_2}} \quad (3.283)$$

gde je Δc_{O_2} – koncentracija rastvorenog kiseonika.

Teorijski i stvarni koeficijent prinosa

Na bazi opšte stehiometrijske jednačine mikrobnog rasta mogu se postaviti sledeće bilansne jednačine značajnih elemenata:

Ugljenik: $\nu_S a = \nu_X \alpha + \nu_{CO_2} + \nu_P \alpha' \quad (3.284)$

Vodonik: $\nu_S b + 3\nu_{NH_3} = \nu_X \beta + \nu_P \beta' + 2\nu_{H_2O} \quad (3.285)$

Kiseonik: $\nu_S c + 2\nu_{O_2} = \nu_X \gamma + \nu_P \gamma' + 2\nu_{CO_2} + 2\nu_{H_2O} \quad (3.286)$

Azot: $\nu_S d + \nu_{NH_3} = \nu_X \delta + \nu_P \delta' \quad (3.287)$

Obično se usvaja da je $\nu_X = 1$ i $\alpha = 1$. Količine supstrata (ν_S) i amonijaka (ν_{NH_3}) potrebnih za sintezu jednog mola suve biomase mogu se direktno izmeriti. Sastavi biomase i proizvoda

mogu se odrediti elementarnom analizom. Količine potrošenog kiseonika i nastalog ugljenikdioksida mogu se odrediti metodom gasne analize. Nastala količina vode ne može se izmeriti, ali se može izračunati kao razlika jednačina (3.285) i (3.286).

Jednačine (3.285) do (3.288) omogućuju da se na osnovu jednačine (3.275) izračunaju „teorijske” vrednosti koeficijenata prinosa biomase u odnosu na supstrat (izražen u $g_{s.b.}/g_{supstrata}$):

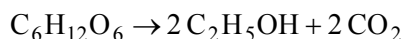
$$Y_{X/S} = \frac{\nu_X(12\alpha + \beta + 16\gamma + 14\delta)}{\nu_S(12a + b + 16c + 14d)(1 - f_a)} \quad (3.288)$$

gde je: f_a – udeo pepela u biomasi (oko 0,07 do 0,10). Koeficijent prinosa biomase u realnim bioprocima nije konstantan, kako proizilazi iz stehiometrijske jednačine, već zavisi od različitih *fizičkih* (hidrodinamički uslovi, brzina prenosa mase kiseonika, i sl.), *hemijskih* (vrsta i koncentracija supstrata) i *bioloških faktora* (vrsta i soj proizvodnog mikroorganizma). Kao što je već objašnjeno, supstrat se troši ne samo za sintezu biomase nego i za obezbeđenje energije za sintezu ćelijskog materijala i održavanje života ćelija.

Stehiometrija bioprocasa omogućava izračunavanje maksimalnog (teorijskog) koeficijenta prinosa proizvoda u odnosu na supstrat (u g/g supstrata):

$$Y_{P/S} = \frac{\nu_P(12\alpha' + \beta' + 16\gamma' + 14\delta')}{\nu_S(12a + b + 16c + 14d)} \quad (3.289)$$

Optimalan slučaj je potpuna konverzija supstrata u željeni proizvod. Na primer, u anaerobnoj fermentaciji glukoze u etanol:



teorijski koeficijent prinosa etanola iznosi 2 mol/mol ili 0,51 g/g, ali je stvarni prinos mnogo manji.

Za sintezu penicilina G jednačina je:



Maksimalni koeficijent prinosa penicilina prema jednačini je 1,2 g/g glukoze dok je stvarni koeficijent prinosa mnogo manji (oko 0,1 g/g). Stvarni prinos željenog proizvoda je manji od teorijskog prinosa, jer se supstrat troši i na sintezu biomase i drugih proizvoda.

3.6. TERMODINAMIKA BIOPROCESA

Apsolutni opis nekog realnog procesa, čak i onih vrlo jednostavnih na makroskopskom nivou, veoma je složen, a u mnogim slučajevima čak nerešiv zadatak. Makroskopski pristup posmatra veličine sistema, kao što su: energija, entropija, koncentracije hemijskih jedinjenja ili temperatura, preko njihovih prosečnih vrednosti, koje se mogu pripisati ukupnom sistemu. Makroskopski pristup je opšte prihvaćen u inženjerskim naučnim disciplinama, a ovde će biti primenjen na termodinamičko razmatranje bioloških procesa.

3.6.1. Zakoni termodinamike

Prvi zakon termodinamike je zakon o održanju energije. Prema ovom zakonu sledi da u bilo kom fizičkom ili hemijskom procesu ukupna energija sistema i okoline ostaje konstantna. Energija može menjati oblik, ali je ukupna količina konstantna. Iz ovog zakona proizilaze određeni kvantitativni odnosi između različitih vrsta energije. Matematički se ovaj zakon prikazuje sledećim izrazom:

$$\Delta U = Q - W \quad (3.290)$$

gde je: ΔU – promena unutrašnje energije između krajnjeg i početnog stanja sistema, Q – toplota razmenjena između sistema i okoline i W – rad koji obavlja sistem.

Prvi zakon termodinamike ne može objasniti pravac odigravanja spontanijh fizičkih i hemijskih promena, a ne pruža ni informacije o efikasnosti transformacija energije u rad.

Drugi zakon termodinamike je zakon o entropiji kao meri neuređenosti sistema. Prema ovom zakonu sledi da se svi fizički i hemijski procesi odigravaju u pravcu u kome se povećava entropija sistema i okoline do postizanja maksimuma, kada je dostignuto ravnotežno stanje. Promena entropije u reverzibilnom procesu na konstantnoj temperaturi je data izrazom:

$$\Delta S_{rev} = \frac{Q_{rev}}{T} \quad (3.291)$$

gde je: ΔS_{rev} – promena entropije, Q_{rev} – dobijena ili izgubljena toplota i T – apsolutna temperatura.

3.6.2. Gibsova energija

Entropija i promena entropije se ne meri i ne izračunava lako. Umesto nje, u biološkim procesima, koji se izvode pri konstantnoj temperaturi i pritisku, upotrebljava se Gibsova energija (slobodna energija). Promena Gibsove energije bioprocesa ΔG je definisana sledećom jednačinom:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3.292)$$

gde su: ΔH i ΔS – promena entalpije, odnosno entropije bioprocesa na apsolutnoj temperaturi T .

U jednačini (3.293), ΔH označava promenu entalpije bioprocesa, tj. toplotu bioprocesa, ΔG označava deo promene entalpije bioprocesa koju mikroorganizam koristi za svoje metaboličke aktivnosti, dok se deo promene entalpije bioprocesa $T\Delta S$, koji se ne može iskoristiti u ove svrhe, gubi u obliku entropije. U uslovima koji vladaju u živoj ćeliji razlika između promene Gibsove energije i promena entalpije bioprocesa je mala.

Gibsova energija ima sledeće osobine:

- u spontanijh izolovanim procesima Gibsova energija se smanjuje, tj. $\Delta G < 0$;
- u ravnoteži nema promene Gibsove energije, a ona dostiže najmanju vrednost;

- smanjenje Gibsove energije sistema u reverzibilnim procesima jednako je maksimalnom radu koji sistem teorijski može da izvrši u odnosu na okolinu. U stvarnim procesima, koji su nepovratni, izvršeni rad je mnogo manji od teorijski maksimalnog rada;
- promena Gibsove energije pokazuje pravac odigravanja procesa, ali ne pruža nikakve informacije kada će dostići ravnotežno stanje;
- Gibsova energija je aditivna termodinamička veličina, pa njena vrednost ne zavisi od puta kojim se promena vrši između krajnjih stanja, već zavisi samo od početne i krajnje vrednosti;
- Gibsova energija ne može se meriti u apsolutnom smislu, već je samo njena promena merljiva.

Standardna promena Gibsove energija reakcije ΔG° može se izračunati iz standardnih promena Gibsovih energija nastajanja reaktanata i proizvoda:

$$\Delta G^\circ = \sum (\Delta G_f^\circ)_{p,j} - \sum (\Delta G_f^\circ)_{s,j} \quad (3.293)$$

Standardna promena Gibsove energije stvaranja jedinjenja ΔG_f° je, po definiciji, jednaka promeni Gibsove energije reakcije nastajanja jednog mola jedinjenja polazeći od sastavnih elemenata u njihovom standardnom stanju. Vrednost standardne Gibsove energije za elemente jednaka je nuli. Standardne promene Gibsove energije nastajanja različitih jedinjenja mogu se naći u odgovarajućim priručnicima.

Po konvenciji standardno stanje u biohemijskim sistemima definiše se za temperaturu 25 °C, pritisak 101,3 kPa i koncentracije reaktanata i proizvoda u rastvoru 1 mol/dm³. Izuzetak su vodonični joni i voda za koje se standardno stanje definiše koncentracijom 10⁻⁷ (pH = 7), odnosno 55,6 mol/dm³.

Promena Gibsove energije koja prati neku reakciju može se povezati sa konstantom ravnoteže te reakcije:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K_p \quad (3.294)$$

gde je: ΔG° – standardna promena Gibsove energije za reakciju, K_p – konstanta ravnoteže reakcije, R – gasna konstanta (=8,314 J/molK) i T – apsolutna temperatura.

Ovde se može uočiti sledeće:

1. Ako su koncentracije reaktanata i proizvoda jednake i iznose 1 mol/dm³, onda je:

$$\Delta G = \Delta G^\circ \quad (3.295)$$

2. U ravnoteži je $\Delta G = 0$, pa je:

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_p \quad (3.296)$$

Većina bioloških reakcija odigrava se u relativno razblaženim rastvorima, pa se koncentracija vode može smatrati konstantnom (približno 55,5 mol/dm³) i uključiti u konstantu ravnoteže reakcije.

3.6.3. Zakoni termodinamike primenjeni na bioprocese

Primena termodinamičkih zakona na procese koji se odigravaju u živim sistemima zasnovana je na činjenici da živi organizmi transformišu energiju, tj. pretvaraju jedan izvor energije, na primer, energiju zračenja u fotosintetskim procesima ili hemijsku energiju u fermentacionim ili respiracionim procesima, u drugi izvor energije. U ovom procesu se energija prenosi od oblika višeg kvaliteta, tj. niže entropije, do oblika nižeg kvaliteta, tj. više entropije. Saglasno prvom zakonu termodinamike, transformacija energije koja se odigrava u sistemu ne utiče na ukupnu količinu energije sistema, koji čine ćelije mikoorganizama i okolina.

U makro pristupu, promena energije ćelije (koja je, kao ekstenzivna veličina, aditivna u odnosu na delove sistema) sa vremenom posmatra se kroz bilansnu jednačinu. Brzina promene unutrašnje energije ćelije ΔU , na primer, jednaka je zbiru brzine kojom se energija oslobađa u procesima koji se odigravaju u ćeliji P_U i brzine kojom se energija razmenjuje sa okolinom F_U tj.

$$\frac{d(\Delta U)}{dt} = \Pi_U + \Phi_U \quad (3.297)$$

Pošto mikrobne ćelije razmenjuju sa okolinom toplotu metaboličkih reakcija Q_F i jedinjenja koja poseduju hemijsku energiju jednaku $\sum h_i \Phi_i$, onda je:

$$\Phi_U = Q_F + \sum h_i \Phi_i \quad (3.297)$$

gde je: h_i – parcijalna molarna entalpija i -te komponente hranljive podloge i F_i – molski protok entalpije prema ili od ćelija (protok je pozitivan ako je usmeren ka ćelijama).

U stacionarnim uslovima, energija koja se razmenjuje između ćelija i okoline je u ravnoteži sa energijom koja se oslobađa u ćelijama, tj. $F_U = 0$, tako da je:

$$Q_F = -\sum h_i \Phi_i \quad (3.299)$$

Ovo sledi iz činjenice da je u stacionarnom stanju brzina promene unutrašnje energije jednaka nuli i da se, saglasno prvom zakonu termodinamike, ukupna energija zatvorenog sistema ne menja zbog transformacionih procesa, pa je $P_U = 0$.

Promena entropije ćelija posledica je porasta entropije u ćelijama i razmene entropije između ćelija i okoline, pa je:

$$\frac{(\Delta S)}{dt} = \Pi_S + \Phi_S \quad (3.300)$$

gde je: P_S – brzina porasta entropije u ćelijama i F_S – brzina razmene entropije između ćelije i okoline.

Brzina promene entropije između ćelije i okoline zavisi od brzine promene entalpije metaboličkih reakcija u ćelijama i brzine transporta jedinjenja ka ili od ćelija, tj.

$$\Phi_s = \frac{Q_F}{T} + \sum_i s_i \Phi_i \quad (3.301)$$

gde je: s_i – parcijalna molarna entropija i -te komponente hranljive podloge i T – apsolutna temperatura.

U stacionarnom stanju je brzina promene entropije ćelije jednaka nuli, pa je:

$$P_s = F_s \quad (3.302)$$

Prema drugom zakonu termodinamike, za vreme odigravanja bioprocesa Π_s mora biti veće od nule i od Φ_s , pa protok entropije prema ćelijama mora biti negativan tj.

$$\Phi_s < 0 \quad (3.303)$$

Prema tome, iz drugog zakona termodinamike ($\Phi_s < 0$) ne proizilazi da se toplota mora transportovati od žive ćelije u okolinu (tj. negativno Q_F). Drugim rečima, bioprocesi u kojima se toplota uzima od okoline (endotermni procesi sa $Q_F > 0$) mogući su ako i dok promena entropije zbog transporta hemijskih jedinjenja čini ukupnu razmenu entropije negativnom.

Pošto, prema definiciji, parcijalna molarna Gibsova energija i -te komponente g_i zavisi od parcijalne molarne entalpije h_i i parcijalne molarne entropije s_i te komponente sledi:

$$g_i = h_i - Ts_i \quad (3.304)$$

onda proizilazi da je ukupna promena Gibsove energije rezultat promena entalpije i entropije kojima doprinose sva jedinjenja:

$$\sum_i g_i \Phi_i = \sum_i h_i \Phi_i - T \sum_i s_i \Phi_i \quad (3.305)$$

Ako se jednačina (3.305) podeli sa T dobija se:

$$-\frac{\sum_i g_i \Phi_i}{T} = -\frac{\sum_i h_i \Phi_i}{T} + \sum_i s_i \Phi_i \quad (3.306)$$

Pošto brojilac prvog člana desne strane jednačine (3.306) predstavlja razmenjenu toplotu između ćelije i okoline, onda je:

$$\Phi_s = -\frac{\sum_i g_i \Phi_i}{T} < 0 \quad (3.307)$$

Ovo praktično znači da je, na osnovu prvog i drugog zakona termodinamike, razmena hemijskih jedinjenja između žive ćelije kao stacionarnog sistema i okolne hranljive podloge ograničena uslovom da je promena Gibsove energije pozitivna:

$$\sum_i g_i \Phi_i > 0 \quad (3.308)$$

Ovaj uslov važi za sve sisteme u kojima se nalaze mikrobne ćelije.

Stanje u živim mikrobnim ćelijama je vrlo blizu stacionarnim uslovima. Biohemijske reakcije se odvijaju što je moguće bliže ravnotežnom stanju, tako da je Gibsova energija na maksimumu i u stacionarnom stanju, jer se utrošeni reaktanti nadoknađuju transportom iz okoline, a proizvodi se neprekidno izdvajaju iz ćelija. Važna posledica je da se neka jedinjenja, kao, na primer ATP, čija je neto razmena između ćelije i okoline u normalnim uslovima jednaka nuli ($\Phi_i = 0$) ne razmatraju pri postavljanju bilansa, izuzev u detaljnoj termodinamičkoj analizi različitih metaboličkih puteva.

Jednačina (3.309) je značajna za definisanje termodinamičke efikasnosti bioprocasa, koja predstavlja odnos između promene Gibsove energije jedinjenja koja napuštaju sistem (ΔG_2) i promene Gibsove energije jedinjenja koja ulaze u njega (ΔG_1):

$$\eta = \frac{\Delta G_2}{\Delta G_1} \quad (3.309)$$

Promena Gibsove energije posmatra se u odnosu na izabrano referentno stanje. Pogodna referentna vrednost je energija smeše CO_2 , H_2O , N_2 i O_2 , pošto mikroorganizmi iz nje ne mogu da dobiju korisnu energiju. Gibsova energija hemijskog jedinjenja u odnosu na ovu referentnu vrednost jednaka je promeni entalpije reakcije sagorevanja tog jedinjenja do CO_2 , H_2O i N_2 . Maksimalna termodinamička efikasnost mikrobnog rasta je oko 65%.

3.6.4. Step en redukcije

Energetske transformacije u biološkim sistemima se obično razmatraju preko tzv. *stepena redukcije* koji predstavlja broj molova raspoloživih elektrona po C-molu. Broj raspoloživih elektrona je u odnosu na ugljenik +4, vodonik +1, kiseonik -2 i azot -3. Za jedinjenja formule $\text{CH}_b\text{O}_c\text{N}_d$ stepen redukcije je:

$$\gamma = 4 + 1(b) - 2(c) - 3(d) \quad (3.310)$$

Jasno je da je stepen redukcije CO_2 , H_2O i NH_3 jednak nuli.

3.6.5. Izračunavanje toplote bioprocasa

Stvaranje toplote u toku bioprocasa je od velikog praktičnog značaja jer može kritično uticati na produktivnost procesa koji se odvijaju u bioreaktoru čiji je kapacitet za hlađenje ograničen. U slučaju aerobnog rasta postoji striktna proporcionalnost između potrošnje kiseonika i stvaranja toplote. Potrošnja kiseonika se može izračunati na bazi stehiometrijske jednačine sinteze biomase. Toplota stvorena za vreme fermentacije može se izračunati na osnovu eksperimentalnog rezultata:

$$r_H = 3,3q_{\text{O}_2} \quad (3.311)$$

gde je: r_H – brzina oslobađanja toplote (u W/dm^3) i q_{O_2} – brzina potrošnje kiseonika (u $\text{mgO}_2/\text{dm}^3\text{h}$). Jednačina (3.311) je potvrđena u slučaju dve bakterije, jednog kvasca i jedne plesni.

Mnogo manje se zna o stvaranju toplote pri anaerobnom rastu. Radi poređenja navode se podaci o stvaranju toplote od 334 kJ/C-mol biomase u aerobnim uslovima i 90 kJ/C-mol biomase u anaerobnim uslovima rasta *Saccharomyces cerevisiae*. Dakle, aerobni rast je praćen manjim izdvajanjem toplote nego aerobni rast, čak i kada se stvorena toplota izrazi po jedinici biomase. Očekuje se da ovaj zaključak generalno važi. Stehiometrijska jednačina omogućava da se proceni toplotni efekat bioprocesa. U saglasnosti sa Hesovim zakonom toplotni efekat ΔH_F fermentacije se može izračunati pomoću sledeće jednačine:

$$\Delta H_F = \sum_i (v\Delta H_c)_{s,i} - (\Delta H_c)X - \sum_j (v\Delta H_c)_{p,j} \quad (3.312)$$

gde je: (ΔH_c) – promena entalpije reakcije sagorevanja supstrata, suve biomase i proizvoda i $v_{s,i}$ i $v_{p,j}$ – stehiometrijski koeficijenti i -tog supstrata i j -tog proizvoda.

U odsustvu eksperimentalnih podataka, promena entalpije sagorevanja biomase, kao i drugih organskih jedinjenja, može se izračunati na bazi stepena redukcije. Približna vrednost standardne promene entalpije sagorevanja suve biomase $(\Delta H_c^0)_X$ direktno je proporcionalna stepenu redukcije biomase γ_X , koji je definisan jednačinom (3.310):

$$(\Delta H_c^0)_X = 115 \cdot \gamma_X \pm 18 \text{ kJ/Cmol} \quad (3.313)$$

Za približne proračune moguće je sa dovoljno tačnosti za $(\Delta H_c^0)_X$ koristiti vrednosti -20,4 kJ/g suve biomase u slučaju bakterija i -21,0 kJ/g suve biomase u slučaju kvasaca. Vrednosti standardne promene entalpije sagorevanja mogu se naći u inženjerskim priručnicima.

Izračunavanje toplote bioprocesa pomoću promene entalpije nastajanja. Drugi način za izračunavanje toplotnog efekta fermentacije je pomoću toplota nastajanja učesnika bioprocesa: supstrata, proizvoda i suve biomase:

$$\Delta H_F^0 = \sum_j (v\Delta H_f^0)_{p,j} + (\Delta H_f^0)_X - \sum_i (v\Delta H_f^0)_{s,i} \quad (3.314)$$

gde su: $(\Delta H_f^0)_s$, $(\Delta H_f^0)_X$ i $(\Delta H_f^0)_p$ – standardne promene entalpije nastajanja supstrata, biomase i proizvoda.

Obično se za ovu svrhu koriste vrednosti standardnih promena entalpije nastajanja jedinjenja koja se mogu naći u termodinamičkim tablicama. Za približne proračune može se uzeti da standardna toplota nastajanja bakterija i kvasaca iznosi -2,72 do -2,76 kJ/g suve biomase. Standardne promene entalpije nastajanja supstrata i proizvoda mogu se naći u hemijsko-inženjerskim priručnicima, a mogu se i izračunati pomoću odgovarajućih metoda za približno izračunavanje.

4. BIOREAKTORI

Bioreaktor je uređaj u kome se obavlja konverzija (transformacija) sirovina (supstrata) u željene proizvode pomoću biokatalizatora. U biotehnološkim procesima bioreaktori su srce procesa. Svi bioreaktori od industrijskog značaja su heterogeni sistemi koji uključuju najmanje dve, a obično više faza, zbog čega je međufazni prenos količine kretanja, toplote i mase od presudnog uticaja na ispunjavanje osnovnih zadataka bioreaktora u biotehnološkom procesu.

Zavisno od vrste biokatalizatora, bioreaktori se mogu podeliti u više grupa, kao, na primer, na:

- bioreaktore za mikrobiološke procese u kojima se transformacije supstrata obavljaju pomoću živih ćelija mikroorganizama,
- bioreaktore za bioprocese sa biljnim i animalnim ćelijama i kulturom tkiva i ograna i
- bioreaktore za enzimске procese u kojima se transformacije supstrata obavljaju pomoću enzima.

Žive ćelije mikroorganizama, kao i biljne i animalne ćelije, tkiva i organi, teže neprekidno da promenom uslova okoline postignu i održavaju optimalne uslove za svoj rast. Ova prirodna tendencija živih ćelija, tkiva i organa se potpomaže u bioreaktoru, da bi se ubrzalo i uvećalo nastajanje željenog proizvoda (biomasa ili metabolit) ili izvršila biotransformacija supstrata. Glavni zadatak bioreaktora je da osigura snabdevanje živih ćelija, tkiva i organa neophodnim supstratima i optimalne procesne uslove (temperatura, pH, mešanje, aeracija) za rast i produkciju metabolita. U slučaju bioreaktora za mikrobiološke procese često se u praksi koristi naziv fermentori, a za proces – fermentacija

Transformacija supstrata u enzimskim reaktorima vrši se enzimima, bez prisustva živih ćelija mikroorganizma. Zadatak enzimskog bioreaktora je da obezbedi optimalne procesne uslove za aktivnost i stabilnost enzima.

Dalja podela bioreaktora moguća je prema različitim kriterijumima, i to:

- prema načinu organizacije rada,
- prema načinu gajenja proizvodnog organizma,
- prema obliku biokatalizatora i
- prema potrebi za prisustvo kiseonika u toku procesa itd.

Tako, prema režimu rada, biorektore je moguće podeliti na:

- diskontinualne (šaržne),
- kontinualne (protočne) i
- semikontinualne (polušaržne ili poluprotočne).

Najveću praktičnu primenu imaju šaržni bioreaktori, mada primena druga dva tipa bioreaktora postaje šira iz dana u dan.

Prema načinu gajenja proizvodnog organizma, bioreaktori se mogu podeliti na:

- dubinske (submerzne),
- površinske (emerzne) i
- bioreaktore sa čvrstom ili polutečnom hranljivom podlogom.

Biokatalizator može biti slobodno suspendovan u tečnom medijumu ili imobilisan na čvrstom nosaču. Prema obliku biokatalizatora, bioreaktori se mogu podeliti na:

- bioreaktore sa slobodno suspendovanim biokatalizatorom i
- bioreaktore sa imobilisanim biokatalizatorom.

Prema prisustvu ili odsustvu kiseonika u toku bioprocasa, bioreaktori se dele na:

- bioreaktore za aerobne procese i
- bioreaktore za anaerobne procese.

Ovi bioreaktori se razlikuju međusobno po tome što prvi mora da obezbedi kontinualno snabdevanje kiseonikom, stvaranjem uslova za efikasno rastvaranje kiseonika iz vazduha u tečnom medijumu, dok drugi mora da spreči prisustvo kiseonika.

4.1. BIOREAKTORI ZA IZVOĐENJE MIKROBIOLOŠKIH PROCESA

4.1.1. *Bioreaktori za submerzno gajenje mikroorganizama*

Osnovna karakteristika ovog tipa bioreaktora je formiranje i održavanje međufazne površine gas-tečnost dispergovanjem gasa (vazduha) u tečnosti pomoću spoljašnje energije. Prema vrsti spoljašnje energije pomoću koje se obavlja mešanje i dispergovanje gasa, ova vrsta bioreaktora se može podeliti u tri glavne grupe (slika 4.1):

- bioreaktore sa mehaničkim mešanjem,
- bioreaktori sa prinudnom cirkulacijom i mešanjem tečnosti pomoću pumpe i
- bioreaktori sa mešanjem aeracijom (produvanjem vazduha).

Prema konstrukciji bioreaktori za submerzno gajenje se mogu podeliti u dve grupe, i to na:

- bioreaktore bez petlje i
- bioreaktore sa petljom (unutrašnjom ili spoljašnom).

Ako je odnos visine i prečnika bioreaktora manji od 3, govori se o sudu, a ako je ovaj odnos veći od 3, onda se radi o koloni.

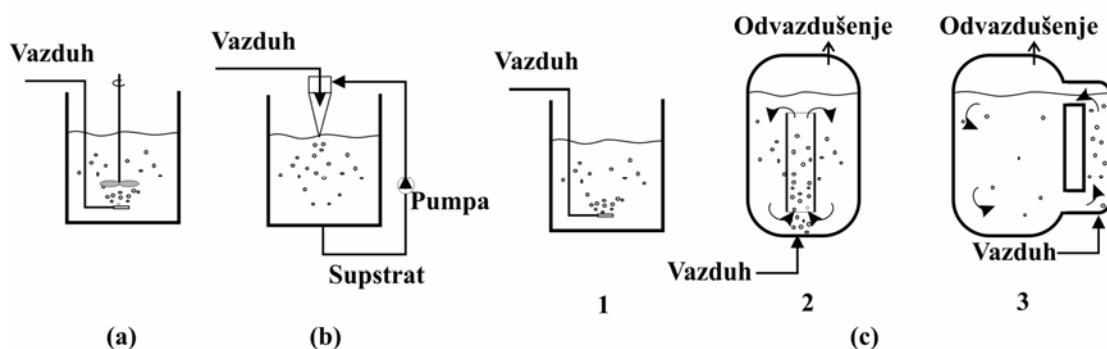
Bioreaktori sa mehaničkim mešanjem

1) Sudovi na mućkalici

Od prvog korišćenja 1933. godine, sudovi na mućkalici su verovatno, najrašireniji tip bioreaktora za gajenje mikrobioloških, biljnih i animalnih ćelija. Osnovna prednost ovog tipa bioreaktora je u mogućnosti izvođenja velikog broja eksperimenata u gotovo identičnim uslovima na

relativno jednostavan i jeftin način, što je od posebnog značaja za primarni "screening", tj. selekciju soja, optimizaciju hranjive podloge, ocenu produktivnosti soja i sl. Najveća mana sudova na mućkalici je ograničena i mala zapremina, što otežava praćenje promena parametara bioprocesa. Takođe, prisutne su teškoće vezane za: prenos kiseonika u slučaju striktno aerobnih mikroorganizama, dodavanje supstrata prihranjivanje i održavanje pH u toku gajenja.

Kao bioreaktorski sudovi koriste se epruvete, boce i sudovi za gajenje mikroorganizama u tečnoj hranljivoj podlozi, različitog oblika i veličine. Epruvete se koriste kada je zapremina hranjive podloge veoma mala, i to uglavnom za preliminarnu identifikaciju mikroorganizama, klijanje spora za kasnije gajenje mikroorganizama i sl. Gajenje mikroorganizama u većim zapreminama obavlja se najčešće u standardnim tikvicama po Erlenmjeru, mada se mogu koristiti i drugi sudovi. Ukupna zapremina suda je obično 100 do 1000 cm³, a najčešće 500 cm³. Sudovi većih zapremina se koriste izuzetno, kada je potrebno u toku gajenja u kratkim vremenskim intervalima uzimati veće uzorke ili kada nedostaje laboratorijski bioreaktor. U cilju povećanja aeracionog kapaciteta u bioreaktorske sudove se ugrađuju odbojnici različitog oblika. Odbojnici mogu uzrokovati penušanje zbog intenzivnog mešanja, a nastala pena na površini tečnosti izaziva smanjenje brzine prenosa gasova kroz graničnu površinu.



Slika 4.1 Tri tipa bioreaktora: a) sa mehaničkim mešanjem, b) sa cirkulacijom supstrata i c) sa mešanjem aeracijom (produvavanjem vazduha) : 1. barbotажna kolona, 2. air-lift sa unutrašnjom petljom i 3. air-lift sa spoljašnjom petljom

Sudovi su, po pravilu, stakleni zbog niza prednosti, kao što su: niska cena, mogućnost posmatranja rasta mikroorganizma i mešanja tečnosti, jednostavna sterilizacija i pranje, kao i otpornost na kiseline, alkalije i toplotu. Nedostaci staklenih sudova su: lomljivost, mikroorganizmi mogu rasti na zidovima suda i troškovi radne snage angažovane za pranje. U nekim slučajevima, na primer, kada se ispituje uticaj materijala suda na tok fermentacije, koriste se i sudovi od metala (čelik, aluminijum). Uprkos određenim pozitivnim osobinama (niska cena omogućuje jednokratnu upotrebu, potpuna inertnost, ne inhibiraju rast, ne utiču na pH fermentacione tečnosti, nema rasta na zidovima zbog hidrofobnosti), plastični sudovi se još uvek komercijalno ne proizvode.

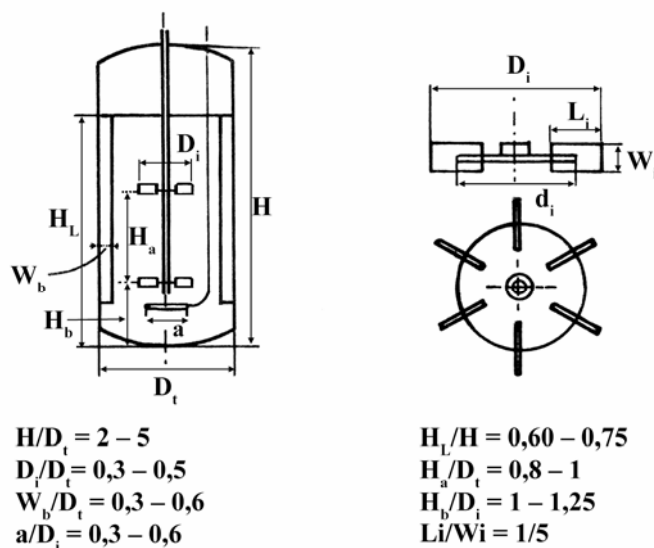
U cilju obezbeđivanja sterilnih uslova sudovi su zatvoreni sa zaptivačem, obično od pamuka (vata), koji ima uticaja na razmenu mase između suda i okolnog vazduha. Koriste se, takođe, filter diskovi i metalni zatvarači.

Sud, obično standardna tikvica po Erlenmajeru, učvršćuje se na pogodan način na mućkalici. Koriste se mućkalice sa recipročnim i rotacionim kretanjem. Osnovna razlika između ova dva tipa mućkalica je u modelu mešanja tečnosti koje se uspostavlja u sudu učvršćenom na mućkalici. Mešanje tečnosti u sudu na recipročnoj mućkalici je nepredvidljivo i često pri većim intenzitetima mućkanja vodi zapljuskivanju, koje može ovlažiti zapušač. Kretanje tečnosti u sudu na rotacionoj mućkalici je uniformno, rotaciono kretanje koje, pri većim brzinama obrtanja, stvara duboki vrtlog ("vortex"). Iako se recipročne mućkalice odlikuju jednostavnijom konstrukcijom i nižom cenom, prednost se daje rotacionim mućkalicama zbog ravnomernog strujanja. Mućkalica mora da bude tiha, pouzdana i bez drugih problema (vibracije) u toku rada u dužem vremenskom periodu, da ima mogućnost promene brzine i/ili radijusa rotacionog kretanja i/ili frekvencije i amplitude recipročnog kretanja, da omogućuje jednostavnu i brzu zamenu platforme i držača sudova i da su troškovi rada niski.

Mućkalice se obično postavljaju u sobama ili kabinetima sa dobrom cirkulacijom vazduha u kojima se temperatura održava konstantnom..

2) Bioreaktori sa mehaničkim mešanjem i prinudnom aeracijom

U ovu grupu spadaju bioreaktori opremljeni sa mehaničkom mešalicom i distributerom za produvanje sterilnog vazduha. Najčešće korišćen tip je klasičan bioreaktor sa mehaničkom mešalicom (slika 4.2).

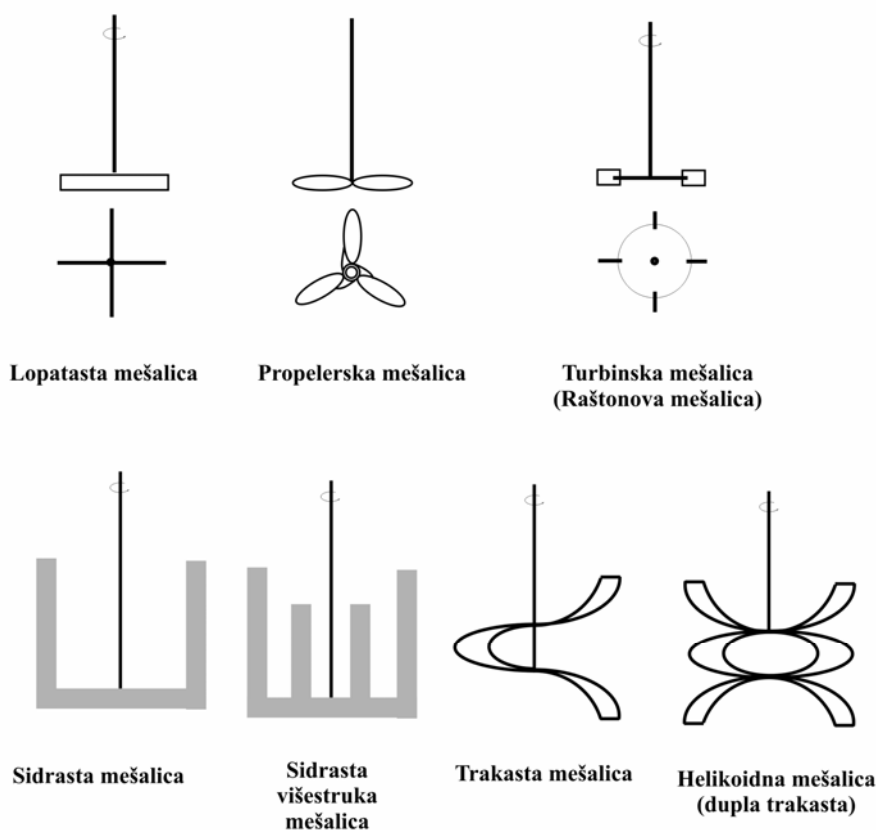


Slika 4.2 Klasični bioreaktor sa mehaničkim mešanjem

Sastoji se iz cilindričnog suda sa ravnim, eliptičnim ili polusfernim dnom i često sa 4 simetrično postavljena odbojnika; odnos visine prečnika suda je obično 1 : 3, a širina odbojnika je najčešće 10% od prečnika suda. Razmena toplote se vrši preko omotača i/ili zmijastog razmenjivača toplote. Mešanje se vrši različitim tipovima mešalica, zavisno od viskoziteta tečnosti (slika 4.3).

Zadaci mešanja u bioreaktorima su ostvarivanje:

- homogenog sastava tečnosti,
- uniformne suspenzije mikroorganizama,
- efikasnog suspendovanja čvrstih čestica,
- efikasnog dispergovanja gasa u cilju povećanja brzine prenosa mase kiseonika,
- efikasnog emulgovanja tečnosti koje se ne mešaju i
- zadovoljavajućeg prenosa toplote.



Slika 4.3 Mešalice koje se najčešće koriste u bioreaktorima

Za mešanje tečnosti malog viskoziteta koriste se propelerska mešalica, lopatasta mešalica sa kosim lopaticama i turbinska mešalica sa ravnim lopaticama. Prva dva tipa formiraju aksijalno strujanje, a treći tip radijalno strujanje. Za mešanje tečnosti srednjeg viskoziteta preporučuju se lopataste mešalice, koje formiraju tangencijalno i radijalno strujanje. U slučaju jako viskoznih tečnosti koriste se spiralna (formira aksijalno strujanje) i sidrasta mešalica (formira tangencijalno strujanje).

Klasičan bioreaktor sa mehaničkom mešalicom se pokazao nepogodnim za neke bioprocese zbog neodgovarajućih tehničkih karakteristika i/ili neprofitabilnosti, kao i potrebnih specifičnih uslova. Najznačajniji razlozi za razvoj i upotrebu novih tipova bioreaktora dati su u tabeli 4.1. Ovi, novo razvijeni ili usavršeni postojeći bioreaktori imaju tehničke i ekonomske prednosti u odnosu na klasičan bioreaktor sa mešalicom. Tako, na primer, u sastavu postrojenja za proizvodnju proteina jednoćelijskih organizama kompanije ICI u Billingham-u nalazi se bioreaktor ukupne zapremine 2.300 m^3 (kolona prečnika 7 m i visine 60 m), odnosno radne zapremine 1.560 m^3 , sa ukupnom potrošnjom snage 7 MW. Tipičan primer je i postrojenje za obradu otpadnih voda, koje je Bayer AG izgradio u Leverkusenu, koje ima ukupnu zapreminu oko 20.000 m^3 (bioreaktor prečnika 26 m i visine 30 m). Upotreba klasičnih mešalica u bioreaktorima takvih zapremina nije tehnički izvodljiva.

Tabela 4.1 Najvažniji razlozi razvoja novih bioreaktora

1.	Konstrukcija bioreaktora vrlo velike zapremine:
o	Problemi projektovanja
o	Velika snaga mešanja ($P/V = \text{const.}$)
o	Veliki troškovi energije i rashladne vode
o	Problemi odvođenja toplote
2.	Smanjenje specifičnih fiksnih troškova
3.	Smanjenje specifičnih troškova energije
4.	Izbegavanje oštećenja ćelija
5.	Smanjenje gubitka supstrata (usled isparavanja i respiracije)
6.	Povećanje stepena konverzije supstrata

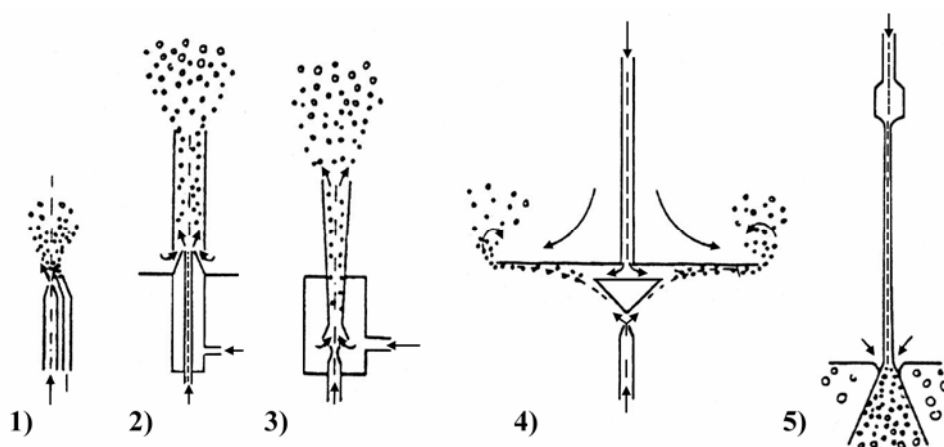
3) Bioreaktori sa cirkulacijom tečnosti pomoću pumpe

Hranljiva podloga stalno cirkuliše kroz bioreaktor pomoću spoljašnje pumpe. Dispergovanje gasa se može izvršiti na više načina, i to:

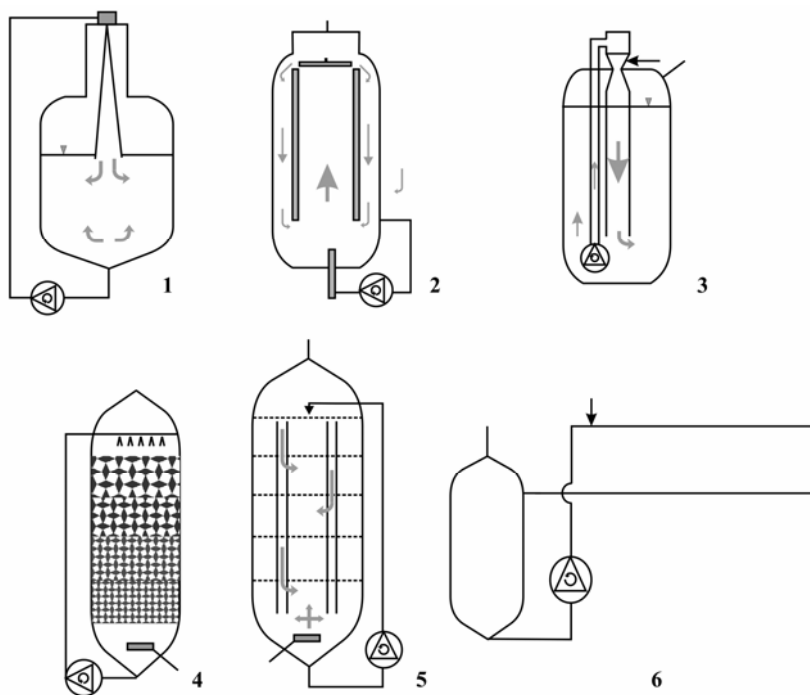
- pomoću dvofazne mlaznice,
- pomoću mlaza i
- kombinacijom pumpe i kompresora.

U slučaju dvofazne mlaznice gas se usisava i disperguje pomoću mlaza tečnosti sa brzinom strujanja 5 do 100 m/s. Koriste se ejektorske mlaznice, injektorske mlaznice i mlaznice sa radialnim strujanjem (slika 4.4). U drugom slučaju gas se disperguje pomoću mlaza tečnosti koji (brzinom 8–12 m/s) izlazi iz mlaznice ili proreza i udara normalno na površinu tečnosti, rasprskavajući se o površinu i prodirući u masu tečnosti; mlaz je opkoljen gasnim omotačem, koji se postepeno disperguje u sitne gasne mehurove koji se kreću naniže i bočno, stvarajući "roj" mehurova.

Tipični bioreaktori iz ove grupe su kolone sa udarnim mlazom, kolone sa mlazom u centralnoj ili spoljnoj petlji, kolone sa punjenjem i cirkulacijom, barbotажne kolone sa podovima i cirkulacijom i kolone sa nepokretnim punjenjem (slika 4.5).



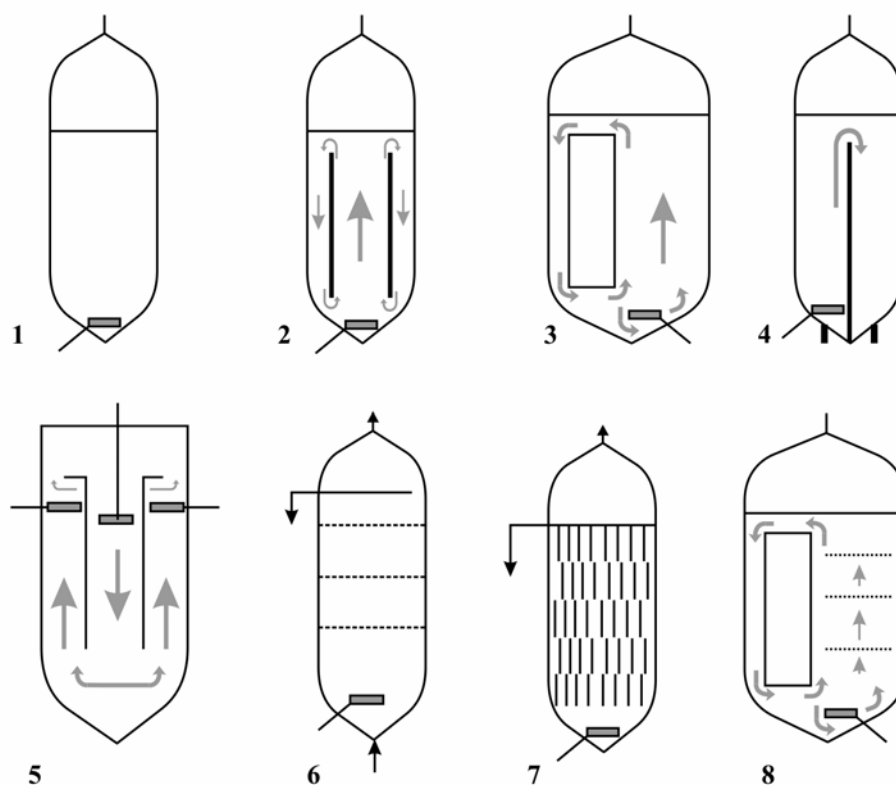
Slika 4.4 Shematski prikaz dvofaznih mlaznica: 1) mlaznica sa slobodnim mlazom, 2) ejektorska mlaznica, 3) injektorska mlaznica, 4) mlaznica sa radijalnim strujanjem i 5) udarni mlaz



Slika 4.5 Tipični bioreaktori sa cirkulacijom tečnosti pomoću pumpe: 1) sa udarnim mlazom, 2) sa mlazom u centralnoj cevi, 3) sa mlaznicom u spoljnoj petlji, 4) sa punjenjem i cirkulacijom, 5) sa podovima i cirkulacijom i 6) cevni reaktor sa cirkulacijom i separatorom

4) Bioreaktori sa mešanjem i aeracijom

Ovoj grupi pripadaju svi bioreaktori kod kojih se komprimovani vazduh uduvava kroz statički distributor (mlaznica, perforirani prsten, perforirana ploča, sinterovana ploča itd.) postavljenim blizu dna bioreaktora. Formirani mehurovi se kreću naviše kroz tečnost pod dejstvom pritiska i napuštaju disperziju na slobodnoj površini. Tipični predstavnici ove grupe bioreaktora su prikazani na slici 4.6.



Slika 4.6 Bioreaktori sa mešanjem sa vazduhom: 1) barbotazna kolona, 2) barbotazna kolona sa cirkulacijom tečnosti ("air-lift" loop), sa centralnom cevima, 3) barbotazna kolona sa spoljnom cirkulacijom, 4) sa vertikalnom pregradom, 5) sa centralnom cevima sa strujanjem naniže ("deep shaft"), 6) barbotazna kolona sa perforiranim podovima, 7) barbotazna kolona sa statičkim mešačima i 8) barbotazna kolona sa perforiranim podovima i sa spoljnom petljom sa statičkim mešačima i pneumatskom pulzacijom tečnosti

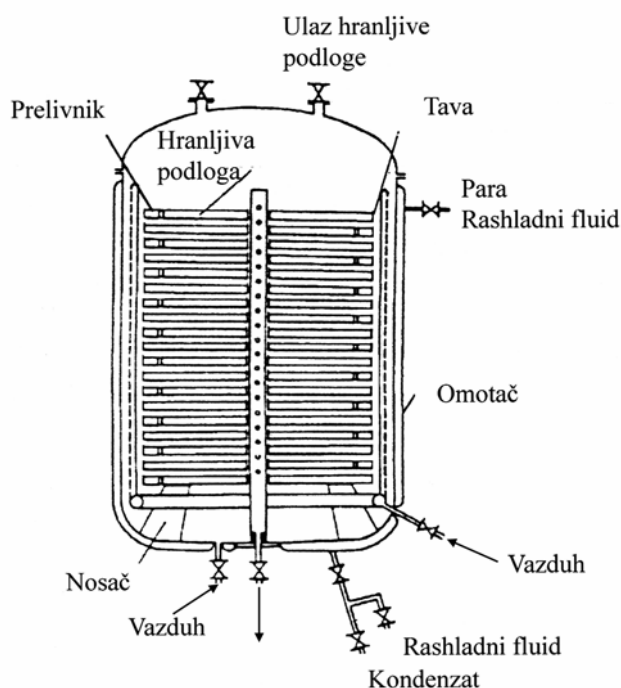
4.1.2. Površinski bioreaktori

Kod površinskih bioreaktora mikroorganizmi se nalaze na površini tečne hranljive podloge ili kontinualno ovlaženoj čvrstoj površini. Snabdevanje kiseonikom je iz okolnog vazduha, bez ili sa minimalnim ulaganjem spoljašnje energije za obnavljanje međufazne površine. Ovo bi mogao biti ozbiljan razlog za obnovljeno interesovanje za površinske bioreaktore u budućnosti. Tipični predstavnici ove grupe bioreaktora dati su u tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Površinski bioreaktori

<i>Bioreaktor</i>	<i>Proces</i>
Sa čvrstom podlogom	Gajenje viših fungi (gljive)
Sa fluidizovanim slojem	Fermentacija glukoze u alkohol u fluidizovanom sloju granula kvasca
Sa mešanim čvrstim slojem	Fermentacija komadića manioka pomoću <i>Saccharomyces</i> u pekarskoj mesilici; sadržaj suve materije oko 25–50%,
Sa tavama	Fermentacija limunske kiseline
Sa nepokretnim slojem	Obrada otpadaka
Filmski	Obrada otpadnih voda
Sa obnavljanjem površine	Obrada otpadnih voda

Bioreaktori sa plitkim tavama. Rast mikroorganizama na čvrstom ili polučvrstom supstratu kontrolisan je brzinom difuzije u čvrstoj fazi. Ovaj problem se prevazilazi upotrebom bioreaktora sa plitkim tavama sa tečnom hranljivom podlogom u slučajevima kada proizvodni mikroorganizam (na primer, plesni) može da "pliva" na slobodnoj površini tečnosti. Na površini se formira micelijski prekrivač ispod koga se tečna hranljiva podloga može menjati više puta kada se supstrat iscrpi. Na slici 4.7 prikazan je bioreaktor sa tavama. Plitke tave su postavljene jedna iznad druge u sudu koji se može sterilisati i sa mogućnošću regulacije temperature. Punjenje tava (prelivanjem od vrha prema dnu), sterilizacija i inokulacija obavljaju se automatski. Prenos mase se može menjati u uskim granicama, kontrolom sastava gasnog prostora.



Slika 4.7 Bioreaktor sa plitkim tavama

Bioreaktor sa nepokretnim slojem. Bioreaktor je tipa kolone sa punjenjem preko koga se hranljiva podloga ravnomerno prelijeva, dok se sterilni vazduh uduvava pri dnu. Pad pritiska u bioreaktoru je obično zanemarljiv. Mikroorganizmi se talože kao "biološki film" na površini punjenja.

Bioreaktori sa obnavljanjem kontaktne površine. Ovde spadaju svi bioreaktori kod koji se snabdevanje mikroorganizama sa supstratom i kiseonikom ostvaruje pravilnim ponavljanjem uranjanja površine prekrivene mikrobiološkom kulturom u tečnu hranljivu podlogu i prolazom ovlažene površine kroz gasni prostor. Najprostiji oblik je horizontalni, rotirajući bubanj uronjen 30–50% u tečnu hranljivu podlogu, koji se naziva "**biodisk**".

4.1.3. Bioreaktori sa čvrstom i polučvrstom hranljivom podlogom

Čvrste hranljive podloge se koriste uglavnom u laboratoriji u istraživačke svrhe i za održavanje sojeva. Za industrijske bioprocese ranije su se koristili, jednostavni, dok se u novije vreme koriste složeniji bioreaktori. Najjednostavniji je proces u gomili supstrata rasprostrtog po ravnoj površini ili plitkim tavama ili bazenima na otvorenom ili u zatvorenom prostoru. Odlikuju se malim investicionim i pogonskim troškovima i lošom kontrolom procesa. Složeniji uređaji sastoje se od većeg broja plitkih tava postavljenih u vertikalnom nizu. Za procese sa čvrstim ili polučvrstim supstratima mogu se koristiti i bazeni sa perforiranim dnom i recirkulacijom kondicioniranog vazduha (za snabdevanje kiseonikom i održavanje optimalne temperature), rotirajući bubnjevi i sudovi sa mehaničkim mešanjem.

4.1.4. Bioreaktor sa imobilisanim ćelijama

Pored toga što se mikroorganizmi mogu koristiti u suspendovanom obliku u tečnoj hranljivoj podlozi, oni se mogu koristiti imobilisani na nosaču. U ovom slučaju se mikroorganizmi praktično koriste kao čvrsti katalizatori. Dobijanje L-asparaginske kiseline iz amonijumfumarata pomoću

imobilizovane *Escherichia coli* sa jakom aktivnošću aspartaze je prvi industrijski postupak u kome su korišćene imobilisane ćelije jednog mikroorganizma (1973. godine).

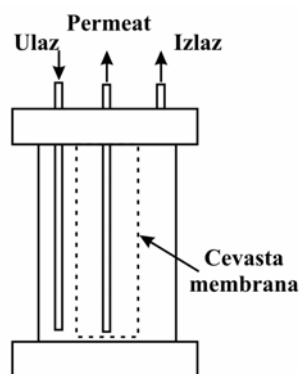
Kao bioreaktori sa imobilizovanim ćelijama koriste se:

- bioreaktori sa nepokretnim slojem,
- bioreaktori sa fluidizovanim slojem,
- bioreaktori sa mešalicom i
- membranski bioreaktori.

Membranski bioreaktori spadaju u *hibridni tip reaktora*, kojima se predviđa velika ekspanzija u budućnosti. Ćelije su imobilisane na selektivno propustljivoj membrani na kojoj se odvija bioproces. Membrana je selektivno propustljiva za metabolit, tako da se paralelno sa biosintezom vrši njegovo odvajanje, zbog čega se postupak naziva *ekstraktivna biokonverzija*. Ova vrsta bioreaktora može se koristiti kod sinteze rastvornih metabolita.

Unutrašnja cev je porozna. Ako je napravljena od keramike, ona služi kao membrana ili nosač membrane na kojoj je, sa unutrašnje strane, fiksiran biokatalizator. Kroz unutrašnjost cevi se potiskuje hranljiva podloga. Unutrašnju cev okružuje spoljašnja cev.

Kroz omotač cevi, protivstrujno hranljivoj podlozi, potiskuje se rastvarač metabolita. Metabolit prolazi kroz membranu u omotač cevi, rastvara se u rastvaraču i u obliku rastvora izlazi iz bioreaktora. Kao rastvarači, odabiraju se supstance koje nisu toksične za biokatalizator i koje ne reaguju sa proizvodom. Korišćen tip membrane mora biti nepropustan za rastvarač. Osnovni tip ove vrste bioreaktora je „cev u cev” (slika 4.8).



Slika 4.8 Membranski reaktor cevastog oblika

4.2. BIOREAKTORI ZA IZVOĐENJE BIOPROCESA POMOĆU ANIMALNIH ĆELIJA, TKIVA I ORGANA

Veliki broj različitih tipova bioreaktora je primenjivan za gajenje animalnih ćelija na laboratorijskom nivou. Projektovanje svakog od ovih tipova bioreaktora, iako ima specifičnosti, zasniva se na istim principima. Hranljive komponente moraju biti dopremljene ćelijama, a proizvodi odvedeni potrebnim brzinama, čak i ako ćelije rastu u slojevima. Bioreaktor mora obezbediti homogenu okolnu sredinu u svim delovima sistema u pogledu pH, temperature i koncentracija svih hranljivih komponenti. Mešanje ne sme da bude prekomerno, da ne bi došlo do oštećenja osetljivih ćelija. Bioreaktor treba da je što je moguće jednostavniji po konstrukciji i što jeftiniji. Pošto se troš-

kovi bioreaktora povećavaju sa povećanjem njegove zapremine, površina na kojoj se »vezani« ili zapremina u kojoj su »uhvaćene« ćelije po jedinici zapremine bioreaktora treba da je što je moguće veća. Imajući u vidu sve postavljene zahteve, industrijski bioprocesi sa animalnim ćelijama izvode se, za sada, isključivo u bioreaktorima sa mehaničkim mešanjem.

Tip bioreaktora koji je pogodan za gajenje animalnih ćelija zavisi od njihovih karakteristika, a najviše od toga u kojoj meri je neophodan nosač za rast i vitalnost ćelija. Neke animalne ćelije mogu da rastu u suspenziji, kao pojedinačne ćelije, dok druge mogu rasti na površini čvrstog nosača. U prvom slučaju, animalne ćelije rastu kao slobodno suspendovane u tečnoj podlozi, pa se one mogu gajiti u bioreaktorima koji se uobičajeno koriste za submerzno gajenje mikroorganizama. U drugom slučaju, koriste se čvrsti nosači, na čijoj površini rastu animalne ćelije.

Principijelno, bioreaktorski sistemi za gajenje animalnih ćelija mogu se podeliti na: homogene ili heterogene.

Kod homogenih bioreaktorskih sistema animalne ćelije su ili slobodno suspendovane u tečnoj podlozi (*kulture suspendovanih ćelija*) ili su na površini i unutar pora mikročestica nosača, koje su suspendovane u tečnoj podlozi (*kulture suspendovanih mikronosača*). Suspenzija ćelija ili mikronosača održava se ravnomernim mehaničkim mešanjem. Ovo omogućava da u bioreaktoru nema gradijenata koncentracije hranljivih komponenti, kao i zona nepovoljnih uslova okoline. Pogodni tipovi bioreaktora su:

- bioreaktor sa mehaničkim mešanjem,
- bioreaktor tipa barbotажne kolone i
- air-lift bioreaktor.

Najvažniji uslov koji bioreaktor mora da ispuni je da se mešanjem i aerisanjem tečne podloge izbegne limitiranje rasta ćelija prenosom mase kiseonika. Poseban zahtev u slučaju gajenja ćelija na suspendovanim mikronosačima je umereno mešanje, da bi se izbeglo skidanje ćelija sa površine nosača delovanjem smicajnih sila.

Kod heterogenih bioreaktorskih sistema animalne ćelije su uhvaćene unutar ili imobilisane na površini biokompatibilnog materijala. U prvom slučaju, animalne ćelije su uhvaćene unutar mikrosfera, koje su jako porozne, pa se govori o makroporoznom mikronosaču. Hidrodinamički uslovi u bioreaktoru određuju prostornu raspodelu koncentracije hranljivih sastojaka. Pogodni tipovi bioreaktora su:

- bioreaktori sa fluidizovanim slojem poroznih mikro-nosača,
- keramički monoliti,
- bioreaktori sa šupljim vlaknima i dr.

Animalne ćelije se mogu gajiti u šaržnim, polušaržnim (ili poluprotočnim), ciklično – šaržnim i protočnim bioreaktorima.

Šaržne kulture se obično izvode sa slobodno suspendovanim ćelijama u bioreaktoru sa mehaničkim mešanjem, na sličan način kao i bioprocesi sa bakterijama ili kvascima. Hranljiva podloga se zasejava inokulumom gustine $0,5 \cdot 10^5$ do $2 \cdot 10^5$ ćelija/cm³. Proces traje jednu do dve nedelje pod kontrolisanim uslovima. Proizvod se izoluje iz tečnog medijuma na kraju procesa.

Kod poluprotočnog bioreaktora, hranljivi sastojci se dodaju kontinualno ili periodično tokom jednog ciklusa izvođenja procesa. Ova dva načina rada bioreaktora se najčešće primenjuju u biofarmaceutskoj industriji u poluindustrijskoj i industrijskoj proizvodnji.

Ciklično – šaržno gajenje animalnih ćelija izvodi se, takođe, u bioreaktoru sa mehaničkim mešanjem. Kao i u slučaju šaržnog gajenja, hranljiva podloga se zasejava i bioproces vodi do dostizanja stacionarne faze. Tada se veći deo tečne podloge (70 do 90%) izdvaja iz bioreaktora, a bioreaktor dopunjuje hranljivom podlogom. Broj ponovljenih šarži zavisi od stabilnosti brzine ekspresije i kvaliteta proizvoda u produkcionoj fazi. Ukupan bioproces obično traje oko nekoliko meseci.

Protočni bioreaktori su, po pravilu, manje zapremine i mogu da deluju sa većom gustinom ćelija (10 do 50 puta) nego šaržni bioreaktori, ali zahtevaju dodatnu opremu za kontrolisanje i održavanje kontinualnog rada, pripremu hranljive podloge i izdvajanje proizvoda. Ćelije se zadržavaju u bioreaktoru, a tečna podloga, bez ćelija, se izvodi iz njega. Ovaj način rada, poznat kao perfuziono gajenje, primenjuje se i kod homogenih i kod heterogenih bioreaktorskih sistema, kao što su perfuzioni hemostat i bioreaktori sa fluidizovanim slojem mikronosača ili sa šupljim vlaknima, respektivno. Kod perfuzionog hemostata, ćelije se izdvajaju iz tečne podloge filtracijom. Obično se koristi filtri sa tangencijalnim strujanjem, koji su postavljeni van bioreaktora, iako se primenjuju i »spin« filtri smešteni u bioreaktoru. Povratna struja hranljive podloge vraća deo ćelija u dovoljnoj gustini u bioreaktor, čime se održava stacionarni rad bioreaktorskog sistema. Kod heterogenih bioreaktorskih sistema, ćelije su imobilisane na površini ili »zarobljene« unutar biokompatibilnog materijala. Ovi bioreaktorski sistemi koriste povratnu struju tečne podloge, da bi obnovili koncentraciju rastvorenog kiseonika i drugih hranljivih komponenti.

4.2.1. Bioreaktori za submerzno gajenje animalnih ćelija

Koncentracija rastvorenog kiseonika u tečnoj podlozi ima glavni uticaj na metabolizam animalnih ćelija. Potreba za kiseonikom kod animalnih ćelija je oko 20 do 200 mg/dm³·h u kulturi sa koncentracijom manjom od 10⁷ ćelija/cm³ i manja je od potrebe mikroorganizama za kiseonikom. Značajan uticaj ima koncentracija rastvorenog kiseonika, pošto su animalne ćelije osetljive na ekstremne koncentracije. Niske koncentracije rastvorenog kiseonika utiču na sekreciju proteina i rast ćelija preko primarnog energetskeg metabolizma. Uticaj na rast se obično javlja kada je nivo rastvorenog kiseonika ispod 5 do 20% od zasićenja pri pritisku vazduha od 1 bar. Energetski metabolizam se menja ako je nivo rastvorenog kiseonika ispod 0,1% od zasićenja. Pravilno definisanje uslova aeracije tečne podloge podrazumeva navođenje vrednosti brzine potrošnje kiseonika i kritične koncentracije rastvorenog kiseonika. Zbog velike praktične važnosti, preporučuje se da se brzina potrošnje kiseonika i kritična koncentracija rastvorenog kiseonika mere pri tipičnim uslovima.

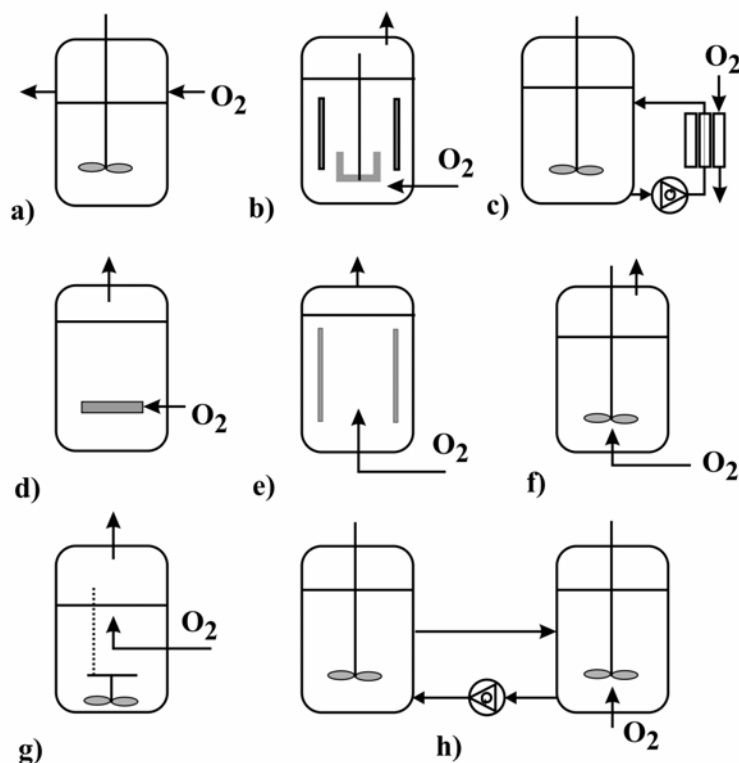
Kao i u slučaju aerobnih bioprocasa sa bakterijama i kvascima, kiseonik može postati limitirajuća hranljiva komponenta, zbog njegove male rastvorljivosti, nedovoljne brzine prenosa mase iz gasne u tečnu fazu i velike brzine potrošnje, naročito u slučaju veće koncentracije ćelija. Ovaj problem se rešava kontinualnim obezbeđivanjem rastvorenog kiseonika. Kod bioreaktora za gajenje animalnih ćelija, ovo se postiže na više načina:

- aeracijom kroz slobodnu površinu tečne podloge (površinskao aeracija),

- dovođenjem kiseonika preko polupropustljive membrane,
- aeracijom tečne podloge u bioreaktoru i
- zasićavanjem tečne podloge van bioreaktora, u posebnom kontaktnom uređaju.

Svaki od ovih načina kontinualnog obezbeđivanja rastvorenog kiseonika ima svoje prednosti i nedostatke. Slika 4. 9 ilustruje osnovne načine obezbeđivanja kiseonika u bioreaktorima za submerzno gajenje animalnih ćelija.

Površinska aeracija. Površinska aeracija je fenomen prenosa mase gasa kroz slobodnu površinu tečne podloge (slika 4.9a). Ona se odigrava kod većine bioreaktora za submerzno gajenje ćelija. Ovaj način aeracije je jedini oblik prenosa mase kiseonika u tečnu podlogu kod malih sudova, kao što su tikvice po Erlenmajeru, T-sudovi i obrtne boce. Brzina prenosa mase kiseonika zadovoljava potrebe animalnih ćelija u šaržnim bioreaktorima male zapremine i pri malim koncentracijama ćelija. Najveća zapremina bioreaktora koja se može uspešno aerisati kroz slobodnu površinu je 10 do 100 dm³.



Slika 4.9 Metodi kontinualnog obezbeđivanja rastvorenog kiseonika:

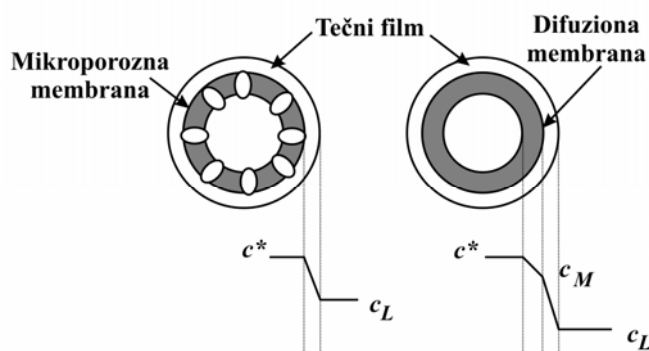
- a) površinska aeracija, b i c) aeracija kroz propustljivu membranu u bioreaktoru i van bioreaktora, d, e i f) direktna aeracija u barbotажnoj koloni, air-lift bioreaktoru i sudu sa mešalicom, g) indirektna aeracija u sudu sa mešalicom i h) aeracija u posebnom kontaktnom uređaju

Aeracija kroz membranu. Kod aeracije kroz membranu propustljivu za kiseonik izbegava se oštećenje ćelija mehurima vazduha i disipacijom energije mešanja, koje se dešava pri direktnoj aeraciji tečne podloge u bioreaktoru. Membrane su u obliku šupljih vlakana ili cevi i mogu biti smeštene u bioreaktoru (slika 4.9b) ili van njega (slika 4.9c).

Membrane su mikroporozne (od polipropilena ili politetrafluoroetilena) ili difuzione (od polidimetilsiloksana, tj. silikona, slika 4.10). Kod mikroporoznih hidrofobnih membrana, granična površina gas-tečnost je stalna i odgovara ukupnoj površini pora. Kod difuzionih membrana, gas se rastvara u hidrofobnoj membrani, koja nema pore. Brzina prenosa mase je određena otporima membrane i difuzionog filma:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_L} + \frac{1}{k_M} \quad (4.1)$$

gde je: k – ukupni koeficijent prenosa mase, k_L – koeficijent prenosa mase sa strane tečnosti i k_M – koeficijent prenosa mase kroz membranu.



Slika 4.10 Struktura membrana za aerisanje i gradijenti koncentracije kiseonika

Polimerni materijali *mikroporoznih membrana* su slabo propustljivi za kiseonik, tako da se prenos mase odigrava samo kroz pore membrane. Pore obično ne pružaju značajan otpor prenosu mase, pa su ove membrane superiornije od drugog tipa, kada su ispunjene gasom. Pritisak potreban da se tečnost potisne iz pora je obično vrlo mali, reda veličine desetak mbar. Negativna strana ovih membrana je promena njihovih osobina u toku gajenja. Zbog taloženja proteina i delova ćelija, zidovi pora mogu postati hidrofilni i popuniti tečnom podlogom. Rizik od ovog problema se povećava sa smanjivanjem prečnika pora i pri dugotrajnom gajenju. Primena mikroporoznih membrana se preporučuje kada gajenje traje kratko i u spoljnoj petlji, koja osigurava zamenu ovlaženih membrana.

Kao *difuzione membrane* koriste se silikonska creva i cevne membrane prekrivene silikonom. Silikon je pogodan materijal iz nekoliko razloga. Koeficijent difuzije kiseonika za silikon je nešto veći nego za vodu. Rastvorljivost kiseonika u silikonu je oko 4 do 5 puta veća nego u vodi. Za razliku od mikroporoznih membrana, difuzione membrane mogu biti pod pritiskom, da bi se

povećala pogonska sila prenosa mase kiseonika. Negativna strana silikona je ta što je propustljiviji za ugljendioksid i amonijak nego za kiseonik.

Kod povećanja zapremine bioreaktora sa aeracijom kroz membranu treba imati na umu da se površina membrane i razlika pritiska moraju povećati, da bi se održala potrebna brzina prenosa mase kiseonika, ako se kao kriterijum za povećanje dimenzija bioreaktora koristi jednaka specifična snaga mešanja.

Direktna aeracija tečne podloge u bioreaktoru. Direktna aeracija tečne podloge obezbeđuje ne samo kiseonik nego i mešanje tečne podloge. Obično se primenjuju bioreaktori tipa barbotажne kolone (slika 4.9d), air-lifta (slika 4.9e) i suda sa mešalicom (slika 4.9f i 4.9g). Air-lift bioreaktori se uspešno primenjuju za gajenje animalnih ćelija osetljivih na smicajne sile. Mehaničko mešanje u bioreaktoru sa mešalicom ubrzava prenos mase kiseonika. Aeracija može da bude direktna (slika 4.10f), kada se mehuri gasa raspodeljuju po čitavoj zapremini bioreaktora, i indirektna (slika 4.10g), kada je ograničena na deo zapremine bioreaktora, koji je odvojen sitastom pregradom.

Brzina prenosa mase kiseonika zavisi od operativnih uslova (specifične snage mešanja i površinske brzine strujanja gasa) i fizičkih osobina tečne podloge, uključujući sklonost prema koalescenciji. Tip distributera gasa je važan za barbotажne kolone i air-lift bioreaktore pri malim protocima gasa, kao i za sudove za mešanjem pri malim snagama mešanja. Geometrija bioreaktora je nevažna, osim ako ne utiče na koalescenciju mehurova, što se dešava u bioreaktorima malog prečnika i male visine.

U nekim slučajevima dešava se oštećenje ćelija koje su izložene mehurima gasa. Utvrđeno je da se ćelije oštećuju prilikom rasprskavanja mehurova na slobodnoj površini tečne podloge. Ovaj problem se prevazilazi smanjenjem slobodne površine po jedinici zapremine, formiranjem vrlo malih mehurova (mikronskih veličina) i dodavanjem površinski aktivnih supstanci koje stabilizuju penu na slobodnoj površini.

Aeracija tečne podloge u odvojenom kontaktnom uređaju. Osnovna prednost ovog načina obezbeđivanja rastvorenog kiseonika je u tome što su bioreaktor, u kome se gaje ćelije i produkuje proizvod i kontaktni uređaj, u kome se tečni medijum bez ćelija aeriše, odvojeni sudovi (slika 4.9h). Uslovi mešanja i aeracije u kontaktnom uređaju mogu se menjati, da bi se osiguralo potrebno zasićenje tečne podloge kiseonikom, bez direktnog uticaja na rast ćelija. Kod bioreaktora veće zapremine potreban je veliki protok tečne podloge ili veliki parcijalni pritisak rastvorenog kiseonika, da bi se održao željeni nivo rastvorenog kiseonika u bioreaktoru.

Oštećenje animalnih ćelija. Ako je intenzitet mešanja u bioreaktorima sa mehaničkim mešanjem i aeracijom prekomeran, gube se njihove prednosti za gajenje slobodno suspendovanih i animalnih ćelija na mikronosačima, kao što su homogeni uslovi okoline i potrebna brzina prenosa mase kiseonika iz gasne u tečnu fazu i prema ćelijama. Intenzivno mešanje može izazvati oštećenje slobodno suspendovanih ćelija, zbog njihove fragilnosti, odvajanje ćelija sa mikronosača i njihovu smrt.

Oštećenje slobodno suspendovanih ćelija je rezultat dva različita fenomena. U bioreaktorima bez direktne aeracije, usled mešanja pri većim brzinama, ćelije se oštećuju sa smanjivanjem veličine vrtloga do nivoa veličine ćelija. U bioreaktorima sa direktnom aeracijom, čak i pri malim brzinama mešanja, oštećenje ćelija je skoro u potpunosti rezultat uvođenja vazduha u bioreaktor (bilo kroz distributer bilo površinskim usisavanjem), sitnjenja mehurova i rasprskavanja mehurova na slobodnoj površini tečne podloge, a ne smicajnih sila koje se javljaju pri kretanju mehurova prema

slobodnoj površini. U slučaju nekih tečnih podloga, ćelije su adsorbovane na graničnoj površini gas-tečnost. Deo adsorbovanih ćelija biva ubijen prilikom formiranja, rasprskavanja ili koalesciranja mehura, usled formiranja prelaznog graničnog sloja sa jakim smicajnim silama i mlazeva tečnosti.

Uočeno je nekoliko mehanizama oštećenja ćelija na mikronosačima, i to: interakcijom sa turbulentnim vrtlozima, čija je veličina manja od veličine mikronosača, dejstvom jakih smicajnih sila, međusobnim sudarima mikronosača izazvanim vrtložnom disipacijom energije i sudarima mikronosača sa pokretnim i nepokretnim čvrstim delovima bioreaktora (mešalice i zid suda). Glavni uzrok oštećenja je disipacija energije vrtložnom aktivnošću. Veličina vrtloga smanjuje se sa povećanjem specifične snage mešanja, tj. sa povećanjem brzine mešanja. Smicajne sile su intenzivne kada je fluktuacija brzine strujanja zbog vrtložne aktivnosti značajna sa vremenom, što se obično dešava u zoni oko lopatica mešalice. Adherovane ćelije se skidaju sa površine mikronosača pri konstantnom laminarnom naponu smicanja od 0,5 do 10 N/m², dok se promene morfologije jednostrukog sloja uočavaju pri naponu smicanja 0,1 do 1,0 N/m².

4.2.2. Bioreaktori sa imobilisanim animalnim ćelijama

Ovaj tip bioreaktora koristi se za gajenje ćelija koje su imobilisane na biokompatibilnom materijalu. Tabela 4.3 sadrži podatke o metodima imobilizacije i proizvodima gajenja animalnih ćelija u glavnim tipovima bioreaktora. Pored glavnih, korišćeni su i drugi tipovi bioreaktora: keramički monoliti, fluidizovani sloj mikronosača, suspenzije mikronosača i mikrokapsula i dr. Tabela 4.4 daje najvažnije karakteristike glavnih tipova bioreaktora sa animalnim ćelijama, a tabela 4.5 – njihove navedene prednosti i mane.

Tabela 4.3. Pregled metoda imobilizacije i proizvoda animalnih ćelija u glavnim tipovima bioreaktora

<i>Tip bioreaktora</i>	<i>Metod imobilizacije</i>	<i>Proizvod</i>
Rotirajuće boce	Rast na unutrašnjoj površini	Vakcina protiv rubeole Eritropoetin
Bioreaktor sa mešanjem	Vezivanje za mikronosače	Vakcine Terapeutski proteini
Bioreaktor sa pakovanjem	Inkapsulacija u sloj sfera ili vlakana	Vakcine Terapeutski proteini
Bioreaktor sa šupljim vlaknima	Rast u šupljim vlaknima ili oko njih	Antitela

Imobilizacija ćelija se može izvršiti na više načina:

- vezivanjem za površinu nosača,
- vezivanjem unutar pora ili šupljih vlakana i
- vezivanjem na nosač iza zaštitne membrane ili sita.

Imobilisanje animalnih ćelija pruža značajne prednosti u njihovoj primeni, ali ima i nedostataka, koji se moraju analizirati pri projektovanju i izboru bioreaktora. Prednosti imobilizacije ćelija na biokompatibilnom materijalu su sledeće:

- rast animalnih ćelija nije sprečen;
 - razdvajanje ćelija od tečne podloge je olakšano, pa često nije potrebno primeniti neku od mehaničkih separacionih operacija;
 - ćelije se mogu koristiti tako da ne budu izložene oštećenju pod dejstvom mehurova i smicajnim silama; i
 - može izazvati povoljne promene osobina ćelija, što može imati za posledicu veću produkciju proteina ili željenog proizvoda po ćeliji.
- Glavni nedostaci imobilizacije animalnih ćelija su:
- imobilisane ćelije se mogu otkaćiti sa nosača ili deagregisati u suspenziju pojedinačnih ćelija, pre nego što se primene za inokulisanje;
 - imobilisane ćelije ne mogu menjati položaj kao odgovor na dejstvo sila i mogu se oštetiti smicanjem ili sudarima;
 - imobilisanje unutar biokompatibilnog materijala i rast u više slojeva može sprečiti razmenu mase između ćelija i tečne podloge; i
 - cena biokompatibilnog materijala može biti značajna.

Tabela 4.4. Karakteristike glavnih tipova bioreaktora za gajenje animalnih ćelija

<i>Tip bioreaktora</i>	<i>Tipične gustine ćelija, ćelija/cm³</i>	<i>Način obezbeđivanja kiseonika</i>	<i>Radna zapremina, dm³</i>	<i>Način rada</i>
Sud sa mešalicom	Slobodno suspendovane: $1-3 \cdot 10^6$ Čvrsti mikronosači: $1-5 \cdot 10^6$ Porozni mikronosači: $5-20 \cdot 10^6$	Površinska aeracija, direktna aeracija, silikonsko crevo	Slobodno suspendovane: do nekoliko hiljada Mikronosači: do 1.000	Šaržni, polušaržni, protočni
Sud sa mešalicom i separatorom ćelija	$1-3 \cdot 10^7$	Površinska aeracija, direktna aeracija, silikonsko crevo	Do 1.000	Perfuzioni
Air-lift	$1-3 \cdot 10^6$	Direktna aeracija	do 2.000	Uglavnom šaržni, mogući su polušaržni i protočni*
Fluidizovani sloj	$1-3 \cdot 10^8$ (računato na čvrste čestice) ili $3-5 \cdot 10^7$ (računato na fluidizovani sloj)	Aeracija u posebnom kontaktnom uređaju	Do 64 (zapremina fluidizovanog sloja)	Šaržni, polušaržni, protočni*
Pakovani sloj	Čvrsti mikronosači: 106 (računato na zapreminu sloja) Porozni mikronosači: $1-4 \cdot 10^7$ (računato na zapreminu sloja)	Aeracija u posebnom kontaktnom uređaju	Do 100	Šaržni, polušaržni, protočni*

Tabela 4.4. Karakteristike glavnih tipova bioreaktora za gajenje animalnih ćelija
(nastavak)

<i>Tip bioreaktora</i>	<i>Tipične gustine ćelija, ćelija/cm³</i>	<i>Način obezbeđivanja kiseonika</i>	<i>Radna zapremina, dm³</i>	<i>Način rada</i>
Šuplja vlakna	10 ⁸	Aeracija u posebnom kontaktnom uređaju	Od 30 cm ³ do nekoliko litara	Šaržni, polušaržni, protočni*
Keramički monolit	10 ⁷ –5·10 ⁸ (računato na keramički matriks)	Aeracija u posebnom kontaktnom uređaju	Od nekoliko mililitara do 39	Šaržni, polušaržni, protočni*

*U svim ovim sistemima, ćelije u bioreaktoru se podvrgavaju kontinualnoj perfuziji sa tečnom podlogom; u toku jednog produkcionog ciklusa, tečna podloga u perfuzionoj petlji se može menjati kontinualno ili periodično (polušaržni rad) ili se ne menjati (šaržni rad)

Tabela 4.5. Prednosti i nedostaci bioreaktora za gajenje animalnih ćelija

<i>Tip bioreaktora</i>	<i>Prednosti</i>	<i>Nedostaci</i>
Sud sa mešalicom	Jednostavno projektovanje, mogućnost povećanja razmere, laka instrumentacija i kontrola, postojanje informacija iz mikrobnih i hemijskih procesa	Relativno male gustine ćelija, mikronosači potrebni za mnoge ćelije
Sud sa mešalicom i separatorom ćelija	Velike gustine ćelija, moguća je produžena produkciona faza, smanjeno trajanje jednog ciklusa	Povećana mehanička složenost, potencijalni problemi pri dugotrajnom radu i u konzistentnosti kvaliteta proizvoda
Air-lift	Jednostavno projektovanje, mogućnost povećanja razmere	Relativno male gustine ćelija, potencijalni problemi pri radu sa adherentnim ćelijama
Fluidizovani sloj	Velike gustine ćelija, veliki koeficijent prenosa mase i između tečnosti i ćelija, mogućnost gajenja slobodno suspendovanih i ćelija na mikronosaču	Zahtevaju mikronosače sa velikom brzinom taloženja
Pakovani sloj	Jednostavno projektovanje i rad, mogućnost gajenja slobodno suspendovanih i ćelija na mikronosaču	Mali koeficijenti prenosa mase, moguće kanalisanje, gradijenti u sloje

Tabela 4.5. Prednosti i nedostaci bioreaktora za gajenje animalnih ćelija (nastavak)

<i>Tip bioreaktora</i>	<i>Prednosti</i>	<i>Nedostaci</i>
Šuplja vlakna	Velike gustine ćelija, lako inokulisanje i rad, proizvod odvojen od tečne podloge u koncentrovanom rastvoru, mogućnost gajenja slobodno suspendovanih i ćelija na mikronosaču	Gradijenti u reaktoru, slaba mogućnost povećanja razmere
Keramički monolit	Mogućnost gajenja slobodno suspendovanih i ćelija na mikronosaču, višestruka primena monolita	Skup monolitni materijal, nehomogenost unutar reaktora

Bioreaktori sa mikronosačima. Kod ovog bioreaktora, ćelije rastu na površini malih sfernih čestica (tipične vrednosti prečnika i relativne gustine: 100 do 200 μm i 1,03 do 1,05), koje su suspendovane u tečnoj podlozi u sudu sa mešalicom. Veličina i gustina sfernih čestica omogućavaju veliku specifičnu površinu nosača i lako suspendovanje uz umereno mešanje u produkcionoj fazi, a brzo gravitaciono taloženje u fazi zamene tečne komine svežom hranljivom podlogom. Sud sa mešalicom obezbeđuje homogenu okolnu sredinu i adekvatnu brzinu prenosa mase, prema i od ćelija, umerenim mešanjem koje ne dovodi do značajnijeg oštećenja ćelija. Uvek treba imati na umu da su ćelije podložne dejstvu mehaničkih sila u strujnom polju, zbog nedostatka zaštitnog zida, relativno velike veličine i nepokretljivosti individualnih ćelija. Ovaj problem se uvećava sa povećanjem zapremine bioreaktora i koncentracije ćelija.

4.2.3. Bioreaktori sa fluidizovanim slojem

Fluidizovanje mikronosača u tečnoj podlozi ubrzava prenos mase rastvorenih hranljivih komponenti u suspenziji. Zbog male veličine mikronosača, minimalna brzina fluidizacije je previše mala da bi obezbedila efektivan fluidizovani sloj. Ovaj nedostatak je prevaziđen upotrebom makroporoznog nosača na bazi kolagena, čije su čestice veličine 500 μm , koje su otežane necitotoksičnim teškim metalima (relativna gustina 1,6). U fluidizovanom sloju ovog nosača ostvaruje se veća brzina prenosa mase kiseonika i drugih hranljivih komponenti u odnosu na sud sa mešalicom. Fluidizovani bioreaktorski sistemi omogućavaju veće iskorišćenje radne zapremine bioreaktora sa mikronosačem (do 50%, pa i više) nego sud sa mešalicom (25%).

4.2.4. Bioreaktori sa šupljim vlaknima

Ova vrsta bioreaktora se sastoji od snopa kapilarnih vlakana (stotine hiljada), koja su smeštena u cilindričnom kućištu. Vlakna su zaptivena na čeonim pločama, koje sa kućištem određuju anularni prostor. U većini slučajeva, tečna podloga struji kroz vlakna, a ćelije rastu u suspenziji u anularnom prostoru, na spoljnoj površini kućišta ili u porama zida vlakana. U ovom bioreaktorskom sistemu postižu se koncentracije ćelija do 10^8 ćelija/ cm^3 . Niskomolekulska jedinjenja, uklju-

čujući rastvoreni kiseonik, difunduju kroz membranu vlakna, dok se makromolekulska jedinjenja dodaju direktno u anularni prostor. Takođe, makromolekulska jedinjenja, kao što su imunoglobulini, ostaju u anularnom prostoru, tako da su koncentracije proizvoda visoke. Hranljiva podloga se aeriše u posebnom kontaktnom uređaju.

4.2.5. Bioreaktor sa pakovanim slojem

Pakovani sloj čine čestice nosača na čijoj su površini, u porama ili u polimernoj mreži, imobilisane animalne ćelije. U poređenju sa bioreaktorima sa fluidizovanim slojem, ovaj tip bioreaktora ima stabilniji rad u širem opsegu protoka tečne podloge, ali i manje brzine prenosa mase i problem kanalisnog strujanja. Specijalan slučaj ovog tipa bioreaktora su keramički monoliti, oblika cilindra ili prizme, sa kvadratnim kanalima koji prolaze longitudinalno kroz monolit. Ćelije inokulisane u kanale prijanjaju uz materijal ili bivaju uhvaćene u pore materijala. Bioreaktori sa pakovanim slojem, kao i oni sa fluidizovanim slojem ili šupljim vlaknima, obično su deo perfuzione petlje.

4.3. BIOREAKTORI ZA IZVOĐENJE BIOPROCESA POMOĆU BILJNIH ĆELIJA

Biljne ćelije se koriste kao kulture slobodno suspendovanih ili imobilisanih ćelija i kao kulture tkiva i organa. Sa inženjerske tačke gledišta, kulture biljnih ćelija imaju bolji potencijal za industrijsku primenu nego kulture biljnih tkiva i organa, a rezultat su ogromnog znanja i iskustava stečenih u oblasti submerznog gajenja mikroorganizama. Kulture biljnih tkiva imaju veću genetičku stabilnost, a u nekim slučajevima i veći prinos, od kultura biljnih ćelija iste linije. Nažalost, još nije postignut zadovoljavajući razvoj pogodnih bioreaktora za industrijsku proizvodnju ove vrste, što zahteva nova ulaganja novca i vremena. Zbog toga se, danas, u komercijalnoj proizvodnji bioteknologije najviše primenjuju kulture biljnih ćelija.

Osnovni cilj komercijalnog gajenja kultura biljnih ćelija je ostvariti visoku proizvodnost procesa u celini, a to znači visok prinos i visoku koncentraciju proizvoda izborom ćelijske linije, hranljive podloge i bioreaktora. Projektovanje komercijalnog procesa sa biljnim ćelijama zahteva multidisciplinarni pristup, kojim se fokusira sledeće:

karakteristike kultura biljnih ćelija, uključujući morfologiju i sastav ćelija, kinetiku ćelijskog rasta i sinteze proizvoda, kao i genetičku stabilnost najproduktivnije ćelijske linije;

- hidrodinamika, prenos mase i povećanje veličina bioreaktora;
- kontrola uslova gajenja u bioreaktoru na mikro i makro nivou; i
- uticaj tipa bioreaktora na postupak izolovanja i prečišćavanja proizvoda.

Potreba biljnih ćelija za kiseonikom je relativno umerena. Tipična vrednost specifične brzine potrošnje kiseonika je reda 10^{-6} g/g·s (računato na suhu ćelijsku masu). Kritična koncentracija rastvorenog kiseonika je oko 15–20% od zasićene. Treba imati na umu da kritična koncentracija za rast može biti značajno manja od kritične koncentracije za produkciju metabolita. Otuda se

potreba za kiseonikom, koja je relativno mala u fazi rasta, može značajno povećati u produkcionoj fazi.

Zbog slabe rastvorljivosti u vodi, kiseonik se u toku gajenja biljnih ćelija mora stalno obezbeđivati. Pošto je zapreminska proizvodnost kultura biljnih ćelija velike gustine i velikog viskoziteta proporcionalna koncentraciji ćelija, aeracija tečne podloge je ključni problem u projektovanju i povećanju dimenzija uređaja za kulture biljnih ćelija. Pokazano je da postoji niža granična vrednost zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika, kao mera aeracione sposobnosti bioreaktora, ispod koje je rast kulture limitiran. Uočeno je, takođe, da proizvodnost kulture smanjuje pri većim zapreminskim protocima vazduha, što je objašnjeno stripovanjem ugljendioksida i esencijalnih isparljivih metabolita iz sistema ili uticajem smicajnih sila. Zbog toga brzina izmene gasova mora da obezbedi dovoljno kiseonika, a da spreči suvišno uklanjanje ugljendioksida i esencijalnih isparljivih metabolita.

Mešanje bioreaktora sa biljnim ćelijama najčešće se obavlja produvavanjem vazduha, mešalicom ili njihovim kombinacijama. Cirkulacijom tečne podloge kroz bioreaktor, mešanje obezbeđuje homogenost suspenzije, hranljivih komponenata i proizvoda biljnih ćelija, uz istovremeno ubrzavanje prenosa mase kiseonika iz mehurova vazduha u tečnost i kroz tečnu podlogu, kao i prenos mase između ćelija i tečne podloge.

Uticaj mešanja i cirkulacije tečnosti na biljne ćelije je dvojak:

- direktnim uticajem hidrodinamičkih sila na njihov oblik i funkcije i
- uticajem na brzinu prenosa mase hranljivih komponenti i proizvoda metabolizma.

Odgovor kulture biljnih ćelija na direktan hidrodinamički uticaj zavisi od njegovog trajanja i intenziteta, kao i od fizioloških karakteristika ćelija. Ovaj uticaj može biti pozitivan i povećati prinos ćelija i proizvoda, ali i negativan. Hidrodinamičke sile treba da budu slabe da ne izazovu smrt ćelija, ali dovoljno intenzivne da stimulišu željenu funkciju ćelija. U bioreaktorima sa dobrim mešanjem, hidrodinamički uticaj je vezan sa vremenskim i prostornim fluktuacijama brzine strujanja i pritiska uzrokovanim viskoznom disipacijom turbulentnih vrtloga. Da ćelije ne bi bile oštećene hidrodinamičkim uticajem, najmanji vrtlozi treba da budu veći od ćelija, ali i manji od nosača na kome su ćelije imobilisane. Pod uticajem fluktuacije pritiska i brzine strujanja metaboličke funkcije imobilisanih ćelija mogu biti stimulisane zbog njihove nepokretnosti. Kritična vrednost napona smicanja u laminarnim uslovima strujanja iznad koje se vitalnost biljnih ćelija prekida iznosi 80 do 200 N/m², što je mnogo više nego za animalne ćelije. Ovo se objašnjava otpornošću gustog, rigidnog ćelijskog zida biljnih ćelija.

Hidrodinamičke sile mogu uticati na površinske receptore biljnih ćelija koji su bitni za rast i održavanje tkiva, kao i za transmembranske sile. Sve ćelije tkiva su u predstresnom stanju, koje generišu mehaničke sile unutar njihovog citoskeletona, što se prenosi na okolnu matricu, kada su imobilisane. Pomeranje citoskeletona, kao odgovor na napon smicanja, proporcionalno je primenjenom naponu. Ove promene citoskeletona mogu uticati na hemijske signale. Prema tome, značajno je obezbediti da nivo smicajnih sila bude ispod nivoa koji izaziva oštećenje ćelija, ali i dovoljno visok da osigurava efikasno mešanje tečne podloge i dispergovanje vazduha.

Prema režimu rada, bioreaktori za biljne ćelije i tkiva se dele na šaržne, protočne i poluprotodne. Izbor režima rada zavisi od dinamike specifične kulture. Nezavisno od režima rada, bioreaktorski sistem treba da, optimizacijom bioloških i inženjerskih faktora, obezbedi potreban

kapacitet i kvalitet proizvoda sa minimalnim troškovima rada. Ovo zahteva adekvatnu kontrolu faktora koji utiču na rast ćelija i nastajanje željenog proizvoda.

Šaržni bioreaktori. Uslovi okoline u šaržnom bioreaktoru se tokom gajenja stalno menjaju. Ovim načinom gajenja mogu se sintetizovati metaboliti po bilo kom kinetičkom zakonu. Produženno gajenje kulture može se ostvariti kontrolisanim dodavanjem limitirajuće hranljive komponente u poluprototnom bioreaktoru.

Poluprototni bioreaktori. Kod prototnih bioreaktora, tečna hranljiva podloga se stalno dovodi, da bi se nadoknadile hranljive komponente koje su potrošene. Ovaj način gajenja biljnih ćelija odgovara hemostatu. Zbog male specifične brzine rasta biljnih ćelija (vreme generacije između 20 i 60 sati), potreban je relativno dugačak period da bi se dostiglo stacionarno stanje. Pored toga, zapreminski protok tečne podloge je mali, tako da se sveža podloga dodaje u kapima. Ako je vreme usvajanja malo u odnosu na vreme mešanja, ovakvo dodavanje sveže podloge može dovesti do lokalnog predoziranja. Ako je usvajanje limitirajuće hranljive komponente brzo, a metabolička konverzija spora, doći će do povećanja njegove koncentracije u ćelijama, što može aktivirati alternativne metaboličke puteve. Sekrecija polisaharida može otežati održavanje dobrog mešanja, koje je preduslov stacionarnog rada prototnih bioreaktora.

Prototni reaktori sa reciklisanjem ćelija. Ovi bioreaktori su, takođe, primenljivi za gajenje kultura biljnih ćelija. Ako se samo mali deo ćelija vraća, onda je ovaj bioreaktorski sistem blizu rada hemostata, a ako se ukupna količina ćelija vraća u bioreaktor, onda se ovaj sistem, tzv. perfuziona kultura, približava bioreaktoru sa imobilisanim ćelijama, pa je pogodan za proizvodnju metabolita, čija sinteza nije vezana za rast ćelija.

Kao kod bioreaktora za mikrobiološke procese, osnovni zahtev je optimalno iskorišćenje susprata i kiseonika, što se postiže klipnim strujanjem vazduha (bez povratnog mešanja) i idealnog mešanja tečne podloge, koje obezbeđuje homogenost okolne sredine i obezbeđuje uslove za ćelijski rast i nastajanje metabolita. U slučaju kultura biljnih ćelija ovaj zahtev može ispuniti veliki broj različitih tipova bioreaktora, a najvažniji su prikazani na slici 4.11. Oni se mogu klasifikovati prema načinu mešanja i aerisanja i prema tehnici gajenja biljnih ćelija.

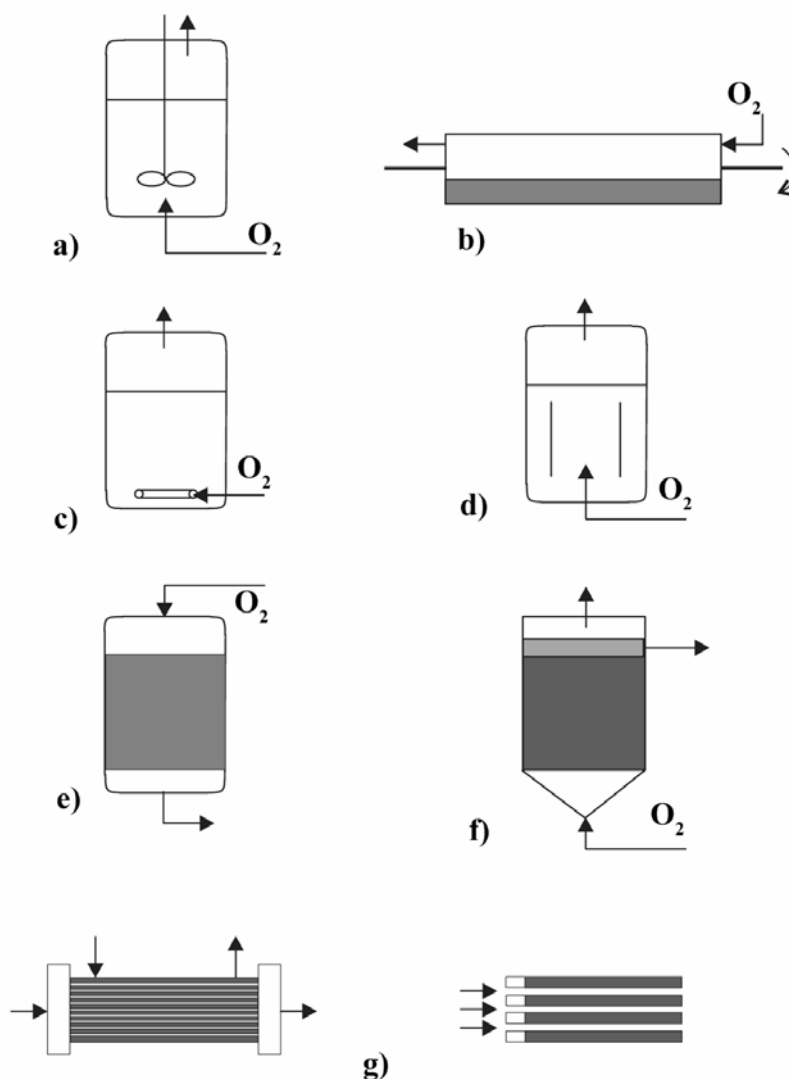
Prema načinu mešanja i aeracije, bioreaktori za biljne ćelije se mogu svrstati u tri grupe, i to:

- bioreaktori sa mehaničkim mešanjem i aeracijom,
- bioreaktori sa pneumatičkom aeracijom i
- bioreaktori bez mešanja.

Bioreaktori sa mehaničkim mešanjem i aeracijom mogu imati razne tipove i geometrije mešalica. Mešalica treba da obezbedi efektivno mešanje, dispergovanje vazduha, suspendovanje ćelija i da spreči nastajanje velikih agregata ćelija u suspendovanoj kulturi. Različiti tipovi mešalica mogu da ispune ove zahteve, ali se najčešće koriste mešalice sa lopaticama i spiralne mešalice, kao i vibracione mešalice sa perforiranim pločama. Mešalice sa velikim lopaticama mogu da obezbede dobro mešanje i pri maloj brzini obrtanja. Upotreba turbinskih mešalica se izbegava zbog postojanja zona jakih smicajnih sila.

Horizontalni rotirajući doboši su, takođe, efektivni bioreaktori koji obezbeđuju prenos mase sa mnogo manjom snagom mešanja, kao rezultat značajnog odnosa slobodne površine i zapre-

mine tečne podloge. Na unutrašnjem zidu doboša nalaze se odbojnici koji pomažu mešanje. Takođe, na zidu doboša se formira tanak sloj tečne podloge koji se lako aeriše.



Slika 4.11 Bioreaktori za biljne ćelije: a) sud sa mešalicom, b) rotirajući doboš, c) barbotažna kolona, d) air-lift, e) pakovani sloj, f) fluidizovani sloj i g) membranski reaktori sa šupljim vlaknima i ravnim pločama

Bioreaktori sa pneumatskom aeracijom uključuju barbotažne kolone i air-lift bioreaktore. Mešanje, cirkulacija i aeracija tečne podloge postiže se uduvavanjem vazduha kroz pogodan distributer gasa pri dnu bioreaktora. Vazduh se, pri prolasku kroz distributer, rasprskava u mehuro-

ve, koji se kreću naviše, mešajući tečnu podlogu. Osnovna razlika između ova dva tipa bioreaktora je u definisanijem strujanju kod air-lift bioreaktora, što je rezultat postojanja unutrašnje ili spoljašnje recirkulacione petlje. S obzirom na malu specifičnu brzinu potrošnje kiseonika u suspendovanim kulturama, bioreaktori sa pneumatskom aeracijom uspevaju da obezbede adekvatnu brzinu prenosa mase kiseonika iz mehurova vazduha u tečnu podlogu, sa mnogo manjim oštećenjem agregata ćelija u odnosu na mehaničko mešanje. Njihova glavna prednost je relativno jednostavna konstrukcija, odsustvo oblasti jakih smicajnih sila, prilično velike brzine prenosa mase i toplote i relativno visoki prinosi proizvoda uz relativno malu potrošnju energije. Njihovi nedostaci su vezani za lošije mešanje i prenos mase kiseonika i intenzivnije stripovanje esencijalnih isparljivih metabolita, u odnosu na sud sa mehaničkim mešanjem. Ovaj nedostatak se može umanjiti delimičnom recirkulacijom izlazne vazdušne struje.

Air-lift bioreaktori su dobri i za gajenje biljnih ćelija imobilisanih na nosačima male gustine, jer imaju veliki kapacitet punjenja u odnosu na čvrste čestice nosača i dobar prenos mase, što je karakteristično za trofazne fluidizovane slojeve. Efikasno mešanje i suspendovanje čestica nosača postiže se cirkulacijom tečne podloge kroz recirkulacionu petlju.

Prema načinu gajenja biljnih ćelija, bioreaktori se mogu, takođe, podeliti u tri grupe:

- bioreaktori za suspendovane kulture,
- bioreaktori za imobilisane biljne ćelije i
- bioreaktori za kulture biljnih tkiva i organa.

Bioreaktori za suspendovane kulture. Kulture slobodno suspendovanih ćelija (tzv. suspendovane kulture) su vrlo bliske mikrobnim kulturama, pa se mogu koristiti znanja o bioreaktorskim sistemima iz postojećih biotehnologija, uz uvažavanje specifičnosti biljnih ćelija, pre svega sa gledišta adekvatnog mešanja, kao što se može zaključiti iz tabele 4.6. Za gajenje slobodno suspendovanih biljnih ćelija koriste se bioreaktori sa mehaničkim mešanjem i/ili pneumatičkom aeracijom (slika 42a-d), da bi se obezbedila mešanje, cirkulacija i aeracija tečne podloge. Za sada, bioreaktori tipa barbotажne kolone i air-lifta, a u manjem stepenu i sudovi sa mešalicama, imaju najširu primenu za gajenje suspendovanih kultura.

Bioreaktori za imobilisane biljne ćelije. Osnovni cilj gajenja biljnih ćelija nije biljna biomasa nego dobijanje vrednih sekundarnih meabolita. Na ovoj činjenici zasniva se primena imobilisanih biljnih ćelija, gde je cilj držati biljne ćelije u produktivnom, ali nerastućem stanju u dužem vremenskom periodu. Imobilisanjem biljnih ćelija na ili unutar polimernog nosača utiče na diferencijaciju ćelija, što često dovodi do veće proizvodnosti u odnosu na suspendovane kulture. U praksi se korsiti više načina imobilizacije biljnih ćelija. Agegacija pojedinačnih biljnih ćelija se često posmatra kao samoimobilisanje ćelija.

Za gajenje imobilisanih biljnih ćelija primenjuju se uglavnom bioreaktori bez mešanja, a najčešće (slika 4.11, f i g):

- bioreaktori sa pakovanim slojem,
- bioreaktori sa fluidizovanim slojem i
- membranski bioreaktori.

Tabela 4.6 Karakteristike mešanja u suspenzijskim kulturama mikroorganizama i biljnih ćelija

<i>Funkcija</i>	<i>Mikroorganizmi</i>	<i>Biljne ćelije</i>
Mešanje	Postizanje homogenosti okolne sredine pri potrošnji nutrijenata i sintezi proizvoda	Postizanje homogene raspodele biljnih ćelija i agregata ćelija, koje se lako talože zbog veličine
<i>Funkcija</i>	<i>Mikroorganizmi</i>	<i>Biljne ćelije</i>
Prenos kiseonika	Zadovoljenje potreba biomase za kisenikom Često limitira gradnju uređaja većih dimenzija	Zadovoljenje potreba ćelija za rast i za produkciju željenog metabolita, ali bez stripovanja esencijalnih gasnih proizvoda ispod kritičnog nivoa
Smicanje	Obično nebitno, osim kod gljivica koje rastu u obliku micelijuma	Obično važno, jer može izazvati oštećenje. U nekim slučajevima, može biti pozitivno, jer povećava prinos metabolita

Bioreaktori za kulture biljnih tkiva i organa. Razlikuju se dva tipa kultura biljnih tkiva: kulture korena i kulture izdanaka. Kulture korena se u principu gaje u bioreaktorima sa mešanjem i aerisanjem i air-lif bioreaktorima. Najpogodniji bioreaktorski sistem uključuje rasprskavanje tečne podloge pomoću mlaznica preko izdanaka postavljenih na mrežastom nosaču. Tečna podloga recirkuliše između suda sa izdancima i rezervoara, gde se aeriše, pomoću crpke. U ovom sistemu, prevazilaze se problemi vezani za oštećenje izdanaka i limitiranje prenosa mase nutrijenata unutar izdanaka pri submerznom gajenju.

4.4. ENZIMSKI BIOREAKTORI

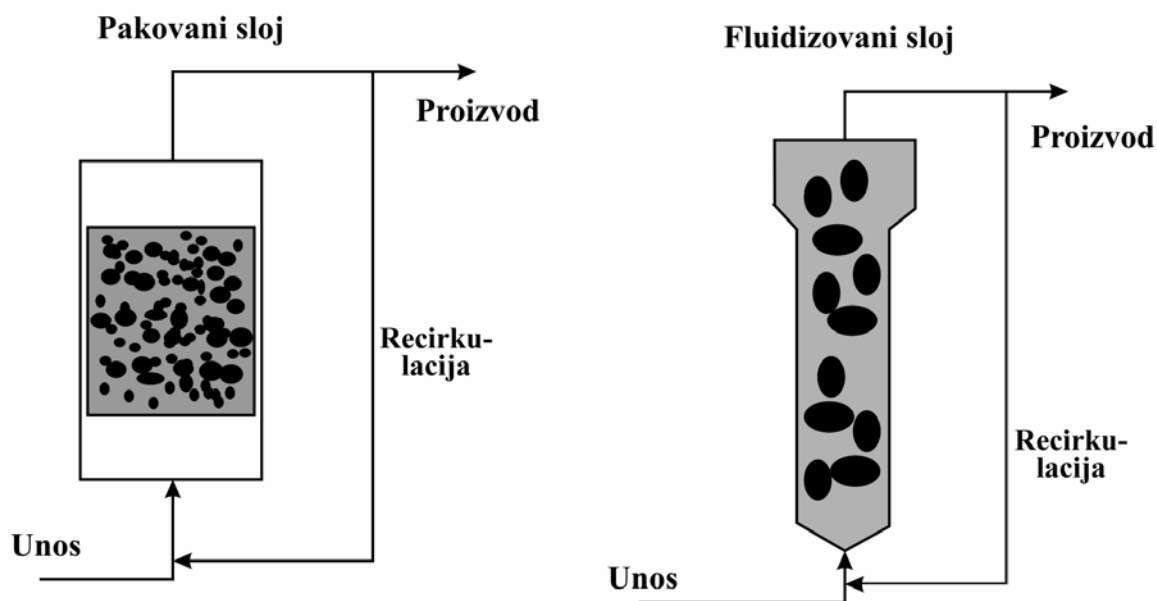
Bioreaktori u kojima se odigravaju reakcije katalizovane enzimima treba da obezbede optimalne uslove (temperatura, pH) za maksimalnu aktivnost i stabilnost enzima, čime se ostvaruje maksimalna proizvodnost takvih bioreaktora. U bioreaktorima se mogu odigravati enzimski procesi pomoću slobodno suspednovanih ili imobilisanih enzima.

Kod procesa koji se odvijaju u bioreaktorima imobilisani enzimi imaju određene prednosti i nedostatke. Prednosti su:

- zadržavanje izolovanog enzima u bioreaktoru,
- sprečavanje gubitaka skupog enzima,
- pojednostavljenje postupka izolovanja proizvoda i
- održavanje enzimске aktivnosti u dužem vremenskom periodu.

Nedostaci bioreaktora sa imobilisanim enzimima su uglavnom dufuzionog ograničenja, koja usporavaju transport supstrata do enzima i proizvoda u sredinu.

Bioreaktori u kojima se odigravaju reakcije sa imobilisanim enzimima mogu biti sa pakovanim ili fluidizovanim slojem (slika 4.12).



Slika 4.12 Tipovi enzimskih reaktora

4.5. POREĐENJE BIOREAKTORA

Različite vrste bioreaktora zasnivaju se na nekoliko osnovnih tipova, od kojih su najvažniji konvencionalni bioreaktor sa mehaničkim mešanjem i bioreaktor tipa barbotажne kolone. Izvedene varijante bioreaktora imaju poboljšanja osnovnog tipa koja su bitna za posebnu namenu bioreaktora. Po pravilu, od mnogobrojnih podataka koji se za određeni tip bioreaktora mogu naći u literaturi, samo su neki bitni za izbor bioreaktora. U tabeli 4.7 dati su podaci o maksimalnoj zapremini bioreaktora, ukupnoj potrošnji snage mešanja, vremenu mešanja, sadržaju gasa i brzini prenosa kiseonika (maksimalna ili publikovana vrednost) za pojedine tipove bioreaktora.

Tabela 4.7 Hidrodinamičke i maseno-prenosne karakteristike nekih tipova submerznih i površinskih bioreaktora

<i>Bioreaktor</i>	<i>Maksimalna zapremina, m³</i>	<i>Vreme mešanja, s</i>	<i>Korisna snaga mešanja, kW/m³</i>	<i>Sadržaj gasa, %</i>	<i>Brzina prenosa kiseonika kg/m³h</i>
SUBMERZNI BIOREAKTORI SA MEHANIČKIM MEŠANJEM I PRINUDNOM AERACIJOM					
Sa mešalicom	400	-	8	8	4
Sa mešalicom i centralnom cevi	80	4	8	12	4
<i>Bioreaktor</i>	<i>Maksimalna zapremina, m³</i>	<i>Vreme mešanja, s</i>	<i>Korisna snaga mešanja, kW/m³</i>	<i>Sadržaj gasa, %</i>	<i>Brzina prenosa kiseonika kg/m³h</i>
Sa površinskom aeracijom	80	30	4	13	10
Kolona sa rotirajućim elementima	120	-	1,5	20	-
Sa rotirajućim perajima	50	8	10	50	15
SUBMERZNI BIOREAKTORI SA CIRKULACIJOM POMOĆU PUMPE					
Cevni sa petljom	5	-	3	8	1
Sa mlazom u centralnoj cevi	500	60	5	30	10
Sa sitastim podovima	1000	300	3	50	10
Sa udarnim mlazom	200	-	2,5	20	12
Sa "potopljenim" udarnim mlazom	4000	-	0,08	2	0,12
Sa mlaznicom u spoljnoj cevi	200	50	6	30	15
SUBMERZNI BIOREAKTORI SA MEŠANJEM AERACIJOM					
Barbotažna kolona	5000	200	3,5	30	12
Barbotažna kolona sa centralnom cevi	3000	80	3,5	30	10
POVRŠINSKI BIOREAKTORI					
Sa rotirajućim dobošem	1	-	0,1	0,01	0,2
Sa nepokretnim slojem i cirkulacijom pomoću pumpe	100	-	0,5	85	0,5

4.6. IZBOR BIOREAKTORA

Izbor bioreaktora zavisi od više faktora koji se mogu grupisati u četiri vrste koje su vezane za:

- prirodu radnog mikroorganizma,
- osobine hranljive podloge i fermentacione tečnosti i
- parametre biohemijskog procesa.

4.6.1. Uticaj prirode proizvodnog mikroorganizma

Od faktora vezanih za prirodu radnog mikroorganizma koji imaju uticaj na izbor bioreaktora treba istaći sledeće:

- stabilnost soja,
- oblik i veličinu ćelija,
- potrebe kiseonika i
- tendenciju rasta na površini.

Stabilnost soja određuje režim rada bioreaktora. Na primer, samo dovoljno stabilni sojevi se mogu koristiti u kontinualnim procesima.

Veličina i oblik ćelija proizvodnog mikroorganizma ima, takođe, značajan uticaj na tip bioreaktora i njegov rad. Ovde su od presudnog uticaja interakcije između mehaničkih sila u bioreaktoru i ćelija mikroorganizama. Sferične ćelije su obično manje po veličini i manje osetljive prema smicanju nego filamentozni mikroorganizmi. S druge strane, sferične ćelije zahtevaju intenzivnije dispergovanje vazduha. Male ćelije imaju veliku specifičnu površinu koja za posledicu ima veliku brzinu trošenja supstrata i brz rast. Aerobni mikroorganizmi sa velikom brzinom rasta imaju veliku brzinu potrošnje kiseonika.

Potrebe kiseonika. Izbor bioreaktora i radni uslovi zavise, nesumnjivo, i od toga da li je mikroorganizam aeroban ili anaeroban. U slučaju aerobnih mikroorganizama, zahtevana količina kiseonika mora uvek biti rastvorena u hranljivoj podlozi. Pošto je rastvorljivost kiseonika u hranljivoj podlozi vrlo mala, mora se obezbediti kontinualno dovodenje i rastvaranje kiseonika, obično dispergovanjem vazduha u hranljivoj podlozi. Brzina prenosa kiseonika iz vazduha u hranljivu podlogu mora da odgovara brzini potrošnje kiseonika koja obezbeđuje maksimalnu produktivnost.

Površinski rast. U slučaju kada mikroorganizam ima sklonost da raste na površini povoljno je izabrati bioreaktor za površinsko gajenje. Načelno, formiranje filma na površini supstrata nije poželjno. Formiranje stacionarnih zona u podlozi može se izbeći izborom odgovarajućeg tipa bioreaktora.

4.6.2. Uticaj osobina hranljive podloge

Brojni su faktori vezani za hranljivu podlogu koji utiču na izbor i rad bioreaktora, a od njih najvažniji su sledeći:

- agregatno stanje podloge,
- biokinetički efekti supstrata ili proizvoda,

- problemi vezani za sterilizaciju toplotom,
- koalescencija gasnih mehurova i
- reološke osobine podloge.

