

MODELIMI DHE SIMULIMI I KINETIKËS SË RRITJES DHE FERMENTIMIT TË MAJASË SË IMOBILIZUAR NË ALGINAT KALCIUMI

*TERKIDA PRIFTI (VASO), LULJETA PINGULLI, ILIRJAN MALOLLARI.

Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Departamenti i Kimisë
Industriale

e-mail: terkida_vaso@live.com

Përmbledhje

Qëllimi i kësaj pune është të studiojmë kinetikën e proceseve të fermentimit periodik me qeliza të lira dhe të imobilizuara. Proceset e fermentimit janë realizuar në bioreaktorë të mbyllur në paralele që përfshijnë gjashtë kushte fermentuese të ndryshme, përfshirë këtu dhe inhibimin nga substrati dhe produkti. Metoda e imobilizimit që kemi përdorur është me ngecje në matricën e alginatit. U përcaktuan konstantet kinetike me tre modele të ndryshme linearizimi për gjashtë fermentime paralele. Duke parë vlerat e parametrave kinetike vihet re një rritje e shpejtësisë maksimale specifike të rritjes dhe konstantes së gjysëm ngopjes në procesin e fermentimit me qeliza të lira, në kushte pune joinhibitore. Në rastin e fermentimeve me inhibim nga substrati dhe produkti vihet re rritja e konstanteve të gjysëm ngopjes dhe ulja e shpejtësive maksimale specifike krahasuar me procesin e fermentimit me qeliza të lira. U bënë përafrime me dhjetë modele matematike. Fermentimet pa inhibim përafrohen me modelin Monod, ndërkohë që fermentimet me inhibim nga produkti dhe substrati përputhen me modele matematike me varësi eksponenciale. U arrit në përfundimin se qelizat e imobilizuara në kushte normale fermentojnë ngjashëm me majanë e lirë. Ndërkohë që fermentimet me inhibim nga substrati dhe produkti kanë fermentueshmëri shumë më të mirë krahasuar me fermentimin me maja të lirë.

Fjalëkyçe: Imobilizim, maja, parametra kinetikë, model matematik, inhibimi nga substrati dhe produkti.

Abstract

The aim of this work is to study the kinetics of free fermentation and immobilized periodic fermentation processes. Fermentation processes are carried out in parallel batch bioreactors that include six different fermentation conditions, including inhibition of substrate and product. The immobilization method was entrapment in alginate matrix. Kinetic constants were determined with three different linearization models for six parallel fermentations. Comparing kinetic parameter, was observed an increase of the maximum specific growth rate and half-saturation constant in the fermentation process with free cells under non-inhibitory conditions. In the case of fermentation with substrate and product inhibition, the increase of half saturation constants and the reduction of the maximum specific rates were observed compared to the free fermentation process. Experimental data were compared with ten mathematical models. Inhibition-free fermentations fitted well with Monod model, while product and substrate inhibition fermentation fit with exponential mathematical models. It was concluded that immobilized cells under normal

conditions ferment similarly to the free yeast process. While fermentation with substrate and product inhibition has much better fermentability compared to free yeast fermentation.

Keywords: Immobilization, yeast, kinetic parameters, mathematical modeling, substrate and product inhibition.

Hyrje

Simulimi i procesit të fermentimit është një ndër mjetet më të fuqishme për vlerësimin e alternativave të proceseve të fermentimit që lejon parashikimin e ecurisë së procesit pa shpenzuar për projektimin, kontrollin, shkallëzimin dhe eksperimentimin në impiante pilot. Cilësia e vetë simulimit varet nga cilësia e modelit matematik themelor të përdorur për parashikimin e përgjigjes së një sistemi të dhënë nga ndryshimet që ndodhin në mjedis dhe në kushtet e punës. Për këtë arsye modelet matematike duhet të përshkruajnë me një saktësi të mjaftueshme mekanizmat e sistemeve të marra në shqyrtim. Për simulimin e bioproceseve përdoren shpesh modelet kinetike që bazohen në bilancin e masës të përbërësve kryesore të fermentimit sic mund të jetë: biomasa, produkti biokimik i dëshiruar ose ai që përdoret rëndom, substrati. Përsa i përket prodhimit të bioetanolit, janë përdorur ekuacione të ndryshme nga studiues të ndryshëm.

