

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**

**SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**

**Dubravka Maretić**

**DIPLOMSKI RAD**

*Zagreb, rujan 2004.*



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**

**SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**

**Inženjerstvo u zaštiti okoliša**

**Dubravka Maretić**

**Razvoj matematičkog modela kontinuirane separacije BS albumina  
ekstrakcijom u vodenom dvofaznom sustavu**

**DIPLOMSKI RAD**

*Voditelj rada:* Dr. sc. Bruno Zelić, docent

*Članovi ispitnog povjerenstva:* Dr. sc. Bruno Zelić, docent

Dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, red. prof.

Dr. sc. Marko Rogošić, izv. prof.

*Zagreb, rujan 2004.*

## SAŽETAK

Genetski algoritmi su stohastičke, globalne, istraživačke i optimizacijske metode koje oponašaju prirodnu biološku evoluciju. Oni djeluju na populaciju mogućih rješenja oponašajući zakone preživljavanja u prirodi s ciljem evoluiranja najbolje prilagođenih, odnosno onih sposobnijih, te na taj način pridonose razvoju i približavanju k optimalnom rješenju u domeni problema.

U ovom radu provedeno je optimiranje procesa ekstrakcije modelne otopine proteina bovine serum albumina (BSA) u vodenom dvofaznom sustavu, PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, upotrebom genetskog algoritma (GA).

U seriji eksperimenata provedenih u šaržnom sustavu istraživani su utjecaj pH, masenog udjela PEG-a, masenog udjela amonij - sulfata i koncentracije modelne otopine BSA na koeficijent raspodjele (omjer ravnotežnih koncentracija proteina u ekstraktnoj i rafiniranoj fazi) u vodenom dvofaznom sustavu. Optimalni koeficijent raspodjele  $K = 0,0874$  postignut je pri  $\text{pH} = 5,5$ ; koncentraciji otopine BSA,  $c_{\text{BSA}} = 1,5 \text{ mg cm}^{-3}$ ; masenom udjelom PEG-a,  $w_{\text{PEG}} = 0,1138$  i masenom udjelom amonij-sulfata,  $w_{\text{AMS}} = 0,0970$ . U usporedbi sa 1530 pokusa potrebnih za provedbu potpunog plana eksperimenta, upotrebom GA optimum procesa procijenjen je u samo devet pokusa.

Pri optimalnim uvjetima, procijenjenim genetskim algoritmom, provedena je kontinuirana ekstrakcija BSA u separatoru tipa mješač - taložnik.

Postavljen je matematički model procesa separacije modelne otopine proteina BSA u separatoru tipa mješač – taložnik te je provedena simulacija procesa. Konstanta brzine separacije proteina određena je iz odziva procesa na impulsnu pobudu. Usporedbom eksperimentalno dobivenih rezultata sa rezultatima simulacije procesa pomoću modela pokazana je primjenjivost modela.

Ključne riječi:

genetski algoritam

optimiranje

vodeni dvofazni sustav, polietilenglikol – voda – amonij sulfat

bovine serum albumin

separator tipa mješač – taložnik

matematički model procesa

## SUMMARY

Genetic algorithms are global, stochastic, research and optimization methods that imitate natural biological evolution. They act on the population of possible solutions imitating the basic principals of surviving in nature with purpose of evaluating the ones that are best adapted and fitted and on that way they contribute to development and achievement of the optimum solution in a problem domain.

In this work the optimization of the extraction process was carried out using the genetic algorithm of the extraction model solution (bovine serum albumin, BSA) and was performed in aqueous two phase system, containing PEG<sub>6000</sub> and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

In group of experiments that were performed in batch system the influences of pH, mass fraction of PEG<sub>6000</sub>, mass fraction of ammonium sulfate and the concentration of protein model solution on partition coefficient were investigated. The optimum partition coefficient was  $K = 0.0874$  and it was achieved under following process conditions pH = 5.5; concentration of protein model solution BSA,  $c_{BSA} = 1.5 \text{ mg cm}^{-3}$ ; mass fraction of PEG<sub>6000</sub>,  $w_{PEG} = 0.1138$  and mass fraction of ammonium sulfate,  $w_{AMS} = 0.0970$ . Considering the fact that 1530 experiments were needed for performance of full experimental plan, the optimum of the process was evaluated in only nine experiments using GA. Under the optimum process conditions, estimated by GA, the continuous extraction of BSA was carried out in separator mixer - settler.

The mathematical model of the separation process of model solution BSA was developed for continuous separator mixer – settler and the simulations of the process were performed. The separation rate constant was determinate from response of the process on the impuls excitation. Model applicability was shown comparing the experimental results with results from model simulations of the process.

Key words:

genetic algorithms

optimisation

aqueous two phase system, polyethylene glycol – aqua – ammonium sulfate

bovine serum albumin

separator mixer - settler

mathematical model of the process

*Neizmjerne se želim zahvaliti dr.sc. Bruni Zeliću na pruženoj pomoći, korisnim savjetima i iskazanoj pažnji tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem se i cjelokupnom Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu, posebice dr. sc. Đurđi Vasić – Rački i asistentima što su mi omogućili izvedbu eksperimentalnog dijela rada i pritom iskazali nesebičnu pomoć.*

*Zahvaljujem se djelatnicima Istraživačkog instituta Plive, a nadalje mr.sc Stjepanu Bogdanu na iskazanoj pomoći u izvedbi eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujem se i svim svojim prijateljima koji su samnom provodili studentske dane u studentskim klupama i izvan njih.*

*Na neiscrpoj potpori, razumjevanju i pomoći želim se zahvaliti Marku.*

*A, nadalje se želim najiskrenije zahvaliti mami i tati što su mi omogućili stjecanje fakultetskog obrazovanja i pritom nesebično pomagali i pružali neizmjernu potporu uz sva odricanja.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	4
<b>2.1 Genetski algoritam</b> .....	5
2.1.1 Razvoj genetskih algoritama.....	5
2.1.2 Genetski algoritam.....	6
2.1.3 Prikaz rješenja.....	7
2.1.4 Inicijalizacija i uvjet završetka.....	9
2.1.5 Funkcija usklađenosti.....	9
2.1.6 Selekcija.....	10
2.1.7 Analogija <i>roulette wheel parent selection</i> .....	12
2.1.8 Genetski operatori.....	13
2.1.8.1 <i>Križanje</i> .....	13
2.1.8.2 <i>Mutacija</i> .....	14
2.1.9 Parametri algoritma.....	15
2.1.10 Teorem sheme.....	16
2.1.11 Rad sa genetskim algoritmom.....	18
<b>2.2 Vodeni dvofazni sustavi</b> .....	20
2.2.1 Ravnoteža vodenih dvofaznih sustava.....	20
2.2.2 Raspodjela biološki aktivnih tvari u vodenom dvofaznom sustavu.....	23
2.2.3 Učinkovitost ekstrakcijskog procesa.....	24
2.2.4 Fizikalno - kemijski parametri sustava.....	27
2.2.5 Matematički model laboratorijskog separatora tipa mješač – taložnik.....	27
2.2.6 Učinkovitost laboratorijskog separatora.....	31
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	32
<b>3.1 Materijali</b> .....	33
3.1.1 Kemikalije.....	33
3.1.2 Otopine.....	33
3.1.3 Oprema.....	34
3.1.4 Separator tipa mješač – taložnik.....	34
<b>3.2 Metode</b> .....	36

3.2.1	Određivanje optimalnog koeficijenta raspodjele.....	36
3.2.2	Kontinuirana ekstrakcija u separatoru tipa mješač - taložnik.....	36
3.2.3	Određivanje koncentracije proteina.....	38
3.2.4	Obrada podataka.....	38
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Određivanje optimalnog koeficijenta raspodjele genetskim algoritmom.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Kontinuirana ekstrakcija u separatoru tipa mješač – taložnik.....</b>	<b>52</b>
4.2.1	Određivanje konstante brzine uspostave ravnoteže proteina BSA.....	52
4.2.2	Ocjena valjanosti modela.....	54
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>POPIS SIMBOLA I OZNAKA.....</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>PRILOG.....</b>	<b>71</b>



## **1. UVOD**

{ PAGE }

Razvoj biotehnologije i računalnih znanosti pridonijeli su napretku u bio - inženjerskom pristupu pri opisivanju složenih, nelinearnih i nestacionarnih bioloških procesa. U svrhu povećanja produktivnosti biotehnoloških procesa, odnosno ekonomičnosti bioseparacijskih procesa te što veće industrijske proizvodnje i komercijalizacije bioprodukata, na teoretska saznanja o biološkim fenomenima i na klasične matematičke metode nadovezale su se netradicionalne i inteligentne metode koje omogućuju optimiranje, projektiranje i kontrolu bioloških procesa. Tako se optimizacija uvjeta provedbe kontinuirane separacije bioprodukta ekstrakcijom u vodenom dvofaznom sustavu, u nedostatku teoretskih istraživanja i matematičkih modela koji bi bili prihvatljivi za predviđanje procesa ekstrakcije, može provesti pomoću genetskih algoritama<sup>1</sup>.

Genetski algoritmi spadaju u grupu heurističkih metoda optimiranja nastalih po uzoru na prirodne procese. U posljednjih tridesetak godina koliko postoje, privukli su mnogo pažnje i jedna su od najistraživanijih i najprimjenjivanijih metoda u području u kojem klasična matematika i računalna znanost ne uspijevaju zadovoljiti strogim zahtjevima za rješavanje i optimiranje sve složenijih problema i procesa.

Iako su genetski algoritmi razvijeni s idejom proučavanja fenomena prilagodbe u prirodi, te načina kako se mehanizmi prilagodbe mogu primijeniti na računalu, danas se koriste za rješavanje vrlo raznolikih problema. Osim osnovne namjene, numeričke optimizacije funkcija koje se ne mogu optimirati uobičajenim matematičkim metodama, danas se koriste u području strojnog učenja, u optimizaciji težinskih faktora neuronskih mreža, u biologiji za predviđanje strukture proteina, u ekonomiji za razvoj pregovaračkih strategija i nastanak ekonomskih tržišta, u medicini za modeliranje imunoloških sustava, u ekologiji, u psihologiji za rješavanje problematike zatvorenikove dileme, u razvijanju strategije igara itd<sup>8</sup>.

U odnosu na ostale optimizacijske metode glavne prednosti genetskog algoritma su u tome da ne postavlja prethodne zahtjeve na prostor rješenja (kontinuiranost prostora, postojanje derivacija i sl.), pokriva široke, složene i teško razumljive prostore stanja, te ne generira točke u prostoru rješenja na slučajan način već ispituje one točke koje imaju potencijal da budu ili da vode prema optimalnom rješenju. Osim toga brzo i lako se implementira i integrira s drugim metodama, a rezultati se mogu interpretirati (za razliku od neuronskih mreža).

Glavni nedostaci su mu da ne jamči optimalno rješenje u danom konačnom vremenu, ima slabu i nedovoljnu teoretsku podlogu, osjetljiv je na izbor parametara, te zahtjeva relativno veliku računalnu snagu.

Ekstrakcija u vodenim dvofaznim sustavima je separacijski proces koji se temelji na nejednolikoj raspodjeli biomolekula između dviju kapljevitih faza koje tvore polimer i anorganska sol otopljeni u vodi. Karakterizirana je ravnotežom kapljevine-kapljevine i procesima prijenosa tvari. Među najvažnijim i najprimjenjivijim vodenim dvofaznim sustavima su polietilenglikol(dextran) - voda - sol.

Vodeni dvofazni sustavi najčešće se primjenjuju za separaciju proteina iz stanica ili dijelova stanica, te za separaciju smjesa različitih proteina. Pogodni su i za izolaciju otopina proteina u velikim procesnim razmjerima. Jedan od razloga raširenosti i pogodnosti primjene vodenih dvofaznih sustava leži u jednostavnosti izvedbe procesa ekstrakcije i blagim uvjetima provedbe separacije. Osobito su pogodni za ekstrakciju spojeva velikih molekularnih masa, a kod separacije proteina, u usporedbi sa klasičnim otapalima, manja je mogućnost njihove denaturacije zbog manjih razlika u površinskoj napetosti i dielektričnim konstantama ekstraktne i rafinatne faze. Osim toga razdvajanje faza je brzo, upotrebljavaju se jeftine kemikalije, visok je stupanj iskorištenja ekstrahirane tvari, a vrlo je lako i provođenje kontinuirane ekstrakcije. Kako proces ekstrakcije u vodenim dvofaznim sustavima ne zahtjeva primjenu visokih temperatura i tlakova nisu potrebne posebne sigurnosne mjere za njenu provedbu<sup>2</sup>.

Osnovni nedostaci ekstrakcije u vodenom dvofaznom sustavu su prije svega složenost mehanizama raspodjele biološkog materijala, nedovoljan broj adekvatnih matematičkih modela za definiranje koeficijenta raspodjele, te niska produktivnost procesa.

U ovom radu provedeno je optimiranje procesa ekstrakcije modelne otopine proteina bovine serum albumina (BSA) u vodenom dvofaznom sustavu, PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pri čemu je istraživana utjecaj pH, masenog udjela PEG-a, masenog udjela amonij-sulfata i koncentracije modelne otopine BSA na koeficijent raspodjele. Koeficijent raspodjele je optimiran upotrebom genetskog algoritma.

Pri optimalnim uvjetima, procijenjenim genetskim algoritmom, provedena je kontinuirana separacija proteina BSA u separatoru tipa mješač – taložnik.

## **2. OPĆI DIO**

## 2.1 Genetski algoritam

### 2.1.1 Razvoj genetskih algoritama

Proučavajući evolucijske sustave, šezdesetih godina dvadesetog stoljeća nekolicina znanstvenika došla je na ideju da bi se evolucija mogla primijeniti kao optimizacijska metoda za inženjerske probleme. Ideja ovih pristupa bila je da se iterativno evoluiraju populacija (skup) potencijalnih rješenja određenog promatranog problema, koristeći operatore inspirirane prirodnim genetskim manipulacijama i prirodnom selekcijom.