U biotehnološkoj proizvodnji koriste se brojne hranljive supstance koji se mogu nalaziti u sva tri agregatna stanja: gasovitom (na primer, metan), tečnom (u vodi rastvorne, na primer: metanol, etanol itd. ili u vodi nerastvorne, na primer, parafini) i čvrstom (u vodi rastvorne, na primer: glukoza, saharoza itd. ili u vodi slabo rastvorne, odnosno nerastvorne, na primer: škrob i celuloza). Svako agregatno stanje značajno utiče na izbor bioreaktora. Tako, na primer, pošto vazduh i metan prave eksplozivne smeše, ne smeju se koristiti bioreaktori sa velikim gasnim prostorom. Tečni i čvrsti supstrati rastvorni u vodi ne izazivaju nikakve probleme. U slučaju lako isparljivog supstrata, treba primeniti bioreaktor sa istosmernim proticanjem faza sa malom aksijalnom disperzijom ili višestepeni bioreaktor u cilju minimiziranja gubitaka sa izlaznim gasom. Generalno, površinski bioreaktori su nepovoljni ako hranljiva podloga zadrži više parafine, jer se u prisustvu parafina smanjuje brzina prenosa kiseonika. Ako se u toku fermentacije povećava viskozitet (na primer, zbog nastajanja polisaharida), treba predvideti primenu bioreaktora sa odgovarajućim mešanjem.

Prisustvo čvrstih, nerastvornih čestica (na primer, CaCO_3) u podlozi i korišćenje vlaknastih supstrata (na primer, obrađena slama) sužava izbor bioreaktora.

Biokinetički efekti supstrata ili proizvoda, takođe, utiču na izbor bioreaktora. Ako supstrat pokazuje inhibiciju ili represiju rasta, proces treba obavljati ili u semikontinualnom bioreaktoru sa dodavanjem supstrata ili u kontinualnom bioreaktoru. U slučaju proizvoda sa inhibicionim ili represivnim efektom pri visokoj koncentraciji (na primer, glukoza i celobioza za *Tricoderma viridae*, a etanol za *Saccharomyces cerevisiae*), poželjno je primeniti višestepene bioreaktore.

U slučaju hranljive podloge u čiji sastav ulaze termolabilne komponente ili komponente koje mogu međusobno reagovati na povišenim temperaturama, treba predvideti odgovarajući način (na primer, filtraciju) ili postupak (separatni tretman toplotom) sterilizacije. Ovo utiče na konstrukciju bioreaktora i na ukupno tehnološko postrojenje.

Uticaj hranljive podloge na koalescenciju mehurova gasa je od značaja za izbor uređaja za dispergovanje gasa (distributer gasa, mešalica sa impelerom) i samog bioreaktora. Kada hranljiva podloga suzbija koalescenciju, potrebno je intenzivno rasipanje energije u distributeru (dvofazna mlaznica, jedna mešalica) sa efektom koji je ograničen na njegovu neposrednu okolinu i, čak, fizičko izdvajanje gasnih mehurova. Naime, stvoreni mali mehurovi su jako stabilni u takvoj hranljivoj podlozi. Kada, međutim, hranljiva podloga favorizuje koalescenciju mehurova (na primer, u prisustvu antipenušavaca), rasipanje energije mora biti što je moguće uniformnije u čitavom bioreaktoru. Sitni mehurovi nastali pomoću efikasnog uređaja za dispergovanje gasa "rastu" vrlo brzo usled koalescencije ako dođu u oblast niskog rasipanja energije.

Reološke osobine hranljive podloge imaju vrlo veliki uticaj na izbor bioreaktora. Tečnosti niskog viskoziteta ne izazivaju nikakve probleme u odnosu na vreme mešanja i brzinu prenosa kiseonika, ukoliko se ne radi o mikroorganizmu koji vrlo brzo raste ili o bioreaktoru vrlo velike zapremine.

Povećanje viskoziteta može biti izazvano različitim faktorima, kao što su:

- visoka koncentracija supstrata (naročito u šaržnom bioreaktoru na početku bioprocasa),

- sekrecija jako viskoznih metabolita (na primer, polisaharida, naročito u šaržnom bioreaktoru na kraju perioda biosinteze proizvoda) i
- morfologija mikroorganizama (u šaržnom bioreaktoru na kraju faze rasta).

4.6.3. *Uticaj parametara procesa*

Najbitniji faktor koji određuje izbor bioreaktora za gajenje aerobnih mikroorganizama je njegov aeracioni kapacitet, tj. brzina prenosa kiseonika u datoj hranljivoj podlozi. Izbor bioreaktora i uslova aeracije i mešanja određen je potrebom mikroorganizma za kiseonikom. Po uprošćenom pravilu, sa povećanjem koncentracije hemijski vezanog kiseonika u supstratu, koeficijent prinosa biomase u odnosu na kiseonik se povećava, a potreba mikroorganizma za kiseonikom opada.

Pošto su brzina rasta i biosinteze proizvoda zavisne od temperature, bioprocesi se, po pravilu, izvode u uslovima kontrolisane temperature. Da bi se olakšalo hlađenje tj. odvođenje toplote iz bioreaktora, preporučuje se upotreba termofilnih mikroorganizama. Sa povećanjem zapremine bioreaktora otežava se odvođenje toplote, pa se može se dostići granica veličine zapremine kada se oslobođena toplota bioprocasa ne može odvesti samo pomoću omotača, već je potrebno ugraditi dodatni razmenjivač u bioreaktor ili ga treba postaviti van bioreaktora (eksterno hlađenje).

4.6.4. *Problemi pri izboru bioreaktora*

Nije moguć jednoznačan stav kada je u pitanju izbor bioreaktora, posebno ako se razmatraju prednosti i nedostaci različitih tipova. Praksa pokazuje da je klasični bioreaktor sa mešanjem i pneumatičkom aeracijom najkorišćeniji tip bioreaktora. Ovakav izbor se vrši i pored nekih analiza koje su pokazale da "air-lift" bioreaktor i bioreaktor sa cirkulacijom tečnosti (do zapremine od 1 m³) imaju prednost nad klasičnim bioreaktorom sa mehaničkim mešanjem u slučaju hranljivih podloga i niskog viskoziteta. Zapremine bioreaktora sa mešalicom koji se koriste u industriji su do 400 m³ (na primer, u proizvodnji antibiotika) sa potrošnjom snage do 5 kW/m³ i sa viskozitetima podloge do 2 Pa·s. Mešalica je obično tipa turbinske, sa više impelera na istom vratilu.

Drugi tip bioreaktora koji se, takođe, široko primenjuje u mnogim bioprocasima je bioreaktor tipa barbotažne kolone, čija zapremina se kreće i do 4.000 m³, uz relativno nisku potrošnju snage do 3,5 kW/m³·h. Ova vrsta bioreaktora koristi se za dobijanje proteina jednoćelijskih mikroorganizama, pekarskog kvasca, sirćetne kiseline, steroida, prečišćavanja otpadnih voda itd.

Bezuslovno, pre izbora bioreaktora mora se izabrati mesto za gradnju pogona. Na taj izbor utiču brojni faktori:

- izvori prirodnih sirovina i troškovi (na primer, šećer u obliku skroba, melase, glukoznog sirupa),
- tržišni kapaciteti u odnosu na proizvode i sirovine,
- raspoloživost i kvalifikacije radne snage,
- karakteristike tržišta (stabilna prodaja – jedno postrojenje; promenljiva prodaja – fleksibilno postrojenje),
- cena i raspoloživost energije i vode (pod određenim uslovima bolje je raditi sa velikim kapacitetom i nižom produktivnošću da bi se uštedela energija),

- regulativa vezana za rad i sigurnost,
- regulativa vezana za zaštitu životne sredine i
- mogućnost ekonomičnog korišćenja sporednih proizvoda.

Načelno, postrojenje treba, kad god je to moguće, planirati za više različitih proizvoda, tako da se obezbedi njegovo ekonomično korišćenje. Investiciona ulaganja u bioreaktor se beznačajno menjaju od proizvoda do proizvoda, dok se ulaganja u postupke izolovanja proizvoda menjaju u ekstremno širokim granicama.

U zavisnosti od planiranog kapaciteta postrojenja, broj bioreaktora ne sme da bude ispod nekog minimuma. Iskustvo pokazuje da, čak i kada se postrojenje koristi za dobijanje samo jednog proizvoda, fleksibilnim projektovanjem obezbeđuju se rezerve za slučaj povećane potrošnje energije i povećanja proizvodnog kapaciteta.

U slučaju kada se u toku fermentacije održava pH na optimalnom nivou, poželjno je pH hranljive podloge održavati na što je moguće nižem nivou, da bi se sprečila moguća kontaminacija drugim neželjenim mikroorganizmima.

5. FENOMENI PRENOSA U BIOPROCESNOM INŽENJERSTVU

Pod fenomenima prenosa u biohemijском inženjerstvu se podrazumevaju:

- prenos količine kretanja,
- prenos toplote i
- prenos mase.

5.1. PRENOS KOLIČINE KRETANJA

Prenos količine kretanja se analizira, pre svega, u sistemima sa proticanjem fluida ili mešanjem.

Proticanje fluida kroz cev se karakteriše pomoću Reynolds-ovog broja Re koji povezuje prečnik cevi i gustinu, brzinu i viskozitet fluida:

$$Re = \frac{\rho v d}{\mu} \quad (5.1)$$

gde je: d – prečnik cevi, v – brzina strujanja fluida, ρ – gustina fluida i μ – viskozitet fluida.

Zavisno od veličine Reynolds-ovog broja, režim strujanja fluida kroz cev može biti: laminarni ($Re < 2.100$), preobražajni ($2.100 < Re < 10.000$) ili turbulentni ($Re > 10.000$).

Kod sudova sa mešanjem, Reynolds-ov broj Re_i (indeks i potiče od reči impeler – mešać) zavisi od prečnika i brzine obrtanja mešalice:

$$Re_i = \frac{\rho N_i D_i^2}{\mu} \quad (5.2)$$

gde je:

N_i – broj obrtaja mešalice,

D_i – prečnik mešalice,

ρ – gustina fluida i

μ – viskozitet fluida.

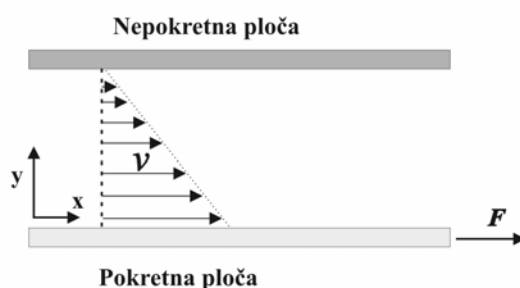
U ovom slučaju, laminarni režim strujanja je u oblasti Reynoldsovog broja $Re < 10$.

Dakle, priroda strujanja fluida zavisi od vrste i geometrije sistema, brzine strujanja i fizičkih osobina fluida (gustina, viskozitet).

5.1.1. Reološko ponašanje fluida

Fenomeni koji se javljaju pri strujanju tečnosti pod dejstvom spoljnih sila, mogu se lako uočiti i objasniti na slučaju dve paralelne ploče između kojih se nalazi fluid (slika 5.1). Ako se donja ploča pomera u pravcu x -ose, onda je sila kojom se ta ploča mora vući proporcionalna promeni brzine fluida, u pravcu y -ose, koju je izazvalo pomeranje ploče u pravcu x ose, sa promenom rastojanja po y -osi, tj.:

$$F \propto \mu \frac{dv}{dy} \quad (5.3)$$



Slika 5.1 Prenos količine kretanja sa pokretne ploče na fluid

Odnos sile kojom se vuče ploča i površine ploče predstavlja *napon smicanja*:

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (5.4)$$

gde je: τ – napon smicanja, F – vučna sila i A – površina ploče. Napon smicanja proporcionalan je gradijentu brzine strujanja fluida:

$$\tau \propto \frac{dv}{dy} \quad (5.5)$$

Koeficijent proporcionalnosti u jednačini (5.5), koji se obeležava se μ odgovara viskozitetu fluida. Na taj način je:

$$\tau = -\mu \frac{dv}{dy} \quad (5.6)$$

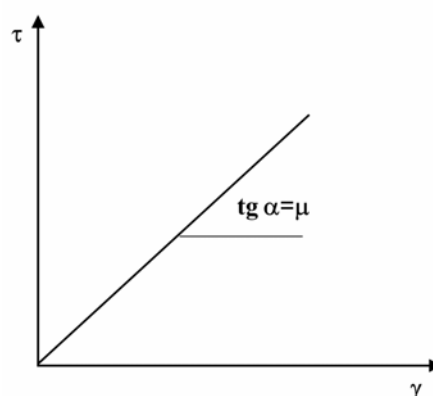
Znak (–) ukazuje da je gradijent brzine u pravcu dejstva sile F negativan. Član $-dv/dy$ naziva se *brzina smicanja* i obeležava se sa γ :

$$\gamma = - \frac{dv}{dt} \quad (5.7)$$

Grafička zavisnost napona smicanja od brzine smicanja data je na slici 5.2, pri čemu je nagib prave, zapravo, viskozitet fluida.

Jednačina (5.6) predstavlja Njutnov zakon viskoziteta, prema kome brzina smicanja ne utiče na viskozitet, tj. viskozitet ne zavisi od stepena mešanja. Fluidi koji podležu ovom zakonu nazivaju se *njutnovski fluidi*.

Fluidi koji ne podležu Njutnovom zakonu, tako da njihov viskozitet zavisi od brzine smicanja, zovu se *nenjutnovski fluidi*. Njihovo ponašanje opisuje se sledećom opštom jednačinom za napon smicanja:



Slika 5.2 Zavisnost napona smicanja od brzine smicanja

$$\tau = \tau_0 + k\gamma^n \quad (5.8)$$

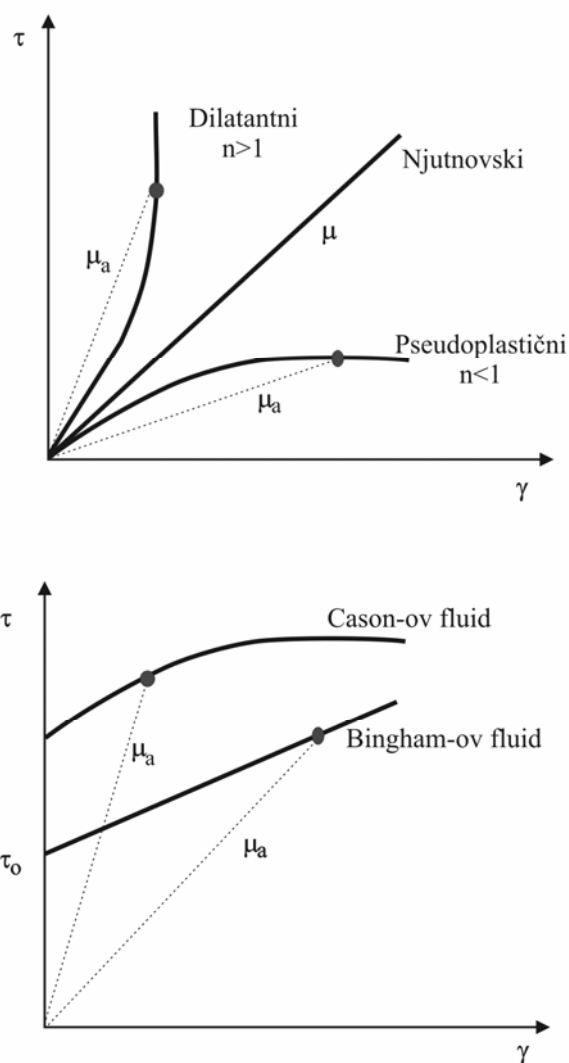
gde je: k – faktor konzistencije, n – indeks toka, a τ_0 – početni napon smicanja.

Prema vrednostima parametara jednačine (5.8), postoji više nenjutnovskih fluida, čije su korelacije za napon smicanja i viskozitet date u tabeli 5.1. Grafički prikaz zavisnosti napona smicanja od brzine smicanja za nenjutnovske fluide je dat na slici 5.3.

Tabela 5.1 Korelacija napona smicanja i viskoziteta za pojedine fluide

Tip fluida	Početni napon smicanja	Indeks toka	Napon smicanja	Viskozitet
Njutnovski fluid	0	0	$\tau = - \mu \frac{dv}{dy}$	μ
Pseudoplastični fluid	0	<1	$\tau = k\gamma^n$	$\mu_a = k\gamma^{n-1}$
Dilatantni fluid	0	>1	$\tau = k\gamma^n$	$\mu_a = k\gamma^{n-1}$
Cason-ov fluid	τ_0	0,5	$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} + k\gamma^{1/2}$	$\mu_a = \left[\left(\frac{\tau_0}{\gamma} \right)^{1/2} + k \right]^2$
Bingham-ov fluid	τ_0	1	$\tau = \tau_0 + k\gamma$	$\mu_a = \frac{\tau_0}{\gamma} + k$

Napomena: Viskozitet μ_a je tzv. prividni viskozitet.



Slika 5.3 Zavisnost napona smicanja od brzine smicanja za pojedine fluide

Za sisteme sa mešanjem pseudoplastičnih fluida koristi se modifikovani Reynolds-ov broj:

$$\text{Re} = \frac{\rho N_i^{2-n} D_i^2}{k} \left(\frac{n}{6n+2} \right)^n \quad (5.9)$$

Primeri različitih tipova fluida dati su u tabeli 5.6. Najveći broj fermentacionih tečnosti ima karakteristike pseudoplastičnih fluida, dok se dilatantni tip fluida ne sreće u biotehnologiji.

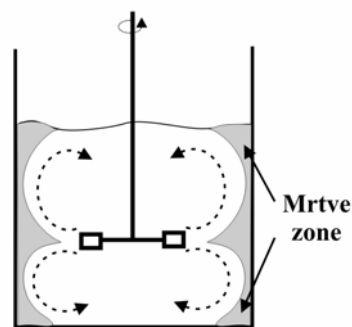
Tabela 5.2 Primeri različitih tipova fluida

<i>Tip fluida</i>	<i>Primeri</i>
Njutnovski fluid	Voda, gasovi, vodeni rastvori soli...
Pseudoplastični fluid	Lepkovi, polimerni rastvori, suspenzije štirka, majonez, papirne pulpe
Dilatantni fluid	Neki rastvori šećera, mokar pesak, cementne suspenzije...
Cason-ov fluid	Krv, paradajz sos, sok pomorandže, rastopljena čokolada, štamparske boje ...
Bingham-ov fluid	Margarin, neki deterdženti, masti...

5.1.2. Prenos količine kretanja mešanjem

U biotehnološkim procesima, proizvodni mikroorganizmi, reološke osobine i mešanje hranljive podloge imaju odlučujući uticaj na stepen promena hidrodinamičkih uslova, razmenu toplote i prenos mase. Prenos količine kretanja utiče na homogenost hranljive podloge i od presudnog je uticaja na ostale fenomene prenosa u bioreaktoru. Da bi se postiglo dobro mešanje u fermentoru, neophodno je obezbediti *makromešanje* pomoću mešalice, koja izaziva intenzivan cirkulacioni tok, tj. konvektivno strujanje tečnosti u bioreaktoru. *Mikromešanje* u bioreaktoru, mada je poželjno, nije od presudne važnosti kao makromešanje.

Pri određenim uslovima mešanja, viskozitet presudno utiče na prirodu. Veliki viskozitet i nenjutnovsko ponašanje uzrokuju slabiju homogenost hranljive podloge zbog formiranja stagnantnih tzv. „mrtvih” zona, u bioreaktoru (slika 5.4). U mrtvim zonama je moguća pojava čak i potpuno mirnog fluida. Sve ovo veoma loše utiče na tok i rezultat bioprocesa, pa može dovesti i do promene metabolizma mikroorganizma i smanjenja prinosa. Takođe, loše mešanje uzrokuje nestabilnost rada sistema za kontrolu i regulaciju procesa. Prenos toplote u sudu sa omotačem odvija se na granici zid reaktora – hranljiva podloga.



Slika 5.4 Formiranje stagnantnih ("mrtvih zona") pri mešanju tečnosti

U slučaju lošeg mešanja i pojave mrtvih zona, kao i zbog činjenice da je pri malim smicajnim naponima, uz zid, viskozitet pseudoplastičnih fluida povećan, javlja se mali temperaturni gradijent između tečnosti u razmenjivaču i fermentacione tečnosti u bioreaktoru. To dovodi do neefikasnog prenosa toplote u bioreaktoru. Pored toga, na površinama za razmenu toplote se talože proteinske frakcije i mikrobne ćelije, zbog čega se smanjuje koeficijent prelaza toplote sa bioreaktora.

Prenos mase zavisi isključivo od brzine i intenziteta mešanja, koji zavise od reoloških osobina fluida. Veliki viskozitet smanjuje prenos mase kiseonika iz gasne u tečnu fazu. U tom slučaju,

prenos mase se odigrava samo u zoni oko mešalice, a dolazi i do koalescencije mehurova, dok se u mrtvim zonama, posebno blizu zida bioreaktora, javljaju zarobljeni mehurovi sa malim sadržajem kiseonika ili bez njega, koji se dugo zadržavaju u biorektoru. Nedostatak hranljivih sastojaka, usled smanjenog prenosa mase, vodi manjoj proizvodnosti, a može doći i do promene morfološkog oblika, pa i do potpune promene rezultata bioprocasa.

5.1.3. Izbor mešalice

Za mešanje nenjutnovskih fluida koriste se dve vrste mešalice:

- mešalice sa malom brzinom obrtanja i
- mešalice sa velikom brzinom obrtanja.

Prvi tip mešalice izaziva kretanje fluida pumpanjem (spiralne, trakaste mešalice) ili veličinom i oblikom lopatica (okvirne mešalice), dok drugi tip prenose količinu kretanja pri velikoj brzini obrtanja (turbinske ili lopataste mešalice).

Pri mešanju pseudoplastičnih fluida dolazi do smanjenja njegovog prividnog viskoziteta sa povećanjem brzine obrtanja mešalice (povećavaju se brzine smicanja). Smanjenje viskoziteta je najveće u zoni mešalice. Sa udaljenjem od vratila mešalice viskozitet se povećava. Stoga je potrebno veoma intenzivno mešanje fluida, da bi se izbeglo formiranje mrtvih zona. U tom cilju se koriste mešalice sa velikom brzinom obrtanja. Ovaj tip mešalice veoma efikasno disperguje gas, a njen osnovni nedostatak je brzo smanjenje smicajnih napona sa udaljenjem od vratila mešalice. Ovo dovodi do kanalisanja struje gasa uz vratilo mešalice, što smanjuje brzinu prenosa mase kiseonika. Primer ovog tipa mešalice je Rushton-ova turbinska mešalica sa diskom.

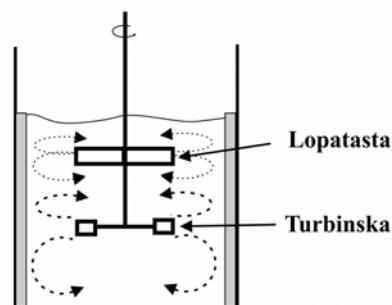
Za različite micelijske fermentacione tečnosti postoje optimalni tipovi mešalice ili kombinacije različitih tipova mešalice. Osnovni uslovi, koji se moraju zadovoljiti, su homogenost hranljive podloge i kontinualnost micelijskog tkiva. Pri mešanju, usled intenzivnog smicajnog napona uz samu mešalicu, može doći do destrukcije micelijskog tkiva, koje se pri nedovoljno homogenom mešanju može istaložiti. Da bi se intenzitet mešanja povećao, može se:

- povećati veličina turbina na mešalici,
- povećati brzina obrtanja mešalice,
- koristiti veći broj mešalica na istom vratilu sa manjom brzinom mešanja i
- konstruisati specijalna mešalica odgovarajuća za dati sistem.

Povećanje prečnika i brzine obrtanja turbinske mešalice zahteva veću spoljnu snagu na vratilu. Mešalice sa manjom brzinom obrtanja se mogu koristiti za mešanje nenjutnovskih fluida kada se radi sa neaerisanim sistemima. Sidrasta mešalica se koristi kod male brzine obrtanja vratila.

Više mešalica na zajedničkom vratilu obezbeđuje efikasnije mešanje i bolji prenos mase nego turbinska mešalica (slika 5.5). Kombinacijom turbinske mešalice i lopataste mešalice sa kosim lopaticama, može se poboljšati ukupan efekat mešanja. Turbinska mešalica se uvek postavlja bliže dnu bioreaktora, radi efikasnijeg dispergovanja gasne faze, a lopatasta mešalica se postavlja bliže površini fluida, tako da pumpa fluid ka dnu. Uduvavanje gasa ne menja značajno model strujanja, iako gas može suzbiti strujanje fluida (plavljenje mešalice). Pri korišćenju dve mešalice dolazi do dodatnog dispergovanja većih mehurova u zoni između mešalica.

Pozitivni efekti mešanja i aeracije viskoznih fluida mogu se postići i posebnim konstrukcijama mešalica ili konstrukcijom bioreaktora sa unutrašnjom cevi i dve mešalice. Cilj konstrukcija specijalnih mešalica jeste postizanje većih brzina mešanja sa manjim utroškom snage od standardnih mešalica, a razlikuju se od slučaja do slučaja, posebno kada se radi o bioprocesima sa mikroorganizama sa micelijskim rastom.

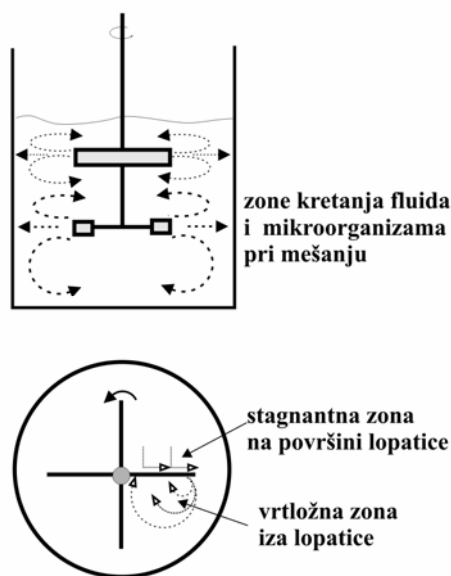


Slika 5.5 Način mešanja sa dve mešalice u bioreaktoru

5.1.4. Uticaj mehaničkih sila na mikroorganizme

Sile smicanja koje se javljaju pri mešanju uzrokuju destrukciju (oštećenje ili hidrodinamički šok) mikroorganizama. Ovo može dovesti do negativnog efekta na ukupan bioproces. Mikroorganizam može pretrpeti fizičko oštećenje pri velikom intenzitetu mešanja, ali se smatra da je on oštećen samo ukoliko to izaziva negativne efekte na ukupan rezultat bioprocasa. Ponekad, mehaničko oštećenje može imati pozitivan efekat na željeni rezultat bioprocasa, dok se u određenim slučajevima može zaključiti da je mikroorganizam oštećen, čak iako nije pretrpeo fizička oštećenja i ima dobar rast, zato što je biosinteza željenog proizvoda smanjena.

Mehanizam oštećenja mikroorganizma. Mehanizam delovanja mešalice je sledeći. Pri mešanju, na prednjoj strani mešalice formira se stagnantna zona, po radijalnom pravcu ka vrhu mešalice dolazi do jakog ubrzanja, dok se u zoni iza lopatice formira zona niskog pritiska sa vrtlozima koji se udaljavaju od lopatice (slika 5.6). Jednoćelijski mikroorganizmi su osetljivi na delovanja u prvoj zoni. Micelijski mikroorganizmi su osetljivi na delovanja u drugoj zoni, ako su izloženi silama smicanja većim od kritične sile kidanja. Višestruko ponavljanje navedenih uticaja može dovesti do zamora ćelija, ali u određenim slučajevima može doći i do adaptacije mikroorganizama na hidrodinamičke uslove u bioreaktoru.

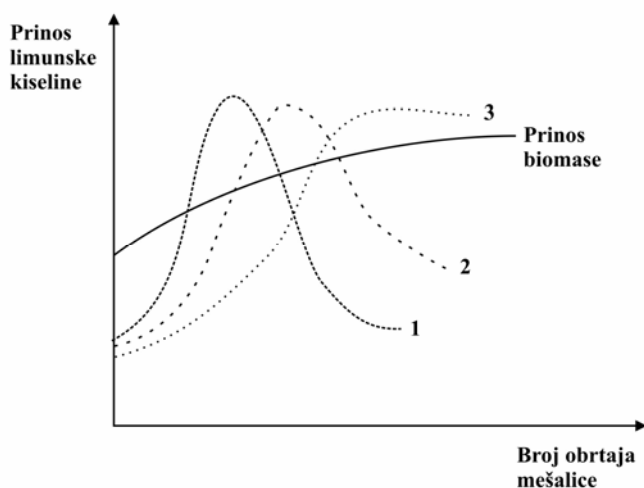


Slika 5.6 Grafički prikaz mehanizama delovanja mešalice

Efekti mehaničkih sila na ćelije mikroorganizama se odražavaju na:

- promenu morfološkog oblika,
- oslobađanje intraćelijskog materijala i promene u metabolizmu,
- brzinu mikrobnog rasta i
- brzinu sinteze proizvoda.

Hidrodinamičke sile utiču na brzinu mikrobnog rasta i sinteze proizvoda. Na primeru sinteze limunske kiseline pomoću tri soja mikroorganizama *Aspergillus niger* može se videti da se prinos biomase povećava sa povećanjem brzine mešanja, dok se prinos limunske kiseline prvo povećava, dostiže maksimum, a zatim opada (slika 5.7). Brzina mešanja, pri kojoj se postiže maksimum proizvodnosti, karakteristična je za svaki soj. Mali prinos limunske kiseline pri malim brzinama mešanja se može objasniti nedostatkom kiseonika za normalan rast micelijuma. Opadanje prinosa limunske kiseline pri relativno velikim brzinama mešanja se objašnjava oštećenjem mikroorganizama. Nepoznato je da li do oštećenja dolazi samo pri velikim brzinama ili u širokom opsegu brzina, pa se efekat maksimalnog prinosa javlja kao zajednički efekat nedovoljne aeracije i oštećenja mikroorganizama.



Slika 5.7 Uticaj broja obrtaja mešalice na prinos limunske kiseline tri soja *A. niger*

Efekat hidrodinamičkih parametara je najbolje eksperimentalno proveriti u uslovima koji su što približniji realnim sistemima u kojima će se odvijati bioproces.

5.1.5. Izračunavanje vremena i snage mešanja

Mešanje treba da obezbedi homogene okolne uslove u svim delovima bioreaktora. Najkritičniji uslov je održavanje potrebne koncentracije rastvorenog kiseonika. Dve osnovne veličine kojima se definiše kvalitet mešanja su *vreme mešanja* i *snaga mešanja*.

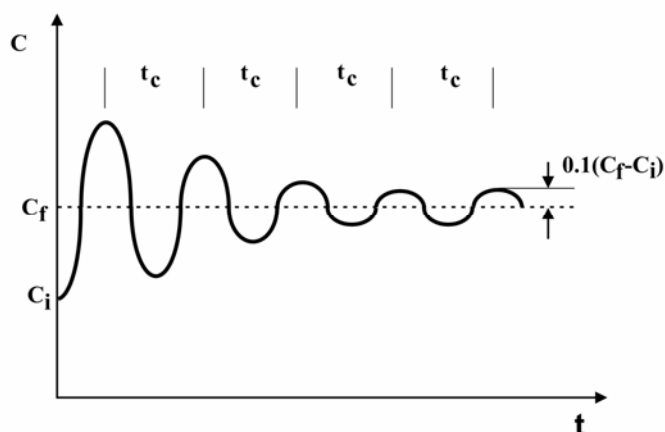
Vreme mešanja je parametar koji određuje efikasnost mešanja u datom sistemu tečnost – bioreaktor – mešalica. To je vreme za koje se u datom sistemu postigne zadovoljavajući nivo homogenosti fermentacione tečnosti. Za mnoge bioreaktore u režimu potpuno razvijenog turbulentnog strujanja, vreme mešanja se može izračunati na osnovu empirijskih korelacija, koje se mogu naći u literaturi. Kada su u pitanju pseudoplastični i dilatantni fluidi, ne postoje korelacije za vreme mešanja, pa se ono određuje eksperimentalno. U ovom eksperimentu se obeležena supstanca ubacuje u bioreaktor i na određenom mestu prati promena njene koncentracije sa vremenom. Najčešće korišćene obeležene supstance su kiseline, baze i rastvori soli. Kiseline i baze utiču na promenu pH, a soli na promenu električne provodljivosti. Jednostavnim merenjem pH ili električne provodljivosti na određenom mestu u bioreaktoru se može pratiti njihova promena sa vremenom, kao posledica mešanja fluida. Grafičkim prikazom promene koncentracije sa vremenom se može doći do vrednosti potrebnog vremena mešanja, slika 5.8.

Određivanje vremena mešanja zavisi od stepena zahtevane homogenizacije, ali se uobičajeno uzima da je u sistemu sa jednom fazom u bioreaktoru sa odbojnicima i relativno malom mešalicom, odnos vremena mešanja i cirkulacionog vremena dat izrazom:

$$t_m = 4t_c \quad (5.10)$$

gde je t_m – vreme mešanja, a t_c – cirkulaciono vreme. Ponegde se, kao praktično vreme mešanja, uzima vreme potrebno za 5 potpunih cirkulacija zapremine tečnosti u bioreaktoru. Industrijski bioreaktori sa zapreminom od 1 do 100 m³ imaju vreme mešanja od 30 do 120 s, zavisno od uslova mešanja.

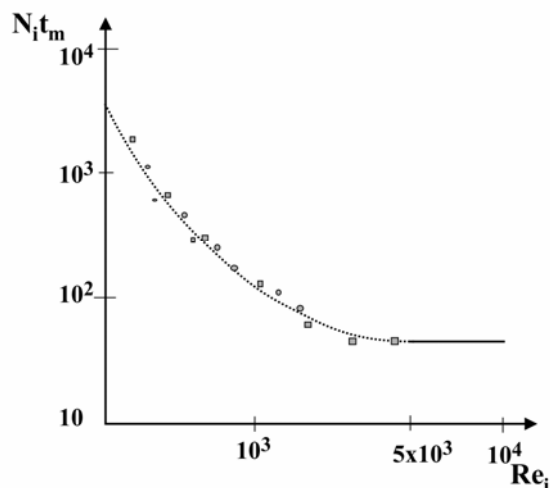
Slika 5.8 Grafički postupak dobijanja optimalne vrednosti potrebnog mešanja (c_i – početna koncentracija obeležene supstance u reaktoru, c_f – koncentracija obeležene supstance u bioreaktoru nakon potpunog umešavanja i t_c – cirkulaciono vreme ili vreme za koje se ponovo javi pik koncentracije na datom mernom mestu)



Vreme mešanja zavisi od veličine bioreaktora, prečnika i tipa mešalice i osobina fluida. Ove relacije se određuju eksperimentalno. Za turbinsku mešalicu Rushton-ovog tipa, u širokom opsegu sistema, utvrđeno je bezdimenziono vreme mešanja $N_i t_m$ zavisi od Reynolds-ovog broja, kao što je prikazano na slici 5.9. Zapaža se da za vrednosti Re_i broja iznad $5 \cdot 10^3$, vrednost $N_i t_m$ postaje konstantna i može se predstaviti jednačinom:

$$N_i t_m = \frac{1,54 \cdot V}{D_i^3} \quad (5.11)$$

gde je: D_i – prečnik mešalice i V – zapremina tečnosti.



Slika 5.9 Zavisnost bezdimenzionog vremena mešanja $N_i t_m$ od Reynoldsovog broja za turbinsku mešalicu Rushton-ovog tipa

Snaga mešanja se određuje na osnovu zavisnosti bezdimenzionog faktora snage mešanja od Reynoldsovog broja mešanja, jednačina (5.2) i (5.9), koja proizilazi iz dimenzione analize. Faktor snage mešanja je definisan sledećom jednačinom:

$$N_p = \frac{P}{N^3 D_i^5 \rho_L} \quad (5.12)$$

gde su: N_p – faktor snage mešanja, P – spoljna snaga mešanja, N_i – brzina obrtanja mešalice, D_i – prečnik mešalice i ρ_L – gustina tečnosti. Zavisnosti faktora snage mešanja od Reynoldsovog broja mešanja za različite tipove mešalica (turbinske, lopataste i propelerske), koje su utvrđene eksperimentalno, prikazane su na slici 5.10.

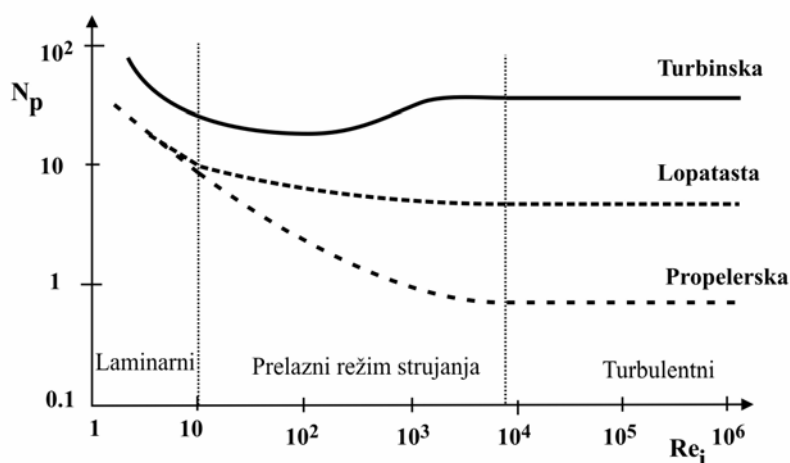
Za laminarni režim strujanja u sudu sa mešalicom važi:

$$N_p = K_l (\text{Re})^{-1} \quad (5.13)$$

Nakon preuređenja, dobija se:

$$P = K_l \mu D_i^3 N^2 \quad (5.14)$$

Dakle, snaga mešanja u laminarnom režimu zavisi od viskoziteta tečnosti, prečnika mešalice i brzine obrtanja mešalice, dok ne zavisi od gustine tečnosti.



Slika 5.10 Zavisnost faktora snage mešanja od Reynolds-ovog broja mešanja za različite tipove mešalica

Za turbulentni režim strujanja faktor snage mešanja je konstantan i ne zavisi od Reynolds-ovog broja:

$$N_p = \frac{P}{N^3 D_i^5 \rho_L} = K_t \quad (5.15)$$

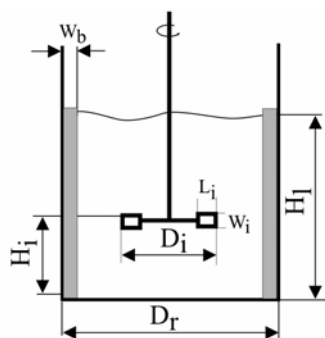
Preuređenjem ove jednačine dobija se:

$$P = K_t N^3 D_i^5 \rho_L \quad (5.16)$$

što znači da snaga mešanja zavisi gustine tečnosti, prečnika mešalice i brzine obrtanja mešalice, dok ne zavisi od viskoziteta tečnosti. Vrednosti konstanti K_l i K_t za različite tipove mešalica su date u tabeli 5.3.

Tabela 5.3 Vrednosti konstanti K_l i K_t u zavisnosti od tipa mešalice

Tip mešalice	K_l	K_t
Turbinska	70	5–6
Lopatasta	35	2
Propelerska	40	0,35
Sidrasta	420	0,35
Helikoidna	1000	0,35



Slika 5.11 Oznake geometrijskih karakteristika standardnog bioreaktora sa mehaničkom mešalicom

Za prelazni režim strujanja ne postoje odgovarajuće korelacije između faktora snage i Reynolds-ovog broja.

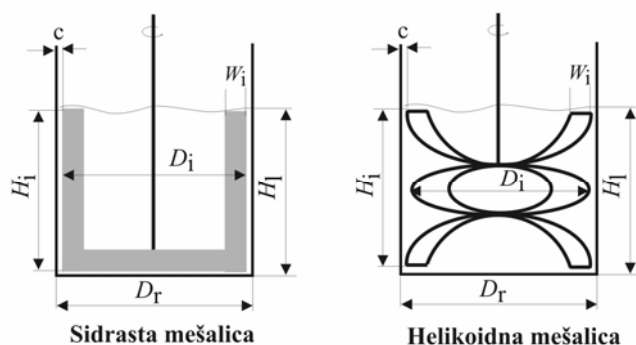
Prečnik mešalice značajno utiče na zadržanu snagu mešanja. U turbulentnom režimu, povećanje prečnika mešalice za 10%, izaziva povećanje snage mešanja i do 60%, a povećanje broja obrtaja mešalice za 10% izaziva povećanje potrebne snage za 30%.

Da bi se proces mešanja, na osnovu iskustva, unapred mogao definisati, neophodno je koristiti usvojene standarde geometrijskih karakteristika bioreaktora sa mehaničkom mešalicom (slika 5.11 i tabela 5.4).

Tabela 5.4 Vrednosti geometrijskih karakteristika standardnog bioreaktora sa mehaničkom mešalicom različitog tipa

Tip mešalice	$\frac{D_i}{D_r}$	$\frac{H_l}{D_r}$	$\frac{W_i}{D_i}$	$\frac{L_i}{D_i}$	$\frac{H_i}{D_i}$	$\frac{W_b}{D_r}$	Broj odbojnika
Turbinska	0,33	1	0,2	0,25	1	0,1	4
Lopatasta	0,33	1	0,25	-	1	0,1	4
Propelerska	0,33	1	-	-	1	0,1	4

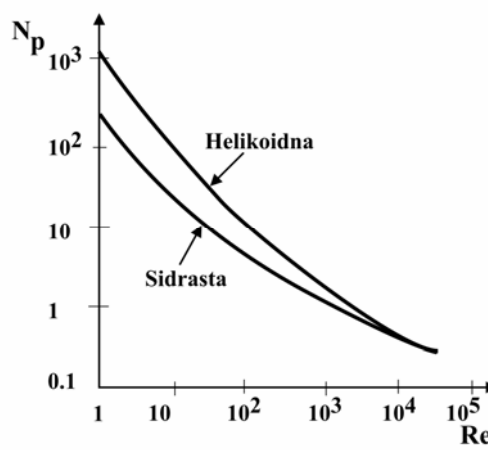
Zavisnost faktora snage mešanja od Reynolds-ovog broja za sidrastu i helikoidnu mešalicu, za specificirane geometrijske odnose (slika 5.12 i tabela 5.5), prikazana je na slici 5.13 i u tabeli 5.5.



Slika 5.12
Geometrijski odnosi bioreaktora i mešalice za sidrastu i helikoidnu mešalicu

Tabela 5.5. Vrednosti geometrijskih karakteristika bioreaktora mešalice sidrastog i helikoidnog tipa

<i>Tip mešalice</i>	$\frac{D_C}{D_i}$	$\frac{c}{D_i}$	$\frac{W_i}{D_i}$	$\frac{H_i}{D_i}$
Sidrasta	1,02	0,01	0,1	1
Helikoidna (trakasta)	1,02	0,01	0,1	1

Slika 5.13 Zavisnost snage mešanja od Reynolds-ovog broja za sidrastu i helikoidnu mešalicu

Kada se geometrijske karakteristike sistema razlikuju od standardnih, onda se koristi korekcionni faktor:

$$f_c = \sqrt{\frac{\frac{D_C}{D_i} \cdot \frac{H_L}{D_i}}{\left(\frac{D_C}{D_i}\right)_{\text{stand}} \left(\frac{H_L}{D_i}\right)_{\text{stand}}}} \quad (5.17)$$

Sve izračunate vrednosti, dobijene na osnovu korelacija koje podrazumevaju standardne sisteme (indeks: *stand*), množe se korekcionim faktorom f_c , kao, na primer, za snagu mešanja:

$$P = P_{\text{stand}} f_c \quad (5.18)$$

Često se kod nestandardnih sistema, kao stepen sigurnosti, izračunati korekcionni faktor uvećava ili smanjuje za 30%, u zavisnosti od smera u kome se sigurnost postiže. Kada je reč o potrebnoj snazi mešanja, korekcionni faktor se uvećava za 30%, pa je:

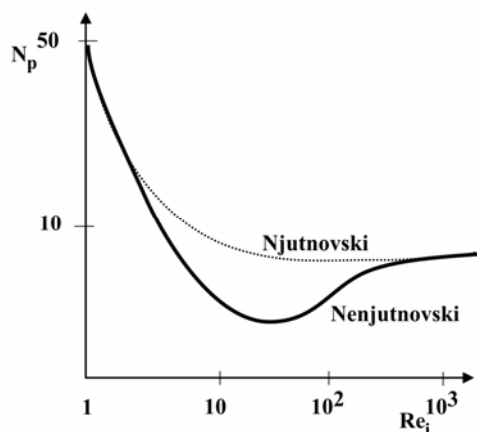
$$f_c^* = 1,3 \cdot f_c \quad (5.19)$$

Kada postoji više mešalica na zajedničkom vratilu, onda se moraju zadovoljiti sledeći uslovi u pogledu rastojanja između mešalica i broja mešalica:

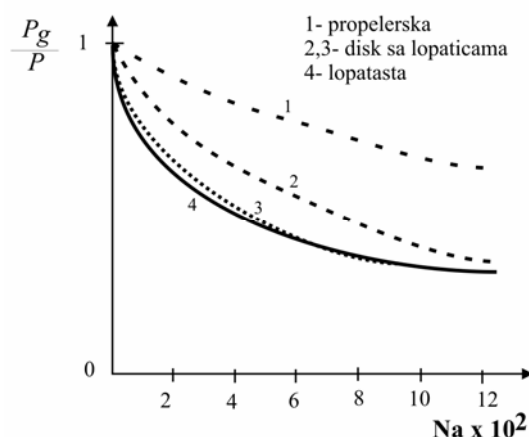
$$D_i < H_i < 2D_i$$

$$\frac{H_L - 2D_i}{D_i} < N_i < \frac{H_L - D_i}{D_i} \quad (5.20)$$

gde su: H_i – rastojanje između mešalica, H_L – visina tečnosti u sudu i N_i – broj mešalica.



Slika 5.14 Zavisnost snage od Reynolds-ovog broja za nenjutoske fluide



Slika 5.15 Odnos snage mešanja aerisanog i neaerisanog fluida u zavisnosti od Reynolds-ovog broja

Hranljive podloge se u mnogim slučajevima ponašaju kao nenjutnovski fluide. Kod ovih sistema, potrošnja snage za savlađivanje viskoznih sila može biti dominantna. Postoje mnogi modeli koji opisuju ponašanje nenjutnovskih fluida, a proračun se svodi na izračunavanje, već definisanog, modifikovanog Reynolds-ovog broja (jednačina 5.9) i određivanja faktora snage iz grafičke zavisnosti date na slici 5.14.

Uvođenjem gasa u tečnost, deo njegove energije se troši i na mešanje što dovodi do smanjenja potrebne snage za mehaničko mešanje. Obično se odnos snaga mešanja aerisanog i neaerisanog fluida prikazuje kao zavisnost od aeracionog broja (slika 5.15):

$$\frac{P_g}{P} = f(N_a) \quad (5.21)$$

gde je N_a – aeracioni broj definisan kao bezdimenzioni odnos zapreminskog protoka gasa Q_v i $N_i D_i^3$:

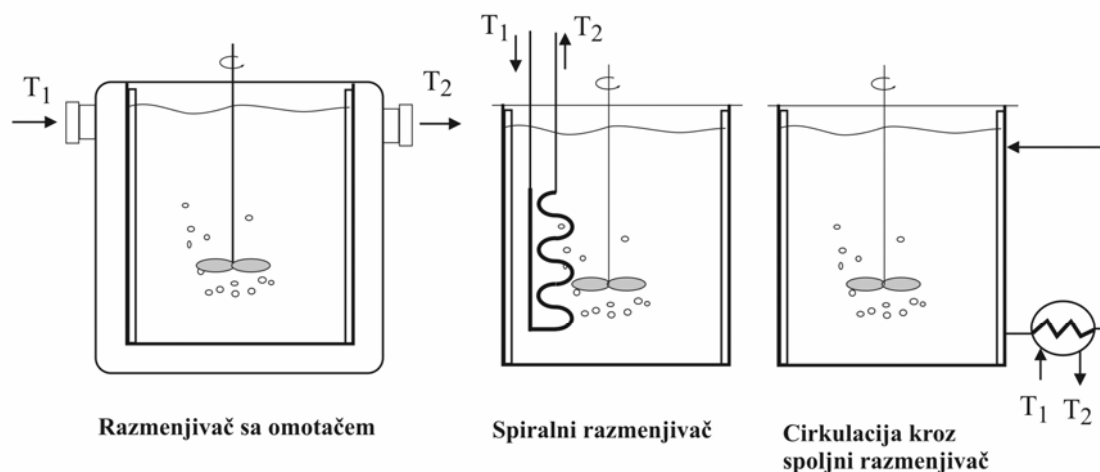
$$N_a = \frac{Q_v}{N_i D_i^3} \quad (5.22)$$

Osnovni razlog za proučavanje sistema sa aeracijom i sistema bez aeracije, sa aspekta snage mešanja, je u tome što je moguće, na osnovu laboratorijskih merenja, predvideti potrebnu snagu za proces u industrijskim razmerama, pri uvećanim dimenzijama (*scale-up*).

5.2. PRENOS TOPLOTE U BIOREKTORIMA

U svakom biotehnološkom procesu se vrši razmena toplote, bilo da se radi o sterilizaciji bioreaktora i hranljive podloge, termostatisiranja bioreaktora tokom procesa, sušenja proizvoda i drugo. Ovde će se razmatrati razmena toplote samo tokom odvijanja bioprocesa, koja je vezana za metabolizam proizvodnog mikroorganizma.

U najvećem broju bioprocesa brzina razvijanja toplote je veća od brzine kojom se ona gubi u okolinu, pa se hranljiva podloga mora hladiti, za razliku od anaerobnih procesa, poput anaerobne digestije na 60 °C, kada se toplota mora dovoditi u sistem. Razmena toplote se obavlja pomoću razmenjivača različitih konstruktivnih rešenja (slika 5.16), od kojih svaki ima i dobre i loše karakteristike, tako da ne postoji univerzalno rešenje.



Slika 5.16 Bioreaktori sa različitim razmenjivačima toplote

Razmena toplote se vrši pomoću više konstruktivnih rešenja:

- preko spoljašnjeg omotača (duplikatora),
- spiralnog razmenjivača toplote smeštenog u biorektoru,
- cirkulacijom fermentacione tečnosti kroz spoljnu petlju sa razmenjivačem i
- faznom promenom (kondenzacijom ili isparavanjem).

Tipične vrednosti ukupnog koeficijenta prenosa toplote za neke razmenjivače toplote date su u tabeli 5.6.

Tabela 5.6 Tipične vrednosti ukupnog koeficijenta prenosa toplote za neke tipove razmenjivača

<i>Razmenjivač toplote</i>	<i>K, W/m²K</i>
Omotač	1.000
Spiralni u bioreaktoru	1.400
Pločasti	2.300

Sistemi sa duplikatorom koriste se kod laboratorijskih i poluindustrijskih bioreaktora. Kada se menja brzina bioprocesa menja se i specifična snaga mešanja sa promenom veličine bioreaktora, površina potrebna za razmenu toplote menja se sa kvadratom, a toplota koju treba razmeniti menja se sa trećim stepenom. Pri projektovanju i izgradnji bioreaktora velikih zapremina o ovome se mora posebno voditi računa, kako bi razmena toplote bila dovoljna i efikasna.

U većim bioreaktorima se češće koriste spiralni (zmijasti) razmenjivači, koji su ugrađeni unutar bioreaktora, jer obezbeđuju bolju razmenu u odnosu na spoljni omotač. Osnovni problem koji se javlja kod ovog tipa razmenjivača je u mogućnosti pojave mikrobnog rasta u tankom sloju na cevi razmenjivača. Ovaj tip razmenjivača nije pogodan ukoliko se u bioprocusu izdvaja velika količina toplote, kada je pogodnije primeniti sistem sa cirkulacijom tečnosti kroz spoljnu petlju sa pločastim razmenjivačem toplote. Prednost ovog sistema je u tome što ne pravi probleme pri povećanju dimenzija bioreaktora.

5.2.1. Jednačina bilansa toplote

Bilansna jednačina za prenos toplote u bioprocusu ima oblik:

$$Q_F + Q_m + Q_a = Q_r + \Delta Q_0 + Q_i + Q_k + \Delta Q_v + Q_{ak} \quad (5.22)$$

gde je: Q_F – brzina oslobađanja toplote zbog mikrobnog rasta, Q_m – brzina razvijanja toplote zbog mehaničkog mešanja, Q_a – brzina razvijanja toplote zbog aeracije, Q_r – brzina prenosa toplote na rashladni fluid, ΔQ_0 – razlika osetne toplote fermentacione tečnosti na izlazu i hranljive podloge na ulazu, Q_i – brzina kojom se toplota gubi isparavanjem, Q_k – brzina kojom se toplota gubi u okolinu, ΔQ_v – razlika toplote vazduha na izlazu i ulazu iz bioreaktora i Q_{ak} – brzina akumulacije toplote.

Brzina oslobađanja toplote zbog metabolizma u šaržnom bioprocusu je:

$$Q_F = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} V_L \quad (5.23)$$

a u kontinualnom izotermnom bioprocusu:

$$Q_F = \frac{1}{Y_{X/S}} \left[(S_0 - S) Y_{X/S} D - \frac{k_d X}{V_L} \right] V_L \quad (5.24)$$

gde je: μ – specifična brzina mikrobnog rasta, k_d – specifična brzina održavanja mikroorganizma, X – koncentracija biomase, S_0 i S – koncentracije supstrata, $Y_{X/S}$ – koeficijent prinosa bio-

mase u odnosu na supstrat, $Y_{X/C}$ – koeficijent prinosa biomase u odnosu na energiju razvijenu u metaboličkim reakcijama, V_L – zapremina bioreaktora i D – brzina razblaživanja.

Brzina razmene toplote između hranljive podloge i rashladnog fluida je:

$$Q_r = KA(T_f - T_r) \quad (5.25)$$

gde je: K – ukupni koeficijent prenosa toplote, A – površina za razmenu toplote, T_f – srednja temperatura hranljive podloge i T_r – srednja temperatura rashladnog fluida.

Zanemarujući sve članove, čiji je doprinos relativno mali u odnosu na toplotu bioprocesa, jednačina bilansa toplote za bioreaktor koji radi izotermno znatno se uprošćava:

$$Q_F = Q_r = KA(T_f - T_r) \quad (5.26)$$

Pomoću jednačine (5.26) rešavaju se dva osnovna problema:

- izračunava se potrebna površina za toplotnu razmenu i
- proverava se mogućnost primene postojećeg bioreaktora u konkretnom bioprocusu.

5.2.2. Određivanje ukupnog koeficijenta prenosa toplote

Ukupni koeficijent prenosa toplote, ukoliko nije definisan od strane isporučiooca opreme, može se odrediti eksperimentalno metodom *dinamičke kalorimetrije*. Za to određivanje bioreaktor se posmatra kao adijabatski kalorimetar sa konstantnom brzinom razvijanja toplote (slika 5.17). U fazi I bioproces normalno teče. U trenutku t_0 se prekine hlađenje (faza II), što izaziva linearno povišenje temperature fermentacione tečnosti. Zatim se u trenutku t_1 počne sa hlađenjem i temperatura fermentacione tečnosti linearno opada (faza III). Zanemarujući nebitne spoljašnje uticaje na razmenu toplote, bilansna jednačina za prenos toplote ima oblik:

$$m_f c_{p,f} \frac{dT}{dt} = -KA\Delta T_{sl} + Q_F \quad (5.27)$$

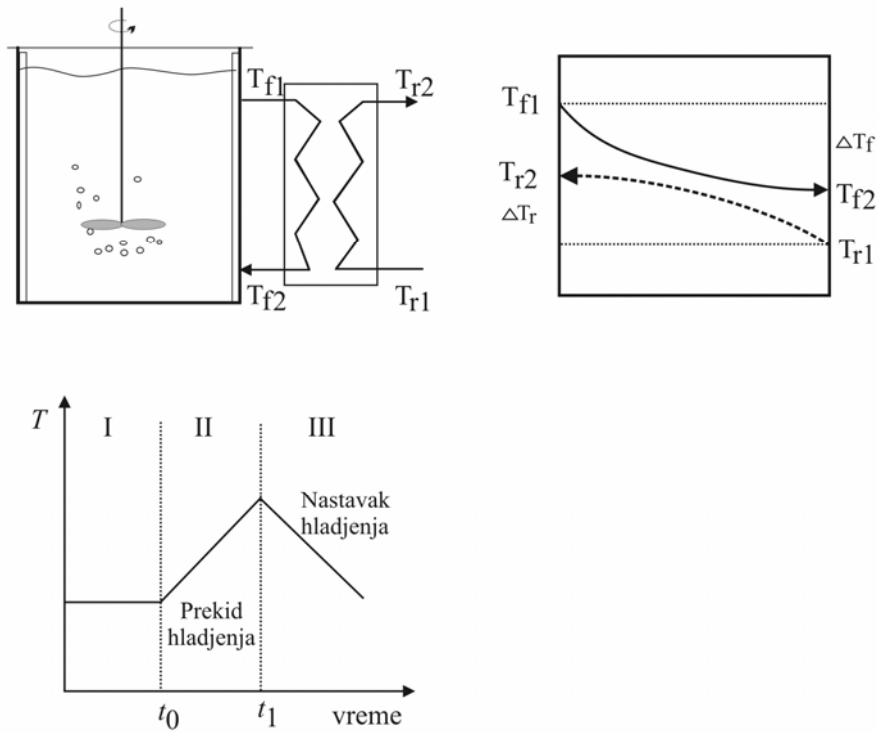
gde je T_{sl} – srednja logaritamska temperaturna razlika, koja se za manje bioreaktore može aproksimirati kao:

$$\Delta T_{sl} \approx T_f - T_r \quad (5.28)$$

U slučaju da se, posebno kod velikih bioreaktora, prethodna jednačina ne može primeniti, koristi se izraz za izračunavanje srednje logaritamske temperature:

$$\Delta T_{sl} = \frac{\Delta T_2 - \Delta T_1}{\ln \left(\frac{\Delta T_2}{\Delta T_1} \right)} \quad (5.29)$$

gde su: ΔT_1 i ΔT_2 – temperaturne razlike toplog i hladnog fluida na početku i na kraju razmenjivača.



Slika 5.17 Temperaturni profil razmene toplote između hranljive podloge i rashladnih fluida u bioreaktoru

Kada se temperatura tokom bioprocesa održava na konstantnoj vrednosti (što je slučaj kod većine bioprocesa), može se koristiti srednja aritmetička razlika temperatura:

$$\Delta T_A = \frac{2T_f - (T_1 + T_2)}{2} \quad (5.30)$$

Brzina oslobađanja toplote u zonama II i III može se definisati kao:

$$Q_f = m_f c_{pf} \left(\frac{dT}{dt} \right)_{II} = const \quad (5.31)$$

$$m_f c_{pf} \left(\frac{dT}{dt} \right)_{III} = -KA\Delta T_{sl} + m_f c_{pf} \left(\frac{dT}{dt} \right)_{II} = const \quad (5.32)$$

tako da je

$$K = \frac{m_f c_{pf}}{A} \frac{(dT/dt)_{II} - (dT/dt)_{III}}{\Delta T_{sl}} \quad (5.33)$$

što predstavlja vrednost ukupnog koeficijenta prenosa toplote u razmatranom sistemu. Jednačina (5.31) omogućava izračunavanje toplote bioprocesa.

Ukupni koeficijent prenosa toplote u sebi sadrži zbir pojedinačnih koeficijenata prenosa toplote, koji se javljaju sa strane fermentacione tečnosti i sa strane rashladnog fluida. Opšta korelacija za izračunavanje koeficijenata prenosa toplote može se izraziti kao zavisnost Nusselt-ovog broja ili Reynolds-ovog ili Grashof-ovog broja i Prandtl-ovog broja:

$$Nu = f(Re \text{ ili } Gr, Pr) \quad (5.34)$$

Nusselt-ov broj predstavlja odnos brzine konvektivnog i konduktivnog prenosa toplote:

$$Nu = \frac{hl}{k_f} \quad (5.35)$$

gde su: h – koeficijent prenosa toplote, l – karakteristična dimenzija sistema (prečnik bioreaktora ili prečnik cevi) i k_f – toplotna provodljivost fluida.

Grashof-ov broj predstavlja odnos prenosa količine kretanja i prenosa toplote:

$$Gr = \frac{l^3 g \rho^2}{\mu^2} \beta \Delta T \quad (5.36)$$

gde je: β – koeficijent toplotnog širenja fluida.

Prandtl-ov broj predstavlja odnos prenosa količine kretanja i prenosa toplote:

$$Pr = \frac{c_p \mu}{k_f} \quad (5.37)$$

U praksi se javljaju različiti sistemi prenosa toplote, za koje postoje različite kriterijalne jednačine kojima se izračunava koeficijent prenosa toplote. Najčešći slučajevi su: proticanje fluida u cevima ili oko cevi bez promene faze i mešanje fluida.

1. Proticanje u cevima bez promene faze

$$Nu = 0,023 Re^{0,8} Pr^{0,4} \quad (5.38)$$

Uslovi za primenljivost jednačine (5.38) su: $10^4 \leq Re \leq 1,2 \cdot 10^5$, $0,7 \leq Pr \leq 120$ i $L/d \geq 60$ (odnos dužine i prečnika cevi).

Za vrlo viskozne fluide, gde temperatura varira na zidu cevi u odnosu na temperaturu u samoj cevi, jednačina (5.38) se modifikuje u oblik:

$$Nu = 0,027 Re^{0,8} Pr^{0,33} \left(\frac{\mu}{\mu_w} \right) \quad (5.39)$$

gde je: μ_w – viskozitet fluida na temperaturi zida cevi.

2. Proticanje oko cevi bez promene faze

$$Nu = C Re_{\max}^{0,6} Pr^{0,33} \quad (5.40)$$

gde je: $C = 0,33$ za pravilan unakrsan raspored cevi, a $C = 0,26$ za šahovski raspored cevi, dok je:

$$Re_{\max} = \frac{\rho u_{\max} d}{\mu} \quad (5.41)$$

gde je: $u_{\max}$ – maksimalna brzina fluida koji struji oko cevi spoljnog prečnika d .

3. Prenos toplote u sistemima sa mešanjem

Bioreaktor sa spiralnim razmenjivačem:

$$Nu = 0,87 Re_m^{0,62} Pr^{0,33} \left(\frac{\mu}{\mu_w} \right)^{0,14} \quad (5.42)$$

Bioreaktor sa omotačem:

$$Nu = 0,6 Re_m^{0,67} Pr^{0,33} \left(\frac{\mu}{\mu_w} \right)^{0,14} \quad (5.44)$$

Prenos toplote sa promenom faze ređe se sreće u bioreaktorima, na primer, kod sterilizacije hranljive podloge u bioreaktoru.

Pri definisanju ukupnog koeficijenta prenosa toplote treba imati na umu da se, posebno u cevima, mogu javiti dodatni toplotni otpori, pre svega, od naslaga, prljavštine ili namnoženog biološkog materijala.

5.3. PRENOS MASE U BIOREAKTORIMA

Razmatranje problema prenosa mase u bioreaktorima najčešće se vezuje za problem prenosa mase kiseonika iz gasne u tečnu fazu, tj. iz vazduha koji je dispergovan u obliku mehurova u tečnu fazu hranljive podloge. Kod aerobnih bioprocesa rastvoreni kiseonik je neophodan, jer on u metabolizmu mikroorganizama služi kao krajnji akceptor elektrona ili vodonika, uz posredničku ulogu enzima oksidaze. Ukoliko se tokom procesa u sistemu javi deficit kiseonika, to može prouzrokovati smanjenje intenziteta bioprocesa, pa i njegov prekid. Smanjena koncentracija kiseonika u odnosu na optimalnu vrednost dovodi do smanjenja rasta aerobnih mikroorganizama, što neposredno dovodi do smanjenja prinosa proizvoda.

Potrebe aerobnih mikroorganizama za kiseonikom zavise od:

- vrste mikroorganizama, fiziološkog stanja i starosti kulture,
- koncentracije i izvora ugljenika u hranljivoj podlozi,

- koncentracije i vrste ostalih sastojaka podloge i
- nakupljenih toksičnih proizvoda metabolizma u toku bioprocesa.

Za kvantitativno izražavanje potrebe mikroorganizama za kiseonikom mogu poslužiti tri veličine:

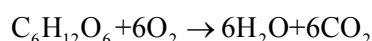
- prinos biomase u odnosu na utrošeni kiseonik (Y_{O_2} kg suve biomase/kg O_2)
- specifična brzina potrošnje kiseonika (q_{O_2} kg O_2 /kg h) i
- brzina trošenja kiseonika (r_{O_2} kg O_2 /m³ h)

Brzina trošenja kiseonika pri gajenju bilo kog mikroorganizma se može izračunati po jednačini:

$$(-r_{O_2}) = \frac{\mu X}{Y_{O_2}} \quad (5.45)$$

gde su: μ – specifična brzina rasta mikroorganizma i X – koncentracija suve biomase mikroorganizama. Da bi se odredila brzina trošenja kiseonika, mora se znati prinos biomase za svaki mikroorganizam i određeni izvor ugljenika. Brzina trošenja se često ne može izračunati teorijski, pa se mora odrediti eksperimentalno.

Rastvoreni kiseonik se može praktično smatrati za hranljivu komponentu podloge. U poređenju sa drugim navedenim sastojcima, rastvorljivost kiseonika je neuporedivo manja, a kao ilustracija takvog odnosa često se koristi poređenje u odnosu na glukozu. Tokom respiracije dolazi do oksidacije glukoze po jednačini:



Za potpunu oksidaciju 180 g glukoze potrebno je 192 g kiseonika. Rastvorljivost kiseonika je oko 6000 puta manja od rastvorljivosti glukoze, dok su brzine njihovog trošenja istog reda veličina, kao što se može videti iz podataka u tabeli 5.7 na primeru rasta kvasca. Jedino kontinualnim snabdevanjem mikroorganizama kiseonikom mogu se zadovoljiti potrebni uslovi za odvijanje aerobnih procesa. Kontinualno snabdevanje kiseonikom se obično postiže neprekidnim uduvavanjem vazduha (aeracijom) u hranljivu podlogu.

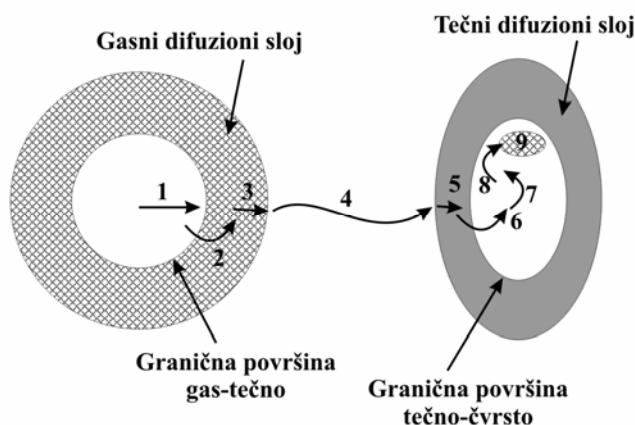
Tabela 5.7 Uporedne vrednosti specifične brzine trošenja, koncentracije i kritične koncentracije kiseonika i glukoze u hranljivoj podlozi (na temperaturi 37 °C)

<i>Supstrat</i>	<i>Specifična brzina trošenja mmol/g·h</i>	<i>Koncentracija mg/l</i>	<i>Kritična koncentracija mg/l</i>
Kiseonik	7,7	7	0,8
Glukoza	2,8	10.000	100

5.2.1. Međufazni prenos mase kiseonika

Pri uduvavanju vazduha u hranljivu podlogu dolazi do njegovog dispergovanja u obliku mehurova koji prolaze kroz hranljivu podlogu. Koncentracija rastvorenog kiseonika u tečnosti će zavistiti od brzine prenosa mase kiseonika iz dispergovanih mehura u tečnost i brzine trošenja kiseonika.

Kiseonik iz gasne faze (mehur) prelazi u hranljivu podlogu (tečna faza), a zatim difunduje do ćelije mikroorganizma (čvrsta faza), gde se troši u biohemijskim procesima. Šematski prikaz opšteg slučaja prenosa mase kiseonika iz dispergovanog mehura do mesta reakcije unutar mikroorganizma je dat na slici 5.18.



Slika 5.18 Šematski prikaz prenosa mase kiseonika iz vazdušnog mehura u unutrašnjost ćelije mikroorganizma, biljnih ili animalnih ćelija

Na putu od mehura do biohemijske reakcije u samoj ćeliji, javlja se više različitih otpora, i to:

- otpor difuziji iz unutrašnjosti mehura do međufazne površine gas – tečnost (1),
- otpor prolazu kroz međufaznu površinu gas – tečnost (2),
- otpor difuziji kroz sloj tečnosti na granici gas – tečnost (3),
- otpor prenosu mase kroz tečnost do sloja tečnosti oko mikrobne ćelije (4),
- otpor difuziji kroz sloj tečnosti oko mikrobne ćelije (5),
- otpor prolazu kroz međufaznu površinu tečnosti i ćelije (tečno – čvrsto) (6),
- otpor difuziji kroz tečnost unutar čvrste faze, koja može biti u obliku agregata ćelija, micelijuma i sl. (7),
- otpor transportu kroz ćelijski zid do mesta reagovanja unutar ćelije (8) i
- otpor na mestu biohemijske reakcije u ćeliji (9).

Svi ovi otpori, izuzev otpora na mestu biohemijske reakcije, jesu čisto fizički otpori. Ako se radi o individualnoj ćeliji, onda otpori 6 i 7 ne postoje. Ćelije pokazuju tendenciju da se adsorbuju na granici faza mehur – tečnost, pa kiseonik prolazi samo kroz jedan neizmešan sloj. Ako mešanje nije dobro, onda brzinu prenosa mase kiseonika kontroliše jedan od interpartikularnih (otpori 3 ili 4) ili jedan od intrapartikularnih (otpori 5 ili 7) otpora. U većini slučajeva otpor prenosu mase kroz sloj tečnosti oko mehura (otpor 3) kontroliše ukupnu brzinu prenosa mase kiseonika.

5.2.2. Osnovi teorije međufaznog prenosa mase

Najjednostavniji model prenosa mase iz gasne u tečnu fazu opisuje teorija dva filma (sloja), koja se zasniva na sledećim pretpostavkama:

- na granici faza postoje dva difuzionu sloja, gasni i tečni;
- prenos mase kiseonika kroz granične slojeve vrši se molekulskom difuzijom;
- celokupni otpor prenosu mase je u graničnim difuzionim slojevima;
- granica faza ne pruža otpor prenosu mase;
- na granici faza postoji ravnoteža između koncentracija kiseonika u gasu i tečnosti, koja se izražava Henry-evim zakonom.

Brzine prenosa mase kiseonika kroz gasni i tečni difuzioni sloj (slika 5.19) su u stacionarnim uslovima međusobno jednake, pa je:

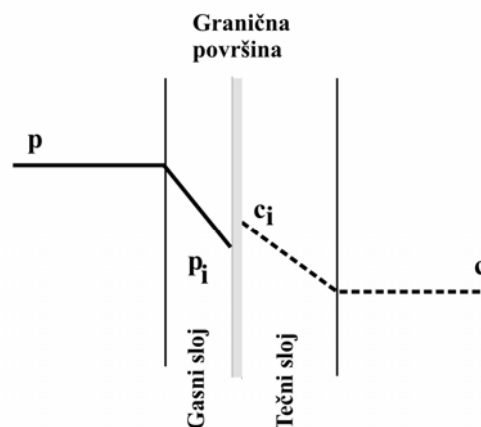
$$N_{O_2} = k_G (p - p_i) = k_L (c_i - c) \quad (5.47)$$

gde je: N_{O_2} – fluks mase kiseonika kroz graničnu površinu, p i p_i – parcijalni pritisci kiseonika u gasnoj fazi i na granici faza, c i c_i – koncentracije rastvorenog kiseonika u masi tečnosti i na granici faza i k_G i k_L – koeficijenti prenosa mase kiseonika sa strane gasa, odnosno tečnosti.

Zbog nemogućnosti merenja koncentracija na granici faza, fluks mase kiseonika se izražava pomoću ukupnog koeficijenta prenosa mase i ukupne pogonske sile prenosa mase:

$$N_{O_2} = K_L (c^* - c) \quad (5.48)$$

gde je: K_L – ukupni koeficijent prenosa mase kiseonika (izražen u jedinicama koje odgovaraju tečnoj fazi), a c^* – koncentracija rastvorenog kiseonika koja je u ravnoteži sa parcijalnim pritiskom kiseonika u gasnoj fazi, odnosno:



Slika 5.19 Šematski prikaz prenosa mase kiseonika iz gasne u tečnu fazu

$$c^* = \frac{p}{H_e} \quad (5.49)$$

gde je H_e – Henry-eva konstanta. Vrednost Henry-eve konstante zavisi od temperature. U tabeli 5.8 data je zavisnost rastvorljivosti kiseonika u vodi od temperature, pod pritiskom 101,3 kPa, za sisteme kiseonik – voda i vazduh – voda.

Tabela 5.8 Podaci za rastvorljivost kiseonika u vodi

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Sistem čist kiseonik – voda (101,3 kPa)</i>		<i>Sistem vazduh – voda (101,3 kPa)</i>
	<i>Rastvorljivost kg/m³</i>	<i>Henry-eva konstanta atm/kg m³</i>	<i>Rastvorljivost kg/m³</i>
0	0,0703	14,2	0,0148
10	0,0549	18,2	0,0115
15	0,0495	20,2	0,0104
20	0,0450	22,2	0,0095
25	0,0414	24,2	0,0087
27	0,0401	24,9	-
30	0,0384	26,1	0,0081
35	0,0358	27,9	0,0075
40	0,0337	29,7	0,0071

Kombinovanjem jednačina (5.47), (5.48) i (4.49) dobija se:

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{k_L} + \frac{1}{k_G H_e} \quad (5.50)$$

koji pokazuje da je ukupan otpor prenosu mase jednak zbiru otpora prenosu mase sa strane tečnosti i otpora prenosu mase sa strane gasa.

U slučajevima slabo rastvornih gasova, kao što je slučaj sa kiseonikom, važi $H_e \gg 1$. Pošto je obično $k_G > k_L$ i $k_G H_e \gg k_L$, onda se član $1/k_G H_e$ može zanemariti, pa se dobija:

$$K_L = k_L \quad (5.51)$$

tj. celokupni otpor prenosu mase pruža tečni difuzioni sloj.

5.2.3. Brzina međufaznog prenosa mase

Ako se pretpostavi čista fizička apsorpcija u šaržnom bioreaktoru i idealno izmešana tečnost, onda je, na osnovu bilansa mase kiseonika za tečnu fazu, brzina prenosa mase kiseonika jednaka:

$$V_L \frac{dc}{dt} = k_L (c^* - c) A \quad (5.52)$$

gde je: V_L – zapremina tečnosti u bioreaktoru i A – ukupna međufazna površina gas – tečnost.

Odnos međufazne površine i zapremine tečnosti je specifična međufazna površina:

$$a = \frac{A}{V_L} \quad (5.53)$$

Kombinovanjem jednačina (5.52) i (5.53) dobija se izraz za brzinu prenosa mase kiseonika:

$$OTR = \frac{dc}{dt} = k_L a (c^* - c) \quad (5.54)$$

gde je: $k_L a$ – zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika. Iz ove jednačine sledi da je brzina prenosa mase kiseonika najveća kada je koncentracija kiseonika u tečnoj fazi jednaka nuli:

$$(OTR)_{\max} = \frac{dc}{dt} = k_L a c^* \quad (5.55)$$

Pri skoro svim aerobnim procesima u reaktoru se odigrava simultano prenos mase kiseonika iz mehurova u tečnu fazu (apsorpcija) i trošenje kiseonika u metabolizmu mikroorganizama (respiracija). Bilans mase u tečnoj fazi mora uzeti u obzir i brzinu prenosa mase i brzinu potrošnje kiseonika:

$$\frac{dc}{dt} = k_L a (c^* - c) - r_{O_2} \quad (5.56)$$

5.2.4. Teorija izotropne turbulencije

Intenzitet turbulencije u reaktoru utiče na koeficijent prenosa mase u tečnoj fazi i specifičnu međufaznu površinu. Kako je turbulentno strujanje veoma složeno, prenos mase u turbulentnom polju nije moguće opisati rigoroznom teorijom. Jedna od teorija koja pokušava da opiše zbivanje u turbulentnom režimu je *teorija izotropne turbulencije*.

Turbulentno strujanje u sudu sa mešalicom može se opisati kao kretanje velikog broja vrtloga, koje je nepravilno po vremenu i po pravcu. Veličina ovakvih vrtloga je određena stepenom mešanja u sudu. Zbog obrtanja mešalice vrtlozi se stvaraju kontinualno, a veličina tako stvorenih primarnih vrtloga je reda veličina prečnika mešalice. Primarni vrtlozi su neizotropni i nestabilni, pa se u interakciji sa sporijim fluidnim strujama raspadaju na manje, intermedijarne vrtloge na koje prenose svoju energiju, slika 5.20. Ovi intermedijarni vrtlozi nose najveći deo kinetičke energije fluida koji struji turbulentno. Oni se dalje usitnjavaju na još manje, tzv. terminalne vrtloge, koji konačno iščezavaju, delovanjem viskoznih sila. Osnovna karakteristika najmanjih vrtloga je da su njihove fluktuacione brzine u različitim pravcima međusobno jednake, što znači da su oni lokalno izotropni. Terminalni vrtlozi predaju svoju energiju tečnosti, odnosno disperziji gas – tečnost. Najveći deo kinetičke energije turbulentne struje se *rasipa* preko terminalnih vrtloga. Pošto se energija terminalnih vrtloga kontinualno obnavlja na račun energije većih vrtloga, uspostavlja se ravnotežno stanje. Prema teoriji izotropne turbulencije, najmanji vrtlozi su statistički nezavisni od primarnih vrtloga, tj. od izvora turbulencije, a njihova veličina l_t i brzina u_t su određene specifičnom energijom koja se predaje sistemu (specifična snaga mešanja):

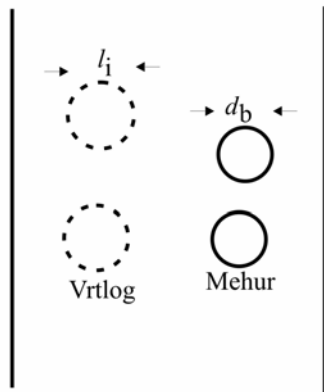
$$l_t = \frac{\mu_L^{3/4}}{\rho_L^{1/2}} \left(\frac{P}{V_L} \right)^{-1/4} \quad (5.57)$$

$$u_t = \frac{\mu_L^{1/4}}{\rho_L^{1/2}} \left(\frac{P}{V_L} \right)^{1/4} \quad (5.58)$$

gde je: P – snaga mešanja, a V_L , ρ_L i μ_L – zapremina, gustina i viskozitet tečnosti.

Ako se eliminiše viskozitet, iz prethodnih jednačina se dobija:

$$\frac{P}{V_L} = \rho_L \frac{u_t^3}{l_t} \quad (5.59)$$



Slika. 5.20 Nastajanje intermedijarnih vrtloga pri mešanju fluida

Kada se postigne ravnotežno stanje, onda energija koju gube intermedijarni vrtlozi mora biti jednaka sa energijom terminalnih vrtloga, odnosno:

$$\frac{P}{V_L} = k \rho_L \frac{u_i^3}{l_i} \quad (5.60)$$

gde je: l_i i u_i – veličina i brzina intermedijarnih vrtloga i k – konstanta čija je vrednost bliska jedinici.

Brzina intermedijarnih vrtloga je

$$u_i \approx \left(\frac{P}{V_L} \right)^{1/3} \left(\frac{l_i}{\rho_L} \right)^{1/3} \quad (5.61)$$

Ako se pretpostavi da su intermedijarni vrtlozi reda veličine mehura ($l_i \gg d_b$), odgovarajući Reynolds-ov broj ima oblik:

$$\text{Re}_b = \frac{d_b^{4/3} \rho_L^{2/3} \left(\frac{P}{V_L} \right)^{1/3}}{\mu_L} \quad (5.62)$$

Za male mehure sa nepokretnom graničnom površinom, koji se najčešće sreću u aerobnim bioprocesima, *Calderbank* i *Moo-Young* su razvili korelaciju za koeficijent prenosa mase sa strane tečnosti u funkciji specifične snage mešanja:

$$\text{Sh}_b = 0,13 \text{Re}_b^{3/4} \text{Sc}^{1/3} \quad (5.63)$$

gde je: Sh – Sherwood-ov broj ($= \frac{k_L d_b}{D_L}$), Sc – Schmidt-ov broj ($= \frac{\mu_L}{\rho_L D_L}$) i D_L – koeficijent molekulske difuzije.

Na osnovu jednačina (5.62) i (5.63) sledi da koeficijent prenosa mase kiseonika zavisi od specifične snage mešanja:

$$k_L \sim \left(\frac{P}{V_L} \right)^{1/4} \quad (5.64)$$

Sitnjenje mehura nastaje kao posledica delovanja sila smicanja, nasuprot kojima sile površinskog napona i viskoziteta održavaju sferičnost mehura i sprečavaju deformaciju. Odnos sila smicanja i površinskog napona je poznat kao Weber-ov broj:

$$\text{We}_b = \frac{\tau}{\sigma/d_b} \quad (5.65)$$

Kada se postigne dinamička ravnoteža sila koje utiču na mehur, dostiže se kritična, tj. maksimalna veličina mehura, kada Weber-ov kriterijum postaje konstantan (oko 1,05), tako da je:

$$d_{b,m} \sim \frac{\sigma}{\tau} \quad (5.66)$$

gde je: $d_{b,m}$ – maksimalni prečnik mehura, koji može da se održi u postojećem turbulentnom polju (tzv. stabilni mehur). Napon smicanja, zbog čijeg delovanja nastaju stabilni mehuri, iznosi:

$$\tau \sim \rho_L u_i^2 \quad (5.67)$$

gde je: u_i – brzina vrtloga veličine najvećeg stabilnog mehura.

Zamenom brzine u_i prema jednačini (5.61), dobija se:

$$\tau \sim \rho_L \left[\left(\frac{P}{V_L} \right)^{2/3} \left(\frac{d}{\rho} \right)^{1/3} \right]^2 \quad (5.68)$$

odakle je:

$$\tau \sim d_{b,m}^{2/3} \rho_L^{1/3} \left(\frac{P}{V_L} \right)^{2/3} \quad (5.69)$$

Kombinovanjem jednačine (5.69) sa jednačinom (5.66) dobija se:

$$d_{b,m} \sim \frac{\sigma^{0.6}}{(P/V_L)^{0.4} \rho_L^{0.2}} \quad (5.70)$$

Iz ove jednačine sledi da se maksimalni prečnik stabilnog mehura smanjuje sa *povećanjem specifične rasute energije*.

Teorija lokalne izotropne turbulencije je idealizovana slika zbivanja u višefaznim bioreaktorima. I pored toga, njen značaj je veliki, jer ukazuje na opšti mehanizam kojim se spoljna energija prenosi na čestice (mehure, kapi, agregate ćelija ili pelete i sl.) i kojim se određuje njihova veličina.

5.2.5. Faktori koji određuju brzinu prenosa mase kiseonika

Brzina prenosa mase kiseonika zavisi od:

- koeficijenta prenosa mase sa strane tečnosti,
- specifične međufazne površine i
- pogonske sile prenosa, koja zavisi od ravnotežne koncentracije rastvorenog kiseonika.

a) Koeficijent prenosa mase sa strane tečnosti

Koeficijent prenosa mase sa strane tečnosti zavisi od *uticaja difuzije i fenomena na graničnoj površini*.

Uticaj difuzije se može izraziti kao:

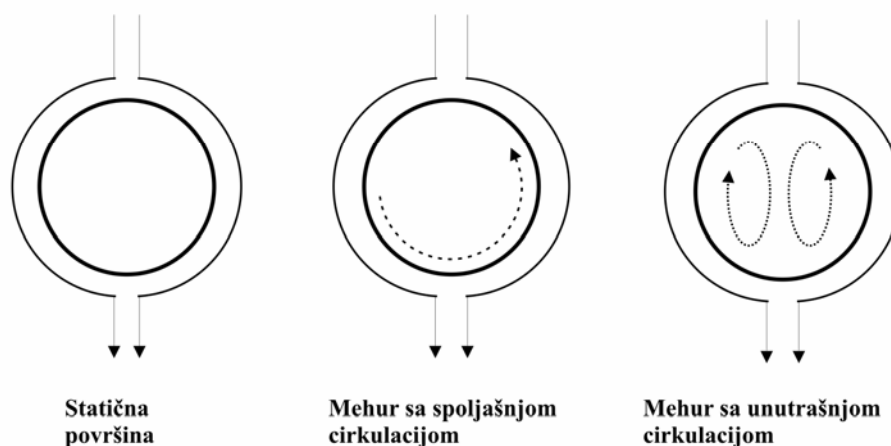
$$k_L \sim D_L^n \quad (5.71)$$

pri čemu eksponent n varira od 0,5 do 1, zavisno od hidrodinamičkih uslova. Prema teoriji filma je $n = 1$, dok je po penetracionoj teoriji i teoriji obnavljanja površine $n = 0,5$. Koeficijent molekulske difuzije kiseonika u vodi na 25°C je $2,1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. Vrednost koeficijenta molekulske difuzije kiseonika za rastvore niskomolekulskih jedinjenja u tečnostima malog viskoziteta nalazi se u opsegu $0,5 \cdot 10^{-9}$ do $2,0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.

Uticaj fenomena na granici faza se ogleda u dva ekstremna slučaja, koji su poznati kao mehur sa nepokretnom i mehur sa mobilnom graničnom površinom (slika 5.21). U prvom slučaju ne postoji nikakva cirkulacija unutar mehura, pa se mehur ponaša kao čvrsta čestica sa nepromenjenom površinom. U drugom slučaju, usled relativne brzine kretanja mehura u odnosu na okolnu tečnost, postoji razvijena unutrašnja cirkulacija u mehuru, koji se ponaša kao deo tečnosti različite gustine.

Cirkulacija u velikoj meri utiče na fenomene na graničnoj površini mehur – tečnost. Strujanje neposredno uz graničnu površinu vodi značajnijim promenama koeficijenta prenosa mase sa promenom veličine mehura kao i promeni njegove brzine kretanja kroz tečnu fazu, slika 5.22.

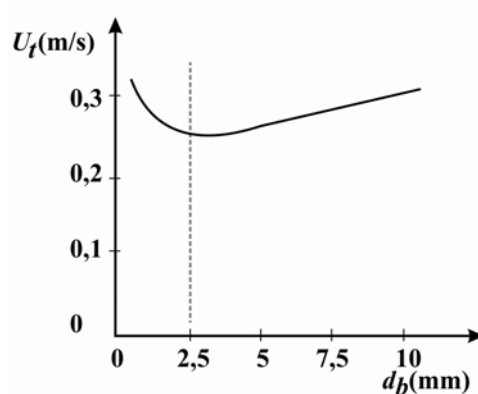
Mehuri se dele na velike i male, a kritičan prečnik je oko 2,5 mm. Generalno, koeficijent prenosa mase sa strane tečnosti ima veću vrednost u slučaju većih mehura.



Slika 5.21 Cirkulacija površine mehura pri prolasku kroz sloj tečnosti

U aerobnim bioprocima uvek su prisutne površinski aktivne materije, pa se sa gotovo potpunom sigurnošću može reći da se mehurovi ponašaju kao mehurovi sa nepokretnom graničnom površinom.

Slika 5.22 Uticaj veličine mehura na brzinu kretanja kroz tečnu fazu



Za prikazivanje zavisnosti koeficijenta prenosa mase sa strane tečnosti od fizičkih osobina dvofaznog sistema i uslova strujanja u bioreaktoru, koriste se kriterijalne jednačine, najčešće u dva oblika:

$$Sh = a + b Re^c Sc^d \quad (5.72)$$

$$Sh = eGr^f Sc^g \quad (5.73)$$

gde su: a do g – empirijske konstante. Bezdimenzioni brojevi u jednačinama (5.72) i (5.73) su definisani u tabeli 5.9.

Tabela 5.9 Bezdimenzioni kriterijumi u jednačinama (5.72) i (5.73)

<i>Kriterijum/ Oznaka</i>	<i>Fizičko značenje</i>	<i>Prirodna konvekcija</i>	<i>Prinudna konvekcija</i>
Sherwood-ov Sh	Ukupni prenos mase / prenos mase difuzijom	$k_L d_b / D_L$	$k_L D_i / D_L$
Schmit-ov Sc	Difuzivnost / masena difuzivnost	$\mu_L / \rho_L D_L$	
Grashof-ov Gr	Sile gravitacije / sile trenja	$d_b^3 \rho_L g D \rho / \mu_L^2$	
Reynolds-ov Re	Sile inercije / sile trenja	$d_b u_b \rho_L / \mu_L$	$d_i^2 N \rho_L / \mu_L$
Peclet-ov Pe=ReSc	Konvektivni prenos mase / difuzioni prenos mase	$d_b u_b / D_L$	
Frud-ov Fr	Sile inercije / sile gravitacije	u_b / gl	

Zavisno od glavnog uzroka prenosa mase i osobina granične površine između čestice (mehuri, kapi, mikrobne ćelije, čvrste čestice) i okolne tečnosti, razlikuje se više karakterističnih slučajeva prenosa mase.

1. Pojedinačne nepokretne čestice u stagnantnoj okolini.

U ovom slučaju se prenos mase odigrava difuzijom. Pošto su čestice nepokretne, onda je $Re=Gr=0$, pa se koeficijent prenosa mase sa strane tečnosti može izračunati pomoću sledeće jednačine:

$$Sh = 2 \quad (5.74)$$

Ovaj prenos mase je beznačajan u slučaju mehurova, ali može biti značajan u slučaju mikrobni ćelija, čija je gustina blizu gustine vode. Pseudostagnantni uslovi realno postoje u viskoznim fermentacionim tečnostima.

2. Pojedinačne mobilne čestice sa nepokretnom graničnom površinom.

Ovaj tip prenosa mase postoji u slučaju malih mehurova, u fermentacionim tečnostima koje sadrže površinski aktivne supstance i u bioreaktorima sa punjenjem (imobilisani biološki katalizatori) i perkolacionim biofiltrima.

U oblasti tzv. puzećeg strujanja tečnosti oko mehura, kada je $Re \ll 1$, važi sledeća korelacija:

$$Sh = 0,99 Re^{1/3} Sc^{1/3} = 0,99 Pe^{1/3} = 0,99 \left(\frac{u_b d_b}{D_L} \right)^{1/3} \quad (5.75)$$

Terminalna brzina sferične čestice je data izrazom:

$$u_t = \frac{d_b^2 g D \rho}{18 \mu_L} \quad (5.76)$$

gde je: $D\rho$ – razlika gustina tečnosti i čestice, a g – ubrzanje zemljine teže.

Zamenom jednačine (5.76) u jednačini (5.75) dobija se:

$$k_L = 0,37 D_L^{2/3} \left(\frac{\Delta \rho g}{\mu_L} \right)^{1/3} \quad (5.77)$$

Iz jednačine (5.77) se mogu izvući tri važna zaključka:

– koeficijent prenosa mase proporcionalan je koeficijentu molekulske difuzije na stepen 2/3, kao što proizilazi iz teorije laminarnog graničnog sloja;

– vidljiv je jak uticaj viskoziteta tečnosti; i

– da bi se izračunao koeficijent prenosa mase, nije potrebno znati brzinu kretanja čestice.

Za laminarno kretanje pojedinačnih mehurova sa nepokretnom graničnom površinom, tj. za $Re \gg 1$, važi sledeća korelacija:

$$Sh = 2 + 0,60 Re^{1/2} Sc^{1/3} \quad (5.78)$$

Kao rezultat promene hidrodinamičkog režima, vrednost stepena Reynolds-ovog broja se menja od 1/3 (oblast puzećeg strujanja) na 1/2 (laminarni režim).

Za bioreaktore sa punjenjem u opsegu $10 < Re < 10^4$ važi sledeća korelacija:

$$Sh = 0,95 Re^{1/2} Sc^{1/3} \quad (5.79)$$

3. Pojedinačne mobilne čestice s mobilnom graničnom površinom.

Mehurovi sa mobilnom graničnom površinom manje su sferični od mehurova sa nepokretnom graničnom površinom. Zbog viskozne interakcije između gasa i tečnosti, mehurovi poprimaju različite oblike – od elipsoida do sferične kape, zavisno od njihove veličine. Kretanje mehurova na više ima oblik spiralne putanje, što značajno utiče na prenos mase, a terminalna brzina mehurova zavisi od njihove veličine:

a) za $Re < 300$ (Levich-ova korelacija)

$$u_b = 27,3 \frac{\rho d_b^2}{\mu} \quad (5.80)$$

b) za $300 < Re < 4000$ (Mendelson-ova korelacija)

$$u_b = \left[\frac{2\sigma}{d_b \rho_f} + \frac{g d_b}{2} \right]^{1/2} \quad (5.81)$$

Za različite hidrodinamičke režime postoje različite korelacije za koeficijent prenosa mase:

a) za $Re < 1$, oblast puzećeg strujanja

$$Sh = 0,5Pe^{1/2} \quad (5.82)$$

b) za $1 < Re < 100$

$$Sh = 0,65Pe^{1/2} (1 + 0,5Re)^{1/2} \quad (5.83)$$

c) za $100 < Re < 1000$

$$Sh = 1,13Pe^{1/2} \left(1 - \frac{2,9}{Re^{1/2}} \right)^{1/2} \quad (5.84)$$

d) za $Re > 1000$

$$Sh = 1,13Pe^{1/2} \quad (5.85)$$

Analizom prethodnih jednačina može se zaključiti da je Sherwood-ov kriterijum proporcionalan Sehmiovom kriterijumu na stepen 1/2, što ukazuje na veći uticaj graničnog sloja u slučaju čestica sa mobilnom graničnom površinom nego u slučaju čestica sa nepokretnom graničnom površinom.

4. Čestice sa međusobnom interakcijom.

U ovom slučaju postoje dva režima:

a) za male mehure (manji od 2,5 mm):

$$Sh = 2,0 + 0,31Gr^{1/3}Sc^{1/3} = 2,0 + 0,31Ra^{1/3} \quad (5.86)$$

b) za velike mehure (veće od 2,5 mm):

$$Sh = 0,42Gr^{1/3}Sc^{1/2} \quad (5.87)$$

b) Specifična međufazna površina

Specifična međufazna površina zavisi od: veličine mehura, terminalne brzine mehura i sadržaja gasa, koji zavise od vrste distributera gasa (prečnika otvora), protoka gasa, zapremine tečnosti u bioreaktoru i veličine mehura. Između specifične međufazne površine, srednjeg prečnika mehura i sadržaja gasa postoji sledeća zavisnost:

$$a = \frac{6\varepsilon_G}{d_{b,sr}} \quad (5.88)$$

gde je: a – specifična međufazna površina, $d_{b, sr}$ – srednji prečnik mehura i ε_G – sadržaj gasa.

Veličina mehura određena je procesima nastajanja, sitnjenja (dispergovanjem) i rastom (koalescencijom) mehura. Stvaranje mehura je određeno nestabilnostima u gasnoj struji pri njenom prodiranju u tečnost i posledica je razbijanja gasne struje na pojedinačne mehurove. Dispergovanje mehurova zavisi od odnosa sila površinskog napona, koje stabilizuju mehurove, i sila smicanja, koje teže da ih usitne. Koalescencija mehurova zavisi od osobina međufazne površine gas – tečnost. U vodenim rastvorima koalescentne osobine zavise najviše od rastvorenih supstanci, kao što su: masne kiseline, polialkoholi, elektroliti i ketoni, koje suzbijaju koalescenciju.

Pri isticanju gasa kroz mlaznicu pri malim protocima stvaraju se pojedinačni mehurovi. Prečnik mehura se izračunava iz bilansa sila koje deluju na mehur na otvoru mlaznice:

$$d_{b,0} = \left(\frac{6\sigma d_0}{g\Delta\rho} \right)^{1/3} \quad (5.89)$$

gde je: d_0 – prečnik mlaznice, a σ – površinski napon.

Pri dovoljno velikom protoku gasa, umesto pojedinačnog odvajanja mehurova, na otvoru mlaznice, formira se mlaz gasa, koji se sastoji od velikog broja gusto pakovanih mehurova nepravilnog oblika. Gasni mlaz se razbija u manje mehurove. Prečnik mehura u tečnosti koja struji laminarno iznosi približno:

$$d_{b,0} = 4,27d_0 \quad (5.90)$$

pod uslovom, koji je obično ispunjen u uslovima aerobnih bioreaktora, da je:

$$\frac{\sigma\rho_L d_0}{\mu_L} > 36 \quad (5.91)$$

Veličina mehura u oblasti dalje od mlaznice određena je procesima dispergovanja i koalescencije mehurova. U tečnostima sa nekoalescentnim osobinama, gde je koalescencija spor proces, favorizovana je dezintegracija mehurova, dok je u tečnostima sa koalescentnim osobinama favorizovana koalescencija mehurova. U prvom slučaju, eksterna energija (na primer, snaga mešanja) je najefikasnija u momentu stvaranja ili dispergovanja mehurova, dok je u drugom slučaju ona efikasna u dispergovanju mehurova samo ako je prostorno uniformna.

Za izračunavanje specifične međufazne površine u sudu sa mešalicom preporučuje se empirijska korelacija Calderbank-a:

$$a = 1,44 \left[\frac{(P/V_L)^{0.4} \rho_L^{0.2}}{\sigma^{0.6}} \right] \left(\frac{u_G}{u_t} \right)^{0.5} \quad (5.92)$$

gde je: u_G – prividna brzina proticanja gasa, a u_t – terminalna brzina mehura.

c) Pogonska sila prenosa (rastvorljivost kiseonika)

Rastvorljivost gasova, naročito kiseonika i ugljendioksida neophodan je parametar pri projektovanju bioprocesa, pre svega sa aspekta postavljanja bilansa mase i određivanja zapreminskog

koeficijenta prenosa mase. Rastvorljivost gasova se izražava na više načina, ali se obično koriste: Henry-eva konstanta (ako važi Henry-ev zakon), Bunsen-ov koeficijent i koncentracija.

U zavisnosti od načina izražavanja koncentracije, Henry-eva konstanta se definiše kao:

$$He = \frac{p}{c} \quad (5.93)$$

$$He' = \frac{p}{x} \quad (5.93)$$

$$He'' = \frac{p}{cRT} \quad (5.94)$$

gde je: p – parcijalni pritisak, c – koncentracija rastvorenog gasa i x – molski udeo rastvorenog gasa.

Bunsen-ov koeficijent se definiše kao zapremina gasa svedena na normalne uslove (0 °C, 101,3 kPa), koja je apsorbirana po jedinici zapremine rastvarača pri parcijalnom pritisku gasa od 101,3 kPa. Ako je rastvorljivost gasa mala, onda je:

$$\alpha = \frac{1}{He''} \frac{273}{T} \quad (5.95)$$

Bunsen-ov koeficijent se može preračunati u koncentraciju rastvorenog kiseonika pomoću jednačine:

$$c = 10^6 \frac{pM_G}{101,3V_0} \alpha \quad (5.96)$$

gde je: c – koncentracija rastvorenog gasa izražena u mg O₂/dm³, p – parcijalni pritisak gasa u kPa, M_G – molarna masa gasa u g/mol, V_0 – molarna zapremina gasa na normalnim uslovima u cm³/mol (za kiseonik 22,395, a za ugljenikdioksid 22,258 cm³/mol).

Koncentracija kiseonika (u mg O₂/dm³) u vodenom rastvoru koji je u ravnoteži sa zasićenim vazduhom može se izračunati pomoću jednačine:

$$c = \frac{32 \cdot 10^6 \cdot 0,2094 (P_{uk} - P_s^0)}{1013 \cdot 22,395} \alpha = 2,954 (P_{uk} - P_s^0) \alpha \quad (5.97)$$

gde je: P_{uk} – ukupni pritisak i P_s^0 – napon vodene pare.

Određivanje rastvorljivosti kiseonika. Rastvorljivost kiseonika se određuje hemijskim i fizičkim metodima. *Hemijski metodi* se zasnivaju na analizi zasićenog rastvora kiseonika, pa nisu najpogodniji za određivanje rastvorljivosti u toku bioprocesa zbog prirode hranljivih podloga. *Fizičke metode* se zasnivaju na određivanju količine gasa koja je desorbovana iz zasićenog rastvora (desorpcioni metod) ili količine gasa koja je potrebna za dobijanje zasićenog rastvora (saturacioni metod). Za merenje rastvorljivosti kiseonika u hranljivim podlogama u prisustvu mikroorganizama najpouzdaniji je *saturacioni metod*. Najpre se tečnost degazira pomoću vakuuma, a gubitak vode

isparavanjem iz sistema nadoknadi dodatkom degazirane vode. Zatim se tečnost dovede u kontakt sa suvim vazduhom, uz mešanje magnetnom mešalicom. Pomoću manometra prati se promena pritiska sa vremenom (slika 5.23). Zasićavanje traje 1 do 4 minuta, u zavisnosti od viskozi-teta tečnosti. Ako je koncentracija mikrobne biomase u podlozi velika, onda se doda određena količina formalina, da bi se smanjio efekat respiracije. Rastvorljivost kiseonika se izračunava na osnovu ukupnog pada pritiska u stanju ravnoteže.

Faktori koji utiču na rastvorljivost gasova. Rastvorljivost gasova u tečnosti zavisi od pritiska, temperature, kao i od prirode i sastava tečnosti. U industrijskim bioprocesima radni pritisak je blizu atmosferskog, pa se Henry-ev zakon može primeniti sa zanemarljivom greškom.

Za izračunavanje rastvorljivosti kiseonika i ugljendioksida u vodi izražene u obliku Bunsen-ovog koeficijenta u opsegu temperatura od 0 do 50°C preporučuje se empirijska korelacija:

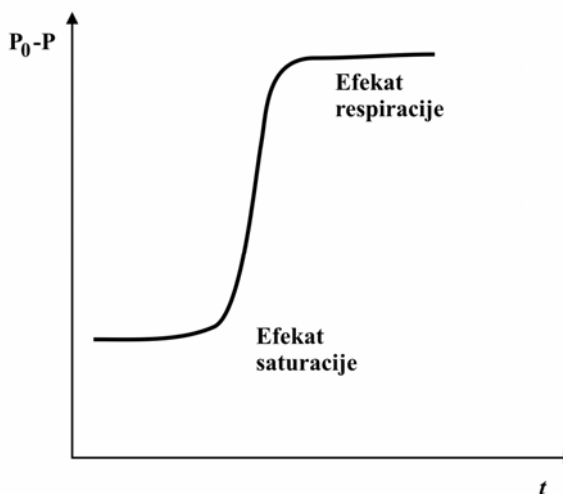
$$\alpha = a + bT + cT^2 + dT^3 + eT^4 \quad (5.98)$$

gde je: T – temperatura izražena u °C. Vrednosti koeficijenata u jednačini (5.98) date su u tabeli 5.10.

Tabela 5.10 Vrednosti koeficijenata u jednačini (5.98)

Koeficijent	Kiseonik	Ugljendidioksid
a	$4,900 \cdot 10^{-2}$	1,720
b	$-1,335 \cdot 10^{-3}$	$-6,689 \cdot 10^{-2}$
c	$2,759 \cdot 10^{-5}$	$1,618 \cdot 10^{-3}$
d	$-3,235 \cdot 10^{-7}$	$-2,284 \cdot 10^{-5}$
e	$1,614 \cdot 10^{-9}$	$1,394 \cdot 10^{-7}$

U slučaju prisustva organskih supstanci i neorganskih soli, što je redovan slučaj kod hranljivih podloga, rastvorljivost kiseonika se smanjuje. Izuzetak čine jedino alkoholi sa malim brojem C atoma, koji povećavaju rastvorljivost kiseonika. Uticaji većeg broja rastvorenih supstanci na rastvorljivost gasova (izražena preko *Bunsen-ovog* koeficijenta) su log-aditivni, tj.:



Slika 5.23 Tipična promena pritiska u toku određivanja rastvorljivosti kiseonika u prisustvu mikroorganizma saturacionim metodom

$$\log \frac{\alpha_0}{\alpha} = \sum_i \left(\log \frac{\alpha_0}{\alpha_i} \right) \quad (5.99)$$

gde je: α – rastvorljivost gasa u rastvoru, α_0 – rastvorljivost gasa u vodi i α_i – rastvorljivost gasa u rastvoru i -te rastvorene supstance iste koncentracije kao u posmatranom rastvoru.

Efekat elektrolita na rastvorljivost gasova se najpouzdanije opisuje Schumpe-Adler-Decker-ovom korelacijom:

$$\log \frac{\alpha_0}{\alpha_{el}} = \sum_j H_j I_j \quad (5.100)$$

gde je: H_j – parametar specifičan za gas, jon i temperaturu (tabela 5.11), I_j – doprinos jona j jonskoj jačini rastvora

$$I_j = \frac{1}{2} c_j z_j \quad (5.101)$$

gde su: c_j i z_j – koncentracija (u mol/dm³) i naelektrisanje jona j . Vrednosti parametra na različitim temperaturama su vrlo bliske, a preporučuje se da se koriste vrednosti na najbližoj temperaturi, a ne interpolisane vrednosti. Izračunavanje mora biti bazirano na sastavu rastvora, tako da, na primer, neutralizacija baze i kiseline (1 M NaOH + 1 M HCl = 1 M NaCl) ili delimična disocijacija kiseline ($\text{H}_2\text{SO}_4 = \text{H}^+/\text{HSO}_4^-$, a ne $2\text{H}^+/\text{SO}_4^{2-}$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 = \text{K}^+/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, a ne $\text{K}^+ 2\text{H}^+/\text{PO}_4^{3-}$) mora da budu uzete u obzir.

Tabela 5.11 Parametar H_j u jednačini (5.100)

<i>Jon</i>	<i>Kiseonik</i>			<i>Ugljendioksid</i>
	20 °C	25 °C	37 °C	25 °C
H ⁺	-0,771	-0,776	-0,803	-0,319
Na ⁺	-0,570	-0,568	-0,577	-0,130
K ⁺	-0,593	-0,587	-0,578	-0,196
NH ₄ ⁺		-0,704	-0,681	-0,252
Mg ²⁺	-0,308	-0,297	-0,321	-0,078
Ca ²⁺	-0,293	-0,309	-0,316	-0,073
Mn ²⁺		-0,324	-0,325	-0,084
Fe ²⁺				-0,078
Cu ²⁺	-0,312		-0,325	-0,090
Fe ³⁺			-0,244	
Cl ⁻	0,843	0,849	0,861	0,339
OH ⁻	0,955	0,943	0,917	
NO ₃ ⁻	0,827	0,802	0,821	0,293
HSO ₄ ⁻	0,945	0,955	0,935	0,436
HCO ₃ ⁻		1,076	0,861	

Tabela 5.11 Parametar H_j u jednačini (5.100) (nastavak)

<i>Jon</i>	<i>Kiseonik</i>			<i>Ugljendioksid</i>
	20 °C	25 °C	37 °C	25 °C
H ₂ PO ₄ ⁻		0,997		
SO ₄ ²⁻	0,458	0,460	0,448	0,213
CO ₃ ²⁻		0,467	0,447	
HPO ₄ ²⁻		0,477		
PO ₄ ³⁻		0,308		

Uticaj organskih supstanci na rastvorljivost gasova obično se opisuje empirijskom jednačinom:

$$\log \frac{\alpha_0}{\alpha_{os}} = K_{os} c_{os} \quad (5.102)$$

gdje je: c_{os} – koncentracija organske supstance (u g/dm³) K_{os} – konstanta specifična za određeni par organska supstanca – gas, skoro nezvisna od temperature (tabela 5.11).

Rastvorljivost gasova u rastvorima složenog sastava, kao što su hranljive podloge i fermentacione tečnosti, može se izračunati primenom log–aditivnog pravila, tj. uključivanjem uticaja svih ili bar glavnih komponenata:

$$\log \frac{\alpha_0}{\alpha} = \sum_j H_j I_j + \sum_i K_{os,i} c_{os,i} \quad (5.103)$$

Promena sastava hranljive podloge u toku bioprocesa, kao rezultat konverzije supstrata u biomasu, biosinteze proizvoda i dodavanja kiseline ili baze radi održavanja pH ili drugih hranljivih komponenti radi prehranjivanja, izaziva promenu rastvorljivosti kiseonika. Rastvorljivost kiseonika u fermentacionoj tečnosti može se izračunati pomoću log–aditivne jednačine, s tim što se mora znati sastav fermentacione tečnosti bar u odnosu na glavne komponente. Ovaj tzv. direktni metod je pouzdan kada su glavne komponente podloge ugljeni hidrati i soli, dok je nepouzdan ako se hranljiva podloga sastoji uglavnom od proteina i albumina.

d) Faktori koji utiču na zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika

U biotehnologiji se najčešće koristi zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika ($k_L a$), jer se mnogo lakše eksperimentalno određuje nego specifična međufazna površina ili koeficijent prenosa mase sa strane tečnosti. Zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika zavisi od brojnih faktora od kojih su najvažniji: protok vazduha, intenzitet mešanja, reološke osobine hranljive podloge i antipenušavci.

Uticaj protoka vazduha. Nezavisno od vrste bioreaktora, povećanje protoka vazduha, povećava vrednost zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika. Uticaj protoka vazduha kod bioreaktora sa mešalicom je znatno manji nego uticaj intenziteta mešanja, čak i kad se protok vazduha povećava do vrednosti koja izaziva *plavljenje mešalice*. U bioreaktorima tipa barbotazne kolone zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika se linearno povećava sa protokom vazduha.

Uticaj intenziteta mešanja. Intenzitet mešanja u bioreaktorima sa eksternim mešanjem, ima značajan uticaj na vrednost zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika iz više razloga. Povećanje smicajnih sila dovodi do sitnjenja mehurova i formiranja veće međufazne površine, što doprinosi bržem prenosu mase kiseonika. Zbog turbulencije u ganičnom sloju koeficijent prenosa mase sa strane tečnosti se povećava sa smanjenjem veličine mehura. Mešanje produžava zadržavanje mehura u disperziji, što omogućava bolje korišćenje kiseonika.

Uticaj reoloških osobina hranljive podloge. Reološke osobine imaju veliki uticaj na zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika. Generalno, sa povećanjem viskoziteta tečnosti vrednost zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika se smanjuje. Promena viskoziteta hranljive podloge tokom bioprocesa zbog promene njenog sastava je obično zanemarljiva, osim ako je skrob sastojak podloge ili ako se proizvode polimeri i niži alkoholi. Kvasci i bakterije ne utiču značajno na viskozitet fermentacione tečnosti koja se ponaša blisko njutnovskim fluidima. Suprotno tome, plesni i streptomicete, zavisno od njihovog morfološkog oblika, značajno utiču na viskozitet fermentacione tečnosti. Po pravilu, filamentni oblici formiraju jako viskozne nenjutnovske tečnosti.

Uticaj pene i antipenušavaca. Formiranje pene u toku bioprocesa je nepoželjno, jer pena ima negativan efekat na prenos mase kiseonika. Prisustvo pene u zoni oko mešalice može uticati i na efikasnost mešanja. Radi smanjenja penušanja, dodaju se antipenušavci, koji smanjuju površinski napon, ali i brzinu prenosa mase kiseonika i do 50%. Pri njihovom doziranju, mora se biti veoma oprezan ili se u određenim slučajevima moraju ugraditi mehanički razbijači pene.

e) Eksperimentalni metodi za određivanje zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika

Najpovoljnije je da se zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika meri tokom bioprocesa. Ovo je povezano sa nizom praktičnih problema, pre svega, za opasnost od kontaminacije. Obično se pribegava upotrebi modela hranljive podloge, čiji sastav mora biti što približniji realnim uslovima. Ponekad, čista voda može poslužiti kao model, ali se moraju uvažiti činjenice da ona ispunjava samo neke od traženih uslova.

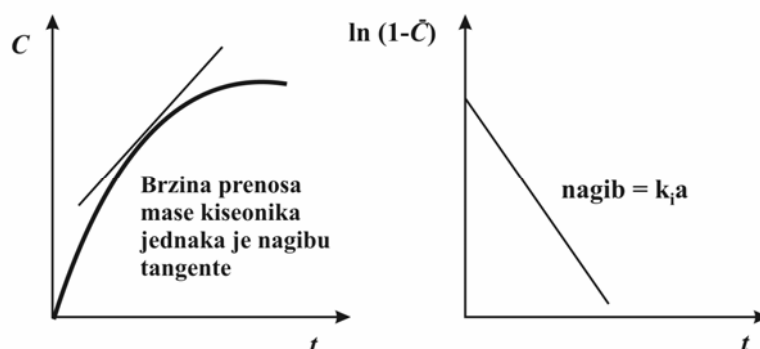
Postoje metodi koji su primenljivi na modele hranljive podloge i metodi koji su primenljivi na čitav bioproces. Metodi koje se primenjuju za hranljive podloge su:

- apsorpcioni,
- hemijski (sulfitni) i
- biohemijski (glukozo-oksidadzni).

Od metoda koji su primenljivi u toku bioprocesa, najčešće korišćeni su:

- dinamički,
- stacionarni i
- bilansni metod.

1. Metod apsorpcije. Po ovom metodu se prvo kroz tečnost u bioreaktoru provodi azot, da bi se koncentracija kiseonika smanjila skoro na nulu, a potom se produvava vazduh, uz mešanje. Tokom aeracije se kontinualno prati povećanje koncentracije kiseonika u tečnosti ili u izlaznom gasu pomoću kiseonične elektrode ili masenog spektrometra, respektivno. Zavisnost koncentracije rastvorenog kiseonika od vremena je data na slici 5.24.



Slika. 5.24 Zavisnost promena koncentracije kiseonika u tečnosti od vremena u toku aeracije tečnosti

Ako se pretpostavi da je tečnost idealno izmešana, onda važi jednačina (5.54) koja predstavlja bilans mase kiseonika u tečnoj fazi ima sledeći oblik:

$$\frac{dc}{dt} = K_L a (c^* - c) \quad (5.104)$$

Ako se uvede normalizovana vrednost koncentracije rastvorenog kiseonika $\bar{c} = c/c^*$, prethodna jednačina dobija oblik:

$$\frac{d\bar{c}}{dt} = k_L a (1 - \bar{c}) \quad (5.105)$$

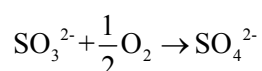
Uz pretpostavku da je zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika konstantan, nakon integrisanja, dobija se:

$$\ln(1 - \bar{c}) = -k_L a t + \text{const} \quad (5.106)$$

Zavisnost $\ln(1 - \bar{c})$ od vremena je prava linija s nagibom $-k_L a$ (slika 5.24). Jednačina (5.106) pokazuje da nije nepohodno poznavati početnu koncentraciju rastvorenog kiseonika, da bi se primenio ovaj metod

Najozbiljniji nedostaci apsorpcionog metoda su činjenice da osnovni uslov $k_L a = \text{const.}$ obično nije ispunjen, kao i da se koncentracija kiseonika meri u jednoj tački, koja u velikom bioreaktoru ne mora da bude reprezentativna. Nepovoljna je i činjenica da se kod velikih bioreaktora mora potrošiti velika količina azota da bi se izvršila desorpcija kiseonika.