Avantazhet e sistemeve me qeliza të imobilizuara krahasuar atë me qeliza të lira janë theksuar dhe studiuar gjerësisht nga shumë studime. Fermentimi me qeliza të imobilizuara është më efektiv sesa procesi me maja të lirë veçanërisht në fermentimet e vazhduara kryesisht për shkak të produktivitetit të lartë të fermentimit atribut ky i procesit të vazhduar, stabilitetit të qelizave dhe kostove më të ulëta të përpunimit dhe trajtimit të produkteve në dalje të procesit. Megjithatë qelizat e imobilizuara kanë akoma aplikim industrial të limituar, pasi stadi kufizues është zhvillimi i procedurave të imobilizimit në shkallë të madhe. Procesi i imobilizimit ndryshon jo vetëm mjedisin, por gjithashtu edhe karakteristikat fiziologjike dhe morfologjike të qelizave dhe aktivitetin katalitik të enzimave, prandaj kushtet e fermentimit (në veçanti kinetike) me maja të lirë dhe të imobilizuar janë të ndryshme. Avantazhi kryesor i sistemeve me qeliza të imobilizuara është se suporti i ngurtë lejon përdorimin e përqëndrimit të lartë të biokatalizatorëve dhe prurje të larta në hyrje e cila çon në vëllime të vogla pune të reaktorit krahasuar me proceset me qeliza të sunspensuara.

Fermentimi periodik në prani të biokatalizatorëve me qeliza të imobilizuara përfaqëson një metodë relativisht të re, e cila është një alternativë për të zëvendësuar proceset tradicionale të bioshndërrimeve. Për të studiuar procesin e fermentimit, fillimisht bëhet përzgjedhja e metodës së imobilizimit. Ekzistojnë shumë teknika imobilizimi. Në varësi të parametrave të ndryshëm të mjedisit dhe në varësi të llojit të mikroorganizmit duhet të përzgjidhet metoda më e mirë e imobilizimit. Metoda më e studiuar e imobilizimit të qelizave është imobilizimi

me ngecje në matricën e alginatit. Kjo është një metodë efikase dhe praktike në kushte laboratorike.

Materiali dhe metodat

Në këtë studim është përdorur majaja *Saccharomyces carlsbergensis* ose ndryshe majaja e birrës. Kjo maja u imobilizua në matricën e alginatit të kalciumit në kokrriza me tre diametra të ndryshëm. Këtu do të paraqesim matjet e bëra vetëm njërin prej tyre. Janë zhvilluar gjashtë paralele të njëpasnjëshme, në kushte të ndryshme fermentuese. Pas marrjes së rezultateve është kryer përpunimi i të dhënave eksperimentale, që konsiston në përcaktimin e parametrave kinetikë dhe ndërtimin e kurbave eksperimentale të ecurisë të fermentimit. Parametrat kinetikë u përcaktuan me tre linearizime të ndryshme me ndihmën e metodave numerike të paketës Microsoft Office. Këto parametra u përdoren për ndërtimin e modeleve të ndryshme matematike. Për të bërë krahasimin e modeleve teorike që të përcaktohet se kujt model teorike i përafrohet modeli jone eksperimental.

Modelet matematike

Të dhënat eksperimentale që kemi marrë i krahasojmë me modelet teorike, të ndara sipas kushteve fermentuese. Modelet janë paraqitur më poshtë në formë tabelare.