Ranih 60-ih Rechenberg je predstavio metodu koju je nazvao "*evolucijske strategije*". Evolucijske strategije imaju puno zajedničkih osobina sa genetskim algoritmima. Obje metode provode definirane operacije nad populacijom rješenja i to se periodički ponavlja. Na sličnom principu temelji se i metoda nazvana "*simulirano kaljenje*". Po načinu djelovanja sve tri navedene metode ubrajaju se u metode usmjerenog slučajnog pretraživanja prostora rješenja (*guided random search techniques*) u potrazi za globalnim optimumom.

70-ih godina Holland je predstavio genetske algoritme koji su u odnosu na evolucijske strategije donijeli nekoliko značajnih prednosti. Prije svega koncept populacije koji se može sastojati i od više kromosoma, te operatore selekcije, križanja i mutacije, dok evolucijske strategije koriste samo mutacije kao glavni operator. Do danas genetski algoritmi su zbog svoje jednostavnosti privukli mnogo pažnje i jedna su od najistraživanijih i najprimjenjivijih optimizacijskih metoda. Međutim, analiza rada genetskih algoritama se temelji na složenim proračunima iz područja vjerojatnosti i statistike. Zbog nedovoljno kvalitetnih rezultata postignutih na području teoretskog istraživanja svojstva i principa rada, genetski algoritmi ostaju do danas u osnovi heurističke metode.

Najvažnija prednost genetskih algoritama je da su sposobni odrediti položaj globalnog optimuma u prostoru s više lokalnih ekstrema. Genetski algoritmi kao stohastička metoda nisu ovisni o nekoj početnoj točki i mogu svojim postupcima pretraživanja s nekom vjerojatnošću (ali ne sa apsolutnom sigurnošću i željenom preciznošću) locirati globalni optimum određene ciljane funkcije. Sigurnost dobivenih rezultata značajno se povećava postupkom ponavljanja procesa rješavanja.

S ciljem povećanja djelotvornosti genetskih algoritama, uz zadržavanje jednostavnosti izvedbe, do danas su se razvile različite implementacije genetskog algoritma kao što je primjerice, globalni paralelni genetski algoritam (GPGA). GPGA je jedna od strategija paralelizacije rada genetskih algoritama. Osnovna ideja je da se poslovi koje je moguće

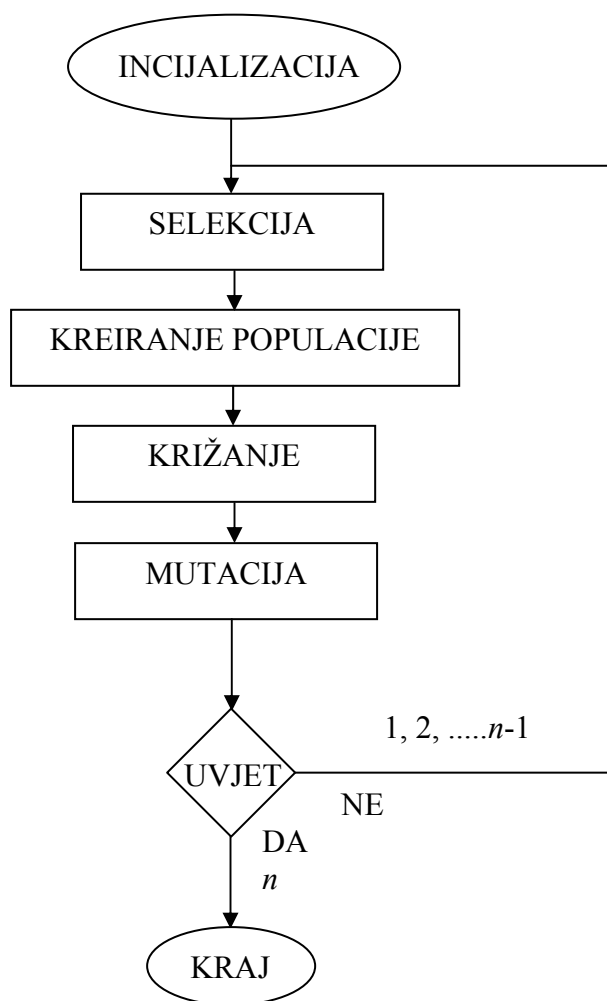
usporedno izvršavati raspodjele na nekoliko procesora, koje kontrolira i vodi jedan centralni procesor, koji ujedno izvršava zadatke koje nije moguće izvoditi paralelno.

### 2.1.2 Genetski algoritam

Genetski algoritmi<sup>3</sup> kao heurističke metode optimiranja nastali su oponašanjem prirodne biološke evolucije. Za razliku od evolucije GA je robustan proces pretraživanja prostora rješenja. Analogija evolucije kao prirodnog procesa i genetskog algoritma kao metode optimiranja, očituje se u procesu selekcije i genetskim operatorima (križanje i mutacija). Mehanizam odabira nad nekom individuum u evolucijskom procesu čine okolina i uvjeti u prirodi. U genetskim algoritmima selekcija je sadržana u funkciji cilja, koja na odgovarajući način predstavlja problem koji se rješava. U prirodi jedinka koja je najbolje prilagođena uvjetima i okolini u kojoj živi ima najveću vjerojatnost preživljavanja i reprodukcije, a time i prenošenja svoga genetskog materijala na potomke. U prirodi evolucija vrste nije potraga za rješenjem (jedinkom koja je najbolje prilagođena uvjetima u prirodi), već prilagođavanje postojeće populacije na nove uvjete. U genetskim algoritmima svaka individua predstavlja potencijalno rješenje problema koji se obrađuje pri čemu to može biti matematička funkcija, ali i plan rada neke tvrtke. Svaka je jedinka predstavljena u jednakom obliku (broj, niz, matrica itd.), a te jedinke se nazivaju kromosomi. Svakom rješenju pridjeljuje se određena mjera kvalitete (usklađenost, eng. *fitness*), dok se funkcija koja tu kvalitetu određuje naziva funkcija cilja ili funkcija usklađenosti (eng. *fitness function*). Iz prethodne (stare) populacije se formira nova populacija, izdvajanjem (selekcijom) prilagođenijih, odnosno boljih individua iz skupa postojećih. Neke individue nove populacije se podvrgavaju utjecajima genetskih operatora koji kreiraju nove individue kombinirajući osobine nekoliko jedinki. Takvim postupkom se postiže iz generacije u generaciju sve veća i veća prosječna dobrot (kvaliteta) populacije. Takav ciklus selekcije, reprodukcije i manipulacije genetskim materijalom individue se ponavlja dok nije zadovoljen uvjet zaustavljanja evolucijskog procesa, a najbolji član trenutne populacije predstavlja rješenje koje bi trebalo biti u blizini optimuma (slika 2.1). Stoga, za evolucijski proces kao i za genetski algoritam se može ustanoviti da:

- postoji populacija individua,
- neke individue su bolje (bolje su prilagođene okolini),
- bolje jedinke imaju veću vjerojatnost preživljavanja i reprodukcije,
- svojstva jedinki su zapisana u kromosomima s pomoću genetskog koda,
- potomci nasljeđuju svojstva roditelja,

- nad individuum može djelovati mutacija.



Slika 2.1 Struktura genetskog algoritma.

### 2.1.3 Prikaz rješenja

Prikaz rješenja može bitno utjecati na učinkovitost genetskog algoritma, pa je izbor prikaza veoma značajan. Podaci koji karakteriziraju individuu mogu biti pohranjeni na razne načine u jedan kromosom (realni broj, polje, raspored itd.). Jednostavni genetski algoritam koristi binarni prikaz, odnosno podaci su pohranjeni u obliku niza bitova koji čine jedan kromosom koji predstavlja moguće rješenje zadanog problema. Za odabrani način prikaza potrebno je definirati i genetske operatore, pri čemu je bitno da operatori ne stvaraju nove jedinke koje predstavljaju nemoguća rješenja, jer se time gubi na efikasnosti algoritma.

Kromosom se može prikazati kao binarni vektor sa kodiranom vrijednošću  $x \in [dg, gg]$ . U takav vektor moguće je zapisati  $2 \cdot n$  različitih kombinacija nula i jedinica, tj. moguće je zapisati bilo koji broj u intervalu  $[0, 2 \cdot n - 1]$ . Binarni vektor  $v(0) = [000\dots 0]$  predstavlja vrijednost  $x = dg$ , a vektor  $v(2 \cdot n - 1) = [111\dots 1]$  predstavlja vrijednost  $x = gg$ .

Općenito vrijedi za neki binarni broj  $b \in [0, 2^{n-1}]$  koji je zapisan kao binarni vektor  $v(b) = [B_{n-1}, B_{n-2}, \dots, B_1, B_0]$  gdje je  $B_i = 0$  ili  $1$ :

{ EMBED Equation.3 }

(2.1)

Primjerice za realni broj:  $x = 3$ :

$$3 = 0 \cdot 2^2 + 1 \cdot 2^1 + 1 \cdot 2^0$$

binarni zapis:  $v(b) = [0, 1, 1]$

za ekvivalentan realan broj:

{ EMBED Equation.3 }

(2.2)

gdje je:

$x$  – realni broj,

$b$  – binarni broj,

$dg$  – donja granica intervala,

$gg$  – gornja granica intervala,

$d = (dg - gg)$  – duljina intervala na kojem je definirana funkcija usklađenosti.

Kodiranje, odnosno određivanje binarnog broja  $b$  za neki realni broj  $x$  može se odrediti iz izraza (2.2) ako je poznata duljina kromosoma  $n$  i preciznost  $p$ :

{ EMBED Equation.3 }

(2.3)

Preciznost nekog realnog broja  $x$  pokazuje koliko  $x$  odstupa od točnog rješenja za maksimalno  $10^{-p}$ , odnosno može se reći da je rješenje  $x$  točno na  $p$  decimala. Duljina



kromosoma, odnosno broj bitova (broj nula i jedinica) određuje preciznost. Dekodiranje je proces pretvaranja binarnog broja u potencijalno rješenje.

### 2.1.4 Inicijalizacija i uvjet završetka

Pri inicijalizaciji genetskog algoritma kreira se početna populacija jedinki, pri čemu se kromosomi obično kreiraju slučajnim odabirom iz domene problema. Genetski algoritam se izvršava sve dok nije zadovoljen uvjet zaustavljanja (slika 2.1). Uvjet zaustavljanja se određuje ovisno o problemu koji se rješava i o uvjetima u kojima se problem rješava. Tako uvjet zaustavljanja može biti odstupanje od definiranog intervala pogreške, istek nekog vremenskog intervala, zadani broj generacija itd.

### 2.1.5 Funkcija usklađenosti (eng. *fitness function*)

Funkcija usklađenosti je funkcija ocjene kvalitete pojedine individue koja se još naziva *fitness* funkcija ili funkcija cilja. U najjednostavnijem slučaju ekvivalentna je funkciji  $f$  koju se optimira. Tada je funkcija usklađenosti definirana kao:

$$F(v) = f(x) \tag{2.4}$$

pri čemu je:

$f$  – funkcija koju treba optimirati, odnosno ispitna funkcija,

$v$  – binarni vektor koji predstavlja realni broj  $x \in [dg, gg]$ ,

$F$  – usklađenost.

Što je funkcija usklađenosti promatrane jedinice veća, individua ima veću vjerojatnost preživljavanja i križanja. Funkcija usklađenosti je ključ za proces selekcije budući ona treba vjerno opisivati domenu problema. U općenitom slučaju se na  $f$ -ju usklađenosti ne postavljaju ograničenja, mada je potrebno primijeniti određene transformacije kako bi se zadovoljili neki uvjeti koje može postavljati proces selekcije.

Postupak linearne transformacije (jednadžba 2.5) temelji se na vrednovanju individua po njihovoj usklađenosti, odnosno funkciji usklađenosti. Kromosom s najmanjom vrijednošću

$f(x_i)$  ima vrijednost usklađenosti  $\min F(v)$ , a sljedeći po veličini je  $\min F(v) + \text{korak}$  itd., pri čemu je veličina koraka zadani parametar algoritma.

$$F(v) = g(f(x)) \tag{2.5}$$

pri čemu je:

$g$  – operator koji transformira funkciju  $f$  u ne-negativan broj.

U "dobrom" genetskom algoritmu, kroz generacije ukupna (jednadžba 2.6) i prosječna (jednadžba 2.7) funkcija usklađenosti populacije rastu. Ukupna i prosječna funkcija usklađenosti populacije definirani su izrazima:

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \tag{2.6}$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \}$$

$$(2.7)$$

pri čemu je:

$F_u$  – ukupna funkcija usklađenosti populacije,

$\{ \text{EMBED Equation.3} \}$  – prosječna funkcija usklađenosti populacije,

$n$  – veličina populacije.

### 2.1.6 Selekcija

Osnovna svrha selekcije je čuvanje i prenošenje dobrih svojstava na sljedeću populaciju. Selekcijom se odabiru dobre jedinke koje će sudjelovati u reprodukciji, čime se dobar genetski materijal čuva i prenosi na sljedeću populaciju dok loš genetski materijal odumire. Pri tome je potrebno osigurati takav proces selekcije koji će i lošim individuama, koje mogu sadržavati i dobar genetski materijal, omogućiti da sudjeluju u reprodukciji kako proces selekcije ne bi rezultirao prebrzom konvergencijom algoritma u slučaju selekcije samo najboljih jedinki.

Genetske algoritme, s obzirom na vrstu selekcije, dijelimo na generacijske i eliminacijske. Kod generacijskog algoritma se procesom selekcije iz stare generacije stvara nova, a u slučaju eliminacijskog se praznina u populaciji nastala eliminacijom loših individua

popunjava novim jedinkama. U generacijske genetske algoritme ubrajaju se jednostavna selekcija (*roulette wheel parent selection*) i turnirska selekcija.

Jednostavna selekcija generira novu populaciju koja ima jednak broj jedinki kao i prethodna populacija. Cilj jednostavne selekcije je odabir roditelja čija je vjerojatnost selekcije proporcionalna njihovoj funkciji usklađenosti.

Postupak je sljedeći:

- ako  $f(x)$  poprima negativne vrijednosti, tada se dodaje pozitivna konstanta  $C$ ,

{ EMBED Equation.3 } (2.8)

tako da je  $F(v) \geq 0$ , za svaki  $x \in [dg, gg]$ .