2. Sulfitni metod. Reakcija oksidacije sulfita u sulfat pomoću rastvorenog kiseonika u prisustvu nekih jona, kao što su Co^{2+} ili Cu^{2+} , odvija se po sledećem mehanizmu:



Pod uslovom da se reakcija oksidacije sulfita odigrava na graničnoj površini (a ne i u tečnom filmu), što znači da je njena brzina limitirana brzinom prenosa mase kiseonika iz gasne u tečnu fazu, a koncentracija kiseonika u rastvoru sulfita jednaka nuli, kao i da je tečnost idealno izmešana, zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika se može izračunati iz jednačine:

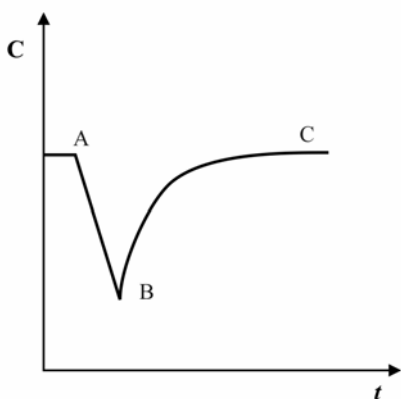
$$k_L a = \frac{(OTR)_{\max}}{c^*} \quad (5.107)$$

gde je: $(OTR)_{\max}$ – maksimalna brzina prenosa mase kiseonika, koja je povezana sa brzinom oksidacije sulfita:

$$(OTR)_{\max} = - \frac{1}{2} \frac{dc_{\text{sulf}}}{dt} \quad (5.108)$$

Prilikom određivanja brzine oksidacije sulfita, neproreagovani sulfat iz uzorka rastvora sulfita, uzetog posle određenog vremena aeracije rastvora, oksidiše se u višku joda, a zatim se višak joda određuje titracijom pomoću natrijumsulfata uz škrob kao indikator.

Prednost sulfitnog metoda je u njegovoj relativnoj jednostavnosti i tačnosti. Metod traje relativno dugo, a uticaj nečistoća u sulfitu na brzinu oksidacije može biti značajan. Ograničenje ovog metoda je u tome što se jednom hemijskom reakcijom aproksimiraju zbivanja u biorektoru, a i cena sulfita koji treba dodati u bioreaktor može biti visoka u slučaju biorektora velike zapremine.



Slika 5.25 Promena koncentracije kiseonika u tečnosti tokom određivanja dinamičkim metodom

3. Dinamički metod. Dinamički metod omogućava da se brzina prenosa mase kiseonika odredi u toku aerobnog bioprocesa. Metod se zasniva na praćenju promene koncentracije rastvorenog kiseonika pomoću kiseonične elektrode. Promena koncentracije kiseonika tokom određivanja prikazana je na slici 5.25. Tokom procesa, u jednom trenutku se prekine sa dovodom vazduha u bioreaktor (A), tako da koncentracija kiseonika počinje da opada zbog respiracije mikroorganizama. Potom se ponovo dovodi kiseonik (B) sve dok se ne postigne ravnoteža između brzine prenosa mase kiseonika i brzine respiracije (C).

Bilans mase kiseonika u tečnoj fazi u šaržnom biorektoru se može predstaviti jednačinom (5.56) koja se, posle deljenja sa c^* , transformiše u oblik:

$$\frac{d\bar{c}}{dt} = k_L a (1 - \bar{c}) - \bar{r}_{O_2} \quad (5.109)$$

gde je: $\bar{c} = c/c^*$ – normalizovana koncentracija rastvorenog kiseonika, a $\bar{r}_{O_2} = r_{O_2}/c^*$ – normalizovana brzina potrošnje kiseonika. Rečenje jednačina (5.109) zasniva se na sledećim pretpostavkama:

- brzina potrošnje kiseonika se ne menja u toku eksperimenta, niti dolazi do promene viskoziteta i gustine fluida,
- mešanje tečne faze je idealno,
- uticaj dinamičkog ponašanja gasa u fluidu se zanemaruje i
- dinamika kiseonične elektrode se zanemaruje.

U prvom delu eksperimenta, kada nema protoka vazduha, brzina prenosa kiseonika je jednaka nuli (pošto je apsorpcija kiseonika na slobodnoj površini tečnosti zanemarljiva) pa je:

$$\frac{d\bar{c}}{dt} = -\bar{r}_{O_2} \quad (5.110)$$

Odavde sledi da je normalizovana brzina respiracije jednaka nagibu pravolinijskog dela zavisnosti normalizovane koncentracije rastvorenog kiseonika sa vremenom.

Kada vazduh počne ponovo da se dovodi u biorektor, postepeno se dolazi do tačke C u kojoj je uspostavljeno kvazi-stacionarno stanje, a koncentracija kiseonika je jednaka c_s pa je:

$$\frac{d\bar{c}}{dt} = k_L a (1 - \bar{c}_s) - \bar{r}_{O_2} = 0 \quad (5.111)$$

odnosno:

$$\bar{c}_s = 1 - \frac{\bar{r}_{O_2}}{k_L a} \quad (5.112)$$

gde je: $\bar{c}_s = c_s/c^*$ – normalizovana koncentracija rastvorenog kiseonika u kvazi-stacionanom stanju.

Sada se jednačina (5.109) može napisati u drugom obliku:

$$\frac{d\bar{c}}{dt} = k_L a \left(1 - \bar{c} - \frac{\bar{r}_{O_2}}{k_L a} \right) = k_L a (\bar{c}_s - \bar{c}) \quad (5.113)$$

Nakon integrisanja, dobija se:

$$\ln(\bar{c}_s - \bar{c}) = -k_L a t + \text{const.} \quad (5.114)$$

Iz ovoga sledi da se $k_L a$ može izračunati iz nagiba zavisnosti $\ln(\bar{c}_s - \bar{c})$ od t .

Dinamički metod je brz, relativno jednostavan i primenljiv u toku aerobnog bioprocesa. Jedino se mora voditi računa da koncentracija kiseonika ne padne ispod kritične vrednosti za mikroorganizme.

4. Stacionarni metod. Ovaj metod se bazira na ravnoteži između potrošnje i apsorpcije kiseonika u kvazi-stacionarnom stanju, gde je $dc/dt = 0$, pa iz jednačine (5.56) sledi:

$$k_L a (c^* - c_s) = r_{O_2} \quad (5.115)$$

Ako se ravnotežna i kvazi-stacionarna koncentracija izmere, a brzina potrošnje kiseonika izračuna ili eksperimentalno odredi, onda se zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika može izračunati:

$$k_L a = \frac{q_{O_2}}{c^* - c_s} \quad (5.116)$$

5. Bilansni metod. Ovaj metod se zasniva na direktnom merenju količine kiseonika koja se razmenjuje između vazduha i tečnosti u toku aerobnog bioprocesa. Primenom masenog bilansa može da se odredi brzina prenosa mase kiseonika:

$$OTR = \frac{1}{RV_L} \left(\frac{Q_{vu} P_u y_u}{T_u} - \frac{Q_{vi} P_i y_i}{T_i} \right) \quad (5.117)$$

gde je: R – gasna konstanta, V_L – zapremina tečnosti, Q_v , T , P i y – zapreminski protok, temperatura, pritisak i zapreminski udeo kiseonika u vazduhu na ulazu (u) i izlazu (i) iz bioreaktora.

Ako se ravnotežna i aktuelna koncentracija kiseonika (c^* i c_L) izmere, onda se zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika može izračunati:

$$k_L a = \frac{OTR}{(c^* - c_L)} \quad (5.118)$$

f) Empirijske korelacije za izračunavanje koeficijenta prenosa mase kiseonika

Korelacije za izračunavanje vrednosti zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika u osnovi imaju oblik:

$$k_L a = K_1 \left(\frac{P}{V_L} \right)^a u_G^b \quad (5.119)$$

Cooper i saradnici su predložili korelaciju:

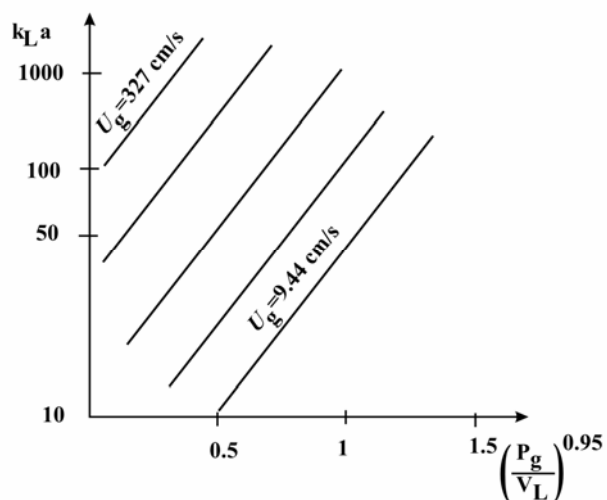
$$k_L a = K_1 \left(\frac{P}{V_L} \right)^{0.95} u_G^{0.67} \quad (5.120)$$

koja se i grafički može prikazati kao zavisnost $k_L a$ od P/V_L za različite vrednosti u_G , kako je to prikazano na slici 5.26.

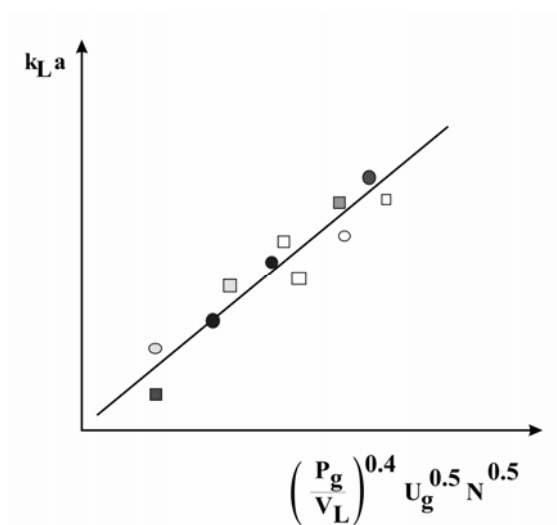
Calderbank je predložio korelaciju:

$$k_L a = K_2 \left(\frac{P}{V_L} \right)^{0.4} u_G^{0.5} N_i^{0.5} \quad (5.121)$$

gde je: N_i – brzina obrtanja mešalice. Grafička zavisnost $k_L a$ za kiseonik prema jednačini 5.126 je data na slici 5.27.



Slika 5.26 Zavisnost zavisnost $k_L a$ od P/V_L za različite vrednosti u_G



Slika 5.27 Prikaz zavisnosti $k_L a$ za koseonik prema Calderbank-ovoj jednačini

6. PRIPREMNA FAZA U BIOTEHNOLOŠKOJ PROIZVODNJI

Pod pripremnim fazama u biotehnološkoj proizvodnji podrazumevaju se:

- priprema vode,
- priprema industrijskih mikrobnih (hranljivih) ili enzimskih podloga,
- sterilizacija opreme, podloga i vazduha i
- priprema inokuluma (starter kultura)

6.1. PRIPREMA VODE ZA POTREBE BIOTEHNOLOŠKE PROIZVODNJE

Na prvi pogled, ogromna količina vode od približno 34 milijardi km³ na Zemlji je garancija za uspešno snabdevanje svetskog stanovništva svim potrebama, od vode za piće do vode za industriju, navodnjavanje, energetiku, transport i rekreaciju. Nažalost, samo 2,4% vode je „slatka“ voda pogodna za upotrebu. Najveći deo slatke vode nalazi se zarobljen u ledu na polovima naše planete (78,1%) i podzemlju (21,0%), dok se vrlo malo nalazi u slatkovodnim jezerima (0,37%) i rekama (0,005%).

Čovek se može snabdevati vodom iz bilo kog mesta u hidrološkom ciklusu. Uslov za to je da njen kvalitet na tom mestu odgovara standardima kvaliteta za datu namenu ili da se, ekonomski prihvatljivim postupcima pripreme, voda može dovesti do potrebnog kvaliteta. Na nivou sadašnjeg tehničko-tehnološkog razvoja i finansijskih mogućnosti, čovek nije u stanju da izuzima vodu za svoje potrebe iz svih delova hidrološkog ciklusa, prvenstveno ne iz polarnih i planinskih lednika gde vode ima najviše. Vodu je najlakše uzimati iz podzemlja na razumnim dubinama i iz površinskih izvorišta (reke i jezera), ali je jasno je da je količina vode koja se može direktno koristiti veoma ograničena.

6.1.1. Osobine voda

Od brojnih osobina koje voda ima, a od značaja su za njenu industrijsku primenu, najbitnije su: *temperatura tačke mržnjenja i ključanja, kiselost ili alkalnost, gustina, toplotni kapacitet, električna provodljivost, mineralizacija (količina rastvorenih minerala) i magnetna svojstva*. Sva ova svojstva zavise od čistoće vode, tj. od količina i vrsta rastvorenih supstanci u njoj.

Hemijski čista voda (uslovno) je providna i bezbojna, a u debljem sloju ima plavičastu boju. Ona praktično nema nikakvog ukusa i mirisa, ali nama, naviknutim na prirodnu vodu u kojoj je rastvorena izvesna količina minerala, ona se čini bljutavom.

Temperatura. Tečno stanje vode, na standardnom pritisku, omeđeno je temperaturom tačke mržnjenja (0°C) i tačke ključanja (100°C). Ova temperaturna oblast određuje takozvanu “*biokinetičku zonu*”, tj. oblast u kojoj je moguć opstanak pojedinih živih bića, kao i njenu industrijsku primenu pod uslovima normalnog pritiska.

Kiselost ili alkalnost vode ima veliki značaj za njenu upotrebljivost. Za piće i upotrebu u domaćinstvu voda treba da ima pH vrednost 6,8–8,5. Sa takvom pH vrednošću ukus vode je neutralan. Odstupanja od tih pH vrednosti čine vodu neprijatnom za piće, pa i zdravstveno štetnom.

Gustina čiste vode na $+4^{\circ}\text{C}$ iznosi $1,0\text{ g/cm}^3$. Minerali (soli) rastvoreni u vodi povećavaju njenu gustinu, dok neke organske materije, na primer, etanol, smanjuju gustinu vode.

Specifična provodljivost hemijski čiste vode je veoma mala, pa se može reći da je ona skoro idealan izolator. Sa rastvaranjem pojedinih supstanci, provodljivost vode naglo raste. Zbog toga je ovaj parametar dobar pokazatelj čistoće vode.

Toplotna provodljivost vode je veoma mala, dok su *specifična toplota i toplota isparavanja* velike. Ove osobine čine vodu veoma povoljnim prenosiocem toplote.

6.1.2. Vrste voda

Iz praktičnih i tehničkih razloga voda se obično deli prema mestu pojave u prirodi, stepenu čistoće i upotrebi (tabela 6.1). Prirodne vode (površinske i podzemne) su izvorišta za sve ostale vrste voda, pa će biti razmatrane detaljnije.

Tabela 6.1 Vrste voda prema različitim kriterijumima

<i>Kriterijum</i>	<i>Vrsta</i>
Mesto pojave u prirodi	Atmosferska voda (kiša, sneg, magla) Podzemna i izvorska voda Površinska voda (reke, jezera, potoci, vodene akumulacije) Hemijski vezana i kristalna voda u mineralima Hidraciona voda u neorganskim i organskim supstancama, koja nije hemijski vezana; otparavanjem se može ukloniti
Stepen čistoće	Sirova, neprečišćena voda Čista, mehanički prečišćena voda Omekšana, delimično ili potpuno demineralizovana voda Destilovana voda Otpadna, zagađena voda
Način upotrebe	Voda za piće, Voda za pranje (sanitarna voda), Voda za tehnološku upotrebu (procesna i tehnička voda), Voda za ribolov i rekreaciju i Voda za navodnjavanje.

6.1.3. Sastav prirodnih voda

U prirodnim vodama nalazi se niz rastvorenih supstanci. I najčišća atmosferska voda, u zoni nezagađene prirode, predstavlja rastvor koji sadrži CO_2 , O_2 , N_2 , NH_3 , i dr., dok u zagađenim zonama sadrži još i SO_2 , H_2S , N_xO_y , HCl i čađ. Sastav površinskih voda jako varira. Najčišće su vode brdskih potoka i reka, jer sadrže veoma malo organskih supstanci, mikroorganizama i rastvorenih soli. Kvalitet rečnih voda, koje čovek najviše koristi, jako varira, od uslovno čistih do veoma zagađenih, što zavisi od vrste, količine i zagađenosti voda koje se u njih ulivaju. Vodoakumulacije, koje postaju jedan od najvažnijih izvorišta vode za snabdevanje, variraju u sastavu, što zavisi od starosti akumulacije, geološkog sastava zemljišta, okruženja i kvaliteta voda kojima se pune. Uobičajeni sastojci prirodnih (nezagađenih) voda prikazani su na slici 4.1. Prirodni sastav voda u današnjim uslovima može se značajno pogoršati zbog zagađivanja vazduha i zemljišta sa kojima voda dolazi u kontakt u hidrološkom ciklusu.

Rastvorene soli dospevaju u vodu rastvaranjem minerala pri njenom prolasku kroz zemljinu koru. Od rastvorenih supstanci redovno su prisutne soli kalcijuma, magnezijuma i natrijuma u obliku bikarbonata i u manjoj meri u obliku hlorida, sulfata i nitrata. Soli kalcijuma i magnezijuma vodi daju *tvrdocu*. Bikarbonati kalcijuma i magnezijuma daju *karbonatnu tvrdocu*, a ostale soli ovih elemenata daju *nekarbonatnu tvrdocu*. Zagrevanjem (kuvanjem) vode iz nje se izdvaja bikarbonatna tvrdoća u obliku kamenca na sudovima, razmenjivačima toplote itd. Ove naslage se mogu ukloniti rastvaranjem u razblaženoj sirćetnoj ili sonoj kiselini. U pojedinim geografskim područjima vode iz bunara, posebno arterskih i subarterskih, mogu sadržavati povećane količine gvožđa, mangana i amonijaka, a ponegde arsena, kao i huminskih jedinjenja (proizvod raspadanja biljnog materijala).

Rastvoreni gasovi (kiseonik, azot, ugljendioksid), obično dospevaju u vodu njenim kontaktom sa vazduhom (padanjem kiše i snega, kao i kontaktom površina vode – vazduh).

Amonijak u vodu dospeva raspadanjem (truljenjem) organskih supstanci (uginule biljke i životinje, fekalije iz komunalnih otpanih voda), spiranjem sa zemljišta đubrenih azotnim đubrivima, zagađenim vodama iz industrije ili iz zagađenog vazduha. Takođe, pojava amonijaka u vodi se može javiti i kao posledica geološkog sastava stena koje su u kontaktu sa podzemnim izdanima.

Suspendovane materije su skoro redovno prisutne u površinskim vodama, a u podzemnim vodama ih u principu nema. Suspendovane materije dospevaju u površinske vode spiranjem sa zemljišta i erozijom.

Organske supstance u vodi su prirodna, sintetska i jedinjenja nastala u toku pripreme vode za upotrebu (piće). Prirodna organska jedinjenja dospevaju u vodu raspadanjem (truljenjem) životinjskih ili biljnih organizama, kao i preko komunalnih otpadnih voda i otpadnih voda prehrambene industrije i biotehnologije. Sintetska organska jedinjenja, koja uključuju veliki broj supstanci, od pesticida i tenzida (površinski aktivne materije), dospevaju u vodu kao zagađenje usled čovekovog nemara. Organska jedinjenja nastala u toku pripreme vode, proizvodi su razlaganja i reagovanja prirodnih ili sintetskih organskih jedinjenja sa sredstvima za dezinfekciju vode (hlor, hlordioksid, ozon). Najveći deo organskih jedinjenja koja se nalaze u vodi imaju izrazito štetno delovanje na ljudsko zdravlje.

Kvalitet svih voda, koje su uključene u hidrološki ciklus, uzajamno je zavisian. Sastav podzemnih voda je u direktnoj zavisnosti od stanja površinskih voda, koje, u svom kruženju do njih dospevaju. Izvorišta površinskih voda predstavljaju svojevrsne eko-sisteme, koji se odlikuju prisustvom organskih i neorganskih supstanci. One u njih dospevaju prirodnim putem (*eutrofikacija*) ili kao posledica delovanja antropogenog (ljudskog) faktora (*zagađenje ili saprobnost*). **Eutrofikacija** je prirodni proces zagađivanja prirodnih voda i, u principu, je niskog inteziteta. **Saprobnost** akvatičnog eko-sistema iskazuje direktan ili indirektan uticaj *antropogenog faktora*. On može biti velikog intenziteta i može dovesti do potpunog razaranja akvatičnog eko-sistema.

Prema količini zagađujućih supstanci i intezitetu primarne produkcije u vodi, površinske prirodne vode se dele na:

- *oligotrofne*, slabo produktivne i siromašne hranom,
- *eutrofne*, vrlo produktivne i bogate hranom, i
- *distrofne*, slabo produktivne, u izvesnom smislu “odumiruće” vode.

6.1.4. Zagađivanje prirodnih voda

Pod zagađivanjem prirodnih voda podrazumeva se unošenje povećanih količina organskih ili neorganskih supstanci u odnosu na normalna zbivanja u prirodi. Površinske vode se u hidrološkom ciklusu zagađuju na tri načina:

- izlivanjem otpadnih (zagađenih) voda,
- prolaskom padavinskih voda kroz zagađeno zemljište (pre svega neuslovna smetlišta, jalovišta i deponije) i
- prolaskom kišnih kapi kroz zagađenu atmosferu.

Uticaj pojedinih zagađivača na zagađivanje prirodnih voda je različit. Po svojoj prirodi, zagađenja koja potiču iz naselja bez industrije, imaju daleko manje štetan uticaj od industrijskih i pojedinih rasutih zagađivača. Takođe, nije istovetan uticaj različitih industrijskih objekata. Manje su štetne otpadne vode prehrambene industrije i biotehnologije, u odnosu na otpadne vode hemijske industrije, ali to treba prihvatiti uslovno, do određenih nivoa, kada i one mogu postati veoma opasne. Primer za to je, u ovom momentu Bački kanal kao veoma zagađen vodotok, upravo vodama prehrambene industrije.

6.1.5. Klasifikacija prirodnih voda prema kvalitetu

Klasa kvaliteta vode određuje se fizičko-hemijskim ispitivanjima. Bez uvida u mikrobiološke, biološke i radiološke karakteristike, ocena kvaliteta vode i njena klasifikacija bila bi neprecizna i mogla bi dovesti do grubih grešaka. Zbog toga, klasifikaciju prirodnih voda treba obavljati na osnovu integralnog sistema kvaliteta. Njegovom primenom se utvrđuje, prati i obezbeđuje stabilnost vodenog eko-sistema i održanje kvaliteta vode na nivou utvrđene klase i zahteva za upotrebu u različite svrhe. Na osnovu parametara kvaliteta (tabela 6.2), prirodna voda se svrstava u četiri klase kvaliteta prema graničnim vrednostima nekih pokazatelja kvaliteta.

Voda I klase nalazi se u prirodnom, nezagađenom stanju i može se bez posebne obrade direktno koristiti kao voda za piće i za potrebe u prehrambenoj industriji. Pre korišćenja vode ovog

kvaliteta, primenjuje se samo dezinfekcija, radi sprečavanja sekundarne infekcije u rezervoarima i u vodovodnoj mreži. Ovaj kvalitet imaju izvorske vode i vode nekih bunara, zatim vode nekih vodotokova i jezera u nezagađenoj prirodi, prvenstveno u brdskim i planinskim predelima.

Voda II klase se u prirodnom stanju može koristiti za rekreaciju i gajenje manje kvalitetnih, vrsta riba (šaran, amur, tolstolobik, som). Za korišćenje u domaćinstvu, prehrambenoj industriji i biotehnologiji ova voda se mora prethodno obraditi postupcima bistrenja i dezinfekcije. U ovu klasu voda spadaju manje zagađene površinske vode i vode nekih bunara.

Voda III klase može se upotrebiti za navodnjavanje, a za korišćenje u domaćinstvu i prehrambenoj industriji, mora se prethodno obraditi postupcima bistrenja i složenim postupcima uklanjanja štetnih sastojaka. Vode ove klase su nepodesne za vodosnabdevanje. Postupci za njihovo prečišćavanje su veoma složeni, a prečišćena voda ima suviše veliku i za naše uslove teško prihvatljivu cenu.

Voda IV klase je veoma zagađena i može se upotrebljavati samo posle složene obrade, pa obrađena voda ima veoma visoku cenu.

Voda van klase. Vode ove vrste u prirodi ne bi smelo biti. Takvo zagađenje mogu imati samo otpadne vode pre prečišćavanja. Korišćenje ove klase voda za vodosnabdevanje krajnje je neprihvatljivo.

Tabela 6.2 Granične vrednosti nekih parametara kvaliteta površinskih voda (po trenutno važećim pravilnicima)

<i>Pokazatelj kvaliteta</i>	<i>Klasa</i>			
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>
Rastvoreni O ₂ (mg/dm ³)	8	6	4	3
Zasićenost O ₂ (%):				
- saturacija	90–105	75–90	50–75	30–50
- supersaturacija	-	105–115	115–125	125–130
BPK ₅ (mg O ₂ /l) do	2	4	7	20
HPK iz utroška KMnO ₄ (mg O ₂ /l) do	10	12	20	40
Suspendovane materije (mg/dm ³) do	10	30	80	100
Suvi ostatak filtrirane vode (mg/dm ³) do	350	1000	1500	-
pH	6,8–8,5	6,8–8,5	6,0–9,0	6,0–9,0
Najverovatniji broj koliformnih bakterija u litru vode:	2.000	100.000	200.000	-
- za kupanje	-	20.000	-	-
Stepen biološke produktivnosti (samo za jezera)	oligotrofni	umereno	eutrofni	-
Stepen saprobnosti po Liebermannu	-	oligo-	β-α-mezo	α-β-mezo
(samo za površinske vode)	-	saprobni	saprobni	saprobni
Toksične materije, izmena temperature i drugi pokazatelji štetnosti	Ne smeju se nalaziti ni u jednoj klasi iznad propisanih granica			

6.1.6. Korišćenje voda

Dve glavne oblasti korišćenja voda su za snabdevanje stanovništva (voda za piće) i industrije. U cilju zaštite ljudskog zdravlja, standardi kvaliteta vode za piće su čvrsto utvrđeni, a kvalitet vode za piće se kontroliše preko: hemijskih, bioloških i radioloških aspekata kvaliteta, preporučenih standarda i normativa i monitoringa kvaliteta. Voda koja se koristi u industriji, zavisno od vrste upotrebe, deli se na: procesnu, tehnološku i vodu za piće, pripremu hrane i sanitarne potrebe. Procesna voda direktno učestvuje u tehnološkom procesu kao: reaktant, rastvarač ili katalizator, a u prehrambenoj industriji i biotehnologiji velikim delom čini gotov proizvod. U principu, zahtevani kvalitet ove vode je istovetan sa kvalitetom vode za piće. Tehnološka voda uključuje vodu koja se koristi kao rashladni, grejni ili transportni fluid, vodu za napajanje parnih kotlova, za održavanje higijene u pogonu i dr. Vodu za piće i sanitarne potrebe koriste zaposleni u proizvodnim pogonima.

Kvalitet procesne i tehnološke vode zavisi od vrste industrije u kojoj se koristi. Najviši kvalitet, identičan kvalitetu vode za piće, mora imati procesna voda u prehrambenoj industriji i biotehnologiji, a još su oštriji zahtevi za vodu za potrebe farmacije. Najniži kvalitet treba da ispuni voda u metalurgiji, dok kvalitet vode u pojedinim hemijskim tehnologijama varira od slučaja do slučaja. Poseban kvalitet mora imati voda koja se koristi za napajanje parnih kotlova. Voda se mora posebno pripremati, tako da se iz nje uklone rastvorene soli, što podrazumeva tzv. omekšavanje, pa i demineralizaciju.

6.1.7. Pregled postupaka za pripremu (obradu) vode

Za snabdevanje prehrambene industrije i biotehnologije, koje zahtevaju isti kvalitet vode, može se koristiti voda nižeg kvaliteta, prvenstveno voda II klase, a ponegde i voda III klase. Ako ove vode ne odgovaraju uslovima propisanog kvaliteta, pre upotrebe se moraju obraditi (prečistiti). Za obradu vode do kvaliteta higijenske ispravnosti koriste se različiti postupci, zavisno od stepena zagađenosti i vrste zagađenja (tabela 6.3).

Na slici 6.1 šematski su prikazane osnovne tehnološke linije obrade vode zavisno od njenog polaznog kvaliteta. Procesi i operacije razvrstani su po redosledu tretmana u tehnološke linije obrade vode (tabela 6.4). Jasno se vidi koliko se postupak usložnjava sa porastom zagađenosti vode.

Tabela 6.3 Pregled operacija u postupcima obrade voda različitog stepena zagađenosti do kvaliteta higijenske ispravnosti

<i>Stepen zagađenosti</i>	<i>Operacija</i>
Nizak	Filtracija (gruba i fina) Dezinfekcija hlorom Fluorisanje (preporuka)
<i>Stepen zagađenosti</i>	<i>Operacija</i>
Srednji	Filtracija, Ozonizacija Filtracija na peščanim filtrima (bistrenje) Filtracija na aktivnom uglju (adsorpcija) Dezinfekcija hlorom Fluorisanje (preporuka)
Visok	Filtracija Ozonizacija Koagulacija i taloženje (filtracija) Aeracija (dezodoracija, oksigenacija) Filtracija na peščanim filtrima Ozonizacija Filtracija na aktivnom uglju (adsorpcija), Dezinfekcija hlorom Fluorisanje (preporuka)

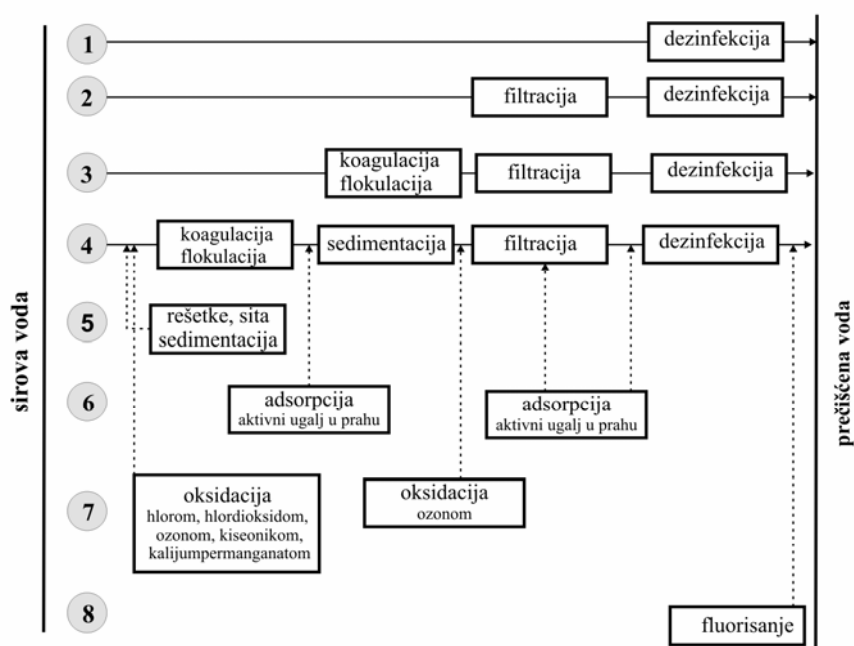
**Slika 6.1** Varijantna rešenja procesnih linija za pripremu vode za piće zavisno od njenog kvaliteta (1 i 2. voda klase I, 3 i 4. voda klase II, 5–8. vode klase III i IV)

Tabela 6.4 Tehnološke linije obrade vode

<i>Klasa</i>	<i>Tehnološka linija</i>	<i>Primena</i>
1	1	Primenjuje se kada voda ispunjava uslove standarda kvaliteta vode za piće (redak slučaj kod pojedinih bunara i izvora)
	2	Primenjuje se kod voda koje sadrže samo suspendovane supstance u koncentraciji do 10 mg/dm ³ , koje se mogu ukloniti filtracijom
2	3	Primenjuje se ako voda sadrži suspendovane i koloidno rastvorene supstance u količini do 40 mg/dm ³
	4	Primenjuje se ako voda sadrži veću količinu suspendovanih i koloidno rastvorenih supstanci
3 i 4	5	Koristi se kod obrade površinskih voda koje pored suspendovanih i koloidno rastvorenih supstanci sadrže i biološko zagađenje (alge, planktone itd.)
	6 i 7	Primenjuje se kada obrada, pored prethodnih linija, sadrži dodatne procese i operacije, radi uklanjanja prisutnih organskih (huminske i fulvo kiseline) i neorganskih i (gvožđe, mangan, arsen, amonijum jon) supstanci

6.1.8. Postupci pripreme vode za industrijske potrebe

Kod vode za industrijsku upotrebu, posebno procesne vode, jedinstvene norme kvaliteta ne postoje i one su određene prema vrsti tehnološkog postupka. Jedino su kotlovske i rashladne vode jedinstveno normirane u pogledu kvaliteta, bez obzira na vrstu tehnologije u kojoj se koriste.

a) Omekšavanje vode

Pod omekšavanjem vode se podrazumeva uklanjanje soli koje vodi daju tvrdoću, a to su rastvorne soli kalcijuma i magnezijuma, pre svega bikarbonati, a zatim hloridi, nitrati i sulfati. Ovakva voda se koristi u grejnim i rashladnim sistemima i za napajanje kotlova niskog pritiska.

Za omekšavanje vode se koriste hemijski postupci i jonska izmena.

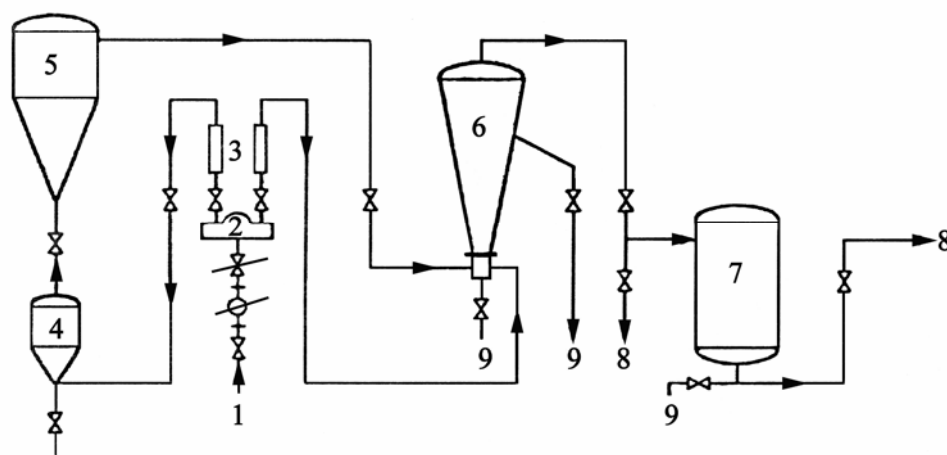
Hemijski postupci obuhvataju omekšavanje vode:

- krečom,
- natrijumhidroksidom,
- sodom i krečom i
- solima fosforne kiseline.

Osnovni princip navedenih postupaka je da se soli kalcijuma i magnezijuma prevedu u nerastvoran oblika i iz vode odvoje taloženjem. Postupcima sa krečom i sodom (Na₂CO₃), rastvorne soli kalcijuma i magnezijuma se prevode u nerastvorne karbonate, a postupkom sa solima fosforne kiseline, oni se prevode u nerastvorne fosfate.

Postrojenje za hemijsko omekšavanje vode

Na slici 6.2 šematski je prikazano postrojenje za omekšavanje vode postupkom sa krečom. U reaktor, koji ima cilindrično-konusan oblik, dodaje se pripremljeni vodeni rastvor reaktanta i uz mešanje se obavi hemijska reakcija. Nakon završetka reakcije, prekida se mešanje, da bi se u konusnom delu reaktora odvojio talog. Izdvojeni talog se odvodi na deponiju, a izbistrena voda se filtrira kroz peščani filter, radi daljeg bistrenja. Ovako omekšana voda se koristi kao grejni fluid i za napajanje kotlova niskog pritiska. Omekšavanje vode drugim hemijskim agensima se izvodi u postrojenjima slične konstrukcije.



Slika 6.2 Šematski prikaz postrojenja za omekšavanje vode krečom
 1 – ulaz sirove vode, 2 – raspodeljivač vode, 3 – merači protoka, 4 – sud za krečno mleko, 5 – sud za krečnu vodu, 6 – reaktor, 7 – peščani filter, 8 – izlaz dekarbonizovane vode i 9 – ispust taloga

U vodi omekšanoj hemijskim postupcima zaostaju soli koje ne čine tvrdoću, kao i soli koje daju tvrdoću, ali nisu potpuno uklonjene. Stoga se takva voda ne može koristiti za napajanje kotlova visokog pritiska, a često nije prihvatljiva ni kao procesna voda. Za kvalitetnije omekšavanje vode koriste se postupci jonske izmene.

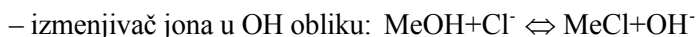
Jonska izmena

Jonska izmena predstavlja efikasniji način omekšavanja vode, kojim se, povoljnom kombinacijom izmenjivača jona, može postići visok stepen demineralizacije. Zasnovana je na sposobnosti izvesnih prirodnih i sintetičkih materija da imaju sposobnost vezivanja (adsorpcije) jona prisutnih u vodi.

Kod *katjonskih izmenjivača jona* vezivanje teče prema jednačinama:



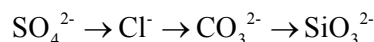
Kod *anjonskih izmenjivača jona* vezivanje teče prema jednačini:



Oznaka Me u gornjim jednačinama se odnosi na noseću matricu izmenjivača jona, koja je kod sintetičkih izmenjivača organski polimer, a kod prirodnih izmenjivača (najrasprostranjeniji su *zeoliti*) je neorganskog karaktera.

Kombinacijom katjonskih i anjonskih izmenjivača mogu se iz vode ukloniti prisutni katjoni i anjoni. Vodonični i hidroksilni joni koje ispuštaju izmenjivači jona kada se vežu katjoni, odnosno anjoni vezuju se u molekule vode.

Efikasnost. Izmenjivači jona nemaju istu efikasnost vezivanja različitih jona, što zavisi od njihovog afiniteta prema određenoj jonskoj vrsti. Uspešnije se izdvajaju viševalentni joni. Za slučaj podjednakih koncentracija različitih jona u vodi mogu se postaviti sledeći afinitetni nizovi katjonskih i anjonskih izmenjivači jona:



Selektivnost. Postoje izmenjivači jona koji selektivno vezuju pojedine jone, na primer, organske jone, tako da se njihovom primenom mogu izdvojiti željene supstance iz vode. Pri tome se voda ne demineralizuje.

Kapacitet izmene. Definiše se kao količina jona koju izmenjivač može da veže, odnosno da otpusti po jedinici svoje mase pod određenim uslovima.

Sposobnost regeneracije. Kada se izmenjivač jona zasiti vezivanjem jona, obavlja se njegova regeneracija. Ona se izvodi obrnutim reakcijama od reakcija vezivanja jona. Uslov da reakcija obrnute izmene uspešno teče je da se sa dovoljnom koncentracijom reagensa za regeneraciju ostvari veći afinitet izmenjivača jona prema jonu kojim se regeneriše od afiniteta koji ima prema jonu kojim je zasićen.

Prirodni izmenjivači jona. Izmenjivači jona su, u principu, organske prirode i sintetičkog porekla, mada postoje i prirodni izmenjivači jona mineralnog karaktera (*zeoliti*). I piljevina drveta pokazuje sposobnost vezivanja jona metala. Prirodni mineralni izmenjivači jona su široko primenjivani dok nisu sintetizovani efikasniji i selektivniji organski izmenjivači jona. Jedno vreme oni su bili skoro napušteni, ali se vraćaju u upotrebu zbog zamene sintetskih materijala prirodnim u ci-

lju očuvanja životne saredine. Tome su doprineli razvijeni postupci prečišćavanja i poboljšanja apsorpcionih osobina prirodnih mineralnih izmenjivača jona.

Sintetički (organski) izmenjivači jona. Kao organski izmenjivači jona koriste se različite sintetičke smole. Katjonski izmenjivači jona se, u principu, dobijaju kopolimerizacijom stirena i divinilbenzena, odnosno polikondenzacijom fenola i formaldehida, a anjonski polimerizacijom aromatičnih amina sa formaldehidom. Polimerna organska masa čini *nepokretni jon* za koga je vezan *pokretni jon*. U masi izmenjivača jona, organski deo je nosač aktivne grupe sa kojom se vrši izmena jona. Kod jako kiselih katjonskih izmenjivača jona aktivna je $-\text{SO}_3\text{H}$, a kod slabo kiselih $-\text{COOH}$ grupa. Kod anjonskih izmenjivača jona aktivne grupe su *amino-* i *imino-* (kod slabo baznih izmenjivača jona) i *kvaternerna amonijum grupa* (kod jako baznih izmenjivača jona.).

Postrojenja za jonsku izmenu

U sastav postrojenja za jonsku izmenu ulaze kolone sa izmenjivačima jona, pumpe za potiskivanje vode kroz postrojenje, merno-regulaciona tehnika (merači protoka, merači provodljivosti, itd.) i oprema za regeneraciju (priprema i doziranje agensa za regeneraciju). Ako voda sadrži suspendovane materije, ispred kolona sa izmenjivačima jona postavlja se zaštitna kolona sa peskom, a ako je voda hlorisana postavlja se i kolona sa aktivnim ugljem. Step en složenosti uređaja zavisi od vrste prisutnih jona u vodi i željenog efekta njihovog uklanjanja.

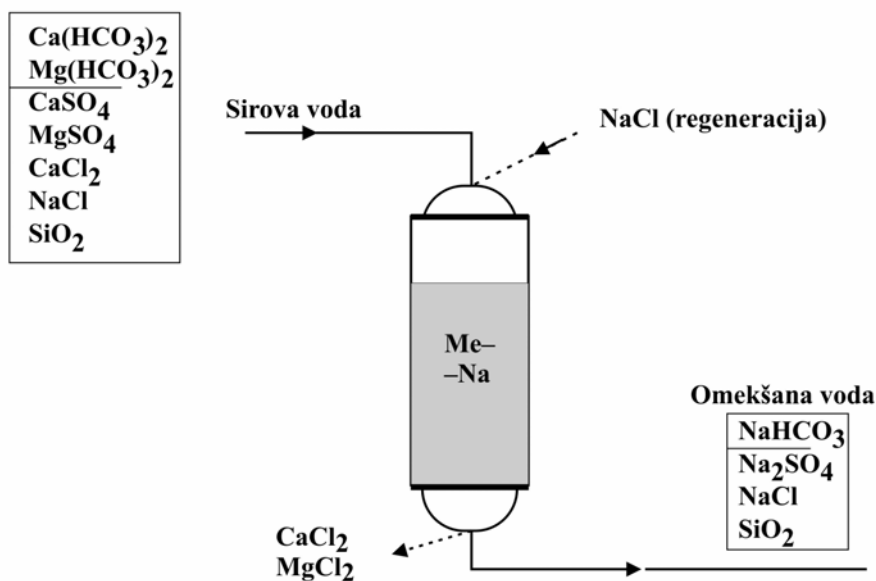
Postrojenje sa „neutralnom izmenom“ koristi se za direktno omekšavanje vode. Ono uključuje samo jednu jonoizmenjivačku kolonu sa izmenjivačem jona u neutralnom, tj. natrijumovom obliku. Izmenjivač jona se regeneriše rastvorom natrijumhlorida. Principijelna šema postrojenja za neutralnu izmenu prikazana je na slici 6.3. Ukupna količina jona u omekšanoj vodi jednaka je polaznoj, ali su soli kalcijuma i magnezijuma zamenjene odgovarajućim solima natrijuma. Ovako omekšana voda koristi se za napajanje kotlova niskog pritiska i kao grejni i rashladni fluid, jer ne formira kamenac.

Postrojenja za derkarbonizaciju vode. Voda sa povećanim sadržajem bikarbonata stvara kamenac i ima povećan alkalitet, što je čini nepovoljnom za upotrebu u nekim biotehnološkim procesima (na primeru proizvodnji piva). Za njeno omekšavanje se koriste izmenjivači katjona u vodičnom obliku:

- *slabo kiseli* – za omekšavanje vode sa povećanim sadržajem kalcijum- i magnezijumbikarbonata i
- *jako kiseli* – za omekšavanje vode sa povećanim sadržajem natrijumbikarbonata.

U oba slučaja dobija se voda sa manjim ili većim sadržajem nekarbonatne tvrdoće, što zavisi od njenog polaznog sastava. Za regeneraciju obe vrste izmenjivača koristi se rastvor HCl. Postrojenje za dekarbonizaciju vode, sadrži kolonu sa odgovarajućim izmenjivačem jona. Pošto dekarbonizovana voda sadrži oslobođeni CO_2 , za njegovo uklanjanje, nakon kolone za jonsku izmenu, postavlja se kolona za degazaciju.

Kod voda koje sadrže veliku količinu bikarbonata, celishodno je prvo izvršiti dekarbonizaciju krečom, a zatim omekšavanje katjonskim izmenjivačem u Na-obliku. Ovim se rasterećuje rad kolone, ali se postupak usložnjava.



Slika 6.3 Šematski prikaz postrojenja za omekšavanje vode neutralnom izmenom

b) Demineralizacija vode

Demineralizacija se može obaviti:

- jonskom izmenom,
- membranskim procesima i
- destilacijom.

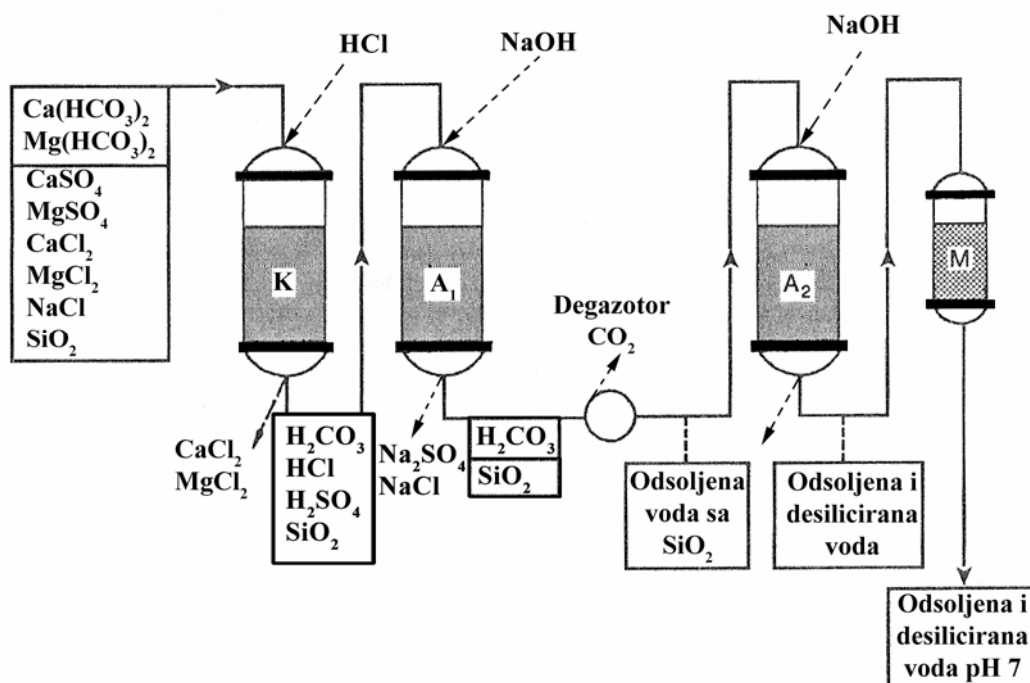
Jonska izmena je do skora bila najprimenjeniji postupak dobijanja demineralizovane vode. Intenzivan razvoj u oblasti membranskih procesa poslednjih godina, naročito uvođenjem membrana koje za separaciju ne zahtevaju jako visoke pritiske, značajno je pojeftinio ugradnju ove vrste postrojenja, pa se ona primenjuju sve češće, sa perspektivom da potpuno potisnu demineralizaciju vode izmenjivačima jona. Demineralizacija vode destilacijom u industrijskim uslovima, zbog velike potrošnje i skupe toplotne energije, postaje neprihvatljiva. Ona je od interesa jedino za laboratorijske potrebe i za dobijanje posebno čiste potpuno demineralizovane (*apirogene*) vode za potrebe medicine i farmacije. U ovom slučaju završna demineralizacija vode, nakon jonske ili membranske demineralizacije, neizbežno se vrši destilacijom, pa i redestilacijom.

Demineralizacija vode jonskom izmenom

Demineralizacija vode izmenjivačima jona zahteva složenije postrojenje od postrojenja za omekšavanje vode (slika 6.4). Vodu ovog kvaliteta zahtevaju kotlovi visokog pritiska, koji se koriste u elektranama i uređajima za dijalizu.

Ovo postrojenje uključuje kolonu sa jako kiselim izmenjivačem u H^+ obliku za uklanjanje katjona i ugljene kiseline, zatim jako bazni izmenjivač anjona u OH^- obliku nakon čega se dobija voda bez rastvorenih jonskih supstanci. Nakon ovih kolona, postavljaju se kolona za degazaciju, radi uklanjanja CO_2 , i kolona sa anjonskim izmenjivačem, radi uklanjanja silicijuma. Iz anjonske kolone, u principu, izlazi demineralizovana voda, koja je slabo kisela zbog prisustva malih količina rastvorene ugljene kiseline. U tom slučaju se, iza anjonske kolone, postavlja manja kolona sa slabo kiselim izmenjivačem katjona (tzv. „pufer“ kolona). Za postizanje najvišeg stepena demineralizacije vode na kraju se postavlja i jedna *mešana kolona* (tzv. „policaj“ kolona) sa katjonskim i anjonskim izmenjivačima jona, koja vrši završnu demineralizaciju, tzv. „poliranje“ vode.

Izgradnja postrojenja za postizanje visokog stepena demineralizacije vode pomoću izmenjivača jona zahteva velika investiciona ulaganja zbog njegove složenosti. Takođe, rad sa ovim postrojenjem je dosta složen i pored mogućnosti visoke automatizacije. Za regeneraciju izmenjivača troše se hemikalije, što poskupljuje rad postrojenja. Zbog toga se u poslednje vreme u praksi demineralizacija izmenjivačima jona sve više zamenjuje membranskim procesima, koji su investiciono postali prihvatljivi, a rad sa njima je znatno jednostavniji i sigurniji.



Slika 6.4 Šematski prikaz postrojenja za demineralizaciju vode.

K – katjonska kolona, A_1 i A_2 – anjonske kolone, M – mešana kolona

Demineralizacija vode membranskim procesima

Membranski procesi se odvijaju na membrani ili posredstvom membrane, a zasnovani su na:

- *selektivnoj propustljivosti membrane*,
- *adsorpciji na adsorbentu*, koji je zadržan na membrani ili od strane same membrane, ili
- *biološkim procesima* uz pomoć mikroorganizama ili enzima, koji su zadržani ili imobilisani na membrani.

U membranskim separacionim procesima dolazi do razdvajanja suspenzija i rastvora kroz polupropustljivu (semipermeabilnu) membranu. Pogonska sila kod ovih procesa je pritisak koji se ostvaruje potisnim pumpama.

U zavisnosti od propustljivosti membrane, razlikuju se:

- *mikrofiltracija* (MF), kojom se uklanjaju čestice veće od 0,1 μm (membrana zadržava suspendovane, koloidno dispergovane čestice i vitalne mikroorganizme), koja se koristi za bistenje i dezinfekciju vode;
- *ultrafiltracija* (UF), kojom se uklanjaju čestice veće od 1 nm (membrana zadržava veće molekule rastvorenih materija, spore i viruse), koja se koristi za uklanjanje organskih supstanci i sterilizaciju vode; i
- *reverzna osmoza* (RO), kojom se uklanjaju čestice manje od 1 nm (membrana propušta samo rastvarač), koja se koristi za demineralizaciju vode.

Prvobitno, membranski procesi, posebno reverzna osmoza i ultrafiltracija, primenjivani su u desalinaciji vode i u pripremi manjih količina vode za potrebe medicine i farmacije. Danas je njihova primena proširena na prečišćavanje vode namenjene snabdevanju stanovništva, pa i za potrebe industrije (procesne i kotlovske napojne vode). Nagloj ekspanziji membranskih procesa posebno su doprineli sledeći momenti:

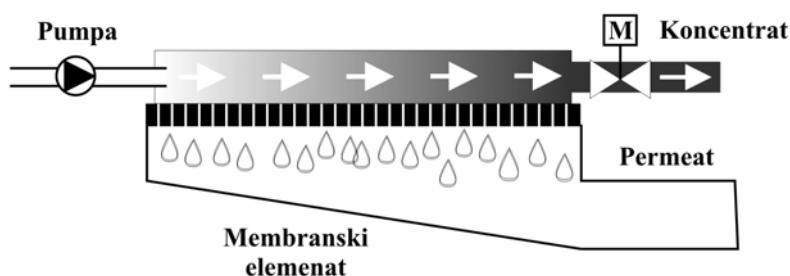
- pad investicionih troškova,
- proces je kontinualan, izoterman i selektivan za pojedine rastvore,
- energetski bilans (posebno u odnosu na postupak destilacije) vrlo je povoljan,
- ne zagađuje se okolina,
- troškovi održavanja su dosta niski i
- izgradnja uređaja je modularna, što omogućava jednostavno povećanje kapaciteta postrojenja.

Nepovoljnost kod membranskih procesa je što zahtevaju povišene pritiske radi potiskivanja vode kroz membranu. Takođe, radi zaštite od zagađenja i blokiranja membrane, mora se izvršiti predtretman vode, koji se sastoji u uklanjanju suspendovanih materija postupcima filtracije. Kod voda koje sadrže koloidno rastvorene i suspendovane materije, potrebno je prethodno izvršiti koagulaciju i flokulaciju, kao i deferizaciju i demanganizaciju, u cilju očuvanja membrane. Membranski procesu su našli svoje mesto u izdvajanju i prečišćavanju proizvoda biotehnologije, kao i u prečišćavanju otpadnih voda.

Princip membranskih procesa je jednostavan. Osnovna komponenta je polupropustljiva membrana na čijoj površini se dešavaju sve promene. Separacija suspenzije ili rastvora kroz membranu zasniva se na selektivnoj propustljivosti membrane. Mikrofiltracija se objašnjava

teorijom pora ili membranskog sita. Membrana deluje kao sito na kome se zadržavaju čestice većeg prečnika od prečnika pora, a čestice manjeg prečnika prolaze kroz njih. U slučaju ultrafiltracije ili reverzne osmoze, membrana deluje kao membransko sito: molekuli veći od pora se zadržavaju na membrani, a rastvarač prolazi.

Principijelna šema membranskog procesa je prikazana na slici 6.5. Pod dejstvom pritiska kroz membranu, na suprotnu stranu, prolazi proizvod (permeat), a koncentrovani rastvor izdvojenih komponenti (koncentrat) ostaje na gornjoj strani membrane. Svaka od ove dve frakcije se posebno izvodi iz sistema. Prečišćena voda (permeat), nakon prolaska kroz membranski sistem, gubi pritisak i slobodnim isticanjem se prihvata u posebnom rezervoaru, a odatle odvodi do potrošača. Uz kontinualno povećanje gustine i sa pritiskom koji je približno jednak ulaznom, koncentrat se odstranjuje sa površine membrane u pravcu oticanja. On se, ukoliko ne sadrži štetne komponente za životnu sredinu, ispušta u kanalizaciju.



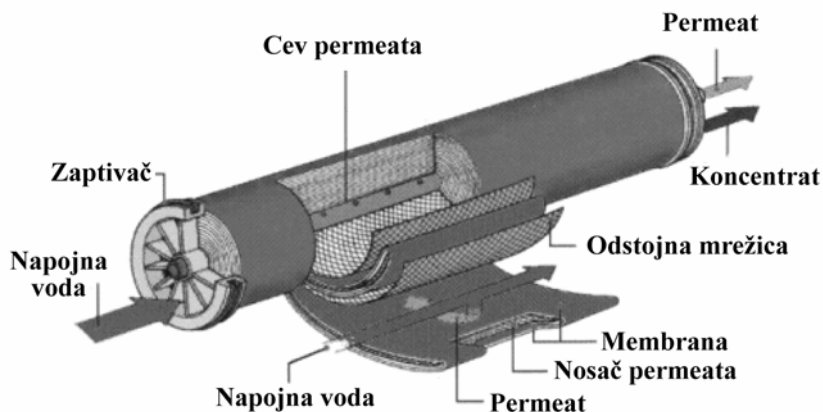
Slika 6.5 Principijelna šema membranskog procesa

Od kvaliteta membrane i radnog pritiska postrojenja zavise stepen prečišćavanja, kapacitet i ekonomičnost rada postrojenja. Odnos permeata i koncentrata kod vode u reverznoj osmozi kreće se oko 3:1. Da bi se povećalo iskorišćenje vode, koncentrat može biti polazna voda u drugom stepenu membranske filtracije. Na taj način se stepen iskorišćenja vode može povećati na preko 90%.

Konstrukcija membrana. Materijal od koga se izrađuju membrane je različit. Prve membrane su bile od acetatne celuloze. Zbog nedostataka ovog materijala, danas se koriste sintetički polimeri (polivinilhlorid, poliakrilonitril, polisulfoni i poliamidi). Treću grupu čine mineralne membrane, najčešće keramičke, koje se koriste u mikrofiltraciji. Ove membrane se grade od cirkonijumoksida, aluminijuma, ugljenika na keramici ili grafitu kao nosaču. One imaju najbolje karakteristike prečišćavanja, ali su i najskuplje.

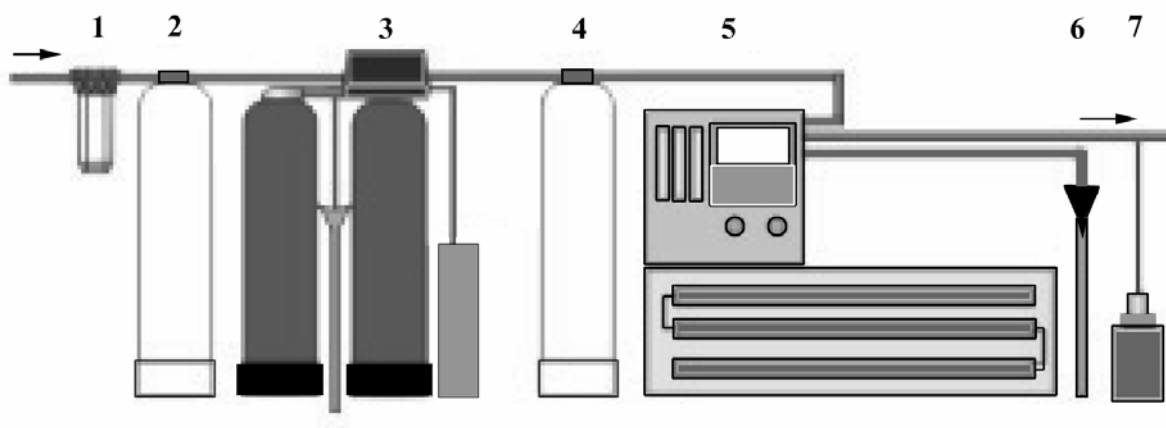
Membrane se smeštaju u *kućišta*, koja mogu biti u obliku ravnih ramova (slično ramskim filter-presama) ili u obliku tubusa. Membrane koje nemaju dovoljnu mehaničku otpornost postavljaju se na nosače, a između membrana postavljaju se odstoynici, koji omogućavaju nesmetan prolaz permeata i koncentrata kroz kućište. Konstruktivni elementi jednog cevnog membranskog kućišta prikazani su na slici 6.6.

Pojedinačne membrane imaju ograničen kapacitet. Radi postizanja većeg kapaciteta, više membrana se vezuje paralelno u membranske *module*.



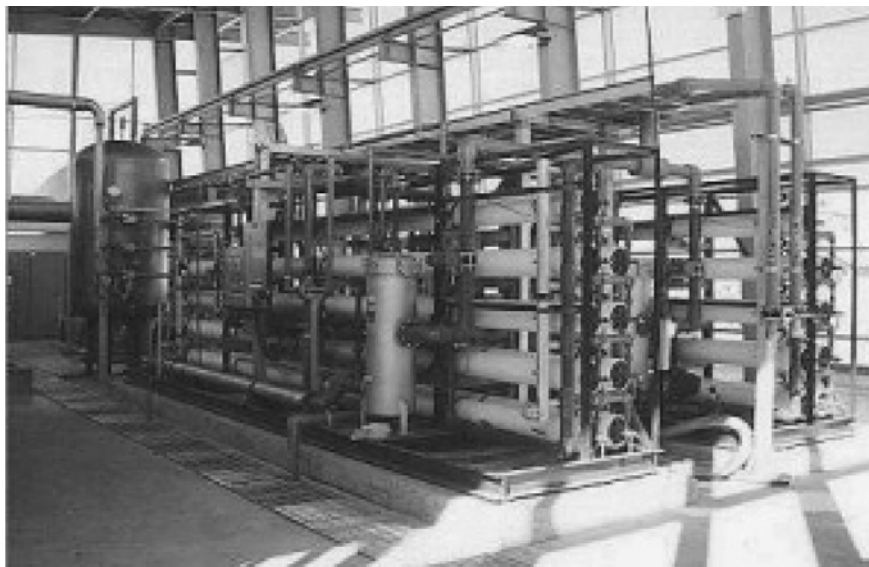
Slika 6.6 Šematski prikaz elemenata cevnog membranskog kućišta

Postrojenja za membransku separaciju. Principijelna šema uređaja za membransku separaciju vode data je na slici 6.7, a izgled postrojenja na slici 6.8. Postrojenje uključuje dve uzastopne faze: predtretman i membransku separaciju. Sirova voda se u prvoj fazi podvrgava *predtretmanu*, koji uključuje filtraciju, deferizaciju, omekšavanje jonskom izmenom i dehlorisavanje. U drugoj fazi, voda se podvrgava membranskoj separaciji u modulu za ultrafiltraciju, nanofiltraciju ili reverznu osmozu, što zavisi od potrebnog kvaliteta vode.



Slika 6.7 Principijelna šema postrojenja za membransku separaciju predtretmanom: 1–mehanički filter, 2–deferizacija, 3–omekšavanje, 4–dehlorisavanje, 5–membranski uređaj, 6–kanalizacija 7–doziranje potrebnih hemikalija (ako je potrebno za postizanje određenog kvaliteta vode, na primer: Ca i Mg soli kod vode za piće)

Efikasnost procesa reverzne osmoze. Kako je već navedeno, efikasnost procesa membranske separacije zavisi, pre svega, od karakteristika membrane i radnog pritiska. Membrane za reverznu osmozu imaju najveći efekat separacije rastvorenih supstanci. Na primer, procesom reverzne osmoze, sa kompletnim predtretmanom u prečišćavanju vode, prosečno se otklanja: 97% monovalentnih jona (na primer: Na^+ , K^+ , Cl^- , NH_3^-), 98% viševalentnih joni (na primer: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , SO_4^{2-}) i 99% nerastvorenih čestica ($5 \cdot 10^{-4}$ mm), pirogenih materija i organskih supstanci (molske mase > 200).



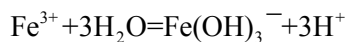
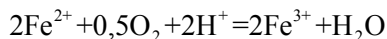
Slika 6.8 Izgled industrijskog postrojenja za reverznu osmozu

6.1.9. Postupci za uklanjanje nepoželjnih supstanci iz vode

a) Deferizacija i demanganizacija vode

Divalentni joni gvožđa i mangana u kontaktu sa vazduhom se oksidišu u feri-, odnosno mangani- oblik i formiraju nerastvorne hidrokside. Divalentne soli gvožđa i mangana mogu u metabolizmu oksidovati tzv. *ferozne i manganozne bakterije* iz roda *Leptotrix*, i *Crenotrix*, koje nastanjuju ovakve vode. Kao posledica, formiraju se sluzasti bazni hidroksidi ovih metala, koji se izdvajaju kao obojen talog u vodovodnoj instalaciji i procesnoj opremi, remeteći njihovu funkciju. Pored toga, ovakva voda ima neprijatan miris. Posebno je značajno što ovi metali, koji imaju više valentnih oblika, nepovoljno deluju na biohemijske procese, a proizvodima daju neželjena senzorna svojstva.

Deferizacija vode. Ako se gvožđe u vodi nalazi u jonizovanom divalentnom obliku, njegovo uklanjanje je jednostavno i lako. Izvodi se oksidacijom divalentnog gvožđa u trovalentno i taloženjem nastalog hidroksida prema jednačinama:

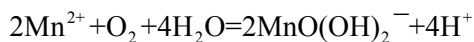


Za oksidaciju $1 \text{ mg/dm}^3 \text{ Fe}^{2+}$ potrebno je $0,143 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$. Aeracijom vode može se postići potrebna koncentracija kiseonika za oksidaciju gvožđa. Tako, na primer, ako je voda na 20°C samo 50% zasićena, koncentracija rastvorenog kiseonika iznosi $4,5 \text{ mg/dm}^3$, što je dovoljno za izdvajanje 30 mg/dm^3 gvožđa iz vode.

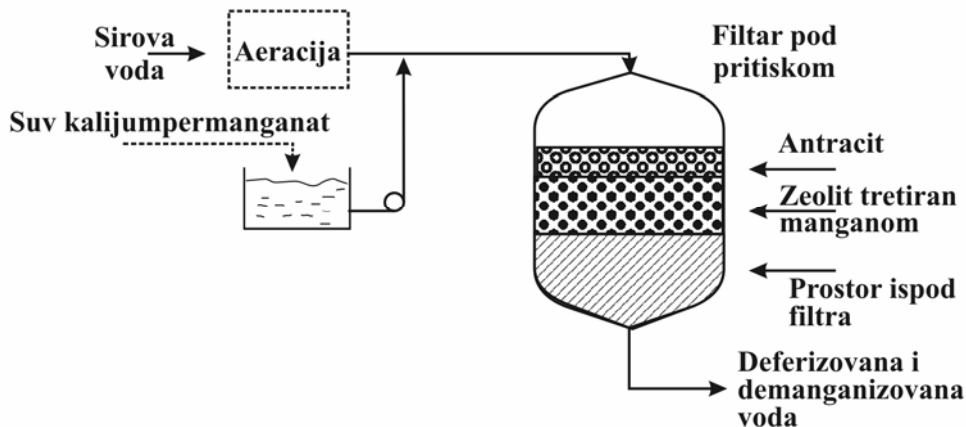
Za postizanje potrebne koncentracije kiseonika u vodi standardno se primenjuje aeracija vode pomoću kaskadne kule ili tornja za aeraciju. Za izdvajanje nastalog taloga koriste se filteri sa ispunama od peska ili zeolita. Savremeniji i jednostavniji način postizanja potrebne koncentracije kiseonika u vodi je uvođenje čistog kiseonika *injektiranjem* direktno u cevovod ili u sud za oksigenaciju.

Demanganizacija vode. Slično gvožđu, mangan se iz vode najčešće uklanja oksidacijom vazdušnim kiseonikom. Zbog toga se gvožđe i mangan izdvajaju zajedno jednostepenim postupkom. Postrojenje za deferizaciju i demanganizaciju šematski je pokazano na slici 6.9.

Oksidacija i hidroliza mangana vrši se po zbirnoj jednačini:



Prema datoj jednačini, za oksidaciju 1 mg/dm^3 mangana potrebno je $0,29 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$, tako da se pri 50%-nom zasićenju vode kiseonikom na 20°C može ukloniti 15 mg/dm^3 mangana. Ova reakcija teče sporo i nepotpuno, ako je pH vode ispod 9. Talog manganioksida je hidratisan, pa se teško izdvaja. Ovaj problem se rešava tako što se na zncima peščanog ili zeolitnog filtra prethodno formira prevlaka MnO_2 , koja deluje kao katalizator oksidacije mangana. Za aktivaciju zeolita ili peska u filtru koristi se kalijumpermanganat.



Slika 6.9 Šematski prokaz postrojenja za deferizaciju i demanganizaciju vode

b) Uklanjanje gasova iz vode – degazacija

U vodi, naročito podzemnoj, često su rastvoreni gasovi (CO_2 , O_2 i ređe H_2S), koji izazivaju koroziju, smetnje u tehnološkom procesu ili daju vodi nepovoljna organoleptička svojstva. Oni se moraju ukloniti postupkom degazacije, koja se može izvesti *fizičkim ili hemijskim postupcima*. U praksi se prednost daje fizičkim postupcima, jer oni omogućavaju istovremeno uklanjanje više vrsta gasova.

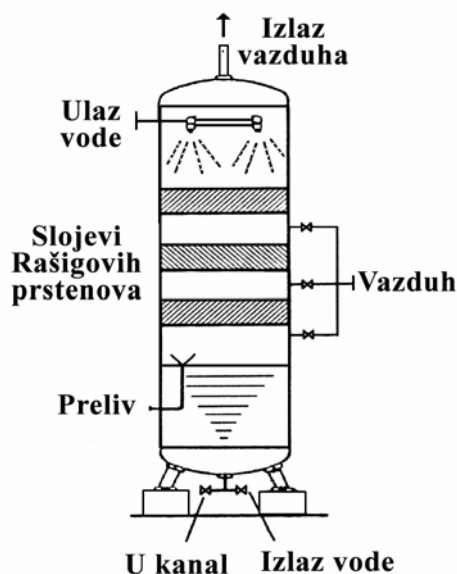
Uklanjanje ugljendioksida iz vode. U svim prirodnim vodama nalazi se manja ili veća količina slobodnog ili vezanog CO_2 . Slobodni CO_2 najvećim delom je rastvoren u obliku CO_2 , a manjim delom u obliku nedisosovane ugljene kiseline. Vezani CO_2 se nalazu u obliku karbonata ili bikarbonata. Ugljendioksida najviše ima u podzemnim vodama, obično $10\text{--}20 \text{ mg/dm}^3$, a ponekad i 80 mg/dm^3 . Veliki sadržaj slobodnog CO_2 imaju i vode nakon dekarbonizacije jonskom izmenom i krečom. U površinskim vodama njegov sadržaj je, u principu, mali, a povećava se tokom zimskog perioda.

Sa tehničkog aspekta, slobodan CO_2 u vodi ima značajnu ulogu, jer sprečava taloženje kamenca iz vode koja sadrži bikarbonate kalcijuma i magnezijuma. Količina slobodnog CO_2 u vodi, koja je potrebna za održavanje ovih bikarbonata u rastvorenom obliku, naziva se *pripadajući CO_2* . Veća količina slobodnog CO_2 u vodi izaziva pojavu korozije metala i betona i naziva se *agresivni CO_2* , koga iz vode treba ukloniti.

U praksi, slobodan CO_2 se uklanja iz vode aeracijom u degazatorima sledećih konstrukcija:

- tornjevi sa ispunom radi povećanja površine kontakta vode i vazduha,
- barbotажne kolone i
- vakuumski degazatori.

Najčešći u primeni su degazacioni tornjevi (slika 6.10). Kolona je cilindričnog oblika sa Rašigovim prstenovima od keramike ili plastičnih materijala. Voda se uvodi se preko raspodeljivača na vrhu kolone, dok se vazduh ubacuje ventilatorima u količini $20\text{--}50 \text{ m}^3$ po m^3 vode. Ugljendioksid iz vode prelazi u vazduh na principu razlike parcijalnih pritisaka (u vodi veći, u vazduhu manji). U vodi zaostaje dovoljna količina pripadajućeg CO_2 , a ona se istovremeno zasićuje kiseonikom.



Slika 6.10 Šematski prikaz kolone za degazaciju vode aeracijom

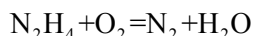
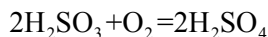
Uklanjanje rastvorenog vodoniksulfida. Vodoniksulfid, koji se javlja u pojedinim vodama, nepoželjan je u vodi za piće i tehnološke potrebe, jer joj daje neprijatan miris. On se iz vode uklanja oksidacijom, najčešće hlorom pri hlorisanju vode. Oksidacija hlorom teče preko sulfita i tiosulfata, kao međuproizvoda, do elementarnog sumpora i sumporne kiseline, tako da se u vodi dobija smeša proizvoda, čiji sastav je u funkciji pH vode.

Uklanjanje rastvorenog kiseonika. U hladnoj vodi za piće prisustvo kiseonika je neophodno radi osećaja svežine. Njegovo prisustvo u toploj vodi je štetno, jer izaziva koroziju, a posebno je štetan u vodi za napajanje kotlova. Prisustvo kiseonika u procesnoj vodi za biotehnologiju je, takođe, nepoželjno zbog mogućih oksidacionih reakcija, koje mogu ometati ili zaustaviti proizvodni proces.

Rastvoreni kiseonik se iz vode može ukloniti termičkim i hemijskim postupcima.

Termičko uklanjanje rastvorenog kiseonika zasniva se na smanjenju njegove rastvorljivosti u vodi sa porastom temperature. U vodenoj pari parcijalni pritisak kiseonika i drugih gasova iz vazduha je praktično jednak nuli, zbog čega se termički postupak naziva i *deaeracija vode*. Ovaj postupak se izvodi zagrevanjem vode u termičkim deaeratorima na atmosferskom pritisku ili u vakuumu. Koristi se za pripremu procesne vode koja ne sme sadržati kiseonik.

Hemijskim postupkom iz vode se uklanja samo kiseonik, pa se ovaj postupak naziva *deoksigenacija vode*. Deoksigenacija vode se obavlja supstancama koje se lako oksidišu kiseonikom, a najčešće se koristi natrijumsulfit ili hidrazin:



Reakcija sa natrijumsulfitom teče brzo na 80°C, ako je prisutan višak reagensa od 2 mg/dm³. Sulfit se dodaje u obliku 3–6%-nog rastvora. Pošto je jeftin, masovno se koristi u manjim toplovodnim sistemima i kotlarnicama. Nedostatak mu je što u vodi nastaju rastvorne soli, pa se ne koristi kod kotlova visokog pritiska.

Hidrazin ne formira ostatak soli u vodi, zbog čega je povoljniji, ali je i skuplji. Upotrebljava se u razblaženom obliku (1–2,5%), a dodaje se u povratni kondenzat koji se koristi za napajanje parnog kotla. Reakcija sa hidrazinom teče samo na temperaturama iznad 100 °C i pH od 8,7 do 9,9, uz višak reagensa od oko 20 µg/kg. U tim uslovima reakcija se završava za nekoliko sekundi. Pri radu sa hidrazinom treba voditi računa da je jako otrovan i pri koncentracijama iznad 40% eksplozivan. Zbog otrovnosti, njegova upotreba nije dozvoljena u pripremi vode u biotehnologiji.

c) Dezodorizacija vode

Voda može sadržati organske ili neorganske supstance, kao i mikroorganizme, usled čega dobija nesvojstven ukus, miris i boju. Najčešće su prisutni vodoniksulfid i fenoli, zatim mikrobni metaboliti, naročito od algi, koji vodi daju miris ustajalosti, pa i truljenja. I hlor, koji se koristi za dezinfekciju, ako je prisutan u količini iznad dozvoljene (do 0,5 mg/dm³), vodi daje neprijatan miris. Posebno neprijatan miris daju hlorovani fenoli nastali reakcijom hlora sa fenolima. Postupak uklanjanja ovih supstanci iz vode naziva se *dezodorizacija*.

Dezodorizacija vode može se izvesti apsorpcijom nepoželjnih jedinjenja na aktivnom uglju ili njihovom oksidacijom.

Adsorpcija na aktivnom uglju najčešće se primenjuje u praksi. Izvodi se:

- filtracijom vode kroz kolonu sa granulisanim aktivnim ugljem ili
- dodatkom sprašenog aktivnog uglja u vodu sa naknadnom filtracijom.

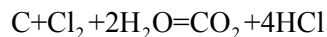
Dezodorizacija filtracijom vrši se u koloni ispunjenoj aktivnim ugljem brzinom 0,06–0,12 m³/m³h dezodorisane vode. Nakon zasićenja, aktivni ugalj se regeneriše provođenjem vodene pare kroz kolonu, obrnutim smerom od smera toka vode pri filtraciji. Regeneracija se može, takođe, izvršiti ispiranjem kolone razblaženim rastvorom natrijumhidroksida. Nedostatak postupka filtracije, naročito ako nije kontinualna, jeste u tome što se na granulama uglja mogu razviti mikroorganizmi koji kontaminiraju vodu. U ovakvom slučaju, pogodnije je dodavanje sprašenog aktivnog uglja u količini 0,5–15 mg/dm³ vode, zavisno od koncentracije supstanci koje treba ukloniti. Prah uglja se, nakon kontakta sa vodom od 15–20 min, uklanja filtracijom.

Dezodorizacija oksidacijom posebno je pogodna za uklanjanje organskih supstanci. Za oksidaciju se koristi hlor (10–25 mg/dm³), kalijumpermanganat (1–2 mg/dm³) ili ozon. Uspeh dezodorizacije oksidacijom zavisi od vrste i koncentracije organskih supstanci, kao i od vrste i količine oksidacionog agensa. Pri doziranju reagensa treba voditi računa da ne bude dodat u višku jer ostatak utiče na karakteristike vode, a povećan rezidual je i zdravstveno štetan.

d) Dehlorisanje vode

Voda za piće obavezno sadrži rezidualni hlor u količini 0,3–0,5 mg/dm³, radi sprečavanja njene sekundarne infekcije. Višak hlora nalazi se i u vodi koja je dezodorisana hlorisanjem. Procesna voda u biotehnologiji i prehrambenoj industriji ne sme sadržati višak hlora zbog nepoželjnih reagovanja sa procesnim supstancama. Zbog toga je iz takve vode potrebno ukloniti hlor postupkom koji se naziva *dehlorisanje vode*.

Dehlorisanje vode u praksi se obavlja filtracijom vode kroz kolonu sa granulisanim aktivnim ugljem. Visina sloja aktivnog uglja u koloni obično je 1,5–3 m, a brzina filtracije iznosi 15–20 m³/m³h. Ako je debljina sloja aktivnog uglja veća, brzina filtracije se može povećati. Voda se kroz kolonu provodi u smeru odozdo prema gore. U koloni hlor reaguje sa ugljenikom prema jednačini:



Aktivni ugalj se troši i mora se, nakon jedno- ili dvogodišnjeg rada, izbaciti i kolona napuniti novim.

Slobodan hlor se može ukloniti iz vode i redukcijom pomoću natrijumsulfata, ali se ovaj postupak, zbog formiranja soli, ređe koristi.

e) Dezinfekcija vode

Potrebno je praviti razliku između *dezinfekcije* i *sterilizacije* vode. Pod *dezinfekcijom vode* podrazumevaju se postupci uklanjanja ili uništavanja prisutnih mikroorganizama u vodi do stepena njene higijenske ispravnosti, a to znači da ona ne sme sadržati patogene mikroorganizme. Pravilnikom o higijenskoj ispravnosti vode za piće dozvoljeno je prisustvo samo do 10 ukupnih aerobnih

mezofilnih bakterija. Pod *sterilizacijom vode* podrazumeva se potpuno uništavanje ili uklanjanje svih mikrobioloških vrsta iz vode.

Dezinfekcija vode je nezaobilazan zahvat u pripremi vode za piće, bez obzira na njen polazni kvalitet. I voda I klase mora se dezinfikovati, radi povećane bezbednosti od prenošenja infektivnih bolesti i crevnih zaraza. Takođe, procesna voda za potrebe biotehnologije i prehrambene industrije, iz istih razloga, se mora dezinfikovati.

Dezinfekcija vode izvodi se primenom *oksidativnih* ili *neoksidativnih postupaka*. Od oksidativnih sredstava primenjuju se, pre svega, hlor u gasovitom obliku ili u obliku hipohlorita, hloraмина i hlordioksida, zatim ozon, vodonikperoksid ili oksazon (smeša ozona i vodonikperoksida). Neoksidativni postupci obuhvataju: UV zračenje, membranske separacije (ultrafiltracija i slojna filtracija), oligodinamički efekat srebra, magnetno i jonizujuće zračenje i termičku sterilizaciju.

Hlorisanje vode. Danas se u svetu najviše koristi dezinfekcija vode hlorisanjem, tj. uvođenjem gasovitog hlora u vodu, ili, bolja varijanta, doziranjem hipohlorita i hloraмина. Dezinficijensi, oksidativnim delovanjem na molekularnom i strukturnom nivou mikrobnih ćelija prisutnih u vodi, inaktivišu prisutne mikroorganizme, ali i hemijski reaguju sa prisutnim supstancama organskog i neorganskog karaktera. U vodu se dodaje toliko hlora, da koncentracija neproreagovanog hlora u vodi (*preostali, rezidualni hlor*) obezbedi očuvanje sterilnosti vode u toku distribucije u cevovodima ili transporta vode cisternama. Ta koncentracija, prema Pravilniku o kvalitetu vode za piće, treba da iznosi 0,3–0,5 mg/dm³. U vanrednim situacijama, kao što su zemljotresi, velike vremenske nepogode, poplave i ozbiljnije havarije na vodovodnoj mreži, koncentracija rezidualnog hlora u vodi na mestu potrošnje može se povećati do 0,8 mg/dm³.

Nažalost, hlorisanje vode ima i svoje negativne posledice. Hlorisanjem vode sa povećanim sadržajem organskih supstanci (na primer, huminske materije prisutne u površinskim vodama reka, vodoakumulacija i nekih arterskih bunara) nastaju veoma štetna i izrazito kancerogena organohlorna jedinjenja, na primer *trihalometani* (THM). Najbolji način da se izbegne prisustvo štetnih proizvoda hlorisanja vode je da se voda pre hlorisanja potpuno oslobodi organskog zagađenja (prekursora THM), što je praktično teško izvodljivo. Za uklanjanje tih supstanci iz vode koriste se: koagulacija i flokulacija, adsorpcija, jonska izmena i membranske separacije. Koji od ovih postupaka će se primeniti, zavisi od mnogih faktora: količine prekursora THM u vodi, zamućenosti vode, željenog kvaliteta vode kapaciteta postrojenja za pripremu vode itd., a najprihvatljiviji za dati slučaj se bira tehno-ekonomskom analizom.

Preporučljivo je da se voda pre hlorisanja tretira vodonikperoksidom, u cilju oksidativnog razaranja dela prisutnih organskih supstanci, čime se smanjuje količina halogenovanih organskih jedinjenja, koja nastaju hlorisanjem vode. Njegova primena znatno poskupljuje pripremu vode za piće.

Uklanjanje ili dovoljno smanjenje sporednih proizvoda hlorisanja vode može se postići adsorpcijom na aktivnom uglju.

Za hlorisanje velikih količina vode, kao najjeftiniji, koristi se gasoviti hlor. Zbog njegove otrovnosti, formiranja THM, problema sa transportom kroz naseljena mesta, uslova skladištenja itd., njegova primena se sve više ograničava sa perspektivom zabrane. Primena rastvora hipohlorita je najbolja zamena za korišćenje hlora.

Natijumhipohlorit ima niz prednosti nad gasovitim hlorom, pošto se može generisati na mestu potrošnje u rastvorenom obliku (10–15%), elektrolizom rastvora natrijumhlorida. Za dobijanje 1 kg ekvivalentnog hlora u obliku NaClO potrebno je 3 kg NaCl, 4 kW električne energije i dosta složena oprema, zbog čega je skuplji od gasovitog hlora. Njegova primena u pripremi vode u manjim postrojenjima (fabrički pogoni, manja naselja i sl.), koji podnose nešto skuplju vodu, čini ga prihvatljivim zbog niza prednosti, kao što su: veća bezbednost i sigurnost u radu, nema transporta i skladištenja, jer se proizvodi prema dinamici potrošnje.

Hlordioksid i **ozon** su najperspektivnija oksidativna sredstva za dezinfekciju vode, sa sve širim primenom u razvijenim zemljama, prvenstveno zbog zdravstvenih aspekata, jer ne formiraju THM, a efikasno uništavaju sve patogene mikrobiološke vrste. Hlordioksid i ozon se mogu generisati na mestu potrošnje, ali je za to potrebna složena i skupa oprema.

Neoksidativni postupci dezinfekcije vode, zbog skupe opreme, uglavnom se, za sada, primenjuju u pripremi vode za industrijske pogone i eventualno izolovane potrošače (bolnice, kampove i sl.). Najviše u primeni su: UV zračenje, membranski procesi i slojna filtracija.

UV zračenje je najpopularniji način neoksidativne sterilizacije vode za potrebe u biotehnologiji, prehrambenoj industriji i farmaciji. Osnovni razlog za to je što posle sterilizacije ne zaostaju hemijski agensi i sporedni proizvodi. Pored toga, postupak je jednostavan, brz i relativno jeftin. Glavni nedostatak postupka sterilizacije je što nema reziduala, koji bi sprečio naknadne infekcije vode. Ovaj problem se rešava tako što se UV lampa za ozračivanje vode postavlja neposredno ispred mesta njene potrošnje.

UV lampe za sterilizaciju vode generišu UV zrake talasne dužine 250 do 260 nm. Za dezinfekciju vode do kvaliteta za piće preporučuje se doza UV zračenja od najmanje 500 – 700 J/m³ vode, zavisno od stepena njene infekcije. Postoje tvrdnje da je za uništenje patogenih mikroorganizama u vodi dovoljna doza od 300 J/m³. Treba imati na umu da delovanje UV zraka značajno ometaju mutnoća vode i rastvorene organske supstance. Zbog toga je imperativni uslov za uspešnu dezinfekciju vode UV zračenjem, da se iz nje prethodno ukloni mutnoća i organske supstance.

Postupak dezinfekcije se izvodi tako što se voda propušta kroz anularni prostor koji opkoljava više lampi. Debljina sloja vode ne treba da je veća od 7–8 cm, a vreme ozračivanja treba da je najmanje 5 sekundi. Za veće kapacitete postavlja se paralelno više lampi. Pošto UV lampe tokom rada “stare” i smanjuju intenzitet zračenja, potrebno je obavljati kontrolu ozračivanja i blagovremenu zamenu lampi.

Membranska i slojna filtracija predstavljaju savremenije postupke sterilizacije vode, kojima se mikroorganizmi iz vode izdvajaju fizički, pa u vodi nema štetnog reziduala. Za membransku ultrafiltraciju koriste se membrane sa porama prečnika manjim od 0,1 µm. Slojna filtracija se izvodi filtrima, koji se sastoje od višeslojnih filtarskih elemenata ukupne debljine oko 30 mm. Filtarski slojevi su postavljeni tako da se dimenzije pora pojedinih slojeva smanjuju u pravcu filtracije. Za uspešnu membransku ili slojnu filtraciju potrebno je prethodno iz vode ukloniti suspendovane i koloidno rastvorene supstance. Duži vek rada filtara postiže se primenom filtracije sa unakrsnim, tangencijalnim tokom vode u odnosu na membranu, jer se izdvojeni materijal ne zadržava na membrani, odnosno slojnom filtru, već potiskuje duž membrane. Posle svakog ciklusa filtracije, potrebno je izvršiti pranje i sterilizaciju filtara. Glavni nedostatak ovog postupka sterilizacije su veći investicioni troškovi u odnosu na oksidativne postupke.

6.1.10. Priprema vode za prenos toplote

U najvećem broju tehnologija, pa i u biotehnologiji i prehrambenoj industriji, voda se, zbog dobrih termičkih karakteristika (velik toplotni kapacitet), koristi kao grejni i rashladni fluid.

Voda za zagrevanje. Kao prenosioci toplote koriste se topla voda, normalnog ili povišenog pritiska, ili vodena para. Topla voda se dobija zagrevanjem omekšane, ređe demineralizovane vode, a vodena para – od dekarbonizovane, omekšane vode u kotlovima niskog i srednjeg pritiska ili demineralizovane vode u kotlovima visokog pritiska. Za proizvodnju vodene pare, koja se koristi kao direktan grejni fluid ili za direktnu sterilizaciju sudova, ne sme se koristiti para dobijena od omekšane ili demineralizovane vode iz koje je kiseonik uklonjen hidrazinom, zbog njegove otrovnosti.

Voda za hlađenje. U velikom broju postupaka u biotehnologiji i prehrambenoj industriji prvo se vrši zagrevanje, radi sterilizacije ili termičke pripreme sirovina, a zatim hlađenje. Voda se koristi za hlađenje u obliku:

- leda,
- ledene vode u zatvorenom sistemu indirektnog hlađenja i
- vode ambijentalne temperature u otvorenom sistemu indirektnog hlađenja.

Led se, u principu, koristi za direktno hlađenje, i to češće u prehrambenoj industriji nego u biotehnologiji. Led se priprema u samom pogonu pomoću frigo uređaja. Ako led dolazi u direktan kontakt sa sirovinom ili proizvodom, priprema se od vode (u nekim slučajevima omekšana ili demineralizovana voda) koja je higijenski ispravna.

Ledena voda i voda sa ambijentalnom temperaturom se uglavnom koriste za indirektno hlađenje u razmenjivačima toplote (hlađenje u procesima, kondenzacija para), mada ima primera njenog direktnog korišćenja, na primer u proizvodnji piva. Kvalitet vode koja se koristi za hlađenje određen je oblikom korišćenja. Ako se hlađenje obavlja vodom u zatvorenom sistemu (kružnom toku), njen kvalitet mora biti takav da ne izaziva koroziju u sistemu. U slučaju da se hlađenje vrši unošenjem hladne vode u sirovine ili proizvod, voda mora biti higijenski ispravna, a mogući su i posebni zahtevi u pogledu njenog mineralnog sastava. Ako je temperatura hlađenja ispod 0 °C, u vodu se moraju dodati sredstva za sniženje tačke mržnjenja, na primer, kuhinjska so (ovakav rastvor se naziva „sola“), etanol, glikol, „antifriz“, koji je obično na bazi glikola i antikorozivnih sredstava. Pošto je, zbog kvarova na rashladnom sistemu, moguć prolaz rashladnog fluida u proizvod, u biotehnologiji i prehrambenoj industriji sredstvo koje se dodaje za sniženje tačke mržnjenja vode mora biti zdravstveno bezbedno, poput etanola ili kuhinjske soli.

Sistemi za hlađenje vode

Količina toplote koji treba odvesti iz proizvodnih procesa često je veoma velika, a to znači da je i utrošak energije za hlađenje velik. Zbog toga se pri izboru sistema za hlađenje, mora voditi računa o efikasnosti i ekonomičnosti sistema.

Količina vode potrebne za hlađenje može se izračunati iz toplotnog bilansa:

$$Q_v = \frac{Q}{c_p \rho (T_2 - T_1)}$$

gde je: Q_v – zapremina vode za hlađenje, Q – količina toplote koju treba odvesti, c_p – specifična toplota vode, ρ – gustina vode i T_1 i T_2 – ulazna i izlazna temperatura vode za hlađenje.

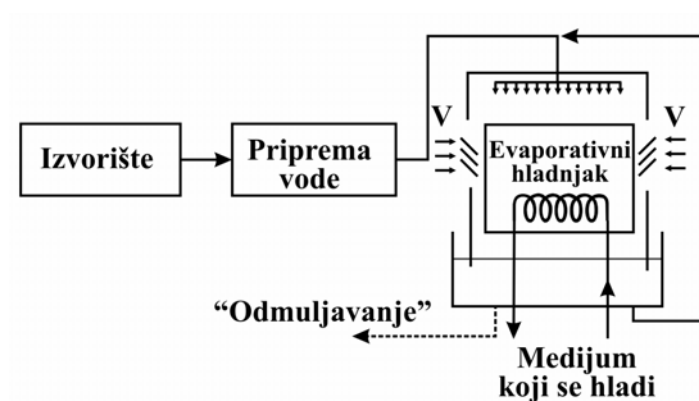
Nakon prolaska kroz sistem za hlađenje, topla voda u kojoj nema aditiva za snižavanje tačke mržnjenja može se iskoristiti u proizvodnom procesu, čime se racionalizuje potrošnja toplotne energije i vode. Topla voda koja se ne može iskoristiti u proizvodnom procesu ne sme se izbacivati u kanizacionu mrežu ili u prirodne recipijente iz dva razloga. Prvo, ona unosi termičko opterećenje u recipijent, a drugo, to predstavlja gubitak i toplote i vode. Ovakva voda treba da se recirkuliše kroz rashladni sistem.

Recirkulacioni sistemi za hlađenje mogu biti *zatvoreni ili otvoreni*.

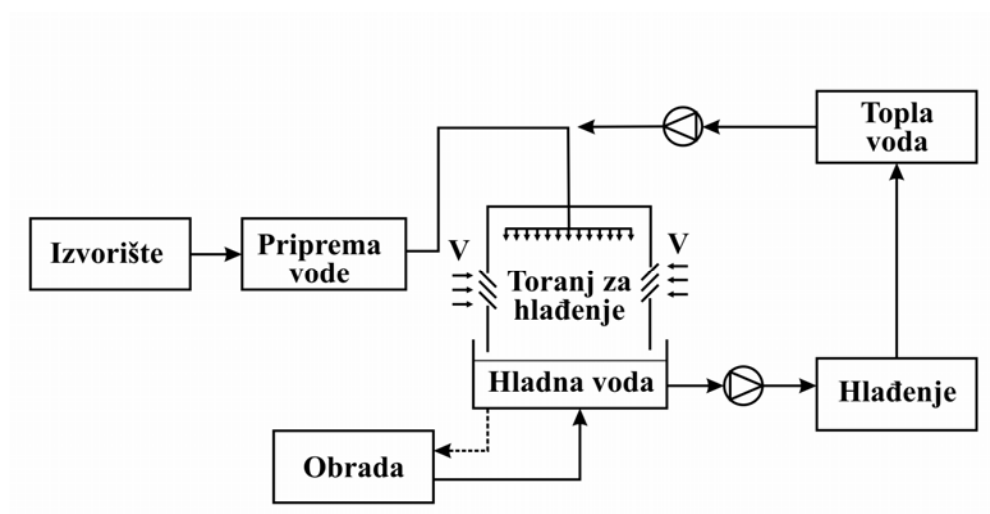
Zatvoreni recirkulacioni sistemi za hlađenje funkcionišu na principu kruženja rashladne vode u toku koga ona prolazi kroz fazu indirektnog hlađenja u frigo sistemu i faze preuzimanja toplote u pogonskom razmenjivaču toplote. Pošto voda u ovakvom sistemu ne dolazi u kontakt sa sirovinama i proizvodom, ona može sadržati aditive za sniženje tačke mržnjenja. Za ovakve sisteme hlađenja najpodesnija je demineralizovana voda koja ne izaziva koroziju i ne stvara kamenac. Radi sigurnosti u radu, vodi se dodaju sredstva protiv korozije i emulgatori za sprečavanje taloženja. **Recirkulacioni sistemi sa adijabatskim isparavanjem** omogućavaju hlađenje samo do tzv. "temperature vlažnih kugli", koja je samo nešto niža od ambijentalne temperature. Voda ili drugi medijum (freon, amonijak) za hlađenje, nakon preuzimanja toplote u pogonskom razmenjivaču toplote, hladi se *adijabatskim isparavanjem* rashladne vode. Za hlađenje rashladne vode adijabatskim isparavanjem koriste se sistemi sa evaporativnim hladnjakom i sistemi sa tornjem za hlađenje. Osnovni uslov pri tome je da vazduh koji se prođuvava ne bude zasićen vlagom, tj. da ima što manju relativnu vlagu.

Sistem sa evaporativnim hladnjakom se primenjuje kada treba hladiti samo jedan uređaj, na primer, amonijačni kompresori u rashladnim sistemima hladnjača. On sadrži dva integrisana kružna toka medijuma. Rashladni medijum se nalazi u unutrašnjem zatvorenom recirkulacionom krugu i hladi se prolaskom kroz hladnjak, koji je smešten na otvorenom prostoru. Ovaj hladnjak se orošava vodom iz spoljašnjeg otvorenog recirkulacionog kruga, koja prima toplotu iz rashladnog medijuma i hladi se adijabatskim isparavanjem u tornju za hlađenje. Ovaj sistem za hlađenje šematski je prikazan na slici 6.11. Topla voda dolazi u kontakt sa vazduhom, koji je na nižoj (ambijentalnoj) temperaturi, u tornju za hlađenje. Kako je napon pare vode u hladnijem vazduhu manji od napona pare u zagrejanoj vodi, zbog težnje da se izjednači napon pare u obe faze (tečnost–vazduh), dolazi do isparavanja tople vode i prelaza vodene pare u vazduh. Pošto je za isparavanje potrebna toplota isparavanja, ona se oduzima iz mase tople vode, usled čega se ona hladi.

Sistem sa tornjem za hlađenje primenjuje su kada je potrebno hlađenje sa većim brojem rasutih rashladnih uređaja u pogonu. Ovaj sistem uključuje dva kružna toka medijuma, slika 6.12. Pogonski rashladni medijum nalazi se u zatvorenom kružnom toku, kojim se vrši hlađenje u pojedinim tehnološkim fazama proizvodnje, a voda, kojom se rashladni medijum hladi, nalazi se u otvorenom kružnom toku. Voda za hlađenje preuzima toplotu od pogonskog rashladnog medijuma u razmenjivaču toplote, a sama se hladi adijabatskim hlađenjem u rashladnom tornju.



Slika 6.11 Šematski prikaz evaporativnog sistema za hlađenje



Slika 6.12 Šematski prikaz recirkulacionog sistema sa tornjem za hlađenje.

Pošto se u recirkulacionim sistemima voda za hlađenje hladi adijabatskim isparavanjem, ispareni deo vode se mora nadoknaditi. Voda za polazno punjenje sistema i nadoknadu isparenog dela mora imati određen kvalitet. U principu, ona ne sme da sadrži mehaničke nečistoće i treba da je u izvesnoj meri omekšana. Cilj je da se pripremljena voda troši što manje, a to je moguće ostvariti ako se dozvoli što veći stepen njenog „ugušćivanja“ (koncentrovanja rastvorenih supstanci), prouzrokovanog adijabatskim isparavanjem. Dozvoljen stepen ugušćivanja je ograničen kvalitetom vode u recirkulacionom krugu. Da bi se mogao primeniti veći stepen "ugušćivanja" vode, potrebno je sprečiti:

- koroziju, dodatkom inhibitora korozije,

- nastajanje taloga i naslaga peska, mulja, oksida metala itd., dodatkom disperganasa (polielektrolita),
- taloženje kamenca, omekšavanjem vode, i
- razvoj mikroorganizama, dodatkom sredstava za dezinfekciju.

Da bi se navedeni zahtevi ostvarili, potrebno je u recirkulacioni krug rashladne vode ugraditi bočni sistem prečišćavanja vode u recirkulacionom krugu, kako je to prikazano na slici 6.12. Ovaj sistem treba da sadrži peščani ili zeolitni filter i sistem za doziranje inhibitora korizije, polielektrolita i dezinficijensa (*algocida*, radi sprečavanja razvoja algi). Kada stepen „ugušćivanja“ vode poraste iznad dozvoljene granice, deo vode se izbacuje iz recirkulacionog sistema, a taj deo nadoknađuje dodatkom sveže vode.

6.2. INDUSTRIJSKE HRANLJIVE PODLOGE

Aktivnost mikroorganizama je u velikoj zavisnosti od uslova u njihovoj okolini. Okolnu sredinu čini, pre svega, hranljiva podloga u kojoj mikroorganizmi rastu i konvertuju njene komponente supstrat u intermedijarne i krajnje proizvode.

6.2.1. Vrste hranljivih podloga

Hranljiva podloga mora da sadrži supstrate u obliku koji mikroorganizmi najbolje usvajaju. Obično je to rastvor supstrata u vodi. U nekim slučajevima, koristi se čvrsta hranljiva podloga sa dovoljnom aktivnošću vode, a neki supstrati se mogu uzimati direktno iz gasne faze. Prema agregatnom stanju, hranljive podloge se dele na: *tečne*, koje se koriste u submerznim (dubinskim) bioprocima, i *čvrste*, koje se koriste u površinskim bioprocima. Prema poreklu, hranljive podloge se mogu podeliti na: veštačke, koje imaju tačno definisan sastav, i prirodne, koje imaju složen, nepotpuno definisan sastav.

U laboratorijskim uslovima se, po pravilu, upotrebljavaju veštačke hranljive podloge, sastavljene iz čistih jedinjenja. One su praktično nezamenljive kada se razmatra uticaj pojedinih supstanci na fiziologiju mikroorganizama koji rastu na njima. Pošto je njihov sastav definisan, moguće je sprovesti tačan maseni i energetski bilans za svaki supstrat. Veštačke hranljive podloge se pripremaju rastvaranjem definisanih hemijskih jedinjenja u destilovanoj vodi, da bi se u potpunosti eliminisali minerali i druga jedinjenja koji su prisutni u česmenjskoj vodi. Laboratorijske podloge se često komercijalno proizvode u čvrstom stanju, a pripremaju se jednostavno rastvaranjem čvrste smeše.

Veštačke hranljive podloge su najčešće nepogodne za upotrebu na industrijskom nivou, najčešće zbog visoke cene. U industrijskim biotehnološkim procesima uglavnom se koriste prirodne hranljive podloge, koje se pripremaju od prirodnih sirovina biljnog ili životinjskog porekla. Njihov tačan hemijski sastav, obično, nije u potpunosti poznat. Priprema prirodnih hranljivih podloga se sastoji u rastvaranju pogodnih prirodnih sirovina u vodi, posle čega se rastvor često podvrgava hidrolizi, bistenju i obogaćivanju sa drugim supstratima, kojih nema u prirodnoj sirovini.

Za pripremu složenih hranljivih podloga za industrijske bioprocese neophodno je poznavati:

- specifične nutritivne zahteve proizvodnih organizama,
- sastav prirodne sirovine i eventualne promene u sastavu u toku skladištenja ili tokom postupka pripreme hranljive podloge i
- ponašanje komponenata hranljive podloge u toku sterilizacije, fermentacije i izdvajanja proizvoda.

Pošto troškovi osnovne prirodne sirovine igraju važnu ulogu u svim industrijskim procesima, za pripremu hranljivih podloga moraju se upotrebiti jeftine prirodne sirovine, koje ispunjavaju i sledeće dodatne kriterijume:

- obezbeđuju maksimalan prinos biomase ili željenog proizvoda po jedinici mase supstrata,
- obezbeđuju maksimalnu koncentraciju biomase ili željenog proizvoda,
- obezbeđuju maksimalnu brzinu nastajanja proizvoda,
- obezbeđuju minimalan prinos neželjenog proizvoda,
- pristupačne su u dužem vremenskom periodu i ekonomski isplative,
- ne izazivaju probleme u odnosu na druge aspekte ukupnog biotehnološkog procesa (na primer: morfološki oblik organizma, mešanje i aeracija, nastajanje pene, izdvajanje i prečišćavanje proizvoda ili zaštita okoline).

Prilikom izbora prirodne sirovine treba razmatrati potrebu njene prethodne pripreme, potrošnju energije i vode i dodavanja drugih sirovina. Najpovoljniji slučaj je kada se hranljiva podloga priprema od sekundarnih (otpadnih) sirovina iz drugih tehnoloških procesa. U ovom slučaju, glavni kriterijum nije cena otpadne sirovine već njen kvalitet, koji određuje nivo i troškove pripreme, kao i raspoloživa količina.

6.2.2. *Supstrati za hranljive podloge*

Komponente hranljive podloge se klasifikuju prema njihovoj glavnoj funkciji u podlozi u više grupa, i to:

- | | |
|-----------------------------------|--|
| – izvori energije, | – prekursori i metabolički regulatori, |
| – izvori ugljenika, | – puferi, |
| – izvori azota, | – antipenušavci, i |
| – minerali, | – kiseonik. |
| – vitamini i drugi faktori rasta, | |

Pored navedenih supstrata, hranljivu podlogu uvek čini voda, koja je nezamenljivi rastvarač svih supstrata, učesnik u metabolizmu proizvodnih organizama i prenosilac mase i toplote u bioreaktorima.

a) Voda

Voda je glavna komponenta svih hranljivih podloga. U industrijskim bioprocima koristi se česmenska voda, koja mora biti higijenski ispravna. Prisustvo nekih jona u česmenkoj vodi je ne-

poželjno. Na primer, visoke koncentracije soli gvožđa i mangana uzrokuju promenu boje nekih mikroorganizama (na primer, kvasaca) i proizvoda, inhibiraju biosintezu nekih metabolita, a mogu izazvati i koroziju sudova. Nekontrolisane promene tvrdoće vode i koncentracije pojedinih katjona, pre svega kalcijuma i magnezijuma, mogu izazvati promenljivost u prinosu proizvoda. U ovakvim slučajevima, treba koristiti demineralizovanu vodu.

b) Supstrati izvori energije

Većina industrijskih mikroorganizama je hemoorganotrofna. Ubičajeni izvori energije su izvori ugljenika, na primer, ugljeni hidrati, lipidi i proteini. Neki mikroorganizmi mogu koristiti metan ili metanol kao izvore ugljenika i energije. Kod fotosintetskih mikroorganizama, kao izvor energije služi svetlost.

c) Izvori ugljenika

Izvori ugljenika predstavljaju kvantitativno glavnu komponentu hranljivih podloga. Oni služe ne samo za biosintezu ćelijskog materijala već i kao glavni izvor energije. Izbor izvora ugljenika prevashodno zavisi od metabolizma proizvodnog organizma, zahteva za određeni kvalitet proizvoda, kao i njegove cene. Kao izvori ugljenika obično se koriste ugljeni hidrati: monosaharidi (glukoza), disaharidi (saharoza i laktoza) i polisaharidi (skrob i celuloza). Takođe, veliku primenu imaju i sirovine složenog sastava, kao što su: melasa, sulfitna lužina, hidrolizat drveta i dr.

Glukoza se industrijski dobija hemijskom ili enzimskom hidrolizom skroba. Mogu je koristiti mnogi proizvodni organizmi. Glukoza se mora sterilisati odvojeno od ostalih komponenti hranljive podloge, jer ona u neutralnoj pH sredini i na visokoj temperaturi reaguje sa aminokiselinama (Maillard-ova reakcija), formirajući proizvode (*melanoidine*), koji podlozi daju tamno smeđu boju. Obično se sterilise u obliku koncentrovanog rastvora (30 do 50%) na pH 3.

Laktoza se dobija iz surutke koja zaostaje u postupku dobijanja sira i maslaca iz mleka. Samo neki mikroorganizmi mogu da koriste laktozu, na primer, *Penicillium chrysogenum* (dobijanje penicilina) ili *Bacillus subtilis* (dobijanje proteaza). Industrijski se, inače, koristi za dobijanje proteinske stočne hrane i etanola.

Saharoza se dobija iz šećerne trske ili šećerne repe. Verovatno je danas saharoza glavni supstrat za mnogobrojne biosinteze, na primer: antibiotika, vitamina, aminokiselina, organskih kiselina itd. Može se koristiti sa različitim stepenom čistoće: rafinisani šećer, sirovi šećer i melasa.

Melasa je jedna od najčešće upotrebljivanih sirovina u fermentacionoj industriji. Ona je sporedni proizvod u fabrikama šećera, koji zaostaje posle kristalizacije glavne frakcije šećera. Uspešno se koristi u proizvodnji pekarskog kvasca, etanola, mlečne kiseline itd.

Skrob se dobija iz kukuruza, drugih žitarica i krompira. U bioprocima se može koristiti sirov (na primer, dobijanje proteinaza pomoću nekih sojeva *Streptomyces*), klajsterizovan (dobijanje acetona i butanola pomoću *Clostridium acetobutylicum*), a najčešće delimično hidrolizovan (industrijsko dobijanje proteina pomoću *Candida utilis*, β -amilaze i α -amilaze pomoću *Bacillus subtilis*, pululana pomoću *Auerobasidium pullulans* i dr.).

Celuloza se industrijski dobija iz otpadaka drveta i slame. Poznati su komercijalni postupci mikrobiološke konverzije celuloze iz otpadnog biljnog materijala u raznovrsne proizvode (protein-ska stočna hrana, etanol). U biotehnologiji se koristi hidrolizat celuloze ili lignoceluloze.

d) Izvori azota

Većina proizvodnih mikroorganizama mogu koristiti neorganske ili organske izvore azota. Kao neorganski izvori azota služe amonijumove soli, vodeni rastvor amonijaka i nitrati. Amonijumove soli (obično, amonijumsulfat, ređe -fosfat) daju kiselu sredinu, pošto mikroorganizmi metabolizuju amonijumove jone, a oslobađa se slobodna kiselina. Nasuprot tome, rastvoreni amonijak i nitrati će prouzrokovati alkalisanje sredine. U slučaju amonijumnitrata prvo će reakcija biti kisela zbog trošenja amonijaka, pa će asimilacija nitrata biti suzbijena; kada se amonijak potroši, počinje korišćenje nitrata, zbog čega dolazi do alkalisanja sredine. U proizvodnji kvasca na hranljivoj podlozi sa melasom ili drugim prirodnim izvorima, kao i za proizvodnju etanola, acetona i butanola, gotovo isključivo se kao izvori azota koriste amonijumsulfat i rastvoreni amonijak.

Organski azot se obezbeđuje aminokiselinama, proteinima i ureom. U mnogim slučajevima je rast mikroorganizama brži ukoliko hranljiva podloga sadrži organski izvor azota. Uobičajeno je da se aminokiseline dodaju u obliku složenih prirodnih izvora, kao što su: kukuruzni ekstrakt, ekstrakt kvasca, hidrolizat kazeina, riblje brašno, sojino brašno itd.

e) Makroelementi

Najvažnije neorganske komponente su: azot, fosfor, sumpor i makroelementi (K, Mg, Ca, Zn, Fe i Cl). Fosfor, u obliku H_2PO_4^- , esencijalan je za rast ćelija i regulaciju nekoliko metaboličkih procesa. Fosfati se dodaju hranljivim podlogama da bi se zadovoljile potrebe za fosforom, a imaju i puferno delovanje. Sumpor je jednako važan kao fosfor. Obično se dodaje u obliku sulfata. U mnogim hranljivim podlogama makroelementi Mg, K, Ca i Cl su esencijalne komponente, a njihove koncentracije su u opsegu 0,1 do 1 mmol/dm³. Zbog njihove relativno visoke koncentracije, makroelementi se moraju dodati hranljivoj podlozi u obliku fosfata ili sulfata. Mikroelementi se dodaju u opsegu 0,1 do 100 µmol/dm³.

f) Mikroelementi

Mikroelementi (Co, B, Cd, Cr, Cu, Mo i Ni) se dodaju u veštačkim hranljivim podlogama, dok se u slučaju kompleksnih hranljivih podloga oni, po pravilu, ne dodaju posebno, pošto se nalaze u dovoljnoj količini u komponentama hranljive podloge. Oblik i opseg koncentracija u kojima se minerali dodaju hranljivim podlogama dati su u tabeli 6.5. Na bazi elementarnog sastava biomase i proizvoda metabolizma moguće je izračunati potrebne količine specifičnih minerala u hranljivoj podlozi.

Koncentracije pojedinačnih mineralnih komponenti ili njihovih kombinacija u hranljivim podlogama mogu imati kritičan uticaj na neke bioprocese. Tako, na primer, koncentracija neorganskog fosfata utiče na formiranje bacitracina, limunske kiseline (u površinskoj kulturi), ergot alkaloda i dr. Visoka koncentracija fosfata je povoljna za dobijanje pirolnitrina, biciklomicina i tiopeptina i dr. Mn, Fe i Zn su od velikog značaja za sekundarni metabolizam: prinos sekundarnih metabolita, po pravilu, linearno raste sa logaritmom koncentracije "ključnog" elementa sve do nivoa iznad koga jon metala postaje otrovan za ćelije proizvodnih organizama.

Tabela 6.5 Opseg koncentracija uobičajenih mineralnih komponenti u hranljivoj podlozi

<i>Mineralna so</i>	<i>Opseg koncentracija, %</i>
KH_2PO_4	1,0 – 4,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 – 3,0
KCl	0,5 – 12,0
CaCO_3	5,0 – 17,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 – 0,1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	0,1 – 1,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01 – 0,1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,003 – 0,01
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 – 0,1

g) Vitamini i drugi faktori rasta

Vitamini i ostali faktori rasta (aminokiseline, purini, pirimidini i njihovi derivati, masne kiseline) su obično prisutni u prirodnim izvorima ugljenika i azota. Kada se ove prirodne sirovine koriste kao jedini izvori faktora rasta, često je potrebno neke od njih, a posebno vitamine, dodati hranljivoj podlozi u potrebnoj količini. Treba imati na umu da je često ekonomičnije dodati čist vitamin nego povećavati količinu jeftinog izvora, čijim bi se dodavanjem u višku poremetio odnos između ostalih komponenti u podlozi.

h) Prekursori i regulatori metabolizma

Pojedine komponente hranljive podloge su bitnije za regulaciju metabolizma, tj. sintezu željenog proizvoda nego za rast. To su: prekursori, inhibitori i induktori. Svi oni imaju veliki uticaj na tok i produktivnost bioprocesa.

Prekursori su jedinjenja koja se, kada su prisutna u hranljivoj podlozi, direktno inkorporiraju u željeni proizvod. Dobar primer je povećanje prinosa penicilina u podlozi sa kukuruznim ekstraktom, koji sadrži feniletilamin koji se direktno ugrađuje u molekul penicilina, dajući benzil penicilin. Slično, dodavanje fenilsirćetne kiseline i njenih derivata povećava prinos penicilina i do tri puta, a biosinteza se usmerava prema dobijanju benzilpenicilina. Neki značajni primeri primene prekursora su dati u tabeli 6.6.

Tabela 6.6 Prekursori sa praktičnom primenom

<i>Prekursor</i>	<i>Proizvod</i>	<i>Mikroorganizam</i>
Fenilsirćetna kiselina	Penicilin G	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Fenoksisirćetna kiselina	Penicilin V	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Hloridi	Hlortetraciklin	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Cijanidi	Vitamin B ₁₂	<i>Propionobacterium</i> spp.
D-treonin	L-izoleucin	<i>Bacillus subtilis</i>
Glicin	L-serin	<i>Corynebacterium glycinophilum</i>

Inhibitori se koriste za regulaciju ćelijskog metabolizma. Zahvaljujući prisustvu specifičnog inhibitora, moguće je povećati prinos određenog proizvoda ili intermedijera metabolizma, koji bi proizvodni mikroorganizam u normalnim uslovima potrošio u svom metabolizmu. Inhibitori, zavisno od svoje specifičnosti, deluju tako da povećavaju prinos željenog ili smanjuju prinos neželjenog proizvoda. U nekim slučajevima, inhibitori deluju na strukturu ćelijskog zida u cilju povećanja njegove permeabilnosti za sekreciju metabolita. Primeri primene opštih i specifičnih inhibitora su dati u tabeli 6.7.

Tabela 6.7 Specifični i opšti inhibitori

<i>Proizvod</i>	<i>Inhibitor</i>	<i>Glavni efekat inhibitora</i>		<i>Mikroorganizam</i>
Glicerol	NaHSO ₃	Suzbijena	sinteza	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tetraciklin	Bromid	Suzbijena	sinteza	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Glutaminska kiselina	Penicilin	Permeabilnost		<i>Micrococcus glutamicus</i>
Limunska kiselina	Alkalni metal/ fosfat, pH<2	Suzbijena	sinteza	<i>Aspergillus niger</i>
Valin	Različiti inhibitori	Različiti	efekti	<i>Brevibacterium roseum</i>
Rifamicin B	Dietilbarbiturat	Inhibirani	ostali	<i>Nocardia mediterranei</i>
		rifamicini		

Većina enzima od industrijskog značaja su induktivni. Oni se sintetizuju samo u prisustvu specifičnih jedinjenja u hranljivoj podlozi, koja se nazivaju **induktori**. Obično je to supstrat na koji enzim deluje ili jedinjenje strukturno slično enzimu. Zbog toga se specifični induktori moraju uključiti u hranljive podloge za komercijalnu proizvodnju enzima. Neki primeri induktora industrijski važnih enzima dati su u tabeli 6.8.

Tabela 6.8 Induktori industrijski važnih enzima

<i>Enzim</i>	<i>Induktor</i>	<i>Mikroorganizam</i>
α-Amilaza	Skrob	<i>Aspergillus</i> spp.
	Maltoza	<i>Bacillus subtilis</i>
Pululanaza	Maltoza	<i>Aerobacter aerogenes</i>
α-Manosidaza	Manan i kvasac	<i>Streptomyces griseus</i>
Penicilinacilaza	Fenilsirćetna kiselina	<i>Escherichia coli</i>
Proteaze	Različiti proteini	<i>Bacillus</i> spp.
		<i>Streptococcus</i> spp.
Celulaza	Celuloza	<i>Trichoderma viride</i>
Pektinaza	Pektin	<i>Aspergillus</i> spp.
Dekstransaharaza	Saharoza	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

i) Puferni sistemi

U mnogim biotehnološkim procesima je kontrola pH hranljive podloge od velike važnosti za postizanje optimalne produktivnosti. Ovo se, u principu, može postići na dva načina:

- dodavanjem vodenog rastvora amonijaka ili NaOH (za neutralisanje kiselina) i H_2SO_4 (za neutralisanje baza) u toku biprocesa i
- dodavanjem u hranljivu podlogu supstanci koje imaju pufernu sposobnost.