Tabela 1. Modelet teorike matematike

| Modeli matematikë | Shpejtësia specifike e rritjes |
|--|---|
| Monod | $\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s}$ |
| Contois | $\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s * X}$ |
| Teisser | $\mu = \mu_{\max} \left(1 - \exp\left(-\frac{s}{K_s}\right) \right)$ |
| Modele kinetike me inhibim nga substrati | $\mu = \mu_{\max} \frac{1}{1 + \frac{K_s}{s} + \frac{s}{K_i}}$ |
| | $\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s} \exp\left(-\frac{s}{K_i}\right)$ |
| | $\mu = \mu_{\max} \left[\exp\left(-\frac{s}{K_i}\right) - \exp\left(-\frac{s}{K_s}\right) \right]$ |

| | |
|---|--|
| Modele kinetike me inhibim nga produkti | $\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s} \frac{K_i}{K_i + p}$ |
| | $\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{p}{p_{\max}} \right)$ |
| | $\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s} (1 - K_i * p)$ |
| | $\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s} \exp(-K_i * p)$ |

Fermentimi periodik

Fermentimet periodike u realizuan në enë me vëllim prej 250 ml ushqim (musht birre). U përdorën përqëndrime të ndryshme sheqeri 12 Brix, 16 Brix dhe 20 Brix për të studiuar efektin inhibitor të substratit dhe 5% dhe 20% alkool, për të studiuar efektin inhibues të produktit. Eksperimenti i fermentimit u realizua në temperaturë 33.5°C. U marrën mostra për analizë pas 2, 4, 6, 8, 24 dhe 28 orësh. Matjet u realizuan me refraktometri dhe spektrofotometri. Në këtë punim po paraqesim matje të bëra në qeliza të imobilizuara me diametër 4mm dhe me densitet qelizor 1 gr/l.

Rezultatet dhe diskutime

Parametrat kinetike μ_{\max} (shpejtësia maksimale specifike e rritjes) dhe K_s (konstantja e gjysëm ngopjes) u përcaktuan me tre metoda të ndryshme linearizimi. Vlerat e marra nga veprimet janë paraqitur në tabelën 2.