- izračunaju se sve vrijednosti funkcija usklađenosti  $F(v_i)$ ,

- izračuna se ukupna funkcija usklađenosti populacije prema jednadžbi (2.6),

- izračunaju se kumulativne funkcije usklađenosti  $q_k$  (jednadžba 2.9) za svaki kromosom tako da vjerojatnost za svaki kromosom  $v_k$  iznosi  $p_k$  (jednadžba 2.10):

{ EMBED Equation.3 }  $k = 1, 2, \dots, n$  (2.9)

{ EMBED Equation.3 }

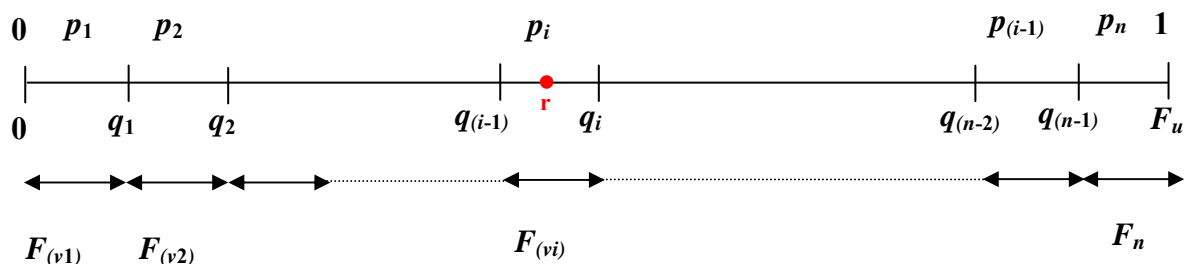
(2.10)

Time se dobiva da je vjerojatnost selekcije,  $p_k$ , proporcionalna funkciji usklađenosti kromosoma,  $v_k$ , (jednadžba 2.11):

{ EMBED Equation.3 }

(2.11)

Ako se unutar intervala  $[0, F_u]$  nasumičnim odabirom izabere slučajni realni broj,  $r$ , koji pripada kromosomu,  $r \in [q_{i-1}, q_i]$ , tada se taj kromosom prenosi u sljedeću populaciju (slika 2.2).

Slika 2.2 Kumulativna usklađenost  $q_i$  i vjerojatnost selekcije  $p_i$ .

Što je funkcija usklađenosti kromosoma veća, kromosom (individua) ima veću vjerojatnost preživljavanja i križanja, te pojavljivanja u sljedećim generacijama.

Nedostaci jednostavne selekcije su:

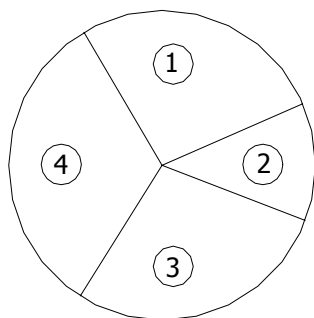
- funkcija  $f(x)$  ne smije poprimiti negativne vrijednosti, što se može riješiti transformacijama funkcije,
- ako funkcija  $f(x)$  poprima velike vrijednosti za svaki  $x$ , prilikom selekcije svi kromosomi imati će jednaku vjerojatnost pojavljivanja u sljedećoj populaciji (svi su podjednako dobri i loši),
- pojavljivanje duplikata kromosoma što usporava algoritam.

### 2.1.7 Analogija *roulette wheel parent selection*

Jedna od metoda selekcije kojom se odabiru jedinke koje će sudjelovati u reprodukciji i na taj način omogućiti očuvanje i prenošenje dobrih svojstava na sljedeću populaciju jest *roulette wheel parent selection*<sup>4</sup>.

Primjerice neka se sa  $Sum$  označi neki realni interval, koji može biti izražen kao suma funkcija usklađenosti individua ili kao suma vjerojatnosti selekcije individua. Tada se svaka individua unosi u interval u području  $[0, Sum]$ . Segment intervala kojeg će svaka individua zauzeti proporcionalna je veličini funkcije usklađenosti ili vjerojatnosti selekcije individue. Što je veći segment intervala kojeg individua zauzima, odnosno što je veća funkcija usklađenosti ili vjerojatnost selekcije individue, to je veća i vjerojatnost da će individua biti izabrana, odnosno da će pri nasumičnom odabiranju brojeva iz intervala  $[0, Sum]$  upravo biti

odabran neki realni broj koji leži u dijelu segmenta intervala kojeg zauzima promatrana individua (slika 2.3).



{ EMBED Equation.3 }

Slika 2.3 Pojednostavljeni prikaz *roulette wheel parent selection*.

### 2.1.8 Genetski operatori

U reprodukciji sudjeluju tzv. dobre individue koje su preživjele proces selekcije. Reprodukcija je razmnožavanje s pomoću genetskih operatora križanja i mutacije.

#### 2.1.8.1 Križanje

Križanje je binarni genetski operator u kojem sudjeluju dvije individue koje se nazivaju roditelji, a njihovim križanjem nastaje jedna ili dvije nove individue koje se nazivaju djeca. Djeca nasljeđuju svojstva svojih roditelja. Ako su roditelji dobri (prošli proces selekcije) tada će i dijete biti dobro, ako ne i bolje od svojih roditelja. Križanje može biti definirano s proizvoljnim brojem prekidnih točaka pri čemu jednostavni genetski algoritam koristi križanje s jednom točkom prekida kao što je prikazano na slici 2.4.

Pri križanju s jednom točkom prekida slučajno se odabere jedna točka prekida unutar kromosoma, te se sadržaji roditeljskih kromosoma zamijene. Time se dobivaju dva potomka.

Roditelji:

↗ točka prekida

1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1
0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0

Djeca:

1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1

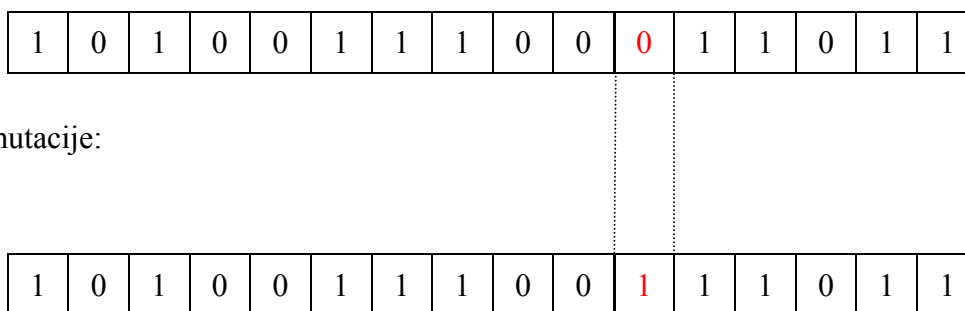
Slika 2.4 Binarni operator križanja s jednom točkom prekida.

Postoji još nekoliko varijanti križanja: uniformno, segmentno i miješajuće križanje, koji mogu imati pozicijsku ili distribucijsku sklonost operatora križanja, ovisno o tome da li zamjena bitova ovisi o poziciji ili broju zamijenjenih bitova. Operator križanja je genetski operator koji razlikuje genetski algoritam od ostalih metoda optimiranja (evolucijske strategije, simulirano kaljenje). Vjerojatnost križanja predstavlja vjerojatnost da dijete naslijedi svojstva jednog roditelja.

### 2.1.8.2 Mutacija

Mutacija je drugi genetski operator koji djeluje na individue tijekom reprodukcije. Djeluje na jednu individuu i temelji se na slučajnoj promjeni jednog ili više gena. Najjednostavniji oblik mutacije je jednostavna mutacija koja u slučajno odabranom kromosomu invertira jedan slučajno odabrani bit (slika 2.5).

Prije mutacije:



Slika 2.5 Binarni operator mutacije.

Osim jednostavne mutacije postoje još i različite druge vrste mutacija: miješajuća, invertirajuća itd. Miješajuća mutacija odabire kromosom i dvije pozicije između kojih se izmiješa ili invertira gene. Krajnji slučaj je potpuna miješajuća mutacija gdje se miješaju svi geni u kromosomu.

Osnovna uloga operatora mutacije je da se koristi pri pretraživanju prostora rješenja kao mehanizam za izbjegavanje lokalnih minimuma i u obnavljanju izgubljenog genetskog materijala, čime se proširuje prostor rješenja koji se pretražuje.

Vjerojatnost mutacije mora biti u intervalu  $[0, 1]$ . Ako vjerojatnost mutacije teži k jedinici, tada se genetski algoritam pretvara u postupak slučajne pretrage prostora rješenja, a ako vjerojatnost mutacije teži k nuli postoji vjerojatnost da će genetski algoritam stati u nekom lokalnom optimumu.

### 2.1.9 Parametri algoritma

Osnovni parametri genetskog algoritma su: veličina populacije, broj generacija ili iteracija, vjerojatnost križanja i vjerojatnost mutacije. Za različite vrijednosti parametara algoritama, genetski algoritam daje različite rezultate, te brže ili sporije dolazi do boljeg ili lošijeg rješenja. Optimiranje parametara genetskog algoritma je složen postupak i zahtjeva izvođenje velikog broja eksperimenata. Kako bi se riješio ovaj složen problem optimiranja parametara, može se realizirati tzv. genetski algoritam nad genetskim algoritmom.

Za optimiranje višedimenzijских funkcija, genetski algoritmi trebaju posjedovati dvije važne karakteristike. Prva je sposobnost konvergiranja k optimumu, lokalnom ili globalnom, nakon pronalaženja područja u kojem se isti nalazi. Druga je karakteristika sposobnost da se konstantno istražuju nova područja problemskog prostora u potrazi za globalnim optimumom.

### 2.1.10 Teorem sheme

Teorijske osnove genetskog algoritma (teorem sheme i hipoteze blokova)<sup>5</sup> odnose se na genetski algoritam s binarnim prikazom. Da bi vrijedili teorem sheme i hipoteze blokova, potrebno je zadovoljiti slijedeće pretpostavke:

- populacija je neograničena,
- funkcija usklađenosti vjerno odražava problem,
- geni u kromosomu su međusobno nezavisni.

Shema je uzorak ili skup rješenja koja su međusobno slična. Sličnost se odnosi na jednakost gena na pojedinim mjestima kromosoma. Ostali geni mogu biti ili isti ili različiti, a možemo ih označiti oznakom "\*" koja predstavlja bilo koji znak.

Primjerice shema \*101\*1 predstavlja skup od četiri rješenja:

010101  
010111  
110101  
110111

Ako je kromosom duljine  $n$ , a shema sadrži  $r$  znakova "\*", ukupan broj shema kod binarnog prikaza rješenja iznosi  $3^r$ , jer jedan znak sheme može biti "\*", "0" ili "1".

Red sheme  $H$ ,  $o(H)$ , (jednadžba 2.12) je broj nepromjenjivih (fiksni) gena, odnosno broj svih onih znakova sheme  $H$  koji nisu "\*":

$$o(H) = n - r \tag{2.12}$$

Primjerice:

$$o(*1*001) = 4$$

$$o(****11****) = 2$$

Definirana dužina sheme ili definirajući razmak,  $\delta(H)$ , je udaljenost između prve i zadnje nepromjenjive znamenke.

Primjerice:



$$\delta(*01110011*) = 9-2 = 7$$

$$\delta(10**0) = 5-1 = 4$$

Prema teoremu sheme broj jedinki koje sadrže shemu niskog reda, kratke definirane dužine i natprosječne dobrote raste eksponencijalno (jednadžba 2.13).

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.13)$$

gdje su:

$m(H, t)$  - očekivani broj jedinki koje su podskup sheme  $H$  u generaciji  $t$ ,

{ EMBED Equation.3 } - prosječna usklađenost sheme,

{ EMBED Equation.3 } - prosječna usklađenost populacije,

$\delta(H)$  - definirana dužina sheme  $H$ ,

$o(H)$  - red sheme  $H$ ,

$p_c$  - vjerojatnost križanja,

$p_m$  - vjerojatnost mutacije,

$n$  - dužina kromosoma.

Vjerojatnost gubitka sheme zbog operatora križanja,  $p_{gc}$ , iznosi:

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.14)$$

Slučajnim odabirom točke prekida shema  $H$  ostaje sačuvana. Vjerojatnost gubitka sheme zbog mutacije,  $p_{gm}$ , iznosi:

$$p_{gm} = o(H) \cdot p_m \quad (2.15)$$

Hipoteza građevnih blokova može se predstaviti kao natjecanje između shema gdje kratke sheme niskog reda s natprosječnom usklađenošću pobjeđuju, pri čemu algoritam dolazi do rješenja sastavljajući i nizajući takve sheme.

### 2.1.11 Rad sa genetskim algoritmom

Za određeni optimizacijski problem koji želimo riješiti pomoću genetskog algoritma potrebno je odrediti:

- funkciju usklađenosti,
- selekciju (jednostavnu, turnirsku, eliminacijsku,...),
- predstavljanje (binarno, s bazom većom od 2,...),
- definirati uvjet završetka evolucijskog procesa (vrijeme, broj generacija,...),
- generacijski procjep (broj jedinki koje se direktno prenosi iz generacije u generaciju),
- genetske operatore,
  - križanje (s jednom ili više točaka prekida, ili posebno definirano),
  - mutaciju (jednostavna, mješajuća,...),
  - zamjenu gena.
- parametre,
  - veličinu populacije,
  - vjerojatnost križanja,
  - vjerojatnost mutacije.

Prilikom izbora genetskog algoritma kao optimizacijske tehnike potrebno je uzeti u obzir njegove brojne prednosti u odnosu na druge metode, primjerice:

- funkcija koju treba optimirati potpuno je proizvoljna tj. nema posebnih zahtjeva kao što su neprekinutost, derivabilnost, itd.,
- primjenjiv na veliki broj problema,
- struktura algoritma nudi velike mogućnosti nadogradnje i povećanja efikasnosti algoritma jednostavnim zahvatima (puno stupnjeva slobode),
- jednostavnim ponavljanjem postupka može se povećati pouzdanost rezultata,
- ako ne nađe rješenje (globalni optimum), daje nekakvo "dobro" rješenje koje može zadovoljiti,
- rezultat je skup rješenja, a ne jedno rješenje,
- rješava sve probleme koje se mogu predstaviti kao optimizacijski, bez obzira da li funkcija koju treba optimirati ima za argumente realne brojeve, bitove, znakove ili bilo koju vrstu informacije,
- jednostavna primjena na višemodalnim (višedimenzijским) problemima,

- jednostavnost ideje i dostupnost programske podrške.