Najznačajnije supstance koje mogu poslužiti kao puferi su fosfati, koji imaju i važnu ulogu u metabolizmu mikroorganizama. Mnoge hranljive podloge se puferuju na pH oko 7,0, dodavanjem kalcijumkarbonata: ako se pH smanjuje, karbonat se razlaže, održavajući pH. Bilansirana smeša izvora ugljenika i azota, takođe, daje osnovu za kontrolu pH, jer proteini, peptidi i aminokiseline iz prirodnog izvora imaju dobru pufernu sposobnost.

j) Antipenušavci

Penušanje hranljive podloge često prati biotehnološke procese, naročito ako one sadrže prirodne sirovine bogate proteinima. Ovo može izazvati velike probleme, kao što su:

- izdvajanje ćelija iz hranljive podloge što može dovesti do lize ćelija i oslobađanja mikrob-nih proteina koji će povećati stabilnost pene i
- izlivanje pene iz bioreaktora, što dovodi do infekcije, pa se, radi sprečavanja, mora smanjiti zapremine hranljive podloge, a time i produktivnost bioreaktora

Ukoliko je penušanje intenzivno i izaziva probleme u radu, hranljivoj podlozi se moraju na početku, a obično i u toku fermentacije, dodati antipenušavci. Najčešće se upotrebljavaju viši alkoholi (oktadekanol), estri, više masne kiseline, silikoni, sulfonati itd. Zbog njihove slabe rastvorljivosti, antipenušavci se dodaju zajedno sa njihovim nosačem (tečni parafin, ricinusovo ulje). Negativan efekat prekomernog dodavanja antipenušavaca je smanjivanje brzine prenosa kiseonika (čak i do 50%) formiranjem dodatog filma oko mehurova vazduha. Zbog toga se dodavanje antipenušavaca mora strogo kontrolisati.

k) Kiseonik

Kiseonik je vrlo važna komponenta hranljive podloge koja često u slučaju aerobnih i fakultativno anaerobnih mikroorganizama kontroliše brzinu rasta i sintezu proizvoda metabolizma. Koncentracija rastvorenog kiseonika koja se mora održavati u bioreaktorima zavisi od:

- inteziteta metabolizma proizvodnog organizma,
- osetljivosti bioprocesa na oscilacije, a posebno na padove koncentracije kiseonika u hranljivoj podlozi,
- reoloških osobina hranljive podloge i
- prisustva antipenušavca.

U slučaju kada hranljiva podloga sadrži supstrate koji se brzo metabolizuju, potreban je brz prenos mase kiseonika. Ako se to ne može ostvariti, dolazi do limitiranja bioprocesa kiseonikom. Ovaj problem se može prevazići smanjivanjem početne koncentracije ključnog supstrata (dodatne količine supstrata se dodaju u toku bioprocesa), promenom sastava hranljive podloge, kao i promenom tipa bioreaktora i uslova mešanja i aeracije.

6.2.3. Definisanje sastava hranljive podloge

U početku razvoja biotehnoloških postupaka sastav hranljive podloge je najčešće rezultat praktičnog iskustva. Upoznavanje fiziologije i metabolizma proizvodnih organizama omogućava optimizaciju sastava hranljive podloge. Optimizovane podloge, koje su proizvod naučnih dostignuća i iskustva, često se čuvaju kao poslovna tajna.

Osnovni pristup u definisanju sastava (formulisanju) hranljive podloge se zasniva na sledeća tri zahteva:

- hranljiva podloga mora zadovoljiti sve potrebe proizvodnog organizma za rast (produkciju biomase) ili produkciju metabolita,
- hranljiva podloga mora obezbediti potrebne izvore energije za biosintezu i održavanje života proizvodnog organizma i
- cena hranljive podloge treba da je što niža.

U definisanju sastava hranljivih podloga prvo se analizira stehiometrijska jednačina rasta biomase i nastajanja proizvoda. Ova jednačina omogućava da se izračunaju minimalne količine supstrata, potrebne za dobijanje određene količine biomase. Znajući koeficijente prinosa proizvoda po jedinici biomase, moguće je izračunati količine supstrata neophodne da bi se dobila željena količina proizvoda.

U ovakvom pristupu, potrebno je poznavati elementarni sastav proizvodnog mikroorganizma, koji treba da uključi ne samo biogene, već i makro- i mikroelemente. Ako ova informacija nedostaje, onda se, kao orijentacioni, mogu koristiti podaci iz tabele 6.9, u kojoj je dat sastav tipičnih hranljivih podloga za dobijanje nekoliko značajnijih proizvoda. Ovi podaci mogu da posluže samo kao vodič za minimalne količine sastojaka hranljivih podloga. U praktičnim uslovima taj sastav se mora optimizovati. Naravno, moguće je konsultovati i biotehnološke priručnike, u kojima ima dosta podataka o hranljivim podlogama.

Pošto neki mikroorganizmi ne mogu sintetizovati specifične nutrijente, na primer: aminokiseline, vitamine ili nukleotide, oni se moraju dodati hranljivoj podlozi u adekvatnoj količini u obliku čistog jedinjenja ili u okviru smeše složenog sastava.

Tabela 6.9 Tipične industrijske hranljive podloge

<i>Proizvod</i>	<i>Proizvodni organizam</i>	<i>Supstrat</i>	<i>Koncentracija, g/dm³</i>	<i>Trajanje</i>
Benzil-penicilin	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Laktoza	35	4–5 d
		Glukoza	10	
		Kukuruzni ekstrakt	35	
		KH ₂ PO ₄	4,0	
		CaCO ₃	10	
		Sojino ulje	2,5	

Tabela 6.9 Tipične industrijske hranljive podloge (nastavak)

Proizvod	Proizvodni organizam	Supstrat	Koncentracija, g/dm ³	Trajanje
Limunska Kiselina	<i>Aspergillus niger</i>	Saharoza	140	3–5 d
		NH ₄ NO ₃	2,5	
		KH ₂ PO ₄	2,5	
		MgSO ₄	0,25	
		Cu	0,06 mg/dm ³	
		Zn	0,25 mg/dm ³	
		Fe	1,3 mg/dm ³	
		Mn	1,0 mg/dm ³	
Glutaminska kiselina	<i>Micrococcus glutamicus</i>	Glukoza	100	oko 40 h
		Urea	8,0	
		KH ₂ PO ₄	0,1	
		MgSO ₄	0,04	
		Sojino brašno	0,5	
		Biotin	0,5 µg/dm ³	
		Fe i Mn	0,2 mg/dm ³	
Pekarski Kvasac	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Melasa	56	oko 12 h
		NaH ₂ PO ₄	2,3	
		(NH ₄) ₂ SO ₄	2,7	
		MgSO ₄	0,7	
		NH ₃	0,5	
Bacitracin	<i>Bacillus licheniformis</i>	Skrob	10	oko 2 d
		Kikiriki brašno	45	
		Kvasac	3,0	
		Ca-acetat	0,5	
		KH ₂ PO ₄	1,0	
		MgSO ₄	0,2	

Od posebnog značaja je pravilno određivanje potrebne količine izvora ugljenika i kiseonika (za aerobne procese). Izvor ugljenika ima dvostruku ulogu: u biosintezi i generisanju energije. Potreba za ugljenikom pod aerobnim uslovima može se izračunati iz koeficijenta prinosa biomase u odnosu na izvor ugljenika $Y_{X/C}$. U slučaju kada se izvor ugljenika troši i u sintezi proizvoda, mora se odrediti koji njegov deo ide na stvaranje biomase, održavanje i sintezu proizvoda.

Treba imati na umu da su osnovni stehiometrijski odnosi komponenti hranljive podloge samo smernica u radu na formulisanju podloga za primenu u komercijalnom procesu. Po pravilu, neki supstrati se dodaju u većoj količini od izračunate. Na primer, izvori ugljenika i azota ulaze u sastav hranljive podloge u većoj koncentraciji od izračunate na bazi stehiometrije, iz više razloga i to:

- proizvodni organizmi najčešće supstrat ne koriste kvantitativno,
- supstrati su često termolabilna jedinjenja koja se u toku sterilizacije toplotom delimično razgrađuju, i

– u toku sterilizacije toplotom može doći do međusobnog reagovanja komponenti podloge.

Zbog toga se u praktičnim uslovima sastav podloge optimizuje, praćenjem uticaja sastava hranljive podloge, količine i koncentracije pojedinačnih supstrata na prinos proizvoda. U postupku optimizacije najčešće se primenjuju metodi statističkog planiranja u kojima je najznačajniji parametar prinos proizvoda. U ovoj fazi se značajna pažnja poklanja ekonomskim kriterijumima, tj. ceni potrebne hranljive podloge za sintezu 1 kg proizvoda, a vodi se računa i o uslovima čuvanja rezervi, nabavke, transporta itd. Ekonomski uslovi mogu zahtevati da se sastav hranljivih podloga promeni i da se koriste jeftinije i pristupačnije sirovine. Zbog toga je korisno posedovati recepture za više alternativnih sastava hranljivih podloga za određenu biotehnošku proizvodnju. To znači da je utvrđivanje optimalnog sastava hranljive podloge predmet stalnog ispitivanja u svakoj biotehnoškoj proizvodnji.

6.2.4. Priprema industrijskih hranljivih podloga

Hranljive podloge se pripremaju direktno u bioreaktoru ili u posebnom postrojenju.

Prvi način se primenjuje kod šaržnih postrojenja malog kapaciteta sa bioreaktorom relativno male zapremine (ispod 10 m^3), kada je ekonomski neopravdano posebno postrojenje za pripremu hranljive podloge. Kod ovakve pripreme hranljive podloge, odmerene količine sastojaka se unose u bioreaktor u koji se, uz mešanje, dodaje određena količina vode, radi rastvaranja supstrata. Pripremljena podloga se sterilise u bioreaktoru. Dobra strana pripreme hranljive podloge je što se, uz sterilizaciju hranljive podloge, istovremeno sterilise i bioreaktor. Loša strana ovog postupka je što se vreme korišćenja bioreaktora za bioprocen skraćuje za vreme pripreme podloge.

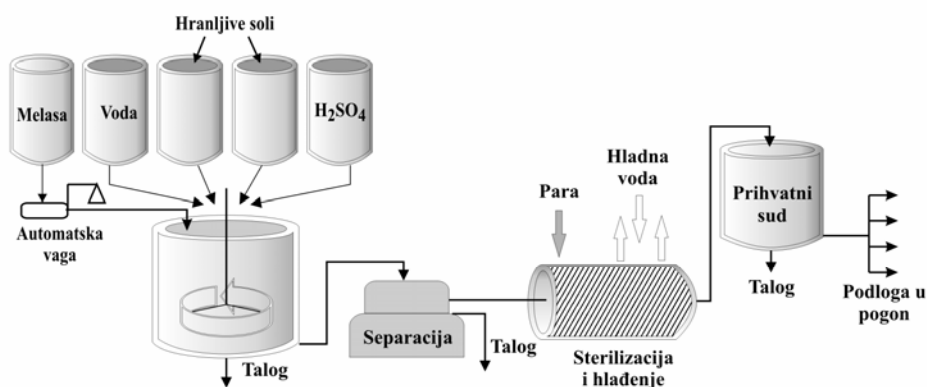
Priprema hranljive podloge u posebnom postrojenju primenjuje se kod postrojenja velikog kapaciteta, koja uključuju bioreaktor velike zapremine ($> 10 \text{ m}^3$) ili više bioreaktora. Posebnim postrojenjem povećava se stepen iskorišćenja bioreaktora, što je kod velikih kapaciteta posebno značajno. Priprema hranljivih podloga za kontinualne bioprocene uvek se obavlja u posebnom postrojenju.

Postrojenje za pripremu hranljive podloge se, po pravilu postavlja između skladišta sirovina i postrojenja za sterilizaciju, a u njegov sastav ulaze (slika 6.13):

- automatska vaga za merenje mase čvrstih sastojaka i uređaj za merenje zapremine tečnih sastojaka,
- sudovi sa mešalicom i omotačem (kod manjih sudova) ili zmijastim razmenjivačem toplota, i
- pumpe za transport pripremljene podloge u postrojenje za sterilizaciju.

Ukoliko se za pripremu hranljive podloge mora da koristi voda posebnog kvaliteta (omekšana ili demineralizovana), postrojenje uključuje i odgovarajuće postrojenje za njenu pripremu.

Hranljiva podloga se priprema u koncentraciji koja odgovara koncentraciji potrebnoj za bioprocen ili u većoj koncentraciji. U tom slučaju ona se razblažuje do potrebne koncentracije vodom zahtevanog kvaliteta.



Slika 6.13 Šematski prikaz potrojenja za pripremu hranljive podloge od melase

6.3. STERILIZACIJA U BIOTEHNOLOGIJI

Mikrobiološki procesi se, po pravilu, izvode pomoću čiste kulture na hranljivoj podlozi, uz obezbeđenje odgovarajućih fizičko-hemijskih parametara okoline. Ukoliko u hranljivoj podlozi, koja se priprema od prirodnih sirovina, zaostanu sve biološke vrste koje se u njoj nalaze, tokom procesa će doći do njihovog rasta i razvoja, što se višestruko negativno odražava na željeni proces:

- u fermentacionoj tečnosti (podlozi) se odvija paralelno rast više mikroorganizama, što uzrokuje pad proizvodnosti,
- pri kontinualnim procesima može doći do potpunog eliminisanja proizvodnog organizma,
- kontaminanti se mogu naći u finalnom proizvodu, što dovodi do smanjenja njegovog kvaliteta,
- kontaminanti otežavaju izdvajanje finalnog proizvoda pri separaciji proizvoda,
- kontaminanti mogu da razgrade finalni proizvod, na primer antibiotike i
- kontaminacije bakterijskih populacija dovode do autolize ćelija.

Kontaminacija se sprečava:

- upotrebom čistih kultura (inokuluma) proizvodnih organizama,
- sterilizacijom hranljive podloge,
- sterilizacijom procesne opreme i bioreaktora,
- sterilizacijom svih komponenata koje se naknadno dodaju u bioreaktor i
- održavanjem sterilnih uslova tokom trajanja mikrobiološkog procesa.

Postoje primeri da se kontaminacija može sprečiti održavanjem vrednosti pH na nivou nepovoljnom za rast kontaminanata. Na primer, pri proizvodnji piva se koristi hmelj, koji ima mikrobično delovanje.

Sterilizacija podrazumeva eliminisanje, izdvajanjem ili ubijanjem, svih mikrobnih ćelija i inaktivaciju virusa prisutnih u hranljivoj podlozi, materijama koje se dodaju u toku bioprocesa, vazduhu ili na samom bioreaktoru ili drugim procesnim uređajima i opremi. Svaki od ovih materijala zahteva specifičan postupak sterilizacije.

6.3.1. Postupci, mehanizam i kinetika sterilizacije

Za sterilizaciju se koriste sledeći postupci:

- razaranje strukture ćelija,
- inaktivacija mikroorganizma i
- uklanjanje mikroorganizama fizičkim metodima.

Razaranje strukture ćelija (destrukcija), pomoću jakih oksidacionih sredstava (azotna, sumporna, hromsumporna kiselina ili toplotom) se koristi redovno u laboratorijskim uslovima, dok se u industriji za pranje procesne opreme i bioreaktora koriste razblaženi rastvori kiselina.

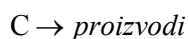
Inaktivacijom mikroorganizama sprečava se mogućnost njihovog daljeg razmnožavanja. Spoljašnje karakteristike ćelija mogu da ostanu u izvornom obliku. Inaktivacija se izvodi pomoću: toplote (suvom – pregrejanim vazduhom ili vlažnom – vodenom parom), UV ili X zraka, ultrazvukom ili pomoću hemijskih jedinjenja (formaldehid, alkohol, hlor, etilenoksid itd.). Pre konačne sterilizacije, procesna oprema se pere deterdžentima i dezinficijensima.

Uklanjanje mikroorganizama fizičkim metodima, tj. sterilizacija pomoću filtracije, se koristi za gasove i rastvore termolabilnih supstanci (vitamini). Razlikuju se dva osnovna načina:

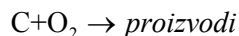
- apsolutna filtracija, koja se izvodi pomoću kompaktnih filtara, sa definisanim veličinama pora, i
- delimična filtracija, koja se izvodi pomoću filtara, čija sposobnost filtracije zavisi od veličine njegovih pora.

Mehanizam odumiranja populacije mikroorganizama pod dejstvom toplote ili nekim drugim delovanjem je reakcija *prvog reda* i može se opisati na sledeće načine:

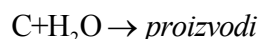
- **pod dejstvom toplote** ključno jednjenje C , konstituent mikrobne ćelije, razlaže se na proizvode, prema reakciji prvog reda:



- **pod uticajem toplotne energije u suvoj sterilizaciji** (pregrejanim vazduhom), ključno jednjenje inaktivira se reagovanjem sa O_2 , koji je u višku, prema reakciji pseudo–prvog reda:



- **pod uticajem toplotne energije u vlažnoj sterilizaciji** (pregrejanom vodenom parom) ključno jednjenje razlaže se hidrolizom u kojoj je voda u višku, pa je i ovo reakciji pseudo–prvog reda:



Pošto se radi o reakciji prvog reda, brzina reagovanja ključnog jedinjenja C je:

$$-\frac{dC}{dt} = kC \quad (6.1)$$

gde je: k – konstanta brzine inaktivacije mikroorganizama, a C – koncentracija ključnog jedinjenja C .

Pošto je koncentracija ključnog jedinjenja C u ćeliji uglavnom konstantna, njegova koncentracija se može izraziti preko broja vitalnih (živih) ćelija N

$$C \propto N_0 - N' = N \quad (6.2)$$

gde je: N_0 – početni broj mikroorganizama, a N i N' – broj preživelih i uništenih ćelija nakon vremena t , razunato po jedinici zapremine.

Kombinovanjem jednačina (6.1) i (6.2), brzina odumiranja ili inaktivacije mikroorganizama definiše se na sledeći način:

$$-\frac{dN}{dt} = kN \quad (6.3)$$

pri čemu je k – konstanta brzine destrukcije (odumiranja ili inaktivacije) mikroorganizma, koja, po svom fizičkom značenju, predstavlja specifičnu brzinu destrukcije mikroorganizma.

Ako se uvedu početni i krajnji uslovi: za $t = 0$, $N(0) = N_0$ i za $t = t$, $N(t) = N_t$, onda se integrisanjem jednačine (6.3) dobija:

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -kt \quad (6.4)$$

ili eksponencijalnom obliku

$$N_t = N_0 \cdot e^{-kt} \quad (6.5)$$

Specifična brzina destrukcije zavisi od vrste mikroorganizma, fiziološkog oblika ćelije i temperature. Za određeni mikroorganizam, specifična brzina destrukcije se menja sa temperaturom po Arrhenius-ovom zakonu:

$$k = A_d \cdot e^{-\frac{Ea_d}{RT}} \quad (6.6)$$

gde je: A_d – konstanta karakteristična za mikroorganizam, Ea_d – energija aktivacije procesa destrukcije, koja je karakteristična za mikroorganizam, R – gasna konstanta i T – apsolutna temperatura.

Linearizovani oblik jednačine (6.6) je:

$$\ln k = \ln A_d - \frac{E_d}{R} \frac{1}{T} \quad (6.7)$$

U praksi se često koristi *decimalno vreme odumiranja*, koje predstavlja vreme zadržavanja mikrobne populacije na temperaturi sterilizacije za koje se broj živih ćelija ili spora u populaciji smanji na 1/10 od početnog broja, odnosno to je vreme za koje se inaktivira 90% od početnog broja mikroorganizama. Zamenom $N_t = N_0/10$ i $t = t_D$ u jednačini (6.4) dobija se:

$$t_D = \frac{\ln 10}{k} = \frac{2,303}{k} \quad (6.8)$$

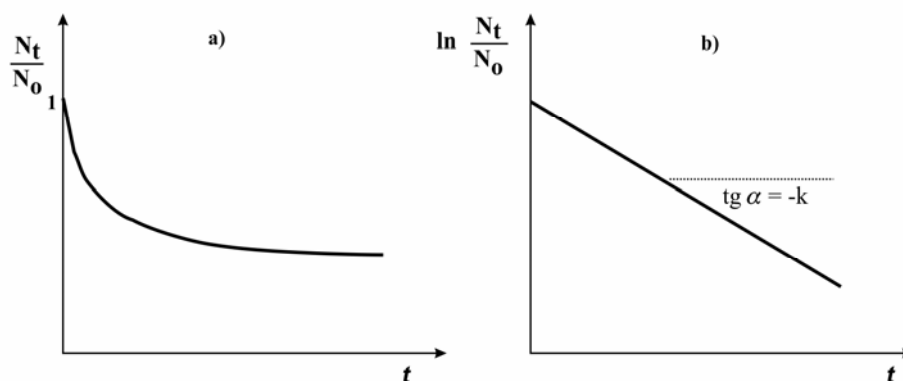
gde je: t_D – decimalno vreme odumiranja. U tabeli 6.10 su date vrednosti za k i t_D za neke spore bakterija. Jasno, što je vrednost specifične brzine destrukcije manja, to je mikroorganizam otporniji i sterilizaciju je teže izvesti.

Tabela 6.10 Vrednosti k i t_D nekih vrsta mikroorganizama na 121 °C

Mikroorganizam	$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$t_D \text{ (min)}$
<i>Bacillus subtilis</i> FS 5230	2,6–3,3	0,6–0,9
<i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679	1,3	1,8
<i>B. stearothermophilus</i> FS 1518	0,77	3

6.3.2. Sterilizacija hranljivih podloga toplotom

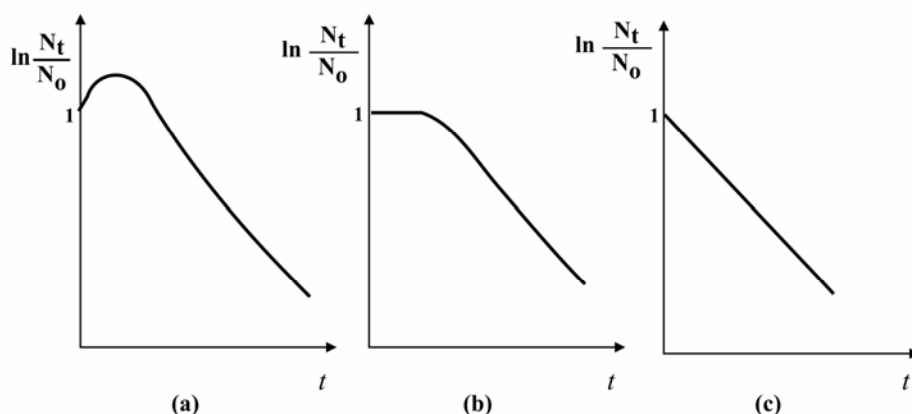
Za sterilizaciju hranljivih podloga toplotom važe jednačine (6.4) i (6.5). Slika 6.14 predstavlja prikaz promene N_t/N_0 i $\ln(N_t/N_0)$ sa vremenom. Sa dijagrama se može videti i da se vrednosti N_t/N_0 i $\ln(N_t/N_0)$ smanjuju eksponencijalno sa vremenom, tj. da se broj aktivnih ćelija mikroorganizama smanjuje eksponencijalno sa vremenom. Zavisnost $\ln(N_t/N_0)$ od t je prava linija sa nagibom $-k$ (slika 6.14b).



Slika 6.14 Grafički prikaz jednačina (4.6) i (4.8) u normalnom i logaritamskom obliku

Drugi bitan zaključak je da se broj živih ćelija u hranljivoj podlozi zapremine V_L svede na nulu, sterilizacija mora da traje beskonačno ($N_t V_L \rightarrow 0$, kada $t \rightarrow \infty$), što znači da je za potpunu sterilizaciju potrebno beskonačno vreme. Drugim rečima, inaktivacija svih ćelija mikroorganizma u realnim uslovima se ne postiže. Takođe, može se zaključiti da nakon određenog vremena, broj preživelih ćelija u hranljivoj podlozi može biti manje od 1 ($N_t V_L < 1$), što fizički nije moguće. Zbog toga ovo treba shvatiti kao verovatnoću da jedna ćelija ostane aktivna nakon obavljene sterilizacije. Tako, na primer, ako je $N_t V_L = 10^{-3}$, onda to znači da verovatnoća p da je jedna ćelija ostala aktivna iznosi 1/1.000, odnosno da postoji verovatnoća da najviše jedna od 1.000 obavljenih diskontinualnih sterilizacija bude kontaminirana zbog neodgovarajućih uslova sterilizacije.

Sporogeni mikroorganizmi odstupaju od kinetičkog modela definisanog jednačinama (6.4) i (6.5), a tipična odstupanja su prikazana na slici 6.16. Prikazani dijagrami pokazuju da postoji odstupanje od linearne zavisnosti na nižim temperaturama, kada spore počinju klijanje pod uticajem toplote i vlage. U slučaju (a) veći je broj novoformiranih ćelija iz spora nego što se inaktivira, u slučaju (b), broj novoformiranih je jednak broju inaktiviranih, a u slučaju (c) veća je brzina inaktivacije od brzine formiranja novih ćelija iz spora.



Slika 6.15 Grafički prikaz odstupanja od linearne zavisnosti inaktivacije mikroorganizama (objašnjenje u tekstu)

Kombinacijom jednačina (6.4) i (6.6) dobija se:

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -A_d t \cdot e^{-\frac{E_{a_d}}{RT}} \quad (6.9)$$

Član na levoj strani jednačine je **kriterijum sterilizacije** ili **del-faktor** ∇ (čitaj nabla), tj.:

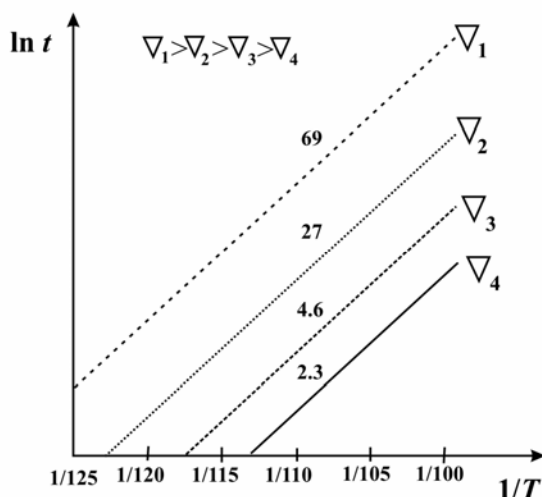
$$\nabla = \ln \frac{N_0}{N_t} \quad (6.10)$$

koji predstavlja meru inaktivacije (destrukcije) mikroorganizama u određenom vremenu. Jasno,

$$\nabla = A_d \cdot t \cdot e^{\frac{Ea_d}{RT}} \quad (6.11)$$

Nakon logaritmovanja jednačine (6.11) i preuređenja, dobija se:

$$\ln t = -\frac{Ea_d}{R} \frac{1}{T} + \ln \frac{\nabla}{A_d} \quad (6.12)$$



Slika 6.16 Uticaj trajanja i temperature sterilizacije na kriterijum sterilizacije

Ova jednačina je *parametarska prava linija* u koordinatnom sistemu $\ln t + 1/T$, čiji je parametar kriterijum sterilizacije ∇ . Nagib prave linije zavisi od energije aktivacije Ea_d . Za različite vrednosti kriterijuma sterilizacije dobija se familija paralelnih pravih, kao što je pokazano na slici 6.16. Sa slike se vidi da se ista vrednost kriterijuma sterilizacije može ostvariti za široki interval vremena sterilizacije i temperatura. Isti kvalitet sterilizacije se može postići za kraće vreme na višoj temperaturi ili, obrnuto, za duže vreme na nižoj temperaturi.

Pri projektovanju uređaja za sterilizaciju potrebno je znati termičke karakteristike prisutnih mikroorganizama.

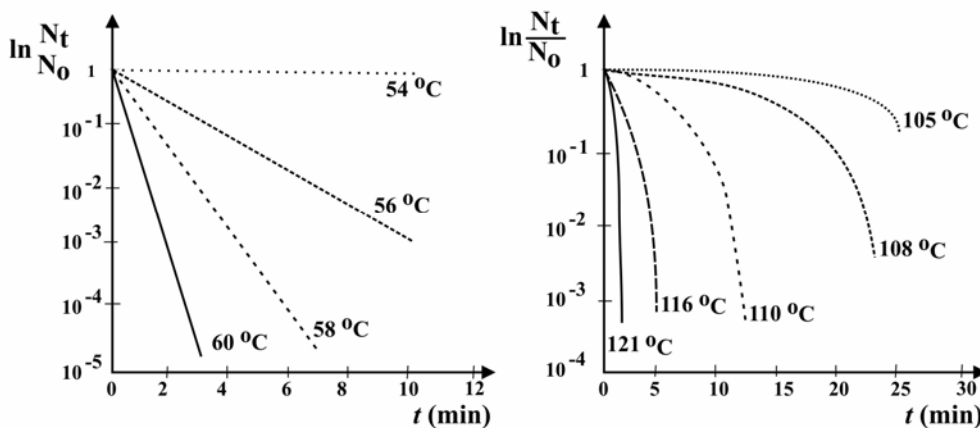
Kako je, tokom sterilizacije, najvažnije inaktivisati mikroorganizme koji obrazuju termorezistentne spore, najčešće se uzimaju karakteristike spora *Bacillus stearothermophilus*, čije su karakteristike: $A_d = 1,59 \cdot 10^{36} \text{ s}^{-1}$ i $Ea_d = 284 \text{ kJ/mol}$. Vrednosti energije aktivacije za većinu mikroorganizama su u opsegu 250 do 290 kJ/mol, mada ima i izuzetaka, kao, na primer, *Clostridium botulinum* sa vrednošću 343 kJ/mol. Poznato je da su spore mnogo otpornije na uticaj toplote od vegetativnih oblika ćelija. Odavde sledi zaključak da je konstanta k veća za vegetativne ćelije nego za spore, što pokazuju podaci u tabeli 6.11.

Tabela 6.11. Konstante brzina inaktivacija za sterilizaciju toplotom:

Organizam	T (°C)	$k \cdot 10^{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$Ea_d \text{ (kJ/mol)}$
<i>Bacillus subtilis</i>	110	450	309
Spore	104	0.57	284
<i>B. Stearothermophilus</i>			
Spore	104	7	343
<i>Clostridium botulinum</i>			

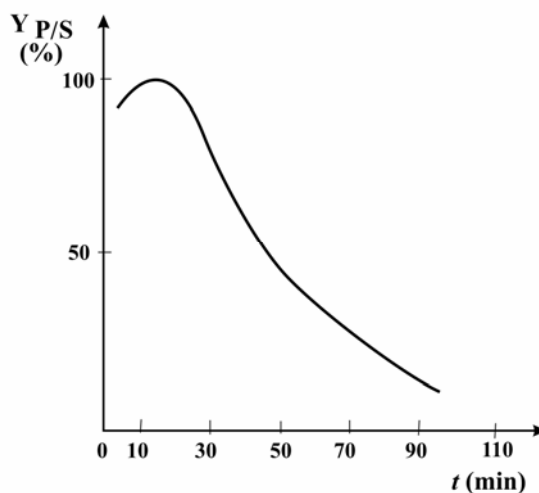
Pri izboru temperature sterilizacije veoma je važno znati da li mikroorganizam sporuliše ili ne. Kao primer, poslužiće uporedni podaci o ponašanju bakterija *Escherichia coli*, koja ne sporuliše, i *Bacillus stearothermophilus*, koja sporuliše (slika 6.17).

Pod dejstvom povišene temperature, tokom sterilizacije hranljive podloge, odigravaju se hemijske reakcije između pojedinih komponenti, koje menjaju njen sastav. Tipičan efekat ovih reakcija na prinos proizvoda je prikazan na slici 6.18: sa dužim trajanjem sterilizacije toplotom prinos proizvoda raste, dostiže maksimalnu vrednost, a zatim se smanjuje. Porast prinosa proizvoda je izazvan dostupnošću nekih komponenti hranljive podloge tek posle njenog zagrevanja, a smanjenje prinosa proizvoda je rezultat razgradnje termolabilnih jedinjenja koja utiču na sintezu proizvoda.



Slika 6.17 Zavisnost brzine inaktivacije a) *E. coli* i b) *B. Stearothermophilus*

Slika 6.18 Uticaj trajanja sterilizacije toplotom na prinos proizvoda



Postoje dva tipa reakcija koje utiču na smanjenje kvaliteta hranljive podloge zbog sterilizacije:

- interakcija između pojedinih komponenti u podlozi, najčešće reakcije šećera i aminokiselina, što izaziva smanjenje količine izvora ugljenika, i
- razgradnja termolabilnih komponenti podloge, naročito vitamina.

Termička razgradnja esencijalne komponente iz podloge, koja utiče na prinos proizvoda, je obično reakcija prvog reda:

$$-\frac{dS}{dt} = k_s S \quad (6.13)$$

odnosno u integrisanom obliku:

$$\frac{S_t}{S_0} = e^{-k_s t} \quad (6.14)$$

gde je: S_0 i S_t – koncentracije esencijalne komponente na početku sterilizacije i posle vremena t , a k_s – konstanta brzine razgradnje.

Konstanta brzine razgradnje termolabilne komponente se menja sa temperaturom po Arrhenius-ovom zakonu:

$$k_s = A_s \cdot e^{-\frac{Ea_s}{RT}} \quad (6.15)$$

odnosno u linearizovanom obliku:

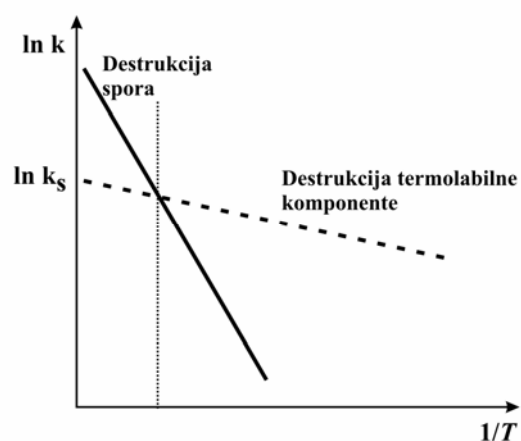
$$\ln k_s = \ln A_s - \frac{Ea_s}{R} \frac{1}{T} \quad (6.16)$$

Iz nagiba prave linije u koordinatnom sistemu $\ln k_s + 1/T$ može se odrediti energija aktivacije Ea_s za razgradnju ključne termolabilne komponente u hranljivoj podlozi. Energija aktivacije razgradnje ključnih komponenti je 42 do 125 kJ/mol, što je znatno manje od vrednosti energija aktivacije za termičku inaktivaciju ćelija mikroorganizama (250 do 290 kJ/mol).

Izbor temperature je od esencijalne važnosti za uspešnost sterilizacije. Funkcionalne zavisnosti $\ln k$ i $\ln k_s$ od $1/T$ su prikazane na slici 6.19. Na višim temperaturama k brže raste od k_s , jer je $Ea_d > Ea_s$. To znači da će malo povećanje temperature imati veći uticaj na inaktivaciju mikroorganizama nego na razgradnju ključne termolabilne komponente u hranljivoj podlozi. Prema tome, izborom pogodne temperature i vremena sterilizacije moguće je svesti razgradnju ključnih komponenti hranljive podloge na najmanju meru. Pri izvođenju sterilizacije hranljivih podloga toplotom, obično se biraju uslovi za sterilizaciju na osnovu principa *visoka temperatura – kratko vreme HTST*.¹ Ceo postupak sterilizacije se izvodi tako što se hranljiva podloga brzo zagreva do željene visoke temperature, kratko drži na toj temperaturi, a potom brzo hladi.

¹ Engl. *High Temperature Short Time*

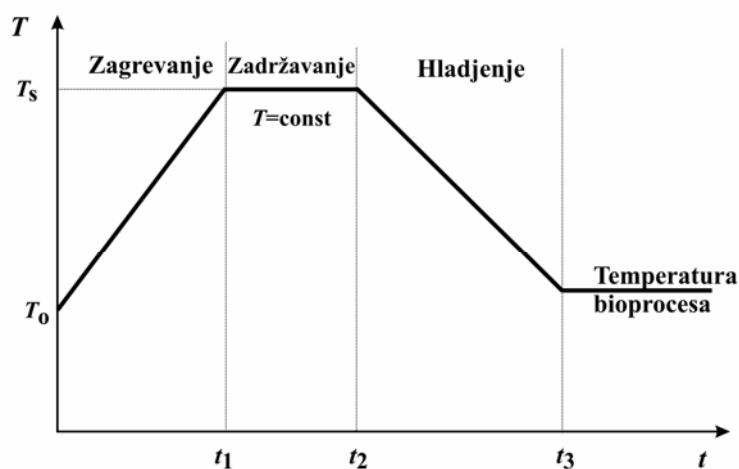
Slika 6.19 Uticaj temperature na inaktivaciju spora i destrukciju termolabilne komponente u hranljivoj podlozi



6.3.3. Diskontinualna (šaržna) sterilizacija toplotom

Diskontinualna ili šaržna sterilizacija hranljive podloge se odvija u tri faze (slika 6.20):

- zagrevanje do početne temperature sterilizacije T_s ,
- zadržavanje na temperaturi sterilizacije određeno vreme i
- hlađenje do temperature bioprocesa T_f .



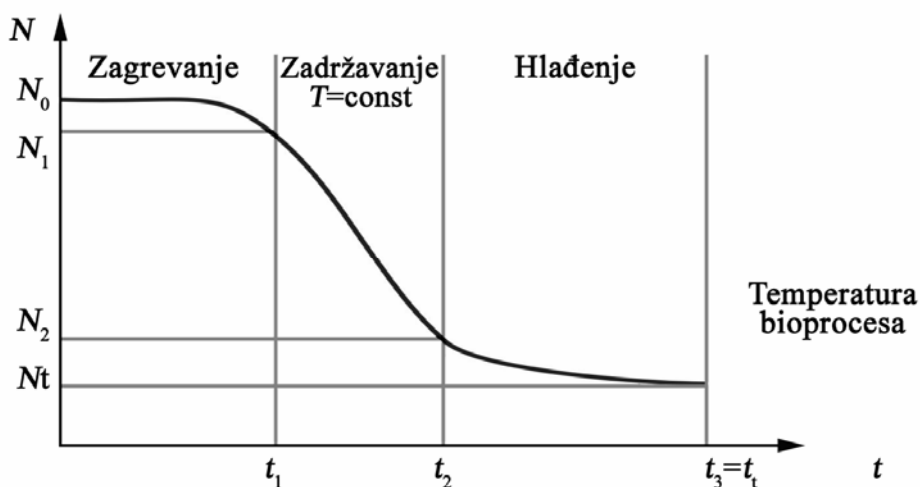
Slika 6.20 Promene temperature tokom trajanja šaržne saterilizacije

Promena broja živih mikroorganizama za vreme sterilizacije grafički je prikazana na slici 6.21.

Diskontinualna sterilizacija u pogonima manjeg kapaciteta se najčešće izvodi u samom bioreaktoru u kome se, zatim, odigrava bioproces. Ređe se izgrađuju posebna postrojenja. Tokom diskontinualne sterilizacije toplotom mikroorganizmi se inaktiviraju u sve tri faze, tj. zagrevanjem, zadržavanjem na temperaturi sterilizacije i hlađenjem podloge. Zagrevanje i hlađenje podloge su nestacionarni procesi, dok je u fazi zadržavanja podloge proces izoterman. Trajanja zagrevanja i hlađenja zavise od tipa uređaja za sterilizaciju i radnih uslova. Stoga se proračun sterilizacije svodi na određivanje vremena zadržavanja na temperaturi sterilizacije.

Osnovni parametar koji se zadaje pre proračuna diskontinualne sterilizacije je ukupni kriterijum sterilizacije, koji se određuje iz jednačine:

$$\nabla = \ln \frac{N_0}{N_t} = A_d \int_0^t e^{-\frac{E_{ad}}{RT}} dt \quad (6.17)$$



Slika 6.21 Promena broja preživelih mikroorganizama u podozi za vreme sterilizacije

Ukupan početni broj živih ćelija ili spora mikroorganizama u hranljivoj podlozi u kojoj je brojna koncentracija živih ćelija ili spora N_0 zavisi od njene zapremine V_L i iznosi $N_0 V_L$. Ako se usvoji da je verovatnoća postizanja sterilnosti $(1 - p)$, odnosno rizik kontaminacije p , pri čemu je $N_t V_L = p$, modifikovanjem jednačine (6.17) dobija se:

$$\nabla = \ln \frac{N_0 V_L}{p} \quad (6.18)$$

što znači da kriterijum sterilizacije zavisi od radne zapremine bioreaktora V_L . Ukoliko je zapremina hranljive podloge veća, utoliko će strožiji uslovi sterilizacije biti potrebni da bi se postigla sterilnost sa istim rizikom kontaminacije.

Ukoliko se poznaje broj mikroorganizama na početku i kraju svakog perioda šaržne sterilizacije, mogu se definisati kriterijumi sterilizacije za periode zagrevanja, zadržavanja i hlađenja:

$$\nabla_z = \ln \frac{N_0}{N_1} = A_d \int_0^{t_1} e^{\frac{Ea_d}{RT}} dt \quad (6.19)$$

$$\nabla_s = \ln \frac{N_1}{N_2} = A_d \int_{t_1}^{t_2} e^{\frac{Ea_d}{RT}} dt \quad (6.20)$$

$$\nabla_h = \ln \frac{N_2}{N_t} = A_d \int_{t_2}^{t_f} e^{\frac{Ea_d}{RT}} dt \quad (6.21)$$

Jednačina (6.17) se može transformisati u

$$\nabla = \ln \frac{N_0}{N_t} = A_d \int_0^{t_1} e^{\frac{Ea_d}{RT}} dt + A_d \int_{t_1}^{t_2} e^{\frac{Ea_d}{RT}} dt + A_d \int_{t_2}^{t_f} e^{\frac{Ea_d}{RT}} dt \quad (6.22)$$

odakle sledi da je ukupni kriterijum sterilizacije rezultat doprinosa zagrevanja, držanja na maksimalnoj temperaturi i hlađenja hranljive podloge destrukciji ćelija ili spora, tj.:

$$\nabla = \nabla_z + \nabla_s + \nabla_h \quad (6.23)$$

Ako se uzme u obzir da je $T = T_s = \text{const.}$ i $(t_2 - t_1) = t_s$, jednačina (6.20) koja definiše kriterijum sterilizacije u periodu zadržavanja na maksimalnoj temperaturi se pojednostavljuje:

$$\nabla_s = \ln \frac{N_1}{N_2} = A_d \cdot e^{\frac{Ea_d}{RT}} \cdot t_s = k(T_s) \cdot t_s \quad (6.24)$$

Linearizovani oblik jednačine (6.24) je

$$\ln t_s = -\frac{Ea_d}{R} \frac{1}{T} + \ln \frac{\nabla_s}{A_d} \quad (6.25)$$

Vreme zadržavanja hranljive podloge na na maksimalnoj temperaturi sterilizacije je:

$$t_s = \frac{\nabla_s}{k(T_s)} \quad (6.26)$$

odnosno

$$t_s = \frac{\nabla - \nabla_z - \nabla_h}{k(T_s)} \quad (6.27)$$

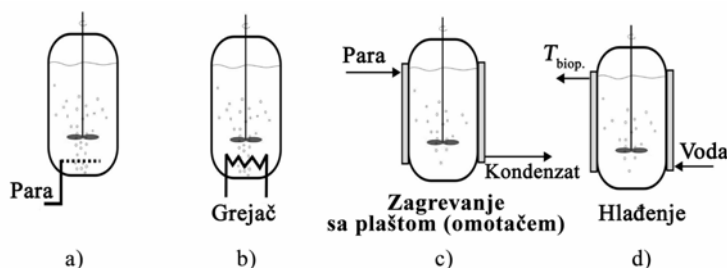
Za proračun vremena trajanja diskontinualne sterilizacije potrebni su sledeći podaci:

– početna brojna koncentracija spora mikroorganizama (N_0),

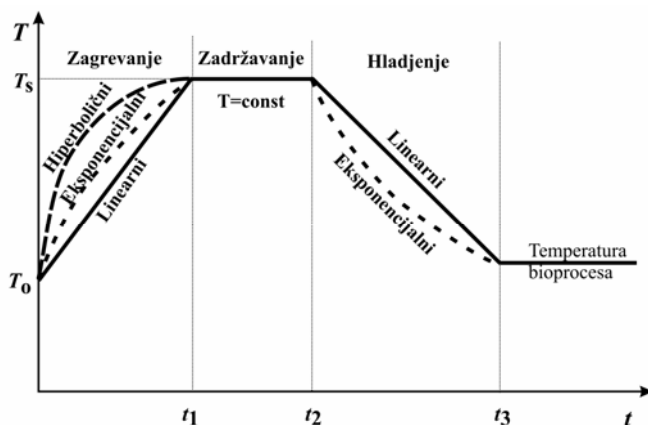
- rizik kontaminacije ($p = N_t V_L$),
- zapremina hranljive podloge (V_L),
- termičke karakteristike mikroorganizma (k) i
- promene temperature tokom zagrevanja i hlađenja sa vremenom.

Zbog teškoća u određivanju broja spora, obično se usvaja da je $N_0 = 10^6$ spora/cm³. Takođe, najčešće se prihvata da jedna od hiljadu šarži bude kontaminirana, tj. $p = 10^{-3}$. Za termičke karakteristike se obično uzimaju karakteristike termostabilnih spora *Bacillus stearothermophilus*: $A_d = 1,59 \cdot 10^{36} \text{ s}^{-1}$ i $Ea_d = 284 \text{ kJ/mol}$.

Promene temperature sa vremenom u fazama zagrevanja i hlađenja zavise od tipa sterilizatora, temperature grejnog medijuma (vodena para), temperature rashladnog medijuma i njihovih masenih protoka. Na slici 6.22 su predstavljena četiri osnovna tipa diskontinualnih sterilizatora. Zavisnosti temperature od vremena za različite načine zagrevanja i hlađenja hranljive podloge je prikazan na slici 6.23, dok su jednačine temperaturnih profila date u tabeli 6.12.



Slika 6.22 Četiri tipa diskontinualnih sterilizatora sa različitim načinom zagrevanja: a) direktno uvođenje vodene pare, b) zagrevanje pomoću električnog grejača, c) zagrevanje vodenom parom ($T = \text{const.}$) i d) hlađenje



Slika 6.23 Zavisnosti temperature od vremena za različite načine zagrevanja hranjive podloge

Tabela 6.12 Jednačine temperaturnih profila za različite načine zagrevanja hranljive podloge

<i>Izvor toplote</i>	<i>Temperaturni profil</i>	<i>Parametri u jednačini</i>
Barbotiranje vodene pare	Hiperbolni $T = T_0 \left(1 + \frac{\alpha t}{1 + \gamma t} \right)$ T_0 – početna temperatura podloge	$\alpha = \frac{(h_{vp} - h_p) Q_{vp}}{m T_0 c_p}; \gamma = \frac{Q_{vp}}{m}$ m – masa podloge; h – entalpija; Q – protok vodene pare; indeks p se odnosi na podlogu, a vp na paru
Električno zagrevanje	Linearni $T = T_0 (1 + \alpha t)$	$\alpha = \frac{q}{m T_0 c_p}$ q – brzina izmene toplote
Razmenjivač toplote (zagrevanje vodenom parom)	Eksponencijalni $T = T_z \left[1 + \beta \cdot e^{-\alpha t} \right]$ T_z – temperatura medijuma za zagrevanje	$\alpha = \frac{KA}{m C_p}; \beta = \frac{T_0 - T_z}{T_z}$ K – ukupni koeficijent prenosa toplote; A – površina za razmenu toplote
Razmenjivač toplote (hlađenje)	Eksponencijalni $T = T_h \left[1 + \beta \cdot e^{-\alpha t} \right]$ T_h – temperatura medijuma za hlađenje	$\alpha = \frac{W c_p'}{m c_p} \left[1 - e^{-\frac{KA}{WC}} \right]; \beta = \frac{T_0 - T_h}{T_h}$ W – protok medijuma za hlađenje; c_p' – specifična toplota medijuma za hlađenje

Kriterijumi sterilizacije za tipične temperaturne profile su:

Konstantna temperatura

$$\nabla = t A_d e^{-\frac{E a_d}{RT}} \quad (6.28)$$

Linearni profil

$$\nabla = E_2 A_d \left(\frac{E a_d}{R T_0} \right)^2 \frac{t}{1 + \alpha t} \quad (6.29)$$

Hiperbolni profil

$$\nabla = \frac{A_d \alpha \delta}{p^2} \cdot e^{-m} \left[E_2 \left\{ \delta \left(\frac{1 + \gamma t}{1 + p t} \right) - m \right\} - E_2 (\delta - m) \right] \quad (6.30)$$

gde je: $\delta = \frac{E}{RT_0}$, $p = \alpha + \gamma$ i $m = \frac{\delta\gamma}{p}$.

Eksponencijalni profil

$$\nabla = E_1 \frac{A}{\alpha} \left\{ \left(\frac{\delta}{1+\beta} \right) - \left(\frac{\delta}{1+\beta \cdot e^{-\alpha t}} \right) \right\} - \frac{A}{\alpha} e^{-\delta} \left\{ \left(\frac{\delta}{1+\beta} - \delta \right) - \left(\frac{\delta}{1+\beta e^{-\alpha t}} - \delta \right) \right\} \quad (6.31)$$

gde su E_1 i E_2 vrednosti eksponencijalnog integrala, definisanog sledećom jednačinom, za $n = 1$, odnosno $n = 2$:

$$E_n(z) = \int_z^{\infty} \frac{e^{-x}}{x^n} dx \quad (6.32)$$

sa rešenjima, koja se mogu naći u matematičkim priručnicima:

$$E_1 = \frac{e^{-x}}{x} \quad (6.33)$$

$$E_2 = \frac{e^{-x}}{x^2} \quad (6.34)$$

Obično se realni temperaturni profili razlikuju od teorijskih profila, koji su dati u tabeli, pa se u fazama zagrevanja i hlađenja uzimaju eksperimentalne zavisnosti, koje se zatim ekstrapolišu polinomom n -tog reda:

$$T = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_n t^n \quad (6.35)$$

Ako ne postoji mogućnost da se jednačina (6.35) reši, pribegava se grafičkom ili numeričkom načinu rešavanja definisanog integrala, po Richards-ovom grafičkom metodu.

Na osnovu poznatog temperaturnog profila se može odrediti zavisnost najpre $k = f(t)$, zatim ∇ i na kraju t_s . Iako je t_s obično kraće od t_z i t_h , najveći broj spora se inaktivise u fazi zadržavanja, zbog relativno visoke temperature. Uobičajene vrednosti raspodele kriterijuma sterilizacije ∇ po fazama u celom ciklusu diskontinualne sterilizacije su: $\frac{\nabla_z}{\nabla} = 20\%$, $\frac{\nabla_s}{\nabla} = 75\%$ i $\frac{\nabla_h}{\nabla} = 5\%$.

Richards-ov metod. Neka dijagram sterilizacije hranljive podloge u fazi zagrevanja ima oblik prikazan na slici 6.24. Način grafičkog integrisanja je takav da se ukupni vremenski period zagrevanja подели na n jednakih vremenskih intervala:

$$\Delta t = \frac{t_k - t_0}{n} = t_1 = t_2 = \dots = t_n \quad (6.36)$$

Tačnost rezultata je veća ako se uzme bar 30 intervala sterilizacije. Specifična brzina inaktivacije mikroorganizama se uzima na srednjoj temperaturi datog intervala strilizacije, pa se izračunava doprinos svakog intervala u periodu zagrevanja. Vrednosti specifične brzine inaktivacije za pojedine periode su:

$$k_i = A_d e^{\frac{-E_{a_d}}{RT_i}} \quad (6.37)$$

a kriterijum sterilizacije za odabrani interval je:

$$\nabla_i = k_i \Delta t \quad (6.38)$$

Pri tome je ukupni doprinos sterilizacije u periodu zagrevanja:

$$\nabla_z = \sum_{i=1}^n \nabla_i \quad (6.39)$$

gde je:

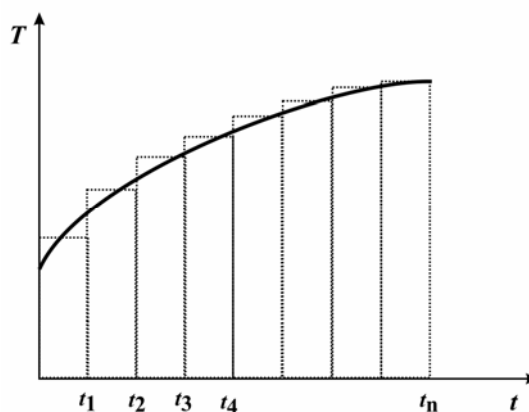
$$\begin{aligned} \nabla_1 &= k_1 t_1 = k_1 \Delta t \\ \nabla_2 &= k_2 t_2 = k_2 \Delta t \\ &\dots \\ \nabla_n &= k_n t_n = k_n \Delta t \end{aligned} \quad (6.40)$$

Na osnovu ovih jednačina se izračunava kriterijum sterilizacije u periodu zagrevanja ∇_z . Kriterijum sterilizacije za period hlađenja se izračunava potpuno analogno, kao za period zagrevanja, s tim što se mora voditi računa da su temperaturni profili drugačiji. Kada se izračunaju ova dva kriterijuma ∇_z i ∇_h , onda se na osnovu jednačine (6.26) dobija t_s .

Jednostavniji metod u odnosu na Richards-ovu metod, kojim se izbegava grafičko i numeričko integrisanje, sa prihvatljivom tačnošću izračunavanja kriterijuma sterilizacije, je brzi Richards-ov metod. On se zasniva na dve pretpostavke:

- inaktivacija spora odigrava se samo na temperaturi višoj od 100 °C, i
- temperaturni profili za periode zagrevanja i hlađenja iznad 100 °C su linearni.

U tabeli 6.13 date su vrednosti specifične brzine inaktivacije i kriterijuma sterilizacije za spore *B. stearothermophilus* za period zagrevanja ili hlađenja u opsegu 100–130 °C, koje važe pod uslovom da je brzina promena temperature 1°C/min. Ako je stvarna brzina zagrevanja ili hlađenja 1°C/min, vrednost kriterijuma sterilizacije se može uzeti direktno iz tabele, a ako je stvarna brzina zagrevanja ili hlađenja različita od 1°C/min, onda se vrednost kriterijuma sterilizacije iz tabele 6.13 preračunava jednostavnom proporcijom.



Slika 6.24 Pretpostavljeni dijagram sterilizacije hranljive podloge u fazi zagrevanja

Tabela 6.13 Vrednosti specifičnih brzina inaktivacije mikroorganizama i kriterijuma sterilizacije i u temperaturnom intervalu 100 –130 °C

T (°C)	k (min ⁻¹)	∇	T (°C)	k (min ⁻¹)	∇	T (°C)	k (min ⁻¹)	∇
100	0,019		107	0,105	0,420	114	0,531	2,488
101	0,025	0,044	108	0,133	0,553	115	0,666	3,154
102	0,032	0,076	109	0,168	0,720	118	1,307	6,341
103	0,040	0,116	110	0,212	0,932	121	2,538	12,549
104	0,051	0,168	111	0,267	1,199	124	4,881	24,518
105	0,065	0,233	112	0,336	1,535	127	9,293	47,373
106	0,083	0,316	113	0,432	1,957	130	17,524	90,591

Povećanje veličine diskontinualnog sterilizatora

Povećanje veličine (dimenzija) šaržnog sterilizatora vrši se uz uslov da se rizik kontaminacije ne poveća, a kvalitet hranljive podloge ne pogorša na različitim nivoima, od laboratorijskog do industrijskog bioreaktora. Povećanje veličine bioreaktora utiče na efekat sterilizacije, jer od zapremine hranljive podloge zavise kriterijum sterilizacije i konstrukcione karakteristike bioreaktora zbog kojih se menjaju temperaturni profili u periodu zagrevanja i hlađenja.

Rešavanje problema povećanja dimenzija uređaja za sterilizaciju zavisi od više faktora, čiji efekti na kvalitet hranljive podloge moraju da budu pažljivo analizirani. Pre svega se mora imati u vidu sledeće:

- 1) Sa povećanjem zapremine hranljive podloge povećava se vreme potrebno da se ona zagreje i ohladi do izabrane temperature. Ovo povećava doprinos perioda zagrevanja i hlađenja ukupnom efektu sterilizacije pod uslovom da se održi geometrijska sličnost, a način zagrevanja ostane isti;
- 2) Kada prinos proizvoda zavisi od termičke degradacije bitnih supstanci hranljive podloge, u obzir se mora uzeti zavisnost između kriterijuma sterilizacije i kvaliteta hranljive podloge. Zbog dužeg izlaganja visokoj temperaturi, veća je razgradnja termolabilnih komponenti hranljive podloge, pa se sastav hranljive podloge mora optimizovati, pri povećanju dimenzija uređaja (slika 6.25);
- 3) Sa povećanjem zapremine hranljive podloge povećava se verovatnoća preživljavanja spora. Da se rizik od kontaminacije u većem bioreaktoru ne bi povećao, sterilizacija se mora produžiti (slika 6.25);
- 4) Razlike u geometriji i promene temperature grejnog medijuma mogu u velikoj meri iskomplikovati postupak povećanja dimenzija sterilizatora.

Kriterijum sterilizacije zavisi od zapremine hranljive podloge. Kad se veličina bioreaktora poveća, početni broj spora se povećava, pa se kriterijum sterilizacije mora povećati da bi se zadržao isti rizik kontaminacije. Ovo duže trajanje sterilizacije se može negativno odraziti na sastav sterilne hranljive podloge.

Upotrebu kriterijuma sterilizacije u postupku projektovanja uređaja većih kapaciteta, a na osnovu podataka iz uređaja manjih kapaciteta, definisao je Banks sa saradnicima. Pošto kriterijum sterilizacije nije vezan za zapreminu nego za ukupni broj mikroorganizama, povećanjem zapremine diskontinualnog sterilizatora, povećava se količina kontaminanata u podlozi na početku sterilizacije, tj. $N_0 V_L$. Ovo se najbolje može pokazati primerom sa diskontinualnim sterilizatorom zapremine $V_L = 1.000 \text{ dm}^3$ u kome se steriliše hranljiva podloga sa koncentracijom mikroorganizama na početku $N_0 = 10^9 \text{ spora/dm}^3$. Uz pretpostavku da je rizik kontaminacije $p = 10^{-3}$, ukupni kriterijum sterilizacije je:

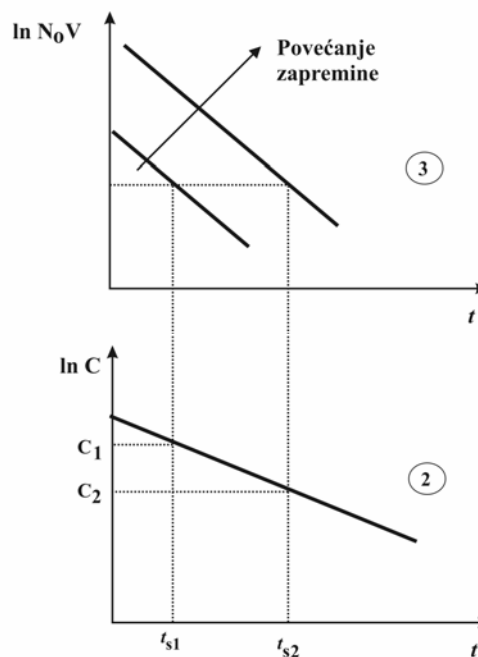
$$\nabla = \ln \frac{N_0 V_L}{p} = \ln \frac{10^9 \cdot 10^3}{10^{-3}} = 34,5$$

Ako se traži isti rizik kontaminacije, a sud se poveća 10 puta, tj. $V_L = 10.000 \text{ dm}^3$, onda je:

$$\nabla = \ln \frac{N_0 V_L}{p} = \ln \frac{10^9 \cdot 10^4}{10^{-3}} = 36,8$$

Iz ovoga sledi da se ukupni kriterijum sterilizacije ∇ povećao sa povećanjem zapremine suda u kome se vrši sterilizacija iste podloge, iako je tražen isti rizik kontaminacije pojedinih šarži.

Slika 6.25 Uticaj povećanja veličine šaržnog sterilizatora na sterilizaciju hranljive podloge



6.3.4. Kontinualna sterilizacija toplotom

Kontinualna sterilizacija se izvodi tako što se hranljiva podloga u kontinualnom toku, zagreva, drži određeno vreme na definisanoj temperaturi, a potom ohladi do temperature za izvođenje procesa. Bazira se na principu „visoka temperatura – kratko vreme“, tj. hranljiva podloga se zagreva do visoke temperature za kratko vreme, drži kratko vreme na konstantnoj visokoj temperaturi, a zatim brzo hladi do temperature bioprocasa. Potreban kriterijum sterilizacije može se ostvariti kombinacijom temperature i vremena držanja na maksimalnoj temperaturi. Pri konstantnom protoku hranljive podloge, vreme zadržavanja hranljive podloge u sterilizatoru je moguće menjati samo promenom geometrije, prečnika ili dužine cevovoda kroz koji hranljiva podloga protiče. U praksi, lakše je proces sterilizacije kontrolisati promenom temperature, nego trajanjem perioda zadržavanja na određenoj temperaturi.

Kontinualna sterilizacija se koristi pri sterilizaciji podloga sa termolabilnim komponentama ili sa komponentama koje međusobno reaguju na povišenim temperaturama. Preporučuje se za bioprocese velikih kapaciteta, kao i za bioprocese koji ne zahtevaju visoki kriterijum sterilizacije.

U praksi se najčešće koriste dva tipa kontinualnih sterilizatora:

- sterilizator sa direktnim zagrevanjem pomoću parnog injektora i
- sterilizator sa izmenjivačem toplote.

Sterilizacija sa parnim injektorom (slika 6.26) se vrši tako što se u hranljivu podlogu direktno uvodi vodena para visokog pritiska, a istovremeno se i meša u mešaču pomoću Venturi efekta. Usled intenzivnog mešanja i visoke temperature pare, podloga se relativno brzo dovodi do željene temperature sterilizacije. Tako zagrejana podloga se provodi kroz cevni izmenjivač toplote. Dužina cevi i protok hranljive podloge određuju vreme zadržavanja na temperaturi sterilizacije. Po izlasku iz cevnog izmenjivača toplote, hranljiva podloga prolazi kroz ekspanzioni ventil u vakuum komoru. Para trenutno ekspanduje, a oduzimanjem latentne toplote isparavanja temperatura hranljive podloge se brzo smanjuje. Uvedena vodena para kondenzacijom razblažuje hranljivu podlogu. Periodi zagrevanja i hlađenja su vrlo kratki i mogu se zanemariti pri proračunu temperaturnog režima.

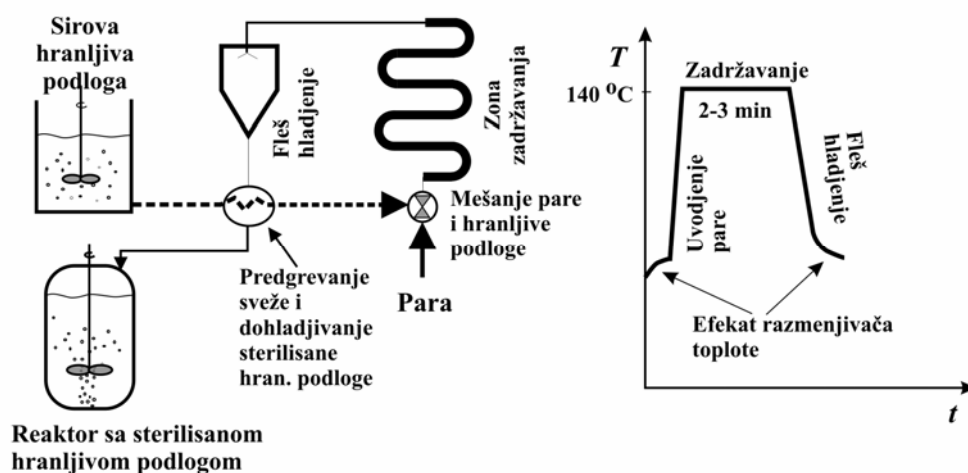
Kontinualni sterilizator sa indirektnim zagrevanjem (slika 6.27) zagreva i hladi hranljivu podlogu u setu izmenjivača toplote. Kontaktno vreme tokom zagrevanja i hlađenja je mnogo duže u poređenju sa vremenom kontakta u sterilizatoru sa direktnim zagrevanjem, ali je doprinos ovih perioda u ukupnom ciklusu (1 do 2%) mnogo manji nego u slučaju šaržnog sterilizatora.

Izmenjivači toplote koji se koriste u sistemima za kontinualnu sterilizaciju hranljive podloge su obično: pločasti, spiralni i tipa cev u cevi.

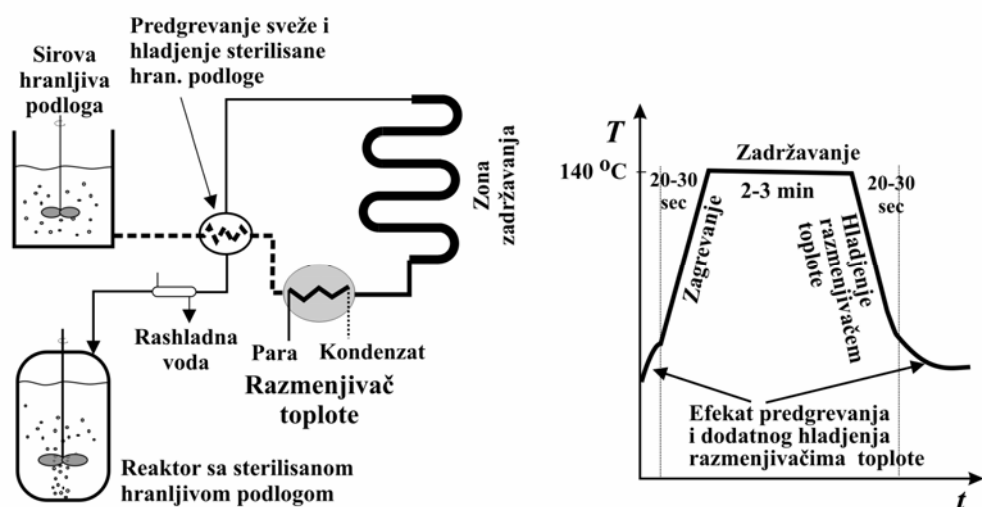
Pločasti izmenjivači se koriste kada su hranljive podloge malog viskoziteta i ako nema suspendovanih čestica. Njihova prednost je veoma dobar prenos toplote zbog izrazito turbulentnog strujanja, a nedostatak im je relativno malo rastojanje između ploča, tako da pri prolazu viskozne hranljive podloge može doći do zapušavanja.

Spiralni izmenjivači toplote se koriste za sterilizaciju relativno gustih i viskoznih hranljivih podloga, kao i podloga koje sadrže suspendovane čestice.

Izmenjivači toplote tipa cev u cevi koriste se za sterilizaciju gustih suspenzija. Imaju široku primenu zbog jednostavnosti konstrukcije. Kao grejni medijum se koristi vodena para, a kao rashladni medijum voda.



Slika 6.26 Šematski prikaz sistema za kontinualnu sterilizaciju hranljivih podloga sa dijagramom sterilizacije



Slika 6.27 Šematski prikaz sistema za kontinualnu sterilizaciju hranljivih podloga sa indirektnim zagrevanjem i hlađenjem sa dijagramom sterilizacije

Poređenjem diskontinualne i kontinualne sterilizacije može se zaključiti da i jedna i druga imaju određenih i prednosti i nedostataka. Tako, prednosti kontinualne sterilizacije su:

- povoljniji su uslovi za sterilizaciju toplotno osetljivih podloga;
- dobijanje i održavanje standardnog kvaliteta hranljive podloge;
- ravnomerna potrošnja pare tokom čitavog procesa, bez pikova u potrošnji;
- proces je ekonomičniji zbog manjeg utroška vodene pare (20 do 25%) i zbog rekuperacije toplote;
- postupak se može u potpunosti automatizovati;
- povećava se ukupni kapacitet uređaja, posebno u sistemu sa više bioreaktora; jednostavno projektovanje postrojenja i moguć *scale-up* uređaja; i
- ukupno vreme potrebno za sterilizaciju određene zapremine hranljive podloge je kraće.

Prednosti diskontinualne sterilizacije su:

- manja cena kompletnog postrojenja;
- manji rizik od kontaminacije ako se sterilizacija obavlja u bioreaktoru;
- jednostavnija manuelna regulacija; i
- lakša sterilizacija viskoznih podloga i podloga u obliku suspenzije.

Projektovanje kontinualnog sterilizatora toplotom

Principi projektovanja su praktično isti kao i kod diskontinualne sterilizacije, jer i u ovom slučaju postoje tri faze: zagrevanje, zadržavanje i hlađenje. Udeo zagrevanja i hlađenja je daleko manji, posebno kod sistema sa direktnim zagrevanjem. Traženi kriterijum sterilizacije može se postići kombinacijom temperatura i zapreminskog vremena u mnogo širem opsegu nego kod diskontinualne sterilizacije, što olakšava projektovanje. Pri proračunu kontinualne sterilizacije sa direktnim zagrevanjem zapreminsko vreme u zonama zagrevanja i hlađenja se može zanemariti, ali ne i kod sistema sa indirektnim zagrevanjem. Za određenu vrednost kriterijuma sterilizacije $\nabla = const.$, vreme zadržavanja u zoni sterilizacije zavisi od temperature u toj zoni. Rezultati dobijeni takvom analizom za usvojenu vrednost $\nabla = 45,7$, koji su dati u tabeli 6.14, pokazuju da se vreme zadržavanja u zoni sterilizacije značajno skraćuje sa povišenjem temperature od 130 na 150°.

Tabela 6.14 Zavisnost vremena zadržavanja u zoni sterilizacije od temperature za vrednost kriterijuma sterilizacije $\nabla = 45,7$

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Vreme zadržavanja (s)</i>
130	150,0
135	51,9
140	18,9
150	2,7

Izbor temperatura u zoni sterilizacije zavisi od termostabilnosti bitnih komponenti podloge, kao i od prisustva komponenata koje mogu međusobno reagovati na povišenoj temperaturi. Ako

se uvede *kriterijum kvaliteta hranljive podloge* λ , koji predstavlja meru za razgradnju termolabilnih ključnih komponenti pod uticajem visoke temperature, koristi se jednačina:

$$\lambda = \ln \frac{S_0}{S_t} \quad (6.41)$$

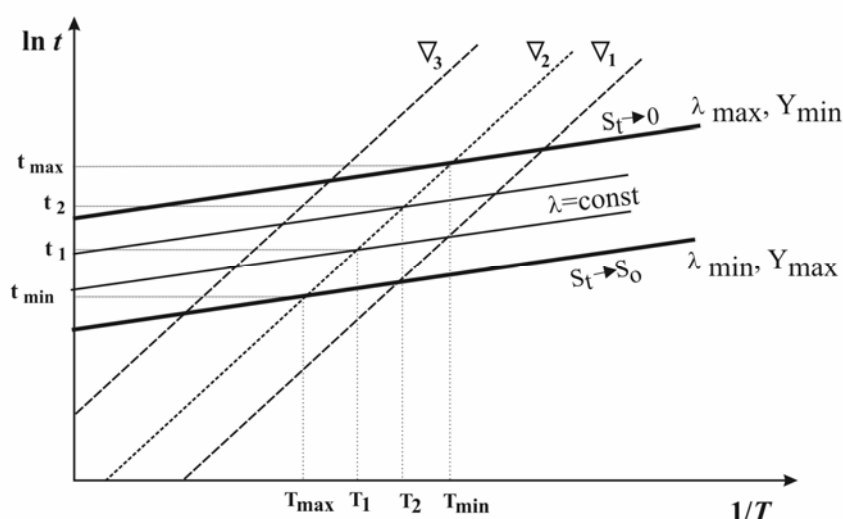
Kombinovanjem jednačine (6.41) sa jednačinama (6.14) i (6.15), uz zamenu $t = t_s$, dobija se

$$\lambda = \ln \frac{S_0}{S_t} = A_s \cdot t_s \cdot e^{-\frac{E_{a_s}}{RT}} \quad (6.42)$$

odakle sledi:

$$\ln t_s = -\frac{E_{a_s}}{R} \frac{1}{T} + \ln \frac{\lambda}{A_s} \quad (6.43)$$

Ovom jednačinom se definiše familija paralelnih pravih linija $\ln t_s \div 1/T$ sa nagibom E_{a_s} , koje su parametarske u odnosu na *kriterijum kvaliteta hranljive podloge*. Jednačina (6.12), u kojoj je sada $t = t_s$, i jednačina (6.43), sa parametrima ∇ i λ , u istim koordinatama imaju različite nagibe, kao što je predstavljeno na slici 6.28.



Slika 6.28 Odnosi kriterijuma sterilizacije i kriterijuma kvaliteta hranljive podloge

Slika 6.28 ilustruje kako se kombinacijom temperature i vremena zadržavanja za dati kriterijum sterilizacije ($\nabla = const.$) hranljiva podloga može sterilisati tako da se ostvari maksimalni prinos proizvoda u odnosu na termolabilnu komponentu. Kada je koncentracija termolabilne komponente jednaka početnoj, tj. $S_t = S_0$, onda se ostvaruje maksimalni prinos proizvoda Y_{max} . Ako

$S_t \rightarrow 0$, onda se ostvaruje minimalni prinos $Y_{\min}$. Sve ostale vrednosti prinosa, koje se realno mogu očekivati u praksi, nalaze se između linija $Y_{\max}$, $\lambda_{\min}$ i $Y_{\min}$, $\lambda_{\max}$. Odabiranjem kriterijuma sterlnosti ∇_2 , mogući su sledeći slučajevi:

- minimalni prinos $Y_{\min}$ i maksimalna razgradnja termolabilne komponente, ako se odabere $T_{\min}$ i $t_{s,\max}$;
- maksimalni prinos $Y_{\max}$ i minimalna razgradnja termolabilne komponente, ako se odabere $T_{\max}$ i $t_{s,\min}$;
- prinos Y_2 će biti manji od Y_1 , ako je $T_1 > T_2$, a $t_1 < t_2$.

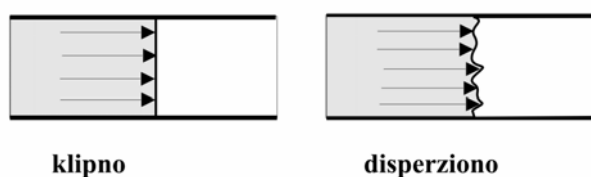
Ova analiza ponovo potvrđuje povoljnost primene principa *HTST* u kontinualnoj sterilizaciji hranljive podloge.

U kontinualnoj sterilizaciji postoje tri radna ciklusa:

- sterilizacija uređaja za kontinualnu sterilizaciju,
- sterilizacija hranljive podloge i
- čišćenje i pranje postrojenja za sterilizaciju.

Proračun vremena zadržavanja u zoni sterilizacije

Da bi se izračunalo vreme zadržavanja hranljive podloge tokom kontinualne sterilizacije, važno je znati tip i režim strujanja tečnosti kroz sterilizator. Najčešće se pretpostavlja idealno klipno strujanje sa uzdužnim mešanjem (disperzijom), koje poznato kao disperziono strujanje ili strujanje sa uzdužnim (aksijalnim) mešanjem. Kod ovog modela strujanja, nazvanog disperzioni model, pretpostavlja se da fluid protiče klipno uz mešanje u pravcu proticanja (slika 6.29).



Slika 6.29 Šematski prikaz klipnog i disperzionog strujanja fluida kroz cev

Termin uzdužnog mešanja se koristi, da bi se napravila razlika između mešanja u pravcu proticanja i mešanja u radijalnom pravcu. Na primer, pri laminarnom proticanju fluida kroz cev, aksijalno mešanje je uglavnom posledica gradijenta brzine fluida, dok je radijalno mešanje posledica samo molekulske difuzije.

Molekulska difuzija u pravcu x -ose opisana je diferencijalnom jednačinom prema Fick-ovom zakonu:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (6.44)$$

gde je: D – koeficijent molekulske difuzije.

Analogno, svi doprinosi povratnom mešanju fluida koji protiče u x pravcu su:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (6.45)$$

gde je: D – koeficijent uzdužne (aksijalne) disperzije ili koeficijent uzdužnog mešanja.

Ako se gornja jednačina izrazi u bezdimenzionom obliku, uz uvođenje zamena: $z = \frac{ut + x}{L}$ i

$\theta = \frac{tu}{L}$, dobija se:

$$\frac{\partial C}{\partial \theta} = \frac{D}{uL} \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - \frac{\partial C}{\partial z} \quad (6.46)$$

gde član D/uL predstavlja bezdimenzionu grupu koja se zove *disperzioni broj* suda. Jednačina (6.46) predstavlja osnovnu diferencijalnu jednačinu disperznog modela.

Eksperimenti pokazuju da disperzioni model podjednako dobro opisuje proticanje u kolonama sa nepokretnim slojem, kao i turbulentno proticanje u cevima. U tim slučajevima postoji zavisnost između veličine disperzije (intenziteta), merene disperzionim brojem suda i osobina sistema.

Za porozni nepokretni sloj važi:

$$\frac{D\varepsilon}{ud_p} = f\left(\frac{\rho u d_p}{\mu}\right) \quad (6.47)$$

a za proticanje u cevima:

$$\frac{D}{ud_t} = f\left(\frac{\rho u d}{\mu}\right) \quad (6.48)$$

gde je: d_t – prečnik čestica, a d – prečnik cevi.

Disperzioni broj suda je proizvod intenziteta disperzije, koji zavisi od Reynolds-ovog i Schmidt-ovog broja (slika 6.32), i geometrijskog faktora:

$$\frac{D}{uL} = \frac{D}{ud} \cdot \frac{d}{L} \quad (6.49)$$

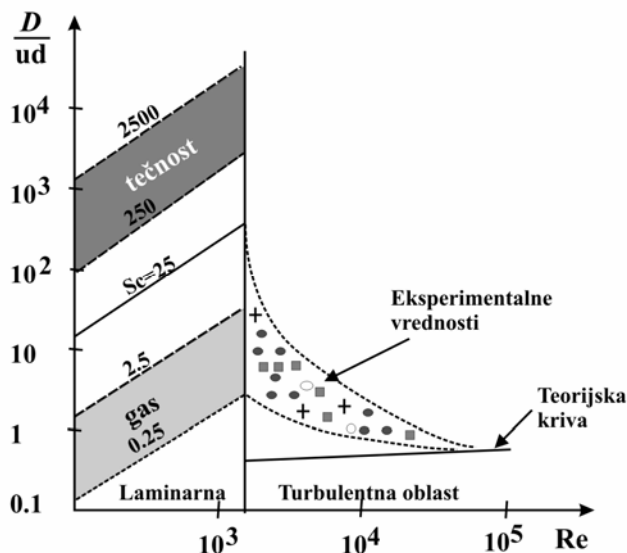
gde je: u – srednja brzina tečnosti, L – dužina sterilizatora, D/uL – disperzioni broj, D/ud – intenzitet disperzije i u/L geometrijski faktor.

Stepen uzdužnog mešanja procenjuje se na osnovu Bodenstein-ovog broja Bo , (koji se ponekad naziva i Peclet-ov broj Pe , naročito kada se prečnik usvoji za karakterističnu dužinu), koji se definiše kao:

$$Pe = Bo = \frac{uL}{D} \quad (6.50)$$

Funkcionalna zavisnost recipročne vrednosti Bodenstein-ovog broja od Reynolds-ovog broja je data na slici 6.30. Ako $Bo \rightarrow 0$, disperzija je velika, odnosno u pitanju je *strujanje sa idealnim mešanjem*, ako $Bo \rightarrow \infty$ disperzija je zanemarljiva, odnosno u pitanju je *idealno klipno strujanje*.

Režim strujanja je između laminarnog i razvijenog turbulentnog strujanja, sa srednjom brzinom od 50–80% od maksimalne brzine strujanja. Poželjno je da strujanje bude bliže razvijenom turbulentnom strujanju ($Re > 20.000$), da bi rizik od pregrevanja tečnosti blizu zida i stepen povratnog mešanja bili manji.



Slika 6.30 Intenzitet disperzije pri proticanju fluida u cevima

Jedinice sterilizatora za zagrevanje i hlađenje zanemaruju se u odnosu na ukupnu dužinu sterilizatora, a pretpostavlja se da je konstantna temperatura u delu sterilizatora uniformna.

U prvom koraku pretpostavlja se da je strujanje turbulentno ($Re > 20.000$), a potom se bira prečnik cevi kroz koju protiče hranljiva podloga i izračuna brzina tečnosti:

$$u = \frac{\mu Re}{\rho d} \quad (6.51)$$

Za date uslove strujanja Bodenstein-ov broj se odredi eksperimentalno ili izračuna pomoću odgovarajuće korelacije, a zatim se odredi koeficijent uzdužnog mešanja. Ako je strujanje laminarno, koeficijent uzdužnog mešanja može se izračunati pomoću sledeće korelacije:

$$D = \mathcal{D} + \frac{\mu^2 d^2}{192 \mathcal{D}} \quad (6.52)$$

Za turbulentni režim strujanja, efektivni koeficijent aksijalne disperzije se može odrediti korišćenjem dijagrama sa slike 6.30.

Sledeći korak je izbor kriterijuma sterilizacije. Prvo se usvoji brojna koncentracija spora u nesterilnoj hranljivoj podlozi (obično $N_0 = 10^6$ spora/cm³), a zatim rizik od kontaminacije (obično $p = 0,001$), tako da kriterijum sterilizacije iznosi:

$$\nabla = \ln \frac{N_0}{N_t} = \ln(10^{15} V_L) \quad (6.53)$$

gde je: V_L – zapremina nesterilne podloge (u m³).

Ako se za analizu proticanja hranljive podloge kroz sterilizator usvoji disperzioni model onda se odnos N_t/N_0 može izračunati pomoću jednačine:

$$\frac{N_t}{N_0} = \frac{4ye^{\left(\frac{Bo}{2}\right)}}{(1+y^2)e^{\left(\frac{Boy}{2}\right)} - (1-y)^2 e^{\left(-\frac{Boy}{2}\right)}} \quad (6.54)$$

gde je:

$$y = 1 + 4 \frac{Da}{Bo} \quad (6.55)$$

a Da – Damkeler-ov broj, definisan kao:

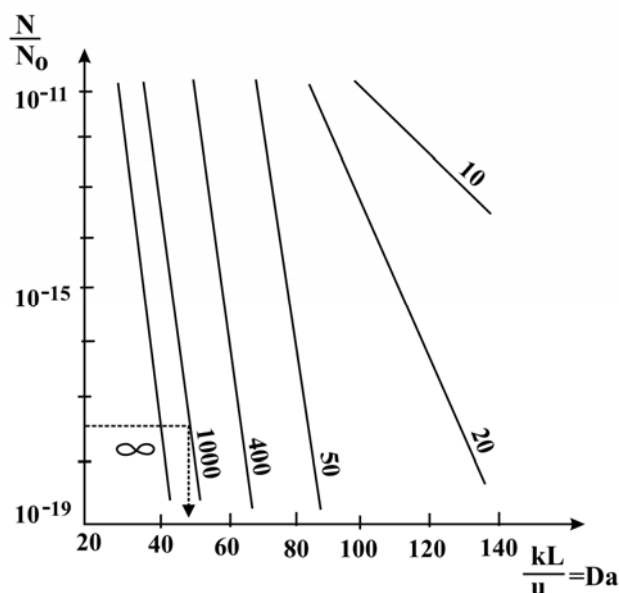
$$Da = \frac{kL}{u} \quad (6.56)$$

Ako je odstupanje od idealnog klipnog strujanja malo ($Bo \rightarrow \infty$), onda se odnos N_t/N_0 može izračunati pomoću jednostavnije jednačine:

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{\left(-Da + \frac{Da^2}{Bo}\right)} \quad (6.57)$$

Na slici 6.31 su prikazane zavisnosti odnosa N_t/N_0 od Damkeler-ovog broja za različite vrednosti Bodenstein-ovog broja. U slučaju idealnog klipnog proticanja ($Bo \rightarrow \infty$), željeni stepen sterilnosti se može postići u najkraćem sterilizatoru, tj. poželjno je da disperzija bude minimalna.

Sa izabranim kriterijumima sterilizacije i poznatim Bodenstein-ovim brojem može se odrediti Damkeler-ov kriterijum, koristeći podatke sa slike 6.31, a zatim izračunati specifična brzina destrukcije k i temperatura sterilizacije T_s . Na sličan način se određuje dužina sterilizatora potrebna za postizanje sterilnosti hranljive podloge na zadatoj temperaturi.



Slika 6.31 Uticaj aksijalne dispeziije na inaktivaciju vitalnih mikroorganizama u kontinualnom sterilizatoru

6.3.5 Sterilizacija hranljive podloge filtracijom

U određenim industrijskim uslovima, kada hranljive podloge sadrže komponente koje na povišenim temperaturama reaguju ili se razgrađuju, sterilizacija toplotom nije pogodna. U tim slučajevima se koristi sterilizacija filtracijom. Filamentni mikroorganizmi (plesni) veoma se lako izdvajaju filtracijom, dok kod kvasaca i bakterija ima problema, jer pore filtra moraju biti 0,22 do 0,45 μm . Ovaj postupak se zasniva na izdvajanju mikrobnih ćelija iz hranljive podloge propuštanjem hranljive podloge pod pritiskom kroz filter, čije su pore manje od mikrobnih ćelija. Filtri su najčešće membranski, porcelanski ili od sinterovanog stakla. Filter se prethodno sterilise u autoklavu na temperaturi od 121°C, u trajanju od 10 do 45 min. U filtraciji se koriste dve vrste filtera:

- apsolutni filteri i
- filteri sa dubinskim slojem.

Apsolutni filteri potpuno izdvajaju mikrobne ćelije iz hranljive podloge, zadržavanjem na filteru. Delimično začepljene pora filtera, sa zadržanim mikrobnim ćelijama na zidovima pora filtera, povećavaju njihovu efikasnost. Koriste se ultrafiltracione, mikroporozne i makroporozne membrane.

Filteri sa dubinskim slojem prave se od poroznog ili vlaknastog materijala, kao što su: porozna keramika, sinterovani metali, infuzorijska zemlja, staklena vuna ili celulozna vlakna. Pore ili

rastojanja između vlakana su veće od najmanjih mikrobnih ćelija. Izdvajanje mikrobnih ćelija se zasniva na verovatnoći da će one pri prolazu kroz filtarsku masu biti zadržane, delovanjem jednog od sledećih mehanizama (slika 6.32):

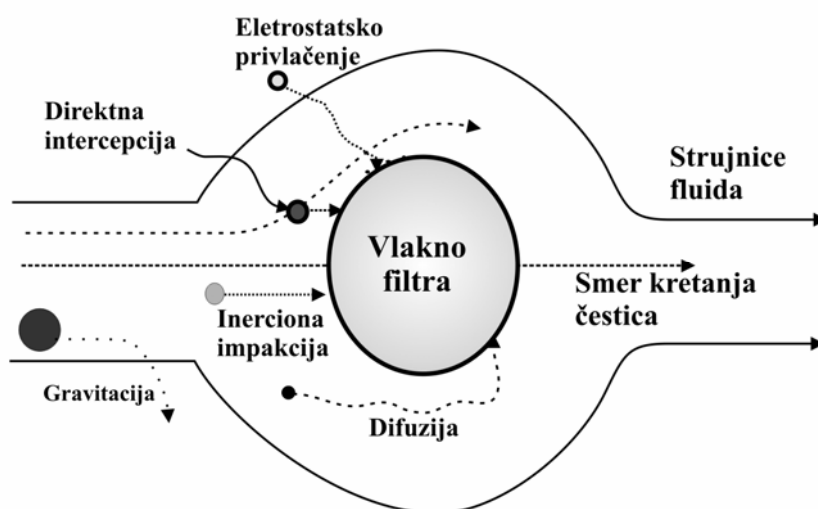
- intercepcijom,
- inercionom impakcijom,
- difuzijom,
- elektrostatskim privlačenjem i
- gravitacijom.

Intercepcija se zasniva na prodoru mikrobne ćelije u stagnantni sloj tečnosti oko vlakna, gde biva vezana za vlakno. Nije poželjno povećavati protok kroz filter, jer se vezane ćelije mogu odvojiti, čime se umanjuje efikasnost filtracije.

Inerciona impakcija je mehanizam po kome mikrobne ćelije koje udare u vlakno filtra gube kinetičku energiju i zadržavaju se na vlaknu. Pri većoj brzini proticanja hranljive podloge, veća je verovatnoća da dođe do efikasnog izdvajanja mikrobnih ćelija.

Difuzija ili Brown-ovo kretanje je karakteristično za ćelije koje su ušle u stagnantni sloj tečnosti oko vlakna, pri čemu one, usled svog kretanja, nalete na vlakno i bivaju izdvojene iz tečnosti.

Elektrostatsko privlačenje i *gravitacija* se javljaju zbog delovanja elektrostatičke i gravitacione sile.



Slika 6.32 Grafički prikaz mehanizama sterilizacije filtracijom

Primena apsolutnih filtara se ne preporučuje ako je koncentracija mikrobnih ćelija veća od 10^6 ćelija/cm³. U ovom slučaju se primenjuje kombinovani sistem dubinskog i apsolutnog filtriranja.

6.3.6. Sterilizacija vazduha

Većina industrijskih bioprocasa se obavlja pod aerobnim uslovima, uz intenzivan dovod vazduha, koji mora biti sterilisan. Broj čestica i mikroorganizama u vazduhu, zavisi od lokacije pogona, strujanja vazduha i njegove prethodne pripreme. Prosečno, spoljni vazduh sadrži:

- 10 do 100.000 čestica/m³ i
- 5 do 2.000 mikroorganizama/m³ od čega su 50% spore gljiva i 40% Gram-negativne bakterije.

Protok vazduha je obično od 0,5 do 1 m³/m³·min. Tako, za aeraciju fermentora od 50 m³ potrebno je približno 3000 m³/h vazduha.

U biotehnologiji se sterilni vazduh višestruko koristi:

- kao izvor kiseonika u aerobnim procesima,
- za sterilno pretakanje sterilnih rastvora iz jedne u drugu posudu pod pritiskom,
- za sušenje sterilnog materijala i
- za održavanje nadpritiska u sterilnim prostorijama.

Sterilizacija vazduha se može ostvariti:

- filtracijom,
- toplotom,
- hemijskim i fizičkim sredstvima, i
- elektrostatičkim taloženjem.

U industrijske svrhe najčešće se koristi sterilizacija filtracijom, dok se ostali postupci primenjuju u laboratorijskim uslovima.

Sterilizacija vazduha filtracijom

Pri izboru opreme kojom će se izvršiti filtracija vazduha moraju se zadovoljiti dva osnovna kriterijuma:

- mora se obezbediti dovoljna količina sterilnog vazduha za određeni bioproces i
- bioproces se mora odvijati u uređaju sa što manjim padom pritiska.

Najčešće korišćeni tipovi filtara su *apsolutni filtri* i *vlaknasti filtri*.

Postupak filtracije u apsolutnom filtru zahteva da se u određenom vremenu filtarska membrana zameni, kako bi se održao potreban kvalitet i kapacitet filtracije. Zbog skupih maretijala, koji su ranije korišćeni za izradu filtara za sterilizaciju, njihova primena u industrijskim uslovima je bila ograničena. Razvoj novih plastičnih materijala, koji imaju dobre karakteristike i nisku cenu, doveo je do veće primene apsolutnih filtara. Niža cena omogućila je češću zamenu filtara, koja je neophodna kada dođe do začepljenja i pada pritiska tokom filtracije.

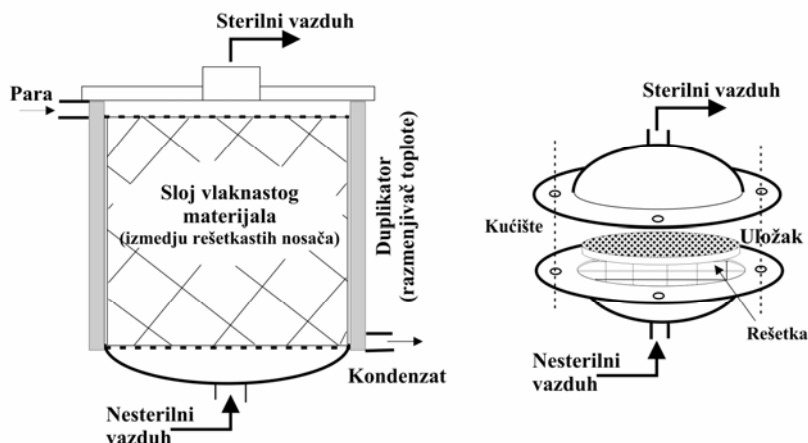
Vlaknasti filtri imaju znatno veću primenu, jer su jednostavniji za proizvodnju i imaju prednosti pri većim protocima. Ovi filtri se prave od vlaknastih materijala, kao što je pamuk ili staklena vuna. Kod ove vrste filtara mikrobne ćelije mogu da prodru u filter, pa čak i da prođu kroz nje, bez obzira na njegovu debljinu, što je njihov osnovni nedostatak u odnosu na apsolutne filtre.

Razlikuju se dva osnovna tipa vlaknastih filtara (slika 6.33): filtri sa dubinskim slojem i filtarski ulošci. Prvi se sastoje od presovanog homogenog sloja vlaknastog materijala smeštenog u metalnom cilindru sa omotačem za sterilizaciju toplotom. Filtarski ulošci sastoje se od jednog ili više tankih slojeva finih vlakana u omotaču, od tekstila, postavljenih u metalno kućište, radi sterilizacije toplotom ili formaldehidom.

Zadržavanje čestica iz vazduha u vlaknastim filtrima se odvija impakcijom, intercepcijom, difuzijom i elektrostatskim privlačenjem.

Da bi se proračunao vlaknasti filter polazi se od dve pretpostavke:

- čestica koja dotakne vlakno ostaje vezana za vlakno i
- raspodela čestica u filtru je uniformna.



Slika 6.33 Šematski prikaz vlaknastih filtara: a) filter sa dubinskim slojem i b) filtarski uložak

Uvažavajući ove pretpostavke, smanjenje koncentracije čestica u vazduhu pomoću filtra se može izraziti kinetičkom jednačinom prvog reda:

$$- \frac{dN}{dL} = k_f N \quad (6.58)$$

gde su: N – broj čestica u vazduhu u filtru, L – debljina filtra i k_f – konstanta filtra.

Integrisanjem jednačine (6.58) se dobija:

$$\frac{N_f}{N_0} = e^{-k_f L} \quad (6.59)$$

gde je: N_0 – broj čestica koje ulaze u filter i N_f – broj čestica koje napuštaju filter. Iz jednačine (6.59) je jasno da je za potpuno uklanjanje svih čestica potrebna beskonačna dužina filtra.

Logaritmovanjem jednačine (6.59) se dobija tzv. *logaritamska jednačina penetracije*:

$$\ln \frac{N_f}{N_0} = -k_f L \quad (6.60)$$

Pošto je nemoguće obezbediti potpuno izdvajanje čestica iz struje vazduha, potrebno je definisati željenu *efikasnost filtra* koja se izražava jednačinom:

$$E_f = \frac{N_0 - N_f}{N_0} \quad (6.61)$$

odnosno:

$$E_f = 1 - \frac{N_f}{N_0} \quad (6.62)$$

Kombinovanjem jednačina (6.59) i (6.62) dobija se izraz za efikasnost filtracije:

$$E_f = 1 - e^{(-k_f L)} \quad (6.63)$$

U industrijskoj praksi je karakteristična efikasnost filtra od 90%, što znači da je 90% od ukupnog broja čestica koje uđu u filter zadržano u njemu. Ako je $E_f = 0,9$, onda je $N_f/N_0 = 0,1$. Ako se *debljina filtra* koji izdvaja 90% čestica označi sa L_{90} , dobija se da je:

$$\ln \frac{N_f}{N_0} = \ln 0,1 = -2.303 = -k_f L_{90} \quad (6.64)$$

Odavde sledi da je:

$$L_{90} = \frac{2.303}{k_f} \quad (6.65)$$

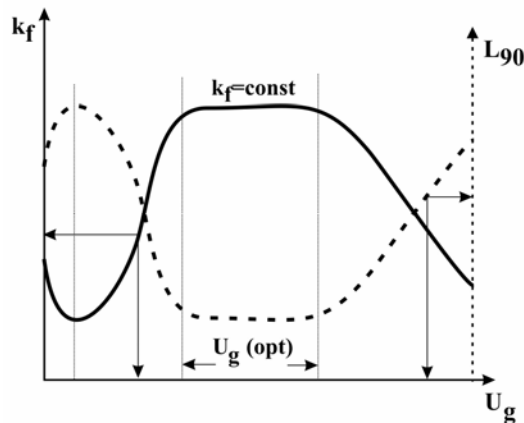
U tabeli 6.15. su date vrednosti za debljinu filtera L_{90} za različite materijale:

Tabela 6.15. Vrednosti debljine filtera L_{90} za različite materijale

<i>Materijal</i>	<i>Prečnik vlakna (μm)</i>	<i>Mikroorganizam</i>	<i>Brzina strujanja vazduha (cm/s)</i>	<i>L_{90} (cm)</i>
Staklena vuna	16	<i>Spore B. subtilis</i>	3	4
			15	9
			30	11,5
			150	1,5
			300	0,4
Staklena vuna	8,5	<i>Escherichia coli</i>	3	0,4
			15	0,6
			30	0,7
			150	0,8
			300	1,1
Aktivni ugalj	-	<i>B. cereus</i>	18	1,7
			28,5	8,7

Konstanta i debljina filtra zavise od prirode materijala od koga je on napravljen kao i od brzine strujanja vazduha kroz filter, kao što je predstavljeno na slici 6.34. Na istoj slici se može videti da postoji neka optimalna debljina filtra za odabrani protok, kada je $k_f = \text{const}$. Pri malim brzinama strujanja gasa u_G javlja se nestacionarno stanje, da bi posle neke minimalne brzine $u_{G,min}$ nastupilo stacionarno stanje, tj. stabilan rad filtra. Nakon neke maksimalne brzine vazduha $u_{G,max}$ dolazi do naglog pada k_f , što je najverovatnije posledica formiranja velikih kanala, vibracije vlakna i odvajanja već vezanih čestica za vlakno. Za stabilan rad filtra treba da odaberemo optimalnu brzinu $u_{G,opt}$, koja se nalazi u intervalu između minimalne i maksimalne vrednosti.

Slika 6.34 Zavisnost koeficijenta filtre i debljine filtra od brzine proticanja vazduha



Proračun vlaknastog filtra se zasniva na logaritamskoj jednačini penetracije i prihvatljivom riziku kontaminacije. Obično se usvaja rizik kontaminacije $p = 0,001$, a potrebna dužina filtra se izračunava pomoću jednačine:

$$L = \frac{1}{k_f} \ln \frac{N_0}{N_f} \quad (6.66)$$

Broj čestica u ulaznom vazduhu je:

$$N_0 = Q_v t_f c_0 \quad (6.67)$$

gde je: Q_v – protok vazduha, t_f – vremenski period rada filtra i c_0 – koncentracija čestica u ulaznom vazduhu. Broj čestica koji napušta filter je $N_f = p$.

Druga važna karakteristika filtera je prečnik filtra. On se izračunava iz protoka vazduha i optimalne linearne brzine vazduha:

$$d_f = \left(\frac{4Q_v}{\pi u_G} \right)^{1/2} \quad (6.68)$$

gde je: d_f – prečnik filtra i u_G – brzina strujanja vazduha.

Filtri velikog poprečnog preseka zahtevaju veći prostor i veća početna ulaganja, ali su zato padovi pritiska i operativni troškovi manji.

Mehanizam inercione impakcije

Ako se u vazdušnoj struji, koja se kreće brzinom u_G , nalazi čestica koja se kreće brzinom u_p , a ima prečnik d_p i gustinu ρ_p , onda otpor kretanju čestice može biti izražen Stoks-ovom jednačinom:

$$\frac{\pi}{6} d_p^3 \rho_p \frac{du_p}{dt} = - \frac{3\pi\mu d_p}{C} (u_p - u_G) \quad (6.69)$$

odnosno:

$$\frac{C\rho_p d_p^2}{18\mu} \frac{du_p}{dt} = - (u_p - u_G) \quad (6.70)$$

Uvođenjem bezdimenzionih veličina koje se odnose na koordinate, brzinu i vreme, koje uključuju prečnik vlakna d_v , i početnu vrednost brzine vazduha u_{G0} , dobija se član ψ koji se naziva *inercioni parametar*:

$$\psi = \frac{C\rho_p d_p^2 U_{G0}}{18\mu d_v} \quad (6.71)$$

gde je: C – Caningham-ov koeficijent i d_v - prečnik vlakna.

Efikasnost filtracije je jednaka nuli ($E_f=0$), kada je $\psi=1/16$. Iz ovoga sledi da postoji kritična brzina vazduha:

$$u_{GC} = 1,125 \frac{\mu d_v}{C\rho_p d_p^2} \quad (6.72)$$

Zamenom vrednosti za μ i ρ za vazduh na 20 °C, dobijaju se vrednosti prikazane na slici 6.35. Iz prikazanog dijagrama moguće je, za poznate i odgovarajuće parove vrednosti, odrediti treću, nepoznatu, vrednost.

Kod izdvajanja čestica mehanizmom intercepcije, primenjuje se pojednostavljeni oblik efikasnosti filtracije:

$$E_f \propto \left(\frac{d_p}{d_v} \right)^2 \text{Re}^{1/16} \quad (6.73)$$

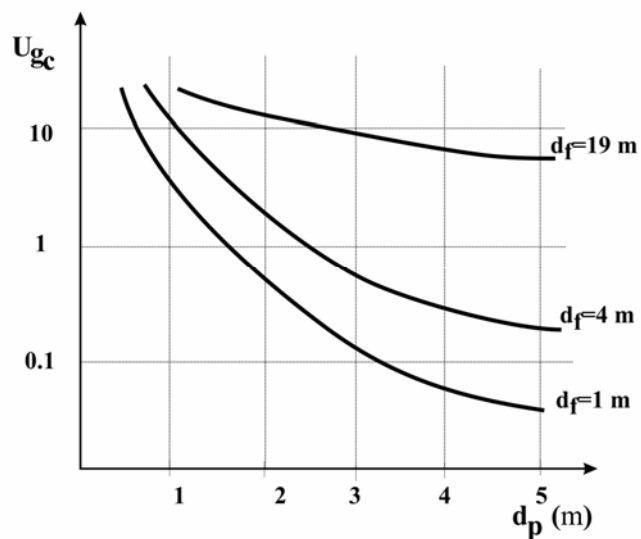
gde je: $\text{Re} = \frac{\rho u_G d_v}{\mu}$.

Kod mehanizma difuzije, tj. Brown-ovog kretanja za efikasnost filtracije koristi se izraz:

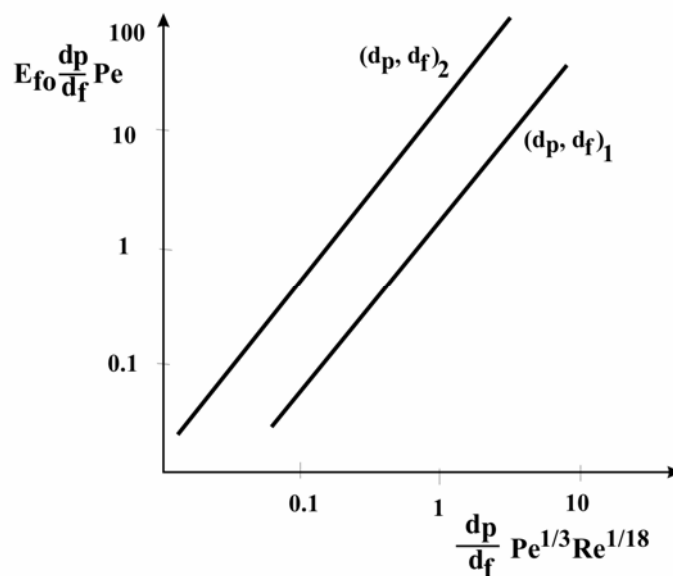
$$E_f \propto \text{Sc}^{-2/3} \text{Re}^{-1/18} \quad (6.74)$$

gde je: $Sc = \frac{\mu}{\rho \mathcal{D}}$, pri čemu je koeficijent difuzije definisan kao: $\mathcal{D} = \frac{CkT}{3\pi\mu d_p}$, gde je: T – apsolutna temperatura, C – Canningam-ov korekcionni faktor i k – Bolcman-ova konstanta $k=1.38 \cdot 10^{-23}$ J/K.

Slika. 6.36
Zavisnost kritič-
ne brzine vazdu-
ha od prečnika
vlakna i prečnika
čestice



Slika 6.37
Određivanje
efikasnosti filtra

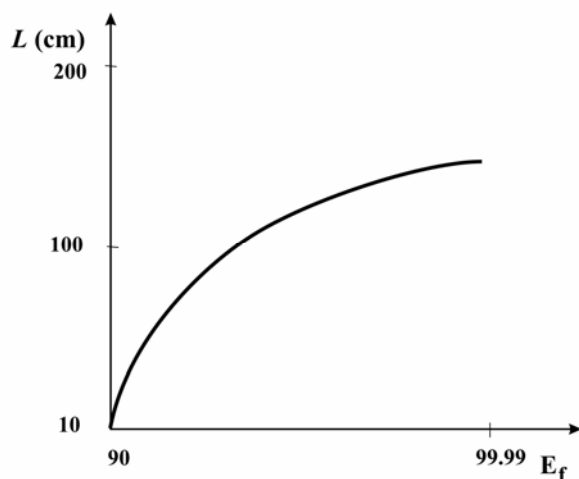


Ukupna efikasnost izdvajanja čestica u filtru je zbir efikasnosti izdvajanja svakog vlakna posebno, koja se izračunava pomoću sledeće zavisnosti:

$$E_{f0} \frac{d_p}{d_v} Pe = f \left(\frac{d_p}{d_v} Pe^{1/3} Re^{1/18} \right) \quad (6.75)$$

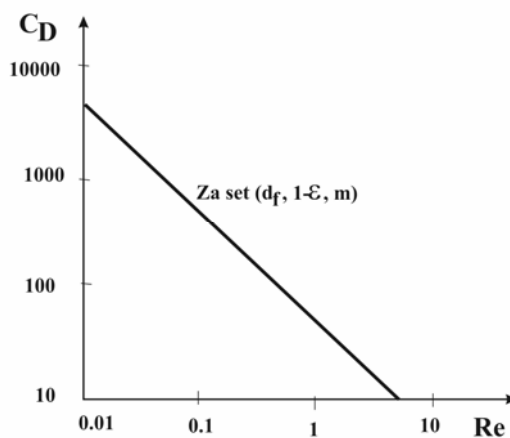
gde je: $Pe = Re \cdot Sc$. Grafički prikaz ove zavisnosti dat je na slici 6.37.

Za usvojenu vrednost ukupne efikasnosti celog filtra, debljina filtra se određuje iz zavisnosti debljine filtra od efikasnosti, koja je prikazana na slici 6.38.



Slika 6.38 Zavisnost efikasnosti filtracije od debljine filtra

Slika 6.39 Zavisnost koeficijenta trenja od Reynolds-ovog broja



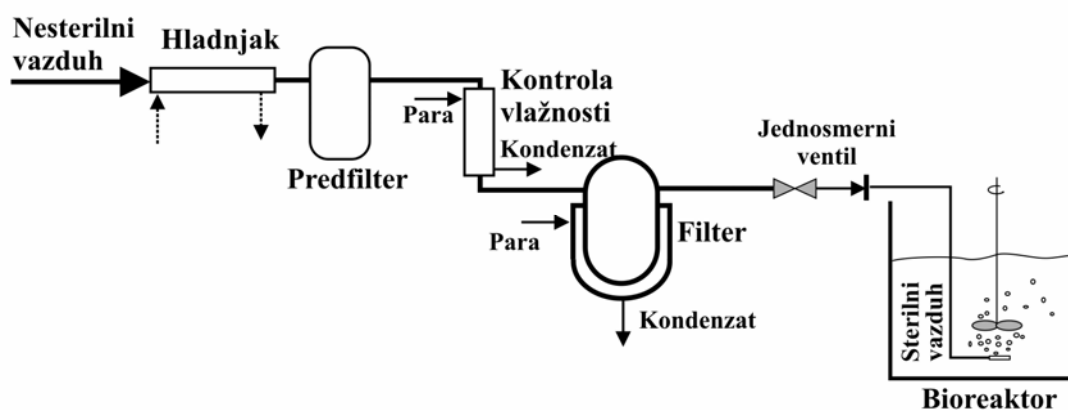
Pad pritiska na filtru za sterilizaciju se određuje iz koeficijenta trenja, koji je definisao Kimura:

$$C_D = \frac{\pi g d_v DP}{2 \rho L u_G^2 (1 - \varepsilon)^m} \quad (6.76)$$

pri čemu se za set vrednosti d_v , $(1 - \varepsilon)$ i m , može dobiti zavisnost koeficijenta trenja od Reynoldsovog broja, kao što je prikazano na slici 6.39.

Postrojenja za sterilizaciju vazduha

Svako postrojenje za sterilizaciju vazduha uključuje: predfilter, kondicioner za regulisanje vlažnosti vazduha i filter sa dubinskim slojem. Najčešći problem kod sterilizacije vazduha filtracijom je pojava kondenzata u vazdušnoj struji po izlasku iz kompresora. Ovaj kondenzat može dospeti u filter i izazvati loš rad filtra. Najbolje je, nakon kompresora, ugraditi hladnjak, kojim će se kondenzat izdvojiti iz struje vazduha. Na slici 6.40 šematski je prikazano postrojenje za sterilizaciju vazduha filtracijom.

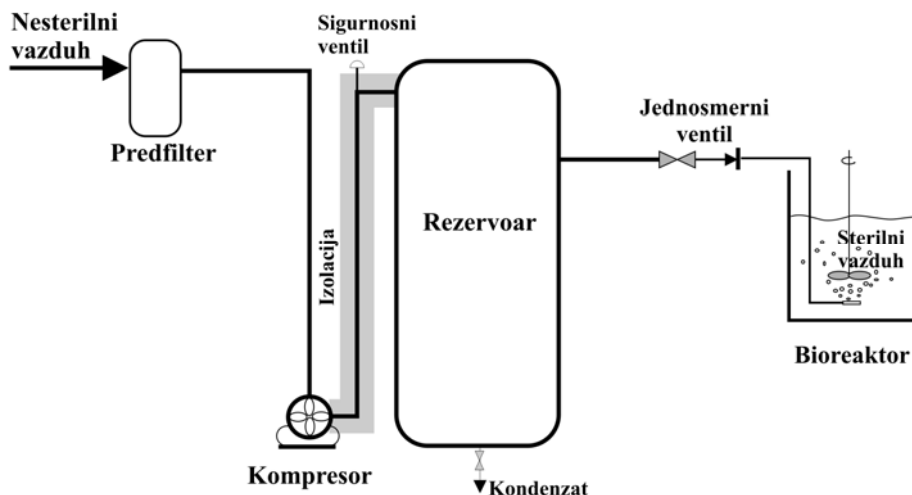


Slika 6.40 Šematski prikaz postrojenja za sterilizaciju vazduha filtracijom

6.3.7. Drugi načini sterilizacije vazduha

Sterilizacija toplotom. Veliki broj spora i bakterija je otporan na temperaturu i mogu biti inaktivisani samo pri dovoljno visokim temperaturama. Tako, spore bakterija u vazduhu mogu biti inaktivisane za 24 s na 218°C. Na povišenju temperature pri sabijanju vazduha bazira se sterilizator vazduha, koji je šematski prikazan na slici 6.41. Pri povišenju pritiska vazduha adijabatskom kompresijom njegova temperatura se diže na 150 do 220 °C, što zavisi od ulazne temperature vazduha. Na toj temperaturi, vazduh se zadržava potrebno vreme, da bi došlo do inaktivacije spora, a potom se odvodi u rezervoar, odakle se vrši aeracija bioreaktora. Ovakav sistem je sa uspehom upotrebljen u biosintezi acetona i butanola, amilaze i 2,3-butilen glikola. Ulazna i izlazna temperatura vazduha su bile 21 i 187 °C, pri izlaznom pritisku vazduha od 7 bar i protoku vazduha je bio od 0,1 do 3 m³/min.

Ovaj postupak sterilizacije je opterećen mnoštvom tehničkih problema koje treba rešiti, kako bi se kontinualno i efikasno odvijao, pre svega sa aspekta lokacije kompresora u odnosu na bioreaktor, dužine potrebnih cevi za transport sterilnog vazduha, obezbeđenja sterilnosti kod kontinualnog rada itd.



Slika 6.41 Šematski prikaz postrojenja za sterilizaciju vazduha toplotom

Ultraljubičasto zračenje. Poznato je da ultraljubičasto zračenje sa talasnim dužinama od 226,5 do 328,7 nm, veoma efikasno inaktivise mikroorganizme u vazduhu. Uspešno se sterilisu sobe u fabrikama i bolnicama, dok je problematično njegovo korišćenje za sterilizaciju vazduha koji se koristi u bioprocusu zbog visokih zahteva u pogledu kvaliteta vazduha.

Mikrobicidni sprejevi. Inaktivaciju mikroorganizama u vazduhu je moguće postići i korišćenjem sprejeva, koji sadrže određenu količinu mikrobicida, poput fenola, etilenoksida ili soli teških metala rastvorenih u vodi. Sterilizacija se obavlja rasprskavanjem u struju vazduha koji je prethodno kondicioniran. Na ovaj način se može postići zadovoljavajuća inaktivacija mikroorganizama. Veliki problem je uklanjanje ostataka mikrobicida iz vazduha pre njegove upotrebe. Zbog toga se ovaj postupak najčešće koristi za sterilizaciju vazduha u radnom prostoru u kome se obavlja proces koji zahteva sterilan rad, na primer, presejavanje proizvodnih kultura u laboratorijama.

6.3.8. Sterilizacija bioreaktora

Kada se hranljiva podloga sterilise u posebnom sudu ili kontinualnom sterilizatoru, bioreaktor se mora sterilisati pre nego što se počne sa dovođenjem sterilne hranljive podloge u njega. Svaki bioreaktor mora imati omotač ili zmijsasti razmenjivač toplote za zagrevanje bioreaktora. Istovremenim zagrevanjem bioreaktora i dovođenjem vodene pare u bioreaktor, on se sterilise. Vodena para se uvodi kroz sve otvore, izuzev kroz otvor za izlaz vazduha, kroz koji para napušta bioreaktor. Pritisak pare u sudu se drži oko 20 min na 2 bar. Na kraju se sterilan vazduh prodivava

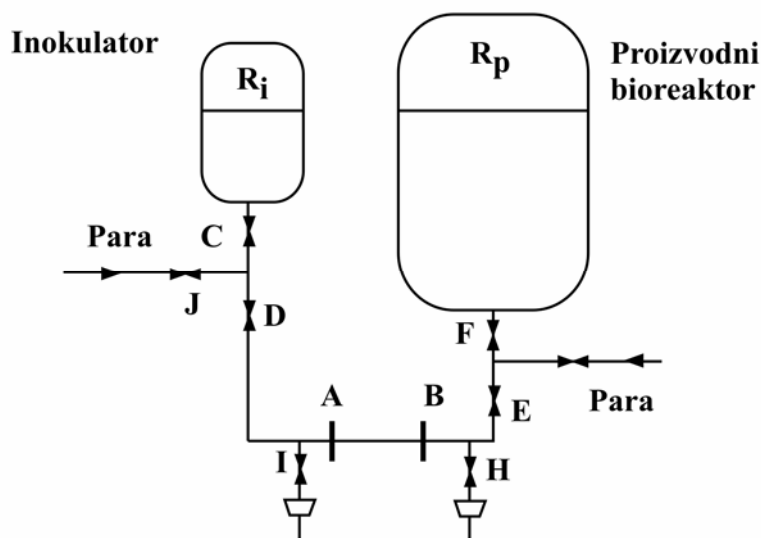
kroz bioreaktor uz održavanje nadpritiska, kako se u toku hlađenja ne bi stvorio vakuum koji bi usisao nesterilan vazduh.