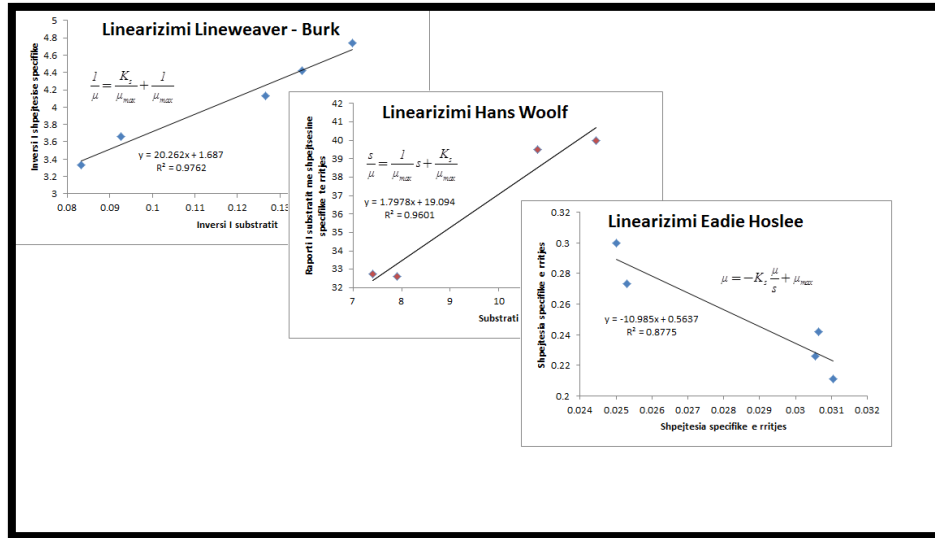


Figura 1. Shembull linearizimi përcaktimin e konstanteve kinetike

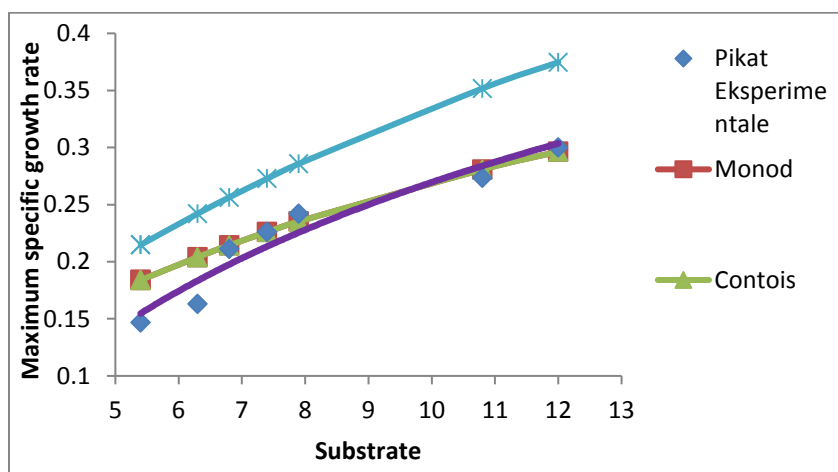
Tabela 2. Parametrat kinetike për cdo fermentimin

| | | μ_{\max} | K_s | K_i | $Y_{p/s}$ | $Y_{x/s}$ | R |
|--------------|--------------------|--------------|--------|--------|-----------|-----------|------|
| Njësia | | 1/ore | °Brix | °Brix | - | - | % |
| Fermentimi 1 | Maja e imobilizuar | 0.593 | 12.01 | - | 0.5 | 0.00114 | 97.6 |
| | Maja e lirë | 0.711 | 14.413 | - | 0.5 | 0.09881 | 89.3 |
| Fermentimi 2 | Maja e imobilizuar | 5.78 | 118.84 | - | 0.5 | 0.0039 | 82.7 |
| | Maja e lirë | 0.077 | 13.06 | - | 0.5 | 0.1079 | 71.3 |
| Fermentimi 3 | Maja e imobilizuar | 0.471 | 20.94 | 104.7 | 0.5 | 0.0117 | 93.8 |
| | Maja e lirë | 0.384 | 24.894 | 124.47 | 0.5 | 0.0669 | 91.6 |
| Fermentimi 4 | Maja e imobilizuar | 0.321 | 22.793 | 113.96 | 0.5 | 0.101 | 95.1 |

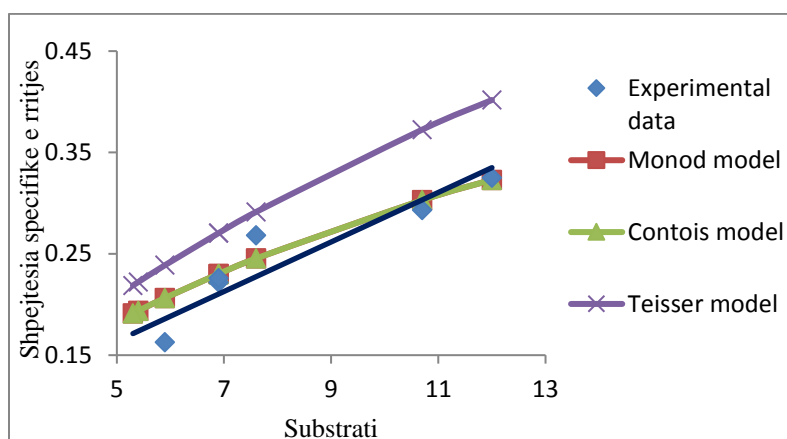
| | | | | | | | |
|--------------|--------------------|---------|--------|--------|-----|---------|------|
| | Maja e lire | 0.208 | 23.638 | 118.19 | 0.5 | 0.0624 | 95 |
| Fermentimi 5 | Maja e imobilizuar | 0.135 | 14.79 | 0.1 | 0.5 | 0.0143 | 98.3 |
| | Maja e lirë | 0.11 | 18.54 | 0.18 | 0.5 | 0.01148 | 97.1 |
| Fermentimi 6 | Maja e imobilizuar | 0.009 | 12.37 | 0.12 | 0.5 | 0.0059 | 99.9 |
| | Maja e lirë | 0.00008 | 12.3 | 0.12 | 0.5 | 0.1075 | 99 |