Kao i sve druge optimizacijske tehnike postoje i slučajevi kada genetski algoritam treba izbjegavati, primjerice:

- teško se definira "dobra" funkcija usklađenosti na temelju  $f$ ,
- potrebno je prilagoditi genetski algoritam zadanim ograničenjima,
- česta potreba prilagodbe problema algoritmu,
- teško je postaviti "dobre" parametre (veliki utjecaj parametra na efikasnost),
- ne može se postići 100 %-tna pouzdanost rješenja,
- konvergencija je znatno sporija u odnosu na ostale numeričke metode,
- potrebno je posebno definirati genetske operatore za posebne vrste prikaza,
- zbog stohastičnosti nikad ne znamo prirodu nađenog rješenja,
- zbog izvođenja velikog broja računskih operacija genetski algoritam je spor, te se traži velika procesorska snaga.

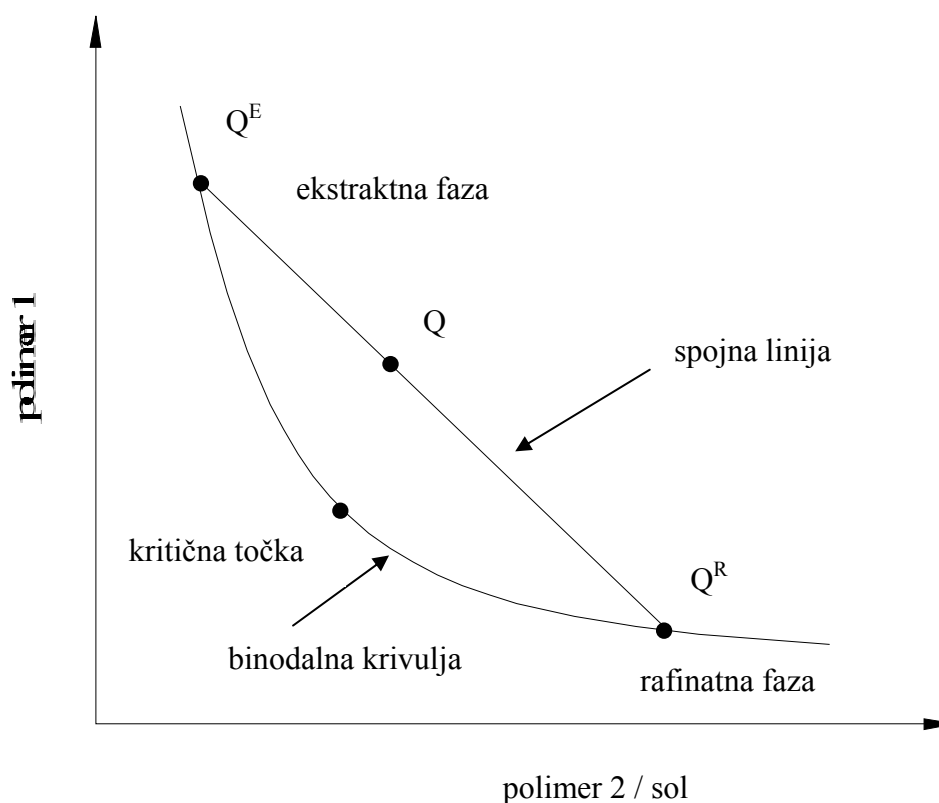
## 2.2 Vodeni dvofazni sustavi

Vodeni dvofazni sustavi<sup>2</sup> nastaju miješanjem vodenih otopina prirodnih ili sintetskih hidrofilnih polimera međusobno ili s vodenim otopinama soli. U svakoj od faza veliki je sadržaj vode (oko 75 %). Do danas je proučavan veliki broj vodenih dvofaznih sustava različitih sastava među kojima su najvažniji:

- dextran - voda - polietilenglikol,
- polietilenglikol - voda - sol  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ .

### 2.2.1 Ravnoteža vodenih dvofaznih sustava

Sastavi vodenih dvofaznih sustava se prikazuju ravnotežnim dijagramima. Na apcisi se prikazuje koncentracija polimera ili soli, a na ordinati koncentracija drugog polimera. Područje miješljivosti i nemiješljivosti, odnosno homogeno i heterogeno područje su međusobno odijeljeni binodalnom krivuljom. U heterogenom području otopina čiji se sastav može prikazati točkom Q, se raslojava na dvije faze, ekstraktnu ( $Q^E$ ) i rafinatnu fazu ( $Q^R$ ) (slika 2.6).



Slika 2.6 Pojednostavljeni prikaz ravnotežnog dijagrama.

Pravac koji povezuje točke  $Q^E$  i  $Q^R$  se naziva spojna linija. Spojna linija se može opisati jednadžbom pravca koji prolazi kroz dvije točke ( $Q^E$ ,  $Q^R$ ), a određena je njegovim nagibom ( $k$ ) i duljinom ( $TLL$ , *tie line length*).

Ako se spojna linija opiše jednadžbom pravca:

{ EMBED Equation.3 }

(2.16)

tada je duljina tog pravca dana izrazom:

{ EMBED Equation.3 }

(2.17)

Sređivanjem izraza (2.17) i uvrštavanjem izraza (2.18) koji definira nagib spojne linije:

{ EMBED Equation.3 }

(2.18)

slijedi da je:

{ EMBED Equation.3 }

(2.19)

pri čemu su:

$k$  – koeficijent smjera pravca,

$l$  – odsječak pravca na  $y$  - osi,

$y$  – ordinata koja odgovara koncentraciji polimera 1,

$x$  – apcisa koja odgovara koncentraciji soli (polimera 2),

$TLL$  – duljina spojne linije.

Sastavi faza u ravnoteži su dani sjecištima spojnih linija s binodalnom krivuljom. Svaki dvofazni sustav koji se može prikazati točkom na spojnoj liniji uvijek se raslojava na ekstrakt i rafinat istog sastava, ali je omjer volumena ekstraktne i rafinatne faze različit, i ovisi o omjeru dužina { EMBED Equation.3 } i { EMBED Equation.3 }.

Binodalna krivulja može biti opisana nekom matematičkom funkcijom i to onom koja može vjerodostojno opisati ravnotežu vodenog dvofaznog sustava u nekom određenom

području sastava. Tako se ravnoteža vodenog dvofaznog sustava, PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, može opisati eksponencijalnom matematičkom funkcijom oblika:

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.20)$$

sa parametrima:

$$A = 0,664$$

$$B = -15,224$$

$$C = 75,499$$

Funkcija je valjana za opisivanje termodinamičke ravnoteže sustava PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pri temperaturi 20 °C i u području ravnotežnih koncentracija predodređenih u tablici 2.1, odnosno u području duljina spojnih linija [ $0 < TLL < 51$ ] pri čemu je koeficijent smjera spojnih linija  $k = -2,21$ .

Tablica 2.1 Područja ravnotežnih koncentracije PEG-a i amonij- sulfata u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi unutar kojih je binodalna krivulja vjerodostojna za opisivanje termodinamičke ravnoteže pri temperaturi 20 °C.

Rafinatna faza		Ekstraktna faza	
$w_{AMS}^*$	$w_{PEG}^*$	$w_{AMS}^*$	$w_{PEG}^*$
$0,0937 < w^* < 0,2324$	$0,0817 < w^* < 0,00065$	$0,0937 < w^* < 0,0225$	$0,0817 < w^* < 0,4643$

Termodinamička ravnoteža vodenih dvofaznih sustava se može opisati i termodinamičkim modelima kao što su primjerice NRTL i UNIQUAC. Termodinamički modeli vodenih dvofaznih sustava opisuju promjene u sastavu faza uzimajući u obzir promjenu temperature, koncentracije komponenata, molekularne mase polimera, raspodjelu jedne ili više komponenata između faza, pH i ionsku jakost otopine na raspodjelu ekstrahirane komponente.

Raspodjela tvari između faza može se izraziti preko koeficijenta raspodjele,  $K$ , (jednadžba 2.21):

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.21)$$

pri čemu je:

$c^E$  – ravnotežna koncentracija tvari u ekstraktu,

$c^R$  – ravnotežna koncentracija tvari u rafinatu.

Pri izboru vodenog dvofaznog sustava potrebno je voditi računa da koeficijent raspodjele bude što manji ( $\ll 1$ ) ili što veći ( $\gg 1$ ), ali različit od 1, pri čemu primjerice većina enzima ima koeficijent raspodjele veći od 1.

### 2.2.2 Raspodjela biološki aktivnih tvari u vodenim dvofaznim sustavima

Na raspodjelu biološki aktivnih tvari u vodenim dvofaznim sustavima utječe veliki broj parametara koji se mogu podijeliti na parametre koji su uvjetovani sustavom, i tzv. slobodne parametre. Parametri koji su uvjetovani sustavom su:

- vrsta polimera koji tvori dvofazni sustav,
- koncentracija polimera,
- molekularna masa polimera,
- raspodjela molekularnih masa polimera.

dok su slobodni parametri:

- ionska jakost,
- temperatura,
- pH.

Utjecaj vrste polimera koji tvori dvofazni sustav je najistraživaniji parametar, a najistraživaniji sustav je PEG – dextran.

Pri istraživanjima učinka molekulske mase polimera u sustavima PEG – H<sub>2</sub>O - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utvrđeno je da se porastom molekularne mase PEG-a položaj binodalne krivulje pomiče u područje nižih koncentracija, dok nagib spojnih linija ostaje konstantan.

Prisutnost pH koja određuje neto električni naboj biomolekula, interakcije biomolekula i soli te ionska jakost utječu na električni potencijal među fazama koji je posljedica prisutnosti nabijenih čestica u dvofaznom sustavu pa su pojedine faze pozitivno ili negativno nabijene. Utjecaj elektrokemijske potencijalne razlike između dviju faza i neto naboja biomolekule na koeficijent raspodjele dani su izrazom (jednažba 2.22)<sup>6</sup>:

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.22)$$

pri čemu je:

$K_0$  – vrijednost koeficijenta raspodjele pri  $\Delta\Phi = 0$  [-],

$F$  – Faraday-eva konstanta [ $\text{C mol}^{-1}$ ],

$z$  – nabojni broj biomolekule [-],

$T$  – temperatura [K],

$R$  – plinska konstanta [ $[\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}]$ ]

$\Delta\Phi$  – razlika potencijala [V].

### 2.2.3 Učinkovitost ekstrakcijskog procesa

Osim koeficijenta raspodjele (jednadžba 2.21) učinkovitost ekstrakcijskog procesa može se iskazati i preko učinkovitosti faze ekstrakta i faze rafinata. Učinkovitost,  $\gamma$ , u fazi ekstrakta definirano je kao (jednadžba 2.23):

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.23)$$

a u fazi rafinata kao (jednadžba 2.24):

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.24)$$

pri čemu je:

$V^E$  – volumen ekstraktne faze,

$V^R$  – volumen rafinatne faze,

$\gamma$  - učinkovitost pojedine faze [-].

Na slikama 2.7 i 2.8 prikazan je utjecaj koeficijenta raspodjele i omjera volumena ekstraktne i rafinatne faze na učinkovitost u ekstraktnoj fazi i rafinatnoj fazi.

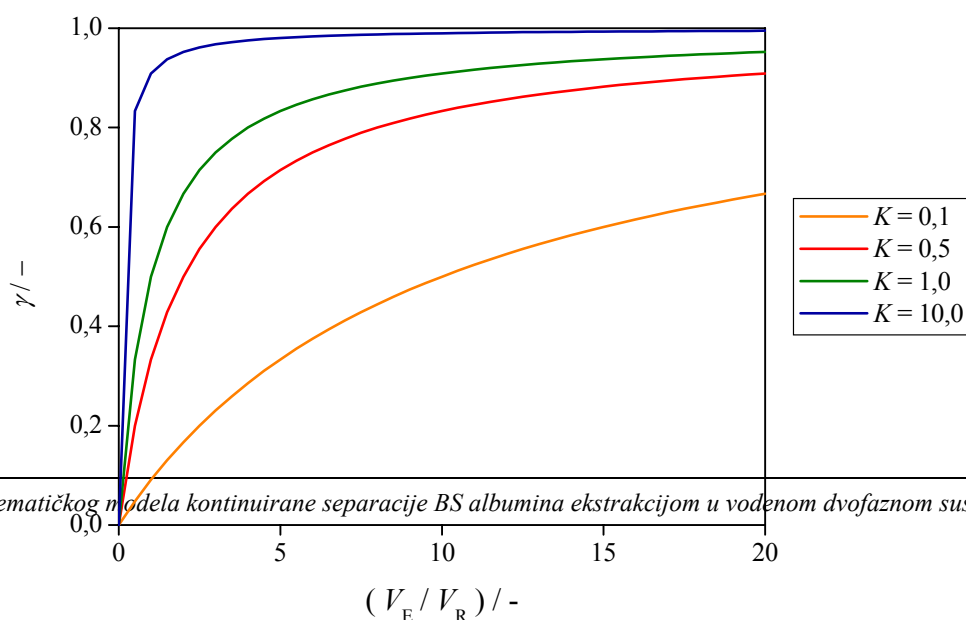
U vodenom dvofaznom sustavu, nakon uspostave ravnoteže, biološka tvar se raspodjeljuje između dvije faze ovisno o afinitetu prema pojedinoj fazi, pri čemu se može