Svi drugi priključci koji se nalaze na bioreaktoru (cevovodi, priključci za održavanje pH, dodavanje inokuluma, prihranjivanje) sterilišu se nezavisno od bioreaktora, primenom dvostrukih ventila, pa i tokom odvijanja bioprocesa u reaktoru.

6.3.9. Aseptično zasejavanje bioreaktora

Proizvodni bioreaktori se zasejavaju prenošenjem inokuluma iz pogonskog inokulatora, suda za suspenziju spora ili drugog proizvodnog bioreaktora. Da bi se sprečila kontaminacija za vreme zasejavanja, inokulum se prenosi pod pritiskom sterilnog vazduha iz suda u sud kroz cevovod, koji je prethodno sterilisan vodenom parom. U praksi se primenjuju različita konstruktivna rešenja za zasejavanje proizvodnih bioreaktora.

Osnovni uslov za aseptično dodavanje u bioreaktore je da se u dovodnim cevovodima postave ventili, koji omogućavaju sterilizaciju cevovoda vodenom parom, a da se bioproces u bioreaktoru ne prekida. Jedno rešenje za zasejavanje bioreaktora prikazano je na slici 6.42. Prvo se obavi sterilizacija proizvodnog bioreaktora i u njega unese sterilna hranjiva podloga na aseptičan način ili se hranljiva podloga steriliše u bioreaktoru, posle čega se hranljiva podloga mora ohladiti do temperature bioprocesa. Nakon toga se dva bioreaktora spoje fleksibilnim crevom *A–B*. Spoj bioreaktora se steriliše vodenom parom. Ventili *C* i *F* se zatvore, a otvore ventili: *D*, *I*, *H*, *E* i *G*. Pregrejana vodena para se uvodi preko ventila *G* i *J*, u toku 20 minuta.



Slika 6.42 Zasejavanje proizvodnog bioreaktora pogonskim inokulumom (oznake u tekstu)

Nakon toga se zatvore ventili *J*, *I*, *H* i *G*, a otvore ventili *C* i *F*. Inokulum iz bioreaktora inokulatora pod pritiskom sterilnog vazduha prebaci se u pogonski bioreaktor. Posle toga se zatvore ventili *C* i *F*, čime je zasejavanje završeno. Nakon zasejavanja, spoj bioreaktora se sterilise vodenom parom istim postupkom kojim je sterilisan pre zasejavanja.

Pored aseptičkog zasejavanja inokulumom, aseptično se moraju uzimati uzorci za kontrolu bioprocesa, pri dolivanju hranjive podloge u bioreaktor kod dolivnog postupka, dodavanju izvora makro- i mikroelemenata i dodavanju pomoćnih supstanci (antipenušavci, baze i kiseline za regulaciju pH i sl.).

6.4. PRIPREMA INOKULUMA PROIZVODNIH ORGANIZAMA

Pod pojmom *inokulum* (koristi se, takođe, nazivi: *starter kultura* i *polazna čista kultura*) podrazumeva se potrebna količina proizvodnog organizma kojom se zasejava hranljiva podloga u bioreaktoru za izvođenje bioprocesa. Kod bioprocesa koji se vode pomoću kultura biljnih ili animalnih ćelija, tkiva i organa pojam inokuluma je nešto složeniji.

Inokulum mora ispuniti niz strogih zahteva. Kada je u pitanju mikrobiološki inokulum, najvažniji zahtevi su:

- starter kultura ne sme biti kontaminirana drugim mikroorganizmima;
- proizvodni mikroorganizam mora biti u fiziološki aktivnom stanju i u pogodnom morfološkom obliku;
- proizvodni mikroorganizam mora zadržati vitalnost i proizvodnost u svim fazama bioprocesa;
- količina inokuluma mora imati toliki broj vitalnih ćelija da nakon zasejavanja u hranjivu podlogu zadovolji zahteve bioprocesa (obično $10^6 - 10^{12}$ ćelija/cm³).

6.4.1. Postupci pripreme inokuluma

Inokulum se priprema "oživljavanjem" i umnožavanjem osnovne kulture proizvodnog mikroorganizma koja se čuva u pogodnom obliku u pogonskoj laboratoriji. Postupak umnožavanja se izvodi u dve faze:

- proizvodnja laboratorijske čiste kulture i
- proizvodnja pogonske čiste kulture.

U obe faze umnožavanja sterilnost inokuluma mora se sačuvati. Umnožavanje proizvodnog mikroorganizma u svakoj od faza je specifično i može se bitno razlikovati. Iako svaki biotehnoški proces, tj. svaki inokulum, zahteva specifične uslove proizvodnje, načelno, postupak je zasnovan na istim principima.

Proizvodnja laboratorijske starter kulture

Postupak pripreme laboratorijskog inokuluma prikazan je na slici 6.43. Postupak počinje oživljavanjem kulture iz uzorka čiste kulture proizvodnog mikroorganizma. Način oživljavanja zavisi od oblika u kome se proizvodni organizam čuva. Najjednostavnije je oživljavanje proizvodnog organizma koji se čuva na podlozi sa agarom, a znatno je složenije ako se kultura čuva u liofilizovanom stanju. Bitno je da se sa sigurnošću zna da polazna kultura proizvodnog organizma nije inficirana ili da postoji sumnja da jeste inficirana. Ako postoji sumnja da je došlo do infekcije, za oživljavanje proizvodnog organizma mora se izvršiti selekcija jedne ćelije proizvodnog organizma postupkom izdvajanja i njenog daljeg umnožavanja.

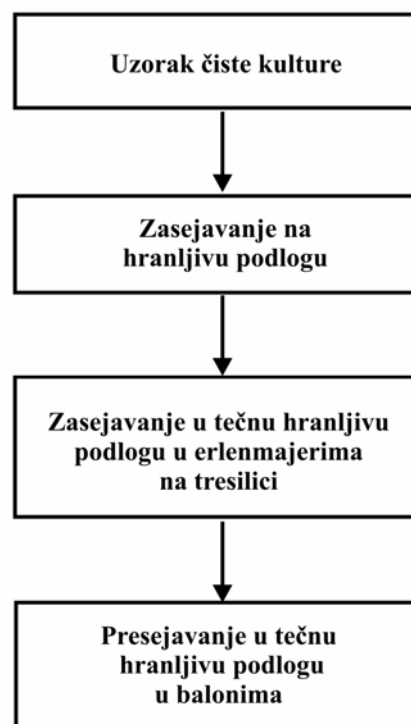
U svim fazama umnožavanja potrebno je ostvariti optimalne uslove rasta i razmnožavanja kulture, kako u pogledu sastava hranljive podloge tako i u pogledu uslova okoline. Umnožavanje kulture se vrši u uzastopno rastućim zapreminama laboratorijskih staklenih sudova. U cilju boljeg prenosa kiseonika laboratorijski sudovi se, stavljaju na mućkalicu u termostatoranoj prostoriji. Presejavanje kulture u fazama umnožavanja mora se vršiti pod strogo aseptičkim uslovima.

Ako je postupak dobijanja izveden korektno, laboratorijski inokulum je čista kultura, sa visokom fiziološkom aktivnošću. U tom obliku ona je pogodna za sledeću fazu umnožavanja, u pogonskom postrojenju za proizvodnju inokuluma.

Priprema pogonskog inokuluma

Dobijena količina laboratorijskog inokuluma, u principu, nije dovoljna za zasejavanje proizvodnog bioreaktora. Kod pogona malih kapaciteta (bioreaktori zapremine ne veće od nekoliko metara kubnih) za dobijanje specifičnih proizvoda, količina laboratorijskog inokuluma, može zadovoljiti potrebne proizvodne količine.

U pogonima velikog kapaciteta postoje postrojenja za dobijanje pogonskog inokuluma u količini koja zadovoljava potrebe zasejavanja jednog ili više pogonskih bioreaktora velikih zapremina (i više stotina metara kubnih). Ova postrojenja uključuju više sudova koji su po konstrukciji identični bioreaktorima. Najčešće su to tri bioreaktora od kojih prvi ima najmanju, a zadnji najve-



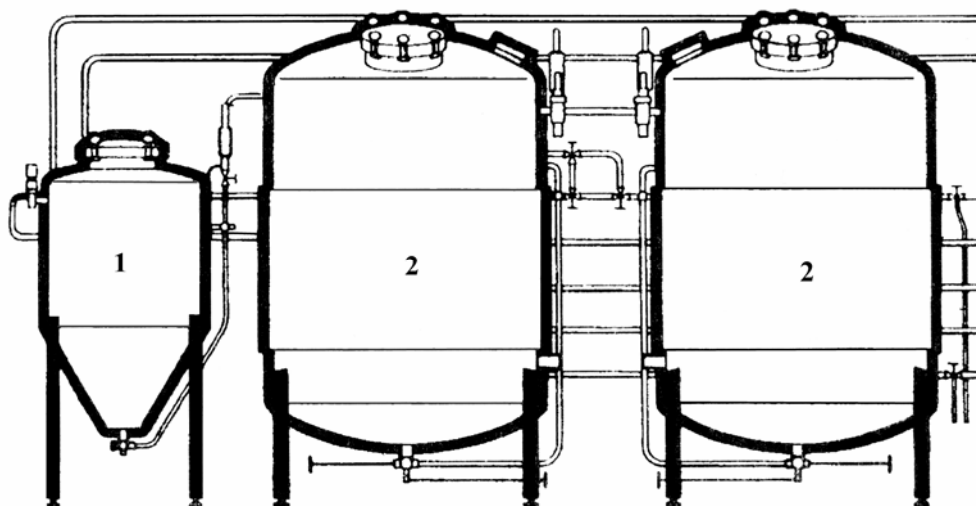
Slika 6.43 Šematski prikaz uobičajenog toka umnožavanja laboratorijskog inokuluma

ću zapreminu. Zapremina prvog bioreaktora obično je $100\text{--}150\text{ dm}^3$, a zadnjeg $10\text{--}20\text{ m}^3$, što zavisi od kapaciteta i broja pogonskih bioreaktora koje treba zasejati (slika 6.44).

Postrojenja za dobijanje pogonskog inokuluma mogu biti *šaržnog ili kontinualnog tipa*. Bez obzira na vrstu postrojenja, postupak pripreme inokuluma izvodi se uz poštovanje istih principa.

U laboratorijskim uslovima, u cilju što bržeg razmnožavanja, proizvodna kultura se gaji u sintetičkim hranjivim podlogama optimalnog sastava. Nasuprot tome, u preovlađujućem broju proizvodnih bioprocasa koriste se podloge pripremljene od prirodnih i jeftinijih sirovina. Samo u proizvodnji posebnih vrsta farmaceutika i hemikalija u pogonskim uslovima koriste se sintetičke hranljive podloge.

Ćelije mikroorganizama, naviknute na optimalan sastav sintetičke podloge u laboratorijskom umnožavanju, potrebno je, tokom umnožavanja, priviknuti na sastav pogonske hranljive podloge. Isto tako, ako se radi o *samozaštićenom bioprocasu* (niža pH vrednost podloge, kontrolisana aeracija, snižena ili povišena temperatura, smanjena aktivnost vode, dodavanje mikrobicidnih agenasa i sl.), proizvodna kultura se mora adaptirati i na proizvodne uslove.



Slika 6.44 Šema postrojenja za pripremu pogonskog inokuluma
1 – bioreaktor za zasejavanje, 2 – bioreaktor za umnožavanje

Umnožavanje pogonskog inokuluma se izvodi u više faza u kojima se postepeno podešavaju uslovi gajenja, koji su karakteristični za pogonske uslove. To se čini tako što se, u postrojenju za pripremu pogonskog inokuluma, sastav podloge i uslovi u bioreaktoru postepeno, iz bioreaktora u bioreaktor, menjaju, tako da se u zadnjem bioreaktoru koristi pogonska hranljiva podloga i uslovi.

Vreme umnožavanja u bioreaktorima iznosi između 24 i 48 časova. Prebacivanje sadržaja iz jednog u drugi bioreaktor obično se vrši pod pritiskom sterilnog vazduha zbog zahteva aseptičnosti.

Ako kapacitet ugrađenog postrojenja za pripremu pogonskog inokuluma sa jednom šaržom ne zadovoljava potrebe zasejavanja pogonskih bioreaktora ili ako se proces proizvodnje izvodi uzastopnim, pravilno ponavljanim ciklusima, mora se istom dinamikom umnožavati i pogonski inokulum. Jedan od načina je da se primeni postupak umnožavanja tzv. »sečenjem« sadržaja zadnjeg bioreaktora u potrojenju za pripremu pogonskog inokuluma. To se izvodi tako što se iz njega izuzmu 2/3 zapremine proizvedene kulture i njome izvrši zasejavanje proizvodnog bioreaktora. U bioreaktor sa preostalom 1/3 starter kulture dolije se hranljiva podloga radi ponovnog umnožavanja kulture. Ovaj postupak se ponavlja više puta, praktično sve dok se analizom ne utvrdi infekcija ili izmena osobina starter kulture.

Za umnožavanje starter kulture, naročito kod pogona velikog kapaciteta, koristi se i jedan od pogonskih bioreaktora. U ovom slučaju može se primeniti opisani postupak »sečenja«.

Kod kontinualnih proizvodnih bioprocasa, priprema inokuluma mora biti kontinualna.

Upotreba recirkulisanih kultura

U pojedinim biotehnologijama inokulum se koristi za pokretanje bioprocasa samo nakon dužih proizvodnih intervala. U međuvremenu se za zasejavanje bioreaktora koristi proizvodna kultura iz prethodnog proizvodnog ciklusa. Tipični primeri su proizvodnja piva i etanola. U ovim biotehnologijama cilj je proizvodnja etanola kao metabolita u, a u obe biotehnologije se kao proizvodni mikroorganizmi koriste specifični sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. U svakom proizvodnom ciklusu biomasa se uvećava za 2 do 4 puta.

Za svoj rast i razmnožavanje, proizvodna kultura koristi komponente hranljive podloge, što je sa aspekta proizvodnje metabolita čist gubitak. Tako, na primer, za svaku jedinicu novonastale biomase proizvodne kulture kvasca u proizvodnji piva ili etanola troši se u proseku dva puta veće količine hranljivih komponenti podloge. Da bi se taj gubitak umanjio i da bi se izbegla stalna priprema inokuluma, primenjeno je rešenje po kome se za zasejavanje u sledećem proizvodnom ciklusu koristi proizvodna kultura iz prethodnog ciklusa, koje inače ima u višku. Taj višak, koji je nastao umnožavanjem kulture tokom proizvodnog bioprocasa, isključuje se iz proizvodnje i koristi kao sporedni proizvod, a osnovni deo se recirkuliše u proizvodni proces.

Pošto tokom proizvodnog ciklusa može doći do infekcije i degenerativnih procesa u proizvodnoj kulturi, broj ciklusa recirkulacije je ograničen. Na primer, u proizvodnji piva on iznosi šest do devet recirkulacija (u praksi svaki povratni ciklus se naziva »generacija«). U *samozaštićenim bioprocasima*, kakva je, na primer, proizvodnja etanola, broj povratnih ciklusa je mnogo veći jer se u toj proizvodnji održava snižena vrednost pH, sredina je anaerobna i biosintezom nastaje etanol koji je bakteriostatik, pa je mogućnost infekcije značajno smanjena.

Da bi se izbeglo prenošenje infekcije u sledeći proizvodni ciklus, recirkulisana količina kulture se prethodno podvrgava prečišćavanju i aktivaciji. Za to se koriste postupci koji su pogodni za pojedine vrste mikroorganizama. Kod kvasaca se prvo njihova suspenzija prosejava kroz vibraciona sita veličine pora 0,1 do 0,2 mm, radi uklanjanja ćelijskih i proteinskih agregata. Nakon toga se obavlja sterilizacija pranjem povratne kulture rastvorom kiseline (obično sumporne, ali je bolja fosforna kiselina), jer su su kvasci tolerantni na niske vrednosti pH (ispod pH 2). Dejstvom niskih vrednosti pH (između 1 do 2) inaktivišu se infektivni mikroorganizmi, naročito bakterije, kao i fi-

ziološki oslabljene ćelije proizvodnog mikroorganizma. Nakon pranja kiselinom u trajanju 30 do 60 minuta, vrši se ispiranje vodom. Ovako tretirana kultura se može aktivirati u hranjivoj podlozi bogatoj nuterijentima, posebno vitaminima i mikroelementima, i služi za zasejavanje u sledećem proizvodnom ciklusu.

7. IZVOĐENJE BIOPROCESA

7.1. TEHNIKE IZVOĐENJA BIOPROCESA

Bioprocеси su višefazni reakcioni sistemi u kojima učestvuju čvrsta (mikroorganizam, čvrsta hranljiva podloga, suspendovane čvrste čestice), tečna (tečna hranljiva podloga) i gasovita (vazduh i gasoviti proizvodi metabolizma – CO_2) faza. Ovo je pojednostavljen mehanistički pristup, jer su bioprocеси veoma složeni sistemi. Optimalni uslovi za rast, sintezu biomase i željenih metabolita, kao proizvoda bioprocеса, zahtevaju strogo definisane uslove koji se ostvaruju u bioreaktorima.

Tehnike gajenja mikroorganizama razlikuju se prema vrsti i strukturi hranljive podloge. Najčešće se primenjuju tri osnovne tehnike (slika 7.1):

- dubinsko (submerzno) gajenje,
- površinsko (emerzno) gajenje i
- gajenje na polučvrstim ili čvrstim hranljivim podlogama.



Slika 7.1 Najčešći načini izvođenja bioprocеса

Dubinsko gajenje označava mikrobni rast u tečnoj hranljivoj podlozi, koja se meša i u koju se u slučaju aerobnog procesa uduvava vazduh. Ono danas ima najveću primenu u industrijskim

bioprocima. Pri dubinskom gajenju mikroorganizama, pošto se proizvodni uslovi mogu precizno kontrolisati i regulisati u čitavoj zapremini bioreaktora, brzina nastajanja proizvoda je i do 20 puta veća nego pri površinskom gajenju i do 5 puta veća nego u kapajućem (»trickle bed«) bioreaktoru.

Površinsko gajenje podrazumeva mikrobni rast na površini tečne hranljive podloge u plitkim sudovima (tavama) ili na površini čvrstih nosača preko kojih se hranljiva podloga sliva u tankom sloju. Prinos je obično visok, a najznačajniji procesi su vezani za dobijanje limunske i sirćetne kiseline, *koji*-a i prečišćavanje otpadnih voda.

Gajenje na čvrstim i polučvrstim hranljivim podlogama podrazumeva rast mikroorganizma na čvrstoj podlozi bez slobodne vode. Voda se nalazi apsorbirana ili vezana u kompleksnom obliku unutar čvrstog nosača. Ovaj metod je široko rasprostranjen u Japanu, gde se primenjuju pri dobijanju pirinčanog vina (sake), sojinog umaka (shoyu) i sojinog sira (miso), kao i hidrolitičkih enzima amilaza, proteaza i celulaza. U Evropi se ovako dobijaju neki delikatesni sirevi i vrši silirana krmiva, kao i prerada otpadaka u cilju dobijanja komposta i biogasa.

Prednosti tehnike gajenja na čvrstim hranljivim podlogama su:

- mogu se koristiti i podloge nerastvorne u vodi,
- nema slobodne vode, pa količina otpadne vode nije velika,
- obično filtracija nije potrebna, jer je proizvod koncentrisan na supstratu,
- lako sušenje proizvoda usled male vlažnosti,
- dobijeni enzimi su jako stabilni i
- smanjuje se mogućnost bakterijske kontaminacije.

Nedostaci tehnike gajenja na čvrstim nosačima su:

- ograničenje na vrste mikroorganizama koje rastu u uslovima niske vlažnosti (plesni, neki kvasci, streptomicete),
- mogućnost kontaminacije neželjenim plesnima,
- konstrukcija bioreaktora je složenija,
- prenos mase i toplote je teže regulisati i
- teža je kontrola i regulacija procesa.

7.2. PRAĆENJE BIOPROCESA

Analitičkim praćenjem bioprocisa dobijaju se podaci koji pokazuju da li je tok bioprocisa u skladu sa tehnološki postavljenim vrednostima ili dolazi do promena koje zahtevaju korektivne mere. Od tačnosti dobijenih podataka o toku procesa i preduzetih korektivnih mera zavisi uspešnost bioprocisa u pogledu prinosa i kvaliteta proizvoda. Postoji više razloga za praćenje toka bioprocisa, ali su najvažniji sledeći:

- provera da li se bioprocis odvija kao što tehnološki postupak određuje,
- neophodnost da se procesni parametri podešavaju,
- direktno izračunavanje nemerljivih parametara bioprocisa,

- donošenje odluke o prekidu bioprocesa i
- prikupljanje podataka za iskustveno unapređenje procesa.

Uspešno praćenje bioprocesa podrazumeva da:

- vrednosti procesnih parametara moraju da budu poznate i na optimalnim nivoima u svakom trenutku i
- analiza informacija o toku bioprocesa, tj. o aktuelnim i optimalnim vrednostima procesnih parametara, mora da se vrši neprekidno.

Za praćenje toka bioprocesa koriste se analitički metodi i merni instrumenti. Analitičkim metodima, gde spadaju različiti fizički, hemijski, fizičko-hemijski i biohemijski metodi, analizira se sastav hranljive podloge i biomase. Za praćenje toka bioprocesa koriste se merni instrumenti kojima se kontinualno mere parametri bioprocesa.

7.2.1. Analitički metodi za praćenje bioprocesa

U toku odvijanja bioprocesa analitički se prate biomasa, hranljiva podloga i procesni parametri.

Praćenje biomase. Osnovni metodi za praćenje biomase dati su u tabeli 7.1. Veliki problem pri analizi biomase je prisustvo čvrstih supstanci iz hranljive podloge. Ako je sadržaj tih supstanci znatan, nefelometrijsko određivanje je nesigurno. U tom slučaju, za određivanje se primenjuje metod zasejavanja, koji je veoma pouzdan, ali i spor. Često se koristi metod centrifugalnog određivanja zapremine biomase u jedinici zapremine hranljive podloge, koji je brži, ali manje pouzdan.

Tabela 7.1 Osnovni analitički metodi za praćenje biomase

<i>Vrsta određivanja</i>	<i>Način merenja</i>
Količina	U podlozi fotometrijski, određivanje suve supstance ili zapremine biomase, određivanje sadržaja proteina, fosfata, diaminopimeleninske kiseline ili druge karakteristične veličine
Kvalitet	Određivanje ATP ili karakteristične enzimске aktivnosti
Morfologija ili stabilnost	Mikroskopiranje nativnog preparata, zasejavanje na čvrstu podlogu i praćenje toka rasta i morfologije mikroskopom
Kontaminacija	Mikroskopiranje, zasejavanje na selektivne podloge, tehnika membranske filtracije

Prateće čvrste supstance predstavljaju još veću smetnju za određivanje hemijskog sastava i aktivnosti biomase. Višestrukim pranjem biomase pogodnim puferima može se znatno smanjiti količina pratećih supstanci i time doprineti tačnosti određivanja.

Od metoda za praćenje aktivnosti biomase najpogodnija je respirometrija, ali je ona složena i dugotrajna.

Praćenje sastava hranljive podloge. Osnovni metodi za analitičko praćenje sastava hranljive podloge dati su u tabeli 7.2. Veliki problem za analitičko praćenje sastava hranljive podloge u toku bioprocesa je njena heterogenost. Hranljiva podloga u toku bioprocesa sadrži tri faze: tečnu,

čvrstu i gasovitu. Za svaku od faza primenjuju se specifični postupci, pa se za precizno određivanje one mogu razdvojiti.

Tabela 7.2 Analitički metodi za praćenje promena u hranljivoj podlozi

<i>Vrsta određivanja</i>	<i>Način merenja</i>
Ugljeni hidrati Proteini Peptidi Aminokiseline Vitamini Ugljovodonici Mineralne soli Prekursori Antipenušavci	Hemijski, biohemijski ili enzimski i fizičke metode
Proizvodi i međuproizvodi	Hemijski, biohemijski ili enzimski i fizički metode, biološka aktivnost
Gasovi: O ₂ i CO ₂ u tečnoj i gasovitoj fazi	Odgovarajućim elektrodama
Sterilnost	Zasejavanje na selektivne podloge ili membranska filtracija

Praćenje procesnih parametara. Pregled metoda za analitičko praćenje procesnih parametara dat je u tabeli 7.3. Ovo praćenje se mora obavljati kontinualno u samom bioreaktoru. Za praćenje nastajanja metabolita u bioprocesu najuspešniji su biosenzori, koji se u poslednje vreme intenzivno razvijaju. Može se očekivati da će u skoroj budućnosti problem praćenja bioprocesa biti uspešno rešen.

Tabela 7.3 Analitički metodi za praćenje procesnih parametara

<i>Vrsta merenja</i>	<i>Način merenja</i>
Temperatura	Kontaktne termometri, bimetalni, gasni termometri
Protok gasa	Rotametri
Potrošnja snage	Dinamometar, vatmetar
Broj obrtaja mešalice	Tahometar
pH	Elektroda
Potrošnja sastojaka podloge	Biosenzori
Nivo tečnosti i visina pene	Kontaktne elektrode postavljene na više nivoa
Pritisak i analiza gasa	Manometri, analizatori gasa
Rastvoreni O ₂	Kiseonična elektroda
Viskozitet	Viskozimetri

7.2.2. Vođenje dokumentacije o praćenju bioprocesa

Analitički podaci imaju višestruku namenu: za kontrolu i korekciju procesnih parametara, za iskustveni razvoj bioprocesa i za dokumentaciju na osnovu koje se prati ispravnost vođenja bioprocesa. Standardno se vode dve vrste dokumenata o praćenju bioprocesa:

(a) **Protokol** o bioprocusu, tj. radna lista u koju se beleže sva zbivanja tokom vođenja određene šarže: vrednosti merenih procesnih parametara i obavljeni poslovi u cilju bilo koje intervencije u toku procesa.

(b) **Grafička dokumentacija** o bioprocusu sadrži grafički prikaz analitičkih vrednosti merenih procesnih parametara. Ovaj prikaz je veoma koristan, jer se iz njega može videti kako su tekle pojedine faze procesa i da li je bilo odstupanja.

Uočena odstupanja od normalnog toka bioprocusa u određenoj fazi koristan su podatak za planiranje sledećih šarži i za intervencije u cilju optimizacije bioprocusa.

7.2.3. Merni instrumenati

Pri praćenju bioprocusa pomoću mernih instrumenata javljaju se dva osnovna problema:

- samo mali broj mernih instrumenata može se pouzdano koristiti u direktnom kontaktu s hranljivom podlogom ("on line") i
- većina mernih instrumenata ne može da se sterilise u bioreaktoru na povišenoj temperaturi.

Komponente mernih instrumenata

Da bi merenje parametara procesa bilo moguće u "realnom" vremenu, merni instrument mora da ima najmanje sledeće četiri komponente: osetni element, pojačivač, predajnik i analizator.

Osetni element (senzor, detektor) je direktno vezan s procesom i daje informaciju o nekom parametru procesa. Merna veličina pretvara se pomoću *pretvarača* najčešće u električni signal (struja ili napon). U bioprocusima senzori se primenjuju na jedan od sledeća tri načina: u hranljivoj podlozi u bioreaktoru, u uzorcima (kontinualnim ili periodičnim) hranljive podloge i bez direktnog kontakta sa hranljivom podlogom. Senzori koji su u direktnom kontaktu sa hranljivom podlogom moraju biti sterilizabilni toplotom, a mora se, takođe, sprečiti kontaminacija hranljive podloge na mestu ulaza senzora u hranljivu podlogu (na primer, pomoću prstenova od elastomera između metalnog kućišta i senzora).

Električni signal iz senzora je veoma slab po intenzitetu struje ili napona i obično je praćen šumom, što otežava njegovu obradu. Da bi se obezbedila visoka tačnost i mali šum, signal se kondicionira pomoću elektronskog pojačivača, kojim se intenzitet signala pojačava, i filtra za niske frekvencije, kojim se prigušuje šum. Kondicionirani signal se zatim prenosi *predajnikom* do *analizatora*, koji konvertuje dobijeni signal u prepoznatljiv oblik, na primer, u pH jedinice.

Podela mernih instrumenata za praćenje bioprocusa

Merni instrumenti za praćenje bioprocusa mogu se podeliti u tri osnovne grupe: „*off-line*”, „*on-line*” i „*in-line*”.

„*Off-line*” merni instrumenti zahtevaju da se iz hranljive podloge uzimaju uzorci u regularnim vremenskim intervalima za kasniju analizu. Većina parametara bioprocusa može se pratiti samo „*off-line*” metodima. Ovi metodi uključuju, na primer, hemijske analize sastava hranljive podloge i suve biomase proizvodnog organizma, kao i upotrebu specijalnih mernih aparata. Pošto „*off-line*” metodi najčešće traju isuviše dugo (više sati, a nekad i više dana), oni se ne mogu koristiti za automatsku kontrolu procesa.

„*On-line*” merni instrumenti zasnivaju se na kontinualnom uzimanju uzoraka iz procesnih struja, koji se zatim analiziraju. Izmerena vrednost nije odmah raspoloživa za kontrolu procesa, ali je trajanje uzorkovanja i analize dovoljno kratko da se "on-line" merni instrumenti mogu uključiti u sisteme za kontrolu procesa. Tipičan primer "on-line" mernog instrumenta je analizator sastava gasne struje koja napušta bioreaktor. U ovom slučaju, deo izlazne gasne struje odvaja se kontinualno, a zatim podvrgava gasnoj analizi pomoću, na primer, masenog spektrometra ili gasnog hromatografa.

„*In-line*” merni instrumenti uključuju merne instrumente (elektrode, senzore) koji su u direktnom kontaktu sa hranljivom podlogom. Na ovaj način dobija se kontinualan i brz signal koji je direktno upotrebljiv za kontrolu procesa. U ovu grupu spadaju instrumenti za merenje temperature, pritiska, pH, rastvorenog kiseonika i dr. Za kontrolu bioprocesa koriste se uglavnom „in-line” merni instrumenti.

Pouzdanost primene mernog instrumenta zavisi od njegovih karakteristika, kao što su: vremenska konstanta, osetljivost, linearnost, tačnost, odstupanje, rezolucija, greška i reproduktivnost. Značenje nabrojanih karakteristika objašnjeno je u tabeli 7.4. Značajna prednost je ako je merni instrument otporan na povišenu temperaturu, tako da može da se sterilise toplotom.

Tabela 7.4 Karakteristike mernih instrumenata

<i>Karakteristika</i>	<i>Značenje</i>	<i>Napomena</i>
Vremenska konstanta	Vreme potrebno da odziv instrumenta (izlazni signal) dostigne 90% od krajnje vrednosti posle stepenaste promene veličine	Poželjno je da bude najviše do 10% od generacijskog vremena mikroorganizma
Osetljivost	Promena izlaznog signala u odnosu na promenu merene veličine	Što veća, da bi male promene merene veličine bile merljive
Linearnost	Da li je zavisnost između izlaznog signala i merene veličine linearna	Poželjna zbog jednostavne kalibracije
Stabilnost	Odnos između izlaznog signala i šuma	Poželjno je da je što veća (>10)
Rezolucija	Najmanja merljiva vrednost promene merene veličine	Obično se izražava u odnosu na puni otklon skale
Greška	Odstupanje izlaznog signala od prave vrednosti merene veličine kad se drži konstantnom	Otklanja se rekalkulacijom
Reproduktivnost	Odstupanje izlaznog signala od prave vrednosti pri ponovljenim merenjima	Održava se redovnom kalibracijom

7.2.4. Merenja u biotehnologiji

1) Fizička merenja

U tabeli 7.5 nabrojana su fizička merenja koja se najčešće koriste za praćenje toka bioprocesa.

Merenje temperature. Merenje temperature u toku bioprocesa je od velikog praktičnog značaja, jer se toplota lako prenosi kroz ćelijski zid i utiče na intraćelijski metabolizam. Pošto

mikroorganizmi nisu efikasni u konverziji supstrata, odnosno značajan deo energije se gubi kao toplota, bitno je merenje temperature na pogodnim mestima u bioreaktoru. Za merenje temperature mogu se koristiti različiti termometri, ali se preporučuju otporni termometri. Oni se zasnivaju na vezi električne otpornosti metalnog mernog otpornika od temperature. Iz izmerene vrednosti električne otpornosti izračunava se temperatura sredine u kojoj se nalazi merni otpornik. Za merenje električne otpornosti mernog otpornika koristi se metod Wheatston-ovog mosta s napajanjem električnog kola jednosmernom strujom. Najčešće se koristi platinski merni otpornik Pt-100. Merni otpornik je smešten u zaštitnoj cevi. Kalibracija se sastoji u podešavanju otpora termootpornog elementa na $100\ \Omega$ na $0\ ^\circ\text{C}$.

Tabela 7.5 Najznačajnija merenja fizičkih veličina u biotehnologiji

<i>Procesna promenljiva</i>	<i>Merni instrument</i>	<i>Napomena</i>
Temperatura	Termootporni termometar Termistor Termopar	On-line, verovatno najbolji način merenja Ne preporučuje se
Pritisak	Pretvarač pritiska sa membranom	On-line Bez problema
Zapremina ili masa tečnosti u bioreaktoru	Diferencijalni pretvarač pritiska Merne trake	Mogući problemi pri sterilizaciji Najbolji način, ali može biti preskup
Protok gasa	Rotametar Toplotni merač protoka	Jednostavan Primenljiv za automatsku kontrolu
Protok tečnosti	Promena težine Magnetski merači Turbinski merači	PolupROTOČNI procesi Sterilizabilni
Brzina obrtanja	Merač učestalosti Tahometar	Najprecizniji Manje pouzdan
Potrošnja snage	Vatmetar Dinamometar Merne trake	Meri ukupnu snagu Složeno merenje Mere snagu mešanja
Mutnoća (turbidnost)	Spektrofotometar Optička ćelija	Off-line merenje Sterilizabilna, on-line merenje
Viskozitet	Viskozimetri	Off-line merenje
Provodljivost	Elektrode (katoda i anoda)	Jednostavno merenje
Pena	Dve elektrode za merenje provodljivosti	Teža primena u malim bioreaktorima

Merenje pritiska. Merenje pritiska u biotehnologiji je važno iz više razloga. Hidrostatički pritisak u bioreaktoru utiče na rastvorljivost gasova (CO_2 , O_2) i isparljivih jedinjenja (alkoholi).

Nadpritisak u gasnom prostoru iznad hranljive podloge pomaže održavanju sterilnih uslova, a značajan je i u toku sterilizacije hranljive podloge. Merenje pritiska u cevovodima za vazduh, paru i vodu je bitno za ispravno funkcionisanje proizvodnog postrojenja.

Za merenje pritiska mogu se koristiti manometri, kao indikatori, i pretvarači pritiska. Na nesterilnim mestima, i ako se ne zahtevaju precizna merenja pritiska, mogu se koristiti Burdonovi manometri. Na sterilnim mestima koriste se membranski manometri. Membrana (dijafragma) odvaja merač pritiska od nesterilne okoline. Obično se membrana postavlja direktno na merni element (merač deformacije ili piezootporni element) koji se nalazi u Wheatston-ovom mostu.

Merenje zapremine i mase tečnosti u bioreaktoru. Merenje zapremine tečnosti je bitno za postavljanje masenog bilansa tečnosti i sprečavanje prelivanja iz bioreaktora i rezervoara. Od posebnog je značaja za semikontinualne i kontinualne bioprocese. Za merenje zapremine tečnosti mogu se primeniti tri vrste merenja:

- merenje nivoa tečnosti,
- merenje mase tečnosti i
- merenje diferencijalnog pritiska.

Merenje mase je najpouzdaniji i najprecizniji metod u slučaju malih i sudova srednje veličine. Sud se postavlja na mehaničku vagu ili na mernu ćeliju za merenje opterećenja. U prvom slučaju, najpre se meri prazan sud, čija se masa zatim oduzima od mase suda s tečnošću. U slučaju mernih ćelija sila težine suda izaziva mikrodeformacije u ćeliji koje se mere piezootpornim elementom. Za merenje zapremine tečnosti u velikim sudovima preporučuju se diferencijalni manometri koji mere razliku pritiska na vrhu i dnu suda. Iz razlike pritiska može se izračunati visina stuba tečnosti, a iz nje zapremina tečnosti.

Merenje protoka gasa. Najvažnija merenja protoka gasa su na ulazu u bioreaktor i u vodovima koji vode ka gasnim analizatorima. Merenje protoka gasa vrši se na nesterilnim mestima, pošto se sterilizacija filtracijom obično obavlja nizvodno od merača protoka. Za merenje protoka gasa najčešće se koriste rotametri i toplotni merači protoka.

Rotametri su prihvatljivi za merenje protoka gasa kada električni signal za kontrolu protoka nije potreban. Merenje protoka gasa pomoću rotametra nije dovoljno precizno za fine maseno-bilansne proračune. Ako se pritisak u gasovodu menja, konstantan protok gasa održava se pomoću kontrolnog ventila. Očitana vrednost protoka gasa mora se korigovati, ako postoji razlika između pritiska gasa i pritiska na kome je obavljena kalibracija rotametra (obično atmosferski). Korekcija se vrši pomoću sledeće jednačine:

$$Q_{G,s} = Q_{G,o} \left(\frac{P_s}{P_k} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (7.1)$$

gde je: $Q_{G,s}$ – pravi protok gasa na pritisku kalibracije, $Q_{G,o}$ – protok gasa očit na rotametu, P_s – stvarni apsolutni pritisak u rotametu i P_k – apsolutni pritisak kalibracije.

Toplotni merači masenog protoka koriste se za precizna merenja protoka gasa i kad je potreban električni signal za kontrolu protoka. Ovaj način merenja se naročito koristi u slučaju malih bioreaktora. Merenje protoka gasa je gotovo nezavisno od promene temperature i pritiska. Princip rada toplotnih merača protoka sastoji se u sledećem. Gas protiče kroz cev koja se zagreva,

a dva termometra mere temperaturu gasa na ulazu i izlazu grejne cevi. Termometri su elementi Wheatston-ovog mosta, koji omogućuje da se razlika temperatura konvertuje u maseni protok gasa. Cev koja se zagreva postavlja u paralelnom vodu u odnosu na glavni gasovod.

Merenje protoka tečnosti. Merenje protoka tečnosti je bitno za kontinualne i semikontinualne procese. Takođe, ovo merenje je bitno za održavanje pH i razbijanje pene dodatkom antipenušavca. Za merenje protoka mogu se koristiti raznovrsni merači protoka, kao što su: rotametri, prigušnice, turbinski merači, elektromagnetni itd. Izbor merača protoka zavisi od namene i uslova rada.

Merenje brzine obrtanja mešalice i snage mešanja. Merenje brzine obrtanja mešalice i snage mešanja značajno je za obezbeđivanje adekvatnih uslova mešanja i prenosa mase kiseonika, kao i za proračun utroška energije. Brzina obrtanja mešalice se jednostavnije i preciznije meri od snage mešanja. Brzina obrtanja mešalice se obično meri direktno na vratilu mešalice pomoću tahometra. Snaga mešanja se najčešće meri vatmetrima, dinamometrima i mernim trakama.

Ukupna potrošnja snage zbog obrtanja mešalice u tečnosti meri se pomoću vatmetra koji je vezan za pogonski elektromotor. Ovako izmerena snaga služi za izračunavanje troškova rada i indikaciju snage koju mešalice predaje tečnosti. Ukupna snaga uključuje snagu koju mešalice predaje tečnosti i gubitke snage između elektromotora i mešalice (na primer, zbog trenja u ležićima). U industrijskim bioreaktorima je snaga mešanja veća od frikcionih gubitaka, ali to nije slučaj u malim i srednjim bioreaktorima. Obično se frikcionih gubitke snage mere pri obrtanju mešalice u vazduhu istom brzinom kao u tečnosti. Snaga mešanja se onda može izračunati kao razlika između potrošnje snage „opterećenog” (kad se mešalice obrće u tečnosti) i „neopterećenog” (kad se mešalice obrće u vazduhu) elektromotora pri istoj brzini obrtanja mešalice.

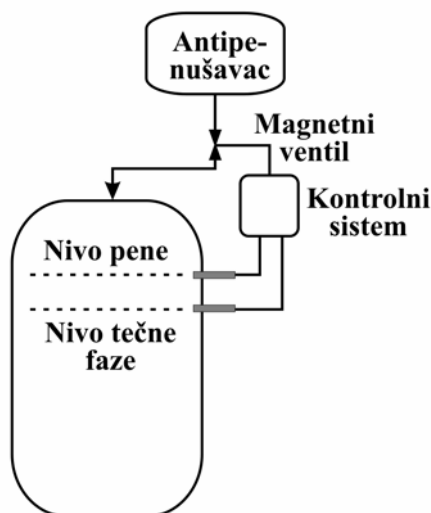
Dinamometri i merne trake koriste se u laboratorijskim i poluindustrijskim bioreaktorima. Jednostavan dinamometar se pravi montiranjem motora u dva opterećena ležišta na vratilu mešalice. Utrošak snage izračunava se iz momenta uvijanja, kojim se sprečava da se motor okreće prilikom rada. Ovako izmereni utrošak snage uključuje frikzione gubitke, pa se od njega mora oduzeti utrošak snage „neopterećenog” motora. Mernim trakama meri se direktno snaga mešanja, tj. utrošak snage bez frikcionih gubitaka. Četiri merne trake se postavljaju na vratilu mešalice pod uglom od 45° (jer su tada najveća naprezanja mernih traka). Merne trake su elementi Wheatston-ovog mosta, koji obezbeđuje da električni signal bude proporcionalan momentu uvijanja, odnosno naponu smicanja koji trpe merne trake pri obrtanju mešalice. Množenjem izmerene vrednosti momenta uvijanja sa ugaonom brzinom mešalice dobija se vrednost snage mešanja.

Određivanje nivoa pene. Najjednostavniji sistem za otkrivanje pene (slika 7.2) sastoji se od dve elektrode (izolovana žica od nerđajućeg čelika). Jedna elektroda je uronjena u hranljivu podlogu ili je montirana na metalni deo bioreaktora koji je u kontaktu sa hranljivom podlogom. Druga elektroda otkriva nivo pene u bioreaktoru. Kad pena dotakne nivo elektrode, zatvara se strujno kolo i električni signal se šalje kontrolnom sistemu, da bi se antipenušavac dodao u bioreaktor pomoću pumpe (u malim bioreaktorima) ili pneumatski (u velikim bioreaktorima). Antipenušavac obara penu, pa se električno kolo prekida. Važno je da se u bioreaktor doda minimalno potrebna količina antipenušavca, da bi se izbegli nepovoljni efekti kao što su smanjenje brzine prenosa mase kiseonika.

Merenje optičke gustine. Merenjem optičke gustine (turbidnosti) u hranljivoj podlozi prati se rast populacije proizvodnog mikroorganizma. Ono se zasniva na merenju intenziteta propuštene

svetlosti, tj. „mutnoće“ hranljive podloge zbog prisustva mikrobnih ćelija koje reflektuju svetlost. U ove svrhe koriste se komercijalni spektrofotometri i specijalne sterilizabilne optičke ćelije. Zavisnost između optičke gustine hranljive podloge i koncentracije (broja) mikrobnih ćelija je linearna samo pri malim koncentracijama. Metod je ograničen na bioprocese sa kvascima i bakterijama.

Merenje viskoziteta. Merenje viskoziteta je značajno za karakterisanje reoloških osobina hranljivih podloga. Preporučuje se da se ova merenja obavljaju na uzorcima hranljive podloge pomoću viskozimetra. Najpogodniji su viskozimetri sa impelerom. Viskozimetri obezbeđuju merenje napona smicanja pri različitim brzinama smicanja.



Slika 7.2 Šematski prikaz uređaja za kontrolu nastajanja pene u bioreaktoru dodatkom antipenušavca

2) Fizičko-hemijska merenja

Najznačajnija fizičko-hemijska merenja u biotehnologiji navedena su tabeli 7.6.

Merenje pH. Za merenje pH hranljive podloge najčešće se koriste sterilizabilne kombinovane pH elektrode, koju čine staklena (odgovara aktivnosti vodonikovih jona) i referentna ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{rastvor KCl}$) elektroda (slika 7.3). pH elektroda je povezana sa hranljivom podlogom preko malog poroznog čepa na bočnoj strani elektrode. Elektrolit u elektrodi mora biti pod natpiskom u odnosu na hranljivu podlogu, da bi se sprečilo njeno prodiranje u elektrodu kroz porozni čepić.

Ako se bioreaktor sterilise *in situ*, onda se pH elektroda smešta u zaštitno kućište, koje je štiti od povišenog pritiska za vreme sterilizacije. pH elektroda može se više puta sterilisati (više od 100 puta na 121°C). S vremena na vreme staklena elektroda se dopunjuje "rastvorom elektrolita" (koncentrovan ili zasićen rastvor KCl), da bi se nadoknadio gubitak kroz porozni čepić.

Tabela 7.6 Najznačajnije fizičko-hemijske metode koje se koriste u biotehnologiji

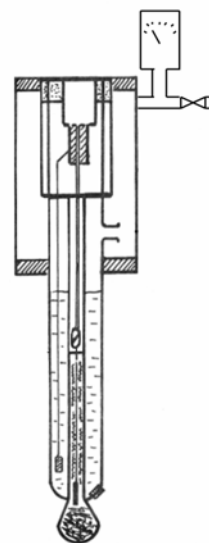
<i>Procesna promenljiva</i>	<i>Merni instrument</i>	<i>Napomena</i>
pH	pH-elektroda	"On-line". Sterilizabilna Osetljiva na toplotu
Kiseonik, rastvoren	Kiseonična elektroda	"On-line". Sterilizabilna. Obavezna kalibracija u uslovima primene
Redoks potencijal	Redoks elektroda	Sterilizabilna. Objašnjenje rezultata teško
Ugljendioksid, rastvoren	Ugljendioksidna elektroda	Sterilizabilna. Logaritamski odziv
Joni (NH_4^+ , Na^+ , Mg^{2+} itd.)	Jon-selektivne elektrode	Nisu sterilizabilne. Nisu primenljive u oblasti pH interesantnoj za biotehnologiju
Analiza gasa na izlazu iz bioreaktora	Paramagnetski analizator IR analizator Gasna hromatografija Masena spektrometrija	Kiseonik Ugljendioksid Isparljiva organska jedinjenja
Koncentracije supstrata i proizvoda	Automatski analizatori	Skupi. Primena ograničena na neka jedinjenja

pH elektroda se mora kalibrisati pre upotrebe, uronjavanjem u puferski rastvor na temperaturi fermentacije. Može se dogoditi da se pH elektroda "razkalibriše" u toku sterilizacije ili upotrebe; pomeranje je obično manje od 0,2 pH jedinice. Preporučuje se da se u ovom slučaju izvrši provera pH elektrode merenjem pH u uzorku fermentacione tečnosti.

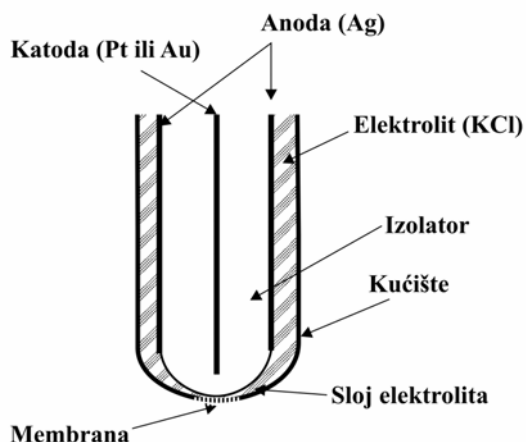
Merenje rastvorenog kiseonika. Za merenje nivoa rastvorenog kiseonika u hranljivim podlogama koriste se kiseonične elektrode. U praksi se najviše koriste kiseonične elektrode s membranom, koje se prema principu rada mogu podeliti u dve grupe:

- galvanske (tzv. *Borkovski–Džonsonove* elektrode, Borkowski–Johnson) i
- polarografske (tzv. *Klarkove* elektrode, Clark).

Katoda i anoda nalaze se u rastvoru elektrolita, a od okoline su odvojene tankom polupropustljivom membranom od teflona ili polietilena.

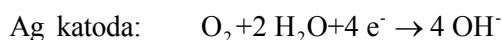
**Slika 7.3** Šematski prikaz pH elektrode

Membrana je propustljiva za kiseonik i druge gasove, ali ne i za elektrodni elektrolit i druge jone. Kada se kiseonična elektroda uroni u tečnost, rastvoreni kiseonik difunduje iz tečnosti prema katodi unutar elektrode, gde se redukuje.

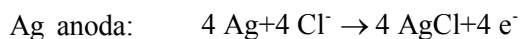
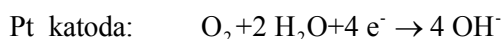


Slika 7.4 Kiseonična elektroda

Galvanska kiseonična elektroda sastoji se od galvanske ćelije (tj. ćelije koja generiše električnu struju), koja povezuje redukciju molekuskog kiseonika na srebrnoj katodi sa oksidacijom i rastvaranjem na olovnoj anodi prema jednačinama:



Polarografska kiseonična elektroda sastoji se od elektrolitske ćelije (tj. ćelije kroz koju prolazi električna struja generisana spolja) u kojoj se kiseonik redukuje na platinskoj elektrodi:



Napon između katode i anode (oko 0,6 V) bira se tako da se kiseonik selektivno redukuje na katodi. Polarografska elektroda pokazala se u praksi robustnijom od galvanske elektrode, ali zahteva skuplju elektroniku.

Promena parcijalnog pritiska kiseonika od mase fermentacione tečnosti do katode je šematski prikazana na slici 7.5. Prenos kiseonika je kontrolisan otporima difuziji kiseonika u tečnom filmu, membrani i elektrolitu, dok je otpor hemijskoj reakciji na katodi zanemarljiv. Jačina elektrodne struje u stacionarnom stanju proporcionalna je masenom fluksu kiseonika prema katodi, koji je proporcionalan parcijalnom pritisku kiseonika u tečnosti. Zbog toga se kiseoničnom elektrodom meri parcijalni pritisak kiseonika, a ne koncentracija rastvorenog kiseonika. Obično se očitava nivo rastvorenog kiseonika (% od zasićenja) u odnosu na zasićeni rastvor kiseonika na atmosferskom pritisku. Koncentracija rastvorenog kiseonika se može meriti kiseoničnom elektrodom samo ako je poznata rastvorljivost kiseonika u tečnosti na bazi Henry-evog zakona.

Merenje kiseoničnom elektrodom je veoma osetljivo na temperaturu i hidrodinamičke uslove. Uticaj temperature se može prikazati Arenijusovom jednačinom; energija aktivacije zavisi od materijala membrane i iznosi oko 3 do $4 \cdot 10^7$ J/mol. Promena vremenske konstante kiseonične elektrode sa promenom temperature iznosi oko 6%/°C. Hidrodinamički uslovi u blizini membrane zavise od uslova mešanja i aeracije. Intenzitet mešanja utiče na debljinu tečnog filma uz membranu i površinsko aerisanje tečnosti. Tečni film pruža otpor prenosu kiseonika i na taj način utiče na pokazivanje elektrode.

Apsorpcija kiseonika i usisavanje vazduha kroz slobodnu površinu tečnosti povećavaju koncentraciju rastvorenog kiseonika. Ovi uticaji se otklanjaju postavljanjem kiseonične elektrode u zatvoren sud minimalne zapremine u kome se tečnost intenzivno

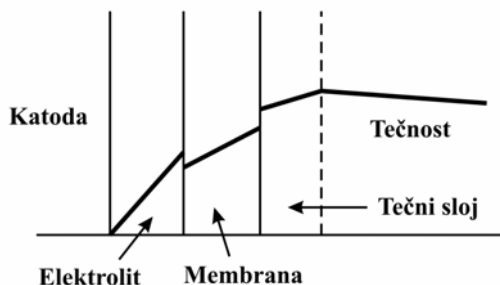
meša; pri povećanju intenziteta mešanja elektrodni signal se ne pojačava. Ako se merenja rade u disperziji gas-tečnost, onda je moguća interakcija između elektrode i gasnih mehurova, koja povećava pokazivanje elektrode. Ovaj uticaj je naročito važan ako je razlika između koncentracija kiseonika u gasu i tečnosti velika.

Negativan uticaj aeracije se otklanja postavljanjem elektrode pod uglom (okrenuta naviše), iza žičanog zaštitnika ili u bočnoj grani kroz koju cirkuliše tečnost. Pošto jačina elektrodne struje, odnosno elektrodni signal, zavisi od uslova merenja, važno je uraditi kalibraciju elektrode (odnosno ampermetra ili registratora elektrodnog signala) na temperaturi i u aktuelnim hidrodinamičkim uslovima merenja. Kalibracija se obavlja dovodenjem kiseonične elektrode u kontakt sa tečnostima u kojima je poznata koncentracija kiseonika, i to:

- sa tečnošću bez kiseonika (koji je desorbovan azotom ili je uklonjen hemijskom reakcijom s natrijumsulfitom) ili sa čistim azotom, kada je pokazivanje elektrode je 0% i
- sa tečnošću zasićenom sa vazduhom ili kiseonikom, kada je pokazivanje elektrode 100%.

Kiseonična elektroda nalazi sve širu primenu u biohemijskom inženjerstvu ne samo za kontinualno merenje nivoa rastvorenog kiseonika u toku aerobnih bioprocasa već i za određivanje aeracionog kapaciteta bioreaktora i brzine respiracije mikroorganizama. Da bi se kiseonična elektroda mogla upotrebiti za određivanje zapreminskog koeficijenta prenosa mase, potrebno je da se zna njeno dinamičko ponašanje, koje zavisi od otpora difuziji kiseonika kroz tečni film i membranu (uključujući i elektrolit).

Merenje redoks potencijala. Redoks potencijal daje informaciju o ravnoteži između oksidacionih i redukcionih sredstava (akceptora i donora elektrona) u hranljivoj podlozi. Merenje redoks potencijala vrši se pomoću redoks elektrode, koja predstavlja kombinaciju platinske i referentne Ag/AgCl elektrode. Redoks elektrode su, po pravilu, sterilizabilne. Vrednost podataka dobijenih merenjem redoks potencijala hranljivih podloga je sumnjiva, a njihova interpretacija teška. Izuzev možda na kraju bioprocasa, hranljiva podloga nije u oksido-redukcionoj ravnoteži. Pored toga, redoks elektroda meri oksido-redukциони potencijal u hranljivoj podlozi koja se, verovatno, potpuno razlikuje od sastava intraćelijske tečnosti, što komplikuje interpretaciju podataka. Redoks potencijal menja se linearno sa pH hranljive podloge, a logaritamski sa koncentracijom rastvorenog kiseonika. U aerobnim procesima oksido-redukциони potencijal je suštinski mera koncentracije rastvorenog kiseonika, dok je za anaerobne procese redoks elektroda korisna za praćenje jako redukativne sredine. U industrijskim procesima redoks elektrode se upotrebljavaju za praćenje koncentracija rastvorenog kiseonika koje su ispod vrednosti merljivih kiseoničnom elektrodom.



Slika 7.5 Šematski prikaz promene parcijalnog pritiska kiseonika u tečnoj fazi u stacionarnom stanju

Merenje ugljendioksida. Merenje rastvorenog ugljendioksida je bitno zbog uticaja koji ovaj gas može imati na metabolizam mikroorganizama. Poznato je da ugljendioksid inhibira rast, a u nekim slučajevima smanjuje sintezu sekundarnih metabolita. Od nedavno se za merenje koncentracije rastvorenog ugljendioksida koristi sterilizabilna CO_2 –elektroda. Ona se sastoji od jedne pH elektrode potopljene u bikarbonatni rastvor, a od hranljive podloge je odvojena polupropustljivom membranom.

Ugljendioksid prolazi difuzijom kroz membranu i menja pH puferskog rastvora, što se registruje pH metrom. pH se može povezati sa parcijalnim pritiskom ugljendioksida u hranljivoj podlozi, odnosno pH bikarbonatnog pufera, indirektno pokazujući nivo rastvorenog ugljendioksida zbog sledeće ravnoteže:



U ravnoteži važi sledeća jednačina:

$$K = \frac{c_{\text{H}^+} c_{\text{HCO}_3^-}}{c_{\text{CO}_2} c_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (7.2)$$

Ako je temperatura konstantna, onda je konstanta ravnoteže K konstantna. Pošto su koncentracije vode i HCO_3^- mnogo veće od koncentracija H^+ i CO_2 , sledi da je koncentracija CO_2 proporcionalna koncentraciji H^+ . Zbog toga je elektrodni signal logaritamski, pa se kalibracija mora raditi pomoću dva različita puferska rastvora.

Anjon–selektivne elektrode. Specifični joni, kao što su: NH_4^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} i PO_4^{3-} , važni su za regulaciju metabolizma mikroorganizama. Danas su razvijene brojne jon–selektivne elektrode za neke neorganske jone, koje su do sada, na žalost, imale ograničenu primenu u biotehnologiji. Ove elektrode se ne mogu sterilisati toplotom, a i primenljive su u opsegu pH koji nije od značaja za bioprocese.

Analiza gasova. Analizom sastava ulaznog i izlaznog gasa određuju se najčešće kiseonik i ugljendioksid. Drugi gasovi (na primer, amonijak, metan, vodonik) i isparljiva jedinjenja (butanol, etanol, acetaldehid, aceton) mogu se, takođe, određivati u izlaznom gasu. Ovim merenjima dolazi se do brzine potrošnje kiseonika, brzine nastajanja ugljendioksida i dr. Za analizu sastava ulaznog ili izlaznog gasa koristi se više različitih sistema, kao na primer, paramagnetski analizatori za kiseonik, ugljendioksid i amonijak, gasni hromatografi i maseni spektrometri.

Biološka merenja. Biološka merenja obuhvataju određivanje biomase, koncentracije supstrata i proizvoda metabolizma u hranljivoj podlozi i intraćelijskih komponenti. Krajnji cilj je kontinualno "on-line" merenje biomase i nekih značajnih komponenti, kao što su: ugljeni hidrati, proteini, fosfati, lipidi, enzimi, prekursori i intermedijarni metaboliti. Uzimanje i pripremanje uzoraka za ovu analizu uglavnom je ručno. Prelazak na automatsku tehniku treba da omogući razvoj bioreaktora. Uzorci se, po pravilu, uzimaju rutinski (aseptično, ako je potrebno), a zatim se pripremaju ručno ili semiautomatski razblaživanjem, filtriranjem ili centrifugiranjem.

Određivanje biomase. Rutinsko merenje biomase u industrijskim hranljivim podlogama još uvek nije moguće. Merenje biomase u prošlosti nije bilo neophodno u svim slučajevima, ali se njegov značaj danas višestruko povećao zbog mogućnosti primene modela bioprocasa za njihovo

vođenje i optimizaciju. Rast mikroorganizma se može pratiti merenjem suve biomase, koncentracije ćelija (broj ćelija u jedinici zapremine) ili optičke gustine, kao i analizom nekih ćelijskih komponenti.

Merenje suve biomase je najčešći način direktnog određivanja koncentracije i rasta biomase. Ovaj metod je obično standardan, i njime se baždare drugi metodi. Postupak uključuje uzorkovanje hranljive podloge, odvajanje ćelija od tečnosti filtriranjem ili centrifugiranjem i sušenje. Određivanje suve biomase je pouzdano samo kad je sadržaj čvrste faze u hranljivoj podlozi mali.

Brojna koncentracija (broj ćelija u jedinici zapremine hranljive podloge) određuje se direktno, brojanjem ćelija pod mikroskopom, ili indirektno, brojanjem kolonija izraslih na čvrstoj podlozi.

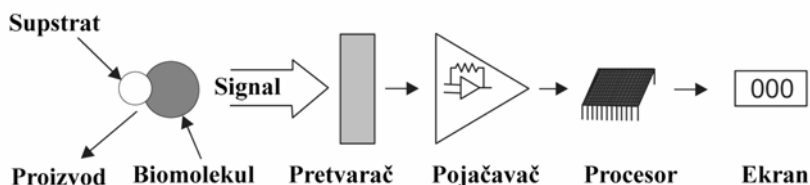
Od ćelijskih komponenti najčešće se određuje sadržaj azota, DNK i ATP. Određivanje sadržaja DNK je naročito pogodno jer sadržaj DNK ne varira bitnije sa brzinom rasta, promenom okolnih uslova i metabolizmom. Problem je što je analiza DNK mučna i nije automatska. Nastajanje ugljendioksida i potrošnja kiseonika mogu se empirijski povezati sa mikrobnim rastom.

Određivanje sastava hranljive podloge. Sastav hranljive podloge određuje se najčešće hemijskim ili biohemijskim analizama uzoraka. Zbog veoma velikog broja različitih jedinjenja prisutnih u hranljivoj podlozi obično se određuju samo koncentracije glavnih supstrata (izvori ugljenika i azota) i proizvoda. Razvoj specifičnih enzimskih i jon-selektivnih elektroda može voditi i "on-line" praćenju bioprocesa.

7.3. BIOSENZORI

Biosenzor je analitički uređaj, koji konvertuje signal biološkog sistema u električni signal. Prema nedavnoj IUPAC definiciji, biosenzor je specifični tip hemijskog senzora koji uključuje:

- biološki element (biomolekul, kao što su: enzim, antitelo, receptor ili mikroorganizam) i
- fizički ili hemijski pretvarač (elektrohemijski, maseni, termički ili optički).



Slika 7.6 Šematski prikaz biosenzora

Postoje i druge definicije biosenzora. U najširem značenju, ovim nazivom se pokriva svaki analitički instrument koji je uključen u merenja u biološkom sistemu ili koji uključuje neki biološki sistem. Otuda se često naziv biosenzor koristi za analitičke instrumente kojima se određuje kon-

centracija supstanci od biološkog značaja, iako tehnički nisu biosenzori. Šematski prikaz biosenzora sa glavnim komponentama uređaja je dat na slici 7.6.

Biološki element prepoznaje prisustvo, aktivnost ili koncentraciju specifičnog jedinjenja (supstrata) u rastvoru. Prepoznavanje može da bude proces vezivanja ili biokatalitička reakcija između biomolekula i supstrata. Ova interakcija između biomolekula i supstrata ima za rezultat merljivu promenu neke osobine rastvora (*signal*), kao što je, na primer, sinteza proizvoda. Pretvarač registruje ovaj signal i konvertuje ga u električni signal. Izlazni signal iz pretvarača se pojačava, obrađuje i na kraju pojavljuje na ekranu uređaja. U principu, biosenzor kombinuje specifičnost biokomponente sa električnim komponentama koje registruju, konvertuju i dalje procesiraju signal nastao specifičnom reakcijom biomolekula i supstrata. Na taj način, biosenzor je veštačka imitacija u prirodi poznatih principa na kojima se zasnivaju registrovanje i transmitovanje signala u živim ćelijama.

Uspešan biosenzor se odlikuje sledećim bitnim osobinama:

- biomolekul mora da ima visoku specifičnost prema supstratu i mora biti stabilan pod normalnim uslovima skladištenja i izvođenja analiza,
- reakcija između biomolekula i supstrata mora da bude nezavisna od pH, temperature i intenziteta mešanja, da bi predpriprema uzorka za analizu bila minimalna,
- signal, kao rezultat reakcije između biomolekula i supstrata, treba da bude tačan, precizan, reproduktivan i linearan u širem mernom opsegu, bez razblaživanja ili koncentrisanja uzorka,
- biosenzor mora da bude jeftin, mali po veličini i prenosljiv; i
- biosenzor mora da zadovolji zahteve vezane za određenu primenu (na primer, da je sterilizabilan, kada se koristi za merenja u fermentoru).

7.3.1. Komponente biosenzora

Glavne komponente biosenzora su:

- biokomponenta i
- električne ili optičke komponente.

Biokomponenta biosenzora

Različiti biološki sistemi mogu biti biokomponente biosenzora, ali su to najčešće:

- biokatalizatori (enzimi, ćelije i organele),
- reakcije vezivanja liganda i
- hibridni receptori.

Prema vrsti biokomponente, biosenzori se dele u dve grupe:

- biosenzori sa biokatalizatorom (najčešće sa enzimom) i
- biosenzori zasnovani na afinitetu liganda.

a) Biokatalizatori

Biokatalitički element biosenzora (biokatalitički receptor) mogu biti sistemi koji sadrže:

- enzime (mono i multienzime),

- cele ćelije (mikroorganizmi, kao što su: bakterije, gljivice, eukariotske ćelije i kvasci),
- ćelije organela i
- biljno ili animalno tkivo.

Enzimi. Najčešće korišćeni vezivni par je enzim–supstrat. Zbog svoje specifičnosti, selektivnosti i efikasnosti, enzimi su veoma pogodni kao biokomponenta biosenzora. Imobilisani enzimi pružaju posebne pogodnosti. Moguća je višestruka primena (do 10.000 puta u toku nekoliko meseci), a povećana je stabilnost i reproduktivnost. Načelno, brojne interakcije enzima sa supstratima se mogu koristiti za praćenje različitih supstrata. Enzimi se mogu koristiti i za otkrivanje i merenje inhibitora. Na osnovu interakcije sa enzimom mogu se meriti male koncentracije supstrata i kompetitivnih inhibitora (čak do 10^{-6} mol/dm³), a još manje (nekoliko redova veličine) koncentracije nekompetitivnih inhibitora.

Određivanje koncentracije supstrata zasniva se na merenju početne brzine reakcije enzima i supstrata. Ako se reakcioni uslovi i koncentracija enzima konstantni, onda je, pri maloj koncentraciji supstrata, početna brzina ove reakcije proporcionalna koncentraciji supstrata. Na osnovu Michaelis–Menten-ove jednačine, sledi

$$(-r_s) = \frac{(-r_s)_{\max}}{K_m} S_o \quad (7.3)$$

ako je ispunjen uslov da je: $S < 0,1K_m$, gde je: $(-r_s)$ i $(-r_s)_{\max}$ – aktuelna i maksimalna brzina nestajanja supstrata, S_o – početna koncentracija supstrata i K_m – Michaelis–Menten-ova konstanta zasićenja.

Biološki signal biosenzora se određuje biokatalitičkom membranom na kojoj je imobilisan enzim i na kojoj se odigrava konverzija reaktanta u proizvod. Ako je reakcija konverzije limitirana brzinom difuzije supstrata prema enzimu, pojavljuju se brojne analitičke prednosti. Tada brzina konverzije supstrata u proizvod zavisi linearno od koncentracije supstrata u širokom opsegu, nekoliko puta većoj od K_m , ali ne zavisi od pH, jonske jačine rastvora, temperature i prisustva inhibitora. Ovo omogućava da se imobilisanim enzimom određuju, bez razblaživanja, koncentracije supstrata desetak puta veće od koncentracija koje se određuju slobodno suspendovanim enzimom. Ovo se, takođe, koristi da se izbegnu problemi vezani za različitost uzoraka koji se analiziraju (hranljiva podloga, krv ili mokraća). Obično se između enzima i rastvora supstrata stavlja polupropustljiva membrana, pa difuzija supstrata kroz nju kontroliše reakciju sa enzimom.

Najpopularniji biosenzor je biosenzor glukoze, koji nalazi široku primenu u medicini i biotehnologiji, jer je glukoza važan metabolit u kliničkoj hemiji i važan supstrat – izvor ugljenika i proizvod pri razgradnji skroba i celuloze. Biokomponenta ovog biosenzora je glukozaoksidaza (EC 1.1.3.4), glukoprotein sa FAD kao prostetičkom grupom. Ovaj enzim ne zavisi od kofaktora, ali mu je nedostatak nastajanje vodonikperoksida u reakciji oksidacije glukoze. Imobilisani enzim pripremljen za kliničku primenu traje 5 dana, a za primenu u biotehnologiji – samo jednu fermentaciju.

Ćelije. Kada se katalitički proces odigrava preko reakcionih sekvenci, onda se mogu koristiti čitave ćelije ili ćelijski homogenizati umesto prečišćenih enzima. Biosenzori koji koriste ćelije mikroorganizama i biljno ili animalno tkivo kao biokomponentu imaju prednost u tome što se

izbegavaju složeni postupci ekstrakcije i prečišćavanja koji su nezaobilazni kada se koristi enzim kao aktivna komponenta. Stabilnost enzima unutar ćelija je obično vrlo velika. Fiziološko stanje ćelija koje se koriste u biosenzorima može biti različito, i to:

- homogenizat sa jednim ili nekoliko enzima,
- nerastuće ćelije,
- permeabilizovane ćelije,
- žive ćelije sa neoštećenom površinom,
- aktivno rastuće ćelije,
- mešane kulture živih ćelija ili smeša ćelija i enzima,
- ćelije imobilisane zajedno sa specifičnim enzimom i
- imobilisane ćelije ili organele sa jednim bitnim, neoštećenim delom metabolizma.

Žive ćelije mogu biti pogodne za praćenje promena koje su vezane sa ćelijskim rastom i deobom. U ostalim slučajevima, ćelije se mogu smatrati nosačem enzima pogodnim za određenu katalitičku reakciju.

Biosenzori sa mikrobnim ćelijama su manje osetljive na inhibiciju drugim jedinjenjima prisutnim u rastvoru, mnogo tolerantniji na promene pH i temperature i generalno duže traju. Ovi biosenzori se zasnivaju na kontaktu elektrode i imobilisanih živih ćelija i lako se regenerišu potapanjem u hranljivu podlogu. Pored očigledne prednosti, primena ćelija ili njihovih homogenizata ima nedostatak zbog mogućih pratećih reakcija, koje mogu postati uzrok ozbiljne greške. Ovi biosenzori imaju spor odgovor i manju selektivnost u poređenju sa biosenzorima sa enzimima. Ovi biosenzori su, generalno, zasnovani na detektovanju organskih jedinjenja koja usvajaju (koriste) mikrobnе ćelije ili na praćenju promena u respiratornoj aktivnosti ćelija tokom metabolizma.

Imobilisane ćelije su do sada korišćene u industrijske i analitičke svrhe. Primeri primene biosenzora sa ćelijama u analitičke svrhe su analize vitamina, biološke potrošnje kiseonika, inhibitora i specifičnih metabolita. Prilikom određivanja vitamina koristi se mutant organizma koji zahteva prisustvo određenog vitamina za svoj rast. Tako, na primer, ćelije *Saccharomyces cerevisiae*, imobilisane na alginatnoj membrani, korišćene su u određivanju tiamina i biotina. Populacija ćelija se imobilizuje na membrani koja se postavlja na pretvarač i drži uz njega pomoću elektromagnetskog nosača.

Organele. Primena organela kao biokomponente biosenzora počiva na istoj osnovi kao i primena ćelija. Zbog njihove fragilnosti i rezultujućeg gubljenja aktivnosti, prestao je razvoj ovog tipa biosenzora. Poznata je primena elektrode za određivanje tiroksina, koja se zasniva na mikrozoimima jetre pacova.

b) Reakcije vezivanja liganda

Kod biosenzora zasnovanih na vezivanju liganda, biološki element mogu biti hemijski receptori, antitela ili nukleinske kiseline, poznatiji kao *bioafinitetni receptori*. Specifični biomolekul stupa u selektivnu interakciju sa određenim ligandom, pri čemu nastaje termodinamički stabilan kompleks. Čitav niz interakcija između specifičnog biomolekula i supstrata može se ubrojiti u reakcije vezivanja, kao što su: imunohemijske reakcije vezivanja, reakcije receptora i dr. Parovi reaktanata sa specifičnim vezivanjem i primeri njihove analitičke primene pobrojani su u tabeli 7.6.

Najbolje proučene i najprisutnije na tržištu biosenzora su imunohemijske reakcije vezivanja (tzv. imunosenzori). Osnova imunohemijskog vezivanja je u specifičnom vezivanju antigena za antitela. Kada se neka životinja učini imunom uvođenjem stranog makromolekula, inicira se protektivna reakcija koja ima za rezultat generisanje antitela. U stvari, limfociti se aktiviraju i počinju da produkuju antitela. Svaki od njih generiše samo jedan tip antitela, tako da se dobija poliklonalni antiserum. Tehnologijom hibridoma moguće je proizvesti individualne klonove antitela, što je dovelo do standardizacije analize.

Fizičko-hemijske promene izazvane vezivanjem antigena i antitela ne generišu signal koji se može detektovati elektrohemijски. Zato se za obeležavanje antigena i antitela koriste enzimi, fluorescentna jedinjenja, elektrohemijски aktivni supstrati, radionuklidi i kompleksi avidina i biotina. Kompleksi antigena i antitela mogu se koristiti sa svim tipovima pretvarača, ali su najčešći akustički i optički sistemi.

Biosenzori zasnovani na reakciji vezivanja se odlikuju visokom osetljivošću (mere se koncentracije do 10^{-10} mol/dm³), jer kompleksi makromolekula i liganda vrlo efikasno nastaju i pri malim koncentracijama. Većina biosenzora ovog tipa deluje na principu kompetitivne analize. Prirodni ligand iz uzorka i obeleženi ligand, koji se dodaje uzorku u poznatoj koncentraciji, reaguju sa biomolekulom, a meri se deo obeleženog liganda koji je vezan za biomolekul.

Tabela 7.6 Primena reakcija vezivanja specifičnog biomolekula i liganda i hibridnih receptora

<i>Biomolekul</i>	<i>Ligand</i>	<i>Primena</i>
Antitelo	Antigen	Imunoanaliza
Protein A	Fc na IgG	Imunoanaliza
Lecitin	Ugljeni hidrat	Analiza ugljenih hidrata
DNK–elektroda	DNK	Specifična analiza DNK
RNK–elektroda	RNK	Specifična analiza RNK
Receptor	Ligand	Analiza receptora ili liganda
Enzim	Inhibitor ili aktivator	Analiza enzima ili inhibitora/aktivatora

c) Hibridni receptori

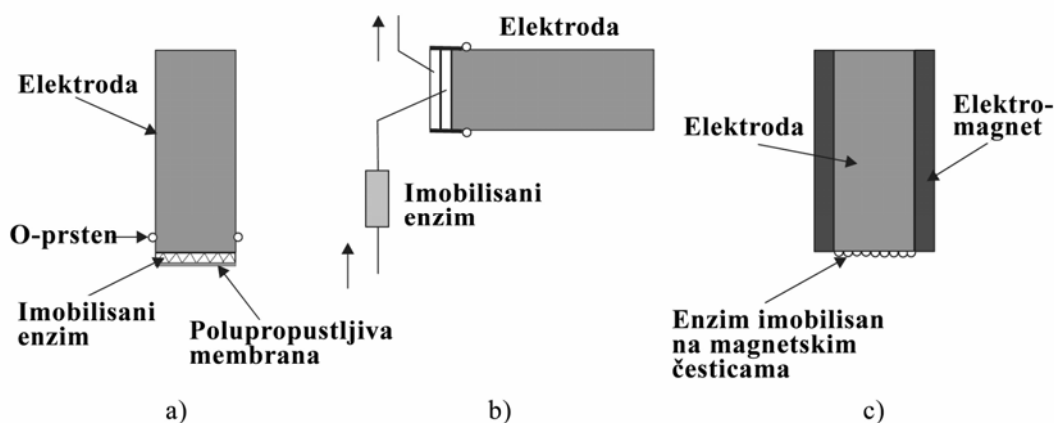
Princip selektivne detekcije biosenzorima sa hibridnim receptorima zasnovan je na detekciji jedinstvene sekvence heterocikličnih baza nukleinskih kiselina hibridizacijom. Po strukturi, nukleinske kiseline se sastoje od dva polinukleotidna lanca koji imaju konformaciju dvostrukog heliksa. Svaki lanac je polimerni lanac koji sadrži baze: adenin, tiamin, citozin i guanin. Po dve baze su komplementarne i vezane vodoničnim vezama, i to po tri vodonične veze u paru citozan–guanin, a dve vodonične veze u paru tiamin–adenozin. Na ovom vezivanju baza zasniva se sposobnost jednog lanca da prepozna svoj komplementarni lanac u građenju dvostrukog heliksa. Kod ovih senzora, definisana sekvenca jednog lanca se imobilise na čvrstom nosaču kao biološki receptor. Ako se DNK–elektroda, posle ubacivanja u uzorak, kombinuje (hibridizuje) sa nepoznatom DNK u uzorku, detekcija i identifikacija nepoznate DNK je moguća zbog prepoznavanja komplementarnih baza. Biosenzori na bazi hibridnih receptora imaju sve širu primenu u analizi hrane i detekciji mikroorganizama. Oni su jedina tehnika za detektovanje genetičkih modifikacija i najosetljiviji senzor patogenih mikroorganizama u hrani.

Integrisanje biokomponente sa pretvaračem

Potrebni uslovi za uspešan rad biosenzora, kao što su rastojanje između biokomponente i pretvarača i reakcija kontrolisanih difuzijom pri visokoj koncentraciji biokomponente, tehnički se realizuju imobilizacijom biomolekula na pretvaraču. Ovaj način primene biomolekula omogućava, takođe, kontinualno merenje i ponovljene analize.

Za imobilizaciju biomolekula u izradi biosenzora primenjuje se više različitih tehnika: adsorpcija, poprečno vezivanje, kovalentno kuplovanje, vezivanje biomolekula u nosaču, vezivanje u kapsulama i dr. Izbor tehnike imobilizacije biomolekula zavisi od prirode biomolekula, vrste pretvarača, fizičko-hemijskih osobina jedinjenja koje se analizira i radnih uslova biosenzora. Najčešće korišćene tehnike su adsorpcija i kovalentno vezivanje.

Fizička adsorpcija biokomponente zasniva se na van der Valsovim privlačnim silama. Ras-tvor enzima, suspenzija ćelija ili komadići tkiva se imobilišu na membrani, koja je propustljiva za jedinjenje koje se analizira, koja u obliku tankog sloja prekriva pretvarač. Prednosti ovog metoda su u njegovoj jednostavnosti, mogućnosti regeneracije membranske matrice. Nedostatak je mogućnost gubljenja biokomponente pri promeni pH, jonske jačine i temperature rastvora.



Slika 7.7 Integrisanje biokomponente i pretvarača: a) sloj imobilisanih biomolekula prekriva pretvarač, b) imobilisani biomolekuli u predkoloni i c) sloj biomolekula imobilisanih na magnetnim česticama prekriva elektrodu

Kod kovalentnog kuplovanja, koriste se čvrsti nosači, na primer membrane sa hemijskim grupama koje, kada se aktiviraju, mogu da reaguju sa specifičnim grupama biomolekula. Najvažnije je da vezani biomolekul zadržava svoju biološku aktivnost i da je vezivanje stabilno. Aktivna mesta biomolekula mogu se zaštititi od reakcije sa hemijskim grupama nosača, izvođenjem imobilizacije u prisustvu kompetitivnog inhibitora koji će ih blokirati. Moguća je indirektna imobilizacija na površini pretvarača.

»Hvatanje« u nosačima, kao što su gelovi ili polimeri naročito je uspešno u slučaju ćelija i njihovih organela. U ovom slučaju biokomponenta se meša sa polimerom ili monomerom rastvo-

renim u vodi. Polimer se, zatim, umrežava, a biomolekuli se »hvataju« u mrežu. Kada se koristi monomer, on se polimerizuje i umrežava.

Većina biosenzora je u obliku elektroda.

Integrisanje imobilisanih biomolekula i pretvarača ostvaruje se na jedan od sledeća tri načina (slika 7.7):

- sloj imobilisanih biomolekula prekriva pretvarač,
- imobilisani biomolekuli u predkoloni i
- sloj biomolekula imobilisanih na magnetim česticama prekriva elektrodu (reverzibilna imobilizacija).

Električne i druge komponente biosenzora

a) Pretvarač

Ključni deo biosenzora je pretvarač koji omogućava da se registruje promena koja prati reakciju između biomolekula i supstrata. To može biti:

- toplota oslobođena u reakciji,
- promena u raspodeli naelektrisanja zbog čega se generiše električni potencijal,
- kretanje elektrona generisanih u redoks reakciji,
- svetlost nastala u reakciji ili razlika u apsorbanciji reaktanata i proizvoda i
- efekti usled promene u masi reaktanata ili proizvoda.

Prema promeni koju registruje, pretvarači biosenzora se dele u sledeće grupe:

- amperometrijski,
- potenciometrijski,
- pijezelektrički,
- termički (kalorimetrijski) i
- optički.

Pregled prednosti, nedostataka i primene pretvarača je dat u tabeli 7.7. U praksi se najčešće koriste elektrohemijski detektori – amperometrijski i potenciometrijski.

Amperometrijski pretvarači se zasnivaju na merenju struje kada se jedinjenje elektrohemijski oksiduje ili redukuje na međufaznoj površini rastvor – elektroda, koja je proporcionalna koncentraciji jedinjenja. Najprostiji biosenzor sa amperometrijskim pretvaračem uključuje Klarkovu polarografsku kiseoničnu elektodu. Potenciometrijski biosenzori koriste jon–selektivne elektrode da bi konvertovali biološki u električni signal. Najčešće se koristi pH elektroda, koja je osetljiva na promene koncentracije H_3O^+ jona.

Pijezelektrični pretvarači registruju promenu mase adsorbovanog materijala na površini pijezelektričnog kristala (na primer, kvarca). Pod uticajem električnog polja, kristal vibrira prema svojoj karakterističnoj frekvenciji. Ova rezonantna frekvencija kristala se menja kako se molekuli adsorbuju na površini kristala ili desorbuju sa nje. Obično, sloj imobilisane formaldehiddehidrogene prekriva pijezelektrični kvarcni kristal, a pretvarač je osetljiv na gasoviti formaldehid.

Kalorimetrijski pretvarači registruju toplotu koja prati reakciju pomoću termistora, odnosno poluprovodnika, čiji otpor zavisi od temperature. Temperatura se meri na ulazu i izlazu male

kolone sa pakovanjem na kome je imobilisan enzim. Promena otpora termistora zbog promene temperature se konvertuje u napon pomoću Vitstonovog mosta.

Postoje dva tipa *optičkih biosenzora*. Prvi tip meri promenu intenziteta apsorbirane svetlosti, a drugi tip intenzitet fluorescentne svetlosti u toku reakcije. Prvi tip obično uključuje upotrebu kolorimetrijskih test traka. Tako, na primer, u kontroli nivoa šećera u krvi koriste se test trake sa glukozooksidazom, peroksidazom i bojenim reagensom (*o*-toluidin). Vodonikperoksid, koji nastaje pri oksidaciji glukoze kiseonikom, oksiduje bojeni reagens uz nastajanje intenzivne boje. Intenzitet boje se određuje refleksionim fotometrom ili poređenjem sa referentnom obojenom trakom. Primer drugog tipa je optički biosenzor sa luciferazom (EC1.13.12.7) svica, kojim se detektuje prisustvo bakterije u hrani ili kliničkim uzorcima. Lizirane bakterijske ćelije oslobađaju ATP (u količini približno proporcionalnoj broju bakterija) koji reaguje sa D-luciferinom i kiseonikom pri čemu nastaje žuta svetlost (562 nm), koja se registruje fotometrijski.

Tabela 7.7 Pregled prednosti, nedostataka i primene pretvarača

<i>Tip</i>	<i>Prednosti</i>	<i>Nedostaci</i>	<i>Primena</i>
Amperometrijski	Jednostavan, veliki broj redoks reakcija, mogućnost smanjenja dimenzija	Mala osetljivost, potreban veći broj membrana ili enzima da bi se povećala osetljivost i selektivnost	Glukoza, saharoza, galaktoza, BPK i dr.
Potenciometrijski (jon-selektivne elektrode)	Jednostavan, pouzdan, lako prenošljiv	Spor odgovor, potrebna stabilna referentna elektroda, osetljiv na šum	Aminokiseline, ugljeni hidrati, alkoholi, neorganski joni
Pijezoelektrički	Brz odgovor, jednostavan, stabilan izlaz, niska cena uređaja za očitavanje, bez specijalne pripreme uzorka, dobar za analizu gasova	Mala osetljivost sa tečnostima, interferencija zbog nespecifičnog vezivanja	Ugljeni hidrati, vitamini, patogeni, kontaminanti (antibiotici, pesticidi), bakterijski toksini
Termički	Višestruka primena, bez optičke interferencije (boja, mutnoća)	Neselektivan	Ugljeni hidrati, saharoza, alkoholi, masti, amini
Optički	Daljinsko merenje, niska cena, male dimenzije, višestruki način rada: apsorbanca, reflektanca, fluorescencija	Interferencija sa okolnim svetlom, potreban visokoenergetski izvor, primenljiv u uskom opsegu koncentracija, smanjenje dimenzija može uticati na jačinu signala	Ugljeni hidrati, alkoholi, pesticidi, praćenje procesa

Osetljivost i druge karakteristike biosenzora mogu biti poboljšane korišćenjem nanomaterijala u njihovoj izradi. Matrice sa bar jednom dimenzijom reda 1 do 100 nm pokazuju jedinstvene fizičke i hemijske osobine. Različite nanostrukture, kao što su nanocevi, nanovlakna, nanošipke, nano-

čestice i tanki filmovi, su ispitivane u cilju nalaženja najpovoljnijeg oblika za primenu u biosenzorima. Tako, funkcionalne nanočestice (sa akustičnim, električnim, optičkim ili magnetnim osobinama) vezane su za biomolekule (peptide, proteine, nukleinske kiseline i dr.) u cilju detektovanja i pojačanja različitih signala. Očekuje se da, zbog njihove submikronske veličine, nanosenzori donesu revolucionarne promene na polju hemijske i biološke analize u smislu omogućavanja brze analize većeg broja supstanci in vivo. Biosenzori zasnovani na nanotehnologiji bi trebalo da budu ugrađeni unutar tankih biočipova, što će ih učiniti malim, prenošljivim, lakim za upotrebu, jeftinim, jednokratno upotrebljivim i višesetruko primenljivim dijagnostičkim instrumentima.

b) Ostale komponente biosenzora

Pretvarač konvertuje promenu (signal) izazvanu reakcijom u električni signal, koji je često slab i sabran sa relativno visokom osnovnom linijom i šumom. Ovo zahteva obradu signala, koja se sastoji u oduzimanju signala bazne linije, koji je generisan sličnim pretvaračem bez prisustva reakcije, od signala koji generiše pretvarač u prisustvu reakcije. Rezultujuća razlika signala se zatim pojačava i elektronski filtrira (»pegla«) od nepoželjnog signala šuma, što je olakšano sporošću (tj. velikom vremenskom konstantom) reakcije. Analogni signal se, zatim, konvertuje u digitalni signal i dalje obrađuje, konvertuje u jedinice koncentracije i prikazuje na ekran uređaja ili se skladišti u memoriju uređaja.

7.4. KONTROLA I REGULACIJA BIOPROCESA

Podaci o vrednostima procesnih parametara, koji se sakupljaju pomoću mernih instrumenata mogu se koristiti za njihovu kontrolu. Najčešće se zahteva da vrednosti procesnih parametara budu konstantne ili da se procesne promenljive menjaju po određenom zakonu u toku bioprocesa. Kontrola bioprocesa obezbeđuje da se bilo kakvo odstupanje procesne promenljive od definisanog nivoa može korigovati odgovarajućom akcijom kontrolnog sistema. Pored toga, kontrolni sistem može obezbediti da promena određenih procesnih promenljivih bude optimizovana.

U vezi sa kontrolom bioprocesa postoje tri naročito bitna problema, koja su rezultat činjenice da u procesu učestvuju živi organizmi:

- 1) ne postoje merni instrumenti koji obezbeđuju "on-line" kontrolu mnogih značajnih procesnih promenljivih,
- 2) u biosistemu postoje brojne složene i međusobno povezane biohemijske reakcije, a značajan uticaj na njih imaju fenomeni prenosa i
- 3) mikrobne ćelije imaju sopstveni regulacioni sistem, eksterni kontrolni sistem podešava okolne uslove dok je neizvestan njegov uticaj na intraćelijski kontrolni sistem.

Osnovne komponente kontrolnog sistema. Osnovna jedinica kontrolnog sistema sastoji se od četiri elementa:

- proces,
- merni instrumenti,
- regulator i
- izvršni element.

Merni instrumenti mere nivoe procesnih promenljivih i generišu pogodne izlazne signale. *Regulator* poredi intenzitet izlaznog signala, koji šalje merni element, s željenom vrednošću. *Izvršni elementi* pretvaraju signal iz regulatora u korektivnu akciju, koja smanjuje razliku između izmerenog i željenog nivoa procesne promenljive.

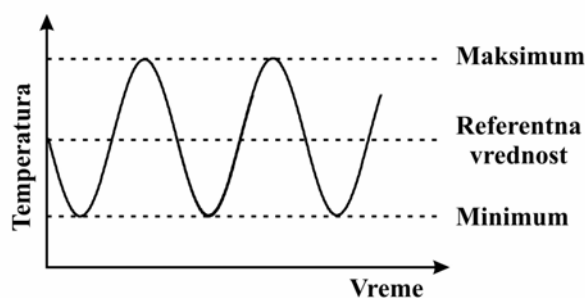
Vrste kontrolnih sistema. Kontrolni sistemi koji su značajni za biotehnologiju mogu se svrstati u tri grupe kontrole:

- ručna,
- klasična automatska i
- kompjuterizovana.

Ručna kontrola je najprostija vrsta kontrole, jer radnik mora da prati nivo procesne promenljive i ako dođe do odstupanja njenog nivoa od referentnog, mora da preduzme odgovarajuću akciju (na primer, otvoriti ili zatvoriti ventil na dovodu fluida) kojom će se smanjiti odstupanje. Kada je to moguće, obzirom na način merenja procesnih parametara, neophodnost intervencije treba signalizovati zvučnim ili svetlosnim signalom. Ovakva kontrola je skupa zbog angažovanja radne snage, pa je opravdana samo u slučaju podešavanja u početnom ili završnom periodu rada.

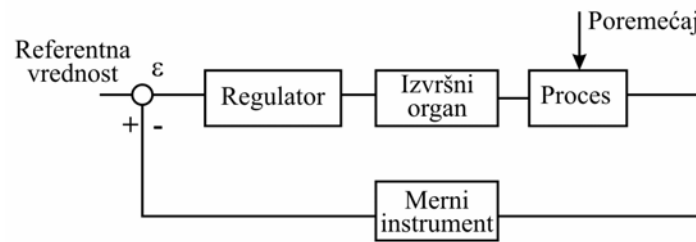
Od klasičnih automatskih kontrola u biotehnološkim procesima primenjuju se dvopoložajna ("on/off") i PID (proporcionalno – integralno – diferencijalna) kontrola.

Dvopoložajni regulator uključuje izvršni kontrolni organ (ventil, prekidač itd.) koji je ili potpuno otvoren ("on") ili potpuno zatvoren ("off"). Kao posledica, kontrolisana promenljiva će oscilovati oko referentne vrednosti između minimalne i maksimalne vrednosti (slika 7.8). Ovaj tip kontrole je uspešan kad su promene nivoa procesne promenljive male i spore, kao što je u slučaju promene pH i temperature u podlozi.



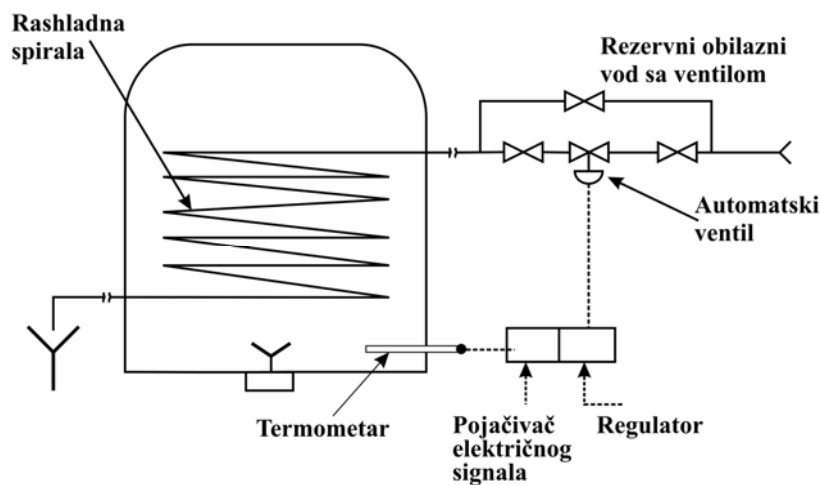
Slika 7.8 Regulacija temperature pomoću dvopoložajnog regulatora

PID kontrola obuhvata proporcionalnu, integralnu i diferencijalnu kontrolu, pojedinačno ili kombinovano. Iako većina savremenih PID kontrolnih sistema koristi analogne elektronske regulatore, još uvek su u primeni mnogi pneumatski regulatori. PID regulatori zadovoljavaju u 80% od svih slučajeva kontrole. Većina kontrolnih sistema radi po principu sistema sa povratnom spregom (slika 7.9). Kontrolisana procesna promenljiva oduzima se od referentne vrednosti, usled čega se generiše signal greške. Regulator prepoznaje signal greške i izaziva korektivnu akciju izvršnog organa u smislu smanjenja greške.



Slika 7.9 Kontrola sa povratnom spregom

Na primeru kontrole i regulacije temperature u biorektoru (slika 7.10) prikazan je način delovanja sistema sa povratnom spregom.



Slika 7.10 Sistem za kontrolu i regulaciju temperature u biorektoru

Upotreba računara u kontroli bioprocesa porasla je u poslednjih nekoliko godina zbog relativno niske cene i povećanja efikasnosti mini računara, koji su omogućili sakupljanje i obradu velikog broja podataka o procesu, kao i zbog smanjenja radne snage angažovane u radu bioreaktora. Dobro poznate prednosti kompjuterizovane kontrole su: brza i precizna registracija i obrada podataka, čuvanje velikog broja podataka u memoriji računara i mogućnost donošenja odluka bitnih za kontrolu procesa na bazi svih trenutno raspoloživih podataka.

7.4.1. Kompjuterizovani kontrolni sistem

Uključivanjem kompjutera sa odgovarajućom softverskom podrškom u kontrolni sistem omogućava ne samo automatsku kontrolu već i vođenje (upravljanje) bioprocesa na osnovu poz-

natog matematičkog modela. Primena matematičkog modela je, takođe, veoma važna i za simulaciju toka bioprocesa, čime se skup, mukotrpan i neizvestan eksperimentalni rad na optimizovanju procesa zamenjuje kompjuterskom "igrom".

Konfiguracija kompjuterizovanog kontrolnog sistema zavisi od konkretnih zahteva jer svaki bioproces ima svoje osobenosti. Za većinu konfiguracija zajedničke su sledeće osnovne funkcionalne komponente:

- merni instrumenti,
- veza (interfejs) između mernih instrumenata i računara i
- računar (hardware, software, periferijska oprema itd.).

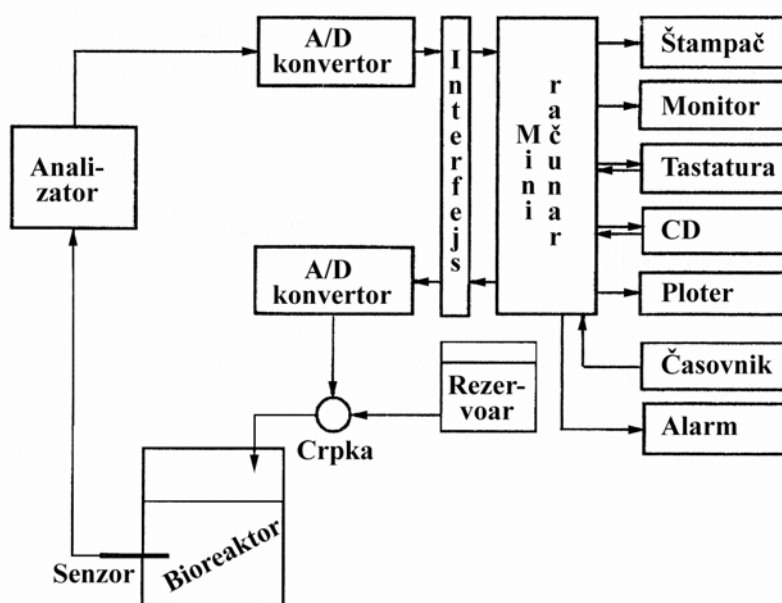
Na slici 7.11 šematski je prikazan jedan jednostavan kompjuterizovani sistem (s jednim regulacionim kolom) za kontrolu bioreaktora. Merni instrument u bioreaktoru generiše signal koji se pojačava i kondicionira u korektan analogni oblik. Analogni signal se konvertuje u digitalni signal pomoću analognog–digitalnog (A/D) pretvarača, koji se zatim prenosi do računara. Povezivanje izlaznog signala iz mernog instrumenta s računarem i izlaznog signala iz računara s crpkom vrši se pomoću interfejsa. Digitalni signal iz računara konvertuje se u analogni između interfejsa i crpke pomoću digitalno–analognog pretvarača. Računar je povezan sa satom koji meri „realno” vreme, koji određuje učestanost očitavanja nivoa procesnih promenljivih mernim instrumentima i registrovanja podataka u memoriju računara. Periferna oprema vezana direktno za računar može uključiti: tastaturu, ekran, štampač, ploter, diskove za memorisanje podataka i alarme. Mini računar može biti povezan s većim računarom, koji može biti korišćen za memorisanje podataka za duži vremenski period i složenu analizu podataka.

Kompjuterizovani kontrolni sistemi primenjuju se u kontroli procesa na tri nivoa, i to kao: *sekvenciona*, *DSC* (digitalna, s referentnom vrednošću; digital set-point control) i *DDC* (direktna digitalna; direct digital control) kontrola.

Sekvenciona kontrola, najniži nivo primene kompjuterizovanog kontrolnog sistema, reguliše sekvencione operacije, kao što su manipulisanje ventilima, crpkama itd. Većina ovih operacija traje relativno dugo (minut do nekoliko minuta) tako da brzina manipulacija nije bitna. Karakteristična je primena sekvencione kontrole u sterilizaciji hranljive podloge i punjenju bioreaktora s hranljivom podlogom.

DSC kontrola. Na višem nivou kontrole pojedinačna regulaciona kola za kontrolu temperature, pH, formiranje pene i dr. uključena su u jedinstven sistem kontrole. DSC kontrola omogućava održavanje procesnih promenljivih na definisanim nivoima, tzv. referentnim vrednostima. Računar je programiran da prati izlazne signale iz mernih instrumenata i poredi ih sa referentnim vrednostima koje su definisane programom. Ako se javi odstupanje izmerene vrednosti od referentne, računar šalje signal izvršnom organu (na primer, crpki) da izvrši odgovarajuću korektivnu akciju kojom će se odstupanje smanjiti.

DDS kontrola. U slučaju DDC kontrole merni instrumenti su direktno vezani sa računarom, a računar sadrži regulatore u obliku programa ili potprograma, tako da računar zamenjuje regulatore. Računar određuje referentne vrednosti, ali je kontrola bolja jer su kontrolni algoritmi matematičke funkcije.



Slika 7.11 Kompjuterizovani sistem s jednim regulacionim kolom za kontrolu bioprocasa u bioreaktoru

Poređenje ova dva kontrolna sistema pokazuje da je DSC kontrola ograničena karakteristikama upotrebljenih regulatora, dok je DDC kontrola limitirana samo zahtevima procesa. Na drugoj strani, kvar računara u DDC kontrolnom sistemu će u potpunosti isključiti kontrolu procesa dok u DSC kontrolnom sistemu postoji mogućnost da će pojedinačna regulaciona kola nastaviti da obavljaju funkciju kontrole nekih procesnih parametara. DSC kontrolni sistemi su skuplji, ali su i pouzdaniji, naročito ako je "pad" kontrolnog sistema kritičan za bioproces.

Primer primene kompjuterske kontrole procesa

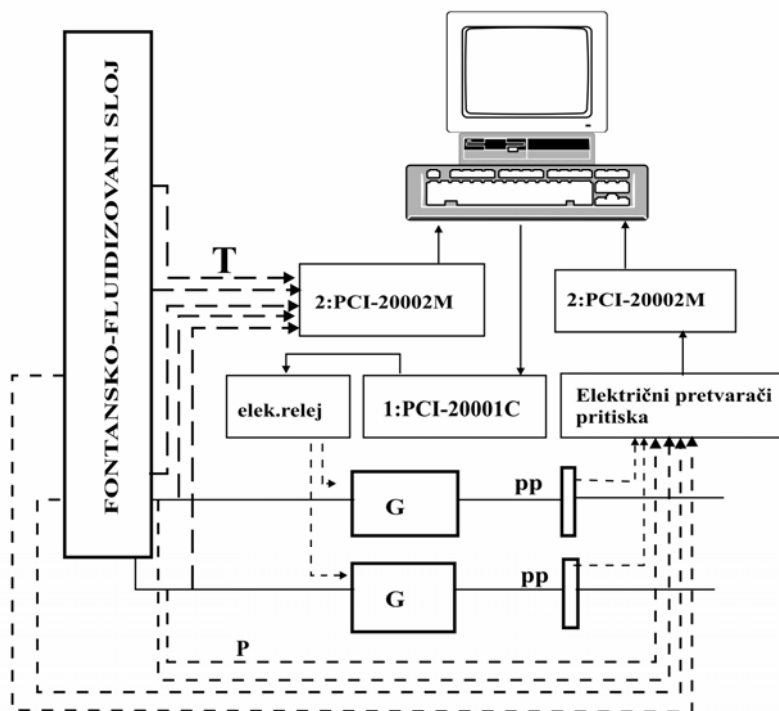
Kao primer primene kompjuterske kontrole procesa poslužiće sistem koji je primenjen na proces sušenja bioloških suspenzija u fontansko–fluidizovanom sušioniku sa inertnim punjenjem (slika 7.12).

Da bi se proces sušenja uspešno odvijao potrebno je pratiti sledeće parametre:

- protok vazduha na dva posebna i nezavisna toka od ventilatora do sušionika,
- pad pritiska vazduha na tim vodovima,
- gradijent pritiska na dva mesta u sušioniku,
- protok kompresorskog vazduha za raspršavanje tečne faze,
- protok tečne faze koja se sušila,
- temperature ulaznih tokova vazduha,
- temperature na dva mesta u sušioniku i

– temperature vazduha na izlazu iz sušionika.

Merenje protoka vazduha na dva nezavisna toka je vršeno standardnim kalibrisanim prigušnim pločama, čija je funkcija pada pritiska od protoka bila poznata (ili izračunata).



Slika 7.12 Kompjuterizovani sistem kontrole bioloških suspenzija u fontansko–fluidizovanom sloju sa inertnim punjenjem

Merna mesta ispred i iza prigušnice su bila direktno povezana sa elektronskim pretvaračima pritiska u naponski signal (pressure transducers). Tako transformisana veličina u obliku naponskog signala je vođena do akvizicionog sistema.

Da bi ovako dobijeni signal bio upotrebljiv neophodno je poznavati funkcionalnu zavisnost napona koji pretvarač daje od pritiska koji je detektovao. Ta zavisnost može biti data od proizvođača ili se određuje direktno eksperimentalnom proverom, tako što se pretvarač pritiska paralelno poveže sa nekim standardnim meračem pritiska (najčešće i najpreciznije kosi U manometar) i onda izlaže različitim pritiscima, koji se mere na paralelno povezanom standardnom instrumentu, a u isto vreme beleže vrednosti napona koji elektronski pretvarač daje. Na taj način se formira baždarni dijagram napon – pritisak $U = f(P)$ (Uobičajene vrednosti od 0 do 10 V, a kada je umesto naponskog signala odziv pretvarača pritiska strujni signal, onda je uobičajeni opseg od 4 do 20 mA, pri čemu su u industrijskim uslovima ti odzivi i najčešće strujni, jer se onda mogu preneti i na ve-

ću daljinu, bez bojazni od uticaja okoline, dok se sa naponskim signalima može raditi na relativno kratkom rastojanju, upravo zbog uticaja okoline na tačnost očitavanja signala).

Svi ostali signali, u tretiranom sistemu, koji služe za merenje gradijenata pritiska ili apsolutnih vrednosti pritiska na bilo kom mernom mestu su izbaždareni na identičan način.

Tako dobijeni signali se prethodno filtriraju i pojačavaju, a onda dovode na panel na kome se povezuju na određena mesta koja su definisana (adrese priključka), a koja programski paket, koji je instaliran na računaru, prepoznaje. Pri aktiviranju programskog paketa ta priključna mesta su definisana i dodeljene su adrese svakog od potencijalnih priključaka. Time se uspostavlja prva komunikacija sa programskim paketom. Pošto se zna koja je fizička veličina merena, a njen električni signal je doveden na određeno mesto na panelu, računar ga prepoznaje (naravno, računar "ne zna" koja se fizička veličina meri već samo detektuje na određenoj adresi vrednost električnog (u razmatranom sistemu naponskog) signala). Tako dovedeni signali do priključnog panela, dalje prolaze kroz filtre, da bi se smanjio šum, i do pretvarača (A/D konvertora) koji analogne vrednosti signala pretvara u digitalni signal, koji računar prepoznaje. Takav signal i informacija o njegovoj veličini dolazi do programskog paketa.

Današnji programski paketi u sebi sadrže mnogobrojne opcije koje se mogu koristiti u cilju načina predstavljanja merenih veličina, njihovog ažuriranja i korišćenja u cilju regulacije procesa. U programskom paketu se definišu sve poznate funkcionalne zavisnosti ili vrednosti dobijene eksperimentalnim putem, tako da se na osnovu signala sa prigušne ploče koji je od pritiska pretvoren u napon, pa potom u digitalnu veličinu na kraju može izraziti koliko, na primer, m^3/h vazduha protiče našim cevovodom i mi tu veličinu možemo pratiti na monitoru, a u isto vreme ažurirati u određenoj bazi podataka.

Savremeni programski paketi u znatnoj meri olakšavaju merenje temperature, time što je potrebno samo definisati tip termopara (na primer K-tip, R-tip, J-tip itd., a što je funkcija materijala od koga je napravljen i mernog opsega koji meri) i pravilno priključiti termopar na za to predviđena mesta na panelu, a sam paket u sebi sadrži baždarne krive za određene tipove uređaja i direktno daje informaciju o temperaturi u kojoj se nalazi vrh termopara (ipak, praktičan savet je da se uvek pri povezivanju akvizicionog sistema eksperimentalno proveriti tačnost, da bi se preduprile greške tokom merenja).

Kontrola procesa se obavlja na osnovu podataka koji su prikupljeni sa sistema a prema raspoloživim izvršnim organima koji tu kontrolu moraju sprovesti. U biohemijskim procesima izvršni organi su pre svega grejači, ventili i otpornici kojima se regulišu temperature, protoci i brojevi obrtaja. Da bi se izvršni organi aktivirali potrebno je da poseduju regulatore koji dobijaju određene signale prema kojima dalje izvršavaju određenu radnju do željenog nivoa. Signali koji mogu doći do regulatora su ili analogni ili digitalni. Konforniji je rad sa anlognim signalima ali su regulatori povezani sa izvršnim organima, u ovom slučaju, daleko skuplji u odnosu na regulatore koji primaju digitalne signale (na primer električne sklopke, koje reaguju na sistem uključeno – isključeno u odnosu na znatno veću cenu anlognog regulatora otvorenosti ventila). Prema prirodi izvršnog organa obezbeđuje se i tip signala koji izlazi iz akvizicionog sistema. Za jednostavniju kontrolu temperature se mogu koristiti digitalni izlazni signali koji se slično kao kod ulaza signala, sa određene adrese vode ka odgovarajućim relejima koji aktiviraju električne sklopke, koje uključuju ili isključuju grejače i time regulišu temperaturu na određenom nivou.

8. ZAVRŠNA FAZA U BIOTEHNOLOŠKOJ PROIZVODNJI

Fermentaciona tečnost (prevrela hranljiva podloga) na kraju bioprocesa sadrži proizvod koga je potrebno izdvojiti i prečistiti. Ona je složenog hemijskog sastava, jer, pored željenog proizvoda biosinteze, ona sadrži ostatke hranljive podloge i sporedne proizvode ćelijskog metabolizma. Prisutna jedinjenja mogu biti u različitom obliku, kao pravi ili koloidni rastvori, a deo njih može biti i u obliku suspendovanog taloga. Ćelije biokatalizatora su uvek prisutne bez obzira da li su željeni proizvod ili su proizvod životne aktivnosti nastao tokom sinteze željenog metabolita. Prevrela podloga je, u principu, zasićena gasovima, obično ugljendioksidom.

Za dobijanje proizvoda željenih karakteristika u završnoj fazi proizvodnje potrebno je izdvojiti, prečistiti, završno obraditi i formulisati proizvod. Izdvajanje željenog proizvoda biosinteze nije nimalo lak zadatak, a treba ga obaviti što uspešnije i što racionalnije. Cilj je da se dobije proizvod koji će ispunjavati sve zahteve kvaliteta, a da pri tome oprema za njegovo izdvajanje bude što jednostavnija jer troškovi izdvajanja i prečišćavanja proizvoda iznose i više od 50% ukupnih proizvodnih troškova.

Postupak izdvajanja i prečišćavanja proizvoda zavisi od velikog broja faktora, među kojima su najbitniji:

- vrsta bioprocesa (enzimski ili ćelijski katalizovan bioprocen),
- lokacija proizvoda kod ćelijski katalizovanih bioprocesa (intracelularno ili ekstracelularno),
- koncentracija proizvoda,
- fizičke i hemijske osobine proizvoda,
- vrste pratećih nečistoća u prevreloj hranljivoj podlozi,
- namena proizvoda (farmacija, prehrana, hemijska sinteza),
- zahtevi čistoće proizvoda i
- mogućnost plasmana i cena proizvoda na tržištu.

Pri izboru postupka izdvajanja proizvoda dobijenih mikrobnom biosintezom, najčešći problemi su: mala koncentracija proizvoda, prisustvo mikrobnih ćelija u prevreloj podlozi, nestabilnost proizvoda i razgradnja proizvoda pod uticajem sekundarne kontaminacije. Na sledećem primeru može se videti koliki je uticaj koncentracije proizvoda u fermentacionoj tečnosti na njegovu tržišnu cenu. U biosintezi limunske kiseline njena koncentracija je oko 100 g/dm^3 , a prodajna cena iznosi 1 do 2 \$/kg. Prilikom biosinteze terapijskih proteina postiže se koncentracija u podlozi oko $0,01 \text{ mg/dm}^3$, a prodajna cena je 100.000.000 \$/kg.

Ako je proizvod nestabilan i podložan infekciji, izdvajanje se mora izvesti u što kraćem roku. Bez obzira na to, u svim fazama izdvajanja proizvoda moraju se održavati optimalni uslovi izvođenja postupka i očuvanja proizvoda. Izuzetno je retko da se izdvajanje proizvoda može izvršiti sa-

mo jednim zahvatom. Najčešće se izdvajanje može uspešno izvršiti primenom više uzastopnih faza. Pri tom izboru treba postupiti maksimalno racionalno, ali, odabrani postupak i oprema ne smeju biti ograničavajući faktori kvaliteta proizvoda.

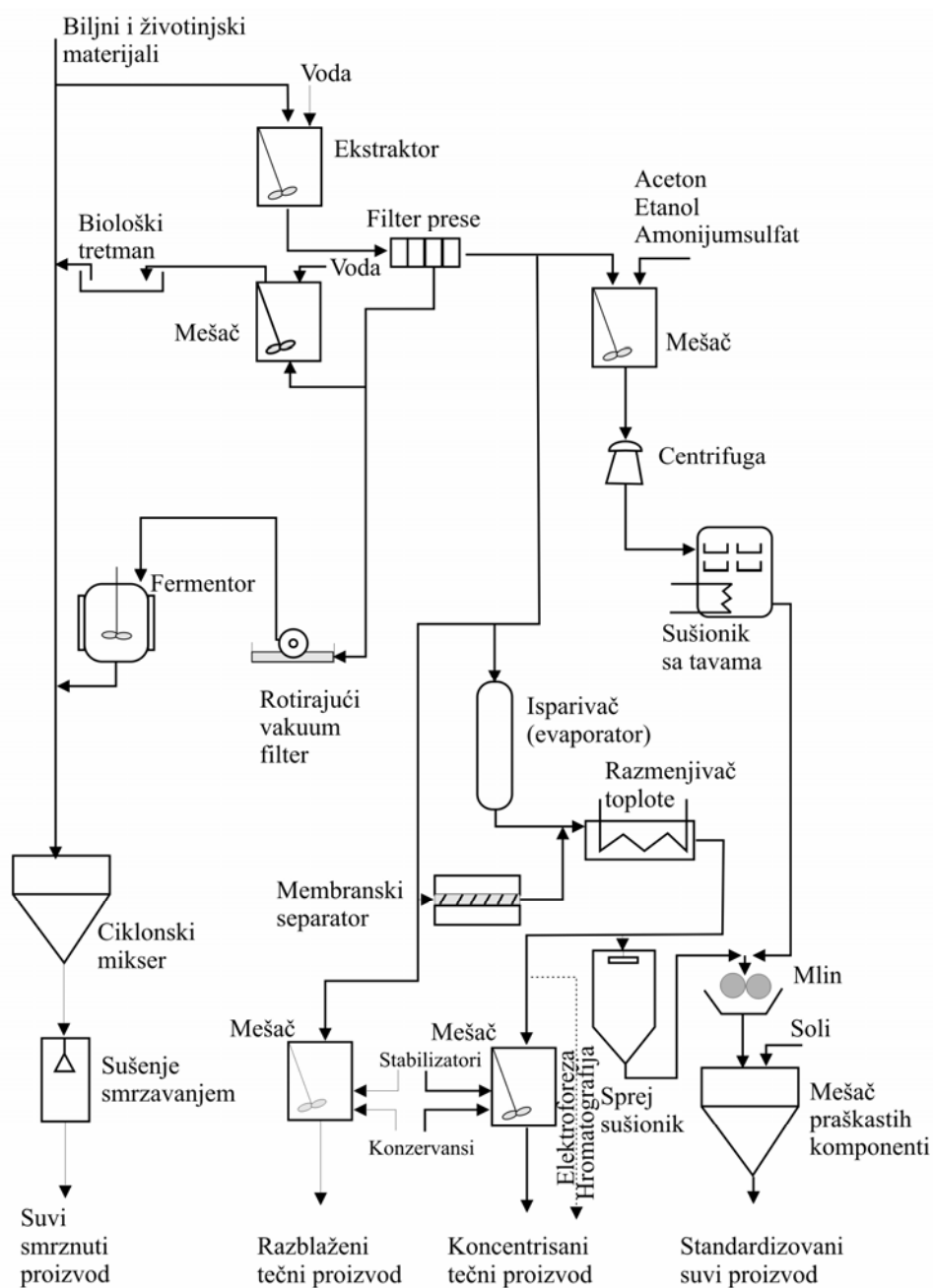
Iako ne eksplicitno, može se zaključiti da su složenost i cena postupka izdvajanja i prečišćavanja, kao i kvalitet proizvoda u funkciji ukupnog biotehnološkog postupka, počevši od kvaliteta sirovina, preko izbora optimalnog biokatalizatora, kontrole i upravljanja bioprocenom i vrste i količine upotrebljenih pomoćnih sirovina itd.

U izvođenju postupka izdvajanja proizvoda biosinteze mogu se primeniti praktično sve tehnološke operacije, koje su u funkciji efikasnosti i očuvanja ili poboljšanja kvaliteta proizvoda. Postrojenje za izdvajanje proizvoda, kao i sve linije biotehnološkog postrojenja, projektuju se tako da se najpovoljnijom kombinacijom različitih procesa i operacija omogući dobijanje proizvoda na najefikasniji i što ekonomičniji način za date uslove. Šema jedne složene biotehnologije, a sa uključenim tehnološkim operacijama, data je na slici 8.1. Opšta šema izdvajanja i prečišćavanja proizvoda je prikazana u tabeli 8.1.