Më poshtë paraqiten krahasimin e pikave eksperimentale me modelet matematike të paraqitura në tabelën 1. Figura 1 paraqet rezultatet e të dhënave eksperimentale të krahasuara me modelet teorike për fermentimet e realizuara në mjedise jo inhibuese. Ecuritë e fermentimit të qelizave të lira dhe të imobilizuara janë pothuajse të ngjajshme.

Figura 1: Të dhënave eksperimentale të krahasuara me modelet teorike



(a)

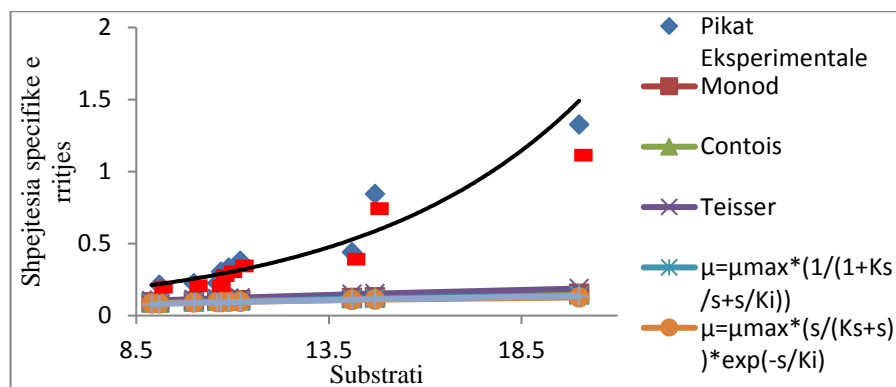


(b)

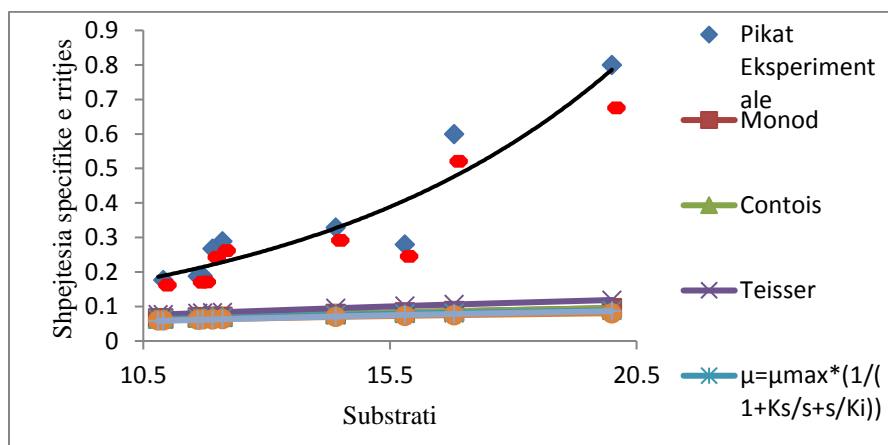
Figura 2. Krahasimi i modeleve matematike në rastin e qelizave të imobilizuara (a) dhe të lira (b) për fermentimet pa efekte inhibuese.

Duke parë figurën 1a, arrijmë në përfundimin që në rastin e fermentimit me qeliza të imobilizuara, modelet Monod dhe Contois përputhen shumë më mirë me modelin eksperimental. Meqë qelizat e imobilizuara zhvillojnë proceset fermentative dhe metabolike brenda matricës së alginatit, difuzioni përmes kësaj strukture zvogëlon shpejtësi specifike të rritjes. Në këtë rast modeli ka vlerë më të ulët të K_s në krahasim me modelin e fermentimit me qeliza të lira.