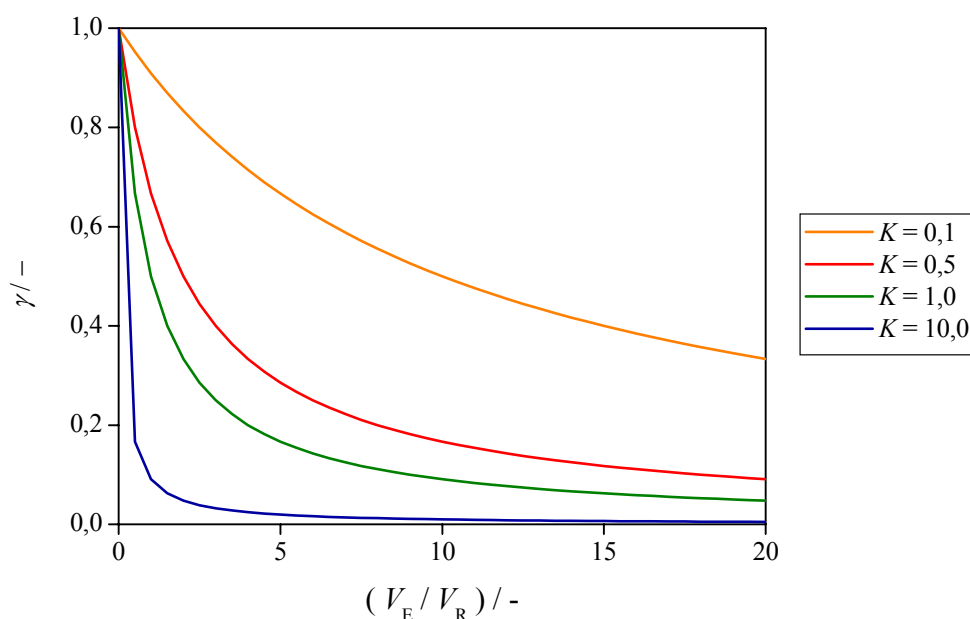
pretpostaviti da prisutnost biološke tvari ne utječe na ravnotežu vodenog dvofaznog sustava, odnosno da je omjer volumena ekstraktne i rafinatne faze neovisna o koncentraciji biološke tvari. Pokazatelj afiniteta biološke tvari u sustavu je koeficijent raspodjele. Kako bi proces ekstrakcije biološke tvari u vodenom dvofaznom sustavu bio ekonomičniji, potrebno je povećati koncentraciju te tvari u fazi u kojoj se ona ekstrahira, a to se može jednostavno postići smanjenjem volumena te faze, odnosno promjenom sastava vodenog dvofaznog sustava i to pomicanjem točke sastava na spojnoj liniji prema onim vrijednostima pri kojima će se ostvariti maksimalna učinkovitost faze. Promjenom koncentracije tvari u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi, koeficijent raspodjele može poprimiti vrijednosti koje su manje ili veće od 1 ovisno o fazi u kojoj se biološka tvar ekstrahira.

Ukoliko se biološka tvar pretežno nakuplja u ekstraktnoj fazi, a koeficijent raspodjele, pri smanjenju volumena ekstraktne faze, teži prema vrijednostima većim od 1, da bi se postigla maksimalna učinkovitost faze potrebno je primjeniti sustav takvog sastava pri kojem će vrijednost omjera volumena ekstraktne i rafinatne faze biti što manja. Za manje koeficijente raspodjele, učinkovitost raste povećanjem vrijednosti omjera volumena faza (slika 2.7).

Ukoliko se biološka tvar pretežno nakuplja u rafinatnoj fazi, a koeficijent raspodjele, pri smanjenju volumena rafinatne faze, teži prema vrijednostima manjim od 1, da bi se postigla maksimalna učinkovitost faze potrebno je primjeniti sustav takvog sastava pri kojem će vrijednost omjera volumena ekstraktne i rafinatne faze biti što manja. Za veće vrijednosti koeficijenta raspodjele, učinkovitost raste smanjenjem vrijednosti omjera volumena faza (slika 2.8).



Slika 2.7 Utjecaj koeficijenta raspodjele i omjera volumena faza na učinkovitost u ekstraktnoj fazi.



Slika 2.8 Utjecaj koeficijenta raspodjele i omjera volumena faza na učinkovitost u rafinatnoj fazi.

#### 2.2.4 Fizikalno - kemijski parametri sustava

Na primjenu vodenih dvofaznih sustava za ekstrakciju biološki aktivnih tvari utječu i neka fizikalno - kemijska obilježja sustava. Osnovno obilježje ovakvih sustava je relativno malena razlika u gustoći faza, gotova zanemariva međupovršinska napetost što omogućuje lako izmješavanje komponenata od kojih se sustav sastoji, te njihovo disperziranje, kako bi se postigla ravnoteža i raspodjela bioloških aktivnih tvari.

Također, prije nego li se neki vodeni dvofazni sustav primjeni u ekstrakcijskom procesu potrebno je poznavati njegove ravnotežne značajke, odnosno sastave i volumene faza nakon uspostave fazne ravnoteže.

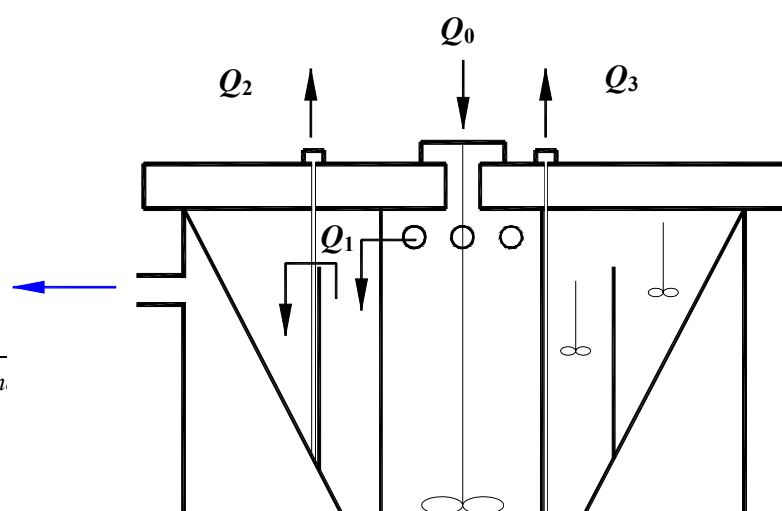
Separacija kapljeviti faza vodenog dvofaznog sustava može se provoditi u gravitacijskim ili centrifugalnim separatorima. Na izbor separatora i vrijeme separiranja utječu fizikalno - kemijski parametri sustava (razlike u gustoći kapljeviti faza, njihova viskoznost, međupovršinska napetost, svojstva biološkog materijala itd.).

### 2.2.5 Matematički model laboratorijskog separatora tipa mješač – taložnik

Za ekstrakciju proteina BSA u vodenom dvofaznom sustavu PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> primijenjen je laboratorijski separator tipa mješač – taložnik (slika 2.9). Poznavajući ravnotežne i kinetičke značajke vodenog dvofaznog sustava, geometriju laboratorijskog separatora i shemu procesnih tokova, postavljen je matematički model procesa uzimajući u obzir sljedeće pretpostavke:

- u sekciji mješača vlada režim idealnog miješanja,
- u odjeljcima taložnika svaka je faza zasebno idealno miješana.

Za svaku sekciju separatora tipa mješač – taložnik postavljene su ukupne bilance tvari, bilance tvari za PEG<sub>6000</sub>, bilance tvari za amonij – sulfat i bilance tvari za BSA.



Slika 2.9 Shematski prikaz separatora tipa mješač – taložnik.

Ukupna bilanca tvari (jednadžba 2.25), bilanca tvari za PEG<sub>6000</sub> (jednadžba 2.26), bilanca tvari za amonij – sulfat (jednadžba 2.27) i bilanca tvari za BSA (jednadžba 2.28) u sekciji mješača dane su sljedećim jednadžbama:

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.25)$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.26)$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.27)$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.28)$$

Ukupne bilance tvari (jednadžba 2.29 i 2.30), bilance tvari za PEG<sub>6000</sub> (jednadžba 2.31 i 2.33), bilance tvari za amonij – sulfat (jednadžba 2.32 i 2.34) i bilance tvari za BSA (jednadžba 2.35 i 2.36) u sekciji taložnika, odnosno u odjeljku u kojem se nakuplja ekstraktna faza i u odjeljku u kojem se nakuplja rafinatna faza dane su kao:

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.29)$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.30)$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.31)$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.32)$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.33)$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.34)$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.35)$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.36)$$

pri čemu je:

$Q$  – protok [ $\text{kg min}^{-1}$ ],

$m$  – masa [kg],

$w$  – maseni udio [-],

$k$  – konstanta brzine uspostave ravnoteže [ $\text{min}^{-1}$ ],

$t$  – vrijeme [min].

Brzina promjene koncentracije PEG-a u ekstraktnoj fazi definirana je izrazom:

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.37)$$

a u rafinatnoj fazi:

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.38)$$

dok za brzinu promjene koncentracije amonij - sulfata u rafinatnoj (jednadžba 2.39), odnosno u ekstraktnoj fazi (jednadžbi 2.40) vrijedi:

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.39)$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (2.40)$$

Za sustav PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konstante brzine uspostave ravnoteže,  $k_1$  i  $k_2$ , (tablica 2.2) preuzete su iz literature na temelju eksperimentalnih istraživanja drugih autora<sup>2</sup>. Konstante brzine uspostave ravnoteže su izračunate na temelju izmjerenih vrijednosti koncentracija PEG-a u ekstraktnoj fazi i amonij - sulfata u rafinatnoj fazi u kotlastom sustavu pri 20 °C.

Tablica 2.2 Procijenjene konstante brzine uspostave ravnoteže za PEG,  $k_1$  i za amonij - sulfat,  $k_2$ .

$k_1 / \text{min}^{-1}$	0,2365
$k_2 / \text{min}^{-1}$	0,2349

Konstanta brzine uspostave ravnoteže proteina BSA u vodenom dvofaznom sustavu PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  $k_3$ , određena je tijekom eksperimentalnih mjerenja koja su obuhvaćena ovim radom (poglavlje 4).

### 2.2.6 Učinkovitost laboratorijskog separatora

Učinkovitost separatora,  $\eta$ , izražena je kao omjer separacije ostvarene tijekom kontinuirane ekstrakcije i maksimalno moguće separacije izračunate na temelju matematičkog modela separatora.

{ EMBED Equation.3 }

(2.41)

pri čemu je:

$\eta$  – učinkovitost [-].

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

U ovom radu proveden je proces ekstrakcije u vodenom dvofaznom sustavu u svrhu ekstrakcije otopine proteina BS albumina, kao modelne otopine. Primijenjen je vodeni dvofazni sustav PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. U seriji eksperimenata provedenih u kotlastom sustavu, pri 20 °C, istraživana je utjecaj pH, koncentracije PEG-a, koncentracije amonij - sulfata i koncentracije proteina na koeficijent raspodjele u izabranom vodenom dvofaznom sustavu. Koeficijent raspodjele navedenog proteina u svakoj generaciji izračunavat je prema jednadžbi 2.21. Koncentracija proteina u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi mjerena je spektrofotometrijski. Koeficijent raspodjele optimiran je upotrebom genetskog algoritma kroz pet generacija.

Pri optimalnim uvjetima, određenim genetskim algoritmom, pH,  $c_{BSA}$ ,  $w_{PEG}$ ,  $w_{AMS}$ , provedena je kontinuirana ekstrakcija proteina BSA u izabranom vodenom dvofaznom sustavu u separatoru tipa mješač – taložnik pri različitim protocima. Cilj provedenih eksperimenata bio je postizanje maksimalne učinkovitosti procesa.

## 3.1 Materijali

### 3.1.1 Kemikalije

Tijekom provedbe pokusa korištene su sljedeće kemikalije:

- natrij-klorid, NaCl, (*Merck*),
- bovine serum albumin, BSA, (*Pliva*),
- amonij-sulfat, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (*Merck*),
- polietilenglikol, PEG<sub>6000</sub>, HO(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>H, (*Merck*),
- kalij-hidrogenfosfat, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (*Merck*),
- kalij-dihidrogenfosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (*Kemika*).

### 3.1.2 Otopine

Za izvedbu eksperimentalnog djela rada su upotrebljene sljedeće otopine:

- vodena otopina amonij - sulfata koncentracije 0,4 g cm<sup>-3</sup>,
- vodena otopina polietilenglikola koncentracije 0,4 g cm<sup>-3</sup>,
- fiziološka otopina (0,9 % NaCl) BSA-a koncentracije 10 mg cm<sup>-3</sup>,
- vodena otopine pufera, pH = 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5.<sup>14</sup>

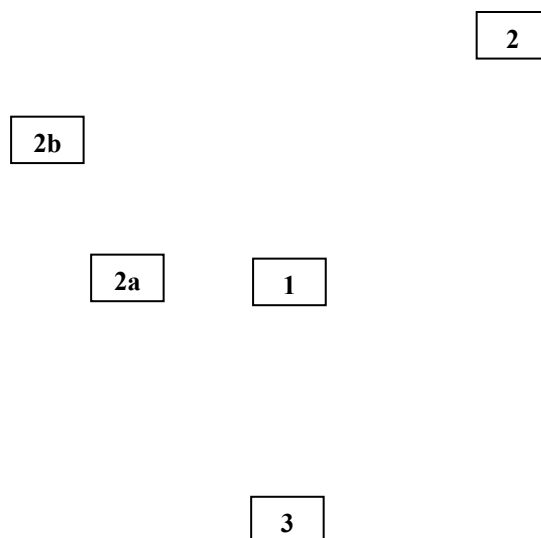


#### 3.1.3 Oprema

Za provedbu procesa ekstrakcije u vodenom dvofaznom sustavu korištena je sljedeća oprema: separator tipa mješač – taložnik, peristaltičke pumpe (*B. Braun*), magnetska mješala (*Tehtnica*), termostat (*Fischer Labor - Relais*), spektrofotometar (*Shimadzu*).

#### 3.1.4 Separator tipa mješač – taložnik

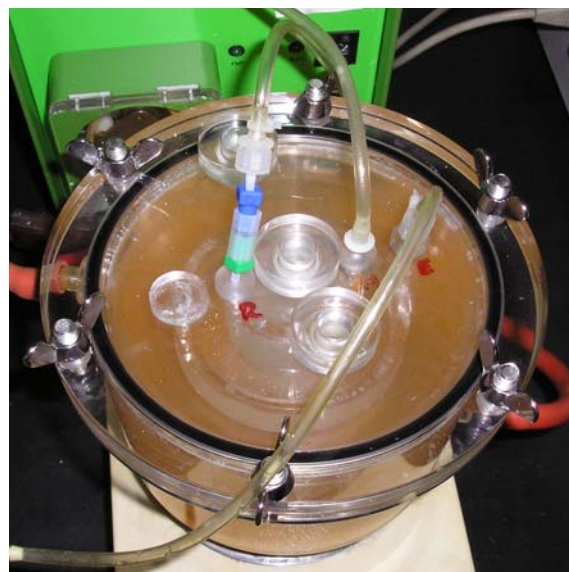
Separator tipa mješač – taložnik (slika 3.1 i 3.2). izrađen je od pleksi stakla. Sastoji se od dvije sekcije (slika 3.1): sekcije mješača (1) i sekcije taložnika (2). Sekcija taložnika podijeljena je pregradom na dva odjeljka: odjeljak u kojem se nakuplja rafinatna faza (2a) i odjeljak sa ekstratnom fazom (2b). Svaka sekcija je opremljena otvorima za doziranje i odvod. Sekcije mješača i taložnika su smještene u termostimirani prostor (3).