Tabela 8.1 Opšta šema postupka izdvajanja i prečišćavanja proizvoda

FERMENTACIONA TEČNOST	
<i>PRIPREMA FERMENTACIONE TEČNOSTI</i>	
Podešavanje pH	Zagrevanje/hlađenje
Dodatak enzima	
<i>IZDVAJANJE MIKROBNIH ČELIJA</i>	
Filtracija	
Centrifugiranje	
<i>EKSTRAĆELIJSKI PROIZVOD</i>	<i>INTRAĆELIJSKI PROIZVOD</i>
	Dezintegracija ćelija
	Separacija ostataka ćelija
<i>KONCENTRISANJE PROIZVODA</i>	
Taloženje	Ekstrakcija
Adsorpcija	Dijaliza
Uparavanje	Destilacija
<i>PREČIŠĆAVANJE PROIZVODA</i>	
Kristalizacija	
Hromatografija	
<i>ZAVRŠNA OBRADA PROIZVODA</i>	
Sušenje	Mlevenje
Prosejavanje	Umešavanje
PROIZVOD	

U principu, u postupku izdvajanja i prečišćavanja proizvoda biosinteze, primenjuju se tehnike koje se koriste u hemijskoj tehnologiji, ali prilagođene specifičnim zahtevima bioprocena. Pored opštih postupaka, razvijeni su i posebni postupci za specifične bioprocene.



Slika 8.1 Šema složenog biotehnološkog postupka proizvodnje sa naznačenim tehnološkim procesima i operacijama

Po završetku procesa biosinteze mora se obaviti priprema fermentacione tečnosti, da bi se olakšalo izdvajanje mikrobne biomase. Vrsta pripreme zavisi od vrste proizvoda, vrste ćelija i sastava fermentacione tečnosti. Priprema može uključivati i podešavanje pH, zagrevanje, dodatak enzima ili hemikalija za razaranje ćelijskog zida ili sredstva za flokulaciju ćelija itd.

Iz fermentacione tečnosti se odvaja biomasa, najčešće postupkom filtracije ili centrifugisanjem, a dalji postupak zavisi od toga gde se proizvod nalazi, u biomasi ili tečnosti. Ako je mikrobna masa proizvod, ona se dalje može sušiti, mleti i potom umešavati sa drugim sirovinama, a ako je proizvod lociran intraćelijski, potrebno je ćelije prvo razoriti, a potom obaviti izdvajanje proizvoda.

Proizvod se u filtratu koncentriše taloženjem, ekstrakcijom, adsorpcijom, dijalizom, ultrafiltracijom, uparavanjem, destilacijom itd. Često je potrebno kombinovati više postupaka da bi se dobio željeni stepen koncentrisanja proizvoda.

Posle izolacije i koncentrisanja proizvoda sledi prečišćavanje proizvoda, najčešće hromatografskim metodima, membranskom separacijom, adsorpcijom, kristalizacijom i dr.

Nakon toga se vrši finalna obrada proizvoda do njegovog komercijalnog oblika. Ona obuhvata sušenje, mlevenje, prosejavanje, mešanje sa drugim komponentama i na kraju pakovanje.

8.1. IZDVAJANJE NERASTVORNIH PROIZVODA

Svi ekstraćelijski proizvodi metabolizma su rastvorni u vodi jer to je prirodni uslov njihovog izlučivanja iz ćelije. Jedini u vodenoj sredini nerastvoran proizvod biosinteze jeste biomasa proizvodnog organizma. Prema tome, pod izdvajanjem nerastvornih proizvoda podrazumeva se izdvajanje biomase proizvodnog organizma iz fermentacione tečnosti. Za to se koriste klasični metodi separacije čvrsto – tečno:

- filtracija,
- centrifugisanje,
- taloženje i
- membranska separacija.

8.1.1. Filtracija

Filtracija je odvajanje suspendovane čvrste faze od tečnog medijuma. Ona se odvija zahvaljujući razlici u pritisku ispred i iza filtracionog medijuma, a to se postiže ili hidrostatičkim pritiskom (nad pritiskom iznad suspenzije) ili vakuumom iza filtracionog medijuma. Za pospešivanje procesa filtracije u suspenziju se mogu dodavati i supstance koje neće narušiti hemijske karakteristike proizvoda (elektroliti), ali će pospešiti koagulaciju koloidnih čestica u suspenziji i time olakšati filtriranje.

Filtracija može biti:

- filtracija kroz filtracionu pogaču,

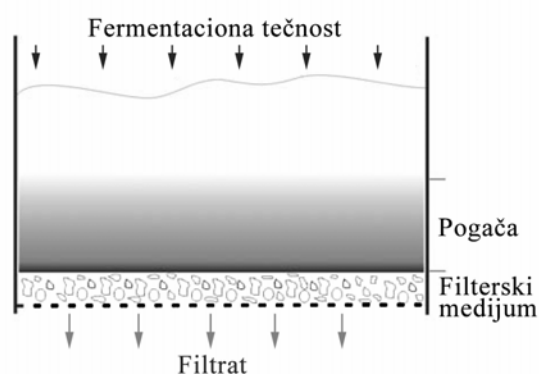
- unakrsna filtracija i
- filtracija na obrtnom vakuum filtru.

Filtracija kroz filtracionu pogaču

Prilikom *filtracije kroz filtracionu pogaču* fermentaciona tečnost protiče normalno na filtracioni medijum, pri čemu se obrazuje filtraciona pogača (slika 8.2). Brzina filtracije zavisi od razlike pritiska ispred i iza filtracionog medijuma, filtracione površine, otpora filtracione pogače i mase sakupljene biomase, viskoziteta tečnosti i otpora filtracionog medijuma. Čvrsta faza se odvaja u vidu pogače, koja pomaže filtraciju. Formiranu pogaču je potrebno povremeno ili kontinualno odstranjivati iz filtra, jer nagomilavanje čvrste faze povećava otpor proticanju i povećava otpor koji je potrebno savladati tokom filtracije.

Filtracija se izvodi kroz sloj materijala određene granulacije (pesak, diatomejska zemlja – kiselgur itd.) ili kroz posebno konstruisane medijume za filtraciju (papir, tekstil, keramika itd.), čije pore moraju biti manje od veličine čestica suspendovane čvrste faze.

Stišljivost biomase može izazvati probleme pri filtraciji i ispiranju pogače. U cilju prevazilaženja ovih problema, u fermentacionu tečnost se dodaje infuzorijska zemlja ili perlit, kako bi se zadržala određena struktura filtracione pogače. Ovaj postupak se primenjuje u slučajevima sa relativno malim sadržajem suspendovanih materija u odnosu na ukupnu količinu tečne faze (na primer, filtriranje piva i vina), zbog toga što je problem povremenog čišćenja filtara manji.



Slika 8.2 Šematski prikaz postupka filtracije kroz filtracionu pogaču

Brzina filtracije. Osnovna veličina koja se određuje pri filtraciji je brzina filtracije:

$$\frac{1}{A} \frac{dV_f}{dt} = \frac{\Delta P}{\mu_f \left[\alpha \left(\frac{M_c}{A} \right) + R_m \right]} \quad (8.1)$$

gde je: A – filtraciona površina, V_f – zapremina profiltrirane tečnosti, t – vreme filtracije, ΔP – pad pritiska kroz filter, μ_f – viskozitet tečnosti, M_c – ukupna masa u filtracionoj pogači, α – specifična otpornost filtracione pogače i R_m – specifična otpornost filtracionog medijuma.

Kada je filtraciona pogača stišljiva (kompresibilna), onda se njena specifična otpornost menja sa promenom pada pritiska tokom filtracije, pa je:

$$\alpha = \alpha' (\Delta P)^s \quad (8.2)$$

gde je: α' – konstantna vrednost zavisna od morfologije čestica u filtracionoj pogači i S – kompresibilnost pogače (jednaka je 0 za čvrste nekompresibilne medijume).

Specifična otpornost filtracione pogače zavisi od karakteristika čestica u njoj pa je:

$$\alpha = \frac{K_v a^2 (1 - \varepsilon)}{\varepsilon^3 \rho_p} \quad (8.3)$$

gde je: K_v – faktor oblika čestica u filtracionoj pogači, a – specifična površina čestica u pogači, ε – poroznost pogače i ρ_p – gustina čestica.

Kada se u jednačinu (8.1) zameni $M_c = cV_f$, dobija se:

$$\frac{1}{A} \frac{dV_f}{dt} = \frac{\Delta P}{\mu_f \left[\alpha \left(\frac{cV_f}{A} \right) + r_m \right]} \quad (8.4)$$

gde je: c – masa čvrste faze izdvojena po zapremini profiltrirane tečnosti.

Kako se ceo problem kod filtracije, zapravo, svodi na eksperimentalno određivanje veličina α i R_m , to se nakon integrisanja i preuređenja jednačine (8.4) dobija:

$$\frac{t}{V_f} = \left(\frac{\mu_f \alpha \cdot c}{2A^2 \Delta P} \right) V_f + \left(\frac{\mu_f R_m}{A \Delta P} \right) \quad (8.5)$$

odnosno:

$$\frac{t}{V_f} = K_1 V_f + K_2 \quad (8.6)$$

gde su: K_1 i K_2 – konstante tokom filtracije.

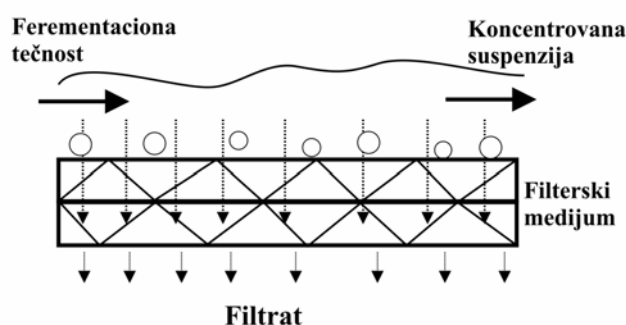
Praćenjem promene $\frac{t}{V_f}$ sa V_f tokom filtracije, dobija se prava sa nagibom K_1 i odsečkom K_2 , gde su:

$$K_1 = \frac{\mu_f \alpha \cdot c}{2A^2 \Delta P} \quad (8.7)$$

$$K_2 = \frac{\mu_f R_m}{A \Delta P} \quad (8.8)$$

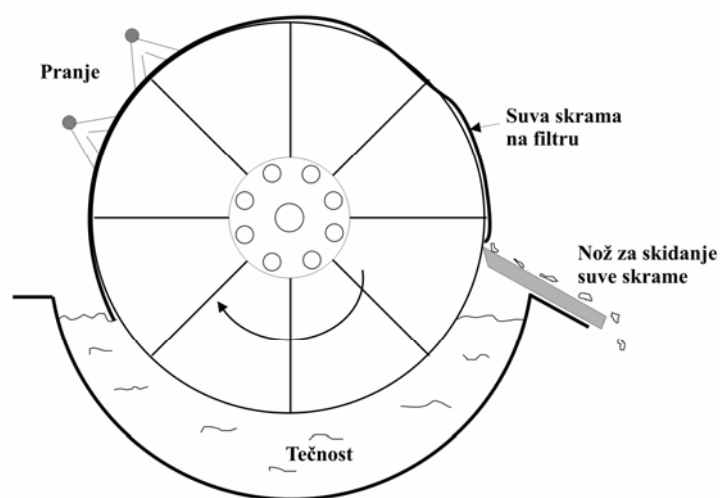
Nagib K_1 zavisi od pada pritiska i karakteristika filtracione pogače, dok odsečak K_2 zavisi samo od pada pritiska, a ne zavisi od karakteristika filtracione pogače.

Unakrsna filtracija se obavlja tako što suspenzija struji preko filtracione površine tangencijalno (slika 8.3), odnoseći čvrste čestice sa filtracionog medijuma, pa se ostvaruju 100 do 1000 puta veće brzine filtracije nego filtracijom kroz filtracionu pogaču. Posebni slučajevi unakrsne filtracije su *mikrofiltracija* i *ultrafiltracija*.



Slika 8.3 Šematski prikaz unakrsne (tangencijalne) filtracije

Obrtni vakuum filtri se šire koriste, pošto mogu raditi kontinualno, uz istovremenu filtraciju i odvajanje čvrste faze. Imaju oblik horizontalnog cilindra (slika 8.4), dužine 0,5 do 3 m, koji je se okreće brzinom 0,1 do 2 obrtaja/min. Filtraciono platno je obavijeno oko cilindra unutar koga se ostvaruje vakuum. Cilindar rotira, delimično potopljen u suspenziji. Usled vakuuma, tečnost ulazi u cilindar, odakle se odvodi, dok se čvrsta faza se zadržava na površini filtracionog platna i polako rotira sa njim. Često se na tom putu ugrađuju mlaznice za ispiranje čvrste faze, kako bi se ona potpuno prečistila od tečne faze iz suspenzije, a potom se neposredno pre ponovnog kvašenja u suspenziji, pomoću strugača izdvaja čvrsta faza. Na taj način filtracija teče kontinualno.

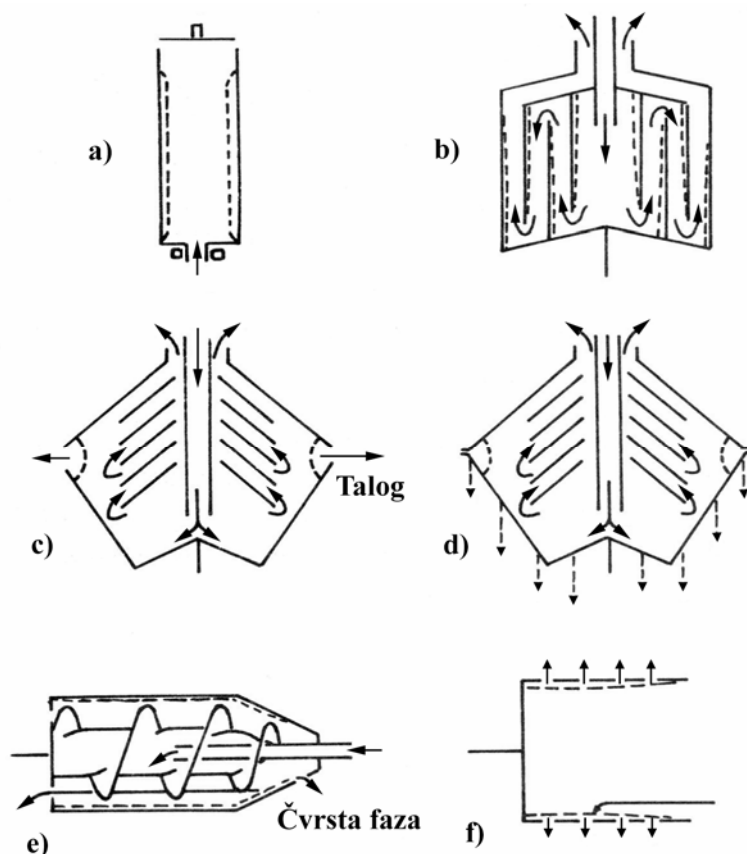


Slika 8.4 Šematski prikaz rada rotirajućeg vakuum filtra

8.1.2. Centrifugisanje

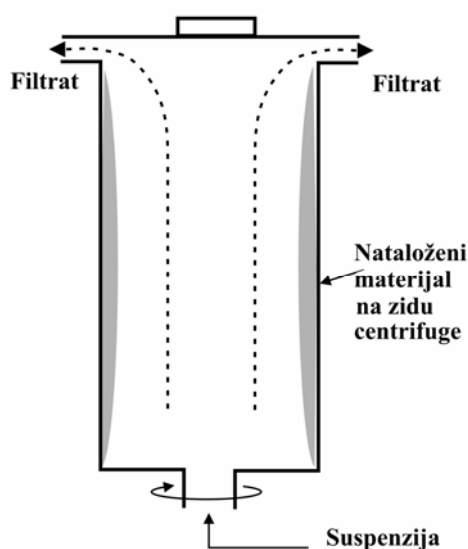
Centrifugisanje se koristi za odvajanje materijala bliskih gustina, koji zahtevaju silu veću od sile zemljine teže, i u slučajevima kada je filtracija spora ili nedovoljno efikasna. Centrifugisanje se koristi u bioprocima za: uklanjanje ćelija i ćelijskih ostataka iz fermentacione tečnosti, izdvajanje istaložene materije i bistrenje fermentacione tečnosti. Oprema za izvođenje centrifugisanja je složenija i skuplja od opreme za filtraciju, ali je i efikasnija.

Centrifuge se dele na filtracione i taložne, a najčešće se koriste cevne, višekomorne i filtracione dobošaste centrifuge, koje su prikazane na slici 8.5.

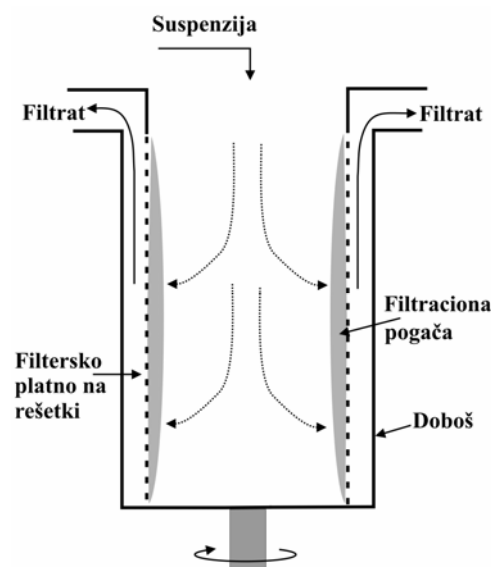


Slika 8.5 Tipovi centrifuga: a) cevna, b) višekomorna, c) disk separator, d) disk separator sa samopražnjenjem, e) pužna i f) dobošasta

Cevna centrifuga je najjednostavnija ali je relativno malog kapaciteta u odnosu na čvrstu fazu (slika 8.6).



Slika 8.6 Šematski prikaz cevne centrifuge



Slika 8.7 Šematski prikaz dobošaste centrifuge

Višekomorna centrifuga odvaja čvrstu fazu po istom principu kao i cevna, ali ima veći kapacitet i manju brzinu obrtanja (zbog većeg prečnika) u odnosu na cevnu. Primenjuje se za separaciju suspenzija sa najviše 5% čvrste faze veličine od 0,1 do 200 μm .

Dobošasta centrifuga se koristi kao filtraciona centrifuga, ali ima ograničen kapacitet i može doći do zapušavanja biološkim materijalom (slika 8.7). Kod ovakve konstrukcije centrifuge se može postići sila 13 do 16 puta veća od sile zemljine teže.

Ultracentrifuge su još složenije konstrukcije, manjeg su kapaciteta, a postižu silu od 105 do 106 sile zemljine teže, pri čemu se radi u inertnoj atmosferi, da bi se smanjile sile trenja i generisanje toplote. Najčešća primena je kod proizvodnje vakcina, gde treba izdvojiti ćelijske ostatke iz tečnosti.

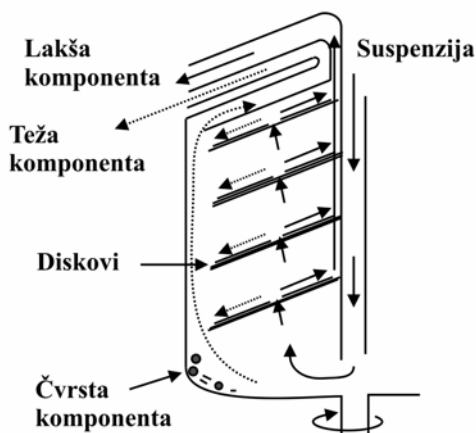
Tanjiraste centrifuge su alternativa cevnim centrifugama i rade se u više tipova (slika 8.8). Izrađuju se sa kontinualnim odvajanjem čvrste faze, uz eventualno pranje uređaja bez prekidanja procesa.

Mehanizam odvajanja čvrstih komponenti pri centrifugisanju (slika 8.9) se objašnjava na sledeći način. Kod taloženja, koje se centrifugisanjem ubrzava, terminalna brzina ili brzina taloženja – u_g je:

$$u_g = \frac{d_p^2(\rho_p - \rho_f)g}{18\mu} \quad (8.9)$$

dok je brzina taloženja pri centrifugiranju – u_c :

$$u_c = \frac{d_p^2 (\rho_p - \rho_f) w^2 r}{18\mu} \quad (8.10)$$



Slika 8.8 Šematski prikaz tanjiraste centrifuge

Odnos brzina taloženja u centrifugalnom i gravitacionom polju je:

$$S = \frac{w^2 r}{g} \quad (8.11)$$

i naziva se *efekat centrifuge* ili Σ faktor.

Za poređenje karakteristika centrifuga koristi se *sigma faktor*, koji fizički predstavlja polovinu površine poprečnog preseka taložnika koji bi imao isti kapacitet kao centrifuga, a definiše se kao:

$$S = \frac{Q}{2u_g} \quad (8.12)$$

gde je: Q – zapreminski protok tečne faze, a u_g – brzina taloženja u gravitacionom taložniku.

Takođe, poređenje dve centrifuge je moguće odrediti na osnovu jednakosti:

$$\frac{Q_1}{S_1} = \frac{Q_2}{S_2} \quad (8.13)$$

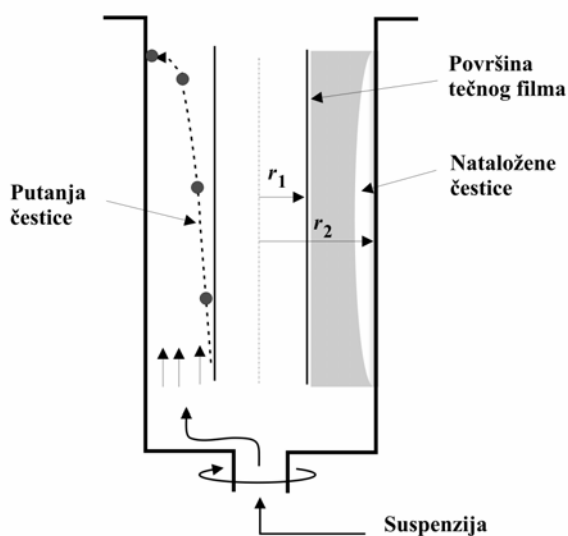
Vrednost Σ faktora je:

- za tanjiraste (disk) centrifuge:

$$S = \frac{2\pi w^2 (N - 1)}{3g \tan \theta} (r_2^3 - r_1^3) \quad (8.14)$$

gde je: N – broj tanjira u centrifugi, r_2 i r_1 – spoljni i unutrašnji poluprečnik tanjira (slika 6.7), a θ – ugao pod kojim tanjir (disk) stoji.

Slika 8.9 Šematski prikaz mehanizma izdvajanja čvrstih komponenti pri centrifugisanju



- za cevne centrifuge:

$$S = \frac{\pi w^2 b}{2g} 3(r_2^2 - r_1^2) \quad (8.15)$$

gde je: b – dužina cevi, r_2 – poluprečnik cevi i r_1 – poluprečnik do tečnog filma.

3.1.3. Koagulacija i flokulacija

Koagulacija i flokulacija se prvenstveno koriste u pripremi vode za uklanjanje suspendovanih i koloidno rastvorenih supstanci. U izdvajanju proizvoda iz fermentacionih tečnosti koriste se kao priprema za izdvajanje centrifugisanjem.

Koagulacijom se pojedinačne ćelije proizvodnog organizma grupišu u flokule manjih dimenzija, a flokulacijom se flokule malih dimenzija spajaju u krupnije. Na taj način se povećava efikasnost izdvajanja mikrobne biomase centrifugisanjem. Koagulantni su elektroliti manje molekulske mase, kao što su kiseline, baze i neke soli. Sredstva za koagulaciju su relativno jeftina i pristupačna, ali im je efekat formiranja flokula nedovoljan za uspešnu separaciju. Flokulanti su makromolekularna organska jedinjenja, rastvorna u vodi. Mogu biti nejonogenog, anjonskog ili katjonskog karaktera, a većina su polielektroliti.

U cilju poboljšanja efekata koagulacije i flokulacije mikrobne biomase kada ona nije finalni proizvod, upotrebljavaju se različiti adsorbensi, kao što su aktivni ugalj i bentoniti.

Izbor vrste i količine koagulanata i flokulanata za izdvajanje biomase zavisi od karakteristika fermentacione tečnosti i oblika u kom se nalazi biomasa (pojedinačne ćelije ili ćelijske asocijacije). Za izbor koagulanata i flokulanata značajno je i to da li je njihova primena dozvoljena u skladu sa namenom proizvoda (prehrana, farmacija ili hemijska industrija). U tabeli 8.2 navedeni su primeri primene pojedinih flokulanata u zavisnosti od prirode hranljive podloge.

Tabela 8.2 Primeri korišćenja pojedinih flokulanata i njihovih doza (g/100 g suve biomase)

<i>Agens</i>	<i>Glukoza izvor C</i>	<i>Ugljovodoni izvori C</i>	<i>Suspendovane ćelije u puferu</i>	<i>Razblažena podloga</i>
Anjonski polielektroliti				0,05 – 4,5
- polistiren sulfat	0,2	0,1	0,06	
Katjonski polielektroliti				
- polietilenimin	10		7,0	
Koloidni lepak i bentonit	2,0	2,0	0,6	
Neorganski				0,05 – 4,5

8.1.4 Destilacija

Destilacija se koristi za izdvajanje isparljivih proizvoda metabolizma, kao što su niži alkoholi (etanoli i butanoli). Najšire se primenjuje u proizvodnji etanola i žestokih alkoholnih pića (voćne rakije).

Zavisno od željene čistoće destilata, koriste se prosti uređaji za destilaciju bez povratnog fluksa (destilacioni kazani) ili složeniji uređaji tipa destilacionih kolona sa višestruko ponovljenim razdvajanjem isparljive faze. Ponovljeno isparavanje vrši se na podovima destilacione kolone i efikasnost izdvajanje se povećava sa brojem podova.

Destilacijom se ne može postići ni dovoljan stepen prečišćavanja ni dovoljna koncentracija proizvoda. U cilju daljeg prečišćavanja i koncentrisanja koriste se rektifikacione kolone koje su po konstrukciji identične destilacionim kolonama.

8.2. DEZINTEGRACIJA MIKROBNIH ĆELIJA

Iako se preovlađujući broj proizvoda biosinteze izlučuje iz ćelije u okolinu (ekstracelularno), izvestan broj proizvoda ostaje u ćeliji (intracelularno). Da bi se ovi proizvodi biosinteze mogli izolovati, neophodno je razoriti ćelijski zid, da bi proizvod bio oslobođen u okolni prostor iz koga se, zatim, može izolovati. Ćelijski zid se može razoriti fizičkim delovanjem i hemijskom ili enzimskom hidrolizom. Dezintegracija ćelija je dodatna faza u izolaciji proizvoda, koja izolaciju čini skupljom. Pošto su intraćelijski proizvodi biosinteze obično veoma vredni i traženi na tržištu, složenost postupka se, u principu, isplati. U nekim slučajevima nije neophodno proizvod u potpunosti osloboditi ostalih sastojaka ćelije, jer se može koristiti i sa drugim komponentama ćelijskog sadržaja. Kada je to moguće, uvek treba izolovati više proizvoda biosinteze sadržanih u ćeliji, što postupak čini isplativijim.

Problem izolacije intraćelijskih proizvoda biosinteze je to što je većina labilna, na primer, makromolekulska jedinjenja sa sekundarnom i tercijalnom strukturom. Postupak dezintegracije mora biti pažljivo odabran, da se ne bi umanjio prinos ili kvalitet proizvoda. Pregled postupaka za dezintegraciju mikrobnih ćelija dat je u tabeli 8.3.

Tabela 8.3 Pregled postupaka za dezintegraciju mikrobnih ćelija

<i>DEZINTEGRACIJA MIKROBNIH ĆELIJA</i>			
<i>NEMEHANIČKI POSTUPCI</i>		<i>MEHANIČKI POSTUPCI</i>	
Liza	Desikacija Sušenje zamrzavanjem	Smicanje u čvrstom stanju	Smicanje u tečnosti
Fizički Osmotski šok Pritisak		Presa Kuglični mlin	Ultrazvuk Visokopritisni homogenizator
Hemijski Baze ili kiseline Deterdženti Rastvarači			
Enzimi			

Mnogi od navedenih postupaka mogu biti nepogodni za industrijsku primenu. Ovo se prvenstveno odnosi na nemehaničke postupke dezintegracije, jer oni zahtevaju primenu agenasa koji mogu oštetiti proizvod, a u sistem unose svoj sadržaj. Izuzetak je enzimska hidroliza ćelijskog zida, koja ima veliku perspektivu, jer je proces hidrolize strogo usmeren i bez štetnog delovanja na proizvod. Za sada, u industrijskoj praksi preovlađuju mehanički postupci.

Postupci smicanja su najčešće primenjivani postupci za dezintegraciju ćelija u industrijskim pogonima. Izvode se na dva načina: smicanjem ćelija koje su u obliku paste ili u obliku suspenzije. Za smicanje u obliku paste koriste se kuglični mlinovi, a za smicanje u obliku suspenzije koriste se uređaji pod visokim pritiskom ili udarom mlaza suspenzije o nepokretnu površinu.

Kuglični mlinovi koriste se za dezintegraciju ćelija u obliku paste. Mlin se sastoji od horizontalnog cilindra unutar kojeg se nalazi osovina sa diskom i mešačem. Unutar cilindra nalaze se čelične ili staklene kuglice. Pri smicanju razvija se toplota, koja se mora odvesti da ne bi došlo do termičke razgradnje proizvoda. Kuglični mlin je šematski prikazan na slici 8.10.

Princip delovanja je sledeći. U cilindar mlina se ubacuju ćelije u obliku paste. Obrtanjem cilindra sa kuglicama dolazi do smicajnih sila koje razaraju ćelijski zid. Da bi se sprečilo odnošenje kuglica iz cilindra, na kraju vratila, pre izlaznog otvora iz mlina je postavljeno sito ispred koga je, disk koji rotira sa vratilom. Sito ima otvore, koji su manji od najmanje kuglice.

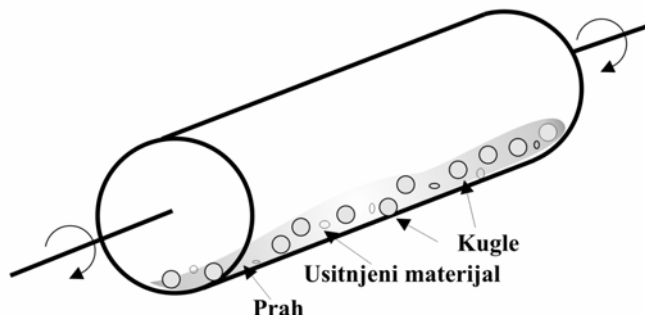
Efikasnost destrukcije ćelije može se pratiti preko količine oslobođenih proteina prema jednačini:

$$\frac{dR}{dt} = k_d (R_m - R) \quad (8.16)$$

gde je: R – količina oslobođenih proteina, R_m – maksimalna količina proteina koja se može osloboditi i k_d – konstanta brzine razaranja ćelija.

Integriranjem jednačine (8.16) dobija se:

$$\ln \frac{R_m}{(R_m - R)} = k_d \cdot t \quad (8.17)$$



Slika 8.10 Kuglični mlin

Konstanta brzine razaranja ćelija zavisi od temperature, brzine obrtanja vratila, količine i veličine kuglica i koncentracije ćelija u suspenziji. Ona se može odrediti eksperimentalno za standardnu konstrukciju mlina. Optimalna količina kuglica u mlinu, sa aspekta potrebne snage mešanja i efekta dezintegracije, je 80–95% zapremine praznog prostora cilindra. Kuglice sa prečnikom većim od 1 mm su efikasnije za dezintegraciju micelijskih mikroorganizama, dok su za dezintegraciju mikrobnih, animalnih i biljnih ćelija efikasnije kuglice prečnika manjeg od 1 mm. Za dezintegraciju bakterijskih ćelija potrebno je više ponovljenih mlevenja.

Visokopritisni homogenizator. Ovi dezintegratori uključuju klipnu crpku sa jednim ili više klipova. Na izlazu iz crpke se nalazi suženi otvor, čija se veličina može podešavati. Suspenzija ćelija pod visokim pritiskom prolazi kroz otvor gde se brzina kretanja suspenzije poveća i do 300 m/s što je praćeno naglim smanjenjem pritiska koji izaziva nastajanje kavitacionih mehurova u suspenziji ćelija. Nakon izlaska iz uskog otvora, brzina kretanja suspenzije ponovo opada, a pritisak raste, što izaziva imploziju kavitacionih mehurova. Sve ovo izaziva intenzivnu turbulenciju, koja ima za posledicu razaranje ćelije. Radi potpunog razaranja ćelija suspenzija se propušta kroz homogenizator više puta. Izgled visokopritisnog homogenizatora prikazan je na slici 8.11.

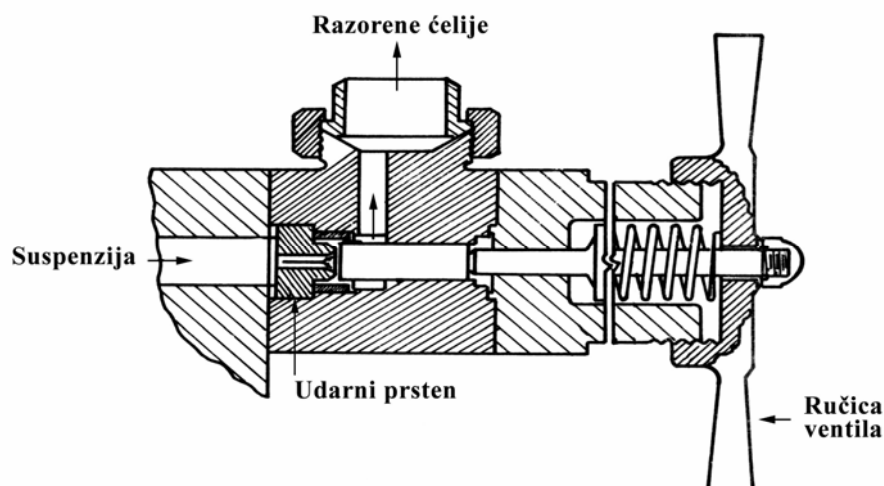
Oslobađanje proteina iz ćelije zavisi od pritiska i od broja prolaska ćelijske sauspenzije kroz homogenizator:

$$\ln \frac{R_m}{(R_m - R)} = k_d n_p P^a \quad (8.18)$$

gde je: n_p – broj prolazaka suspenzije ćelija kroz homogenizator i a – eksponent zavisen od vrste mikroorganizama (za *S. cerevisiae* 2,9; za *E. coli* 2,2).

Radni pritisak u homogenizatoru iznosi 50 – 60 MPa. Izbor pritiska je značajan zbog ekonomičnosti rada homogenizatora jer je potrošnja snage linearna funkcija radnog pritiska (3,5 kW/100 MPa). Pošto je u pitanju adijabatska kompresija, sa porastom pritiska raste i oslobođena toplota, pa porast temperature iznosi 2 °C/10 MPa. Da toplota ne izazove termičku destrukciju proizvoda,

temperatura ne sme porasti iznad 40 °C, pa se suspenzija hladi između dva prolaska kroz homogenizator. Viskozitet suspenzije je, takođe, od značaja za uspešnost razaranja ćelija. Njegova maksimalna vrednost ne treba da pređe 1 Pa·s. Maksimalno prihvatljiva veličina ćelija je 20 µm (najbolje oko 2 µm), pa ovaj postupak nije pogodan za razaranje filamentoznih mikroorganizama i agregata ćelija.



Slika 8.11 Visokopritisni homogenizator

8. 3. IZDVAJANJE RASTVORENIH PROIZVODA

Rastvoreni proizvodi biosinteze uključuju ekstracelularne i intracelularne metabolite, koji su prešli u vodenu sredinu nakon razaranja ćelijske strukture. Većina postupaka za izdvajanje proizvoda, zavisno od selektivnosti u izdvajanju, primenjuje se i za prečišćavanje proizvoda. Od velikog broja razvijenih postupaka, najčešće se primenjuju:

- ekstrakcija,
- precipitacija,
- adsorpcija,
- ultrafiltracija i
- hromatografija.

8.3.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija tečno – tečno

Najznačajniju primenu ova vrsta izdvajanja proizvoda dobila je u proizvodnji penicilina i drugih antibiotika i metabolita. Metaboliti, koji su organskog karaktera, neutralne ili slabo bazne,

odnosno kisele prirode, rastvaraju se u organskoj fazi. Disocijacija slabih baza i kiselina se pri ekstrakciji potiskuje podešavanjem pH. Kod mnogih antibiotika kao rastvarač, ekstragens, koristi se amilacetat ili izoamilacetat. U principu, da bi bio primenjen, ekstragens mora biti netoksičan, selektivan, nemešljiv sa fermentacionom tečnošću, da ima što veći koeficijent raspodele za određeni proizvod i da je što jeftiniji. Najčešće upotrebljavani ekstragensi su: alifatski alkoholi (propanol, butanol), estri (amilacetat, butilacetat) i etri (dioksan, *n*-propiletar), ugljovodonici (frakcije petroletra), kao i aromatska (benzen, fenol) i heterociklična jedinjenja.

Koeficijent raspodele (distribucioni koeficijent). Ekstrakcija neke supstance iz jedne u drugu fazu zasnovana je na razlici u rastvorljivosti supstance u odnosu na te dve faze. Ako se supstanca raspoređuje između dve nemešljive tečnosti, odnos koncentracija supstance u te dve faze naziva se *koeficijent raspodele* K_D :

$$K_D = \frac{X_L}{X_H} \quad (8.19)$$

gde je: X_L – koncentracija supstance u ekstraktu i X_H – koncentracija supstance u fermentacionoj tečnosti.

Stepen koncentrisanja. On se izražava odnosom koncentracije supstance u ekstraktu i fermentacionoj tečnosti prema jednačini:

$$G_E = \frac{1}{\frac{L}{G_P} + \frac{1}{K_D}} \quad (8.20)$$

gde je: G_E – stepen koncentrisanja, L – količina rastvarača i G_P – količina fermentacione tečnosti.

Koeficijent selektivnosti. Ako fermentaciona tečnost sadrži više od jednog metabolita, selektivnost ekstragensa je veoma bitan faktor uspešnosti ekstrakcije. Koeficijent selektivnosti se definiše kao

$$\beta_{i,j} = \frac{K_i}{K_j} \quad (8.21)$$

gde je: $\beta_{i,j}$ – koeficijent selektivnosti, K_i – koeficijent raspodele supstance i i K_j – koeficijent raspodele supstance j .

Prelaz supstance iz jedne u drugu fazu definisan je zakonom o prenosu mase koji ima matematički oblik:

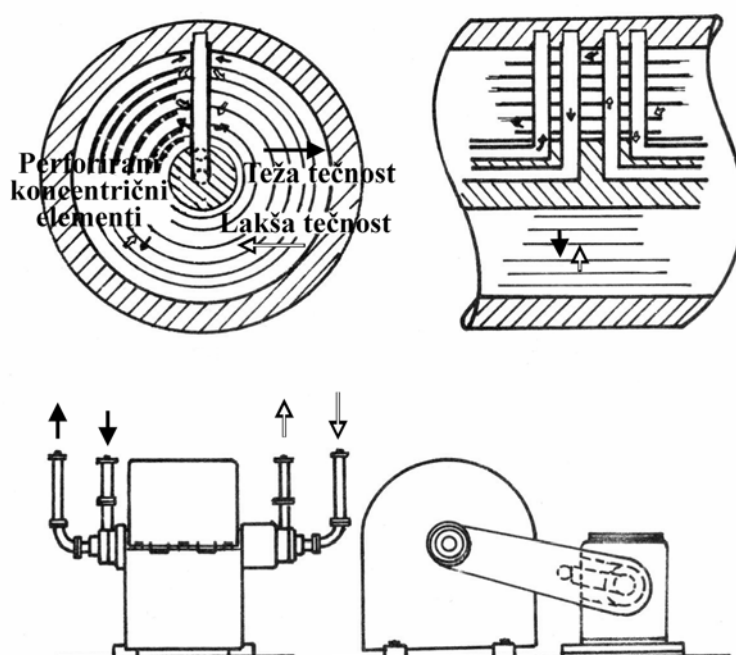
$$G_E = \frac{\Delta X \cdot A \cdot t}{R} \quad (8.22)$$

gde je: ΔX – pogonska sila ekstrakcije (srednja razlika između radne i ravnotežne koncentracije supstance), A – dodirna površina faza, t – vreme ekstrakcije i R – otpor prenosu supstance zbog unutrašnjeg trenja među molekulima.

Iz jednačine (8.22) sledi da se ekstrahovana količina supstance može povećati ako se produži vreme ekstrakcije, poveća dodirna površina i poveća pogonska sila ekstrakcije. Produžavanje vre-

mena ekstrakcije nije prihvatljivo zbog mogućnosti inaktivacije proizvoda i zbog ekonomskih razloga. U praksi se želi postići što veća kontaktna površina i što veća pogonska sila ekstrakcije. Povećanje kontaktne površine se postiže što boljim dispergovanjem rastvarača u podlozi mešanjem ili strujanjem u tankom sloju. Povećanje pogonske sile ekstrakcije može se postići ako se svež rastvarač bez supstance dovodi u kontakt sa podlogom koja sadrži supstancu. To se ostvaruje na dva načina, izvođenjem postupka ekstrakcije kontinualno ili protivstrujno.

Klasičan primer izdvajanja proizvoda biosinteze iz fermentacione tečnosti je ekstrakcija penicilina, eritromicina i tetraciklina. Ekstrakcija se izvodi centrifugalnim ekstraktorom, koji je pogodan za izdvajanje nestabilnih metabolita, jer je vreme ekstrakcije veoma kratko. Najpoznatiji je centrifugalni ekstraktor *Podbielniak*, koji je prikazan na slici 8.12.



Slika 8.12 Centrifugalni protivstrujni ekstraktor tipa *Podbielniak*

Ovaj ekstraktor je oblika rotirajućeg cilindričnog bubnja u kome su smešteni koncentrični perforirani cilindri. Rotacija se vrši oko horizontalne šuplje osovine. Fermentaciona tečnost se uvodi kroz šuplju osovinu (teža frakcija), a ekstragens (lakša frakcija) se uvodi po obodu bubnja. Brza rotacija (nekoliko hiljada obrtaja u minutu) ima za posledicu radijalno protivstrujno kretanje frakcija. Teža frakcija se kreće ka obodu cilindra, a lakša sa ekstrahovanom supstancom ka centru bubnja, odakle se one izводе. Usled rotacije i prolaska kroz perforacije na unutrašnjim dobošima, dolazi do intenzivnog mešanja frakcija na relativno dugom protivstrujnom putu uz kratko zadržavanje, što ima za rezultat efikasno ekstrahovanje i očuvanje proizvoda.

Pored centrifugalne ekstrakcije, u praksi se primenjuju i jednostavniji diskontinualni ekstraktori. Kod njih se prvo intenzivnim mešanjem fermentacione tečnosti i ekstragensa obavlja ekstrakovanje, a zatim se frakcije razdvajaju separacijom.

Ekstrakcija čvrsto–tečno

Ova vrsta ekstrakcije se koristi kada se proizvod nalazi u obliku taloga (na primer, u proizvodnji tetraciklina) ili kada se proizvod nalazi unutar ćelija (na primer, antibiotik nistatin). Za ekstrakciju se koriste perkolacioni ekstraktori kod kojih se čvrsta frakcija u kojoj je proizvod pakuje u cilindrični sud sa perforiranim dnom, kroz koji cirkuliše ekstragens.

8.3.2 Precipitacija

Precipitacija (izdvajanje taloženjem) je često prvi stepen izdvajanja intracelularnih proteina nakon razaranja ćelija, mada se koristi i za izdvajanje proteina (na primer, enzima) iz fermentacione tečnosti. U primeni su sledeća dva postupka precipitacije:

- isoljavanje dodatkom soli sa velikom jonskom jačinom i
- smanjenje rastvorljivosti proteina na niskim temperaturama ($T < -5\text{ }^{\circ}\text{C}$), uz dodatak organskog rastvarača.

Isoljavanje se povećava jonska jačina rastvora proteinskog rastvora. Za isoljavanje se obično koristi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ili Na_2SO_4 . Joni ovih soli stupaju u interakciju sa vodom (vezuju je u svojoj jonskoj sferi), što izaziva smanjenje koncentracije slobodne vode i precipitaciju proteina.

Jonska jačina rastvora I se definiše kao:

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad (8.23)$$

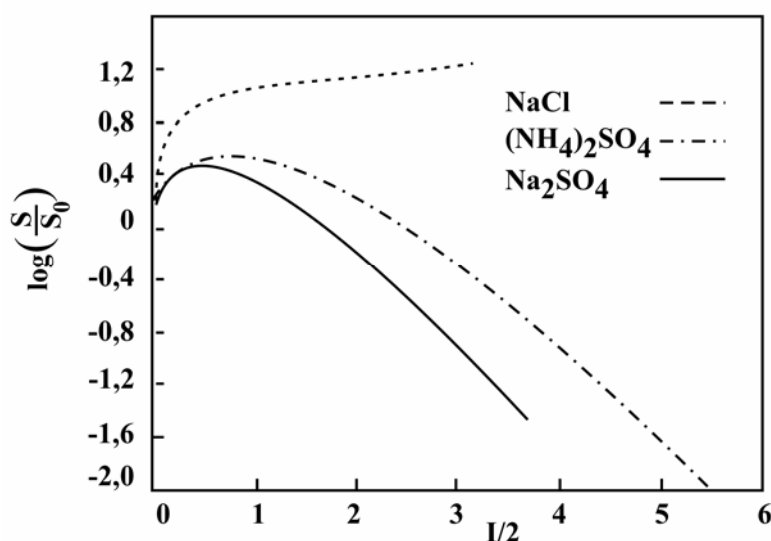
gde je: C_i – molarna koncentracija jonske supstance i Z_i – valenca (naelektrisanje) jona.

Rastvorljivost proteina u funkciji jonske jačine rastvora data je izrazom:

$$\log \frac{S}{S_0} = -K'_s(I) \quad (8.24.)$$

gde je: S – rastvorljivost proteina u datom rastvoru, S_0 – rastvorljivost proteina u rastvoru sa jonskom jačinom 0,1 i K'_s – konstanta isoljavanja koja je funkcija temperature i pH. Na slici 8.13 prikazan je uticaj neorganskih soli na rastvorljivost proteina hemoglobina.

Precipitacija rastvaračem i niskom temperaturom zasnovana je na smanjenju dielektrične konstante rastvora, što ima za posledicu pojačanje elektrostatičkih sila u molekulu proteina i njegovu precipitaciju. Istovremeno, dodatak rastvarača umanjuje interakciju protein – voda, što smanjuje rastvorljivost proteina. Pri izboru rastvarača mora se voditi računa da on može imati za posledicu denaturaciju proteina.



Slika 8.13 Uticaj neorganskih soli na rastvorljivost proteina hemoglobina

Rastvorljivost proteina u funkciji dielektrične konstante rastvora data je izrazom:

$$\log \frac{S}{S_0} = -K'/D_s^2 \quad (8.25)$$

gde je: D_s – dielektrična konstanta rastvora voda – rastvarač.

U cilju poboljšanja izdvajanja proteina precipitacija rastvaračem se može kombinovati sa ispljavanjem rastvora, podešavanjem pH i niskom temperaturom.

Pored navedena dva postupka precipitacije, koriste se i sledeći postupci:

- izoelektrična precipitacija,
- precipitacija polielektrolitima i
- precipitacija nejonskim polimerima.

Izoelektrična precipitacija se ostvaruje podešavanjem pH rastvora na izoelektričnu tačku proteina kada proteinski molekuli ne poseduju jonsko naelektrisanje. Ovaj postupak se primenjuje za precipitaciju proteina koji imaju izraženiju hidrofobnu površinu molekula, tj. nepolarnu površinu. Postupak je jeftin, lako se izvodi, ali može izazvati denaturaciju proteina.

Precipitacija polielektrolitima zasnovana je na promeni jonske jačine rastvora, koja se postiže dodatkom polielektrolita, kao što su polisaharidi, polifosfati ili poliakrilne kiseline. Polielektroliti mogu izazvati denaturaciju proteina, pa je potrebno biti veoma pažljiv pri njihovom izboru.

Precipitacija nejonogenim polimerima, kao što su dekstran i polietilen glikol, zasnovana je na smanjenju koncentracije slobodne vode za interakciju sa molekulima proteina. Ovaj postupak je uspešan prilikom precipitacije proteina male molekulske mase.

8.3.3. Adsorpcija

Adsorpcija je uobičajen postupak izdvajanja organskih supstanci iz vodenih rastvora, kao što je fermentaciona tečnost. Ona se može definisati kao proces migracije i akumulacije određene supstance iz jedne u drugu fazu, a odvija se na međufaznoj površini. Adsorpcija je, u suštini, površinski fenomen uslovljen razlikom liofilnosti ili liofobnosti rastvorene supstance (*adsorbat*) u odnosu na rastvarač.

U procesu adsorpcije učestvuju Coulone-ove i van der Waals-ove sile, a dominantna sila zavisi od hemijske prirode sistema. Na primer, u sistemu aktivni ugalj – voda karakterističan je mali elektrostatički naboj, pa su u procesu adsorpcije dominantne van der Waals-ove sile. Zbog toga se ovaj oblik adsorpcije naziva *fizička adsorpcija*.

Adsorcijom upravljaju površinske sile, čiji intenzitet određuju sledeći faktori:

- termodinamički (Gibbs-ov potencijal i temperatura),
- hemijski (hemijske karakteristike adsorbata i rastvora) i
- fizički (međufazna površina i karakteristike adsorbensa).

Za definisanje procesa adsorpcije najbitniji su adsorpciona ravnoteža i kinetika adsorpcije.

Šaržna adsorpcija i adsorpciona ravnoteža. Migracija supstance u sistemu tečno – čvrsto odvija u dva pravca, a neto efekat je adsorpcija. Trenutak kada se dva suprotno usmerena procesa – adsorpcija i desorpcija – uravnoteže naziva se *adsorpciona ravnoteža*. Na određenoj temperaturi sistema uspostavlja se tačna relacija između koncentracija adsorbata u rastvoru i vezanog za adsorbens, koja se naziva *adsorpciona izoterma*. Ovo stanje matematički se definiše Freundlich-ovom, Langmuire-ovom i linearnom jednačinom. Ove jednačine su prikazane u matematičkom i grafičkom obliku na slici 8.14.

Eksponent $1/n$ opisuje jačinu veze adsorbat–adsorbens i ima vrednost 0,25 do 1,5. Za fiksne vrednosti K i C_r , manja vrednost $1/n$ ukazuje na jaču vezu adsorbens – adsorbat. Za male vrednosti ovog eksponenta kapacitet adsorpcije ne zavisi od ravnotežne koncentracije, tj. proces adsorpcije za date uslove je ireverzibilan (prava linija na na adsorpcionoj izotermi, slika 8.14).

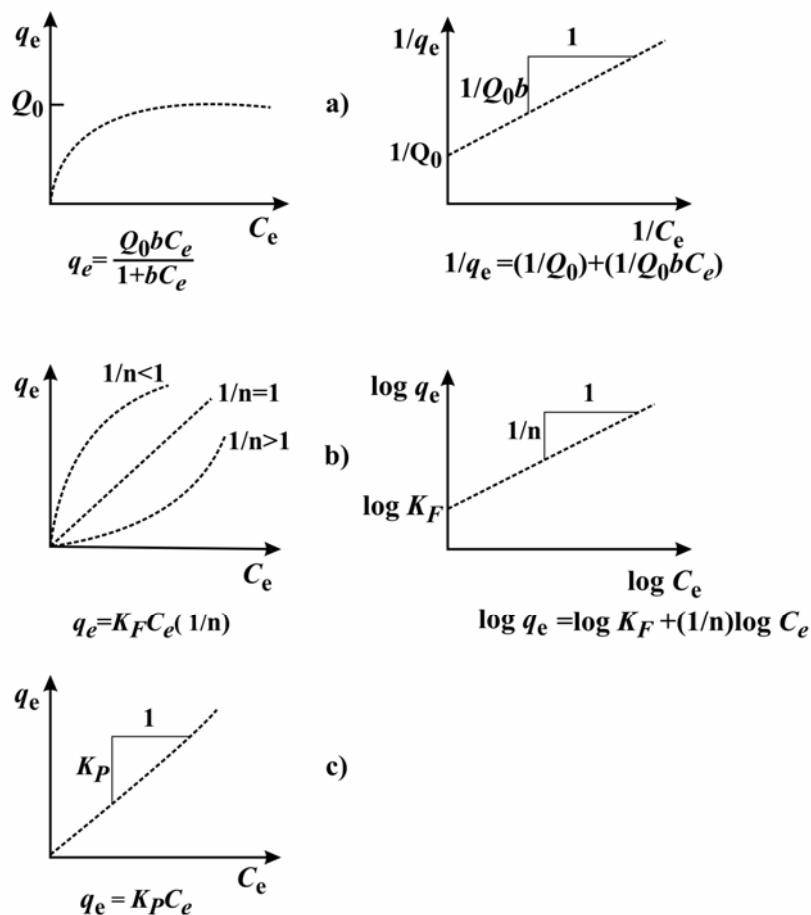
Konstanta K je direktno proporcionalna adsorpcionom kapacitetu adsorbensa za dati adsorbat. Za fiksne vrednosti C_r i $1/n$ veća vrednost K označava veći kapacitet adsorpcije. Vrednost ove konstante zavisi od prirode adsorbata, varira u širokom opsegu i može se naći u odgovarajućim tablicama.

Na adsorpcionu ravnotežu utiče veliki broj faktora, a najbitniji su: temperatura, specifična površina adsorbensa, veličina i distribucija pora u adsorbensu, hemijski procesi na površini adsorbensa, priroda adsorbata i osobine rastvora.

Temperatura ima veliki uticaj na kinetiku procesa adsorpcije, jer se njegova brzina se povećava sa sniženjem temperature rastvora.

Specifična površina ima, takođe, veliki uticaj na adsorpcioni kapacitet u ravnotežnom stanju. Treba razlikovati specifičnu od aktivne površine adsorbensa. Aktivna površina predstavlja površinu pora raspoloživih za adsorpciju i uvek je manja od specifične površine.

Distribucija pora u adsorbensu određuje njegovu selektivnost, kao i kapacitet adsorbovanja molekula različitih veličina. Veličina pora utiče na prolaznost molekula kroz poroznu strukturu adsorbensa. Ako adsorbens ima mali udeo makropora, on ima manji afinitet adsorpcije krupnijih organskih molekula. Suprotno tome, veći udeo mikropora omogućava veći kapacitet adsorpcije manjih organskih molekula.



Slika 8.14 Matematički i grafički oblici adsorpcionih izoterma: (a) Langmuir-ova, (b) Freundlich-ova i (c) linearna (q_r – masa adsorbata adsorbovana po jedinici mase adsorbenta, tj. površinska koncentracija, C_r – ravnotežna koncentracija adsorbata u rastvoru i na međufaznoj površini i K – konstanta koja definiše odnos q_r i C_r)

Hemijski procesi na površini adsorbensa, ako do njih dolazi, znatno utiču na adsorpcionu ravnotežu. Posebno je nepovoljna oksidacija adsorpcionih centara, koja smanjuje kapacitet adsorpcije.

Priroda adsorbensa direktno utiče na njegov afinitet prema adsorbatu i njegov adsorpcioni kapacitet. Sa smanjenjem rastvorljivosti adsorbata u rastvoru adsorpcija raste. *Osobine rastvora* utiču, takođe, na afinitet adsorbensa prema adsorbatu i kapacitet adsorpcije. Tako, na primer, promena pH izaziva promenu polariteta molekula, čime se menja afinitet adsorpcije. Najveći adsorpcioni kapacitet imaju nedisosovani molekuli.

U rastvorima složenog sastava, kakve su fermentacione tečnosti ili kakav je rastvor posle razaranja ćelija, prisutan je veliki broj organskih supstanci sa različitim afinitetom prema adsorbentu. U takvoj smeši ponašanje rastvorenih supstanci je različito od onog kada su prisutne pojedinačno. To se, pre svega, ispoljava konkurencijom komponenti za adsorpciju. Ova vrsta adsorpcije se naziva *konkurentna adsorpcija*. Jedinjenja se većim afinitetom će se adsorbovati u većoj meri od onih sa manjim afinitetom. To je razlog što je konkurentna adsorpcija značajna za kinetiku adsorpcije i adsorpcioni kapacitet, naročito u adsorpcionim kolonama. Pojedine neorganske supstance prisutne u kompleksnom rastvoru mogu uticati na adsorpcioni kapacitet adsorbensa.

Kontinualni sistemi. Adsorpciona ravnoteža izražava krajnje stanje adsorpcionog sistema i može se okarakterisati kao statički pristup problemu. U kontinualnim adsorpcionim sistemima koncentracija adsorbata je dinamički parametar, koji raste sa povećanjem količine tretiranog rastvora, pa je kinetika adsorpcije veoma bitna.

Za uspešnu adsorpciju neke supstance veoma je bitna dužina adsorpcione kolone. Za konkretni adsorbat i određene uslove adsorpcije, uvek postoji određena dužina kolone pri kojoj se već u prvom efluentu javlja probojna koncentracija adsorbata. Ova dužina se naziva *kritična dužina kolone* i ona je direktno proporcionalna *kritičnom kontaktnom vremenu*.¹

Kritično kontaktno vreme je veoma bitan parametar za definisanje procesa adsorpcije i za date uslove (temperatura, pH, sastav rastvora i vrsta adsorbensa) određen je relacijom:

$$EBCT_{\min} = \frac{L_k}{Q_v A} \quad (8.26)$$

gde je: L_k – kritična dužina kolone, Q_v – protok rastvora i A – površina preseka kolone.

Ova relacija definiše minimalno kontaktno vreme $EBCT_{\min}$ potrebno za efikasnu adsorpciju.

Adsorpcioni kapacitet kolone (adsorpcioni kapacitet do tačke proboja) je, takođe, veoma bitan parametar procesa adsorpcije u kolonama. On definiše masu adsorbata koja se izdvoji do postizanja probojne tačke.

Karakteristike adsorbensa imaju izuzetno veliki značaj za proces adsorpcije. Veličina zrna adsorbensa u kolonama je značajan kinetički parametar, jer ona određuje putanju prenosa mase. Smanjivanjem veličine zrna, skraćuju se putanja prenosa mase i vreme postizanja adsorpcione ravnoteže, usled čega se smanjuje kritična dužina kolone. Iz toga sledi da zrna adsorbensa treba da budu što manja. Nažalost, smanjenje zrna ima negativan uticaj na hidrodinamičke parametre adsorpcione kolone sa nasutim slojem adsorbensa (brzinu filtracije, pritisak u koloni, ispiranje kolone). Zbog toga se veličina zrna adsorbensa mora optimizovati.

Uniformnost zrna adsorbensa je, takođe, bitna za uspešnost adsorpcije, jer utiče na stratifikaciju slojeva pri pranju kolone. Za manju stratifikaciju, potrebna je veća uniformnost zrna.

¹ Engl. Empty Bed Contact Time, *EBCT*

Piroda adsorbata može imati za posledicu konkurentnu adsorpciju, koja je od posebnog značaja za kinetiku adsorpcije u rastvorima složenog sastava. Prisustvo prateće supstance sa većim afinitetom, zbog brže adsorpcije, umanjuje adsorpcijsku kapacitet za željenu supstancu.

Izvođenje postupka adsorpcije. Postupci adsorpcije se dele na šaržne i kontinualne.

Šaržna adsorpcija se obavlja u sudu sa mešanjem u koji se stavlja rastvor iz koga se želi izdvojiti određena supstanca i u njega doda adsorbens. Uz mešanje, proces adsorpcije teče do uspostavljanja adsorpcione ravnoteže. Nakon završene adsorpcije, adsorbens sa adsorbovanom supstancom se odvaja gravitacionim taloženjem, filtracijom ili centrifugisanjem. Adsorbovana supstanca se desorbuje sa adsorbensa rastvorom u odnosu na koji adsorbens ima veliki afinitet i karakterističan je za dati sistem. Šaržni postupak adsorpcije se izvodi u slučaju malih koncentracija adsorbata i relativno malih količina rastvora.

Kontinualna adsorpcija se vrši u adsorpcijskim kolonama (jedna ili više njih u nizu). Ovaj postupak adsorpcije se primenjuje kod velikih količina rastvora. Na slici 8.15 šematski je prikazana adsorpcijska kolona sa nepokretnim slojem adsorbensa.

Kontinualnu adsorpciju karakterišu četiri uzastopna fenomena:

- transport adsorbata iz rastvora do površine adsorbensa,
- transport adsorbata kroz granični sloj na površini adsorbensa,
- transport adsorbata kroz pore adsorbensa i

adsorpcija adsorbata na poroznoj strukturi adsorbensa.

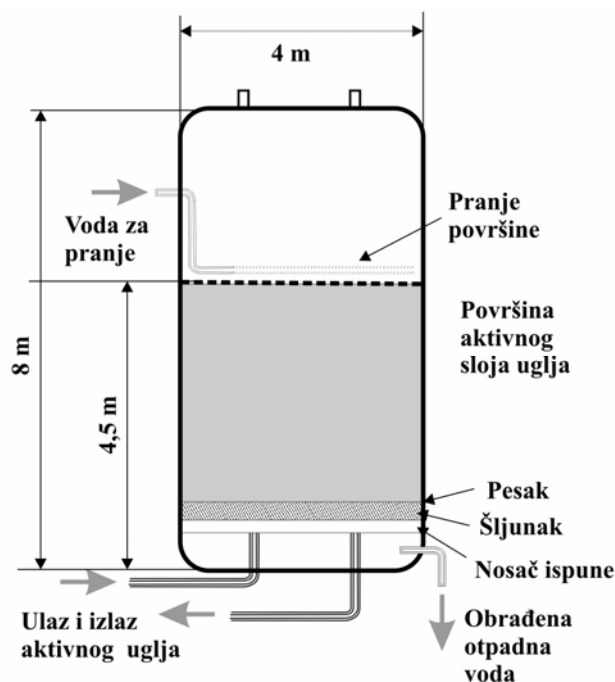
Najsporiji od ovih koraka kontroliše ceo proces. U principu, to su drugi i treći korak. Prvi je dovoljno brz jer se odvija u turbulentnoj zoni, dok je četvrti korak najbrži.

Kod adsorpcione kolone sa nasutim slojem adsorbensa rastvor iz koga se želi izdvojiti određena supstanca propušta se kroz kolonu odozgo nadole. Propuštanjem rastvora, u koloni se formira zona adsorpcije, tj. zona prenosa mase. Ona se prvo formira u gornjim slojevima adsorbensa, koji se postepeno zasićava, a zatim putuje ka dnu kolone (slika 8.16). Na početku, usled adsorpcijskih fenomena, koncentracija adsorbata je veoma niska u rastvoru koji izlazi iz kolone (*efluentu*). Tokom trajanja adsorpcije, zona adsorpcije se spušta ka dnu kolone, a koncentracija adsorbata u izlaznom rastvoru postepeno raste. Kada zona adsorpcije dođe do dna kolone, koncentracija adsorbata u efluentu dostiže maksimalnu vrednost (C_B). U tom trenutku je dostignuta tzv. *tačka proboja kolone*, što znači da je adsorbens u koloni zasićen adsorbatom. Nakon toga se radi desorpcija adsorbata, da bi kolona mogla da se koristi u sledećem ciklusu adsorpcije.

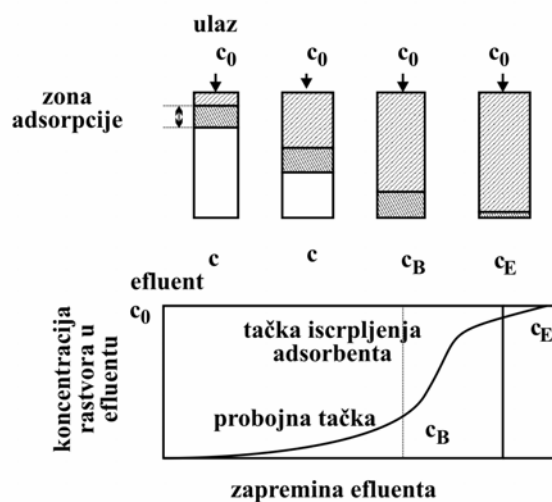
Desorpcija adsorbovane supstance sa adsorbensa je završna faza u postupku izdvajanja proizvoda adsorpcijom. Izbor rastvora za desorpciju je od suštinskog značaja za uspešnu desorpciju adsorbovane supstance. Dok je kod izvođenja procesa adsorpcije cilj da se željena supstanca iz rastvora što potpunije i što selektivnije veže za adsorbens, u ovoj fazi postupka cilj je obrnut: da se adsorbovana supstanca što potpunije odvoji od adsorbensa i pređe u rastvor. Rastvor za desorpciju (*eluent*), mora ispunjavati više uslova od kojih su najbitniji:

- adsorbat mora imati veći afinitet prema eluentu od afiniteta prema adsorbensu,
- eluent ne sme reagovati sa adsorbatom i adsorbensom i
- eluent mora posedovati svojstva koja omogućavaju što jednostavnije koncentrisanje desorbovane supstance itd.

Kao eluenti, zavisno od prirode konkretnog sistema: adsorbens – adsorbat – eluent, koriste se organski rastvarači ili rastvori neorganskih supstanci sa podešenom pH vrednošću i jonskom jačinom.



Slika 8.15 Adsorpciona kolona sa nepokretnim slojem adsorbensa

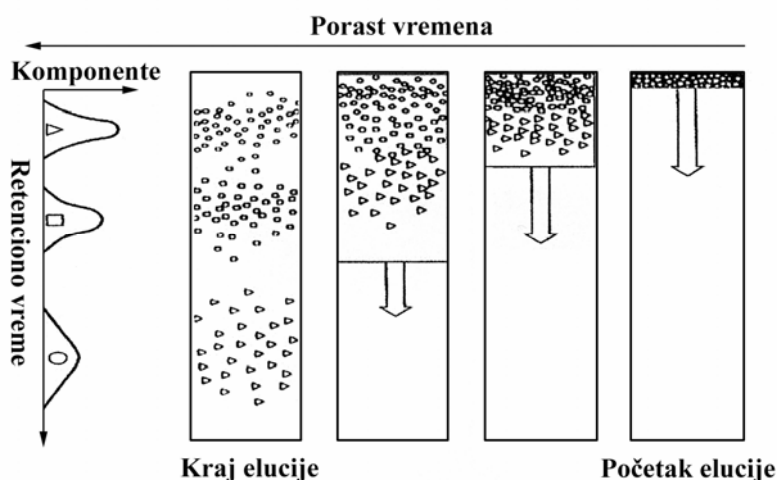


Slika 8.16 Tok procesa adsorpcije u koloni sa tipičnom probojnom tačkom (c_0 početna koncentracija, c_B maksimalna koncentracija, c_E završna koncentracija)

Koncentrisanje desorbovane supstance iz eluenta izvodi se jednim od standardnih postupaka koncentrisanja proizvoda: uparavanjem, kristalizacijom, precipitacijom ili membranskom separacijom.

8.3.4. Hromatografija

Hromatografija je zasnovana na fenomenima adsorpcije. *Eluaciona hromatografija* je osnovni oblik i izvodi se u hromatografskoj koloni. Smeša supstanci u rastvoru propušta se kroz kolonu (*mobilna faza*) u kojoj je pakovan (nasut) sloj adsorbensa (*stacionarna faza*). U koloni se pojedine komponente iz mobilne faze različito zadržavaju vezivanjem za stacionarnu fazu (slika 8.17). Tokom prolaska kroz kolonu, pojedine komponente rastvora postepeno se razdvajaju na stacionarnoj fazi zbog različite brzine kretanja kroz sloj adsorbensa, zahvaljujući razlici u afinitetu.



Slika 8.17 Hromatogram eluacione hromatografije: promena koncentracije komponenti sa vremenom elucije

Punjenje hromatografske kolone se bira na osnovu osobina komponenata rastvora i radnih uslova. Elucija se obavlja *mobilmom fazom*, koju čini, zavisno od karakteristika proizvoda i stacionarne faze, smeša rastvarača ili puferovani rastvor određene pH vrednosti ili jonske jačine. U industrijskim uslovima mobilna faza je najčešće vodeni rastvor. Pri ispiranju kolone se molekuli koji su bili »vezani« za stacionarnu fazu, kreću od vrha ka dnu kolone. Različiti molekuli se kreću različitim brzinama kroz kolonu, što zavisi od jačine njihove interakcije sa stacionarnom fazom. Slabije vezani molekuli (manji afinitet prema stacionarnoj fazi) kreću se brže od jače vezanih molekula (slika 8.16). Kao rezultat toga, razdvajaju se pojedine komponente i sakupljaju na izlazu iz kolone. Prikazani pikovi (zone najveće koncentracije pojedinih komponenti) posledica su razlike u vremenu zadržavanja (*retencijom vremenu*).

Promena koncentracije pojedinih komponenti u izlaznom toku (eluentu) određuje se analitičkim metodima. Step razdvajanja zavisi od *rezolucije pikova*, a definiše se kao:

$$R_z = 2 \frac{t_A - t_B}{w_A - w_B} \quad (8.27)$$

gde je: R_z – stepen razdvajanja komponenti A i B , t_A i t_B – vreme zadržavanja komponenti A i B i w_A i w_B – srednje širine pikova izražene u jedinicama vremena. Ako je $R_z = 1$, onda je, prema jednačini (8.27), preklapanje pikova 2%. Da bi preklapanje pikova bilo manje od 0,1%, što je potrebno za dobro razdvajanje komponenti, R_z mora imati vrednost veću ili jednaku 1,5.

Efikasnost kolone se određuje na osnovu visine ekvivalentne *teorijskom podu* – *HERT*, što je uobičajeno kod kolona sa punjenjem. U slučaju teorijskog poda rastvorak (komponenta) je ravnomerno raspoređen između stacionarne i mobilne faze. Što je broj teorijskih podova veći, efikasnost kolone je veća. Za komponentu A broj teorijskih podova može se izračunati pomoću jednačine:

$$N_A = 16 \left(\frac{t_A}{w_A} \right)^2 \quad (8.28)$$

gde je: N_A – broj teorijskih podova.

Za kolonu visine h , visina ekvivalentna teorijskom podu iznosi:

$$HERT = \left(\frac{h}{N_A} \right)^2 \quad (8.29)$$

Broj teorijskih podova i visina ekvivalentna teorijskom podu za datu kolonu zavisi od komponenti koje se razdvajaju. Optimalno razdvajanje se postiže sa minimalnom visinom ekvivalentne teorijskom podu. Visina ekvivalentna teorijskom podu zavisi od brzine proticanja eluenta kroz kolonu zbog toga što utiče na povratno mešanje, prenos mase i kanalisanje kroz sloj čvrstih čestica u koloni. Pri maloj brzini proticanja ima dovoljno vremena da se rastvorak raspodeli između faza u svakom elementu po visini punjenja. Sa povećanjem molske mase rastvorka efekat prenosa mase postaje slabiji. Efekat kanalisanja kroz kolonu minimizuje se upotrebom punjenja manjih dimenzija, ali se istovremeno povećava pad pritiska kroz kolonu.

U biotehnologiji najčešće se koriste punjenja od poroznih, hidrofilnih materijala kao što su umreženi poliakrilamidi, agaroz, umreženi dekstran i celuloza. Ova punjenja se lako deformišu, što izaziva stišnjavanje pakovanja (smanjenje slobodnog prostora među česticama adsorbensa) i pad pritiska kroz kolonu. Ovaj problem se može rešiti podelom ukupne visine punjenja na više sekcija. U tom slučaju svaka sekcija se ponaša kao poseban sloj punjenja.

Vrste hromatografskih metoda. Zavisno od mehanizma interakcije između rastvorka i stacionarne faze razlikuje se više vrsta hromatografskih metoda koji se nalaze u primeni. Za industrijske uslove najviše se primenjuje adsorpciono-eluciona hromatografija. Većina ostalih hromatografskih postupaka imaju prvenstveno analitički značaj ili se koriste za izdvajanje i prečišćavanje malih količina veoma skupih proizvoda.

Adsorpciona hromatografija (ADC) se naziva i *eluaciona hromatografija*. Zasniva se na razlici među van der Valsovim sila, koje su karakteristične za slabo polarna jedinjenja. Rastvorena supstanca sa slabijim van der Valsovim silama brže se ispira (eluiru) iz kolone. Kao punjenje ko-

lone koriste se neorganski adsorbenti: infuzorijska zemlja, aluminijumoksid, silikagel, aktivni ugalj i porozne organske smole (na primer, Amberlite). Aktivni ugalj se obično koristi za uklanjanje pigmenata (obezbojavanje) i bistrenje rastvora.

Tečno – tečna podeona hromatografija (LLC) je zasnovana na različitim koeficijentima raspodele rastvorenih molekula između adsorpcione tečne faze i protočne tečne faze. Najčešće je adsorpciona tečnost nepolarna.

Jonoizmenjivačka hromatografija (IEC) je zasnovana na reverzibilnom vezivanju jedinjenja za aktivne suprotno naelektrisane grupe jonoizmenjivača, kojima je napunjena kolona. Postoje kolone sa anjonskim i katjonskim jonoizmenjivačima. Eluiranje se vrši rastvorom kiseline ili baze, zavisno od vrste punjenja kolone.

Afinitetna hromatografija (AFC) zasniva se na visoko specifičnoj interakciji između rastvorka i punjenja kolone, na primer, interakcija enzim – supstrat, enzim – inhibitor, antigen – antitelo itd. Molekuli rastvorka (proizvoda) se vezuju za ligand zahvaljujući specifičnom afinitetu. Ligand je imobilisan na čvrstom nosaču (matriksu). Po završetku adsorpcije proizvoda kolona se ispira, a zatim se vrši eluiranje proizvoda pogodnim hemijskim agensom: rastvorom sa određenim pH ili određenom jonskom jačinom.

Gel-filtraciona hromatografija se naziva i *hromatografija na molekulskim sitima*. Molekuli se razdvajaju na osnovu njihovih veličina, odakle naziv molekulsko sito. Pri prolazu rastvora kroz kolonu samo molekuli koji su manjih dimenzija od veličine pora u gelu mogu preći u gel, a veći molekuli prolaze kroz kolonu. Ispiranje se vrši kontinualnim proticanjem čistog rastvarača kroz kolonu. Molekulska sita su obično umreženi dekstrani (Sephadex), agaroze (Sephadex) ili poliakrilamidi (Bio-Rad gelovi).

Hidrofobna hromatografija (HC) zasnovana je na hidrofobnoj interakciji između rastvorene supstance (na primer, proteini) i funkcionalnih grupa (na primer, alkil grupa) na stacionatnoj fazi. To znači da stacionarna faza ima manji polaritet od mobilne faze.

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) bazirana je na opštim principima adsorpcione hromatografije, s tim da tečna faza prolazi kroz kolonu pakovanu adsorbensom pod pritiskom, velikom brzinom. Ova vrsta hromatografije je u sve većoj primeni zbog velike rezolucije razdvajanja komponenti.

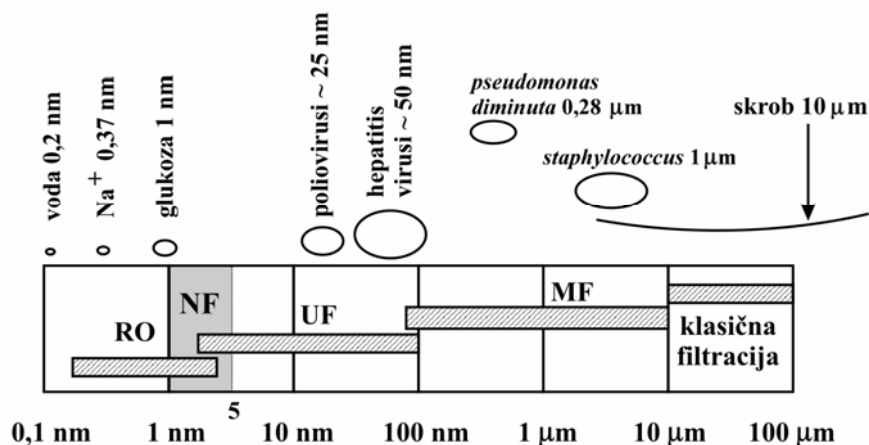
8.3.5. Membranska separacija

Razvojem selektivno propustljivih, hemijski i mehanički otpornih membrana, membranski separacioni procesi zauzimaju sve značajnije mesto u biotehnologiji, prvenstveno u postupcima prečišćavanja proizvoda, mada se sve više koriste i za izdvajanje proizvoda iz suspenzija. Na taj način membranski procesi kao selektivniji sve više zamenjuju klasičnu filtraciju i centrifugalnu separaciju. Uspešno se koriste i kao faza prečišćavanja nakon izdvajanja proizvoda, najčešće proteina, precipitacijom.

Proizvodi biosinteze, koje je potrebno izdvojiti iz fermentacione tečnosti ili razorene ćelijske biomase organske su prirode, ali su po veličini molekulske mase i hemijskoj prirodi veoma različiti. Zbog toga je izbor tipa membrane za izdvajanje određenog proizvoda prvi i najbitniji korak, ko-

ji uvek zavisi od veličine molekula ili fizičko-hemijskih karakteristika supstance koja se želi odvojiti.

Podela postupaka membranske separacije prema veličini pora membrana šematski je prikazana na slici 8.18.



Slika 8.18 Podela membranskih separacionih procesa zavisno od veličine pora membrane

Mikrofiltracija (MF). Mehanizam ovog najjednostavnijeg postupka membranske separacije dobro je poznat. Suspendovane ili koloidno dispegovane čestice većih dimenzija od prečnika pora se zadržavaju na membrani, a manje prolaze kroz nju. Tipična vrednost prečnika pora je $0,2 \mu\text{m}$.

U skladu sa veličinom pora membrane, mikrofiltracijom se na membrani mogu odvojiti bakterije i kvasci (veličina ćelije je $0,1$ do $10 \mu\text{m}$) i makromolekuli, kao što su belančevine i polisaharidi (molekulska masa 100.000 do 500.000 daltona). Iako je pomoću *MF* moguće izdvajati i animalne ćelije, zbog intenzivnih smicajnih sila i osetljivosti ćelija, to je potrebno činiti veoma oprezno.

Pošto se *MF* (delom i *UF*) prvenstveno koristi za izdvajanje mikroorganizama i makromolekula, klasična filtracija ima za posledicu formiranje sloja izdvojenih supstanci, koji se ponaša kao dodatna membrana i izaziva značajne filtracione probleme. Zbog toga se za ovu vrstu namene isključivo koristi unakrsna filtracija.

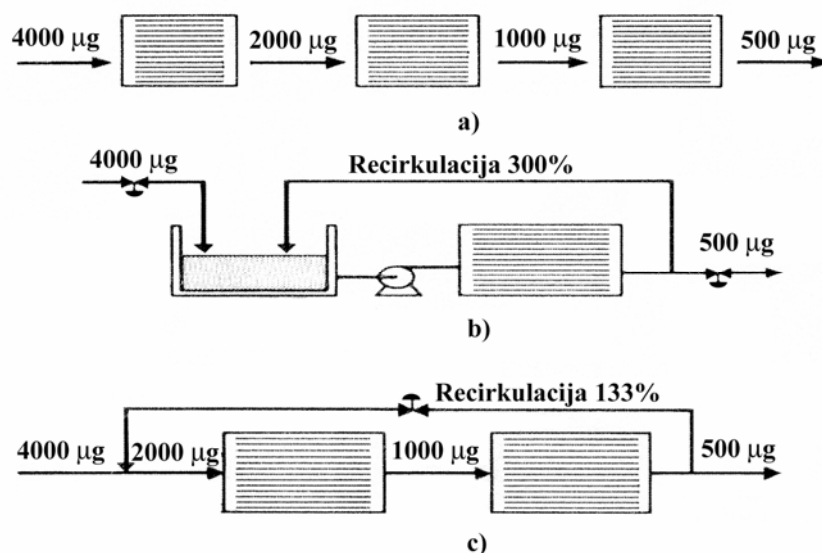
Ultrafiltracija (UF) koristi membrane manje permeabilnosti, sa veličinom pora manjih dimenzija. Opseg koji obuhvata *UF* je 5.000 do 100.000 daltona što odgovara prečniku pora $2 - 100 \text{ nm}$. *UF* se koristi za koncentrisanje i prečišćavanje proizvoda, na primer izdvajanje i prečišćavanje proteina, enzima, pirogenih supstanci (lipopolisaharidi iz zida bakterijskih ćelija), ćelijskih delova i virusa.

Nanofiltracija (NF) zahvata deo oblasti koji pripada *UF* i *RO*, pa se njome mogu izdvajati komponente sa dimenzijama 1 – 5 nm. Primenjuje se za izdvajanje i separaciju proizvoda.

Reverzna osmoza (RO) obuhvata opseg ispod 500 daltona (prečnici pora 0,2 – 3 nm). U skladu sa veličinom pora, *RO* se koristi za izdvajanje organskih molekula manje molekulske mase i neorganskih molekula i jona. Pošto *RO* membrane bez smetnji propuštaju molekule vode, ovaj membranski postupak se uspešno koristi za sušenje proizvoda.

Uređaji za membransku separaciju. Uređaji za membransku separaciju sadrže *MF*, *UF* ili *RO* modul i napojnu pumpu. U slučaju *MF* i *UF* koriste se centrifugalne pumpe jer radni pritisci nisu previše visoki. U slučaju *RO*, iza napojne pumpe se postavlja pumpa visokog pritiska. Ovakvom kombinacijom pumpi izbegava se kavitacija pumpe visokog pritiska, a za pranje modula koristi se samo napojna pumpa.

U određenim slučajevima retentat (frakcija koja ne prolazi kroz membranu) se recirkuliše, radi boljeg iskorišćenja permeata ili koncentrisanja retentata (slika 8.19). Ako je pad pritiska nakon membrane veliki, uključuje se još jedna pumpa u povratni tok (buster pumpa), radi podizanja radnog pritiska.



Slika 8.19 Osnovna šema uređaja za mikrofiltraciju.

Postupak separacije se može izvoditi šaržno ili kontinualno.

Šaržni postupak se izvodi tako što se u cirkulacionom krugu vrši više uzastopnih prolaza kroz modul. Ovaj postupak se koristi u slučaju manjih količina fluida i kada je potrebno postići što veću koncentraciju komponenti koje ostaju u retentatu. Uređaj je jednostavaniji i investiciono jeftiniji. Uređaj obavezno uključuje povratnu pumpu. Veliki nedostatak je to što se željena komponenta duže vreme zadržava u uređaju, što može imati za posledicu delimično razaranje proizvoda, a veća je i mogućnost infekcije.

Kontinualni postupak uključuje dve osnovne varijante. Prva je kontinualni postupak bez recirkulacije koji je višestepen, a broj modula u nizu se smanjuje sa porastom stepena koncentrisanja. Fluid prolazi kroz uređaj samo jedanput, pa je oštećenje komponenti manje nego kod šaržnog postupka. Potrošnja energije je mala, što ovaj postupak čini ekonomičnim. Drugi je kontinualni postupak sa delimičnom recirkulacijom retentata, pa se ovaj bolje koncentriše.

Ekonomičnost primene membranskih procesa određena je kvalitetom (cenom) membrana i potrebnim pritiskom.

Za izbor membrana najbitnije su sledeće karakteristike: biokompatibilnost, permeabilnost, mehanička i hemijska stabilnost, mogućnost interakcije sa proizvodom i podobnost za sterilizaciju (termička stabilnost). Većina membrana koje su u upotrebi su izrađene od polimernih materijala kao što su: acetat celuloze, najlon, politetrafluoroetilen (PTFE), polivinildifluorid (PVDF), polisulfonati i sl. U poslednje vreme, sve češće se primenjuju keramičke membrane. One poseduju veliku hemijsku stabilnost i mehaničku otpornost, kao i otpornost na termičku sterilizaciju. Zbog toga im je duži vek upotrebe, što kompenzuje njihovu veću cenu.

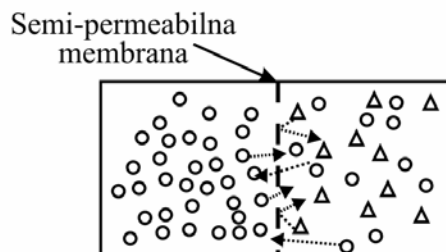
Pored navedenih karakteristika i cene membrana, treba imati na umu da sa smanjenjem prečnika pora otpor prolasku kroz membranu raste, tako da za *MF* iznosi 1 – 3 bar, *UF* 1 – 7 bar, a za *RO* 7 – 70 bar. To je jedan od razloga što se u biotehnologiji i hemijskoj industriji najviše koriste *MF* i *UF*, dok se *RO* prvenstveno koristi za prečišćavanje skupih farmaceutskih proizvoda.

8.3.6. Dijaliza

Dijaliza je membranska separacija koja se koristi za razdvajanje rastvorenih niskomolekularnih jedinjenja (molekulska masa 100 do 500 daltona), kao što su, na primer, organske kiseline i neorganski joni (jonska masa 10 do 100 daltona). U primeni najpoznatija dijaliza je izdvajanje uree (molekulska masa 60 daltona) iz urina kod bolesnika obolelih od uremije. U biotehnologiji dijaliza se može primeniti za izdvajanje soli iz rastvora proteina.

Uređaj za dijalizu uključuje selektivnu membranu koja deli dva prostora: prostor sa rastvorom niskomolekularne i prostor sa rastvorom viskomolekularne komponente (slika 8. 20).

Slika 8.20 Šematski prikaz separacije dijalizom: O – niskomolekularna komponenta, mase, Δ – viskomolekularna komponenta



Zbog selektivne propustljivosti membrane, komponenta male molekulske mase difunduje kroz membranu u prostor niže koncentracije sve do uspostavljanja ravnotežnog stanja. U stanju ravnoteže hemijski potencijal difundujućeg jedinjenja μ na obe strane membrane je izjednačen, pa se može pisati:

$$\mu_1^a = \mu_1^b \quad (8.30)$$

uvođenjem koncentracija dobija se:

$$R \ln C_1^a \gamma_1^b = R \ln C_1^b \gamma_1^a \quad (8.31)$$

ili:

$$C_1^a \gamma_1^b = C_1^b \gamma_1^a \quad (8.32)$$

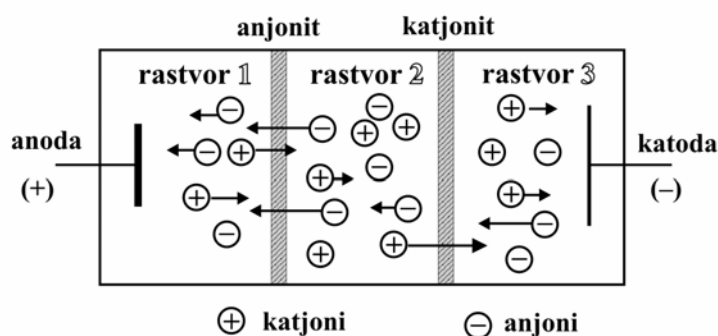
gde je: C – koncentracije difundujuće komponente i γ – koeficijent aktivnosti difundujuće komponente.

Za idealne, veoma razblažene rastvore $\gamma = 1$, pa jednačina 8.32 ima oblik:

$$C_1^a = C_1^b \quad (8.33)$$

Ova ravnoteža važi za nenaelektrisane rastvorene molekule. Ako je makromolekul polielektrolit, kao što su belančevine i nukleinske kiseline, potrebno je uzeti u obzir i ravnotežu naelekterisanja molekula. Ravnoteža se naziva Donnan-ova ravnoteža.

Elektrodijaliza je poseban tip dijalize kod koje se u jednosmernom električnom polju mogu razdvojiti pozitivno od negativno naelektrisanih jona, što je poznati princip elektrolize. Za razliku od obične elektrolize, prostori katode i anode su odvojeni selektivno propustljivim membranama, čime se postiže i selektivno razdvajanje jona po veličini (slika 8.21). Elektrodijaliza se koristi za razdvajanje jona iz rastvora velike jonske koncentracije.



Slika 8.21 Šematski prikaz uređaja za elektrodijalizu

8.4. PREČIŠĆAVANJE PROIZVODA

Nakon izdvajanja proizvoda, ukoliko njegova čistoća ne ispunjava zahteve tržišta, potrebno ga je prečistiti. Ova faza proizvodnje znatno poskupljuje proizvod jer se u njoj moraju koristiti

efikasni i sofisticirani metodi separacije. U principu, prečišćavanje se izvodi primenom jednog od selektivnijih postupaka izdvajanja proizvoda koji se nalazi u rastvorenom obliku. To znači da proizvod koji je izdvojen u nerastvornom obliku prethodno treba rastvoriti u pogodnom rastvaraču.

Izbor rastvarača treba obaviti u skladu sa sledećim zahtevima:

- rastvarač mora imati maksimalnu selektivnost,
- mora biti kompatibilan sa postupkom koji je odabran za prečišćavanje proizvoda i
- ne sme menjati karakteristike proizvoda.

Izbor postupka prečišćavanja zavisi od prirode i količine supstanci koje prate proizvod. Prateće organske supstance se, u principu, uklanjaju adsorpcijom, uključujući hromatografiju, ekstrakcijom i membranskim postupcima. Za uklanjanje neorganskih supstanci u principu koriste se jonska izmena i membranski postupci.

8.5. KONCENTRISANJE PROIZVODA

Najčešće korišćeni postupci koncentrisanja proizvoda su: uparavanje, izmrzavanje, taloženje i ekstrakcija.

Uparavanje. Najčešće se koristi vakuum uparavanje.

Izmrzavanje. Primenjuje se kod termolabilnih proizvoda, a postupak je u nekoliko uzastopnih stupnjeva izmrzavanja vode i uklanjanja leda iz rastvora centrifugisanjem.

Precipitacija. Najčešće se dodaju hemijski reagensi koji pospešuju taloženje (so koja smanjuje rastvorljivost proteina i time olakšava taloženje, (isoljavanje). Kod visokomolekulskih jedinjenja se dodaju organski rastvarači, na primer, dekstran se taloži dodatkom metanola ili etanola fermentacionoj tečnosti.

Ekstrakcija rastvaračem. Obično se koristi nakon destrukcije ćelija. Nemešljivi rastvarač se dodaje u što je manje mogućoj zapremini. Primenjuju se različita konstruktivna rešenja: ekstrakcione kolone, mešač – odvajač, centrifugalni ekstraktor i drugo.

Kristalizacija. Prethodi joj uparavanje, a količina vode koju treba ukloniti da bi došlo do kristalizacije, određuje se na osnovu krive rastvorljivosti proizvoda. Kristalizacijom (običnom ili frakcionom) se izdvaja proizvod (na primer, kod limunske kiseline i aminokiselina) ili se obavlja finalno prečišćavanje (na primer, kod antibiotika). Ona se obično izvodi na sniženoj temperaturi, a često i na sniženom pritisku.

8.6. SUŠENJE PROIZVODA

Često je potrebno iz dobijenog proizvoda ukloniti višak vlage, radi pogodnijeg i sigurnijeg čuvanja, pakovanja, a u nekim slučajevima i smanjenja troškova transporta.

Za svaku materiju, bilo da je organskog ili neorganskog porekla, pri definisanom pritisku, postoji određena vrednost vlažnosti (*ravnotežna vlažnost*), koja je u ravnoteži sa vlažnošću okolne atmosfere. Pri većoj vlažnosti, dolazi do prenosa vlage iz proizvoda ka atmosferi, najčešće vazduhu, tj. dolazi do sušenja proizvoda. Obrnuto, ako je vlažnost proizvoda manja od ravnotežne, dolazi do vlaženja proizvoda vlagom iz vazduha, sve do postizanja ravnoteže. U isto vreme, aktivnost mikroorganizama je tesno povezana sa raspoloživom vlagom, pa je za sprečavanje njihovog rasta i razmnožavanja neophodno da ona bude što manja. Na kojoj vrednosti vlažnosti će aktivnost mikroorganizama biti sprečena, zavisi od prirode materijala. Ona se može poklopiti sa ravnotežnom vlagom (primer su žitarice kod kojih je ravnotežna vlaga oko 14%, pri kojoj ne dolazi do mikrobioloških promena pri čuvanju u silosima), ali u velikom broju slučajeva, kod proizvoda biotehnologije, radi inaktivacije mikroorganizama, zahtevaju se znatno niže vrednosti vlage od ravnotežne vlažnosti. U tim slučajevima, potrebno je proizvod osušiti do zahtevanog sadržaja vlage, na kojoj ne dolazi do "kvarenja" proizvoda i odmah ga upakovati, tako da ne dođe u kontakt sa vlagom iz atmosfere (primer su farmaceutski proizvodi, vakuum pakovanja, supe u kesicama i sl.).

Način kojim se proizvod suši zavisi od osetljivosti proizvoda na povišenu temperaturu, utiča vazduha na proizvod i zahtevanog kvaliteta proizvoda. U osnovi, razlikuju se tri tipa sušara koje se primenjuju u biotehnologiji:

- kontaktne,
- konvektivne i
- sublimacione.

Kod kontaktnih sušara se proizvod suši u tankom sloju u direktnom kontaktu sa zagrejanom površinom. Iako ove sušare najčešće rade šaržno, moguće je, u određenim uslovima, primeniti i kontinualni postupak, poput sušenja na valjcima.

Najčešće primenjivane su konvektivne sušare, koje daju zadovoljavajući kvalitet uz optimalne kapacitete. Sušenje se vrši direktnim kontaktom vazduha (ili nekog drugog gasa) koji konvektivnim načinom prima vlagu iz proizvoda. Vlažan proizvod može biti u:

nepokretnom sloju, lociran u tavama, koje mogu biti nepokretne u slučaju komorne sušare ili se blago kretati kada su u pitanju tunelske sušare,

- obliku kapi u struji vazduha (spray sušara) i
- fluidizovanom ili fontansko–fluidizovanom sloju, zajedno sa inertnim punjenjem.

Sušenje materijala u čvrstom stanju

Kao materijali u čvrstom stanju, u biotehnologiji se najčešće pominju žitarice, voće, povrće, testenine, kao i različite vrste soli i aditiva koje je u nekim slučajevima potrebno dosušiti do željene vlage. Koji tip sušare će biti odabran za ovu namenu, zavisi, pre svega, od raspoložive opreme, traženog kvaliteta proizvoda i tehnoeconomskog bilansa. Najčešće se primenjuje konvektivni postupak, i to u tunelskim sušarama, nasutim slojevima sa gravitacionim kretanjem (posebno za žitarice, sušare "Cer" iz Čačka), a u novije vreme i sistema sa fluidizovanim, odnosno fontanskim slojem. Kako je u ovom slučaju reč o relativno jeftinim proizvodima, najbitnije je postavljanje ispravnog toplotnog i masenog bilansa, koji se koriste za tehnoeconomsku analizu.

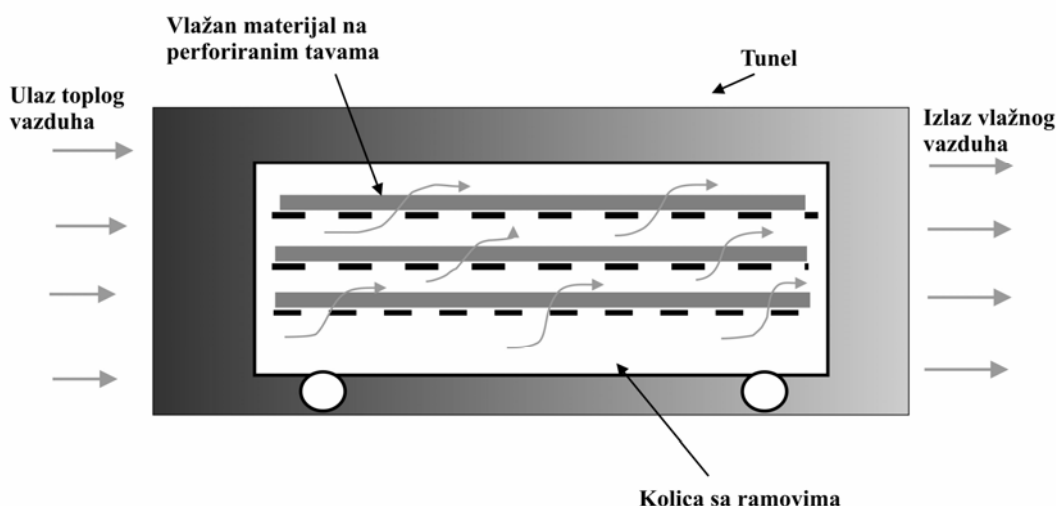
Jedan od novijih postupaka dehidracije voća i povrća je osmotsko sušenje. Vlažni materijal (na primer: trešnja, jagoda, malina, kajsija) dovodi se u kontakt sa koncentrovanim rastvorom u

okruženju. Usled velike razlike koncentracije, u ovom slučaju šećera u samom plodu i okolnom rastvoru, uspostavljaju se uslovi da voda, osmotskim efektom, prelazi iz voća u koncentrovani rastvor koji ga okružuje. Time se vrši dehidracija materijala, kod koga se sadržaj vode može smanjiti i do 70% u odnosu na polazni sadržaj. Kombinacijom sa nekim drugim, konvencionalnim, sistemom, preostala vlaga se znatno jeftinije može dovesti do željenog nivoa, uz očuvanje visokog kvaliteta sušenog proizvoda.

Sistemi za sušenje suspenzija i rastvora

Najčešće, u biotehnologiji, konačni proizvod je potrebno izolovati iz suspenzije ili rastvora, odnosno dovesti ga do suvog stanja u praškastom ili ljuspastom obliku. Postoji više načina, da se ukloni tečna faza i dehidracijom dobije suv, praškast materijal, sa zadržanim funkcionalnim karakteristikama. Konvektivni postupak sušenja se primenjuje kod sušenja u tavama, na pokretnim valjcima u kombinaciji sa konduktivnim postupkom, raspršavanjem, u fluidizovanom sloju i fontanskom sloju, kao i liofilizacijom.

Sušenje na tavama u tunelskim sušarama. Tečni materijal se, prethodno određenim tehnološkim operacijama (ceđenje, filtracija ili dekantacija) ugusti što je više moguće i unese u tave sa perforiranim dnom, koje se ređaju u ramove, najčešće postavljene na kolicima (u velikim sistemima i na vagonetima), koje se potom uvode u tunel sa strujom toplog vazduha, uz obezbeđenu meru – regulacionu opremu (slika 8.22). U tunelu se materijal zadržava određeno vreme potrebno za sušenje datog proizvoda, pri definisanim ulaznim parametrima u pogledu protoka vazduha, temperature i polazne vlažnosti materijala.

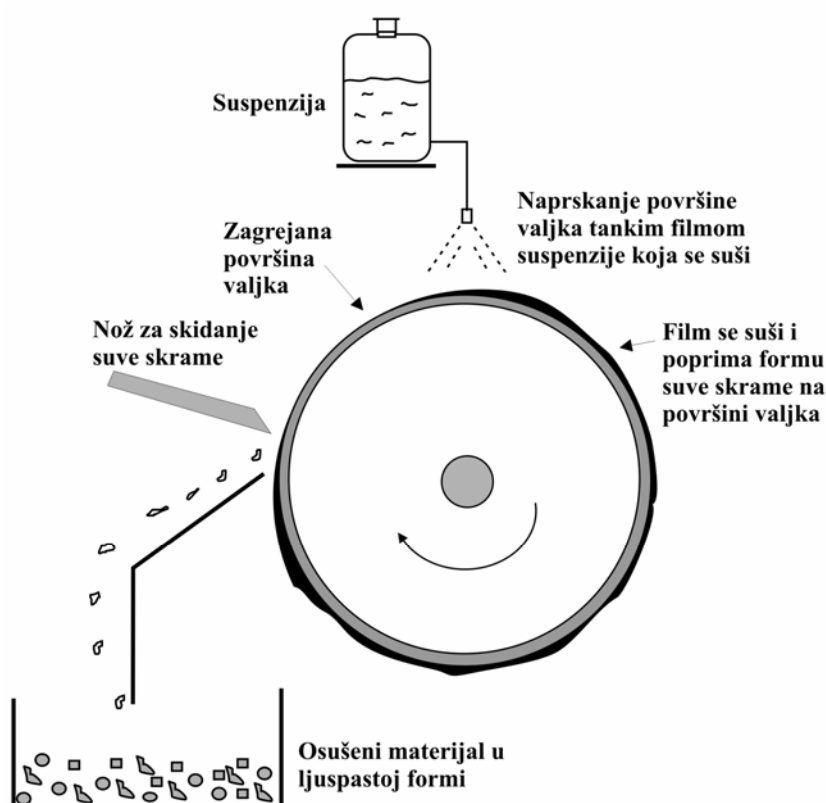


Slika 8.22 Šema sušenja na tavama u tunelskim sušarama

Najveća prednost ovog tipa sušara je jednostavna konstrukcija, mogućnost povećanja kapaciteta, lako rukovanje i održavanje radnih parametara sistema. Njihova primena je moguća samo

kod ograničenog broja suspenzija i rastvora, sa termootpornim materijalima (usled mogućnosti pregrevanja pojedinih delova materijala koji se suši). Na kraju sušenja, proizvod je u vidu pogače ili skrame, koju je neophodno dodatno preraditi, drobljenjem, sitnjenjem ili mlevenjem, kako bi se došlo do konačnog proizvoda. Sve ove operacije mogu imati negativne efekte na kvalitet proizvoda.

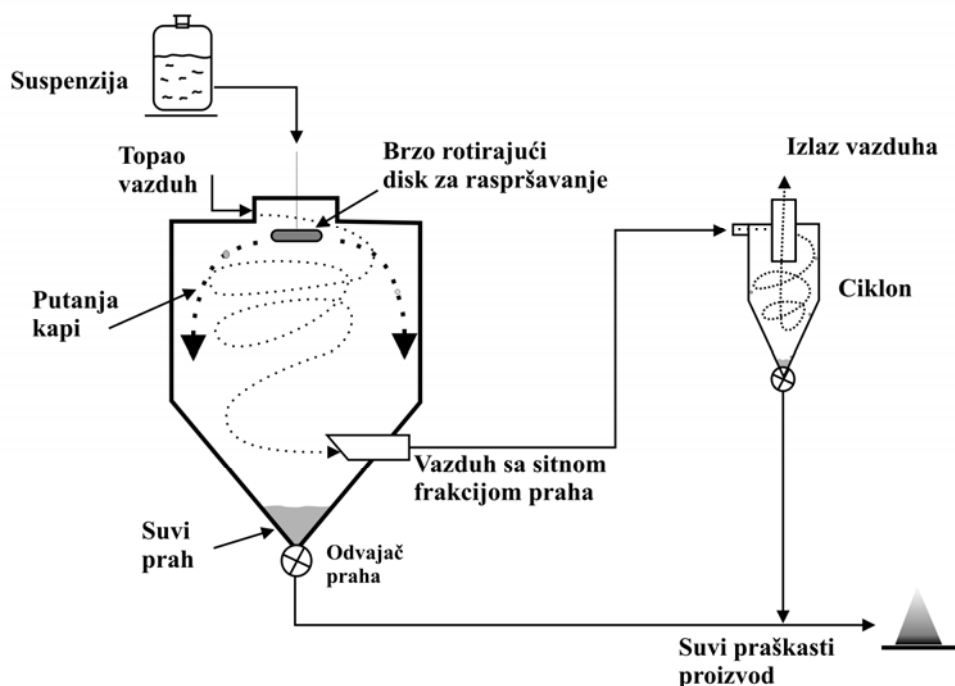
Sušenje na valjcima. Ovo sušenje je pokušaj zamene postupka sušenja na tavama. Sušenje na pokretnim valjcima se svodi na postupak razlivanja tečnog medijuma u vidu tankog filma na zagrejane valjke, koji se relativno sporo okreću, gde dolazi do sušenja filma koji se u određenoj poziciji valjka, strugalicama skida sa njihove površine (slika 8.23). Kvalitet osušenog materijala, obično, ne zadovoljava propisane norme u pogledu granulacije čestica, tako da se mora dodatno mleti i sejati. Postojanje mehaničkih i pokretnih delova u ovakvoj liniji otežava i poskupljuje održavanje čitavog sistema. Jedan od proizvoda, koji se na ovaj način može dobiti, je osušeni pivski kvasac u ljuspastom obliku, koji se može koristiti kao višenamenski proteinski dodatak u ishrani ljudi.



Slika 8.23 Šema sušenja suspenzija na valjcima

Sušenje raspršavanjem. Ovaj način sušenja predstavlja efikasan i do sada najrasprostranjeniji postupak. Zasniva se na raspršivanju tečnog medijuma u struji toplog vazduha (slika 8.24). Pri

malim kapacitetima, do $50 \text{ dm}^3/\text{h}$ tečnosti, raspršavanje kapi je moguće izvršiti mlaznicom (diznom), dok se za veće kapacitete koristi brzo rotirajući disk, sa jednom nepokretnom i jednom pokretnom površinom. Usled male veličine raspršenih kapi, kontaktna površina sa toplim vazduhom je veoma velika, pa se odvijaju intenzivan kontakt i brzi prenosi toplote i mase. Prolaskom naniže kroz zapreminu uređaja, dolazi do sušenja kapi, koje na putu dobijaju praškastu strukturu. Kao osušeni praškasti materijal se prikuplja na konusnom dnu, a vazduh kojim je vršeno sušenje, zajedno sa najsitnijom frakcijom osušenog materijala, odvodi se cevovodom iz uređaja. Krupnija frakcija praškastog proizvoda se leptirastim odvajačem kontinualno odvodi sa dna uređaja, dok se sitnija frakcija praškastog proizvoda odvaja iz struje vazduha mehaničkim separatorima (ciklonima i vrećastim filterima) i zajedno sa krupnijom frakcijom se prikuplja kao gotov proizvod. Ovaj postupak ne zahteva doradu dobijenog praškastog materijala, pa se proizvod dobija u jednom koraku.



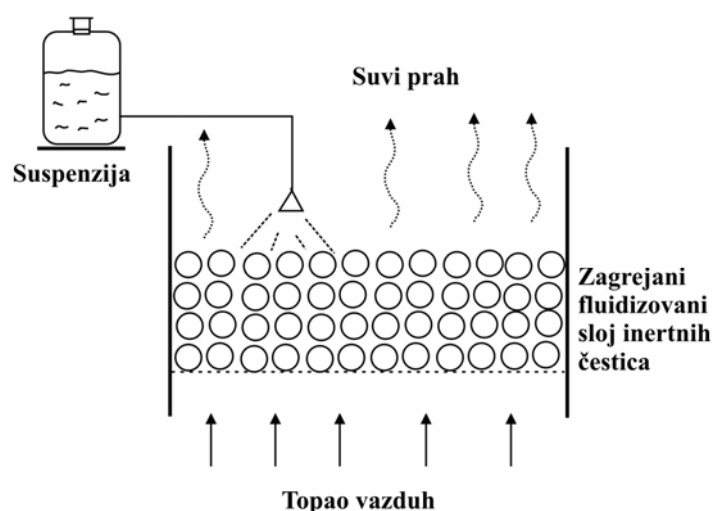
Slika 8.24 Sušara sa raspršavanjem

Prednosti ovog postupka su što se proizvod dobija u jednom koraku, mogu se sušiti lepljivi materijali i lepeza mogućih proizvoda je veoma široka. Nedostatak ovih uređaja su veoma velike dimenzije. Postupak zahteva strogo poštovanje fluidno–mehaničkih parametara sistema, da bi se proces efikasno izvodio. Potrebno je obezbediti dovoljan slobodni put raspršenoj kapljici da ne dopre do zida uređaja pre nego izgubi vlagu i sposobnost lepljenja, što povećava investicione troškove pri instaliranju ovakvog postupka. Istovremeno, raspršene kapi moraju biti što uniformnijeg prečnika, što povlači čestu zamenu skupog, brzo rotirajućeg diska, koji se troši tokom rada. Nakon

određenog vremena može doći do povećanja prečnika raspršenih kapi, odnosno stvaranja uslova da se kap ne osuši dovoljno na putu naniže, što dovodi do lepljenja materijala na zid sušnice i prekida procesa sušenja.

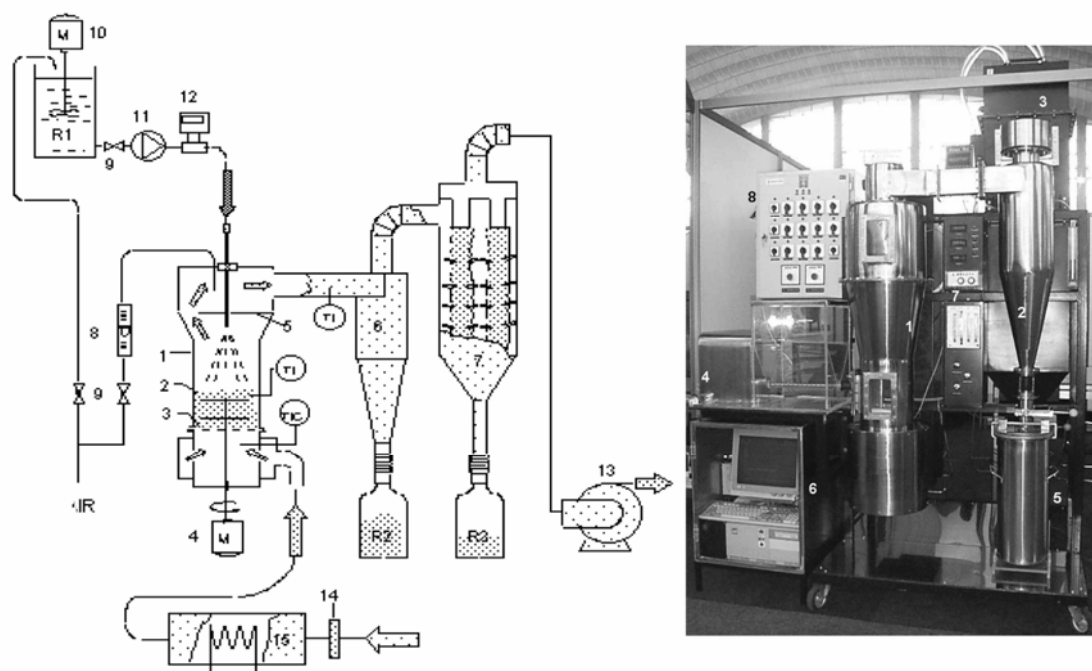
Sušenje u fluidizovanom sloju. Ovaj način sušenja se, pre svega, koristi za sušenje zrnastih materijala. Saglasno fluidno–mehaničkim uslovima u fluidizovanom sloju, vršeni su pokušaji da se sušenje suspenzija i rastvora obavi naprskavanjem na već osušeni praškasti materijal, uz simultano odvođenje osušenih čestica (slika 8.25). Ovakav tip sušare ima relativno mali kapacitet, jer je, umesto sušenja, ovo, pre postupak oblaganja zrnastog materijala, gde je i našao primenu. Dovodeњem raspršene tečnosti na fluidizovan sloj različitih nosača i istovremenim sušenjem toplim vazduhom, moguće je izvršiti njihovo oblaganje uz istovremeno sušenje nanetog sloja.

Ovakvi procesi se najčešće primenjuju u farmaceutskoj industriji, za oblaganje tableta različitim materijalima koji se različito rastvaraju, čime se omogućava produženo delovanje leka u organizmu korisnika.



Slika 8.25 Sušenje suspenzija i rastvora u fluidizovanom sloju

Ukoliko bi se u fluidizovanom sloju koristile inertne čestice, koje bi se prethodno zagrejale u struji toplog vazduha, moguće je naprskavanjem suspenzije po njenoj površini, naneti film mikronske debljine, koji se suši konduktivnim mehanizmom sa površine inertne čestice i istovremenim konvektivnim mehanizmom u struji vazduha kojim se formira fluidizovani sloj. Usled intenzivne turbulencije u fluidizovanom sloju i trenja čestice o česticu dolazi do otiranja suvog praha i njegovog odnošenja sa strujom vazduha van sušare, gde se prah izdvaja ciklonom i/ili vrećastim filtrom. Sušenje suspenzija i rastvora bez lepljivih karakteristika, u ovakvom sistemu (slika 8.26) je dalo odlične rezultate, pre svega kod neorganskih soli i preparata za zaštitu bilja, međutim u biotehnologiji su mahom svi mediji sa relativno lepljivim karakteristikama koje onemogućavaju primenu ovakvih sistema.

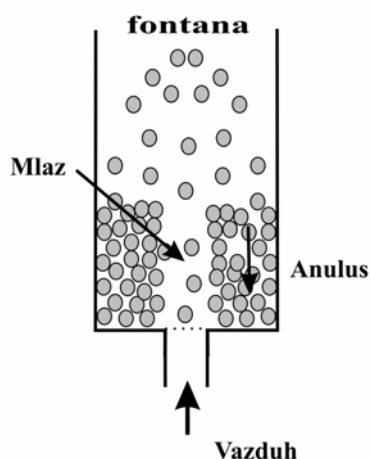


Slika 8.26 Šema i fotografija sušare sa fluidizovanim slojem

Sušenje suspenzija i rastvora u fontanskom sloju. Ovaj postupak sušenja je proizašao na osnovu proučavanja fenomena prenosa toplote i mase u sistemu, u kome za razliku od fluidizovanog sloja, postoji uređeno kretanje čestica (slika 8.27). Naime, uvođenjem vazduha kroz mlaznice na dnu sloja obrazuje se fontanski sloj, koji se odlikuje postojanjem dve zone, mlaza čestica u centru i anulusa u koncentričnom sloju oko mlaza. U mlazu se čestice, nošene strujom vazduha, kreću naviše, da bi po izlasku iznad nasutog sloja, izgubile kinetičku energiju i u obliku pečurke, odnosno vodene fontane (otuda naziv fontanski sloj) pale na vrh sloja koji okružuje mlaz (annulus), u kome se čestice protivstrujno u odnosu na vazduh, kreću naniže. Fontanovanjem inertnog sloja čestica toplim vazduhom formira se ciklično kretanje čestica u sloju. Raspršavanjem tečnosti po površini prethodno zagrejanih čestica formira se tanki film na njihovoj površini. Istovremenim prenosom toplote sa zagrejane inertne čestice i toplog vazduha, kojim se čestica fontanjuje, na film tečnosti, dolazi do sušenja filma i njegovog pretvaranja u skramu osušenog materijala. Pod dejstvom trenja čestica – čestica i čestica – vazduh suvi materijal se skida sa površine i strujom vazduha nosi u separator. Inertna čestica, kao teža, pada na vrh sloja i ponovnim dolaskom u zonu kvašenja proces se nastavlja. Proces dobijanja praškastog proizvoda se takođe odvija u jednom koraku i nije potrebna njegova dorada. Sušenje suspenzija u fontanskom sloju je nastalo kao posledica pokušaja da se prevaziđu neki od nedostataka sušara sa raspršavanjem, koji se pre svega ogledaju u velikim dimenzijama i nemogućnosti efikasnog sušenja pri niskim temperaturama kada su u pitanju toplotno osetljivi materijali.

Sušenje suspenzija u fontansko–fluidizovanom sloju sa centralnom cevi se može vršiti uz zadržavanje svih pozitivnih karakteristika fontanskog sloja, uz dodatak centralne cevi u osi kolone, na određenom rastojanju od dna kolone i uvođenjem nezavisnog toka vazduha na dnu sloja (anularnog toka), kao što je prikazano na slici 8.28.