E njëjta analizë mund të bëhet për modelet e fermentimit me qeliza të lira. Përsëri modelet Monod dhe Contois përputhen me modelin eksperimental. Në këtë rast kemi μ_{max} dhe K_s më të lartë. Në këtë rast parametrat kinetikë janë më të lartë sepse dhe transporti i metabolitëve në qelizë dhe dalja e produkteve jashtë saj është shumë më e lehtë krahasuar me majanë e imobilizuar.



(a)



(b)

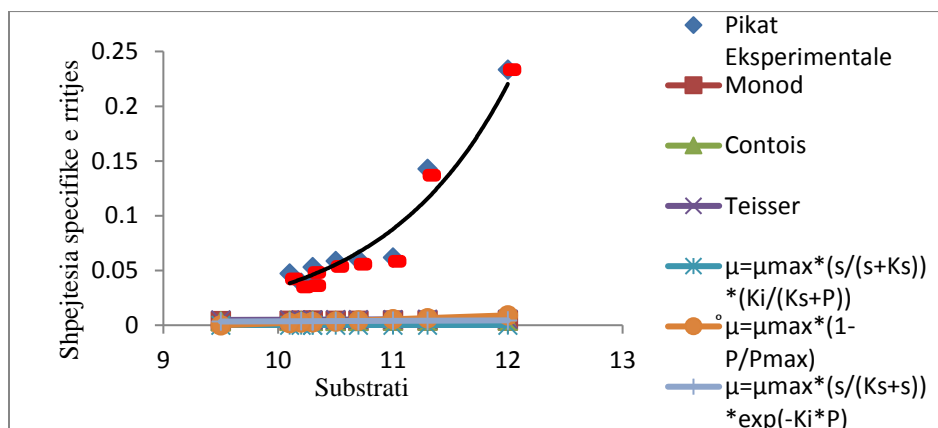
Figura 3. Krahasimi i modeleve matematike në rastin e qelizave të imobilizuara (a) dhe të lira (b) për fermentimet me inhibim nga substrati

Figura 2 paraqet rezultatet e modelit eksperimental të krahasuar me modelet teorike, në rastin e inhibimit nga substrati. Siç mund të shikohet nga grafikët, jo të gjitha modelet teorike përputhen me modelin eksperimental.

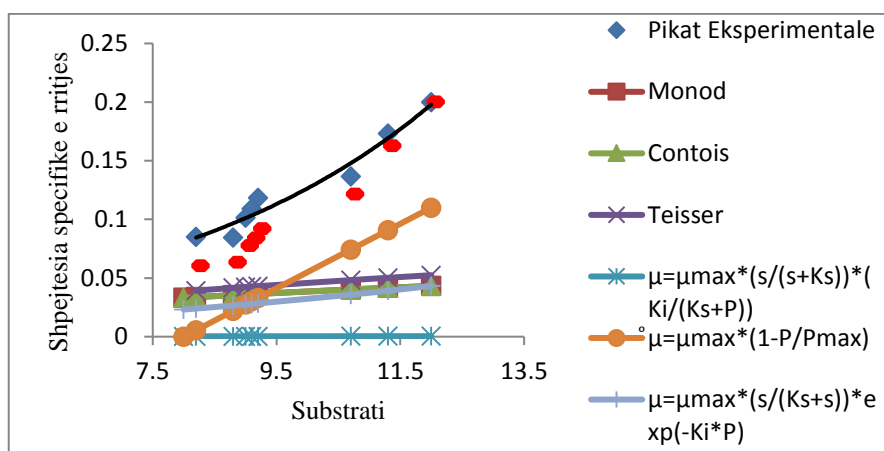
Duke parë grafikët arrijmë në përfundimin që në të dyja rastet me ose pa imobilizim modeli eksperimental ka varësi eksponenciale.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s} \exp\left(-\frac{s}{K_i}\right) \quad (1)$$

Efekti inhibues duke iu referuar dhe konstanteve kinetike ndjehet shumë më pak tek fermentimi me qeliza të imobilizuara.