Slika 3.1 Pojednostavljeni prikaz laboratorijskog separatora tipa mješač – taložnik.



Slika 3.2a



Slika 3.2b

Slika 3.2 Separator tipa mješač – taložnik

a) bočni pogled

b) pogled odozgo.

U tablici 3.1 navedene su geometrijske značajke laboratorijskog separatora.

Tablica 3.1 Geometrijske značajke separatora tipa mješač – taložnik.

	$V [ \text{dm}^3 ]$
Sekcija mješača	0,1033
Sekcija taložnika	0,1973
Odjeljak rafinatne faze	0,1333
Odjeljak ekstraktne faze	0,0640

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Određivanje optimalnog koeficijenta raspodjele

Vodeni dvofazni sustav PEG<sub>6000</sub> - H<sub>2</sub>O - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> primijenjen za ekstrakciju BSA je priređen miješanjem otopine polietilenglikola molekulske mase 6000 g mol<sup>-1</sup> (PEG<sub>6000</sub>) sa otopinom soli ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i modelnom otopinom BSA. Volumeni otopina pojedinih komponenata računati su na temelju plana pokusa danog genetskim algoritmom. Ukupni volumen sustava od 5 cm<sup>3</sup> podešavan je dodatkom pufera. Smjesa je potom homogenizirana na vortexu i ostavljena mirovati preko noći. Nakon 24 h uzet je uzorak iz ekstraktne i rafinatne faze, te je određena koncentracija proteina. U svakoj točki plana pokusa eksperiment je proveden tri puta.

### 3.2.2 Kontinuirana ekstrakcija u separatoru tipa mješač – taložnik

U šaržnim eksperimentima tijekom pet generacija genetskog algoritma određeni su optimalni uvjeti za provedbu kontinuirane ekstrakcije BSA u vodenom dvofaznom sustavu.

Laboratorijski separator tipa mješač – taložnik je povezan sustavom cijevi preko peristaltičkih pumpi s termostatom, spektrofotometrom i spremnikom u kojem je prethodno pripravljena radna otopina. Aparatura korištena za provedbu mjerenja prikazana je na slikama 3.3 i 3.4.

Na početku mjerenja u posudi je pripremljen dvofazni sustav sastava:  $w_{\text{PEG}} = 0,1138$ ;  $w_{\text{AMS}} = 0,0970$ . Tako pripremljenom dvofaznom sustavu dodan je protein,  $c_{\text{BSA}} = 1,5 \text{ mg cm}^{-3}$  i fosfatni pufer, pH = 5,5 tako da je ukupni volumen radne otopine bio 2 dm<sup>3</sup>. Pripremljeni sustav miješan je na magnetskoj mješalici.

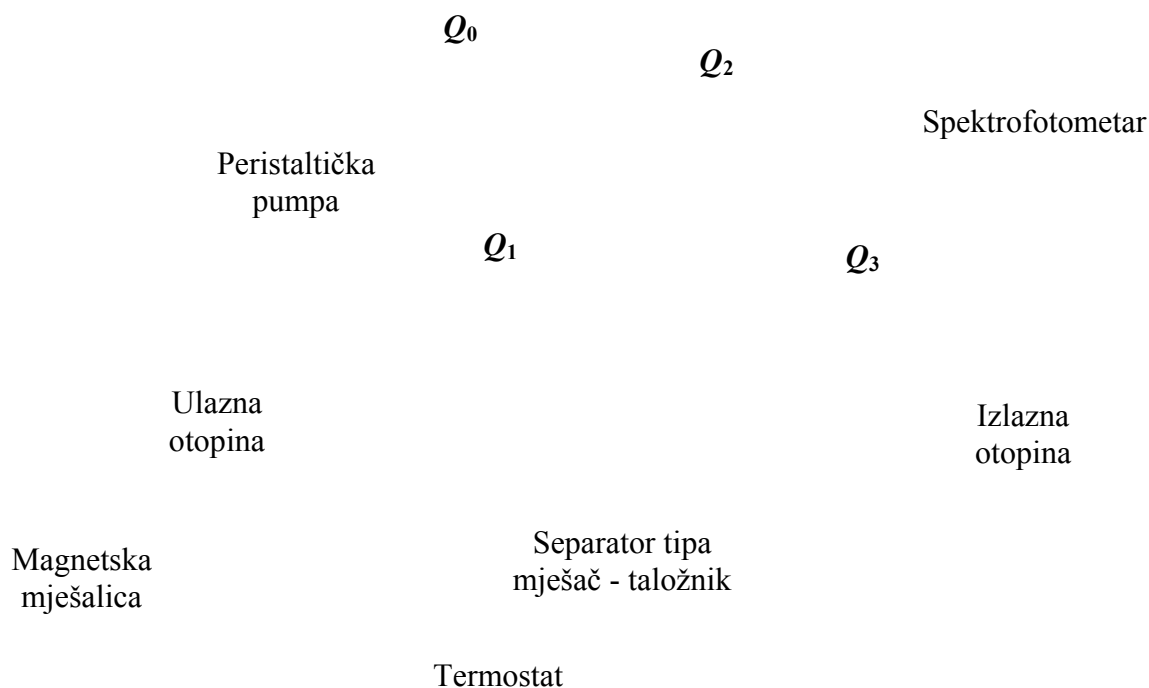
Na temelju prikupljenih podataka o sustavu i geometrijskim značajkama separatora tipa mješač - taložnik, pomoću simulacija (prilozi 5 - 10), su procijenjeni optimalni protoci u sustavu za provedbu procesa ekstrakcije, a potom su baždarene pumpe.

Tijekom mjerenja radni sadržaj je transportiran peristaltičkom pumpom u sekciju mješača (slika 3.1, 1). Sadržaj sekcije mješača je bio intenzivno miješan. Kada je razina u sekciji mješača dosegla visinu pregradne stijenke došlo je do prelijevanja u sekciju taložnika (slika 3.1, 2) u kojem je počelo odvajanje faza. U donjem dijelu taložnika (slika 3.1, 2a) odjeljivala se rafinatna faza – pretežno amonij - sulfat, dok se ekstraktna faza – pretežno PEG<sub>6000</sub> prelijevala preko pregradne stijenke i odvajala u zasebni odjeljak taložnika (slika 3.1,

2b). Nakon što su se odjeljci taložnika napunili, uključene su preostale peristaltičke pumpe pomoću kojih su se faze izvlačile u spremnik. Proces je praćen na spektrofometru mjerenjem apsorbancije ekstraktne faze. U određenim vremenskim intervalima, ovisno o sustavu i dinamici procesa, prikupljani su uzorci ekstraktne i rafinatne faze. Trenutak završetka eksperimenta aproksimiran je trenutkom u kojem je sustav postigao stacionarno stanje, a koji je određen na temelju poznatih geometrijskih značajki separatora i radnog protoka. Uzorci su potom analizirani na spektrofotometru pri valnoj duljini,  $\lambda = 280$  nm. Sustav je termostatiran na temperaturi od 20 °C. Mjerenja su provedena pri protocima  $Q_0 = 10,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  i  $Q_0 = 26,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ .

Pri istim uvjetima je provedeno mjerenje u svrhu određivanja konstante brzine uspostave ravnoteže proteina BSA i to impulsnom pobudom u sustavu. Nakon što se u vodenom dvofaznom sustavu, PEG<sub>6000</sub> - H<sub>2</sub>O - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, uspostavila ravnoteža injektiran je mali volumen visoko koncentrirane otopine proteina BSA. Početak mjerenja aproksimiran je trenutkom injektiranja. Proces je vođen na prethodno opisani način.

Slika 3.3 Aparatura za provedbu procesa kontinuirane ekstrakcije



Slika 3.4 Shematski prikaz aparature za provedbu procesa kontinuirane ekstrakcije

$Q_0$  – protok ulazne otopine [ $\text{kg min}^{-1}$ ],

$Q_1$  – protok otopine iz sekcije mješaća u sekciju taložnika [ $\text{kg min}^{-1}$ ],

$Q_2$  – protok ekstraktne faze [ $\text{kg min}^{-1}$ ],

$Q_3$  – protok rafinatne faze [ $\text{kg min}^{-1}$ ].

### 3.2.3 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi mjerena je spektrofotometrijski (spektrofotometar *Shimadzu*) pri  $\lambda = 280$  nm. Na temelju prethodno određene baždarne krivulje koncentracija BSA - apsorbanacija (prilog 1) određivana je koncentracija BSA u nepoznatom uzorku.

### 3.2.4 Obrada podataka

Koeficijent raspodjele proteina BSA je optimiran pomoću genetskog algoritma korištenjem programskog paketa GALOP 1.24 (*Genetic Algorithm for the Optimization of*

*Processes*).<sup>13</sup> Programski paket GALOP 1.24 se temelji na jednostavnom genetskom algoritmu koji koristi binarni prikaz, jednostavnu selekciju, križanje s jednom točkom prekida i jednostavnu mutaciju (poglavlje 2.1).

Ravnotežni sastavi vodenog dvofaznog sustava, su izračunati na temelju poznatih duljina spojnih linija kao sjecišta binodalne krivulje (jednažba 2.20) i spojnih linija upotrebom programskog koda napisanog u programskom paketu MathLAB<sup>®</sup> (prilog 3).

Matematički model procesa kontinuirane ekstrakcije u vodenom dvofaznom sustavu rješavan je upotrebom programskog paketa MathLAB<sup>®</sup> (prilozi 5 - 10).

Konstanta brzine uspostave ravnoteže za BSA procijenjena je simplex metodom uključenom u programski paket Scientist (prilog 4).

Sustav diferencijalnih jednažbi (poglavlje 2.2.5) riješen je numeričkom metodom Runge – Kutta IV.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1 Određivanje optimalnog koeficijenta raspodjele genetskim algoritmom

U ovom radu proveden je proces ekstrakcije u vodenom dvofaznom sustavu PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u svrhu separacije modelne otopine proteina BS albumina.

Prije nego li se je vodeni dvofazni sustav PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> primijenio za ekstrakciju proteina BSA, upoznate su njegove ravnotežne značajke, odnosno sastavi i volumeni faza nakon uspostave fazne ravnoteže uz određene pretpostavke:

- prisutnost biološki aktivnih tvari i pufera ne utječe na faznu ravnotežu,
- raspodjele molekularnih masa PEG-a u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi se međusobno ne razlikuju i jednake su raspodjeli molekularnih masa PEG-a u polaznoj otopini.

Uz navedene pretpostavke, ravnoteža vodenog dvofaznog sustava PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dana je binodalnom krivuljom (jednadžba 2.20) pogodnom za opisivanje termodinamičke ravnoteže sustava u određenom području duljina spojnih linija, odnosno u određenom području ravnotežnih koncentracija PEG-a i amonij - sulfata (tablica 4.1).

U seriji eksperimenata provedenih u kotlastom sustavu, pri 20 °C, istraživana je utjecaj pH, koncentracije PEG-a, koncentracije amonij - sulfata i koncentracije proteina na koeficijent raspodjele u vodenom dvofaznom sustavu uz upotrebu genetskog algoritma kao optimizacijske metode.

Pri inicijalizaciji genetskog algoritma kreirana je početna populacija jedinki  $c_{BSA}$ , pH,  $TLL$ , i određene su njihove značajke (granice intervala, koraci u kojima se mijenjaju, veličina pojedinog elementa populacije, odnosno broj bitova i distribucija unutar intervala) koje su prikazane u tablici 4.1.

Tablica 4.1 Elementi populacije i parametri inicijalizacije.

Element populacije	Donja granica	Gornja granica	Korak	Broj bitova	Distribucija
$c_{BSA} / \text{mg cm}^{-3}$	0,5	3,5	0,5	3	jednolika
pH / -	5,5	7,5	0,5	6	jednolika
$TLL / -$	1,0	51,0	1,0	6	f-ja



U tablici 4.1 su prikazana područja prekrivenosti genetskim algoritmom unutar kojih su pojedini elementi populacije podložni djelovanju genetskih operatora. Za pH je to područje u granicama intervala unutar kojeg nema negativnih učinaka na postojanost proteina. Općenito je pokazano da područje u kojem je pH manji od 4 i veći od 9 predstavlja bio - nekompatibilno okruženje za proteine. Zbog sličnih razloga određene su i granice intervala koncentracije proteina BSA, dok su područja sastava dvofaznog sustava, odnosno granice intervala duljine spojne linije bile određene područjem unutar kojeg je termodinamička ravnoteža sustava bila matematički vjerodostojno opisana (jednadžba 2.20).

Funkcija distribucije duljine spojne linije,  $TLL$ , bila je definirana na način da najveća vjerojatnost generiranja jedinki  $TLL$  tijekom generacija bude u području većih vrijednosti duljina spojnih linija kako bi se izbjegnulo područje u okolici kritične točke gdje raslojavanje faza iščezava.

Parametri genetskog algoritma bili su:

- veličina populacije;

Broj bitova pojedinog elementa populacije je prikazan u tablici 4.1.