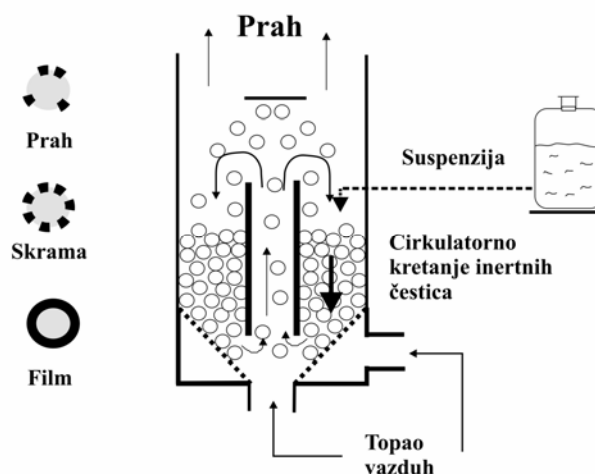
Proces sušenja suspenzija se i u njemu odvija po istom mehanizmu kao i u fontanskom sloju, ali kako se sušenje odvija u tankom filmu ($\sim 3 - 5 \cdot 10^{-6}$ m) na česticama inertnog punjenja to je dodirna površina za prenos toplote i mase veoma velika, a toplotni kapacitet inertnih čestica u maloj zapremini čini uređaj znatno efikasnijim u poređenju sa drugim



Slika 8.27 Šema fontanskog sloja

Sušara sa raspršavanjem istog kapaciteta ima preko 20 puta veću zapreminu, što znatno povećava investicione troškove pri gradnji ovakvih sistema. U sušari sa fontansko–fluidizovanim slojem se može odvijati proces sušenja i pri relativno niskim temperaturama što omogućava sušenje temperaturno osetljivih materijala, uz zadržavanje njihovih funkcionalnih, nutritivnih ili aromatskih karakteristika. Tako je moguće dobiti prah temperature 30°C sa ulaznom temperaturom vazduha od 100°C i temperaturom sloja od 60°C , pri izlaznom sadržaju vlage od 5%, što se postiže relativno kratkim vremenom boravka materijala u sušari i efikasnim korišćenjem toplote samo na isparavanje tečnosti a ne i na zagrevanje produkta. Tako se vreme boravka materijala u sušari kreće od nekoliko sekundi do 1 do 2 min. Značaj kratkog vremena boravka materijala u sloju se ogleda u nemogućnosti denaturacije proizvoda dužim izlaganjem na povišenoj temperaturi.

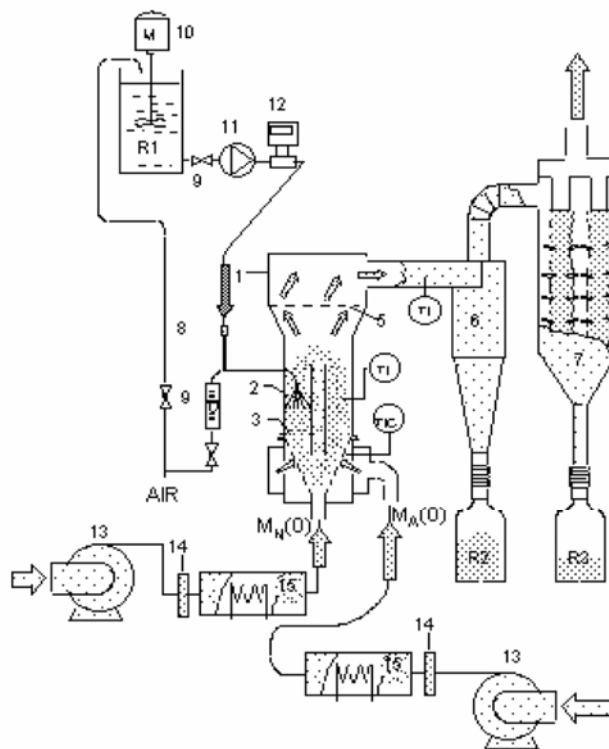
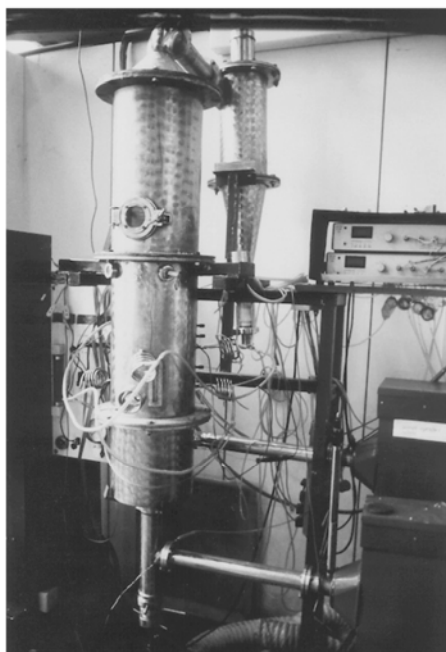
Slika 8.28 Sušenje na tankom filmu u fontansko–fluidizovanom sloju sa inertnim punjenjem



Poređenjem promene rastvorljivosti proteina, kao jedne od osnovnih mera kvaliteta dobijenog praškastog proizvoda, sušenih u različitim tipovima sušara, utvrđeno je da je, rastvorljivost proizvoda dobijenih u pokretnom sloju sa kratkim vremenom boravka u sušari, daleko veća u odnosu na sušenje u tavama ili valjkastim sušarama. Takođe ispitivanja i u odnosu na sušaru sa raspršavanjem, pokazuju veću rastvorljivost proteina dobijenih u sušari sa fontanskim slojem.

Osnovne prednosti sušare sa fontanskim slojem su fleksibilnost u pogledu kapaciteta, laka regulacija, jednostavna manipulacija i relativno niža cena instaliranja i eksploatacije. Nedostatak ovog tipa sušare je u tome što se u njoj ne mogu sušiti lepljive suspenzije.

Na slici 8.29 prikazana je fontansko–fluidizovana sušara sa centralnom cevi, sledećih karakteristika: centralni deo sušare čini kolona prečnika 250 mm, visine 1,5 m, koja na dnu ima perforirano konično dno ugla 45 °C. U osi kolone postavljena je cev prečnika 65 mm i promenljive dužine, od 600 do 900 mm, sa mogućnošću da se menja aksijalno rastojanje početka cevi od dna kolone. Dovod vazduha za obrazovanje fontansko–fluidizovanog sloja je izveden preko mlaznog i anularnog priključka. Mlazni priključak je postavljen osno na dnu kolone, dok je anularni priključak postavljen bočno na dnu kolone u zoni ispod perforiranog konusa.



Slika 8.29 Sušara sa fontansko fluidizovanim slojem

Na izlazu iz kolone nalazi se visokoefikan ciklon za sakupljanje praha prilikom sušenja suspenzija i rastvora. Suspenzija se dovodi u kolonu setovima dvofluidnih mlaznica koje su pos-

tavljene iznad vrha anulusa. Termin dvofluidna mlaznica se odnosi na konstrukciju mlaznice kojom se jednim tokom dovodi tečna faza, da bi aksijalnim tokom komprimovanog vazduha bila raspršena na izlazu iz mlaznice. Maksimalni kapaciteti koji se mogu postići na ovakvoj jedinici su do 10 dm³/h isparene vode, što uobičajeno za biološke suspenzije iznosi 1,5 do 2,0 kg/h praškastog proizvoda. Ovim sistemom uspešno je sušena lepeza različitih proizvoda biotehnologije (kvasac, mleko, krvna plazma...).

8.7. LIOFILIZACIJA

Kod sublimacionih sušara (liofilizacija), proces se odvija tako što se vlažan materijal zamrzne na –15 do –50 °C, a zatim se kristali leda sublimišu pri blagom zagrevanju u visokom vakuumu. Prednosti ovog metoda su:

- dobra rekonstitucija dehidratiranih proizvoda,
- produžena stabilnost proizvoda,
- uklanjanje vode iz proizvoda bez prekomernog zagrevanja i
- brzo i dobro rastvaranje pri rekonstituciji proizvoda (ponovno kvašenje).

Njegovi nedostaci su:

- relativno mali kapacitet,
- dužina procesa i
- investicioni i operativni troškovi.

Liofilizacija je stabilizirajući proces u kojem se supstanca prvo zamrzava, a onda se smanjuje količina rastvarača (najčešće vode), sublimacijom (primarno sušenje) i desorpcijom (sekundarno sušenje), do vrednosti koja više ne podržava biološku aktivnost ili hemijske reakcije. Postupak liofilizacije se odvija u tri faze.

Prva faza – zamrzavanje. Cilj ove faze je zamrzavanje proizvoda, tako da aktivna komponenta ostane nepromenjena. Rastvarač kristališe i formiranjem kristala rastvorena supstanca se potiskuje u prostor između kristala – intersticijalno područje. Zamrzavanjem se, dakle, odvaja rastvarač od rastvorene supstance. Brzina hlađenja utiče na strukturu zamrznutog matriksa. Ako se voda zamrzava brzo, kristali leda su mali, što dovodi do porozne strukture proizvoda sa visokim otporom prema protoku vodene pare, čime se produžava vreme primarnog sušenja. Ako je zamrzavanje sporo, ledeni kristali rastu od površine koja se hladi i veći su. Zamrzavanje se obično završava na eutektičkoj temperaturi suspenzije za liofilizaciju. Eutektička temperatura je tačka na faznom dijagramu u kojoj se temperatura sistema ili koncentracija rastvora ne može promeniti bez promene broja prisutnih faza. Zamrzavanje je završeno kada je rastvorena supstanca u čvrstom stanju i kada je pokretljivost vode u intersticijalnom području jednaka nuli. Voda koja je neophodna za održavanje stabilnosti finalnog proizvoda (posebno proteina ili hidrata), je vezana voda, koja ne učestvuje u zamrzavanju.

Druga faza – primarno sušenje. Primarno sušenje je druga faza liofilizacije tokom koje led, koji je formiran u fazi zamrzavanja, sublimira. U literaturi se označava i kao vakuum sušenje ili kriosušenje. Sublimacijom leda voda se najvećim delom uklanja, a zaostaje rastvorena supstanca.

Ukoliko se sublimacija odvija na atmosferskom pritisku, proces je spor, jer molekuli gasa pronalaze put kroz atmosferske gasove koji bombarduju površinu leda. Molekuli vode napuštaju površinu leda difuzijom. Sublimacija se može ubrzati smanjenjem pritiska iznad površine leda, kada se materijal ubaci u komoru pod vakuumom, pošto su prethodno gasovi već uklonjeni pomoću vakuuma. Kada pritisak u komori postane manji od pritiska pare, definisanog temperaturom leda, brzina sublimacije značajno raste, a vodena para se uklanja putem kondenzacije.

Tok ove faze u velikoj meri određuje izgled liofilizata (tzv. „kolača”), koji je porozne strukture nastale sušenjem intersticijalnih konstituenata. Izgled "kolača" je rezultat procesa primarnog sušenja u kome je temperatura rastvorenih supstanci dovoljno niska, tako da nema značajnih količina mobilne vode. Ukoliko zaostane mobilna voda, rastvorena supstanca se ugiba i "kolač" se kompletno topi. Dobar izgled „kolača” ukazuje na dobro očuvanu poroznu strukturu, nepromenjene fizičke osobine i očuvanje aktivnih komponentu, nakon rekonstitucije.

Treća faza – sekundarno sušenje. Tokom treće faze liofilizacije, temperatura raste, da bi sadržaj vode dostigao optimalnu vrednost, koja garantuje stabilnost proizvoda. Dužina ove faze i finalna rezidualna vlaga zavise od vrste proizvoda koji se liofilizuje. Proteini i peptidi zahtevaju veći procenat vlage jer se time čuva njihova sekundarna i tercijarna struktura. U tim slučajevima pažljivo se kontroliše procenat rezidualne vlage u proteinskom proizvodu. Ukoliko se liofilizuju bakterijske ćelije, postavlja se zahtev da u finalnom proizvodu ne bude više od 1% rezidualne vlage.

Faktori koji utiču na uspešnost liofilizacije su:

- priprema suspenzije za liofilizaciju,
- vođenje postupka liofilizacije i
- uslovi čuvanja liofilizovanog kolača.

Priprema suspenzije za liofilizaciju. Suspenzija za liofilizaciju je smeša aktivne komponente, inertne komponente i krioprotektanata. Ona se, neposredno po pripremanju, liofilizuje. Postupak liofilizacije treba da očuva specifičnu aktivnost aktivne komponente, koja može biti hemijske ili biološke prirode. U farmaceutskoj industriji, aktivna komponenta je definisana potencom, a u dijagnostici svojom reaktivnošću. Aktivna komponenta u proizvodnji starter kultura za mlečnu industriju izražava se preko vitalnosti ćelija mikroorganizama. Inertne komponente su vezivna sredstva koja obezbeđuju stabilnu tečnu sredinu u suspenziji za liofilizaciju, a istovremeno mogu da imaju i ulogu krioprotektanata. Krioprotektanti su jedinjenja koja štite aktivnu komponentu tokom zamrzavanja, time što štite ćelijske membrane od ivica kristala leda. U tu svrhu se najčešće koriste saharoza, glukoza, dekstran, trehaloza, natrijumglutamat, glicerol, adonitol, pepton, konjski serum, vitamini B kompleksa, natrijumacetat itd. Izbor krioprotektanta zavisi od njegove efikasnosti i ekonomske isplativosti u okvirima date proizvodnje i opreme.

Suspenzija za liofilizaciju predstavlja izbalansiranu smešu navedenih komponenti. Kao primer mogu da posluže sledeće smeše:

- kombinacija 10% obranog mleka, 5% glicerola i 0,1% CaCO_3 daje 85,9% preživljavanja
- kombinacija 10% obranog mleka, 5% saharoze daje 67,4% preživljavanja.

Optimalni sadržaj suve mase u formulaciji suspenzije za liofilizaciju je obično do 20%. Nizak sadržaj suve mase u formulaciji može dovesti do pucanja kolača tokom sušenja, a visok sadr-

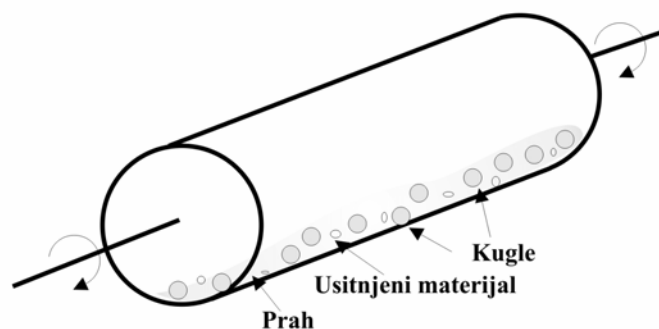
žaj suve mase, preko 20%, može biti prepreka izdvajanju vode iz kolača tokom sekundarnog sušenja.

Izvođenje postupka liofilizacije. Oprema za liofilizaciju može biti manjeg ili većeg obima. Parametri procesa mogu se kontrolisati ručno ili automatski. Pored osnovnih funkcija (hlađenje, zagrevanje i kontrola vakuumu), u modernoj opremi inkorporirani su sistemi za čišćenje i sterilizaciju na licu mesta (CIP, clean in place, i SIP, sterilize in place) i kompjutersko praćenje procesa.

Uslovi čuvanja liofilizovanog kolača. Kiseonik, vlaga i svetlost su štetni po sušene koncentrovane kulture i zato se one pakuju pod vakuumom ili pod suvim inertnim gasom, a čuvaju na temperaturi od 4 do 8 °C (temperatura frižidera). Liofilizovani *Lactobacillus acidophilus*, čuvan na 4 °C, posle godinu dana pokazuje neznatno smanjenje broja živih bakterija, a čuvan na 22 °C, u toku prva dva meseca pokazuje nagli pad broja živih bakterija. Čuvanjem na sobnoj temperaturi, dolazi do bržeg pada vitalnosti i propadanja kulture.

8.8. MLEVENJE

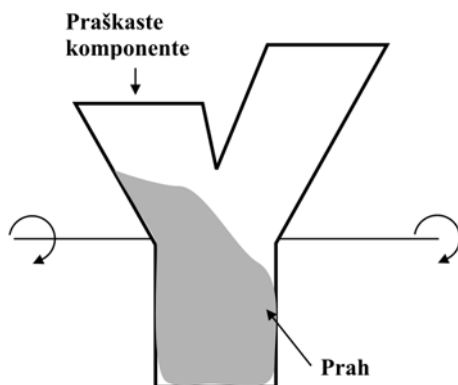
Proizvodi biotehnoloških procesa su obično temperaturno osetljivi, pa se, radi granulometrijskog ujednačavanja proizvoda, najčešće primenjuju kuglični mlinovi. Oni rade na principu rotiranja cilindra u kome se nalaze kugle zajedno sa materijalom koji se melje (slika 8.30). Pri okretanju cilindra sa određenim brojem obrtaja, koji zavisi od konstrukcije mlina i materijala koji se melje (1 do 3 obrtaja/s), i neprekidnom kotrljanju kugli unutar cilindra zajedno sa materijalom dolazi do njegovog sitnjenja.



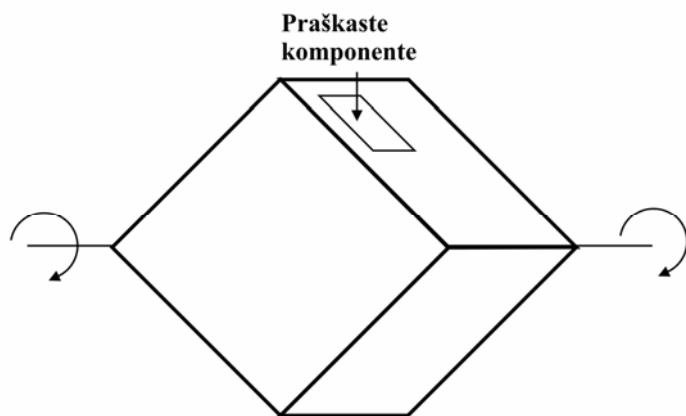
Slika 8.30 Kuglični mlin cilindričnog oblika

8.9. UMEŠAVANJE PRAŠKASTIH PROIZVODA

Mešanje praškastih proizvoda se izvodi u tzv. V – mešaču (slika 8.31) ili u kocki koja rotira (slika 8.32), pri relativno malom broju obrtaja (15 do 20 obrtaja/min). Najbolji efekti se postižu tako što se pri okretanju suda sa prahom kotrlja sloj preko sloja. Time je moguće postići veoma kvalitetno mešanje dva praškasta proizvoda sa razlikom u redu veličine koncentracije u smeši.



Slika 8.31 Šematski prikaz V – mešača



Slika 8.32 Šematski prikaz mešača u obliku kocke

9. RAZVOJ BIOPROCESA

9.1. POVEĆANJE RAZMERA BIOPROCESA

Pod povećanjem razmera bioreaktora¹ podrazumeva se povećanje veličine bioreaktora od laboratorijskog, preko poluindustrijskog, do industrijskog nivoa. Povećanje razmera bioreaktora je jedan od najznačajnijih problema biohemijskog inženjerstva. Logično je postaviti pitanje: zašto se povećanje razmera bioreaktora pojavljuje kao problem u biohemijskom inženjerstvu. Ili, drugim rečima, zašto se jednostavno ne napravi industrijski bioreaktor, geometrijski sličan laboratorijskom bioreaktoru, s jednakom specifičnom snagom mešanja, brzinom obrtanja mešalice ili specifičnom protokom vazduha. Odgovor na ova pitanja leži u činjenici da svi problemi vezani za povećanje razmera bioreaktora proizilaze iz zavisnosti procesnih parametara od veličine bioreaktora.

Za rad bioreaktora bitne su tri grupe fenomena:

- termodinamički (oslobađanje toplote, prenos toplote),
- kinetički (bioproceni) i
- transportni (prenosi količine kretanja, mase i energije).

Termodinamičke osobine, kao što je, na primer, rastvorljivost kiseonika, ne zavise od veličine bioreaktora, ali zavise od sastava hranljive podloge i temperature. Rast mikroorganizama i biosinteza proizvoda, takođe, ne zavise od veličine bioreaktora već od lokalnih okolnih uslova (sastav hranljive podloge, pH i temperatura). Fenomeni prenosa su veoma zavisni od veličine bioreaktora. Rastvoreni kiseonik i drugi supstrati troše se neprekidno zbog metaboličke aktivnosti ćelija biokatalizatora pa oni moraju stalno da se obezbeđuju prenosom mase. Pored toga, na biokatalizator uvek deluju smicajne sile koje su, takođe, vrsta fenomena prenosa (prenos količine kretanja), koje mogu "oštetiti" ćelije bioloških katalizatora ili uticati na formiranje aglomerata (na primer, peleta). U malom laboratorijskom bioreaktoru gradijenti koncentracije su mali, odnosno uslovi mešanja su bliski idealnom mešanju, a smicajne sile relativno slabe. U velikom industrijskom bioreaktoru mogu postojati veliki gradijenti koncentracije i pritiska, a smicajne sile su mnogo jače nego u malom bioreaktoru. Prema tome, problem povećanja razmera bioreaktora postoji jedino zbog zavisnosti fenomena prenosa od veličine bioreaktora.

Uticaj fenomena prenosa na ponašanje bioloških katalizatora u bioreaktorima različite veličine je veoma složen i često nepredvidljiv. Značaj fenomena prenosa procenjuje se na osnovu njihovih vremenskih konstanti.

¹ Eng. *scale up*

Fenomeni prenosa u bioreaktorima odvijaju se *konvektivnim* (vrtložnim) ili *difuzionim* (molekulskim) *mehanizmom*. Vremenska konstanta konvektivnog prenosa data je izrazom:

$$\tau_k = \frac{L}{u_L} \quad (9.1)$$

gde je: τ_k – vremenska konstanta konvektivnog procesa, L – karakteristična dimenzija (prečnik suda) i u_L – brzina strujanja tečnosti.

Brzina strujanja tečnosti mora da se poveća proporcionalno sa povećanjem veličine bioreaktora, da bi vremenska konstanta konvektivnog mehanizma ostala konstantna pri povećanju razmera bioreaktora. U slučaju bioreaktora sa mešanjem, gde je $u_L \propto N_i L$, ovo praktično znači da brzina obrtanja mešalice N_i treba da bude konstantna na svim nivoima. Ovo, međutim, ima za posledicu značajno povećanje specifične snage mešanja, što je nepovoljno, pošto važi zavisnost:

$$\frac{P}{L^3} \propto \rho_L N_i^3 L^2 \quad (9.2)$$

gde je: N_i – broj obrtaja mešalice, a

$$\frac{P}{V_L} \propto L^2 \quad (9.3)$$

Vremenska konstanta za difuzioni prenos iznosi:

$$\tau_d = \frac{L^2}{D_L} \quad (9.4)$$

gde je: τ_d – vremenska konstanta za difuzioni prenos i D_L – koeficijent molekulske difuzije.

Ako difuzija limitira bioproces, povećanje veličine bioreaktora značajno se odražava na vremensku konstantu. Pošto koeficijent molekulske difuzije ne zavisi od veličine bioreaktora, to je:

$$\tau_d \propto L^2 \quad (9.5)$$

Jednačine (9.1) i (9.5) pokazuju da se vremenske konstante transporta značajno povećavaju sa povećanjem veličine bioreaktora, dok je vremenska konstanta mikrobiološkog procesa, definisana sledećom jednačinom:

$$\tau_c = \frac{c}{r} \quad (9.6)$$

gde je: c – koncentracija i r – brzina reakcije, koja se može smatrati nezavisnom od veličine bioreaktora. U velikim industrijskim bioreaktorima je $\tau_c < \tau_k$ ili τ_d .

Uticaj fenomena prenosa na funkcionisanje bioreaktora raste sa povećanjem veličine bioreaktora, jer se vremenska konstanta transporta povećava sa povećanjem veličine bioreaktora. Sa konvektivnim i difuzionim prenosom povezani su direktno sledeći fenomeni:

– smicanje,

- mešanje (vreme mešanja t_m),
- prenos mase ($k_L a$),
- prenos toplote i
- makrokinetika (ako brzina procesa zavisi od kinetike i difuzije).

Ovi fenomeni su, zbog toga, podložni promenama pri povećanju veličine bioreaktora. Pošto uslovi mešanja utiču na lokalne okolne uslove, od kojih zavisi rast mikroorganizama i biosinteza proizvoda, očekuje se da će se i "prividno" kinetičko ponašanje mikroorganizama menjati s povećanjem veličine bioreaktora.

9.1.1. Metodi povećanja razmera bioreaktora

Proizvodni kapacitet biotehnološkog postupka može se, u principu, povećati na dva načina:

- povećanjem broja identičnih bioreaktora ili
- povećanjem zapremine bioreaktora.

Primena više identičnih bioreaktora je najsigurniji način povećanja kapaciteta proizvodnje. U identičnim bioreaktorima očekuju se identični transportni i kinetički fenomeni, pa i identični rezultati procesa. Na ovaj način izbegavaju se sve neizvesnosti koje prate proces povećanja razmera bioreaktora, a nepotrebno je i poluindustrijsko postrojenje. Pored toga, postrojenje sa više identičnih bioreaktora je fleksibilnije sa aspekta njegove primene za istovremeno dobijanje različitih proizvoda.

Zbog neizvesnosti procesa povećanja razmera bioreaktora obično se pre projektovanja industrijskog bioreaktora obavljaju ispitivanja na poluindustrijskom postrojenju, koje je po kapacitetu između laboratorijskog i industrijskog. Na ovaj način proverava se uticaj transportnih fenomena na kinetičko ponašanje i "oštećenje" biološkog katalizatora. Upotrebom poluindustrijskog bioreaktora smanjuje se rizik od neuspešnog povećanja razmera bioreaktora. Održavanje konstantnim temperature, pH ili koncentracije supstrata (naročito rastvorenog kiseonika) uprošćava se postupak povećanja veličine bioreaktora.

Za povećanje razmera bioreaktora primenjuje se najčešće neki od sledećih metoda:

- fundamentalni metod,
- semifundamentalni metod,
- dimenziona analiza i teorija sličnosti,
- iskustveni metod i
- metod "probaj i greši".

Fundamentalni metod. Ovaj metod je najsloženiji jer se zasniva na predstavljanju zbivanja u bioreaktoru matematičkom modelom koji čine jednačine bilansa količine kretanja, toplote i mase. Složenost modela uslovljena je matematičkim i hemijsko-inženjerskim razlozima. Model se uprošćava pretpostavkom o izotermnom vođenju procesa. Sem u slučaju jednostavnih i dobro definisanih uslova strujanja, nemoguće je rešiti jednačine bilansa količine kretanja. Zbog toga je primena ovog metoda, na današnjem stupnju razvoja nauke, ograničena na vrlo jednostavne sisteme, na primer, sa laminarnim strujanjem ili bez strujanja.

Semifundamentalni metod. Pored iskustvenog metoda, semifundamentalni metod se, verovatno, najčešće koristi u praksi. Osnovna odlika ovog metoda je primena jednostavnih modela strujanja, kao što su: model idealnog mešanja, model proticanja sa idealnim mešanjem, model idealnog klipnog strujanja i disperzioni model. Obično se pretpostavljeni model strujanja proverava eksperimentalno ispitivanjem raspodele vremena zadržavanja. Primenom ovih modela strujanja izbegavaju se problemi vezani za primenu i rešavanje jednačina bilansa količine kretanja. Model idealnog mešanja se najčešće primenjuje u slučaju bioreaktora sa mešanjem. Provere modela strujanja izvršene su do sada u manjim bioreaktorima ($10 - 100 \text{ dm}^3$). Prenos modela strujanja, koji je utvrđen u malom bioreaktoru, na veliki industrijski bioreaktor povezan je sa izvesnim rizikom zbog nedostatka pouzdanih eksperimentalnih podataka o strujanju u velikim sudovima.

Dimenziona analiza i teorija sličnosti. Dimenziona analiza i teorija sličnosti omogućuju da se do zadovoljavajućih rešenja dođe u slučajevima kada se ne znaju ili samo delimično znaju zavisnosti između faktora koji utiču na određenu pojavu. Dimenziona analiza je algebarski metod, koji se zasniva na svodenju svih relevantnih faktora na osnovne dimenzije. Teorija sličnosti zasniva se na opštem principu prirode da se pod sličnim uslovima moraju javiti slične posledice. U oba slučaja, kao rezultat matematičkog postupka, dobijaju se kriterijalne jednačine koje povezuju bezdimenzione grupe faktora (kriterijumi sličnosti). Fizički smisao ovih bezdimenzionih grupa je, u stvari, odnos između mehanizama transporta.

Pri povećanju razmera bioreaktora bezdimenzione grupe drže se konstantnim na svim nivoima. S obzirom na fizičko značenje bezdimenzionih grupa njihova nepromenljivost obezbeđuje da se relativan značaj mehanizama transporta ne menja sa povećanjem razmera bioreaktora. Osnovni preduslov primene ovih metoda je geometrijska sličnost između bioreaktora različite veličine.

Ovaj postupak povećanja razmera bioreaktora je veoma koristan, iako ima nekoliko nedostataka. Sve bezdimenzione grupe često nije moguće držati nepromenjenim na svim nivoima. U tom slučaju, moraju se odrediti najvažnije grupe uz zanemarivanje ostalih.

Primena kriterijalnih jednačina ponekad vodi nerealnim rezultatima, kao što je prevelika snaga mešanja ili brzina obrtanja mešalice. Ovo se dešava kad se kriterijalna jednačina primenjuje u oblasti u kojoj njena važnost nije eksperimentalno verifikovana. Neki faktori su ponekad nezavisni od veličine bioreaktora i procesnih uslova, kao na primer, veličina gasnih mehura u koalescentnim tečnostima.

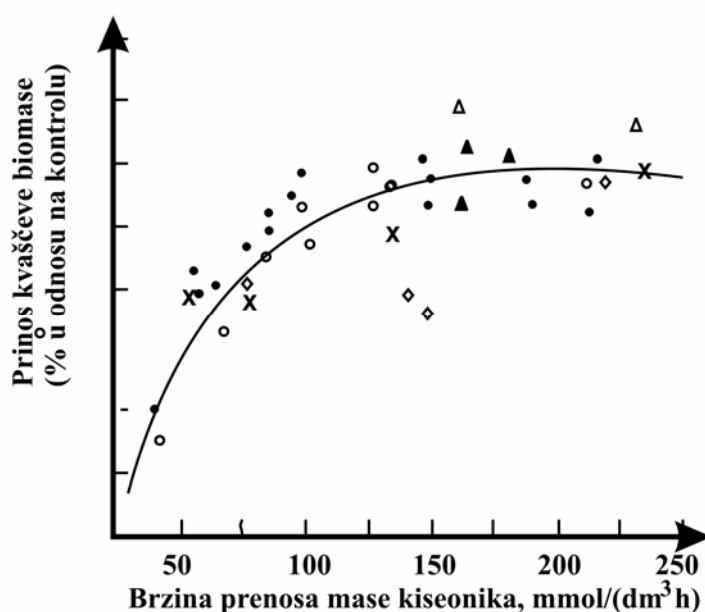
Iskustveni metod. Ovaj metod zasniva se na održavanju jednog od sledećih kriterijuma nepromenjenim nezavisno od veličine bioreaktora:

- zapreminski koeficijent prenosa mase, $k_L a$,
- specifična snaga mešanja, P/V_L ,
- periferna brzina obrtanja mešalice, Nd_i ,
- koncentracija rastvorenog kiseonika i
- vreme mešanja t_m .

Do ovih kriterijuma došlo se iskustveno, pa otuda i naziv metoda. Od navedenih kriterijuma, za povećanje veličine bioreaktora s mešanjem, u Evropi najčešće se primenjuju prva dva (u oko 30% slučajeva) dok se sledeća dva primenjuju u nešto manjem broju slučajeva (oko 20%). Ovi

kriterijumi vezani su sa prenosom mase kiseonika: koncentracija rastvorenog kiseonika zavisi od brzine prenosa mase kiseonika, koji zavisi od zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika na čiju vrednost utiče specifična snaga mešanja, koja je zavisna od periferne brzine obrtanja mešalice (ako je veća od 3 m/s).

Primena iskustvenih kriterijuma za povećanje razmera bioreaktora zasniva se na zavisnosti između željenog rezultata mikrobiološkog procesa, na primer, prinosa proizvoda, i izabranog kriterijuma. Ova zavisnost mora biti verifikovana eksperimentalno u najmanje dva, a najčešće u većem broju, geometrijski sličnih bioreaktora različitih veličina. Postupak primene iskustvenog metoda ilustrovan je na slici 9.1. Željeni rezultat bioprocasa ne zavisi od izabranog kriterijuma ako je on veći od određene kritične vrednosti nezavisno od veličine bioreaktora (ravan deo krive). Ovo znači da svi drugi faktori, uključujući i veće vrednosti izabranog kriterijuma iznad kritične, imaju zanemarljiv uticaj na željeni rezultat. Prema tome, povećanje bioreaktora može se izvršiti uz održavanje izabranog kriterijuma konstantnim i blizu kritične vrednosti (da bi se smanjili troškovi rada).



Slika 9.1 Uticaj brzine prenosa mase kiseonika na prinos biomase kvasca: x – Erlenmayer tikvica (190 cm³); o – laboratorijski bioreaktor (19 dm³): 600 min⁻¹, 800 min⁻¹; Δ – poluindustrijski bioreaktor (265 dm³): ● – s mešanjem (550 min⁻¹) i ▲ – bez mešanja; + – industrijski bioreaktor (114 m³)

Na osnovu izabranog kriterijuma za povećanje razmera i faktora povećanja veličine bioreaktora mogu se izračunati najvažnije procesne promenljive (brzina obrtanja, snaga mešanja i sl.) u većem bioreaktoru. Primena različitih kriterijuma za povećanje razmera bioreaktora ima za posledicu različite procesne uslove u većem bioreaktoru. Ovo je ilustrvano primerom u tabeli 9.1.

Tabela 9.1 Posledice primene različitih kriterijuma za povećanje razmera bioreaktora

<i>Kriterijum za povećanje razmera</i>	<i>Laboratorijski bioreaktor</i>	<i>Industrijski bioreaktor</i>			
	<i>10 dm³</i>	<i>10 m³</i>			
		P/V_L	N	Nd_i	Re_i
P/V_L	1	1	0,22	2,15	21,5
N	1	10^2	1	10	10^2
Nd_i	1	0,1	0,1	1	10
Re_i	1	10^{-4}	10^{-2}	0,1	1

Primena iskustvenog metoda biće detaljnije objašnjena na primeru bioreaktora s mešanjem (s jednom standardnom turbinskom mešalicom s ravnim lopaticama).

a) Održava se konstantnim zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika. Održavanje zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika konstantnim u cilju povećanja veličine bioreaktora ima za cilj održavanje brzine prenosa mase kiseonika konstantnom na različitim nivoima. Ovo je, međutim, moguće samo ako je pogonska sila prenosa mase, takođe, konstantna na svim nivoima.

Tabela 9.2 Posledice povećanja veličine bioreaktora uz održavanje zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika konstantnim

<i>Kriterijum</i>	<i>Laboratorijski bioreaktor</i>		<i>Industrijski bioreaktor</i>	
	<i>75 dm³</i>		<i>10 m³</i>	
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>I</i>	<i>II</i>
H_L/d_i	1	1	1	2,8
P/V_L	1	1	>1	1
vvm	1	1	0,2	0,1
u_G	0,1	0,5	0,1	0,1
$k_L a$	1	1	1	1

Tabela 9.2 prikazuje primer povećanja veličine bioreaktora uz održavanje zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika ($k_L a$) konstantnim na različitim nivoima. Može se videti da nije moguće održavati specifičan protok vazduha nepromenjenim, pošto će se površinska brzina gasa u_G povećavati sa povećanjem veličine bioreaktora. U nekim slučajevima, pri dovoljno velikoj površinskoj brzini gasa, može doći do "plavljenja" mešalice. Zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika se može održati nepromenjenim u većem bioreaktoru pri istom specifičnom protoku ga-

sa kao u manjem bioreaktoru ili povećanjem specifične snage mešanja ili promenom geometrije bioreaktora.

Održavanje zapreminskog koeficijenta prenosa mase konstantnim na različitim nivoima može imati i negativne efekte, kao što su: "oštećenje" mikroorganizama u turbulentnim uslovima mešanja ili koalescencija mehurova u bioreaktorima bez mehaničkog mešanja pri velikim protocima gasa. Pored toga, zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika nije uvek konstantan u toku fermentacije. Tako, na primer, u slučaju jako viskoznih hranljivih podloga ili nastajanja površinski aktivnih materija uočene su velike varijacije u vrednosti zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika. U ovim slučajevima, veći uspeh u povećanju razmera bioreaktora postiže se ako se kao kriterijum usvoji brzina potrošnje kiseonika. Potrebna brzina prenosa mase kiseonika u većem bioreaktoru postiže se promenom uslova mešanja ili aeracije u toku bioprocesa. Ovaj pristup omogućava čak da različiti bioreaktori ne moraju da budu geometrijski slični.

b) Održava se konstantnom specifična snaga mešanja. Nepromenljivost specifične snage mešanja u geometrijski sličnim bioreaktorima koristi se vrlo često kao kriterijum za povećanje razmera bioreaktora. Konstantnost specifične snage mešanja vodi sličnim vrednostima zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika u različitim bioreaktorima. Na osnovu iskustva preporučuje se da vrednost specifične snage mešanja bude $1,7 \text{ kW/m}^3$. Specifična snaga mešanja "čistih" tečnosti u bioreaktorima koji se koriste u fermentacionoj industriji evropskih zemalja smanjuje se sa povećanjem zapremine bioreaktora, tako da važi:

$$\frac{P}{V_L} \propto V_L^{-0,5} \quad (9.7)$$

Ako su specifične snage mešanja jednake u dva bioreaktora različitih veličina, onda je:

$$\left(\frac{P_G}{V_L} \right)_1 = \left(\frac{P_G}{V_L} \right)_2 \quad (9.8)$$

gde se indeksi 1 i 2 odnose na mali i veliki bioreaktor. Snaga mešanja disperzije gas – tečnost, saglasno Michel–Miller-ovoj korelaciji je:

$$P_G \propto \left(\frac{P_0 N_i d_i^3}{Q_G^{0,56}} \right)^{0,45} \quad (9.9)$$

Pošto je snaga mešanja "čiste" tečnosti u turbulentnim uslovima mešanja $P_0 \propto N_i^3 d_i^5$, to je snaga mešanja disperzije:

$$P_G \propto \frac{N_i^{1,8} d_i^{3,6}}{Q_G^{0,252}} \quad (9.10)$$

Brzina obrtanja mešalice u većem bioreaktoru može se izračunati kombinovanjem jednačina (9.9) i (9.10)

$$N_{i2} = N_{i1} \left(\frac{V_2}{V_1} \right)^{5/9} \left(\frac{d_{i,1}}{d_{i,2}} \right)^2 \left(\frac{Q_{G,2}}{Q_{G,1}} \right)^{0,14} \quad (9.11)$$

Brzina obrtanja mešalice zavisice ne samo od faktora povećanja veličine bioreaktora i mešalice, već i od izabranog kriterijuma za povećanje intenziteta aeracije.

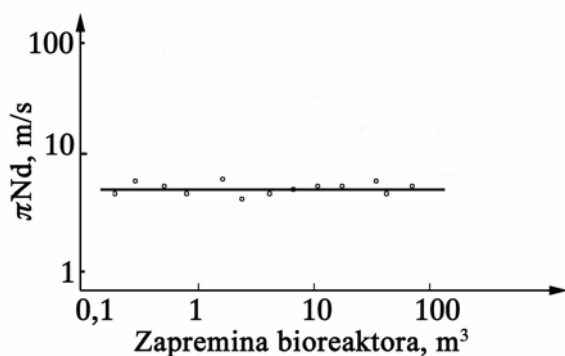
Povećanje veličine bioreaktora uz održavanje specifične snage mešanja nepromenjenom, ima kao negativnu posledicu značajno povećanje vremena mešanja i periferijske brzine obrtanja mešalice, kao što se može videti u tabeli 9.1. Ovo znači da je mešanje slabije, a sile smicanja intenzivnije u većem bioreaktoru.

c) Održava se konstantnom periferna brzina. Periferna brzina obrtanja mešalice utiče na sile smicanja u bioreaktoru, a naročito u zoni oko impelera. Ovaj uticaj ne sme se zanemariti ako je mikroorganizam osetljiv na smicanje. Dodatni problem je što promena sila smicanja s povećanjem veličine bioreaktora nije najjasnija. Smicanje može imati i negativne (na primer, "oštećenje" mikroorganizma) i pozitivne (na primer, smanjenje veličine micelijskih čestica) efekte.

U turbulentnim uslovima mešanja napon smicanja je proporcionalan perifernoj brzini obrtanja mešalice:

$$\tau \propto \rho_L (N_i d_i)^2 \quad (9.12)$$

Zbog toga se periferna brzina obrtanja koristi kao kriterijum za povećanje – razmera bioreaktora. Na osnovu stanja u evropskoj fermentacionoj industriji može se zaključiti da je ovaj kriterijum dosledno poštovan (slika 9.2). Nezavisno od veličine bioreaktora i vrste mikroorganizama (tj. reoloških osobina tečnosti), periferna brzina obrtanja mešalice je konstantna: $\pi N_i d_i = 5\text{--}6 \text{ m/s}$.



Slika 9.2 Zavisnost između periferijske brzine mešalice i zapremine bioreaktora

Metod probe i greške. Metod probe i greške se najduže koristio u svrhe povećanja razmera bioreaktora. Danas se ovaj metod ne koristi zbog velikog rizika od neuspeha koji ima za posledicu velike troškove.

9.1.2. Promena inteziteta aeracije povećanjem razmera bioreaktora

Pri povećanju razmera bioreaktora posebno se postavlja pitanje kako menjati intenzitet aeracije. Opšte prihvaćena pravila su:

- 1) konstantan specifičan protok vazduha ($vvm = const.$),

- 2) konstantna površinska brzina vazduha ($u_G = \text{const.}$) i
- 3) konstantan aeracioni broj $\left(N_a = \frac{Q_G}{N_i d_i^3} = \text{const.} \right).$

Posledice primene ovih kriterijuma vide se u tabeli 9.3. Protok gasa u velikom bioreaktoru povećava se nezavisno od primenjenog kriterijuma. Primena nepromenljivosti specifičnog protoka vazduha obično nije uspešna. Prednost se daje konstantnoj površinskoj brzini gasa jer onda, na primer, zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika zavisi samo od specifične snage mešanja.

Tabela 9.3 Posledice primene različitih kriterijuma za povećanje intenziteta aeracije

<i>Kriterijum</i>	$\frac{u_{G,2}}{u_{G,1}}$	$\frac{Q_{G,2}}{Q_{G,1}}$
<i>vvm</i>	$d_{i,2}/d_{i,1}$	$(d_{i,2}/d_{i,1})^3$
u_G	1	$(d_{i,2}/d_{i,1})^2$
Q_G/Nd_i^3	$(d_{i,2}/d_{i,1})^{1/3}$	$(d_{i,2}/d_{i,1})^{7/3}$

9.1.3. Ograničenja održavanja geometrijske sličnosti

Obično se pri povećanju veličine bioreaktora između bioreaktora različite veličine održava geometrijska sličnost, koja znači linearno povećanje svih dimenzija suda i mešalice. Održavanje geometrijske sličnosti povlači značajna ograničenja, kao što su, na primer:

- 1) Većina literaturnih korelacija zavise od veličine bioreaktora. Ove korelacije su najčešće nepouzdate.
- 2) Fizičke osobine fermentacione tečnosti (viskozitet, površinski napon i dr.) menjaju se u toku fermentacije, a ove promene su različite u bioreaktorima različitih veličina.
- 3) Površinska brzina gasa u velikom bioreaktoru može biti i za red veličine veća od one u malom bioreaktoru, iako je specifičan protok gasa u velikom bioreaktoru manji nego u malom bioreaktoru. Ovo može imati posledice na sadržaj gasa, stvaranje pene, brzinu prenosa mase kiseonika itd.
- 4) Gotovo je nemoguće održavati nepromenjenim uticaje, na primer, razmenjivača toplote ili instrumenata ugrađenih u bioreaktoru, na različitim nivoima.
- 5) Promena površinske aeracije s povećanjem veličine bioreaktora je od praktičnog značaja. Intenzitet mehaničkog uvlačenja gasa kroz slobodnu površinu tečnosti zavisi od specifične snage mešanja i površinske brzine gasa:

$$\alpha_s = 2,75 \cdot 10^{-15} \left(\frac{P_G}{V_L} \right)^{2,5} u_G^{-1,5} \quad (9.14)$$

gde je: α_s – odnos između protoka gasa kroz slobodnu površinu tečnosti i protoka vazduha kroz mlaznicu. Promena intenziteta površinske aeracije sa povećanjem veličine bioreaktora zavisi od izabranog kriterijuma za povećanje razmera bioreaktora. Ako se pri povećanju veličine bioreaktora specifična snaga mešanja i površinska brzina gasa održavaju konstantnim, onda će intenzitet površinske aeracije ostati konstantan, ali se protok usisanog gasa po jedinici zapremine tečnosti smanjuje. Ako se, pak, specifičan protok gasa kroz mlaznicu održava konstantnim, onda se i intenzitet aeracije i protok usisanog gasa po jedinici zapremine tečnosti smanjuju sa povećanjem veličine bioreaktora.

U mnogim slučajevima je nepraktično ili nerazumno održavati geometrijsku sličnost bioreaktora. Odstupanje od geometrijske sličnosti omogućava veću fleksibilnost u projektovanju bioreaktora. Tako, na primer, povećanje veličine bioreaktora bez održavanja geometrijske sličnosti omogućava da se i zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika i napon smicanja održavaju konstantnim u bioreaktorima različite veličine, što nije moguće ako su bioreaktori geometrijski slični. Čak i u slučaju kad se povećanje veličine bioreaktora vrši bez održavanja geometrijske sličnosti, ostaje problem koji stvaraju promenljive fizičke osobine tokom bioprocesa.

Najpouzdaniji način povećanja – razmera bioreaktora je na osnovu eksperimentalnih ispitivanja u postojećim bioreaktorima. Ovo je obično preskupo i često neizvodljivo. Drugi pouzdan pristup je zasnovan na postojećim podacima dobijenim u bioreaktorima u kojima su izvođeni slični bioprocеси.

9.2. MODELOVANJE BIOPROCESA

Odavno su činjeni pokušaji da se bioprocеси opišu matematički. Tek nedavno su, zahvaljujući sakupljenim neophodnim znanjima o biohemijskim reakcijama u živoj ćeliji, mernim instrumentima i bioreaktorima, kao i razvijenom matematičkom aparatu i računarskoj opremi i programima, učinjeni naponi doveli do uspešnog modelovanja mikrobioloških procesa. Razvijeni matematički modeli su se pokazali vrlo praktičnim i korisnim za različite aspekte biohemijskog inženjerstva, kao što su: povećanje razmera, kontrola, simulacija i optimizacija mikrobioloških procesa. Očekuje se da će s daljim razvojem bioloških i biohemijsko – inženjerskih naučnih disciplina značaj matematičkih modela bioprocesa još više porasti u bliskoj budućnosti.

Matematički modeli su matematički opisi bioprocesa koji, iako često na uprošćenom nivou, dovoljno adekvatno predstavljaju njihovu prirodu. Obično su to grupe matematičkih formula ili jednačina koje opisuju bitne promene u toku bioprocesa. Matematički modeli se „prave” iz više razloga od kojih su najvažniji sledeći:

- predviđanje konverzije supstrata ili proizvodnosti bioprocesa,
- ispitivanje rada postrojenja u različitim uslovima,
- projektovanje bioprocesa,
- povećanje razmera bioprocesa,
- modifikacije u cilju unapređenja bioprocesa,
- optimizovanje bioprocesa,

- kompjutersko simuliranje bioprocesa,
- identifikovanje nepoznatih uticajnih faktora i
- kontrola procesa.

Načelno, upotreba matematičkog modela mikrobiološkog procesa omogućava biohemijском inženjeru da svoje ideje u vezi, na primer, sa projektovanjem, povećanjem razmera ili unapređenjem bioprocesa, proverava na modelu, a ne na postrojenju, čime se značajno smanjuju rizici od gubitaka vremena i troškova eksperimentisanja. Matematički modeli kojima se ostvaruju navedeni ciljevi mogu biti potpuno različiti. Tako, na primer, za projektovanje, povećanje razmera i simulaciju bioprocesa potrebni su prilično detaljni mehanicistički modeli, dok su za kontrolu procesa dovoljni relativno jednostavni modeli.

Vrste modela. Postoji više različitih vrsta matematičkih modela. Po pravilu, jedan model spada istovremeno u nekoliko vrsta modela. Kad se počinje sa ispitivanjem biološkog sistema, obično se on opisuje modelom "crne kutije", koji daje samo formalni opis mehanizama u sistemu. Ovakvi modeli su nestruktuirani, nemehanicistički, tj. fenomenološki i ne dozvoljavaju ekstrapolaciju van opsega uslova u kojima su sprovedena ispitivanja. Sa boljim upoznavanjem strukture biosistema, model "crne kutije" se menja u model "sive kutije", koji okuplja više „elemenata” (odnosno manjih „crnih kutija”), koji mogu biti, na primer, kinetičke ili transportne jednačine. Modeli „sive kutije” su struktuirani i mehanicistički.

Matematički modeli bioprocesa se „prave” za određenu svrhu i sa određenim ciljem. Različiti ciljevi traže različite modele. Prema nameni, matematički modeli bioprocesa mogu se podeliti u dve grupe:

- modeli za kontrolu bioprocesa i
- modeli za simulaciju bioprocesa.

Principi modelovanja bioprocesa. Postupak postavljanja i rešavanja matematičkog modela bioprocesa isti je, u principu, kao za bilo koji hemijski proces. Matematički model se uvek pravi na osnovu dobro formulisanoг verbalnog modela. Matematički modeli mogu biti vrlo jednostavni, ali i vrlo složeni. Jednostavni modeli se lako rešavaju ali ne pružaju dovoljno podataka o bioprocusu. Složeni modeli daju bolji opis bioprocesa, ali imaju velike probleme u dobijanju vrednosti parametara. Da bi model bio što jednostavniji, preporučuje se da modelovanje počne uzimanjem u obzir samo najvažnijih fenomena u složenom biološkom sistemu. Koristeći literaturne ili eksperimentalne podatke biraju se značajne procesne promenljive i formulišu odgovarajuće matematičke jednačine, koje čine matematički model bioprocesa. Ovaj model uključuje konstitutivne i bilansne jednačine: prve obuhvataju kinetičke, transportne i termodinamičke jednačine, dok druge opisuju bilanse mase, toplote i količine kretanja. Ako je bioreaktor sa idealnim mešanjem, bilansne jednačine se postavljaju na makronivou, tj. za ceo bioreaktor.

Načelno, jednačine modela su nelinearne, najčešće diferencijalne jednačine. Da bi se izbeglo nepotrebno usložnjavanje koje će otežati izračunavanja, model se, ako je moguće, uprošćava do nivoa kojim se adekvatno opisuju zbivanja u biološkom procesu uzimanjem u obzir samo relevantnih faktora. Najvažnije pretpostavke koje se mogu koristiti pri modelovanju bioprocesa su da se bilansi toplote i količine kretanja ne razmatraju jer bioreaktor funkcioniše izotermno zbog regulacije temperature na konstantnom nivou, a kvazistacionarna stanja se brzo uspostavljaju posle eventualne promene brzine mešanja ili protoka gasa. Složenost modela može se često umanjiti po-

ređenjem vremenskih konstanti različitih mehanizama. Mehanizmi s vremenskim konstantama mnogo većim od vremenske konstante procesa mogu se izostaviti, dok su mehanizmi s mnogo manjim vremenskim konstantama u ravnoteži ili u kvazistacionarnom stanju.

Pogodnim matematičkim aparatom rešava se sistem matematičkih jednačina koje čine model. Rešavanje jednačina znači da se jedna ili više osobina biosistema dobije u eksplicitnom obliku. Poželjno je da rešenja budu analitička, jer ona omogućuju dublje sagledavanje prirode bioprocasa. Načelno, analitička rešenja se teško dobijaju, izuzev u slučaju linearnih jednačina. Obično se jednačine modela rešavaju numeričkim metodima pomoću računara. Pri korišćenju računara, obavezna je provera korektnosti računarskog programa.

Nakon rešenja jednačina modela, ispituje se osetljivost modela na parametre modela. Prave vrednosti kinetičkih (maksimalna specifična brzina rasta, saturaciona konstanta, koeficijenti prinosa itd.), transportnih (koeficijent molekulske difuzije, zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika itd.) i termodinamičkih (na primer, rastvorljivost kiseonika) parametara moraju biti poznate. S obzirom da dobijanje vrednosti parametara često vremenski dugo traje, a njihova važnost za model nije podjednaka, vrši se tzv. analiza osetljivosti parametara.

Najprostiji način analiziranja osetljivosti parametara sastoji se u sledećem:

- dobijanje prve procene vrednosti parametara (po pravilu, iz literature),
- unošenje ovih vrednosti u model i izračunavanje najvažnije izlazne promenljive modela (na primer, koncentracije) i
- promena vrednosti parametara jednog po jednog za po, na primer, 10%, i ponovno izračunavanje najvažnije izlazne promenljive modela.

Na ovaj način određuju se parametri koji imaju veliki uticaj na izlazne promenljive, a time i na ponašanje modela. Vrednost značajnih parametara mora se odrediti precizno, dok je za ostale parametre često dovoljno znati samo red veličina. Prema tome, cilj analize osetljivosti parametara modela je da se izbegne određivanje tačnih vrednosti manje značajnih parametara.

Sledeći korak je optimizacija parametara i testiranje modela na osnovu eksperimentalnih rezultata. Optimizacija parametara znači podešavanje njihovih vrednosti da bi se postiglo dobro slaganje („fitovanje”) između modela i eksperimenta. Zatim se vrši verifikacija modela, tako što se on poredi sa rezultatima novih eksperimenata izvršenih pod drugačijim uslovima okoline od uslova prilikom eksperimenata sprovedenih radi optimizacije parametara. Samo na ovaj način može se korektno proveriti ispravnost modela i njegova primenljivost za opis ponašanja biološkog sistema u drugačijim uslovima okoline. Ako između modela i eksperimenta ne postoji dobro slaganje, onda se model mora promeniti.

9.3. KONTROLA BIOPROCESA

Kontrola bioprocasa zasniva se na merenju fizičkih, hemijskih i biohemijskih osobina fermentacione tečnosti i podešavanju vrednosti faktora okoline. Modeli za kontrolu fizičkih i hemijskih faktora, kao što su: temperatura, pH i rastvoreni kiseonik, razlikuju se od modela za kontrolu biohemijskih parametara, kao što je specifična brzina rasta. U oba slučaja je, međutim,

važna analogija u ponašanju modela i bioprocesa dok je potpuno nebitno da li model fizički odgovara strukturi bioprocesa.

Za kontrolu temperature i pH, koji se obično održavaju konstantnim u toku fermentacionih procesa, potrebni su jednostavni modeli procesa. Za regulisanje temperature i pH u slučaju mikroorganizma koji oslobađa toplotu i kiseline, potrebno je da se zna zapremina fermentacione tečnosti, da bi se sistemom kontrole odredila količina toplote koju treba razmeniti s rashladnom vodom po jedinici porasta temperature ili količina rastvora baze koju treba dodati u fermentor po jedinici pada pH.

Kontrola koncentracije rastvorenog kiseonika zahteva složeniji model. Koncentracija rastvorenog kiseonika je manja od njegove rastvorljivosti pod datim radnim uslovima zbog trošenja u metabolizmu mikroorganizma. Koncentracija rastvorenog kiseonika obično se reguliše promenom brzine mešanja ili protoka vazduha. Model za kontrolu mora da opiše bilans mase kiseonika u fermentacionoj tečnosti i zavisnost zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika od brzine mešanja ili protoka vazduha.

Kontrola biološkog sistema zasniva se na modelovanju interakcije mikroorganizma i okolne sredine a vrši se podešavanjem okolnih faktora. Tako, na primer, vrlo jednostavan model biološkog sistema uključuje zavisnost brzine rasta mikroorganizma od koncentracije limitirajućeg supstrata (Monod-ov model):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{K_s + S} X \quad (9.15)$$

i brzinu trošenja limitirajućeg supstrata:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} + mX \quad (9.16)$$

gde je: S – koncentracija supstrata, X – koncentracija biomase, μ – specifična brzina rasta, μ_m – maksimalna specifična brzina rasta, K_s – Monod-ova konstanta, $Y_{X/S}$ – koeficijent prinosa biomase u odnosu na supstrat, m – koeficijent održavanja i t – vreme. Kontrola specifične brzine rasta podešavanjem koncentracije limitirajućeg supstrata u fermentacionoj tečnosti je često od kritičnog značaja za mnoge bioprocese. Teškoće u primeni ovog modela nastaju zbog nemogućnosti direktnog praćenja promene koncentracije supstrata i biomase kao i zbog promena koeficijenata prinosa biomase i održavanja u toku bioprocesa.

9.4. SIMULACIJA BIOPROCESA

Formulisanje matematičkog modela treba da pomogne da se bioproces potpunije biohemijski razume. Ako su svi parametri modela, kao što su: konstante brzine reakcija i druge konstante, poznati, onda se model može koristiti za predviđanja rezultata bioprocesa. Način opisivanja bioprocesa putem rešenja matematičkih jednačina ovakvog modela bioprocesa, koja su dobijena na osnovu početnih uslova, tj. vrednosti parametara modela, predstavlja kompjutersku simulaciju bioprocesa.

Praktičan značaj modela za simulaciju bioprocesa je veliki. Oni se koriste za planiranje eksperimenata, interpolaciju i ekstrapolaciju eksperimentalnih rezultata, kao i objašnjenje prirode bioprocesa. Eksperimentisanje na računaru, pomoću odgovarajućih programa, brže je (za nekoliko redova veličina) i ekonomičnije od laboratorijskih eksperimenata. Složenost modela koji se koriste u ove svrhe razlikuje se zavisno od njihove namene. Tako, na primer, za određivanje graničnih uslova eksperimentalnog ispitivanja ponašanja kontinualnih biosistema mogu se koristiti jednostavniji modeli. S druge strane, složeniji modeli su neophodni kad se želi da se o bioprocusu sazna više i detaljnije, bilo unutar (interpolacija) bilo van (ekstrapolacija) granica eksperimentalnih ispitivanja. Interpolacija je posebno značajna za tehnoekonomsku analizu bioprocesa (uštete vremena, radne snage ili skupih sirovina i sl.), dok su razlozi za ekstrapolaciju suviše dugo trajanje procesa, nedostatak analitičke opreme, nemogućnost merenja niskih koncentracija supstrata ili proizvoda i sl.

Simulacija toka bioprocesa testiranjem vrednosti parametara modela omogućava bolje razumevanje i objašnjavanje rezultata bioprocesa. Modeli koji se koriste u ove svrhe predstavljaju "pravo" modelovanje u striktnom značenju, jer oni služe da potvrde (ili opovrgnu) hipotezu o mehanizmu bioprocesa i na taj način objasne njegovu prirodu.

9.5. OPTIMIZACIJA BIOPROCESA

Optimizacija bioprocesa znači da je cilj da se bioproces vodi u optimalnim uslovima, kao i da se stalno traže uslovi optimalnog vođenja bioprocesa. U slučaju industrijskih bioprocesa optimalno vođenje znači ostvarivanje ekonomskog optimuma. Često se optimum vezuje za uslove maksimalnog prinosa proizvoda, maksimalne proizvodnosti ili minimalne cene proizvoda, s obzirom da oni najdirektnije određuju profitabilnost industrijskog procesa.

Dakle, optimizaciju bioprocesa treba shvatiti kao njegovo poboljšavanje (unapređenje) u smislu povećanja profitabilnosti bioprocesa. S obzirom da se znanja u oblasti relevantnih naučnih disciplina svakodnevno proširuju, optimizaciju treba sprovesti stalno, ali uvek smišljeno, i to u svim fazama bioprocesa.

Unapređenje bioprocesa može se postići poboljšanjem:

- osobina proizvodnog mikroorganizma,
- sastava hranljive podloge i
- uslova izvođenja bioprocesa.

Optimizacija proizvodnog mikroorganizma. Ova vrsta optimizacije podrazumeva zamenu postojećeg soja proizvodnog mikroorganizma drugim, koji poseduje bolja proizvodna svojstva ili selekciju potencijih jedinki iz populacije postojećeg soja.

Optimizacija sastava hranljive podloge. Optimizacija sastava hranljive podloge ima za cilj povećanje prinosa željenog proizvoda uz smanjenje cene hranljive podloge i troškova izdvajanja proizvoda iz fermentacione tečnosti. Za optimizaciju sastava hranljive podloge preporučuju se statistički metodi, jer se broj eksperimenata smanjuje, a vreme eksperimentisanja značajno skraćuje. Najčešće se u ove svrhe koristi statistički metod poznat kao grčko – latinski kvadrat.

Optimizacija uslova vođenja bioprocesa. Ova vrsta optimizacije označava optimizaciju procesnih uslova koji obezbeđuju realizaciju željenog rezultata bioprocesa. Ova optimizacija mora da usledi pri bilo kojoj promeni uslova vođenja bioprocesa, napr. nakon zamene proizvodnog soja kvalitetnijim, nakon optimizacije sastava hranljive podloge, izmene funkcionalnih delova bioreaktora (mešalice, aeratora) itd.

Kad je bioproces dovoljno poznat, može se formulisati pouzdan matematički model, pa kompjuterska simulacija može mnogo pomoći da se izvede brza optimizacija, sa minimalnim laboratorijskim eksperimentisanjem.

9.5.1. Integralni pristup optimizaciji u bioprocenim inženjerstvu

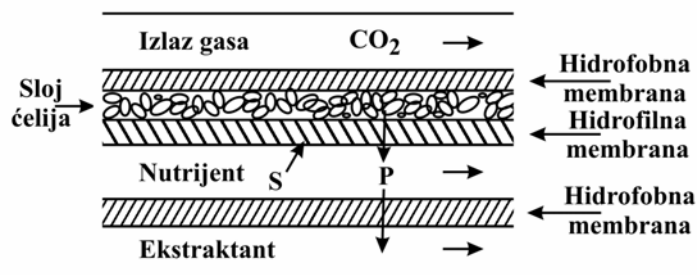
Jedan od nedostataka sadašnjeg pristupa optimizaciji, posmatran sa inženjerskog aspekta, je taj što se optimizacija biotehnoških postupaka nije posmatrala kao integralni proces već se odvijala separatno, pojedine faze su optimizovane skoro nezavisno jedna od druge. Tako su se, na primer, optimizacija biokatalizatora, izvođenje bioprocesa i izdvajanje proizvoda odvijale odvojeno. Razlog tome je činjenica da formalno obrazovanje inženjera nije uključivalo dovoljan stepen znanja iz bioloških nauka i, naravno, bilo je nedovoljno inženjerskih znanja u obrazovanju biologa. Zbog toga je optimizacija tekla u skladu sa sposobnostima pojedinih timova, bez dovoljne povezanosti, tj. bez integralnog optimizacionog modela.

Jedna od već sada uspešnih optimizacija je povezivanje bioreaktora i postupka izdvajanja proizvoda. Ova vrsta integralne optimizacije proistekla je iz potrebe da se izbegne inhibicija bioprocesa proizvodom i na taj način poveća specifična brzina bioprocesa, i da se omogući primena koncentrovanijih hranljivih podloga, umanje degradacioni procesi proizvoda tokom izdvajanja iz fermentacionih tečnosti, smanji opasnost od infekcije itd. Evidentno je da ovakva vrsta udružene optimizacije predstavlja kapitalan doprinos razvoju i ekonomičnosti bioprocesa.

Težnja ovakvoj integraciji pojedinih tehnoloških faza bioprocesa postoji još od prvih godina razvoja modernog biohemijškog inženjerstva. U cilju optimizacije istraživana je vakuum destilacija etanola u toku procesa biosinteze, vezivanje etanola dodavanjem tečnih adsorbenata u hranljivu podlogu, zatim ekstrakcija etanola i u novije vreme membranska separacija.

Membranski bioreaktor za proizvodnju etanola nastao je iz ideje da se kao ekstrakciono sredstvo za etanol koristi tributylfosfat (TBF) direktnim dodatkom u hranljivu podlogu. Ideja nije dala dobar rezultat jer je ovaj rastvarač delovao inhibitorno na kvasac. Ispitivanjem ove pojave, utvrđeno je da TBF nije hemijski, nego je fizički inhibitor, jer oblaže ćelije kvasca i usporava transport nutrijenata u ćeliju i metabolita iz ćelije u okolinu. Rešenje je bilo da se hranljiva podloga sa proizvodnjim mikroorganizmom i ekstragens ne mešaju. Kao jedino moguće rešenje bilo je da se između te dve faze postavi selektivno propusna barijera. Tako je nastao *multimembranski bioreaktor* koji je šematski prikazan na slici 9.7. Imobilisani biokatalizator smešten je između hidrofobne i hidrofilne membrane. Sa suprotne strane hidrofobne membrane nalazi se gasni prostor u koji prelazi CO₂ koji je proizvod bioprocesa. Na suprotnoj strani hidrofilne membrane protiče hranljiva podloga. Iz hranljive podloge u zonu oko imobilisanog biokatalizatora difunduju nutrijenti, a iz te zone u hranljivu podlogu difunduje metabolit (u ovom sličaju etanol). Hranljiva podloga je od ras-

tvarača odvojena hidrofobnom mebranom koja propušta metabolit – etanol u struju ekstragensa (u ovom slučaju TBF).



Slika 9.3 Šematski prikaz multimembranskog bioreaktora

Opisani model bioreaktora, koji integralno optimizuje bioreaktor i izdvajanje proizvoda biosinteze, može biti primenjen na veći broj biosinteza. Uslov je da je metabolit ekstracelularan i da postoje pogodne selektivno propusne membrane. Razvoj industrijskih multimembranskih bioreaktora je u toku.

10. INŽENJERSKI ASPEKTI ZAŠTITE ŽIVOTNE SREDINE I ODRŽIVOG RAZVOJA U BIOTEHNOLOGIJI

10.1. OPŠTI ASPEKTI ZAŠTITE ŽIVOTNE SREDINE I ODRŽIVOG RAZVOJA

Pored ogromnih dostignuća u oblasti nauke i struke, moćne tehnike i tehnologije, kao i opšteg kulturološkog razvoja, čovek je u treći milenijum uneo poražavajuće posledice neumerenog materijalnog razvoja. Teško je shvatiti zbog čega je čovek tokom industrijske revolucije, a posebno u 19. i 20. veku, razvio filozofiju neograničenog, razvoja smatrajući pri tome profit njegovom jedinom i pravom osnovom (*«profit iznad svega»*). Ne shvativši postojanje granica rasta, čovek je beskrupulozno eksploatisao prirodne resurse, ekstremno zagadio prirodu navodno «nekorisnim», a zapravo, sa stanovišta profita, «neprofitabilnim» otpadom svih vrsta. Time je biosferi naneo oštećenja, koja su rezultirala u uništenju brojnih bioloških vrsta, razaranju ozonskog omotača, globalnoj promeni planetarne klime, nagomilavanju štetnih, pre svega toksičnih, otpadnih materija u prirodnom okruženju i iscrpljivanju prirodnih neobnovljivih resursa.

Danas je čovek došao u apsurdnu situaciju da spašava planetu od nepovratnog sloma globalnog ekosistema. Pred sadašnju generaciju postavlja se zahtev da izmeni tokove daljeg razvoja, koji će, ne samo zaustaviti dalju degradaciju prirode, već uvesti *principe predviđanja i sprečavanja uzroka* koji izazivaju degradaciju. Jasno da se rešenje nalazi u bezuslovnom prihvatanju i realizaciji *koncepta održivog razvoja*¹ u svim oblastima ljudske delatnosti, na regionalnom i globalnom nivou.

10.1.1. Pojam održivog razvoja

Zahtevi za zaštitu životne sredine posledica su saznanja da su prirodni resursi iscrpljivi, a podnošljivost planetarnog ekosistema na negativne udare ograničena. Iz toga je sledilo da *razvoj mora biti «održiv» da bi se obezbedila «održiva budućnost»*. Održiv razvoj se može ostvariti jedino ako počiva na:

- održivom (usklađenom) privrednom rastu;

¹ Treba naglasiti da postoje neslaganja oko termina *održivi razvoj* (engl. „sustainable development“). Neki smatraju da ovaj termin nedovoljno precizno izražava smisao usklađenosti u razvoju i da je bolji termin *usklađeni razvoj*. Termin održivi razvoj je ušao u stručnu leksiku i pravna akta.

- socijalnoj pravdi; i
- zdravoj životnoj sredini.

Održiv privredni rast zahteva nov *ekološko – etički stav* od svih aktera privrednog rasta – proizvođača i potrošača. Razvoj svakako pretpostavlja ispunjenje osnovnih ljudskih potreba (hrana, voda, očuvanje zdravlja, stanovanje i niz potreba psihofizičkog karaktera), tj. ostvarenje *blagostanja*, ali i niz drugih odredišta, kao što su:

- usklađivanje proizvodnje i potrošnje u duhu održivog razvoja (proizvoditi ono što je neophodno za ostvarenje blagostanja, a sa što manjim utroškom svih resursa);
- uključivanje proizvoda, nakon primarnog veka upotrebe, u nov upotrebni ciklus (popravljanje ili prepravke) ili njegovo iskorišćenje kao sekundarne sirovine;
- primena preventivnih mera preko *predviđanja rizika* i *upravljanja rizicima*;
- utvrđivanje i praćenje **indikatora** održivog razvoja;
- uravnoteženje podela blagostanja između razvijenih i nerazvijenih, kao i između sadašnjih i budućih generacija, na načelima socijalne pravde;
- prestanak rešavanja ekoloških problema razvijenih zemalja seobom prljavih tehnologija u nerazvijena područja.

Iz ovoga jasno proističu principi i zadaci za sve oblasti ljudske delatnosti. Za materijalnu proizvodnju i potrošnju, oni su:

- izvršiti racionalizaciju proizvodnih postupaka uštedama i reciklisanjem;
- zameniti zastarele i neracionalne tehnologije savremenim;
- rešiti pitanje neizbežnog otpada, tj. zagađenja postupcima zaštite životne sredine;
- primeniti postupke remedijacije i popraviti do sada degradirano.

10.1.2. Pravne norme i standardi u oblasti održivog razvoja

Održivi razvoj nije moguće ostvariti bez pravnih normi i propisa. U deklaracijama donetim na ekosamitima UN sadržan je globalni pristup zaštiti životne sredine. Verovatno najbitniji akt UN je «Deklaracija o održivom razvoju» i „Agenda 20“. Njima se deklariraju norme daljeg ekonomskog, industrijskog i prostornog održivog razvoja za održivu budućnost. Zemlje, potpisnice ovih deklaracija su obavezne da donesu svoja zakonska akta o očuvanju životne sredine.

Predviđanje i sprečavanje uzroka degradacije prirodnog okruženja zahteva uvođenje *indikatora održivog razvoja*. Oni uključuju sve parametre koji omogućavaju praćenje *uzroka i posledica* ljudskog delovanja na biosferu, radi nalaženja aktivnosti koje će sprečavati negativan uticaj. Indikatori održivog razvoja omogućavaju praćenje stanja održivog razvoja regionalno i globalno – formiranjem svetske mreže praćenja razvoja i uticaja na životnu sredinu.

Indikatori održivog razvoja u materijalnoj proizvodnji su svi parametri proizvodnje koji direktno ili indirektno utiču na racionalno korišćenje sirovina i energije, kao i faktori rizika i grešaka u proizvodnji koji mogu dovesti do proizvoda neželjenog kvaliteta i zagađivanja životne sredine. Oni se najvećim delom svode na parametre upravljanja kvalitetom u skladu sa standardima ISO 9000/2000 i na standarde upravljanja zaštitom životne sredine ISO 14000. To se posebno odnosi

na parametre kojima se prati potrošnja sirovina i energije i na parametre zagađivanja životne sredine.

Svaka faza proizvodnje mora se posmatrati kao deo jedinstvenog procesa u proizvodnom lancu, koji počinje od izvora sirovina, nastavlja se pripremom i preradom sirovina u proizvod, distribucijom (transportom i skladištenjem), prodajom i upotrebom proizvoda i završava reciklažom, kad je to moguće, ili bezbednim uništavanjem istrošenog proizvoda. U svim navedenim fazama moraju se definisati i kontrolisati indikatori održivog razvoja koji omogućavaju da se prati uticaj proizvoda na životnu sredinu u njegovom životnom ciklusu („od klevke do groba”).

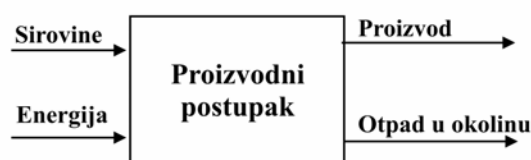
10.2. PROCESNE TEHNOLOGIJE KAO ZAGAĐIVAČI ŽIVOTNE SREDINE

Prema funkcionisanju i uticaju na životnu sredinu, procesne tehnologije mogu se podeliti na „otvorene” („prljave”) i „zatvorene” („čiste”).

Intenzivna industrijalizacija do šesdesetih godina prošlog veka, zasnivala se na „otvorenim” tehnologijama. Njima je ostvaren veliki profit, koji je doprineo industrijskom razvoju i istovremeno izazvao ekstremno zagađivanje životne sredine. Zbog toga je ovoj vrsti tehnologija dat naziv „prljava” tehnologija. One i danas postoje u nerazvijenim zemljama i u zemljama u razvoju. Razvijene zemlje se od njih oslobađaju izvozom u nerazvijene. Principijelna šema „otvorenih” tehnologija je prikazana na slici 10.1. Njihove osnovne karakteristike su sledeće:

- visok profit, koji ostvaruju eksploatacijom prirodnih resursa (sirovinae, energije i posebno vode) i ljudskog rada;
- neracionalno korišćenje sirovina, uz formiranje mnogo otpada;
- odlaganje nastalog otpada, koji se bez ulaganja ne može racionalno iskoristiti, u okolinu.

U cilju zaštite životne sredine bilo je neophodno da se otpad iz „otvorenih” tehnologija uništi primenom postupaka i uređaja, koji su postavljeni na kraju proizvodnog procesa („end of pipe” postupci). Oni su, u principu, bili skupi i na izgled neprofitabilni. Predstavljali su trošak, koji su profilerske firme maksimalno izbegavale.



Slika 10.1 Opšta šema „otvorenih” („prljavih”) procesnih tehnologija

Razvojem ekološke svesti šezdesetih godina otpor primeni „otvorenih” tehnologija u svetu sve više je rastao i zahtevi za očuvanje životne sredine postajali su sve oštriji. Pred tehnologiju je postavljen ozbiljan zadatak da se proizvodni procesi maksimalno racionalizuju u pogledu potrošnje neobnovljivih prirodnih resursa i da se smanji negativan uticaj na životnu sredinu do pod-

nošljivog stepena. Ovakvim pristupom se zahtevalo da procesne tehnologije moraju biti „*zatvorene*“, tj. „*čiste*“. Uporedo, shvaćeno je da se nova tehnološka rešenja moraju povezivati u dobro osmišljenu funkcionalnu celinu, kojom se može precizno upravljati („*precizne procesne tehnologije*“), dok je krajnji cilj bio potpuno proizvodno savršenstvo, tzv. „*totalna tehnologija*“.

Savremene „čiste“ tehnologije moraju se zasnivati na potpuno drugačijim principima, kao što su:

- racionalno, što znači maksimalno, koristiti polazne sirovine i energiju, posebno ako su iz grupe neobnovljivih;
- zastarele neracionalne tehnološke procese i operacije zameniti novim, racionalnijim u svakom pogledu;
- upravljati tehnološkim procesima „precizno“;
- sporedne proizvode reciklisati u pogodnu fazu osnovnog procesa ili ih koristiti kao sekundarne sirovine;
- neizbežan otpad na racionalan način uništiti, da bi se izbegao negativan uticaj na životnu sredinu.

Principijelna šema „zatvorenih“ tehnologija je prikazana na slici 10.2. Uvođenje ove vrste tehnologija zahteva:

- velika ulaganja u istraživanja i razvoj racionalnijih procesa i operacija;
- supstituciju neobnovljivih sirovina i energije obnovljivim, kada je god to moguće;
- razvoj novih procesnih tehnologija za korišćenje sekundarnih sirovina koje nastaju kao sporedni proizvodi polaznih tehnologija;
- razvoj što racionalnijih postupaka zaštite životne sredine za uništenje otpada koji nije moguće iskoristiti kao sekundarnu sirovinu;
- integraciju proizvodnih faza u logičke proizvodne celine koje omogućavaju precizno upravljanje radi maksimalnog korišćenja sirovina, energije i sporednih proizvoda;
- obrazovanje stručnog kadra sposobnog da upravlja složenim proizvodnim sistemima (sistemski inženjeri);
- isključivanje iz pogona otvorenih procesnih tehnologija koje se ne mogu dovesti na nivo zatvorenih, itd.



Slika 10.2 Opšta šema „zatvorenih“ („čistih“) procesnih tehnologija

Ostvarenjem ovih principa delovanja procesne tehnologije bi se u potpunosti uklopile u principe održivog razvoja. Na sadašnjem nivou razvoja nauke i tehnike ostvarenje navedenih zahteva u celosti nije moguće, ali je to stav čijem ostvarenju treba težiti.

10.3. MESTO BIOTEHNOLOGIJE KAO ZAGAĐIVAČA ŽIVOTNE STEDINE

Tehnologije bazirane na serkundarnim sirovinama uključene su direktno u zaštitu životne sredine po principima održivog razvoja, jer omogućavaju „zatvaranje“ tehnologija u kojima je sporedni proizvod nastao. Najboljih primer za tu vrstu tehnologija je većina biotehnoloških procesa u kojima se kao sirovina koriste otpadni i sporedni proizvodi prehrambene industrije (na primer, melasa, surutka, hidrol), hemijske prerade biomase (na primer, hidrolizati lignoceluloznih sirovina), prerade nafte itd. Ovaj stav se može osporiti činjenicom da se i u biotehnološkim procesima formira otpad koji je potencijalni zagađivač životne sredine. Međutim, ovaj otpad je biorazgradljiv, jer je biološkog porekla, zbog čega ne postoji trajan štetan uticaj na životnu sredinu.

Nažalost, mnoge biotehnologije u velikom broju zemalja u svetu, među kojima su i neke od visokorazvijenih, deluju po principima „otvorenih“ tehnologija i svrstavaju se među zagađivačke procesne tehnologije. Neke od njih su umereni zagađivači (većina biotehnologija baziranih na enzimskim procesima), dok su neke zagađivači visokog rizika (neke od biotehnologija zasnovanih na mikrobiološkim procesima).

Biotehnologije zasnovane na mikrobnim procesima ne koriste čiste sirovine već sporedne proizvode poljoprivrede i prehrambene industrije, koje su složenog sastava i sadrže mnoge supstance koje proizvodni mikroorganizmi ne mogu da metabolišu. Nakon završetka mirobnog procesa, u istrošenoj hranljivoj podlozi te supstance ostaju neiskorišćene. Drugo, metabolizam proizvodnih mikroorganizama ne može se usmeriti isključivo ka željenom proizvodu, pa nastaje i čitav niz sporednih proizvoda koji zaostaju u iskorišćenoj hranljivoj podlozi. Treće, ako u datoj biotehnološkoj proizvodnji nije cilj umnožavanje mikroorganizama, oni, takođe, zaostaju u istrošenoj hranljivoj podlozi. Četvrto, u pojedinim fazama pripreme sirovina, izdvajanja i dorade proizvoda itd. koriste se pomoćne sirovine koje mikroorganizmi ne metabolišu (na primer, sintetički antipenušavci, sredstva za bistrjenje, taloženje i podešavanje pH, adsorbensi itd.). Dalje, u cilju održavanja higijene i sterilnosti opreme koriste se različita sredstva za dezinfekciju i pranje. Na kraju, u biotehnološkim procesima nastaju i rashladne vode koje su termički zagađivači okoline.

Prema tome, ako se istrošene hranljive podloge, nakon izdvajanja proizvoda, vode od pranja i sterilizacije, sanitarne i termički zagađene vode itd., ispuštaju u prirodne prijemnike bez prethodnog prečišćavanja, one su ozbiljni zagađivači okoline. Bez obzira što je zagađenje prisutno u otpadnoj vodi, ove vrste, većim delom biorazgradljivo, stepen njene zagađenosti najčešće je veoma visok pa se u zoni izlivanja, a i šire, premašuje kompenzacioni potencijal prijemnika. Stepenu zagađenosti otpadnih voda iz mikrobnih procesa naročito doprinosi mikrobna biomasa nastala kao sporedan proizvod.

U toku mikrobnog procesa, kao metaboliti, nastaju gasovi koji se ispuštaju u atmosferu. Gasoviti proizvodi mogu nastati i u procesima prečišćavanja sirovina i proizvoda i spaljivanjem. Time biotehnologija može biti zagađivač atmosfere.

U biotehnologiji se u pojedinim fazama koriste čvrsti pomoćni materijali, na primer, adsorbensi u fazama izdvajanja i prečišćavanja proizvoda. Njima se pridružuju otpadni ambalažni materijali (staklo, karton, drvo), etikete i sl. Na taj način biotehnologija može biti zagađivač tla čvrstim otpadom.

Pošto se u biotehnologiji koja koristi enzimske procese upotrebljavaju čisti supstrati i pošto su enzimski procesi strogo usmereni, ona je oslobođena zagađenja koje dolazi od metabolita i mikrobne biomase. Sva druga zagađenja koja prate mikrobne procese prate enzimske procese.

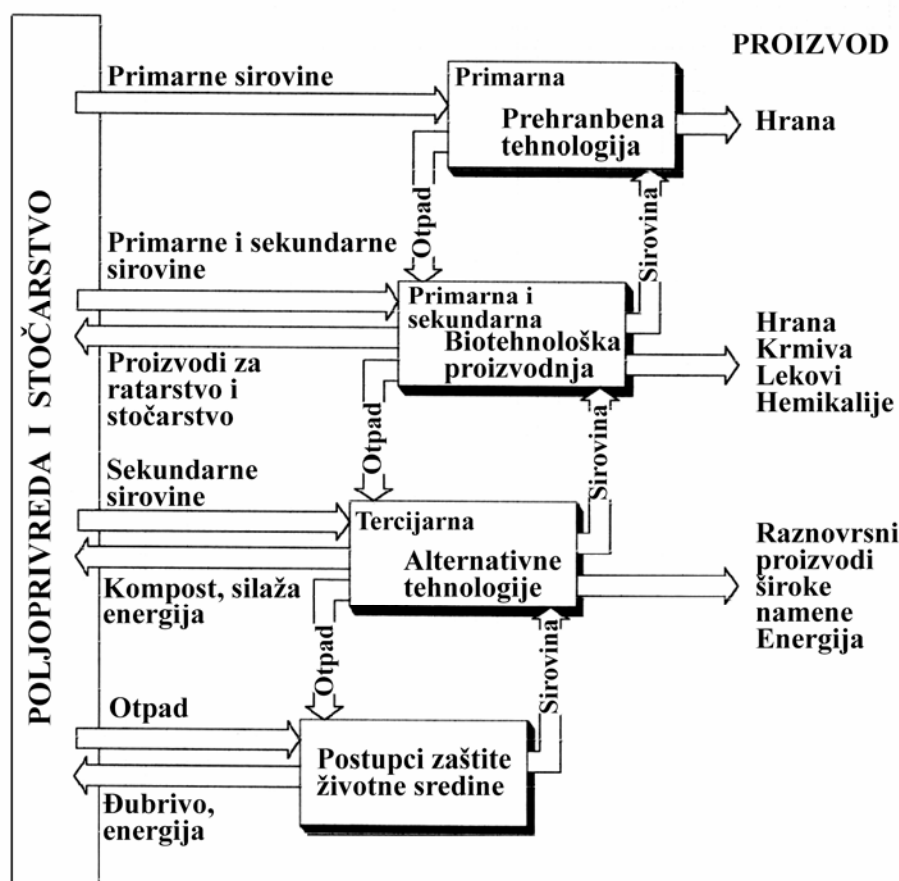
10.4. PRINCIPI POVEZIVANJA PROCESNIH TEHNOLOGIJA U „ZATVORENE” PROIZVODNE SISTEME

Jedan od neizbežnih puteva realizacije „zatvorenih“ tehnologija je integrisanje razdvojenih proizvodnih faza i pogona u organski povezanu celinu. Primer mogućeg povezivanja agrara, prehrambene industrije i biotehnologije u jedinstven agroindustrijski kompleks pokazuje sve prednosti takvog pristupa. Koji su razlozi za takvo povezivanje?

Agrarni kompleks, koji je primarni proizvođač neprerađene hrane za ishranu ljudi i stoke, obično je fizički i poslovno odvojen od industrijskog kompleksa u kome se proizvodi agrara prerađuju do konzumnog oblika. Veze koje postoje između ova dva segmenta proizvodnje uglavnom su ugovorne, a retko proizvodne. Iz toga proističe niz neusaglašenosti i neracionalnosti na planu proizvodnje i korišćenja sporednih proizvoda u oba proizvodna segmenta. To dovodi do formiranja otpada koji se ne može racionalno iskoristiti, pa obično završava odbačen u okolinu. Problemi korišćenja ovog otpada su vezani za njegovu malu vrednost ili relativno malu količinu, zbog čega je neracionalno podizati pogone za preradu na mestu nastanka. Sakupljanje istorodnih otpada, radi obrade u pogonima ekonomski opravdanog kapaciteta, povezano je sa troškovima transporta i kvarljivošću otpada. Kada bi se agroindustrijski kompleks povezao u funkcionalnu celinu na bliskoj lokaciji, najveći deo ovih problema bi bio rešen.

Osnovna ideja jedinstvenog agroindustrijskog kompleksa leži u vekovima razvijanom modelu seoskog gazdinstva u kome nema otpada i zagađivanja okoline. Poljoprivredna proizvodnja, gajenje stoke i izrada hrane su krajnje racionalni i međsobno u potpunosti usaglašni. Nema prekinutih veza i ukupnim sistemom se upravlja tako da ne dođe do neželjenih gubitaka i rastura u pojedinim segmentima sistema. Prirodni resursi se koriste racionalno, a reciklaža je razvijena do krajnjih mogućih granica: svaki otpad nalazi primenu u ishrani stoke, đubrenju zemljišta, proizvodnji energije itd. Zbog korišćenja organskog đubriva smanjena je hemizacija zemljišta, očuvana je njegova biološka ravnoteža i visoka rodnost, poboljšani su zdravstveni status useva i njihova otpornost na štetočine. Prenosjenjem ovakvog proizvodnog principa na makro sistem agroindustrijskog kompleksa, uz uvođenje savremenih agrotehničkih mera i tehnoloških rešenja, ostvario bi se željeni cilj: racionalna proizvodnja hrane i očuvana priroda, kao što je prikazano na slici 10.3. Primarne sirovine se prerađuju u pogonima prehrambene industrije (primarna prerada), odakle se dobija hrana u prerađenom obliku pogodnom za direktno korišćenje ili preradu u domaćinstvu ili ugostiteljstvu. Otpadni materijali i sporedni proizvodi iz primarne proizvodnje i prerade koriste se u pogonima sekundarne prerade, koji su najčešće biotehnološki. Primera radi, u preradi šećerne re-

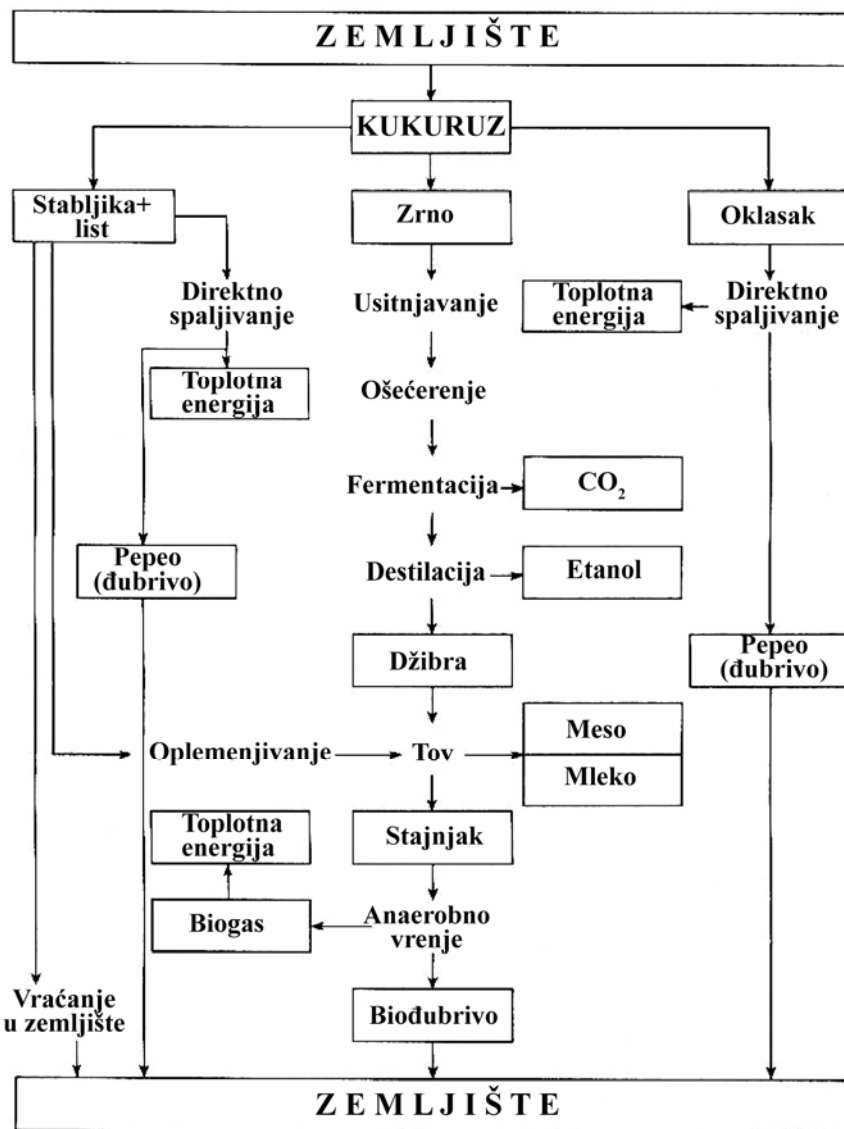
pe dobija se šećer kao konzumni proizvod, dok kao sporedan proizvod nastaje melasa, koja se koristi kao osnovna sirovina u biotehnološkoj proizvodnji etanola, limunske kiseline, mikrobne biomase, enzima itd. U biotehnološkim procesima, takođe, nastaju sporedni i otpadni proizvodi, koji se mogu preraditi u mnogobrojnim alternativnim tehnologijama (tercijarna prerada), zavisno od prirode sekundarne sirovine, u raznovrsne proizvode: od hrane za ljude i stoku do hemikalija. Na primer, jedan od poznatih sporednih proizvoda industrije piva i alkohola je kvasac, koji se, nakon prerade, koristi kao hrana i lek.



Slika 10.3 Šematski prikaz koncepcije integriranog agroindustrijskog kompleksa sa „zatvorenim” masenim i energetske tokovima

Tercijarnom preradom otpadnih materija i sporednih proizvoda završava se krug rekuperacije i recirkulacije. Otpad nastao u ovoj preradi, u principu, ne sadrži materije koje se mogu preraditi u proizvode direktne upotrebe. Da odbacivanjem ne bi zagađivao okolinu, ovaj otpad, zajedno sa otpadom iz agrara, tretira se u procesima zaštite životne sredine. U ovoj koncepciji se ne primenjuju destruktivni procesi zaštite, nego samo procesi kojima se otpad transformiše u organsko đubrivo,

koje se koristi za đubrenje zemljišta, uz dobijanje biogasa koji se koristi kao energent u nekom od procesa u proizvodnom sistemu.



Slika 10.4 Osnovna tehnološka šema „zatvorenog“ agroindustrijskog kompleksa u kome je sirovina kukuruz, glavni proizvodi etanol, meso i mleko, a sporedni proizvod energije spaljivanja otpadne biomase i biogasa i pepeo za mineralizaciju zemljišta

Primer formiranja zatvorenog agroindustrijskog kompleksa. Zatvoreni agroindustrijski kompleks u proizvodnji etanola iz kukuruza, kao polazne sirovine, dobar je primer mogućnosti po-

vezivanja agrara i industrije u jedinstven proizvodni kompleks u kome biotehnološki procesi zauzimaju značajno mesto (slika 10.4). Kukuruz, nakon pripreme (drobljenje, ošćenje), podvrgava se alkoholnom vrenju kojim se dobija etanol i kukuruzna džibra. Etanol se koristi kao gotov proizvod ili sirovina u mnogim tehnologijama, kao intermedijer u hemijskim sintezama ili kao energent. Džibra je visokokvalitetna hrana i koristi se za tov junadi. Junad se odvodi u klanicu i dalju preradu, a stajnjak iz staja (stočni izmet sa prostirkom) se odvodi na anaerobno vrenje kojim se dobija biogas i kvalitetno organsko đubrivo. Đubrivo se koristi za đubrenje poljoprivrednog zemljišta, zajedno sa pepelom od sagorevanja stabljike, lista i oklasaka. Energija dobijena spaljivanjem biomase i biogasa koristi se u proizvodnim pogonima. Proizvodni ciklus je potpuno zatvoren, uz maksimalno korišćenje sirovina i otpada, što je u skladu sa principima održivog razvoja. Ovaj proizvodni ciklus ostvaruje značajan finansijski efekat direktnim korišćenjem kukuruzne džibre u tovu stoke bez njene prethodne prerade (konzervisanje ili sušenje), koja bi bila obavezna ako bi se transportovala do udaljenih stočnih farmi.

10.5. UŠTEDA ENERGIJE U BIOTEHNOLOGIJI

Dobro je poznato da većina procesnih tehnologija, pa i biotehnologija, u nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju neracionalno koristi energiju i da se alternativni, stalno obnovljivi izvori energije (energija vetra i sunca, geotermalna energija, biogas) praktično ne koriste. Ovakvo stanje obavezuje bioinženjere da nađu puteve za racionalniju energetske potrošnje svih, a posebno neobnovljivih energetske izvora. Za rešavanje ovog zadatka potrebno je da se u postojećim biotehnologijama obavi sledeće:

- detaljno razmotre faze bioprocasa i utvrdi stepen racionalnosti potrošnje energije;
 - izvrši rekuperacija toplote iz termičkih otpadnih tokova;
 - tehnički i tehnološki neracionalne termičke faze zamene savremenijim i racionalnijim rešenjima; i
 - nafta i ugalj zamene alternativnim izvorima obnovljive energije gde god je to moguće.
- Tehnologiju u kojoj se ovi zahvati ne mogu realizovati treba isključiti iz funkcije.

10.5.1. Alternativni izvori obnovljive energije

Osnovni raspoloživi energetske izvori u Srbiji su rezerve uglja i hidropotencijal, dok su rezerve sirove nafte i prirodnog gasa daleko manje. Ukupne geološke rezerve energetske sirovina iznose oko 4,57 milijardi tona ekvivalentne nafte u kojima ugalj učestvuje sa 86,9%, hidropotencijal sa 5%, nafta i prirodni gas sa 1,3%, a ostalo su uljni škriljci, obnovljivi izvori i dr. U skladu sa raspoloživim energetske resursima u našoj zemlji je i njihova potrošnja, tako da preovlađuje upotreba nafte i uglja, a raste i upotreba zemnog gasa. Ovo stanje je u perspektivi neprihvatljivo s obzirom na činjenicu da su to neobnovljivi i ograničeni resursi, čijim se sagorevanjem emituju gasovi koji izazivaju efekat staklene bašte.

Veliki porast cena nafte (1973. godine barel nafte je koštao 3,39 \$US, a u vreme rata u Iraku 2005. godine dostigao cenu 70 \$US) naveo je mnoge zemlje zavisnice od uvoza nafte da se ozbiljno pozabave razvojem upotrebe alternativnih izvora energije. Najperspektivniji alternativni i stalno obnovljivi izvori energije, pored već primenjivane hidroenergije, su: biloška goriva na bazi biomase (bioetanol, biogas, biodizel), sunčeva energija, energija vetra, geotermalna energija i energija plime i oseke i morskih talasa. Veliku perspektivu ima upotreba zemnog gasa, iako neobnovljiv resurs, zbog veoma velikih rezervi.

10.5.2. Uvođenje termički racionalnijih tehnoloških rešenja u biotehnologiji

Većina biotehnoloških procesa su veliki energetske potrošači. Među njima su procesi koji uključuju termičku pripremu sirovina, kao što su proizvodnje piva ili alkohola iz žitarica i ligno-celuloznih materijala. Sve biotehnologije uključuju brojne faze zagrevanja, kao što su: sterilizacija supstrata, kuvanje, uparavanja, termičko konzervisanje itd. U većini slučajeva velika potrošnja je uslovljena tehnološkom opremom koja neracionalno koristi toplotnu energiju. Ove tehnologije mogu značajno energetske racionalisati izmenama u pojedinim tehnološkim fazama.

Dobar primer racionalizacije potrošnje energije je proizvodnja alkohola iz skrobnih sirovina. Sve do danas u starijim pogonima u fazi prevođenja skroba iz žitarica u oblik koji je podesan za enzimsku hidrolizu do fermentabilnih šećera (tzv. utečnjavanja skroba) primenjeno je zagrevanje iznad 150 °C na pritisku od 5 – 6 bar u autoklavima. Ovaj postupak je poznat kao „termičko – enzimski“ ili “topli”. Uvođenjem u industrijsku proizvodnju termostabilnih amilaza, koje mogu da hidrolizuju skrob na temperaturi iznad 100 °C, nastao je “hladni”, dvoenzimski postupak, koji potpuno potiskuje prethodni. Tehnološka šema ovog postupka pripreme kukuruza za alkoholnu fermentaciju data je na slici 10.5. Priprema kukuruza se vrši dejstvom enzima na 105 °C. Prednost koju daje “hladni” postupak razgradnje skroba najbolje se može videti iz podataka o energetskim utrošcima. Kod “toplog” postupka za razgradnju skroba se troši 2.449 MJ/t kukuruza (6 – 8 MJ/dm³ etanola), a u “hladnom” postupku po Dilinger-u svega 566 MJ/t (1 – 3 MJ/dm³ etanola). Uvođenjem kontinualnih postupaka u proces razgradnje skroba učinjen je dalji napredak, jer je moguća razgradnja skroba sa koncentracijom izdrobljenog kukuruza od 35 do 40%, dok je u u šaržnim postupcima moguće maksimalno 20%.

Sledeći problem koji prati proizvodnju etanola, bez obzira na sirovinsku bazu, je izdvajanje etanola iz prevrelih komina, koje se sada obavlja destilacijom. Ova faza proizvodnje zahteva veliki utrošak energije, koji je etanol, kao energent, činio nekonkurentnim na tržištu. Na utrošak energije u ovoj fazi proizvodnje znatno utiče koncentracija etanola u prevreloj komini i energetska efikasnost destilacionih kolona. Ukupnom utrošku energije doprinosi i faza dehidracije etanola. U klasičnim destilacijama 10 – 12 MJ energije za svaki litar apsolutnog (bezvodnog) etanola. Značajno smanjenje potrošnje energije (i preko 40%) postignuto je rekonstrukcijom destilacionih kolona, načina njihovog povezivanja, uvođenjem korišćenja bridovih para i termo pumpi. Ovo se posebno odnosi na bioetanol namenjen energetici i hemijskoj industriji, koji ne mora imati stepen čistoće kao bioetanol namenjen prehrambenoj industriji, medicini i farmaciji. Bioetanol ovim racionalizacijama u proizvodnji postaje ozbiljan konkurent benzinu kao gorivu za pogon motora sa unutrašnjim sagorevanjem.

10.6. OTPADNE VODE U BIOTEHNOLOGIJI I NJIHOVO PREČIŠĆAVANJE

10.6.1. Karakteristike otpadnih voda

Da bi se mogao utvrditi stepen negativnog uticaja otpadnih voda na prirodne vode potrebno je meriti stepen njihove zagađenosti. Za to služe *parametri kvaliteta (indikatori zagađenosti)* otpadnih voda. Broj parametara kojima se definiše zagađenost vode je velik, posebno kod industrijskih otpadnih voda. Međutim, za primarno utvrđivanje vrste i stepena zagađenosti, na osnovu kojeg se voda može svrstavati u grupe prema intenzitetu nepoželjnog delovanja i načinu prečišćavanja, dovoljan je manji broj bitnih parametara, koji su poznati kao *parametri opšteg karaktera*. Nakon toga se, prema potrebi, proširuje broj parametara u okviru detaljnije analize, na primer, vrste organskog zagađenja (posebno toksičnih i biorezistentnih), vrste neorganskog zagađenja (posebno teških metala) itd., koji su poznati kao *parametri specifičnog karaktera*.

Rastvorene i suspendovane supstance otpadnih voda sadrže organske i neorganske supstance. Organske supstance uključuju: ugljene hidrate, masti, proteine, površinski aktivne supstance, pesticide i druge hemikalije korišćene u poljoprivredi, isparljiva organska jedinjenja i neke toksične supstance. Neorganske supstance uključuju: teške metale, azot i fosfor (makronutrijenti), supstance koje utiču na alkalitet, hloride, sumporna jedinjenja i mnoge druge neorganske zagađivače. Takođe, u otpadnim vodama mogu biti prisutni gasovi: ugljendioksid, azot, kiseonik, vodoniksulfid, metan i dr. Posebna pažnja se poklanja sadržaju ukupnog azota i fosfora kao nutrijentima koji izazivaju eutrofikciju vodenih sistema.

Najvažnije grupe mikroorganizama koje se mogu naći u otpadnim vodama su: bakterije, plesni, protozoe, mikroskopske biljke i životinje i virusi. Većina od ovih mikroorganizama, a posebno bakterije i protozoe, neophodne su za biološku obradu otpadnih voda. Neke patogene bakterije, plesni, protozoe i virusi, koji se mogu naći u vodi, nepoželjni su i štetni po zdravlje ljudi.

Karakteristike otpadnih voda mogu se podeliti u četiri grupe, i to:

- fizičke (suva supstanca, ukupna suva supstanca, ukupne suspendovane supstance, ukupne rastvorene supstance i fiksne i isparljive supstance),
- hemijske (ukupan azot, ukupan fosfor i organske supstance),
- biološke (bakterijski indikatori: ukupan broj koliformnih bakterija, broj fekalnih koliformnih bakterija i broj fekalnih streptokoka) i
- specifični indikatori zagađenosti (biohemijska, hemijska i teorijska potreba kiseonika, ukupni sadržaj ugljenika i broj ekvivalentnih stanovnika).

10.6.2. Načini prečišćavanja otpadnih voda

Sadašnje stanje tehnike i tehnologije ne pruža mogućnost formiranja „totalne“, tj. zatvorene biotehnologije. I posle najefektnijih intervencija, u pogonu ostaju otpadne vode sa određenim,

iako značajno smanjenim stepenom zagađenosti, zbog čega se mora razmotriti njihovo prečišćavanje.

Priroda zagađenja u otpadnim vodama određena je prirodom procesa u kome one nastaju. Pošto se u biotehnologiji, kao polazne sirovine, koriste biološki materijali prirodnog porekla i manji broj nebioloških pomoćnih materijala, očigledno je da je u otpadnim vodama prisutno pretežno biorazgradljivo zagađenje. Zato se, kao osnovni postupci za prečišćavanje, mogu koristiti biološki postupci, koji su zasnovani na mikrobnim procesima u kojima se prisutno zagađenje razlaže do mineralnog oblika i proizvoda koji ne oštećuju prirodu. U nekim slučajevima povoljnija je kombinacija bioloških i hemijskih postupaka.

Pre odluke o tome na koji će se način rešavati problem otpadnih voda (projektovanje i izrada postrojenja za prečišćavanje ili ulivanje u gradsku kanalizacionu mrežu sa prečišćavanjem na gradskom postrojenju) najbitnije je obezbediti validne podatke o karakteristikama otpadnih voda, zatim primeniti zakonsku regulativu vezanu za zaštitu voda od zagađivanja. Ako se postrojenje projektuje i gradi, potrebno je primeniti tehničke norme i zakonsku regulativu za gradnju objekata.

Prema mestu nastajanja otpadnih voda, moguća su tri slučaja:

- otpadna voda potiče isključivo iz domaćinstava (*sanitarna otpadna voda*),
- otpadna voda potiče iz industrijskog pogona (*industrijska otpadna voda*) i
- otpadna voda je zbir sanitarne i industrijske otpadne vode (*komunalna otpadna voda*).

U savremenim uslovima, zbog prirode razvoja, sve je češći slučaj da sanitarne i industrijske vode nastaju u bližem okruženju. U sadašnjoj praksi sve češće se primenjuje zajedničko prečišćavanje industrijskih i sanitarnih otpadnih voda. Ovaj pristup ima niz prednosti a najvažnije su: manja investiciona ulaganja i udruživanje sredstava, lakše i racionalnije vođenje i održavanje jedinstvenog postrojenja, povoljniji uslovi prečišćavanja zbog ujednačavanja hidrauličkog i organskog opterećenja, korišćenja i održavanja jedinstvenog kanalizacionog sistema, briga o otpadnim vodama prenosi se na jedinstvenog izvršioca itd. On ima i svojih nedostataka, kao što su: mogući nepredviđeni udari opterećenja sistema, usled poremećaja obima i dinamike rada u priključenim pogonima, smanjena zainteresovanost uprave industrijskog pogona za sudbinu otpadnih voda, odgovornost za efekte prečišćavanja, uprava idustrijskog pogona prenosi na nadležni organ komune, a krivac može biti u pogonu i sl.

10.6.3. Karakterizacija otpadnih voda za potrebe projektovanja postrojenja za prečišćavanje

Prilikom pristupa projektovanju postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda osnovni problem je verodostojnost prikupljenih podataka. Sa aspekta karakterizacije sanitarnih otpadnih voda potrebno je poznavati trenutni broj stanovnika i njihov prirast, a sa aspekta karakterizacije industrijskih otpadnih voda potrebno je poznavati trenutni i perspektivni broj ekvivalentnih stanovnika postojećih pogona i pogona koji će se eventualno graditi. Postrojenje se obično gradi u dva stepena. Za prvi stepen izgradnje postrojenja usvajaju se podaci za 15 godina, dok se za drugi (krajnji) stepen gradnje usvajaju podaci za 30 godina. Podaci o broju stanovnika i ekvivalentnom broju stanovnika služe i za prikupljanje sredstava za investicionu gradnju i održavanje objekata za prečiš-

ćavanje otpadnih voda jer u tome moraju participirati svi koji su priključeni na sistem, od građana do preduzeća.

Prilikom utvrđivanja broja ekvivalentnih stanovnika za preduzeća primenjuju se sledeća pravila:

- nakon analize (karakterizacije) otpadnih voda i podataka uzetih iz katastra, izračunava se broj ekvivalentnih stanovnika i utvrdi iznos sredstava za gradnju postrojenja,
- od preduzeća se dobija podatak o budućem razvoju, tj. povećanju kapaciteta i
- na osnovu prethodnog dobija se «učestvujući broj ekvivalentnih stanovnika» koji se koristi za dimenzionisanje postrojenja.

Bilansiranje otpadnih voda. Pod ovim podrazumeva se utvrđivanje količine i opterećenja otpadnih voda.

Količina otpadnih voda iz pogona utvrđuje se u periodu bez atmosferskih padavina. Koriste se sledeći podaci:

- količina vode preuzete iz vodovodne mreže,
- količina vode iz sopstvenog izvorišta (bunari, vodoakumulacije itd.),
- količina vode koja ulazi i proizvodi gubici koji nastaju u pogonima.

Količina vode koja ulazi u pogon (potrošnja) može se precizno utvrditi postavljanjem merača protoka, dok kod utvrđivanja gubitaka vode postoje problemi jer ih je teško registrovati i meriti. Pod gubicima se podrazumeva voda koja je:

- isparena u otvorenim termičkim procesima (ukuvavanja bez kondenzacije, rashladne kule, pranje ambalaže i opreme toplom vodom, korišćenje prskalica za vodu i sl.);
- utrošena u građevinskim radovima i zalivanjem zelenih površina u krugu pogona itd.

Najlakše se utvrđuje podatak o količini vode koja je ušla u sastav proizvoda.

Zbir voda iz vodovodne mreže i vlastitog izvorišta daje podatak o *potrošnji vode*. Kod utvrđivanja dnevne potrošnje vode uzima se da *faktor neravnomernosti* iznosi 1,5. Oduzimanjem vode ušle u sastav proizvoda i gubitaka od potrošnje vode dobija se *količina otpadne vode* pogona. Kontrola količine otpadnih voda koje se ispuštaju iz pogona obavlja se postavljanjem merača protoka sa pisačem na mestu izliva vode u prijemnik.

Količina otpadne vode izražava se kao dnevna i godišnja. Količnik ovih dveju veličina, daje vrednost koja se naziva «*srednji radni dan u godini*».

Fiziološki i tehnološki parametri procesa. Za projektovanje procesa biološkog prečišćavanja otpadnih voda potrebno je definisati sledeće još i fiziološke i tehnološke parametre procesa.

Fiziološki parametri procesa. Svi parametri okoline (temperatura, pH, aktivnost vode, vrsta hrane) koji utiču na stanje mikrobiološke populacije i lanac njihove ishrane imaju uticaj na tok bioloških postupaka za prečišćavanje otpadnih voda. Vrednosti ovih parametara i ispoštovanost zakonskih minimuma karakteristični su za mikroorganizme koji učestvuju u procesima prečišćavanja otpadnih voda. Za uspešno funkcionisanje postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda svi parametri moraju se održavati u oblasti optimuma.

Tehnološki parametri procesa. U postrojenjima u kojima se izводе biološki procesi moraju se optimalnim održavati i tehnološki parametri. Cilj je da se ostvari što uspešniji prenos mase i energije, održi mikrobiološka populacija u što aktivnijem stanju preko održavanja fizioloških para-

metara procesa, da se podesi sastav otpadne vode kao i da se kontrolišu svi bitni tehnološki parametri procesa. Ti parametri se oslanjaju na fiziološke parametre i održavaju se pod strogom kontrolom. U parametre koji su značajni za sve vrste bioloških procesa spadaju:

- organsko opterećenje,
- hidauličko opterećenje i
- hidrauličko vreme zadržavanja.

Organsko opterećenje izražava količinu organskog biorazgradljivog zagađenja u jedinicama biološke potrebe kiseonika BPK_5 u odnosu na jedinicu mase mulja, jedinicu aktivne zapremine biološkog reaktora ili površine procesnog reaktora.

Hidrauličko opterećenje predstavlja količinu otpadnih voda koja dolazi na postrojenje za prečišćavanje u odnosu na zapreminu postrojenja.

Hidrauličko vreme zadržavanja izražava vreme zadržavanja jedinice zapremine otpadne vode u biološkom reaktoru.

Pored ovih opštih, postoje i tehnološki parametri specifični za pojedine procese, na primer, starost mulja kod procesa aktivnog mulja, dubina vodenog sloja kod procesa prečišćavanja u lagunama itd.

Karakteristike otpadnih voda. U biotehnološkoj proizvodnji nastaju otpadne vode koje su zagađene uglavnom biorazgradljivim materijama. Stepem zagađenosti ovih otpadnih voda varira u širokom opsegu, od vrednosti BPK_5 300 do 600 mg O_2/dm^3 , pa do nekoliko hiljada, što direktno zavisi od vrste biotehnološkog procesa i primenjenih principa održivog razvoja i zaštite životne sredine. U tabeli 10.1 dati su komparativni podaci o karakteristikama otpadnih voda prehrambene industrije. U proizvodnji slada, piva, žitnog alkohola, vina i rakija nastaju otpadne vode koje su po zagađenosti nalaze među vodećim zagađivačima.

Tabela 10.1 Količina i zagađenost otpadnih voda pojedinih pogona prehrambene industrije

Vrsta delatnosti	Broj ispitanih industrija (n)	Ukupno opterećenje		Specifično opterećenje	
		Q (m ³ /d)	ES	Q (m ³ /dxn)	ES/n
Mlevenje i ljuštenje žitarica	12	997	3.346	83	279
Proizvodnja hleba, peciva i testenina	4	568	21.076	142	5.269
Prerada i konzervisanje voća i povrća	17	5.161	50.328	304	2.960
Klanje stoke, prerada i konzervisanje mesa	20	11.053	162.943	553	8.147
Prerada i konzervisanje mleka	13	2.605	80.276	200	6.175
Proizvodnja šećera	11	107.254	2.180.718	9.750	198.247
Proizvodnja poslastičarskih i konditorskih proizvoda	5	1.765	21.879	353	4.376

Tabela 10.1 Količina i zagađenost otpadnih voda pojedinih pogona prehrambene industrije (nastavak)

<i>Vrsta delatnosti</i>	<i>Broj ispitanih industrija (n)</i>	<i>Ukupno opterećenje</i>		<i>Specifično opterećenje</i>	
		<i>Q (m³/d)</i>	<i>ES</i>	<i>Q (m³/dxn)</i>	<i>ES/n</i>
Proizvodnja biljnih ulja i masti	7	4.405	27.551	629	3.936
Proizvodnja skroba i prerađevina	2	4.845	28.035	2.423	14.018
Proizvodnja začina	3	1.341	61.499	447	20.500
Proizvodnja slada, slasnog ekstrakta i piva	8	8.096	155.469	1.012	19.434
Proizvodnja etanola biljnog porekla, vina i rakije	6	4.561	61.351	760	10.225
Proizvodnja bezalkoholnih pića i mineralne vode	1	58	965	58	965
Proizvodnja prehrambenih proizvoda	109	152.709	2.855.436	-	-
Stočarstvo, uzgoj domaćih životinja – farme	48	4.947	181.376	103	3.779
Proizvodnja prehrambenih proizvoda i stočarstvo (farme)	157	157.656	3.036.812	-	-

10.6.4. Smanjenje količine i stepena zagađenosti otpadnih voda

U kontekstu gazdovanja vodama u industrijskim pogonima principi održivog razvoja zahtevaju:

- racionalno korišćenje voda u svim fazama proizvodnje sa što manje gubitaka i reciklisanje vode u pogonu kada je to moguće;
- smanjenje zagađenosti otpadnih voda reciklisanjem i rekuperacijom sporednih proizvoda, pranje opreme CIP uređajima itd.;
- smanjenje, po mogućnosti, potpuno izbegavanje rastura međuproizvoda, proizvoda i sporednih proizvoda;
- smanjenje toksičnosti otpadnih voda, korišćenjem biorazgradljivih deterdženata i dezinficijensa sa kratkom karencom;
- razdvajanje kanalizacione mreže sanitarnih, procesnih i atmosferskih voda;
- predtretman teže zagađenih i toksičnih otpadnih voda iz pojedinih faza proizvodnje, itd.

Poštovanjem ovih zahteva pri projektovanju i izgradnji pogona, kao i intervencijama u pogonu u kome ti principi nisu poštovani, moguće je značajno smanjiti i količinu i stepen zagađenosti otpadnih voda.

Dobar primer je smanjenje stepena zagađenosti otpadnih voda pivare intervencijama u pogonu. Zagađenja koja nastaju u pojedinim fazama proizvodnje piva, koja se mogu naći u otpadnim vodama, data su u tabeli 10.2. Najveće zagađenje nastaje u fazama bistrenja sladovine, glavnog i naknadnog vrenja i filtracije piva, a nosioci zagađenja su prvenstveno talozi i kvasac. Izdvajanjem kvasca, belančevinastih i drugih taloga može se značajno smanjiti stepen zagađenosti otpadnih voda, što se odražava i na smanjenje stepena zagađenosti zbirnih otpadnih voda pogona. U tabeli 10.3 prikazani su rezultati izvršenih intervencija u nekim fazama proizvodnje piva.