(a)



(b)

Figura 4. Krahasimi i modeleve matematike në rastin e qelizave të imobilizuara (a) dhe të lira (b) për fermentimet me inhibim nga produkti.

Figura 3 paraqet krahasimin e rezultateve të modelit eksperimental krahasuar me modelet teorike në rastin e inhibimit nga produkti.. Vija eksperimentale dhe këtu përputhet mirë me modelin eksponencial të inhibimit që njihet ndyshe dhe modeli Aiba:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s} \exp(-K_i * p) \quad (2)$$

Tabela 2 tregon se μ_{\max} është më e madhe në rastin e fermentimit me qeliza të imobilizuara dhe konstantet K_s dhe K_i janë më të ulta, d.m.th efekti inhibues ndihet më pak se në rastin e qelizave të lira. Vlerat e këtyre dy parametrave janë më të ulta sepse difuzioni i ulët përmes kokrrizës krijon një efekt “mbrojtës” nga efekti inhibitor i produktit.

Konkluzione

Qëllimi i kësaj pune është të marrim një sërë relacionesh matematikore që përshkruajnë të dyja proceset e fermentimit periodik me qeliza të lira dhe të imobilizuara. U përcaktuan konstantet kinetike me tre modele të ndryshme linearizimi për gjashtë fermentime paralele të cilat përfshijnë fermentimet me maja të lirë dhe të imobilizuar. Duke parë vlerat e parametrave kinetikë vihet re një rritje e shpejtësisë maksimale specifike të rritjes dhe konstantes së gjysëm ngopjes në procesin e fermentimit me qeliza të lira, në kushte fermentimi jo inhibitore. Në rastin e fermentimit me inhibim nga substrati dhe produkti vihet re rritja e konstantes së gjysëm ngopjes dhe konstantes së inhibimit, kurse shpejtësia

maksimale specifike e rritjes zvogëlohet krahasuar me fermentimin me qeliza të lira.

U bënë përafrime me dhjetë modele matematike si Monod, Contois, Tessier, Aiba, etj. Nga rezultatet e marra është e vështirë të zgjidhet modeli i vetëm më i mirë i përshtatshëm. Fermentimet pa inhibim përafrohen me modelin Monod, ndërkohë që fermentimet me inhibim nga produkti dhe substrati përputhen me modele matematike me varësi eksponenciale.

Nga këto përfundime arrijmë në konkluzionin që qelizat e imobilizuara në kushte normale fermentojnë ngjashëm me majanë e lirë. Shpejtësia e fermentimit është pak më e vogël në rastin e qelizave të imobilizuara, por kjo rregullohet me rritjen e densitetit qelizor. Nga ana tjetër në fermentimet me inhibim nga substrati dhe produkti marrin fermentueshmëri shumë më të mirë krahasuar me fermentimet me maja të lirë.

Literatura

Arellano-Plaza M, Herrera-López E J, Díaz-Montaña D M, Moran A, Ramírez-Córdova J J (2007): Unstructured Kinetic Model for Tequila Batch Fermentation. *Int. J. Math Comput. Simul*, Vol. 1, Num. 1

Bailey JE, Ollis DF (1986): *Biochemical Engineering Fundamentals*, Second Edition. USA: McGraw-Hill Book Company.

Lee J. M (2008): *Biochemical Engineering*. Albright's Chemical Engineering Handbook. Florida: Taylor & Francis Group, LLC. Retrieved

Aiba S, Shoda M, Nagatani M. (2000): Kinetic of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol Bioeng*; 67; 671-90

Xhagolli L., Malollari I. (2009): *Inxhinieria e proceseve biokimike*