- vjerojatnost križanja:

$$p_c = 0,95;$$

- vjerojatnost mutacije

$$p_m = 0,01.$$

Funkcija usklađenosti bila je minimalni koeficijent raspodjele,  $K$ , koji je promatran kao funkcija masenog udjela PEG-a, masenog udjela  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH i koncentracije proteina. Kako bi se smanjio broj parametara koje je potrebno optimirati polazne koncentracije PEG-a i amonij - sulfata definirane su duljinom spojne linije pa je:

{ EMBED Equation.3 }

Iz duljina spojnih linija, tijekom svih pet generacija, računate su ravnotežne koncentracije vodenog dvofaznog sustava pomoću algoritma (prilog 3) i to kao sjecišta funkcije binodalne krivulje (jednadžba 2.20) i jednadžbe pravca spojne linije (jednadžba 2.16). Pritom je pretpostavljeno da su volumeni ekstraktne i rafinatne faze nakon uspostave fazne ravnoteže jednaki i neovisni o pH i koncentraciji proteina. U tom slučaju točka sastava

polazne otopine leži u heterogenom području na polovištu pravca spojne linije koji povezuje ravnotežne koncentracije PEG-a i AMS-a u ekstraktu i rafinatu.

Ravnotežne koncentracije vodenog dvofaznog sustava računane su na temelju dva uvjeta:

1.  $y_1 - y_2 = 0$

pri čemu je:

{ EMBED Equation.3 }

$$y_2 = -2,21 \cdot x + l$$

2. { EMBED Equation.3 }

pri čemu je kao što i slijedi iz jednadžbe 2.19. duljina spojne linije funkcija ravnotežnih koncentracija PEG-a i amonij - sulfata.

Stoga, ako su volumeni ekstraktne i rafinatne faze nakon uspostave fazne ravnoteže jednaki i točka sastava polazne otopine leži na polovištu pravca spojne linije tada vrijedi da je:

{ EMBED Equation.3 }

{ EMBED Equation.3 }

odnosno:

$$K = f(w_{\text{PEG}}, w_{\text{AMS}}, \text{pH}, c_{\text{BSA}}) \rightarrow f(w_{\text{PEG}}^*, w_{\text{AMS}}^*, \text{pH}, c_{\text{BSA}}) \rightarrow f(TLL, \text{pH}, c_{\text{BSA}})$$

pa je funkcija usklađenosti definirana izrazom:

{ EMBED Equation.3 }

Nakon što je stvorena početna populacija jedinki ( $c_{\text{BSA}}, \text{pH}, TLL$ ), pri čemu su određene i njihove značajke (tablica 4.1.) iniciran je genetski algoritam i dobivena je prva generacija elemenata populacije (tablica 4.2).

#### 4. Rezultati i rasprava

U tablici 4.2 prikazani su uvjeti provedbe pokusa: pH, koncentracija modelne otopine BSA i duljina spojne linije (sa pripadajućim početnim sastavom u području nemješljivosti, te ravnotežnim sastavima ekstraktne i rafinatne faze) za prvu generaciju.

Tablica 4.2 Uvjeti provedbe pokusa za prvu generaciju.

Početni sastav		Ravnotežni sastav				Elementi populacije		
		Ekstrakt		Rafinat		TLL /-	pH /-	$C_{BSA}$ / $\text{mg cm}^{-3}$
$w_{PEG}$ /-	$w_{AMS}$ /-	$w_{PEG}^*$ /-	$w_{AMS}^*$ /-	$w_{PEG}^*$ /-	$w_{AMS}^*$ /-			
0,1138	0,0970	0,1955	0,0600	0,0320	0,1340	18	5,5	1,5
0,1481	0,1050	0,2806	0,0450	0,0155	0,1650	29	6,5	1,0
0,1251	0,1050	0,2399	0,0530	0,0102	0,1570	25	5,5	2,0
0,1770	0,1105	0,3415	0,0360	0,0124	0,1850	36	7,0	2,5

U tablici 4.3 prikazane su ravnotežne koncentracije BSA u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi, te srednja vrijednost koeficijenta raspodjele za svaku jedinku prve generacije.

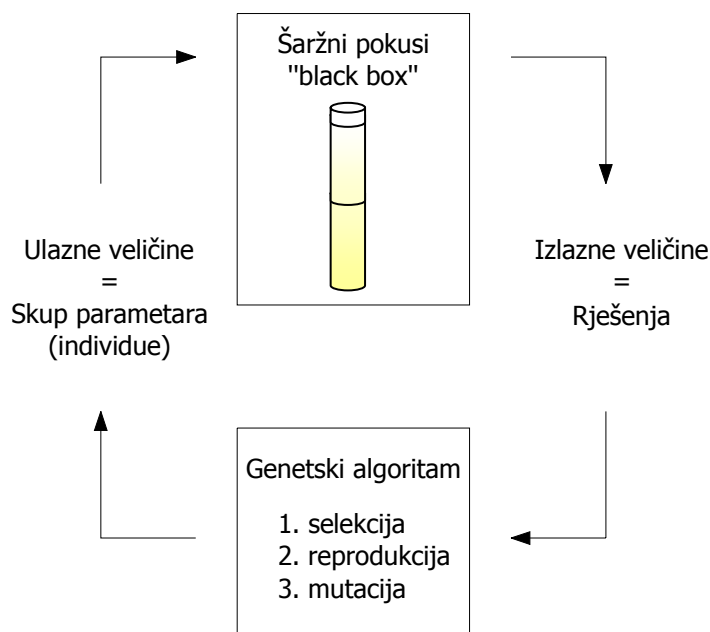
Tablica 4.3 Ravnotežne koncentracije BSA u rafinatnoj i ekstraktnoj fazi, i srednje vrijednosti koeficijenta raspodjele za prvu generaciju.

{ EMBED Equation.3 } / $\text{mg cm}^{-3}$	{ EMBED Equation.3 } / $\text{mg cm}^{-3}$	$K / -$
0,2210	2,5833	0,0874
0,2372	2,7295	
0,2210	2,4614	
0,3964	1,4297	0,2677
0,3769	1,4541	
0,3704	1,3891	
0,4354	3,5581	0,1350
0,5069	3,3387	
0,4452	3,3794	
1,9821	3,2900	0,4793
1,8522	3,3306	
1,6084	2,9651	

U svakoj generaciji, kroz četiri eksperimenta, koeficijent raspodjele računat je prema jednadžbi 2.19 pri čemu su koncentracije proteina u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi određivane spektrofotometrijski pri valnoj duljini,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ .

Unošenjem dobivenih koeficijenta raspodjele prve generacije u genetski algoritam, inicirana je druga generacija (tablica 4.4) elemenata populacije ( $c_{BSA}$ , pH,  $TLL$ ). Kroz pet generacija dobiven je optimalni koeficijent raspodjele proteina BSA. Uvjet prekida optimiranja je bilo uzastopno ponavljanje iste generacije.

Slijed radnji pri optimiranju procesa primjenom genetskog algoritma prikazan je na slici 4.1:



Slika 4.1 Shematski prikaz optimiranja procesa upotrebom genetskog algoritma.

Uvjeti pri kojima su se provodili šaržni pokusi tijekom optimizacije procesa ekstrakcije proteina BSA u vodenom dvofaznom sustavu uz upotrebu genetskog algoritma (pH, koncentracije modelne otopine BSA i duljine spojnih linija) te dobivene srednje vrijednosti rezultata koeficijenta raspodjele tijekom preostalih generacija dane su u tablicama: 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 i 4.11.

U tablici 4.4 prikazani su uvjeti provedbe pokusa, pH, koncentracija modelne otopine BSA i duljina spojne linije (sa pripadajućim početnim sastavom u području nemješljivosti, te ravnotežnim sastavima ekstraktne i rafinatne faze) za drugu generaciju.

Tablica 4.4 Uvjeti provedbe pokusa za drugu generaciju.

Početni sastav		Ravnotežni sastav				Elementi populacije		
$w_{PEG}$ /-	$w_{AMS}$ /-	Ekstrakt		Rafinat		$TLL$ /-	pH /-	$c_{BSA}$ / $mg\ cm^{-3}$
		$w_{PEG}^*$ /-	$w_{AMS}^*$ /-	$w_{PEG}^*$ /-	$w_{AMS}^*$ /-			
0,1138	0,0970	0,1955	0,0600	0,0320	0,1340	18	5,5	1,5
0,1119	0,0965	0,1903	0,0610	0,0334	0,1320	17	5,5	2,5
0,1481	0,1050	0,2806	0,0450	0,0155	0,1650	29	6,5	1,5
0,1807	0,1115	0,3497	0,0350	0,0117	0,1880	37	6,0	1,5

U tablici 4.5 prikazane su ravnotežne koncentracije BSA u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi, te srednja vrijednost koeficijenta raspodjele za drugu generaciju.

Tablica 4.5 Ravnotežne koncentracije BSA u rafinatnoj i ekstraktnoj fazi, i srednje vrijednosti koeficijenta raspodjele za drugu generaciju.

{ EMBED Equation.3 } / $mg\ cm^{-3}$	{ EMBED Equation.3 } / $mg\ cm^{-3}$	$K$ / -
0,2210	2,5833	0,0874
0,2372	2,7295	
0,2210	2,4614	
0,8692	4,9716	0,1767
0,9407	4,8253	
0,8221	5,1015	
0,4874	2,3883	0,2045
0,4939	2,4208	
0,4874	2,3721	
0,9846	3,5093	0,2879
0,9911	3,6556	
1,1113	3,7206	

U tablici 4.6 prikazani su uvjeti provedbe pokusa, pH, koncentracija modelne otopine BSA i duljina spojne linije (sa pripadajućim početnim sastavom u području nemješljivosti, te ravnotežnim sastavima ekstraktne i rafinatne faze) za treću generaciju.

Tablica 4.6 Uvjeti provedbe pokusa za treću generaciju.

Početni sastav		Ravnotežni sastav				Elementi populacije		
		Ekstrakt		Rafinat		$TLL$ /-	pH /-	$c_{BSA}$ / $\text{mg cm}^{-3}$
$w_{PEG}$ /-	$w_{AMS}$ /-	$w_{PEG}^*$ /-	$w_{AMS}^*$ /-	$w_{PEG}^*$ /-	$w_{AMS}^*$ /-			
0,1138	0,0970	0,1955	0,0600	0,0320	0,1340	18	5,5	1,5
0,1138	0,0970	0,1955	0,0600	0,0320	0,1340	18	5,5	1,5
0,1299	0,1010	0,2381	0,0520	0,0217	0,1500	24	5,5	1,5
0,1453	0,1040	0,2734	0,0460	0,0172	0,1620	28	6,5	2,5

U tablici 4.7 prikazane su ravnotežne koncentracije BSA u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi, te srednja vrijednost koeficijenta raspodjele za treću generaciju.

Tablica 4.7 Ravnotežne koncentracije BSA u rafinatnoj i ekstraktnoj fazi, i srednje vrijednosti koeficijenta raspodjele za treću generaciju.

{ EMBED Equation.3 } / $\text{mg cm}^{-3}$	{ EMBED Equation.3 } / $\text{mg cm}^{-3}$	$K$ / -
0,2210	2,5833	0,0874
0,2372	2,7295	
0,2210	2,4614	
0,2210	2,5833	0,0874
0,2372	2,7295	
0,2210	2,4614	
0,7084	4,8335	0,1517
0,7181	4,6872	
0,7539	4,8497	
0,6011	2,2908	0,2879
0,6645	2,2746	
0,6710	2,1608	

U tablici 4.8 prikazani su uvjeti provedbe pokusa, pH, koncentracija modelne otopine BSA i duljina spojne linije (sa pripadajućim početnim sastavom u području nemješljivosti, te ravnotežnim sastavima ekstraktne i rafinatne faze) za četvrtu generaciju.

Tablica 4.8 Uvjeti provedbe pokusa za četvrtu generaciju.

Početni sastav		Ravnotežni sastav				Elementi populacije		
		Ekstrakt		Rafinat		$TLL$ / -	pH / -	$c_{BSA}$ / $\text{mg cm}^{-3}$
$w_{PEG}$ / -	$w_{AMS}$ / -	$w_{PEG}^*$ / -	$w_{AMS}^*$ / -	$w_{PEG}^*$ / -	$w_{AMS}^*$ / -			
0,1138	0,0970	0,1955	0,0600	0,0320	0,1340	18	5,5	1,5
0,1138	0,0970	0,1955	0,0600	0,0320	0,1340	18	5,5	1,5
0,1299	0,1010	0,2381	0,0520	0,0217	0,1500	24	5,5	1,5
0,1299	0,1010	0,2381	0,0520	0,0217	0,1500	24	5,5	1,5

U tablici 4.9 prikazane su ravnotežne koncentracije BSA u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi, te srednja vrijednost koeficijenta raspodjele za četvrtu generaciju.

Tablica 4.9 Ravnotežne koncentracije BSA u rafinatnoj i ekstraktnoj fazi, i srednje vrijednosti koeficijenta raspodjele za četvrtu generaciju.

{ EMBED Equation.3 } / $\text{mg cm}^{-3}$	{ EMBED Equation.3 } / $\text{mg cm}^{-3}$	$K$ / -
0,2210	2,5833	0,0874
0,2372	2,7295	
0,2210	2,4614	
0,2210	2,5833	0,0874
0,2372	2,7295	
0,2210	2,4614	
0,7084	4,8335	0,1517
0,7181	4,6872	
0,7539	4,8497	
0,7084	4,8335	0,1517
0,7181	4,6872	
0,7539	4,8497	

U tablici 4.10 prikazani su uvjeti provedbe pokusa, pH, koncentracija modelne otopine BSA i duljina spojne linije (sa pripadajućim početnim sastavom u području nemješljivosti, te ravnotežnim sastavima ekstraktne i rafinatne faze) za petu generaciju.

Tablica 4.10 Uvjeti provedbe pokusa za petu generaciju.

Početni sastav		Ravnotežni sastav				Elementi populacije		
		Ekstrakt		Rafinat		TLL /-	pH /-	C <sub>BSA</sub> / mg cm <sup>-3</sup>
W <sub>PEG</sub> /-	W <sub>AMS</sub> /-	W* <sub>PEG</sub> /-	W* <sub>AMS</sub> /-	W* <sub>PEG</sub> /-	W* <sub>AMS</sub> /-			
0,1138	0,0970	0,1955	0,0600	0,0320	0,1340	18	5,5	1,5
0,1138	0,0970	0,1955	0,0600	0,0320	0,1340	18	5,5	1,5
0,1138	0,0970	0,1955	0,0600	0,0320	0,1340	18	5,5	1,5
0,1299	0,1010	0,2381	0,0520	0,0217	0,1500	24	5,5	1,5

U tablici 4.11 prikazane su ravnotežne koncentracije BSA u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi, te srednja vrijednost koeficijenta raspodjele za petu generaciju.