Tabela 10.2. Faze u proizvodnji piva u kojima nastaju najbitnija zagađenja

<i>Faza proizvodnje</i>	<i>Vrsta zagađenja</i>
Komljenje	Celuloza, hemiceluloze, šećeri, belančevine i produkti njihove razgradnje, deterdženti
Ceđenje sladovine	Trop, šećeri, belančevine, deterdženti
Kuvanje i hmeljenje sladovine	Hmelj, sladovina, deterdženti
Bistrenje sladovine	Talog sladovine, sladovina deterdženti
Vrenje i odležavanje	Belančevinasti i drugi talozi, kvasac, pivo, deterdženti
Filtracija piva	Filtraciona sredstva, kvasac, belančevine, pivo, deterdženti
Punjenje boca	Pivo, etikete, lepak za etikete, deterdženti
Mašine i uređaji	Sredstva za pranje i dezinfekciju, soda, kiseline, mineralna ulja

Tabela 10.3. Komparativni podaci karakteristika zbirnih otpadnih voda pivare i otpadnih voda iz pojedinih proizvodnih faza, pre (1) i nakon (2) izdvajanja sporednih proizvoda

<i>Pokazatelj</i>	<i>Zbirno</i>		<i>Varionica i bistrenje</i>		<i>Glavno, naknadno vrenje</i>	
	1	2	1	2	1	2
BPK ₅ (mgO ₂ /L) prosek	1.100	470	7.600	2.700	8.500	3.600
Ukupni N (mg/L)	45,8	24,1	161	69,6	189,9	78,5
Ukupni PO ₄ ³⁻ (mg/L)	18,4	11,3	35,7	21,2	69,7	31,6
Istaložene supst. 1/2h, (cm ³ /L)	3,8/4,4	1,4/1,7	6/6,5	3,1/3,8	9/9,8	5,7/6,1
Žareni ostatak (mg/L)	491	385	687	495	667	438
pH	6,7	6,9	6,8	6,7	6,2	6,5

10.7. POSTUPCI PREČIŠĆAVANJA OTPADNIH VODA

Otpadne, zagađene vode, bilo da se radi o gradskim ili industrijskim otpadnim vodama, pre ispuštanja u recipijent moraju se prečistiti. Stepen do koga treba prečistiti otpadnu vodu zavisi od

njenog sastava, mase, klase i veličine i karakteristika recipijenta i zakonske regulative. Osnovni zahtev je da ispuštena zagađena voda ne dovede do promene kvaliteta vode recipijenta.

Prema vrsti primenjenih procesa, tretmani otpadne vode se mogu podeliti na:

- mehaničke,
- biološke,
- hemijske.

Prema zahtevanom kvalitetu efluenta, tretmani mogu biti:

- preliminarni,
- primarni,
- sekundarni,
- tercijarni.

U procesima prečišćavanja otpadnih voda koriste se sledeći osnovni procesi i operacije:

- mehaničko odvajanje komadastih i sitnijih nerastvornih materijala,
- taloženje inertnih materijala,
- koagulacija i flokulacija koloidnih materija,
- procesi biofiltracije,
- procesi sa aktivnim muljem,
- taloženje sa hemijskim sredstvima,
- dezinfekcija prečišćene vode.

Pored navedenih osnovnih postupaka koriste se i pojedini dopunski postupci kao:

- mešanje i aeracija,
- flotacija (npr. pri separaciji masti i ulja),
- sorpcija,
- filtracija,
- reverzna osmoza,
- obrada nastalog mulja.

Obrada viška aktivnog mulja se obavlja korišćenjem više postupaka:

- ugušćivanje,
- neutralizacija,
- hemijsko prečišćavanje,
- flotacija,
- filtracija pod pritiskom ili vakumom,
- centrifugisanje,
- digestija (truljenje),
- aerobna stabilizacija,
- sušenje (konduktivno ili konvektivno) i
- spaljivanje mulja.

U zavisnosti od tipa otpadne vode koja se želi prečistiti, količine i kvaliteta vode, željenog stepena prečišćavanja, vrste i kvaliteta vode recipijenta u koji se ispušta prečišćena voda, koristi se kombinacija postupaka tretmana voda. Najčešće kombinacije koje se primenjuju u praksi, zavisno od stepena zagađenosti voda, šematski su prikazane na slici 10.6.

10.7.1. Sistemi za prečišćavanje otpadnih voda

Osnovni cilj obrade svake otpadne vode je njeno što potpunije oslobađanje od neželjenih komponenti – zagađenja, čije se dimenzije čestica kreću u vrlo širokim granicama, od prostih jona do krupnih, plivajućih komada materijala. Ovaj cilj se ostvaruje primenom jednog ili više osnovnih **procesa i operacija obrade**, čija priroda može biti fizička, hemijska ili biološka. Jedan ili više osnovnih procesa obrade, koji se koriste za ostvarivanje određenog efekta obrade, čine **liniju obrade**. Jedna ili više linija obrade, koje je potrebno primeniti da bi se ostvario krajnji cilj obrade, odnosno celovito prečišćavanje otpadne vode do željenog stepena, čine **sistem (postrojenje) za obradu**.

Mehaničko prečišćavanje

Mehaničkim (fizičkim) postupkom prečišćavanja otpadnih voda odstranjuju se iz zagađenih voda nerastvorne materije kao i deo materija prisutnih u obliku koloidnih rastvora. Pored odstranjivanja komadastih i drugih čvrstih materijala iz otpadne vode, ovim postupkom se odstranjuju materije iz vode koje bi ometale ili opterećivale naredne faze prečišćavanja vode, kao i rad samih uređaja.

Mehaničko prečišćavanje može se svrstati u dve osnovne grupe:

- preliminarno prečišćavanje i
- primarno prečišćavanje.

Preliminarno i primarno prečišćavanje

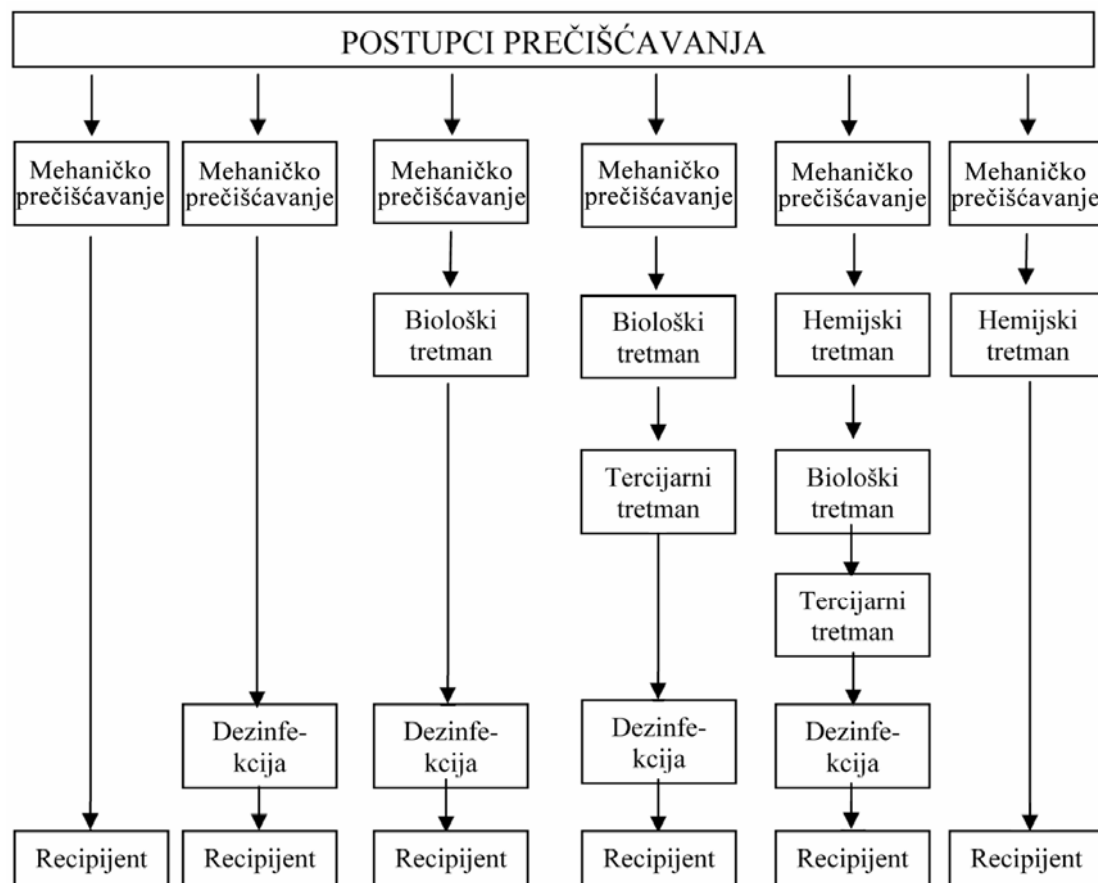
Preliminarno prečišćavanje predstavlja prvi stepen mehaničkog prečišćavanja, kojim se uklanjaju: grubi sastojci (komadastih materijala) kao što su drvo, papir, lišće, guma, i dr., teške neorganske materije (pesak, šljunak, metalni delovi, staklo) i delimično se uklanjaju ulja i masti. Za preliminarno prečišćavanje koriste se:

- grube i fine rešetke,
- drobilice (kominutori),
- taložnici za pesak (peskolovi),
- bazeni za prethodnu aeraciju,
- separatori (odvajači) masti i ulja.

Rešetke

Rešetke se koriste za izdvajanje komadastog i drugog materijala koji pliva u vodi koja se prečišćava. Od prečnika otvora na rešetkama zavisi koji materijal i u kojoj količini će se izdvojiti iz vode. Otvori na rešetkama mogu da bude različiti (16, 30, 60 mm). Danas su u upotrebi tzv. grube rešetke (prečnika otvora rešetke 60 mm) i fine rešetke (prečnika otvora na rešetkama od 16

mm). Rešetke mogu biti pokretne i nepokretne, lučne i lančane. Izrađuju se od gvožđa i postavljaju normalno na tok vode u kanalu obično pod uglom od 45 – 80°. Veličine rešetki zavise od količine otpadne vode, mase komadastog materijala u vodi i načina evakuacije otpadnog materijala sa rešetke.



Slika 10.6 Shematski prikaz prečišćavanja otpadnih voda

Rešetke se dimenzionišu na prosečnu brzinu toka vode od 1,0 – 1,5 m/s. Veće brzine mogu dovesti do kvara mehanizma za čišćenje rešetke, zbog suviše velikog pritiska materijala na rešetku.

Površina otvora rešetke određuje se pomoću jednačine:

$$A = Q/v \quad (10.1)$$

gde je: A – površina sita, m^2 ; Q = protok vode, m^3/h ; v – brzina proticanja vode, m/h

Drobnice

Zadržavanje i mlevenje krupnih otpadaka iz zagađene vode moguće je ostvariti sa specijalnim rešetkama, tzv. kominutorima. Ovi uređaji rade na principu prolaska zagađene vode kroz rotacioni bubanj sa nazubljenim otvorima koji je u sadejstvu sa vibracionim češljem koji melje zadržane otpatke na rotacionom bubnju. Izdrobljeni otpaci zajedno sa tečnim fluidom prolaze kroz nazubljene otvore bubnja i izlaze iz drobnice.

Korišćenje kominutora omogućava punu automatizaciju procesa, što je veoma važno jer se personal za kontrolu i održavanje ovih uređaja uglavnom ne angažuje.

Sita

Sita izdvajaju iz vode sve one materije koje su prečnika većeg od prečnika otvora sita. Koriste se kružna ili pravougaona pokretna sita sa mehaničkim čišćenjem pomoću specijalnih četki ili mlazom vode. Veličina otvora na mreži sita je obično 2 – 3 mm, a ponekada se koriste sita otvora 1 – 1,5 mm.

Taložnice za pesak

Za izdvajanje težih, uglavnom mineralnih sastojaka (pesak, šljaka i dr.) iz zagađene vode koriste se taložnice za pesak ili peskolovi. Ovi uređaji se koriste kod svih postrojenja, a postavljaju se ispred primarnih taložnika.

Peskolov funkcioniše na principu smirivanja vode da bi se omogućilo taloženje gušćih čestica peska koje voda nosi.

Danas se koriste kompleksni bazeni sa mehanizovanim uklanjanjem peska, sa uređajima za aeraciju i izdvajanje masti i ulja.

Prema načinu kretanja zagađene vode, peskolovi mogu biti horizontalni, vertikalni i sa spiralnim kretanjem vode. Najčešće se koriste horizontalni. Oni mogu biti sa pravolinijskim ili kružnim kretanjem tečnosti. Danas se često koriste peskolovi sa spiralnim kretanjem tečnosti tangencijalnog i aerisanog tipa.

Za proračun dimenzija peskolova može se koristiti sledeća jednačina:

$$L = K \cdot \left(\frac{1000 \cdot h}{V_0} \right) \cdot v \quad L = K \cdot ((1000 \cdot h) / V_0) \cdot v \quad (10.2)$$

gde je: L – dužina peskolova (m), h – računsa dubina peskolova (m), v – brzina kretanja tečnosti u peskolovu (m/s), V_0 – brzina taloženja (cm/s), K – koeficijent uticaja turbulencije toka vode i drugih faktora na rad objekta.

$$K = V_0 \cdot (v_0^2 - \rho)^{1/2} \quad (10.3)$$

gde je: ρ – vertikalna komponenta turbulencije, i ima vrednost 0,055.

Neke uobičajne karakteristike peskolova su:

- brzina kretanja vode u peskolovu je obično 0,3 m/s,
- vreme zadržavanja vode u peskolovu je oko 60 s,
- odnos dubine prema dužini bazena iznosi od 1:20 do 1:0,5,

- dužina taložnika se kreće do 30 m, a obično je 10 – 15 m

Bazeni za prethodnu aeraciju

Prethodna aeracija vode, ispred primarnog prečišćavanja, primenjuje se samostalno ili u kombinaciji sa peskolovom, odnosno separatorom masti i ulja, a iz sledećih razloga:

- da pospeši uklanjanje čvrstih suspendovanih materija (potpomaže flokulaciju lakših suspendovanih čvrstih materija u veće, što omogućava brže taloženje) u sedimentacionim bazenima,
- da *pomogne odvajanje masti i ulja* iz zagađene vode,
- da osveži zagađenu vodu, naročito leti, i
- da smanji BPK.

Prethodna aeracija se obavlja ubacivanjem vazduha u vodu u trajanju od 20 – 30 minuta. To se postiže ili uduvavanjem vazduha ili uz pomoć mehaničkih aeratora.

Separatori masti i ulja

Masnoće prisutne u otpadnoj vodi stvaraju poteškoće kod procesa prečišćavanja vode, posebno kod procesa aeracije u biološkom tretmanu vode. Zbog toga se separator masnoća postavlja na većini postrojenja za prečišćavanje voda, jer se masnoće i ulja redovno nalaze (u većem ili manjem obimu) u otpadnim vodama.

Separatori masnoća su u obliku bazena kod kojih se na dnu uduvava vazduh radi flotacije masnih čestica i sprečavanja taloženja ostalih čestica. Odstranjivanje izdvojenih masnoća sa površine se ostvaruje specijalnim zgrtačima.

Primarni taložnici

Osnov primarnog prečišćavanja otpadne vode čini proces sedimentacije (taloženja) uz pomoć koga se iz zagađene vode uklanja najveći deo taložnih čvrstih suspendovanih materija. Primenom koagulanata sedimentacijom se može odstraniti i veći deo koloidnih materija. Za sedimentaciju se koriste septičke jame, tankovi i primarni taložnici. Taložnici za primarnu sedimentaciju mogu biti sa vertikalnim, radijalnim i horizontalnim tokom zagađene vode. Često se koriste radijalni taložnici prečnika od 10 – 60 m.

Taložnici se grade od armiranog betona; različitog su oblika i veličine.

Osnovni kriterijum za određivanje dimenzija primarnih taložnika su hidrauličko opterećenje, dubina taložnika uz obod i vreme retencije (zadržavanja). Za hidrauličko opterećenje se uzima srednja dnevna količina zagađene vode kojom se opterećuje taložnik (površina) ($\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{dan}$). Vrednost hidrauličnog opterećenja (P_{opt}), se može izračunati uz pomoć sledećeg izraza:

$$P_{\text{opt}} = \frac{Q}{A} \quad (10.4)$$

gde je: P_{opt} – hidraulično opterećenje, ($\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{dan}$); Q – srednja dnevna masa zagađenih voda (m^3/dan); A – površina primarnog taložnika (m^2)

Maksimalna opterećenost se obično uzima $60 \text{ m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{dan}$. Dubina bazena uz obod je obično 2 m, uz nagib prema mestu skupljanja mulja oko 10%.

Vreme zadržavanja (retencija) vode u bazenu, T , se može izračunati iz jednačine:

$$T = \frac{24 \cdot V}{Q} \text{ (h)} \quad (10.5)$$

gde je: V – zapremina taložnika u m^3 .

Vreme zadržavanja je obično 2 sata, a brzina proticanja vode je 0,45 – 0,75 m/min.

Taložnici koje se koriste mogu biti sa ili bez zgrtača. Struganjem se mulj skuplja u jame ili žljebove taložnika odakle se najčešće hidraulički transportuje. Ukoliko su taložnici kružnog oblika, strugači su pričvršćeni na jedan okvir koji se okreće oko osovine koja je u sredini bazena. Kod taložnika pravougaonog oblika strugači se postavljaju tako da ih vuče jedan pokretni most koji ide od kraja do kraja taložnika ili jedna potopljena beskrajna traka.

Za brže i efikasnije taloženje, zagađena voda se tretira različitim hemikalijama. Pri tom dolazi do flokulacije i koagulacije uz nastanak većih agregata koji se lakše i brže talože, odnosno na neki drugi način izdvajaju iz vode.

Postupak hemijske precipitacije je pogodan za tretiranje zagađenih voda koje u sebi sadrže visoke koncentracije industrijski emitovanih polutanata koji bi mogli uticati na biološke procese prečišćavanja voda.

10.8. BIOLOŠKO PREČIŠĆAVANJE OTPADNIH VODA

10.8.1. Biološke karakteristike otpadnih voda

Najvažnije grupe organizama koje se mogu naći u otpadnim vodama su bakterije, plesni, protozoe, mikroskopske biljke i životinje i virusi. Većina od ovih organizama, a posebno bakterije i protozoe su odgovorne i neophodne za biološku obradu otpadnih voda. Međutim, neke patogene bakterije, plesni, protozoe i virusi koji se mogu naći u vodi su nepoželjni i štetni po zdravlje. Prisustvo patogenih bioloških vrsta iskazuje se preko, tzv. *bakterijskih indikatora vode*.

10.8.2. Biološki postupci prečišćavanja otpadnih voda

Biološko prečišćavanje je zasnovano na aktivnosti kompleksne mikroflore, koja tokom svoje životne aktivnosti, koja podrazumeva održavanje života, rast i razmnožavanje, koristi znatan deo organskih i manji deo neorganskih materija u otpadnoj vodi. Upravo okolnost da te materije ujedno predstavljaju zagađenje otpadne vode, nam omogućava da korišćenjem delovanja mikroflore, možemo prečistiti otpadnu vodu. Ovim načinom prečišćavanja je moguće ukloniti znatan deo organskog sadržaja iz otpadne vode, ali je nemoguće to postići potpuno.

Biološki procesi prečišćavanja otpadnih voda se zasnivaju na istim principima na kojima je zasnovano prirodno samoprečišćavanje vode. Razlika je u tome što se biološki procesi zasnivaju na kontroli rasta i razmnožavanja mikroflore pa su po tome biološki procesi prečišćavanja sličniji

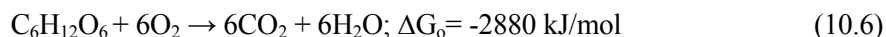
sa procesima biotehnologije. Pri prečišćavanju otpadnih voda se koristi mikroflora koja potiče iz prirodne sredine, a ne kao u biotehnologiji koja je zasnovana na bioprocima, selekcionisane čiste kulture. Međutim, i u procese biološkog prečišćavanja otpadnih voda počelo je uvođenje selekcionisanih kultura sposobnih da razlažu i biorezistentne, pa i toksične supstance (ksenobiotike). Za razliku od biotehnoloških procesa, u ovom slučaju je koncentracija hrane (supstrata) najčešće preniska za optimalan rast i razmnožavanje, izuzev ređih slučajeva kada može biti i previsoka. Kod biotehnoloških procesa se obično teži što većem prinosu biomase, dok se kod prečišćavanja otpadnih voda proces vodi ka što većem uklanjanju organskih materija, a ne ka stvaranju biomase ili produkata metabolizma.

Najčešća primena bioloških procesa je kod uklanjanja organskog zagađenja i makronutrijenta (azota i fosfora) iz otpadne vode. Takođe, biološki procesi se često primenjuju i za uklanjanje organskih frakcija muljeva koji nastaju tokom primarnog prečišćavanja (taloženja), kao i za razgradnju viška biomase nakon sekundarne obrade (mulj iz sekundarnog taložnika). Ova vrsta bioprocisa se naziva *biološka stabilizacija muljeva ili digestija*.

U odnosu na kiseonik razlikuju se aerobni i anaerobni biološki procesi prečišćavanja, koji su zasnovani na aktivnosti aerobnih, odnosno anaerobnih mikroorganizama.

Razlika ova dva procesa je u putevima biološke oksidacije organskih materija, a kao primer može poslužiti oksidacija glukoze:

Aerobni proces:



Anaerobni proces:



Iz gornjih jednačina se vidi da aerobni put oksidacije karakteriše produkcija veće količine slobodne energije, ΔG_0 , što za posledicu ima brz i intenzivan rast biomase, a samim tim i brzu aktivnost, odnosno, u slučaju otpadne vode, njeno brzo prečišćavanje uz nastajanje krajnjih proizvoda oksidacije sa malim sadržajem energije. To ukazuje na veliku efikasnost procesa prečišćavanja. Kod anaerobnog puta, produkuje se malo slobodne energije, što ima za posledicu sporiji rast biomase, procesi su sporiji i manji su efekti prečišćavanja, ali, krajnji gasoviti produkti imaju veliki sadržaj energije pa se mogu koristiti kao energent (biogas).

Aerobno prečišćavanje je daleko više zastupljeno od anaerobnog i primenjuje se u obradi otpadnih voda sa malim i osrednjim koncentracijama organskog zagađenja, tj. u obradi slabo i srednje opterećenih otpadnih voda. Anaerobno prečišćavanje se češće primenjuje kod otpadnih voda sa velikim koncentracijama organskog zagađenja.

Često se u praksi kombinuju ova dva postupka, radi postizanja boljeg krajnjeg efekta prečišćavanja.

10.8.3 Aerobni procesi prečišćavanja

Aerobne postupke delimo na dve osnovne grupe:

1. Postupci sa suspendovanom mikroflorom u otpadnoj vodi (proces aktivnog mulja);
2. Proces sa imobilisanom mikroflorom na pogodnom nosaču, i to:
 - a) biofiltri (imobilisana mikroflora na granulisanim nosačima; šljunak, plastični nosači)
 - b) biodisk (imobilisana mikroflora na ravnim rotirajućim mrežastim površinama)

Procesi sa suspendovanom mikroflorom

Ovo je, danas, najrašireniji vid primene aerobnog procesa prečišćavanja, sa primenom u obradi slabo i srednje opterećenih otpadnih voda, kao što su komunalne otpadne vode.

Primena ovog vida obrade se izvodi pomoću:

1. procesa aktivnog mulja,
2. aerisanih laguna sa pneumatskom ili površinskom aeracijom,
3. aerobnih jezera (plitka jezera sa prenosom kiseonika iz vazduha).

Postupci prečišćavanja otpadnih voda u aerisanim lagunama i aerobnim jezerima se primenjuju ukoliko su na raspolaganju veliki otvoreni zemljani bazeni (prirodni, nepravilnog oblika ili iskopani, pravougli ili okrugli) koji služe kao biološki reaktori. Osnovni uslov je da te lokacije budu dovoljno udaljene od naselja, kako bi se tolerisao moguć nastanak neprijatnih mirisa tokom procesa.

Aerisane lagune su opremljene aeratorima, različitih konstruktivnih rešenja, površinskom aeracijom ili difuzerima. Dubina laguna se kreće od 3 do 4 m, a hidrauličko vreme zadržavanja je od 3 do 30 dana, najčešće 5 do 8 dana. Koncentracija mikroflora u laguni je relativno mala 100 – 300 mg/l. Uticaj temperature okoline na proces u laguni je veoma izražen. Taloženje mulja se odigrava u samoj laguni ili na tzv. taložnim poljima koja se sukcesivno čiste. Ako nastaje velika količina mulja, ugrađuju se i sekundarni taložnici sa mogućnošću recirkulacije mulja, radi povećanja efikasnosti procesa.

Prilikom primene aerobnih jezera, uslov je da ona budu plitka (od 1 do 1,5 m dubine), a neophodna količina kiseonika za biološku aktivnost se obezbeđuje prenosom mase sa površine vode (ogledalo vode) kao i metabolizmom algi. U isto vreme bakterije koje razgrađuju organske materije, obezbeđuju mineralne materije neophodne za rast algi. Vreme zadržavanja otpadne vode u aerobnim jezerima je dugo, obično ne manje od 90 dana. Moguće je veoma malo organsko opterećenje (0.001 – 0.003 kg BPK/m³·d) koje je limitirano brzinom prenosa mase kiseonika sa površine vode i nastalog produkcijom iz fotosintetskih procesa algi.

Proces sa aktivnim muljem

Aktivni mulj je naziv za biološki aktivnu biomasu aerobne mikroflora, suspendovanu u otpadnoj vodi u obliku flokula. U flokulama sem živih, aktivnih, mikroorganizama nalaze i mrtve ćelije kao i organske (biorazgradljive i bionerazgradljive) i neorganske supstance apsorbirane iz otpadne vode koja se prečišćava. U reaktoru se aktivni mulj održava u suspenziji, a dovođenjem otpadne vode odvijaju se tri paralelna procesa:

1. Reakcije disimilacije, tj. oksidacije organske materije:
 $\text{Organska materija} + \text{O}_2 + \text{mikroflora} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{drugi krajnji proizvodi} + \text{energija}$
2. Reakcije asimilacije, tj. sinteze novih ćelija mikroflora (sa opštom formulom $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$):
 $\text{Organska materija} + \text{O}_2 + \text{mikroflora} + \text{energija} \rightarrow \text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$
3. Reakcije autooksidacije, tj. endogene respiracije ćelija mikroflora:
 $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2 + 5\text{O}_2 \rightarrow 5\text{CO}_2 + \text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{energija}$

Mikroorganizmi aktivnog mulja. Najvažniji i najzastupljeniji mikroorganizmi aktivnog mulja su bakterije, uglavnom gram-negativne rodova *Pseudomonas*, *Zooglea*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, kao i nitrifikacione bakterije *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*. Pored njih se javljaju i filamentozne bakterije rodova *Sphaerotilus*, *Thiotrix*, *Lecicothrix*, *Geotricum* i slične. Pored bakterija, i druge vrste mikroorganizama igraju veoma značajnu ulogu u prečišćavanju otpadnih voda, kao npr. protozoa, koje se hrane dispergovanim (neflokulisanim) bakterijama, i rotifere koje uklanjaju male neistaložene flokule aktivnog mulja, pa igraju značajnu ulogu u bistranju efluenta iz aerobnog bioreaktora.

Kada je reč o industrijskim otpadnim vodama, značajnu ulogu mogu imati i plesni, posebno zbog njihove otpornosti na niže vrednosti pH, kao i male potrebe za nutrijentima, na primer, gotovo polovinu azota manje u odnosu na bakterije.

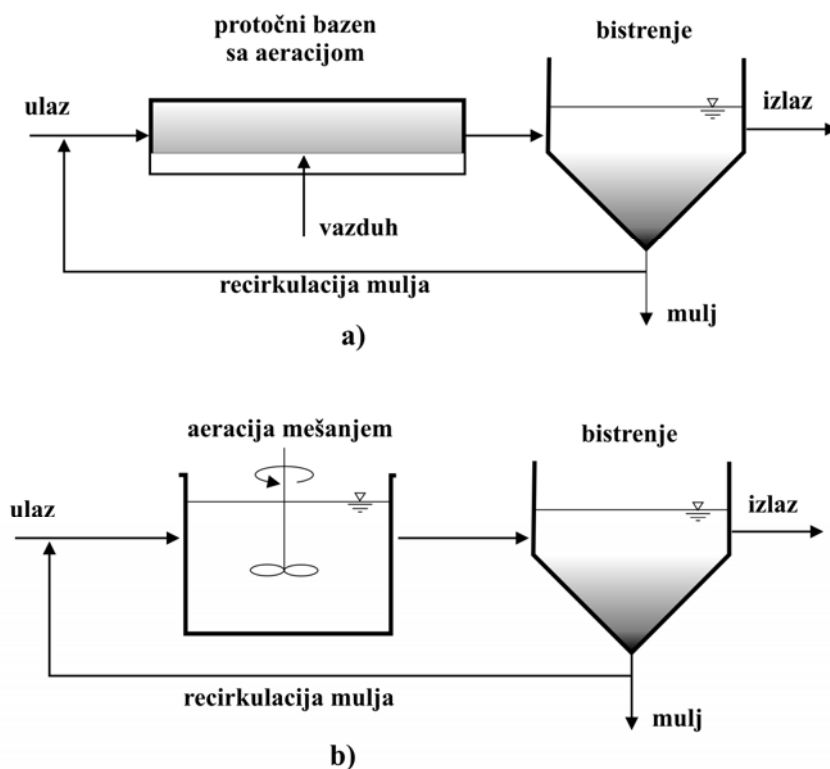
Potreba za kiseonikom. Kiseonik za biološku oksidaciju se dovodi u otpadnu vodu stalnom aeracijom, površinskom ili difuzerima. Ovim se postiže i potreban stepen mešanja za održavanje flokula aktivnog mulja u suspenziji (slika 10.7). U slučaju da to nije dovoljno primenjuje se i mehaničko mešanje. Jedan deo mikroflora koji se nalazi u unutrašnjosti flokule, do koje ne dopire kiseonik, se nalazi u fakultativno aerobnim i anaerobnim uslovima. U unutrašnju zonu flokule difunduje mala količina hranljivih materija pa mikroorganizmi prelaze na endogenu respiraciju kojom se smanjuje količina nastalog mulja.

Po dostizanju željenog stepena prečišćavanja, sadržaj iz biološkog reaktora se prebacuje u taložnik (sekundarni taložnik) gde dolazi do odvajanja aktivnog mulja od prečišćene vode, koja se preko prelivnika odvodi u prijemnik ili dalju preradu, a aktivni mulj se delom reciklira na početak procesa, a delom odvodi na dalji tretman u cilju njegove stabilizacije.

Vrste organskih jedinjenja koja se najčešće nalaze u gradskim otpadnim vodama i potrebna potrošnja kiseonika kod aerobne oksidacije su date u tabeli 10.4.

Tabela 10.4. Organske materije u otpadnoj vodi i potreba kiseonika za njihovu biološku oksidaciju.

Organske materije	Prosečna formula	Mikrobiološka potrošnja O_2 , kg O_2/kg supstance	Sadržaj ugljenika, %	Sadržaj azota, %
Ugljeni hidrati	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_9$	1,13	43	0
Masti, ulja	$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$	2,03	72	0
Proteini	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_7\text{N}_2$	1,20 (1,60)	53	8,8
Organske materije	$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{N}$	1,42 (1,59)	55	3,6



Slika 10.7 Šematski prikaz procesa sa aktivnim muljem a) difuzna aeracija, b) mehanička aeracija

Kinetički parametri procesa sa aktivnim muljem

Hidrauličko opterećenje. Za proces aktivnog mulja sa potpunim mešanjem značajan parametar za projektovanje i dimenzionisanje procesa je srednje vreme hidrauličkog zadržavanja ili hidrauličko opterećenje u aeracionom bazenu. On predstavlja odnos zapremine reaktora i protoka otpadne vode kroz reaktor, a izračunava se pomoću jednačine:

$$\theta = V/Q \quad (10.8)$$

gde je: θ – hidrauličko vreme zadržavanja, d; V – zapremina bioreaktora, m^3 ; Q – ulazni protok vode, m^3/d

Organsko opterećenje aktivnog mulja. Opterećenje aktivnog mulja se definiše kao odnos prisutnog zagađenja u otpadnoj vodi (hrane) prema prisutnoj biomasi u reaktoru. U literaturi se najčešće izražava kao F/M (food/ mass). Prisutno zagađenje se može izražavati ili preko HPK ili, češće, BPK vrednosti. Masa mikroorganizama u aeracionom bazenu se izražava kao masa suspendovanih materija aktivnog mulja *MLSS* (Engl. mixed liquor suspended solids). Ona se

sastoji uglavnom od mikroorganizama, nedegradabilnih suspendovanih organskih materija i drugih inertnih suspendovanih materija. Mikroorganizmi u *MLSS* su izgrađeni od 70 – 90% organske materije i 10 – 30% neorganske materije.

Mada je BPK vrednost najbolja mera za količinu hrane koja ulazi u bioreaktor, često se umesto nje koristi HPK, jer se daleko lakše i brže određuje. Praćenje i korekcija odnosa *hrana/biomasa* može sprečiti pojavu složenih problema u procesu aktivnog mulja.

Vrednost opterećenja aktivnog mulja se može izračunati pomoću jednačine:

$$F/M = \frac{BPK}{MLSS} \quad (10.9)$$

gde je: F/M – odnos hrane prema mikroorganizmima, g BPK/dan. g *MLSS*; *BPK* – biološka petodnevna potreba za kiseonikom, mg/l; *MLSS* – suspendovana materija aktivnog mulja u aeracionom bazenu, mg/l

Neki autori u prethodnoj jednačini koriste volatilne suspendovane materije aktivnog mulja *MLVSS* (Engl. mixed liquor volatile suspendes solids) umesto *MLSS*. *MLVSS* je volatilna frakcija *MLSS* (uklanja se spaljivanjem uzorka) i kreće se između 0,75 do 0,85, a približno se može izračunati kao $MLVSS = 0,80 \times MLSS$. Korišćenje *MLVSS* preciznije određuje ukupnu biološku masu mikroorganizama u procesu aktivnog mulja.

Prema opterećenju, proces aktivnog mulja se može klasifikovati u sledeće tipove:

- konvencionalni,
- viskoopterećeni,
- niskoopterećeni (produžena aeracija ili stabilizacija mulja i potpuno prečišćavanje)

Parametri opterećenja ovih postupaka aktivnog mulja su prikazani u tabeli 10.5.

Tabela 10.5. Parametri dozvoljenih opterećenja aeracionog bazena za različite tipove postupaka aktivnog mulja

<i>Proces</i>	<i>BPK opterećenje, kg/d m³</i>	<i>F/M opterećenje, kg/kg mulja·d</i>	<i>MLSS, g/l</i>	<i>Vreme zadržavanja, h</i>
Konvencionalni aktivni mulj	0,64	0,2 – 0,5	1 – 3	4 – 8
Viskoopterećeni	0,80	0,2 – 0,6	1 – 3	1 – 3
Niskoopterećeni, (produžena aeracija)	≤0,24 kg	0,05 – 0,1	3 – 5	20 – 30

Starost mulja. Starost mulja predstavlja dužinu vremena (najčešće broj dana) u toku koga su čestice aktivnog mulja podvrgnute aeraciji u biološkom reaktoru. Ova vrednost se koristi za održavanje propisane količine aktivnog mulja u bioreaktoru i varira za konvencionalan proces aktivnog mulja u granicama 3 – 7 dana.

Optimalna starost mulja varira u svakom postrojenju u određenim uslovima i mora se eksperimentalno odrediti. Starost mulja se izračunava prema sledećoj jednačini:

$$G = \frac{SS \text{ u aeraciji, kg}}{SS \text{ ulazna, kg/d}} \quad (10.10)$$

gde je: G – starost mulja; $SS \text{ u aeraciji}$ – MLSS ili MLVSS, kg; $SS \text{ ulazna}$ – suspendovane materije koje dnevno ulaze u sistem, kg/d

Srednje vreme zadržavanja ćelija. Srednje vreme zadržavanja ćelija – θ_c (Engl. mean cell residence time) je sličan, ali složeniji parametar od starosti mulja. Normalna vrednost θ_c se razlikuje od starosti mulja i varira od 5 – 15 dana, a optimalna vrednost se razlikuje od postrojenja da postrojenja. Glavna razlika prilikom izračunavanja starosti mulja i srednjeg vremena zadržavanja ćelija je u tome, što je proračun starosti mulja baziran na količini suspendovanih materija koje *ulaze* u sistem, dok je izračunavanje θ_c bazirano na količini suspendovanih materija koje *napuštaju* sistem aktivnog mulja. Izračunava se pomoću jednačina:

$$\theta_c = \frac{SS \text{ u aeraciji, kg}}{SS \text{ izlazna, kg/d}} \quad (10.11)$$

$$\theta_c = \frac{MLSS \cdot V}{SS_w \cdot Q_w + SS_e \cdot Q_e} \quad (10.12)$$

gde je: θ_c – srednje vreme zadržavanja ćelija, d; $MLSS$ – suspendovane materije aktivnog mulja, mg/l; V – zapremina aeracionog bazena, m³; SS_w – suspendovane materije otpadnog mulja, kg; SS_e – suspendovane materije u efluentu otpadne vode, kg; Q_w – protok otpadnog mulja, m³/d; Q_e – protok efluenta, m³/d

Materije koje napuštaju sistem. Pri analizi i proračunu procesa sa aktivnim muljem, potrebno je definisati i *materije koje napuštaju sistem* jer se na osnovu te vrednosti utvrđuje efikasnost izdvajanja čvrstih materija iz efluenta (bistrenje). One su zbir količina suspendovanih materija koje se izbacuju iz sistema kao višak mulja i suspendovanih materija u efluentu.

Suspendovane materije koje se izbacuju iz sistema predstavljaju višak mulja izdvojenog u sekundarnom taložniku i koncentracija im je ista kao i u povratnom mulju koji recirkuliše. Ovaj višak mulja se odvodi na dalju obradu.

Suspendovanih materija u efluentu napuštaju sekundarni taložnik sa istim protokom kao efluent.

Materije u sistemu određene su koncentracijom suspendovanih materija aktivnog mulja, mg/l.

Pošto su funkcije bioreaktora i sekundarnog taložnika u uskoj koordinaciji, oni mogu biti posmatrani kao jedinstven sistem i zbog toga se prilikom konverzije mg/l suspendovanih materija aktivnog mulja u kg/m³, mora uzeti u obzir zapremina i bioreaktora i taložnika. Na taj način je srednje vreme zadržavanja ćelija (θ_c) u gornjoj jednačini dato odnosom:

$$\frac{\text{masa suspendovanih materija u bioreaktoru i sekundarnom taložniku}}{\text{masa suspendovanih materija koje napuštaju sistem}}$$

Izračunavanje viška mulja. Zavisno od potrebne mase suspendovanih materija aktivnog mulja u sistemu, potrebnog vremena zadržavanja (θ_c), i aktuelne mase suspendovanih materija aktivnog mulja, tj. aktuelne starosti mulja, potrebno je definisati i višak suspendovanih materija mulja, koji je potrebno odstraniti iz sistema. Ovaj parametar se obično označava kao otpadni aktivni mulj – WAS (Engl. waste activated sludge). Otpadni mulj se obično odbacuje iz primarnog taložnika ili iz zgušnjivača mulja. Alternativno je moguće izbaciti deo suspendovanih materija aktivnog mulja iz aeracionog bazena ili iz linije efluenta aktivnog mulja. Cilj ovoga je da se održava optimalna količina mikroorganizama u sistemu, a samim tim optimalni i sledeći parametri sistema: F/M odnos (opterećenje aktivnog mulja), θ_c (srednje vreme zadržavanja celija) i G (starost mulja).

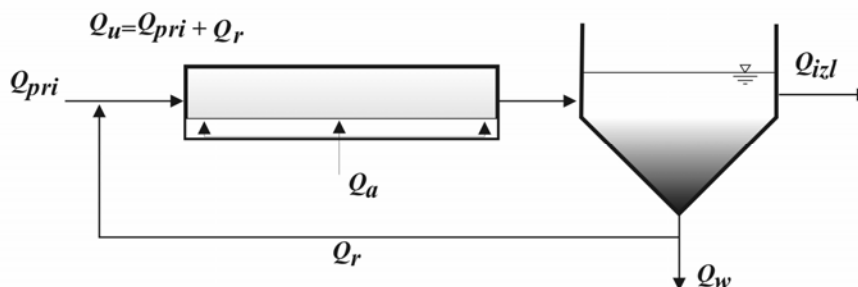
Višak suspendovanih materija mulja se određuje upoređivanjem poželjnih količina suspendovanih materija u sistemu, sa aktuelnom količinom suspendovanih materija u sistemu. Postoje tri načina za upoređenje i to: upoređuju se mase suspendovanih materija aktivnog mulja, upoređuju se starosti aktivnog mulja i upoređuju se koncentracije.

Izračunavanje protoka otpadnog i recirkulisanog mulja. Kada se utvrdi koja količina mulja je višak, potrebno je odrediti protok otpadnog mulja. Protok otpadnog mulja u mnogome zavisi od koncentracije suspendovanih materija u mulju. Iz šeme procesa aktivnog mulja (sl. 10.8) se može videti da je koncentracija suspendovanih materija u recirkulisanom mulju – RAS (Engl. recirculated active sludge) i otpadnom aktivnom mulju i WAS (Engl. waste activated sludge) ista. Zapremina recirkulisanog mulja obično iznosi 20 – 30% ulaznog protoka u postrojenje. Mase ovih veličina izračunavaju se pomoću jednačina:

$$WAS = c \cdot 10^{-3} \cdot Q_w \quad (10.13)$$

$$RAS = c \cdot 10^{-3} \cdot Q_r \quad (10.14)$$

gde je: WAS – masa suspendovanih materija otpadnog mulja, kg; RAS – masa suspendovanih materija recirkulisanog mulja, kg; c – koncentracija suspendovanih materija u recirkulisanom ili otpadnom mulju, mg/l; Q_w – protok otpadnog mulja, m³/d; Q_r – protok recirkulisanog mulja, m³/d; Q_{pri} – protok primarnog efluenta, m³/d; Q_u – ukupan protok u sistem, m³/d.



Slika 10.8 Šema procesa aktivnog mulja sa sa oznakama tokova (Q_{pri} -protok primarnog efluenta, Q_r - protok recirkulisanog mulja, Q_u - ukupan protok, Q_w - protok otpadnog mulja, Q_{izl} - protok izlaznog efluenta, Q_a – protok vazduha

Produkcija biološkog mulja. Količina mulja koja se proizvede dnevno, utiče na projektovani kapacitet i karakteristike postrojenja, a naročito na karakteristike procesa obrade i odlaganja mulja. Može se izračunati prema jednačini:

$$P_x = Y_{ob} Q (S_0 - S) \quad (10.15)$$

gde je: P_x – neto nastali otpadni aktivni mulj (VSS), kg/d; Y_{ob} – uočeni prinos mulja, kg/kg; Q – ulazni protok, m³/d; S_0 – koncentracija rastvorenog BPK₅ u influentu, kg/m³; S – koncentracija rastvorenog BPK₅ u efluentu, kg/m³.

Potreba za kiseonikom. Teorijska potreba kiseonika u procesu aktivnog mulja se utvrđuju pomoću vrednosti BPK₅ otpadne vode i količine mikroorganizama koja se odbacuje dnevno u procesu. Biohemijska reakcija endogene respiracije se može predstaviti jednačinom:



Prema jednačini 10.16 po *jednom molu biomase ćelija potrebno je 1,42 mola kiseonika*, tako da se teorijska potreba za kiseonikom u procesu aktivnog mulja za uklanjanje organskog ugljenika može predstaviti kao:

$$\text{kg } O_2 / d = \frac{Q(S_0 - S)}{f} - 1,42P_x \quad (10.17)$$

gde je: Q – ulazni protok, m³/d; S_0 – koncentracija rastvorenog BPK₅ u influentu, kg/m³; S – koncentracija rastvorenog BPK₅ u efluentu, kg/m³; F – konverzioni faktor za prevođenje BPK₅ u BPK_u (ukupno BPK).

Kada se razmatra proces aktivnog mulja sa nitrifikacijom, ukupne potrebe za kiseonikom su zbir potreba za uklanjanje organskog ugljenika i azota (nitrifikaciju) i mogu se izračunati na sledeći način:

$$\text{kg } O_2 / d = Q \cdot (S_0 - S) \cdot \left(\frac{1}{f} - 1,42Y_{ob} \right) + Q \cdot (N_0 - N) \quad (10.18)$$

gde je: N_0 – koncentracija ukupnog azota po Kjeldahl-u u influentu, kg/m³; N – koncentracija ukupnog azota po Kjeldahl-u u efluentu, kg/m³; Y_{ob} – uočeni prinos, kg/kg.

Obično se prilikom projektovanja sistema aktivnog mulja sa izuzetkom postupka sa produženom aeracijom primenjuje normativ potrebe za kiseonikom od 1,1 kg kiseonika po kg BPK₅. Ovo iznosi 94 m³ vazduha pri standardnim uslovima temperature, pritiska i vlažnosti. Za proces sa produženom aeracijom potrebno je obezbediti 128 m³/kg BPK₅. U praksi, potrebe za kiseonikom variraju od 3,75 do 15 m³ vazduha /m³ vode.

Uklanjanje azota u procesu sa aktivnim muljem

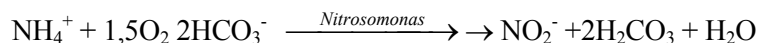
Azot se u otpadnim vodama nalazi u formi organskog, amonijačnog, nitritnog i gasovitog azota. Azotne materije, a naročito amonijak zahtevaju značajne količine kiseonika u toku biološke nitrifikacije i mogu izazvati eutrofikaciju u recipijentima. Amonijak je toksičan za vodene organizme i reaguje sa hlorom smanjujući efikasnost procesa dezinfekcije efluenta. Zbog toga je kontrola azota u otpadnim vodama neophodna.

Ukupan primarnim i sekundarnim konvencionalnim tretmanom uklanja se 25 – 75 % (5 – 15 mg/l) organskog azota, što obično predstavlja 14 – 26 % ukupnog azota iz sirove otpadne vode. Dakle, biološki postupci uklanjaju veći deo organskog azota, a deo transformišu do amonijaka i neorganskih oblika. Deo prisutnog amonijaka se asimiluje u biomasu mikroorganizama.

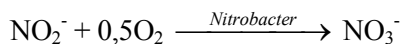
Ovo prevođenje organskog azota u neorganski naziva biološka nitrifikacija i može se ostvariti u posebnoj fazi procesa koja sledi iza sekundarnog tretmana (u većini slučajeva), ili u kombinovanim postupcima oksidacije ugljenika i nitrifikacije. Sekundarni efluent koji sadrži visok sadržaj amonijaka i nisko BPK₅ zagađenje je podloga u kojoj nitrifikacione bakterije bolje rastu nego heterotrofne bakterije.

Reakcija biološke nitrifikacije je aerobni autotrofni proces u kome se energija za bakterijski rast dobija oksidacijom neorganskih azotnih jedinjenja, pre svega amonijačnog azota. Nitrifikacione bakterije, za razliku od heterotrofnih bakterija, za svoj rast i reprodukciju koriste ugljendioksid umesto organskog ugljenika. Prinosa nitrifikacionih bakterija po jedinici iskorišćenog supstrata je nekoliko puta manji nego za heterotrofne mikroorganizme. U biološkoj nitrifikaciji dominiraju bakterije iz roda *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*. Biooksidacija amonijaka je dvostepeni proces. Prvo bakterije iz roda *Nitrosomonas* oksidišu amonijak do nitrita a zatim bakterije iz roda *Nitrobacter* transformišu nitrite do nitrata. Biohemijske jednačine ovih procesa su:

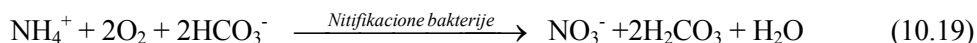
Oksidacija amonijaka:



Oksidacija nitrita:



Sumarna reakcija:



Iz navedenih jednačina se može izračinati da je za oksidaciju 1 mg/l amonijačnog azota teorijski potrebno 4,56 mg/l kiseonika, pod pretpostavkom da se zanemari sinteza biomase nitrifikacionih bakterija. Formirana ugljena kiselina u reakciji snižava pH vrednost otpadne vode. Teorijski, po 1 mg/l oksidisanog amonijačnog azota potrebno je 7,14 mg/l CaCO₃ za neutralizaciju proizvedene kiseline (US EPA 1975).

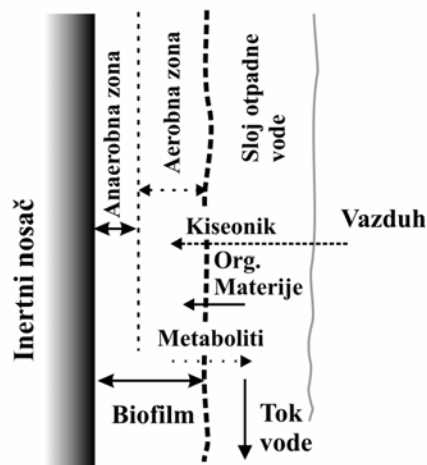
Biološka filtracija

Aerobno prečišćavanje otpadne vode sa imobilisanim slojem mikroorganizama na inertnom nosaču, tzv. aerobna biofiltracija, je postupak koji se uglavnom koristi za prečišćavanje komunalne otpadne vode manjih naselja i za prethodnu obradu pojeдинinih industrijskih otpadnih voda. Biološki filtri se ugrađuju i u gradska postrojenja kada je vremenom njihov kapacitet postao nedovoljan usled porasta količine otpadnih voda nastalih širenjem naselja. Aerobni biofiltri su stariji postupak od postupka aktivnog mulja, ali su vremenom potisnuti postupcima aktivnim muljem. Uvođenjem plastičnih inertnih nosača u konstrukciju bioloških filtara, dolazi do ponovnog rasta njihove primene, posebno kada se ne raspolaze sa dovoljno prostora za smeštaj postrojenja za obradu otpadnih voda.

Biofiltri nisu filtri u pravom smislu reči, već je njihova uloga da formiraju što veću specifičnu površinu kontakta otpadne vode i vazduha čime se ubrzavaju biološki procesi obrade. Od postupaka aerobne biofiltracije, danas su najčešće primenjeni kapajući biofiltri (Engl. trickle bed reactors) i biodisk (vidi kasnije).

Razlika ovog postupka u odnosu na aktivni mulj je u mehanizmu transporta organske materije i kiseonika u fiksiranom biofilmu, slika 10.9.

Vazduh difunduje kroz sloj otpadne vode koji obliva inertni nosač sa na njemu fiksiranim biofilmom, zajedno sa organskim zagađenjem koje iz sloja vode difunduje u biofilm. Mikroflora u biofilmu koristi tu organsku materiju za svoj metabolizam i debljina filma, usled nastajanja novih ćelija postepeno raste. Međutim, aerobna zona biofilma, odnosno dubina fiksiranog sloja mikroorganizama do koje dopire kiseonik, ograničena je na oko 50 do 100 μm . Ostali deo biofilma do površine nosača je prvo u fakultativno aerobnoj, a zatim u anaerobnoj zoni, do koje ne dopire kiseonik i u koju dopire samo neznatan deo organske materije, pa je mikroflora u anaerobnoj zoni, pogotovo uz sam nosač, u fazi intenzivne endogene respiracije. To dovodi do smanjenja sposobnosti pričvršćivanja, lepljenja ćelija na površinu nosača i do odvajanja i spiranja biofilma, a na oslobođenoj površini započinje formiranje novog sloja mikroorganizama. Spiranje biofilma zavisi od hidrauličkog i organskog opterećenja biofiltra.



Slika 10.9 Šematski prikaz biofilma na nosaču kapajućeg biofilma i mehanizma transporta kiseonika i metabolita

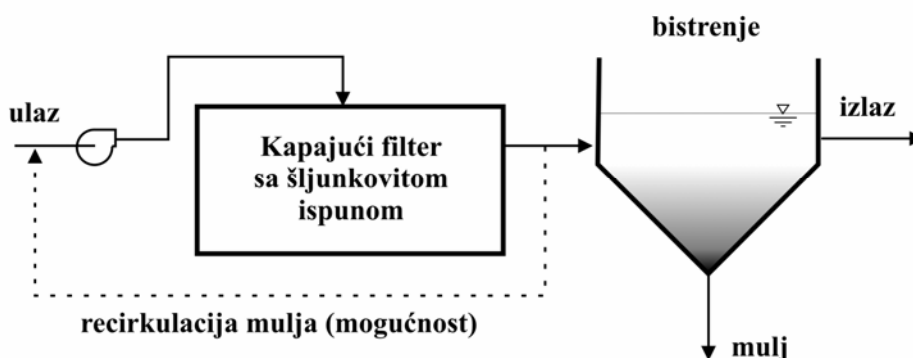
Kapajući biofilter

Kapajući biofiltri su često primenjivana alternativa procesu aktivnog mulja, za manje protoke otpadne vode, zbog manjih operativnih troškova i jednostavnijeg rada, ali im je manja i efikasnost uklanjanja zagađenja.

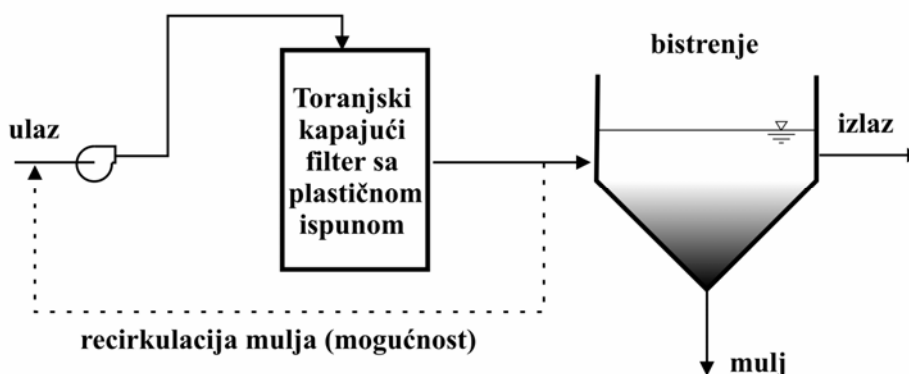
Konstruktivno se izvode kao toranj sa dubokim slojem nosača; ispune biofilitara, velike propustljivosti, i na njihovoj površini se formira tanak sloj imobilisanih mikroorganizama, biofilm. Raspršivanjem vode po vrhu ispune, i njenim slivanjem (kapanjem) preko biofilma kroz ispunu, dolazi do opisanih fenomena prečišćavanja otpadne vode, da bi pri prolazu kroz ceo sloj ispune, bio postignut željeni stepen prečišćavanja. Na dnu tornja sa ispunom se nalazi sabirni rezervoar, iz koga se voda odvodi do sekundarnog taložnika.

Doziranje otpadne vode po vrhu ispune se najčešće vrši raspršivanjem iz seta mlaznica ili, što je češći slučaj, putem rotirajućih jedno- ili višekrakah distributera, sa mlaznicama na dnu, sa kojih se voda raspršava po površini ispune po čitavom poprečnom preseku tornja. Biofiltri sa

šljunkovitom ispunom su obično (zbog težine ispune) plići i većeg prečnika, dok su biofiltri sa plastičnom ispunom dublji ali manjeg prečnika (sl. 10.10 i 10.11).



Slika 10.10 Šema kapajućeg biofiltra sa šljunkovitom ispunom



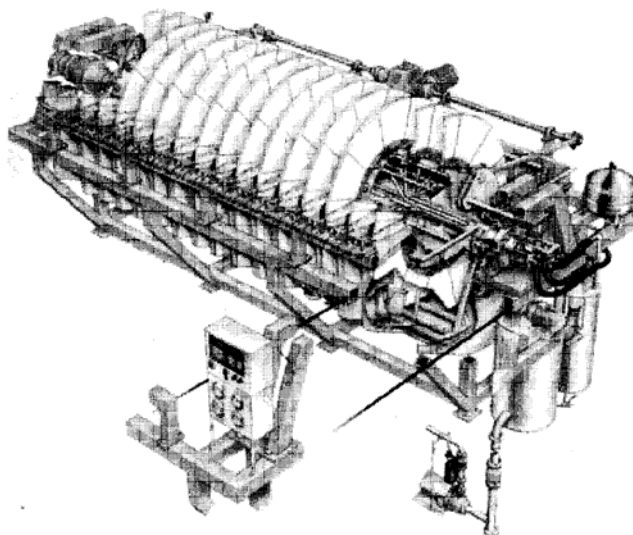
Slika 10.11 Šema kapajućeg biofiltra sa plastičnom ispunom

Biodisk proces

Po mehanizmu uklanjanja zagađenja u otpadnoj vodi, ovaj postupak je sličan biofiltru, s tim što je biofilm nanet na mrežastu površinu u obliku tankih diskova koji su nanizani na centralno postavljenu osovinu (sl.10.12). Broj diskova i njihova površina određuju površinu kontakta. Tako poredani i fiksirani diskovi su potopljeni do polovine svoje površine u otpadnu vodu. Sporim rotiranjem biofilm se nalazi u kontaktu sa vodom i vazduhom, pri čemu se organske materije iz vode i kiseonik iz vazduha transportuju ka biofilmu. Izronjavanjem dela površine diska iznad nivoa vode, ostvaruju se uslovi za transport kiseonika iz vazduha ka biofilmu, čime je omogućen proces biooksidacije.

Najčešća primena ovog procesa je u prečišćavanju sanitarnih otpadnih voda ali i u obradi pojedinih vrsta industrijskih otpadnih voda. Tipična instalacija je od 5 do 20 metara dužine. Pri proračunu ove vrste procesa proračunava se brzina obrtanja diskova i njihova ukupna površina.

Zbog kompaktnosti izrade i malih gabarita, biodisk se prvenstveno koristi u urbanizovanim zonama i izolovanim objektima (hoteli i kampovi). Koristiti se i pogonima prehrambene industrije i biotehnologije za predtretman jače zagađenih voda pre ispuštanja u gradsku kanalizaciju.



Slika 10.12 Biodisk, izgled bez rezervoara za vodu (odozdo) i poklopca (odozgo)

Procesi obrade u fluidizovanom sloju

Procesi u fluidizovanom sloju, zahvaljujući intenzivnom kontaktu između reaktanata, karakterišu se velikom brzinom odvijanja procesa i velikom efikasnošću.

Kod ovog procesa kao nosač mikroorganizama koristi se pesak na kome se, kao kod biološkog filtra, formira biološki film sa tri karakteristične zone po dubini filma. Prečnik pešćanih zrna je između 0,4 i 1,2 mm. Pesak se unese u fluidizacionu kolonu kroz koju se propušta otpadna voda brzinom dovoljnom da se zrnca peska sa biološkim filmom dovedu u fluidizovano stanje. Zahvaljujući malim dimenzijama pešćanih zrna, formira se veoma velika kontaktna površina između otpadne vode i biološkog filma koja iznosi preko $3.300 \text{ m}^2/\text{m}^3$ reaktorskog prostora. Zahvaljujući tome postiže se vrlo velika brzina bioloških reakcija..

Osim za uklanjanje biorazgradljivog organskog materijala, ovaj sistem se može iskoristiti za uklanjanje azota iz otpadne vode procesom nitrifikacije i denitrifikacije. Pošto se za razliku od nitrifikacije, denitrifikacija izvodi u anaerobnim uslovima, za tu svrhu su konstruisani anaerobni

biološki reaktori sa fluidizovanim slojem. U cilju potpune biološke obrade otpadnih voda ovim postupkom, primenjuje se kombinovana obrada u aerobnom i anaerobnom biološkom reaktoru.

10.9. ANAEROBNI POSTUPCI OBRADJE

10.9.1. *Mehanizam biološkog delovanja*

Biohemijske transformacije organskih materija, tj. organskih zagađenja do kojih dolazi u toku anaerobne obrade, uslovljene su fiziološkim karakteristikama radnih mikroorganizama. Osnovna zajednička karakteristika bakterija anaerobnog vrenja jeste sposobnost transformisanja materije i energije u odsustvu kiseonika. Pri tome su bakterije kiselinskog vrenja u odnosu prema kiseoniku fakultativne, a bakterije metanskog vrenja su striktni anaerobi.

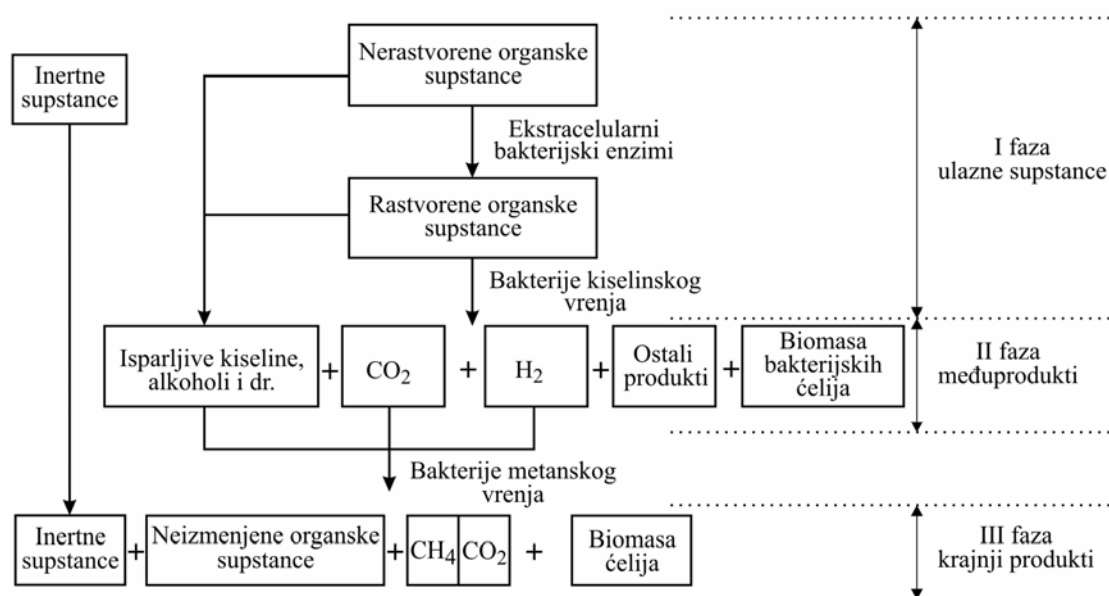
Pod dejstvom bakterija anaerobnog vrenja složene supstance kao što su belančevine, lipidi, skrob, celuloza, lignin itd. razlažu se složenim putem koji se može podeliti u tri faze kao što je to šematski prikazano na slici 10.13.

U *prvoj fazi* razgradnje, složene, u vodi nerastvorne supstance, hidrolizom se prevode u rastvoran oblik. Ova hidroliza je katalizovana enzimima koje izlučuju u okolni prostor bakterije anaerobnog vrenja. Pošto se u ovoj fazi razgradnje, u vodi nerastvorne supstance prevode u rastvoran oblik, ona se često naziva fazom likvefakcije, rastvaranja ili utečnjavanja.

Prevođenje složenih supstanci u oblik rastvoran u vodi je neophodan uslov za dalju razgradnju, jer mikroorganizmi mogu potpuno razložiti samo onaj oblik hrane koji je rastvoran u vodi. Na žalost, u praktičnim uslovima, rastvaranje složenih organskih supstanci retko kada je potpuno, zbog čega iz postupka obrade uvek izlazi manja ili veća količina nerazgrađene organske supstance. Takav je na primer, lignin koji se razlaže veoma sporo i nepotpuno; produkti njegove razgradnje ulaze u sastav mulja koji se izdvaja iz biološkog reaktora čineći kasnije osnovne komponente humusa u zemljištu.

U *drugoj fazi* razlaganja bakterije kiselinskog vrenja koriste u vodi rastvorne komponente organskog zagađenja, bez obzira da li su unete u sistem ili nastale u prvoj fazi razlaganja, i prevode ih u svoju biomasu i različite metabolite. Razumljivo je da se pod uticajem bakterija kiselinskog vrenja većom brzinom razlažu one komponente zagađenja koje su prisutne u rastvornom obliku jer ne moraju proći kroz prvu fazu razlaganja tj. hidrolizu.

Pri razlaganju pod dejstvom bakterija kiselinskog vrenja ne postoji spoljašnji akceptor elektrona oslobođenih razlaganjem supstrata, pa bakterije moraju koristiti unutrašnje akceptore koji nastaju u metaboličkim tokovima, na primer, ketokiseline. Pošto je najčešće zastupljeno korišćenje ketokiselina kao krajnjih akceptora elektrona, logično je što se kao krajnji produkt kiselinskog vrenja, tj. druge faze razlaganja javljaju različite organske kiseline. Pored toga nastaju i određene količine CO_2 i H_2 , kao i novoizgrađena biomasa mikroorganizama. Upravo zbog toga što se kao masovan produkt ove faze razlaganja organskih supstanci javljaju organske kiseline, ona se naziva fazom kiselinskog vrenja.



Slika 10.13 Šematski prikaz mehanizma bioloških delovanja u procesu anaerobne obrade

Vrste, kao i količine nastalih kiselina zavise od brojnih faktora, a pre svega od: vrste organskog zagađenja, pH, temperature, koncentracije kiseonika, itd. Ova faza razlaganja se može odvijati u prisustvu i bez prisustva kiseonika, pošto su bakterije kiselinskog vrenja fakultativno aerobne.

Zavisno od hemijske prirode, u drugoj fazi razlaganja se različita jedinjenja razlažu različitim brzinama. Najbrže i praktično potpuno se razlažu ugljeni hidrati, dok se više masne kiseline razlažu znatno sporije i na kraju zaostaje ih oko 20% u nerazloženom obliku.

Treća faza razlaganja dešava se pod dejstvom bakterija metanskog vrenja i u njoj se, prethodno formirane organske kiseline razlažu u metan i ugljendioksid uz biosintezu određene količine bakterijske biomase. Pored organskih kiselina, bakterije metanskog vrenja mogu razlagati, tj. koristiti kao hranu, i neka druga jedinjenja kao na primer niskomolekularne alkohole. One takođe koriste i H_2 , a pri tome CO_2 služi kao akceptor elektrona. Produkti ove transformacije su CH_4 i H_2O .

Sva, ili skoro sva postrojenja za anaerobnu obradu funkcionišu tako da se sve tri faze razlaganja organskih supstanci odvijaju sukcesivno u istom reaktoru. Zbog značajne razlike u fiziološkim osobinama između bakterija kiselinskog i metanskog vrenja u takvim bioreaktorima nije moguće postići optimalne uslove funkcionisanja mikroflora. Jedan od načina da se ovi problemi reše je razdvajanje sredine u kojoj deluju ove dve vrste mikroorganizama. To je postignuto u takozvanom *dvofaznom postupku* anaerobne obrade (vidi kasnije).

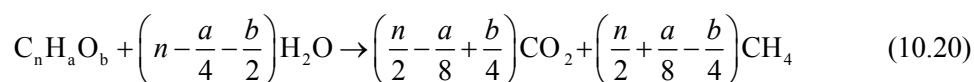
Efikasnost biološkog delovanja u anaerobnim procesima

Efikasnost delovanja anaerobnog procesa, iako zavisna od velikog broja faktora, prvenstveno zavisi od vrste organskih supstanci koja se obrađuju. Najlakše i najefikasnije se razlažu komponente zagađenja koje se nalaze rastvorene u vodi u molekulskom ili jonskom obliku. Znatno sporije se razlažu makromolekulska jedinjenja i koloidni rastvori, a najsporije one supstance koje se nalaze u suspendovanom stanju. Razlog za ovo je što se makromolekuli i suspendovane supstance prethodno moraju prevesti u rastvoren oblik delovanjem ekstracelularnih hidrolitičkih enzima. Brzina kojom se složena makromolekulska jedinjenja mogu prevoditi u rastvoran oblik zavisi od njihove hemijske građe i osobina bakterija anaerobnog vrenja. Pod dejstvom bakterija najlakše se razlažu supstance na koje su bakterije priviknute i imaju potrebne hidrolitičke enzime konstitutivnog karaktera. Kako je sposobnost prilagođavanja bakterija na pojedine supstance ograničena, jasno je da se neke od njih neće uopšte razlagati, ili će se razlagati u malom stepenu.

Dok se u aerobnim postupcima koji su dobro vođeni može postići smanjenje sadržaja organskih supstanci i od 95%, u standardnom anaerobnom procesu koji funkcioniše pod optimalnim uslovima u toku 30 dana boravka u bioreaktoru može se postići stepen redukcije organskih supstanci koji retko kada iznosi više od 75%. U novijim varijantama anaerobnih procesa obrade, naprimer u dvofaznom procesu, mogu se postići bolji efekti u kraćem vremenu.

Produkcija gasa

Količina gasa koja nastaje u anaerobnom procesu obrade zavisi kako od vrste zagađenja tako i od uslova pri kojima se proces izvodi. Za izračunavanje količine gasovitih produkata metanskog vrenja, može se koristiti jednačina:



Ako se ova jednačina primeni na određeni supstrat, na primer na sirćetnu kiselinu koja je centralni metabolit metanskog vrenja, može se izračunati teorijski prinos metana po jedinici supstrata. Na osnovu takvog proračuna sledi da se na svaki 1 g BPK₅ može dobiti $0,267/1,067 = 0,25$ litara metana pod uslovima procesne temperature (35 – 40°C), odnosno svedeno na normalne uslove 0,35 litara.

Za izračunavanje količine gasa koji se produkuje u toku metanskog vrenja koja uključuje i nastajanje mikrobne biomase, može se koristiti jednačina:

$$V_{gasa} = 0,35(e \cdot S - 1,42 \cdot BM) \quad (10.21)$$

gde je: V_{gasa} – količina produkovanog gasa; E – koeficijent efikasnosti korišćenja supstrata (0,80–0,95); S – količina utrošenog supstrata (BPK/d); BM – količina produkovane biomase (kg/d).

U praktičnim uslovima funkcionisanja postrojenja za anaerobnu obradu ostvaruje se sledeći prinos gasa (smeša CH₄, CO₂ i male količine H₂, H₂S i drugih gasova):

500 – 700 l gasa/kg organske supstance unete u reaktor

750 – 1100 l gasa/kg razložene organske supstance

14 – 37 l gasa/kg per capita (po stanovniku) na dan

Anaerobni biološki reaktori

Za kontrolisano i usmereno izvođenje procesa anaerobne obrade konstruišu se biološki reaktori koji funkcionišu pod anaerobnim uslovima i koji se u praksi često nazivaju *digestori*.

Biološki reaktori za obradu mogu biti diskontinualnog i kontinualnog delovanja. U praksi se primenjuju dva tipa kontinualnih reaktora i to:

- reaktori sa klipnim protokom, i
- reaktori sa potpunim mešanjem.

Ova dva karakteristična tipa anaerobnih bioloških reaktora sa najznačajnim parametrima procesa prikazana su na slici 10.14.

Digestori se izrađuju u raznim oblicima i mogu biti: četvrtasti, okrugli, pravougaoni i heksagonalni. Okrugli oblik je najčešći. U cilju očuvanja toplote često se ukopavaju u zemlju. Kao konstrukcioni materijal koristi se čelik, a često i beton. Mogu biti pokriveni ili otkriveni, pri čemu poklopac može biti fiksiran ili pokretan. Pokretan poklopac je konstrukciono složeniji i skuplji ali je bezbedniji jer može kompenzovati nagle promene zapremine usled neravnomernog izdvajanja gasa, kompenzuje promene dotoka i sprečava formiranje eksplozivne smeše gas – vazduh. Sadržaj digestora može se mešati na jedan od sledećih načina:

- recirkulacijom, tj. prepumpavanjem sadržaja;
- barbotiranjem gasa;
- mehaničkim mešanjem.

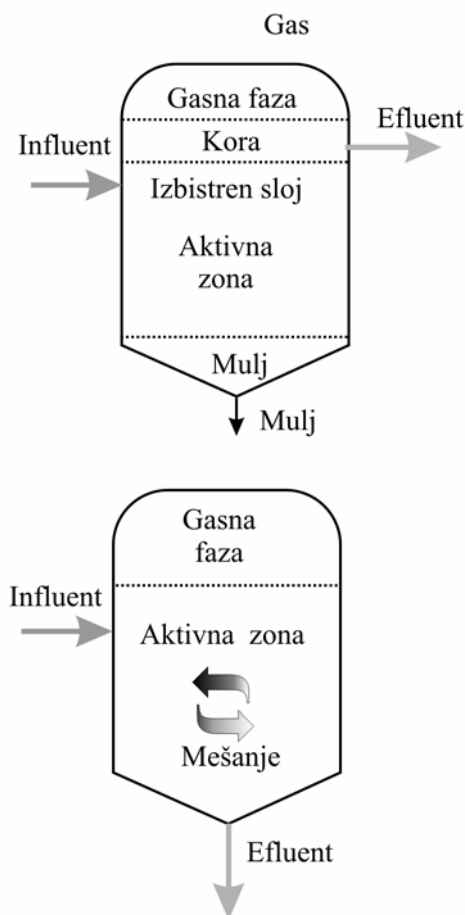
Recirkulacija sadržaja digestora je najpovoljniji oblik mešanja, posebno kada se poveže sa sistemom za eksterno zagrevanje.

Zagrevanje sadržaja digestora se može obavljati ugradnjom razmenjivača toplote (interno zagrevanje) ili spoljašnjim sistemom za zagrevanje (eksterno zagrevanje). Pošto se cirkulacijom sadržaja kroz spoljašnji sistem za zagrevanje vrši istovremeno i mešanje sadržaja digestora, ovaj način zagrevanja je povoljniji. Intenzitet zagrevanja mora biti tako podešen da se može povisiti temperatura influenta do željene vrednosti i da se mogu kompenzovati gubici koji nastaju zračenjem toplote u okolni prostor ili na druge načine. Za zagrevanje se najčešće koristi gas koji nastaje biosintezom u toku funkcionisanja sistema ili se koriste termički zagađene vode iz proizvodnih pogona. Ako je moguće ostvariti ovaj drugi oblik zagrevanja, anaerobna obrada postaje izvor toplotne energije.

Osnovni faktori procesa anaerobne obrade

Od mnogobrojnih faktora koji utiču na proces anaerobne obrade poseban značaj imaju temperatura, pH, vrsta i koncentracija zagađenja, koncentracija nutrijenata i toksika, vreme boravka u biološkom reaktoru, mešanje, koncentracija kiseonika, itd.

Kako se bakterije kiselinskog vrenja i metanskog vrenja međusobno značajno razlikuju, optimalno delovanje jedne ili druge grupe bi zahtevalo značajnije razlike u vrednostima pojedinih parametara procesa. Zbog toga, u klasičnim postupcima anaerobne obrade, pod optimalnim uslovima, podrazumevaju se takve vrednosti operativnih parametara koje omogućavaju što uspešnije zajedničko delovanje obe grupe mikroorganizama ali ne i njihov optimum.



a) Karakteristike:

Opterećenje: 0,5 – 1,1 kg
 Vreme boravka: 30 – 40 dana
 Zagrevanje: nema
 Punjenje i pražnjenje: šaržno

b) Karakteristike:

Opterećenje: 1,6 – 6,4 kg
 Vreme boravka: 15 dana ili manje
 Zagrevanje: ima
 Punjenje i pražnjenje:
 svakih 30 – 50 minuta
 kontinualno

Slika 10.14 Anaerobni biološki reaktori: A– sa niskim opterećenjem, B– sa visokim opterećenjem, i njihove karakteristike

Temperatura. Mezofilne bakterije imaju optimalnu temperaturu za delovanje 29 °C – 40 °C, dok termofilne bakterijske vrste anaerobnog vrenja imaju optimalnu temperaturu za delovanje između 50 °C i 60 °C. U zavisnosti od temperaturne oblasti u kojoj se postupak anaerobne obrade izvodi razlikujemo *mezofilno anaerobno vrenje* i *termofilno anaerobno vrenje*. Mezofilno vrenje se u praksi izvodi u temperaturnoj oblasti 27 – 38 °C (najčešće 35 – 39 °C) dok se termofilno vrenje izvodi u temperaturnoj oblasti 40 – 60 °C.

Opterećenje biološkog reaktora. Organsko opterećenje biološkog reaktora je značajno jer se njegovim menjanjem menja i tok vrenja, a menja se i količina produkovanog gasa. Koncentracija

suve supstance u reaktoru treba da bude u granicama od 3% do 10%. Niža koncentracija od 3% umanjuje kapacitet postrojenja, a viša deluje inhibitoryno.

Vreme boravka. Postoji minimalno i kritično biološko vreme boravka. Ako je vreme boravka ispod minimalnog, dolazi do ispiranja bioreaktora usled toga što je brzina uklanjanja mikroorganizama iz bioreaktora veća od brzine njihovog rasta. Ovakvo stanje bi brzo dovelo do prestanka rada sistema jer bi bioreaktor ostao bez mikroorganizama. Vreme boravka u bioreaktoru direktno zavisi od uslova pod kojim se anaerobna obrada izvodi, kao i od vrste primenjenog biološkog reaktora. Do 1950. godine primenom mezofilnog anaerobnog vrenja i šaržnih reaktora niskog opterećenja, vreme boravka je iznosilo 30 – 60 dana. Nakon uvođenja reaktora sa mešanjem dokazano je da je dovoljno i znatno kraće vreme i ono obično iznosi 11 do 15 dana.

pH i alkalitet. Koncentracija vodoničnih jona, tj. pH, je od velikog značaja za efikasnost funkcionisanja procesa anaerobne obrade. Optimalnu oblast vrednosti pH prvenstveno određuju bakterije metanskog vrenja koje su znatno osetljivije na promenu ovog faktora od bakterija kiselinskog vrenja.

Poznato je da se u drugoj fazi anaerobne obrade organske supstance razlažu delovanjem bakterija kiselinskog vrenja na organske kiseline pa bi trebalo očekivati opadanje pH vrednosti u sistemu. Međutim, nastale organske kiseline se u trećoj fazi anaerobne obrade prevode u metan delovanjem bakterija metanskog vrenja, dakle uklanjaju se iz sistema. Prema tome, biohemijsko delovanje ove dve vrste bakterija je suprotno u odnosu na promene pH i ukoliko su ta dejstva u neprekidnoj dinamičkoj ravnoteži; pH se neće značajnije menjati i održavaće se u granicama između 6 i 8,5, što je i optimalno.

Ako je pH vrednost znatno niža od 6, brzo dolazi do inaktivacije, a zatim i do odumiranja bakterija metanskog vrenja što za posledicu ima prekid njihovog delovanja. Prema tome, praćenjem promene pH u bioreaktoru za anaerobnu obradu može se pratiti i efikasnost njegovog funkcionisanja.

Nasuprot fenomenima koji dovode do zakišeljavanja bioreaktora deluje puferni kapacitet u bioreaktoru. Puferni kapacitet je posledica prisustva velikog broja kiselih i baznih komponenti koje čine niz konjugovanih kiselobaznih parova. Što je puferna moć veća, veća je i stabilnost funkcije bioreaktora. Kao mera kompenzacije moći anaerobnog bioreaktora uzima se njegov *alkalitet*. Alkalitet se konvencionalno izražava preko količine CaCO_3 i što je alkalitet veći, veća je i puferna moć bioreaktora.

Ukupni alkalitet bioreaktora može se izračunati korišćenjem jednačine:

$$\text{Ukupan(mg/l CaCO}_3\text{)} = \text{Bikarbonatni alkalitet} + 0,85 \times 0,833 \text{ Koncentracija organska kiselina}$$

gde je: 0,833 konverzioni faktor za usaglašavanje jedinica; 0,85 faktor zbog korekcije jer samo 85% organskih kiselina može se odrediti titracijom uz metiloranž.

Za izražavanje alalkaliteta koristi se i bikarbonatni alkalitet:

$$\text{Bikarbonatni alkalitet} = \text{Ukupni alkalitet} - 0,8 \cdot \text{isparljive kiseline}$$

Toksične supstance. Među toksične supstance pre svega spadaju joni metala kao što su: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} i dr. Ove supstance postaju toksične pri koncentracijama koje obično iznose oko 1.000 mg/l ili više. Treba naglasiti da proces anaerobnog vrenja podnosi znatno veće koncentracije jona teških metala od procesa aktivnog mulja. Razlog za ovo verovatno leži u tome što se najveći deo jona teških metala istaloži u obliku sulfida, jer je H_2S uvek jedan od metabolita anaerobnog vrenja.

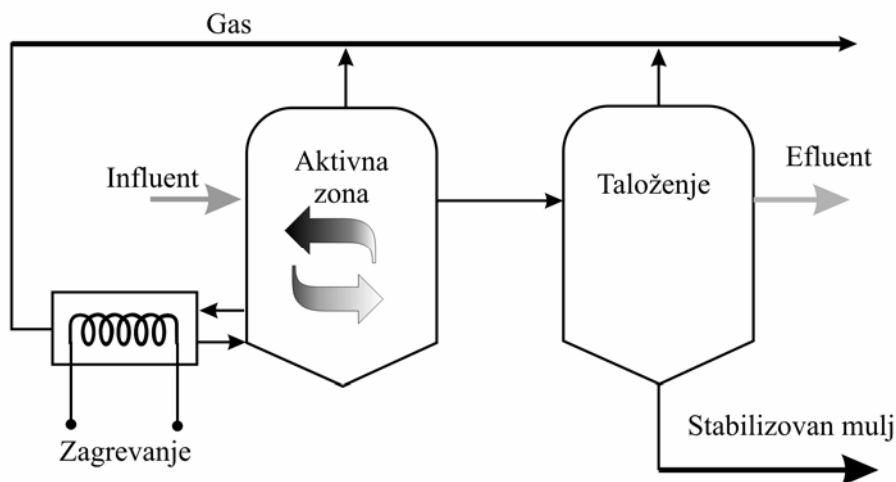
Vrste procesa anaerobne obrade

Konvencionalni anaerobni proces

Konvencionalni ili nisko opterećeni proces u biološkom reaktoru bez mešanja prikazan je na slici 10.16a. Ovaj proces se danas, zbog niza nedostataka, retko primenjuje u postrojenjima većeg kapaciteta, a primenjuje se još jedino kod postrojenja malog kapaciteta koja su lokalnog značaja. Ovaj proces podnosi mala opterećenja i zahteva dugo vreme obrade.

Dvostepeni anaerobni proces

Za razliku od konvencionalnog procesa, dvostepeni proces anaerobne obrade uključuje i taložnik, čime je omogućeno izvođenje potpunog mešanja u reaktoru. U taložniku se efluent zadržava dovoljno dugo da se može postići izdvajanje mulja, a istovremeno se dovršavaju i procesi biološke obrade koji su u ovoj fazi veoma usporeni. Dvostepeni proces anaerobne biološke obrade prikazan je na slici 10.15.



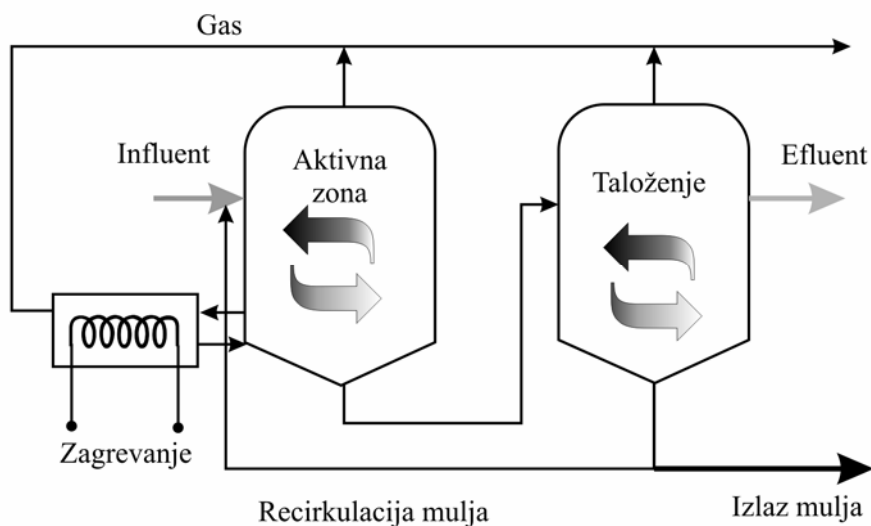
Slika 10.15 Dvostepeni proces anaerobne biološke obrade

U ovom procesu se koristi visoko opterećeni biološki reaktor sa potpunim mešanjem čije su osnovne karakteristike date na slici 10.16b.

Anaerobni kontakt proces

Anaerobni kontakt proces je nastao kao analogija sličnog aerobnog procesa obrade aktivnim muljem. Ovaj proces je prvenstveno namenjen anaerobnoj obradi jako zagađenih otpadnih voda stočnih farmi, mada se koristi i u obradi bioloških i drugih muljeva.

Osnovna karakteristika ovog procesa je recirkulacija mikroorganizama anaerobnog vrenja koji su izdvojeni taloženjem u taložniku; oslobođeni su biosorbovanog zagađenja zbog čega su veoma aktivni. Anaerobni kontakt proces šematski je prikazan na slici 10.16.

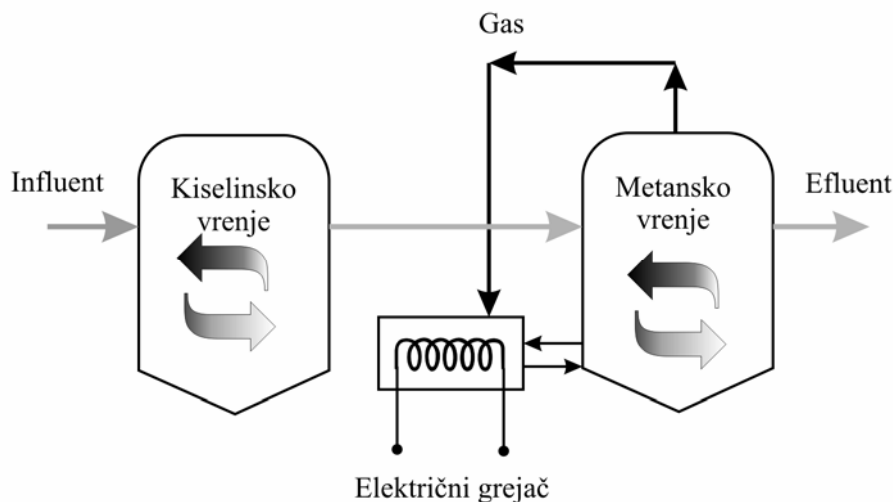


Slika 10.16 Anaerobni kontakt proces

Dvofazni anaerobni proces

Prethodno je navedeno da u procesima anaerobne obrade učestvuju dve vrste mikroorganizama: bakterije metanskog vrenja i bakterije kiselinskog vrenja koje se međusobno fiziološki značajno razlikuju. Pošto su bakterije metanskog vrenja osjetljivije na promenu ekoloških faktora od bakterija kiselinskog vrenja, najčešće, ograničavajući faktor brzine anaerobnog vrenja predstavljaju neoptimalni uslovi za njihovo delovanje. U cilju optimizacije njihovog delovanja razvijen je postupak obrade koji je nazvan dvofaznim, jer se dve osnovne faze obrade: kiselinsko i metansko vrenje izvode u odvojenim reaktorima. Na taj način moguće je podesiti optimalne uslove za delovanje obe grupe bakterijskih vrsta. Ovaj proces je šematski prikazan na slici 10.17.

Zahvaljujući razdvajanju kiselinskog od metanskog vrenja, postignuto je značajno ubrzanje i povećanje efikasnosti procesa. Uvođenjem ovog postupka u biološku obradu omogućen je i razvoj novog, veoma perspektivnog tzv. «*bioenergetskog*» postupka anaerobne obrade.



Slika10. 17 «Bioenergetski» anaerobni proces

10.10. MEMBRANSKI PROCESI

Intenzivan razvoj membranskih procesa omogućio da oni u bliskoj budućnosti postanu konkurentni hemijskim pa i biološkim postupcima obrade. Njihova primena postaje posebno korisna u slučajevima kada se želi da se, zbog racionalizacije proizvodnje u industrijskim pogonima, upotrebljena voda recirkuliše.

Detalniji opis principa delovanja i načina primene ovih procesa dat je u poglavlju 6.1.

10.11. DEZINFEKCIJA EFLUENTA

Dezinfekcija efluenta predstavlja poslednju fazu sekundarnog ili tercijernog tretmana otpadnih voda. Dezinfekcija je hemijski tretman koji podrazumeva dodavanje dezinfekcionih sredstava efluentu u cilju inaktivacije patogenih mikroorganizama radi zaštite zdravlja ljudi.

Dezinfekcioni agensi koji se koriste su: hlor, hlordioksid, ozon, ultravioletno i gama zračenje, brzi elektroni.

Najčešće korišćeni način dezinfekcije efluenta je hlorisanje. Hlor se dodaje sekundanom efluentu i ostavlja da reaguje u toku određenog vremena kontakta (obično 20 – 45 min za prosečni protok i 15 min za udarni protok) a zatim se koristi dehlorisanje pre ispuštanja obrađene vode u

prijemnik da bi se zaštitile prisutne biološke vrste. U SAD je prihvaćen standard po kome je maksimalno dozvoljeno 200 fekalnih koliformnih bakterija u 100 ml vode efluenta, dok kod nas ti standardi još uvek nisu uspostavljeni.

Hlorisanje se obično izvodi pomoću tečnog hlora, mada je moguće alternativno koristiti i kalcijum- ili natrijumhipohlorit ili hlordioksid (vidi poglavlje 6.1.9).

- adsorpcija, 42, 231, 246, 322, 347, 352, 354, 355
aerobni procesi, 123
agregacija, 34, 35, 42, 45
aktivatori, 35, 37
aktivni centar, 40, 55, 57
aktivni mulj, 417, 418, 420, 422, 423, 425
aktivnost vode, 25, 26, 300, 406
alge, 20, 21, 22, 23, 49, 231
anaerobni, 22, 129, 147, 196, 416, 418, 427, 428, 430, 431, 432, 434, 435, 436
animalne ćelije, 21, 30, 31, 32, 33, 149, 160, 161, 169, 170, 360, 443
antagonizam, 47
antipenušavci, 27, 218, 219, 252, 257, 298, 306, 397
autotrofi, 23
bilans mase, 219, 389
bilansni metod, 219, 223
biljne ćelije i tkiva, 19, 170
biodisk, 158, 417, 425, 426, 427,
biohemijsko inženjerstvo, 1, 2, 5
bioinženjerstvo, 1
biokatalizator, 159, 377, 391
biokomponente biosenzora, 318, 320
biološka filtracija, 424
biološko inženjerstvo, 1
biomedicinsko inženjerstvo, 1
biomolekularno inženjerstvo, 1
bioproces, 13, 14, 15, 16, 49, 124, 125, 126, 127, 159, 161, 187, 188, 197, 218, 260, 270, 288, 297, 304, 328, 329, 333, 378, 389, 390, 391
bioprocesno inženjerstvo, 2
bioreaktor sa potpunim mešanjem, 50
bioreaktor, 14, 15, 50, 64, 65, 67, 99, 102, 104, 105, 106, 109, 111, 118, 120, 123, 126, 127, 128, 151, 152, 154, 157, 160, 161, 164, 170, 171, 175, 177, 178, 179, 180, 189, 197, 220, 260, 261, 296, 298, 300, 301, 308, 310, 311, 312, 377, 380, 381, 382, 383, 387, 391, 392, 420, 433, 444
biosenzori, 306, 318, 320, 323
biosinteze, 12, 13, 25, 27, 28, 45, 188, 133, 134, 135, 136, 137, 179, 217, 253, 333, 334, 336, 344, 347, 349, 359, 391, 392
biotehnologija, 1, 3, 4, 7, 10, 11, 173, 397, 398, 401
Bodenstein-ov broj, 283, 284, 285,
brojanje, 75, 317
brzina filtracije, 245, 337
brzina nastajanja proizvoda, 50, 69, 92, 93, 304
brzina potrošnje kiseonika, 147, 161, 201, 220, 221, 222, 383
brzina prenosa kiseonika, 178, 179, 221, 222
brzina razblaženja, 123, 129, 136
brzina smicanja, 183
brzina trošenja supstrata, 84, 91, 107, 121
brzina, 24, 35, 37, 45, 50, 51, 52, 56, 69, 70, 71, 72, 79, 80, 81, 84, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 102, 104, 107, 110, 121, 123, 124, 129, 133, 136, 141, 144, 145, 147, 161, 164, 168, 170, 178, 179, 181, 182, 183, 186, 187, 188, 190, 195, 196, 200, 201, 204, 205, 206, 207, 211, 213, 219, 220, 221, 222, 245, 263, 265, 266, 273, 274, 275, 276, 283, 284, 285, 291, 292, 304, 319, 328, 337, 341, 342, 346, 352, 374, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 388, 389, 391, 412, 413, 415, 427, 433
celuloza, 44, 79, 87, 89, 178, 253, 256, 358, 409, 428
centrifugalni separator, 115
cevna centrifuga, 340
cevni bioreaktor, 50, 62, 100, 104, 105, 118, 119, 121, 122, 444
ciklični, 127, 321
Damkeler-ov broj, 285
deferizacija, 240, 241
degazacija, 243
dehlorisanje vode, 245
dehlorisanje, 240, 245, 436
del-faktor, 265
demanganizacija vode, 241
demanganizacija, 241, 242
demineralizacija vode, 236
demineralizacija, 236, 237, 238,
desorpcija, 219, 352, 355
destilacija, 391
dezinfekcija vode, 246
dezintegracija, 31, 214, 334, 344, 345
dezodorizacija, 244, 245
diauksični rast, 85, 86
difuzija, 43, 89, 90, 282, 287, 319, 378,
dijaliza, 362
dinamički metod, 221
diskontinualni procesi, 99, 126
dolivni postupak, 127
dužine trajanja enzimske reakcije, 63
Eadie-Hofste-ova jednačina, 60, 61, 68
eksponencijalna faza, 70, 71, 79
eksponencijalni profil, 274
ekstrakcija, 347, 364, 391
endogeni metabolizam, 24, 85
energija, 22, 23, 24, 25, 27, 31, 35, 37, 38, 39, 40, 49, 78, 85, 88, 90, 131, 137, 138, 139, 141, 142, 144, 146, 150, 154, 157, 163, 165, 173, 178, 179, 180, 194, 197, 205, 206, 208, 213, 236, 248, 249, 252, 253, 258, 259, 262, 263, 266, 268, 287, 309, 311,

- 314, 362, 370, 377, 394, 395, 396, 398, 401, 402, 403, 406, 416, 418, 423, 424, 428, 431
- entalpije bioprocasa, 138, 139, 142
- entropija, 141, 142, 145
- enzimi, 4, 9, 19, 29, 31, 39, 41, 174, 304, 316, 318, 319, 321
- eubakterije, 20, 21
- eukariote, 20, 21
- faza odumiranja, 70, 72, 79
- feed – batch, 126, 127, 129
- filtracija, 231, 262, 288, 304, 336, 337, 338, 339, 340, 360, 366, 410, 424
- flokulacija, 246, 343, 410
- formalni makro-pristup, 135
- genetsko inženjerstvo, 32
- genotip, 37
- geometrijska sličnost, 276, 380, 385
- Gibsova energija, 142, 143, 145, 146, 444
- glukoza, 12, 31, 80, 136, 138, 139, 178, 202, 253, 258, 259, 319, 324, 344, 374
- gljive, 20, 21, 157
- gravimetrijski metodi, 76
- hemijskog inženjerstva, 3
- hemoheterotrofi, 24
- hemostat, 100, 102, 109, 110, 113, 115, 126, 129, 161
- Hemotrofi, 23
- Henry-eva jednačina, 98
- heterotrofi, 23
- hidrauličko opterećenje, 414, 419,
- hlorisanje vode, 246
- hranljiva podloga, 27, 39, 99, 105, 118, 120, 123, 127, 157, 158, 159, 161, 171, 178, 185, 195, 217, 251, 252, 254, 257, 258, 268, 277, 278, 281, 284, 296, 297, 298, 300, 301, 303, 304, 305, 315, 319, 333, 391
- hranljive podloge, 15, 16, 17, 26, 33, 47, 69, 75, 76, 85, 87, 100, 102, 104, 111, 127, 128, 129, 139, 144, 145, 151, 157, 158, 161, 169, 177, 178, 180, 185, 186, 195, 196, 197, 198, 200, 217, 218, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 274, 275, 276, 277, 278, 280, 281, 282, 285, 286, 287, 296, 299, 300, 301, 303, 304, 305, 307, 310, 312, 315, 316, 317, 328, 333, 343, 377, 390, 391, 397, 444, 445
- hromatografija, 313, 347, 357, 358, 359
- idealno klipno proticanje, 104, 105
- imobilizacija, 42, 322, 323, 443
- in situ, 130, 312
- inerciona impakcija, 287
- inhibicija supstratom, 55
- inhibitor, 55, 57, 359, 391
- inhibitori, 39, 70, 72, 82, 255, 256
- inokulum, 47, 118, 120, 297, 298, 301
- Intercepcija, 287
- izdvajanje proizvoda, 130, 161, 333, 334, 336, 347, 359, 391, 392
- izmenjivači jona, 234, 235
- izoenzimi, 39
- izolacija, 6, 17, 28, 29
- izvođenje bioprocasa, 3, 100, 159, 169, 298, 391, 444
- izvori azota, 252, 254
- izvori energije, 252, 253, 401, 402
- jonska izmena, 232, 234, 236, 246, 364,
- jonska izmena, 232, 246, 364
- kaskada biorektora, 116
- kaskada, 116
- katalitička sposobnost, 39
- katalizator, 1, 3, 4, 7, 14, 16, 17, 20, 26, 28, 29, 31, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 49, 158, 211, 230, 242, 377, 379
- kinetički model, 52, 84, 85, 89, 108
- kinetički parametar, 80, 95, 354
- kinetički parametri, 59, 82, 94, 97, 106, 108, 113
- kinetika rasta, 33, 69, 70, 92, 98, 99
- kinetika sterilizacije, 262, 445
- kiseonik, 7, 21, 23, 24, 26, 37, 87, 138, 140, 146, 161, 163, 164, 169, 170, 179, 200, 201, 203, 204, 214, 220, 222, 227, 244, 248, 252, 314, 316, 377, 388, 404, 416, 418, 425, 426
- klasifikacija, 19, 20, 40, 228
- klipno proticanje, 120
- koagulacija, 231, 246, 343, 410
- koeficijent prinosa biomase mikroorganizama po jedinici mase utrošenog kiseonika, 89
- koeficijent prinosa biomase u odnosu na supstrat, 91, 111, 137, 197, 389
- koeficijent prinosa biomase, 89, 91, 111, 137, 138, 139, 140, 179, 197, 389
- koeficijent prinosa, 89, 91, 92, 111, 137, 138, 139, 140, 141, 179, 196, 389
- koeficijent raspodele, 348
- koeficijent selektivnosti, 348
- komponente kontrolnog sistema, 325
- konkurentna inhibicija, 54, 82
- konstanta ravnoteže, 143, 316
- konstanta zasićenja supstratom, 80
- kontinualni procesi, 49, 100
- kontrola, 35, 45, 131, 132, 167, 169, 257, 304, 326, 328, 329, 375, 386, 387, 423
- kristalizacija, 334, 364
- kriterijum sterilizacije, 265, 266, 270, 271, 275, 276, 277, 278, 280, 281, 285
- kritični protok, 111
- kulture biljnih organa, 36, 37
- kvalitet, 9, 17, 29, 33, 46, 130, 144, 161, 167, 171, 189, 225, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 236,

- 239, 240, 246, 247, 248, 250, 252, 253, 260, 266,
268, 276, 280, 281, 288, 296, 304, 305, 333, 334,
344, 362, 365, 366, 367, 372, 376, 391, 394, 401,
404, 410, 411
- kvasci, 4, 22, 26, 35, 49, 72, 73, 74, 88, 136, 160,
161, 219, 301, 304, 319, 360
- kvasci, 4, 22, 26, 35, 49, 72, 74, 75, 88, 301, 304,
319, 360
- laboratorijski inokulum, 299
- lag faza, 33, 71
- laktoza, 253, 258
- Lineweaver-Burk-ova jednačina, 60, 61, 62, 107, 108
- linije obrade vode, 230, 231
- liofilizacija, 373
- makroelementi, 25, 254
- makrokinetika, 49, 379
- maksimalna brzina enzimске reakcije, 52
- maseni bilans, 91, 107, 110, 115, 118
- matrica, 43
- mehanička delovanja, 30, 33
- mehanizam, 35, 40, 50, 57, 58, 100, 133, 165, 188,
209, 262, 287, 292, 341, 360, 380, 387, 388, 428
- mehanizam, 35, 40, 50, 57, 58, 100, 133, 165, 188,
209, 262, 287, 292, 341, 360, 380, 387, 388, 428
- melasa, 253, 259, 397, 399
- membrana, 20, 21, 27, 31, 44, 45, 159, 163, 238, 239,
288, 310, 319, 324, 359, 360, 362, 363
- membranska filtracija, 306
- membranska separacija, 336, 362, 391
- membranski procesi, 238, 247
- membranski procesi, 238, 247, 359, 436
- merenja u biotehnologiji, 312
- merenje pH, 312
- merenje protoka gasa, 310
- merenje temperature, 308, 309, 331
- merni instrumenti, 305, 307, 308, 325, 328
- mešalice, 153, 165, 171, 181, 186, 187, 189, 190,
191, 192, 193, 206, 218, 219, 306, 311, 377, 378,
380, 381, 382, 383, 384, 385, 391
- mešanje, 7, 33, 37, 50, 64, 67, 68, 102, 105, 106, 109,
116, 118, 120, 149, 150, 151, 152, 153, 156, 158,
159, 160, 161, 164, 165, 168, 170, 171, 172, 173,
174, 175, 176, 177, 178, 179, 181, 184, 186, 187,
189, 195, 200, 201, 204, 216, 219, 222, 333, 252,
260, 282, 284, 336, 349, 350, 355, 358, 379, 378,
379, 380, 381, 382, 384, 387, 410, 418, 431, 433,
434
- metod apsorpcije, 219
- mezofilni, 246
- Michaelis-Menten-ova konstanta, 52
- mikroelementi, 10
- mikrofiltracija, 238, 338
- mikrokinetika, 49, 50
- mikroorganizmi, 1, 3, 4, 19, 23, 25, 26, 27, 28, 47,
75, 76, 100, 111, 123, 146, 151, 157, 158, 177,
185, 187, 245, 247, 251, 253, 254, 258, 265, 270,
285, 301, 309, 319, 397, 418, 428
- mlevenje, 336, 413
- modelovanje, 387, 390
- Monodov model, 79, 80, 82
- mutacije, 7, 11, 29, 115, 116, 130, 131, 134
- NADH, 146
- napon smicanja, 170, 182, 183, 208, 384, 386
- natrijumhipohlorit, 437
- nekonkurentna inhibicija, 55, 82
- nestacionarni proces, 270
- nitifikacija, 424
- nitifikujuće bakterije, 23
- nomenklatura, 19, 20
- određivanje biomase, 76, 78, 316
- oksidacija, 8, 242, 244, 353, 416, 424
- omekšavanje vode, 222, 233, 235, 236
- omekšavanje vode, 232, 233, 235, 236
- opterećenje bioreaktora, 114
- optimizacija, 386, 388, 390, 391
- organsko opterećenje, 407, 417
- otpadne vode, 228, 229, 304, 404, 405, 406, 407, 410,
411, 412, 414, 415, 416, 417, 419, 421, 423, 424,
425, 427
- pakovanje, 17, 165, 324, 336
- parametri, 50, 59, 73, 82, 87, 94, 97, 98, 99, 106, 107,
108, 113, 273, 281, 304, 305, 366, 375, 388, 389,
394, 404, 406, 407, 419, 420, 422, 431
- pekarski kvasac, 131
- plesni, 10, 21, 22, 23, 26, 35, 45, 49, 72, 73, 74, 75,
76, 79, 88, 89, 90, 134, 147, 157, 219, 286, 304,
404, 415, 418
- plesni, 10, 22, 23, 26, 35, 45, 49, 72, 73, 74, 75, 76,
79, 88, 89, 134, 147, 157, 218, 285, 304, 404, 415,
418
- pogonski inokulum, 301
- polukontinualni biorektori, 99, 126
- postupci prečišćavanja, 47, 235, 415, 447
- potreba za kiseonikom, 170, 420, 423
- povezivanje, 391, 398
- povratna (nekonkurentna) inhibicija, 55
- povratna inhibicija, 57, 131
- povratna represija, 131
- praćenje bioprocesa, 305, 307, 445
- precipitacija, 347, 350, 351, 364
- precipitacija, 347, 351
- prečišćavanje proizvoda, 17, 252, 336, 347, 360, 364
- prečišćavanje, 17, 22, 23, 42, 229, 238, 252, 304,
334, 336, 347, 358, 360, 362, 363, 364, 404, 405,
406, 407, 410, 411, 414, 415, 416, 420, 424
- prekursori, 33, 252, 255, 316

- primarni metaboliti, 131
 priprema inokuluma, 225, 301
 priprema vode, 225
 prirodni izmenjivači jona, 234
 pritisak, 25, 27, 133, 143, 164, 214, 215, 222, 238, 239, 244, 309, 310, 314, 330, 346, 354, 374
 proces, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 17, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 41, 42, 45, 49, 50, 69, 70, 72, 77, 78, 79, 86, 89, 93, 98, 99, 100, 102, 104, 105, 113, 115, 119, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 135, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 149, 150, 157, 158, 160, 161, 167, 169, 171, 174, 177, 178, 179, 186, 188, 193, 196, 201, 202, 203, 206, 214, 226, 228, 230, 231, 232, 233, 235, 236, 237, 238, 239, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 254, 257, 259, 260, 261, 262, 263, 270, 278, 280, 288, 296, 298, 301, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 311, 313, 315, 318, 319, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 331, 334, 335, 336, 341, 345, 352, 353, 354, 355, 356, 359, 360, 362, 368, 369, 370, 371, 373, 374, 375, 377, 378, 379, 380, 381, 386, 387, 388, 389, 390, 390, 391, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 405, 406, 407, 408, 410, 411, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 429, 430, 431, 433, 434, 435, 436
 procesne tehnologije, 395, 396, 397
 produkcija metabolita, 133
 proizvodnja, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 20, 22, 23, 33, 34, 47, 123, 129, 131, 298, 299, 301, 398, 402, 407, 408
 protočni reaktor, 171
 protozoe, 20, 21, 22, 23, 404, 415
 psihofilni, 27
 razmnožavanje bakterija, 72
 reakcije metabolizma, 38, 131
 reciklat, 105
 recirkulacija, 121, 435
 recirkulacioni sistemi, 249
 redoks potencijal, 313, 315
 regulacija metabolizma, 131
 regulatori metabolizma, 255
 rektifikacija, 344, 446
 reverzna osmoza, 238, 410
Saccharomyces cerevisiae, 8, 12, 22, 138, 147, 178, 256, 259, 301, 320
 saharoza, 53, 178, 253, 256, 259, 324, 374
 samoagregacija, 42, 45
 samoimobilizacija, 37
 sekundarni metaboliti, 11, 35, 93, 126, 131
 sekundarni metabolizam, 131, 134, 254
 selekcija mikroorganizama, 124
 separacija, 238, 334, 336, 359, 362, 391
 separator, 115, 116, 340, 370, 414
 signal, 170, 307, 308, 310, 311, 315, 316, 317, 318, 319, 321, 323, 324, 325, 326, 328, 330, 331
 simbioza, 47
 simulacija, 386, 389, 390, 391
 simulacija, 386, 391
 sistemi za hlađenje, 249
 skrob, 10, 24, 43, 79, 87, 178, 179, 219, 221, 253, 256, 259, 319, 402, 428
 slojna filtracija, 246, 247
 specifična brzina nastajanja proizvoda, 91
 specifične brzine rasta, 80, 81, 83, 84, 85, 87, 89, 91, 93, 99, 113, 171, 389
 specifične brzine utroška supstrata, 91
 stacionarna faza, 70, 72, 79, 357, 359
 stacionarni metod, 223
 stacionarni procesi, 270
 stacionarno stanje, 100, 171, 221, 291
 standardi, 230, 394, 446
 starost biomase, 114
 starost mulja, 407, 420, 421, 422
 stehiometrijski koeficijent, 135, 147
 stepen redukcije, 146, 430
 stepena konverzije supstrata, 63, 110, 154
 sterilizacija filtracijom, 285, 288, 310
 sterilizacija toplotom, 269, 278, 285, 445
 sublimacija,
 submerzni postupak, 73, 79, 176, 251,
 sulfitni metod, 220
 supstrat, 12, 14, 25, 39, 40, 47, 49, 50, 52, 54, 55, 57, 72, 78, 79, 80, 86, 89, 90, 91, 92, 98, 102, 106, 118, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 132, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 157, 178, 197, 251, 253, 256, 260, 319, 359, 430
 sušenje proizvoda, 304, 361
 šarža, 7, 49, 50, 99, 135, 149, 160, 161, 162, 166, 167, 170, 171, 178, 179, 205, 260, 269, 271, 272, 276, 277, 278, 300, 301, 307, 352, 355, 361, 362, 365, 402, 432, 433
 taksonomija, 19
 taložnik, 414, 418, 421, 434
 tehnika rekombinantne DNK, 3, 34
 tehnike rekombinantne DNK, 4, 29
 temperatura, 7, 25, 26, 27, 28, 32, 37, 44, 83, 87, 102, 141, 142, 143, 145, 149, 152, 174, 197, 198, 199, 215, 222, 248, 249, 263, 266, 268, 273, 278, 280, 284, 285, 293, 295, 300, 309, 311, 316, 347, 352, 354, 373, 374, 375, 377, 388, 406, 431
 termodinamika, 49
 termofilni, 179
 tkiva, 1, 3, 4, 9, 10, 19, 20, 30, 31, 33, 34, 36, 37, 49, 149, 159, 169, 170, 173, 174, 187, 298, 322
 uklanjanje azota, 427

ukupna koncentracija enzima, 56
ultrafiltracija, 238, 246, 338, 347
unakrsna filtracija, 337, 338, 360
uparavanje, 334, 336, 357, 364
UV zračenje, 29, 246, 247
vakuum filtri, 339
virusi, 5, 22, 23, 32, 72, 74, 404, 415
viskozitet, 22, 35, 79, 152, 153, 170, 178, 181, 182,
183, 184, 186, 187, 191, 192, 200, 207, 208, 209,
212, 216, 219, 222, 278, 306, 309, 312, 337, 347,
385
višak mulja, 421
vitamini, 10, 131, 252, 262, 324, 374
voda II klase, 230
voda, 4, 6, 8, 22, 23, 24, 25, 26, 44, 46, 47, 100, 139,
143, 154, 157, 179, 186, 202, 225, 226, 227, 228,
229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 237, 238, 239,
240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249,
250, 252, 260, 262, 279, 304, 313, 350, 351, 352,
373, 374, 394, 397, 404, 405, 406, 407, 408, 409,
410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 423,
424, 425, 427, 428, 435, 436
vreme mešanja, 171, 176, 178, 189, 190, 379, 380
vreme zadržavanja, 264, 278, 280, 282, 358, 407,
413, 417, 419, 421, 422
vrste voda, 226
zagađivanje prirodnih voda, 228
zamrzavanje, 46, 345, 373
zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika, 89,
205, 217, 218, 219, 220, 222, 382, 383, 385, 386,
388
zapreminski protok, 105, 129, 171, 222, 342
završna faza, 17, 33, 355

LITERATURA

1. Aiba, S., Humhrey, A. E., Mills, N. F., "Biochemical Engineering", 2nd ed., Academic Press, New York (1973).
2. Atkinson, B., Mavituna, F., "Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook", Nature Press, New York (1985).
3. Bailey, J. E., Ollis D. F., "Biochemical Engineering Fundamentals", 2nd ed., Mc Graw-Hill, New York (1987).
4. Belter, P.A., Cussler, E.L., Hu, W.Sh., "Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology", Wiley Interscience, New York (1988).
5. Berovič, M. (ed.), "Bioreactor Engineering Course", Boris Kidrič Institute of Chemistry, Ljubljana (1987).
6. Blanch, H.W., Clark, D.S., "Biochemical Engineering", Marcel Dekker, New York (1997).
7. Gaćeša S., Klašnja M., "Tehnologija vode i otpadnih voda", Jugoslovensko udruženje pivara, Beograd (1994).
8. Gutcho, S. J., "Microbial Enzyme Production", Noyes (1974).
9. Doran P.M., "Bioprocess Engineering Principles", Academic Press, San Diego, (2000).
10. Flickinger, M.C.: Drew, S.W., "Encyclopedia of Bioprocess Technology, Fermentation, Biocatalyst and Separation", Vol. 1–5, John Wiley & Sons, Inc, New York (1999).
11. Laidler, K. J., Bunting, P. S., "The Chemical Kinetics of Enzyme Systems", 2nd ed., Oxford (1973).
12. Leach, C.K., "Operational Modes of Bioreactors", Butterworth-Heinemann, Oxford, (1992).

13. Levenspiel, O., "The Chemical Reactor Omnibook", OSU Book Stores, Corvallis (1979).
14. Marić V., Novak, S., Horvat P. (urednici), "Biokemijsko inženjerstvo", 1. izdanje, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, (1988).
15. Metcalf, I., Eddy, N., "Wastewater Engineering Treatment", Diposal, Reuse, Mc Graw Hill, New York (1981).
16. Mijnbeek, G., Oosterhuis, N.M.G., "Bioreactor Design and Product Yield", Butterworth-Heinemann, Oxford (1992).
17. Moo-Young, M. (ed.): Comprehensive Biotechnology, Vol. 2., "Principles of Biotechnology", Engineering Consideration (Cooney C. L., Humphrey, A. E., eds.), Pergamon Press, Oxford (1985).
18. Moser, A.: Bioprocess Technology, "Kinetics and Reactors", Springer-Verlag, New York, Wien (1988).
19. Mudde, R.F., Akker, H.E.A.v.d., "Bioprocess Technology: Modelling and Transport Phenomena", Butterworth-Heinemann, Oxford (1992).
20. Najafpour, G.D., "Biochemical Engineering and Biotechnology", Elsevier, Amsterdam (2007).
21. McNeil, B. & Harvey, L.M. (Eds.), "Fermentation; A Practical Approach", IRL Press, Oxford University Press (1990).
22. Nielsen, J., Villadsen, J., "Bioreaction Engineering Principles", Plenum Press, New York (1994).
23. Pirt, S. J., "Principles of Microbe and Cell Cultivation", Blackwell Scientific Publication, Oxford (1975).
24. Popov, S., "Osnovi biohemijskog inženjerstva", Tehnološki fakultet Novi Sad, (2000)
25. Povrenović, D.S., Grbavčić, Ž.B., Hadžismajlović, Dž.E., Vuković, D.V., Littman, H., "Fluid mechanical and thermal characteristics of spout-fluid drier with a draft tube", DRYING, Sel.Pap.Int.Drying Symp., 1990, , Edited by Mujumdar Arun S., Filkova Iva; Elsevier, Amsterdam, Netherlands CA 117, 1992, 343-351, 51392 w (6/154)

26. Schugerl, K., "Bioreaction Engineering", Vol 1: Fundamentals, Thermodynamics, Formal Kinetics, Idealized Reactor Types and Operation Modes, Wiley (1985).
27. Shuler, M.L., Kargi, F., "Bioprocess Engineering, Basic Concept", Prentice Hall, Upper Saddle River (2002).
28. Stanbury, P. F., Whitaker, A., "Principles of Fermentation Technology", Pergamon Press, Oxford (1987).
29. Veljković, V. B., "Osnovi biohemijaskog inženjerstva", Tehnološki fakultet Leskovac (1994).
30. Vogel, H.C., Todaro, C.L. (eds.), "Fermentation and Biochemical Engineering Handbook", Principles, Process Design, and Equipment, Second Edition, Noyes Publications, New Jersey (1997).
31. Viestur, Y. Z., Kuznecov, A. M., Savenkov, V. V., "Sistemi fermentacii", Zinatne, Riga (1986).
32. Wang, D.I C. et al. "Fermentation and Enzyme Technology", John Wiley (1987)
33. Wiseman, A., (ed.), "Principles of Biotechnology", Surrey Univ. Press, Glasgow (1983).