Tablica 4.11 Ravnotežne koncentracije BSA u rafinatnoj i ekstraktnoj fazi, i srednje vrijednosti koeficijenta raspodjele za petu generaciju.

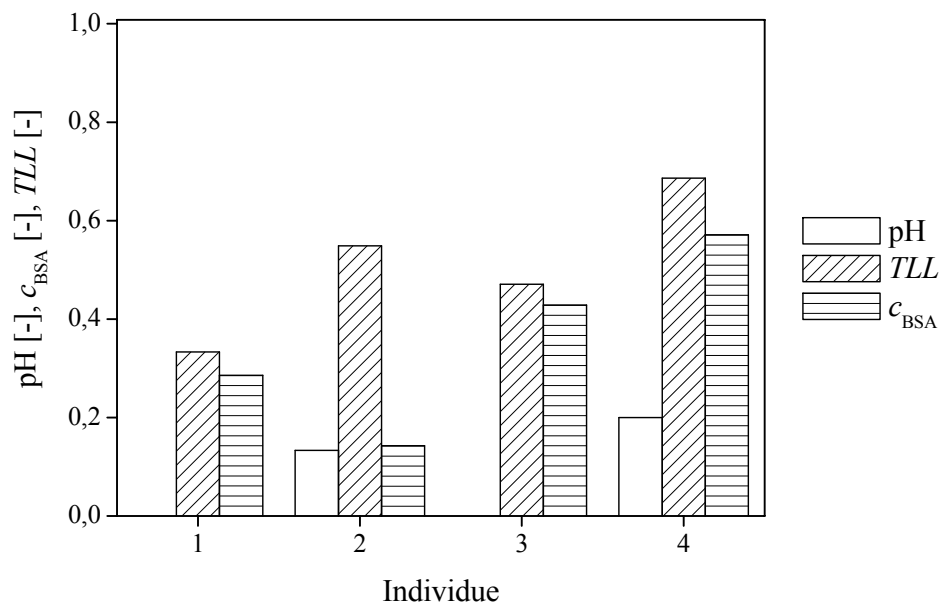
{ EMBED Equation.3 } / mg cm <sup>-3</sup>	{ EMBED Equation.3 } / mg cm <sup>-3</sup>	K / -
0,2210	2,5833	0,0874
0,2372	2,7295	
0,2210	2,4614	
0,2210	2,5833	0,0874
0,2372	2,7295	
0,2210	2,4614	
0,2210	2,5833	0,0874
0,2372	2,7295	
0,2210	2,4614	
0,7084	4,8335	0,1517
0,7181	4,6872	
0,7539	4,8497	

Na slikama 4.2 i 4.3 prikazane su normalizirane vrijednosti elemenata populacije, odnosno pH, duljine spojnih linija i koncentracije proteina BSA u prvoj i petoj generaciji. Usporedbom normaliziranih vrijednosti četiri individe u prvoj generaciji s vrijednostima individua u petoj generaciji, uočljiva je tendencija genetskog algoritma pri određivanju optimalnih uvjeta provedbe ekstrakcije.

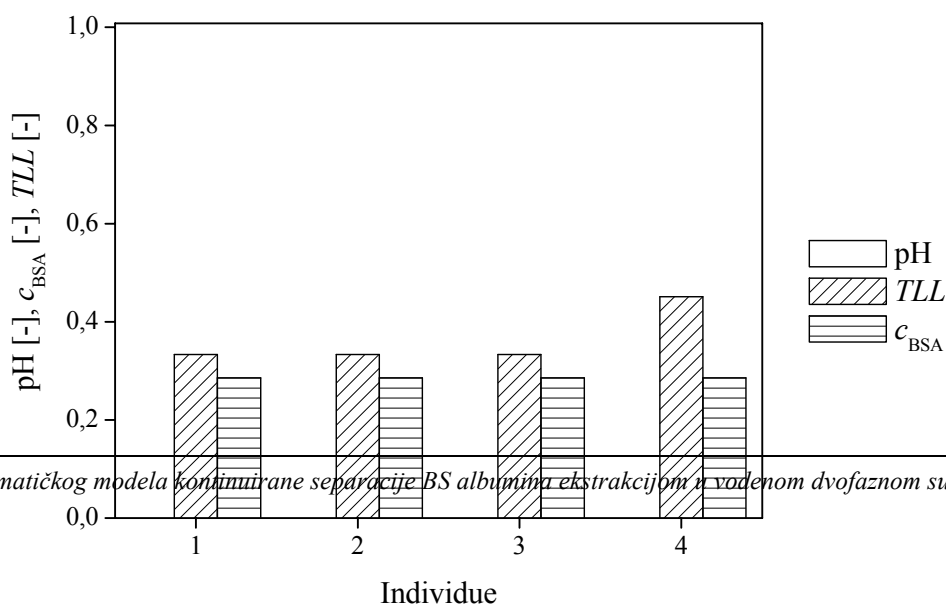
Pri inicijalizaciji prve generacije (slika 4.2) genetskim algoritmom pokriveno je široko područje vrijednosti elemenata populacije, odnosno pH, duljina spojnih linija i koncentracija



proteina. Može se reći da je genetski algoritam generirao elemente populacije koji su široko raspodijeljeni unutar definiranog intervala vrijednosti pojedinog elementa populacije. U petoj generaciji (slika 4.3) usljed uzastopnog ponavljanja vrijednosti individua iniciran je završetak optimizacije. Genetskim algoritamom dobivene su usredotočene vrijednosti pojedinog elementa populacije (slika 4.3).

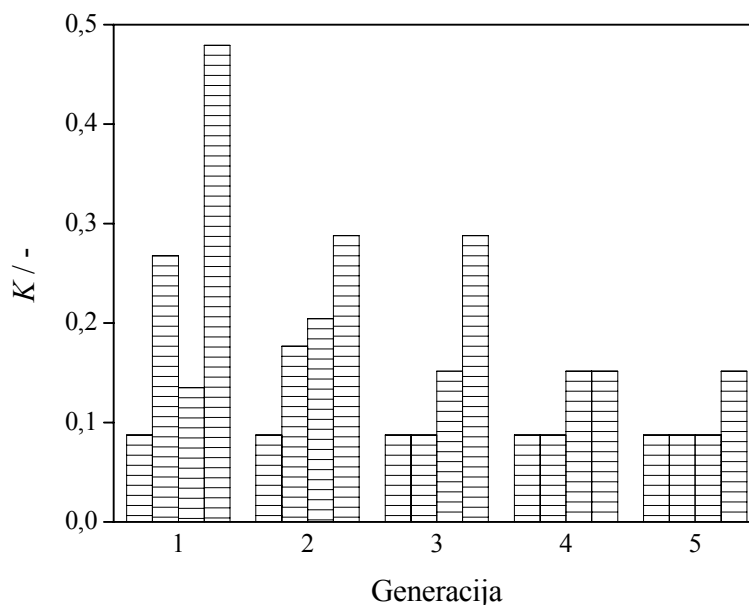


Slika 4.2 Normalizirane vrijednosti elemenata populacije u prvoj generaciji.



Slika 4.3 Normalizirane vrijednosti elemenata populacije u petoj generaciji.

Na slici 4.4 prikazana je promjena koeficijenta raspodjele tijekom svih pet generacija.



Slika 4.4. Promjena koeficijenta raspodjele  $K$  tijekom pet generacija.

Primjenom genetskog algoritma dobiven je optimalni koeficijent raspodjele,  $K = 0,0874$  u području u kojem se termodinamička ravnoteža vodenog dvofaznog sustava može opisati navedenom eksponencijalnom matematičkom funkcijom (jednadžba 2.20). Za što učinkovitiju ekstrakciju poželjno je da koeficijent raspodjele bude što veći ili što manji od 1. Optimizacija genetskim algoritmom pokazuje tendenciju koeficijenta raspodjele prema

vrijednostima manjim od 1, ali je ograničena područjem definicije termodinamičke ravnoteže PEG-a i amonij - sulfata.

Iako genetski algoritam možda neće uvijek biti primjenjiv i učinkovit za optimizaciju procesa ekstrakcije da bi se pri dobivenim optimalnim uvjetima moglo zadovoljiti zahtjevima ekonomičnosti procesa, primjena genetskog algoritma u ovom radu pokazala se jednostavnom metodom za optimiranje uvjeta provedbe procesa ekstrakcije otopine proteina BSA u vodenom dvofaznom sustavu  $\text{PEG}_{6000} - \text{H}_2\text{O} - (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

#### 4.2 Kontinuirana ekstrakcija u separatoru tipa mješač - taložnik

Kroz pet generacija genetskog algoritma određeni su optimalni uvjeti za provedbu kontinuirane ekstrakcije proteina BSA u laboratorijskom separatoru tipa mješač – taložnik pri 20 °C (slika 3.2a i 3.2b). Optimalni uvjeti za provedbu kontinuirane ekstrakcije proteina BSA bili su:  $\text{pH} = 5,5$ ; koncentracija otopine BSA,  $c_{\text{BSA}} = 1,5 \text{ mg cm}^{-3}$ ; sastav vodenog dvofaznog sustava koji odgovara duljini spojne linije,  $TLL = 18$ , bio je: maseni udio PEG-a  $w_{\text{PEG}} = 0,1138$  i maseni udio amonij - sulfata,  $w_{\text{AMS}} = 0,0970$ .

Na temelju dobivenih rezultata mjerenja pri danim uvjetima i optimalnom protoku procijenjena je konstanta brzine uspostave ravnoteže za navedeni protein.

U cilju postizanja maksimalne učinkovitosti separatora kontinuirana ekstrakcija provedena je pri različitim protocima.

##### 4.2.1 Određivanje konstante brzine uspostave ravnoteže proteina BSA

U vodenom dvofaznom sustavu  $\text{PEG}_{6000} - \text{H}_2\text{O} - (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i pri uvjetima koji su navedeni u tablicama 4.12 i 4.13 je provedeno mjerenje u kojem je procijenjena konstanta brzine uspostave ravnoteže za protein BSA.

Tablica 4.12 Uvjeti provedbe kontinuirane ekstrakcije određeni genetskim algoritmom.

pH / -	$c_{\text{BSA}} / \text{mg cm}^{-3}$	$w_{\text{PEG}} / -$	$w_{\text{AMS}} / -$
5,5	1,5	0,1138	0,0970

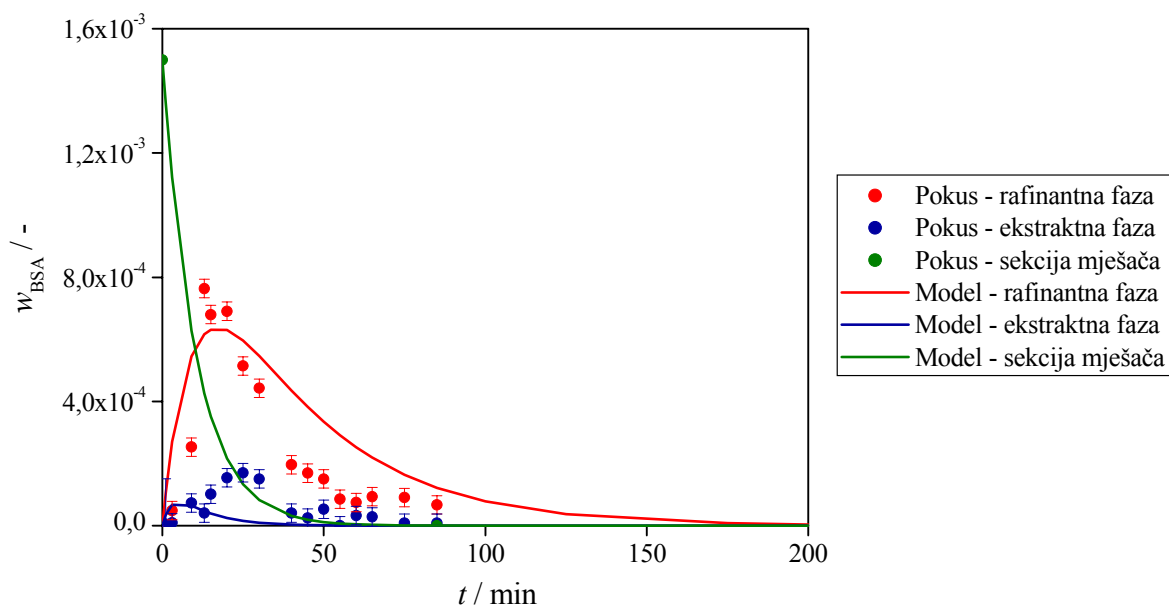
Tablica 4.13 Protoci procesnih struja procijenjeni simulacijama pretpostavljenog matematičkog modela.

	0	1	2	3
$Q / \text{cm}^3 \text{min}^{-1}$	10,0	10,0	5,5	4,5

Pri navedenim uvjetima konstanta brzine uspostave ravnoteže proteina BSA je određena impulsnom pobudom u vodenom dvofaznom sustavu nakon što se u sustavu uspostavila ravnoteža. Mjerenja su provedena impulsnom, a ne primjerice skokomičnom pobudom budući je sustav veoma osjetljiv na promjene stanja i ne postoji mogućnost vođenja procesa na način da se u sustavu trenutačno promjene uvjeti, a da bi oni bili točno poznati, određeni, mjerljivi i upravljivi u kontinuiranim radnim uvjetima.

Procijenjena je konstanta brzine uspostave ravnoteže,  $k_3 = 0,2251 \text{ min}^{-1}$ . Ako se procijenjena vrijednost konstante brzine uspostave ravnoteže proteina BSA uspoređi sa vrijednostima konstanti brzina uspostave ravnoteže PEG-a i amonij – sulfata,  $k_1 = 0,2365$  i  $k_2 = 0,2349$ , može se uvidjeti da se u vodenom dvofaznom sustavu najprije uspostavi ravnoteža između dvije faze, i to ekstraktne faze koju čini pretežno vodena otopina PEG-a i rafinatne faze koju čini pretežno vodena otopina amonij - sulfata. Nakon uspostave ravnoteže dvofaznog sustava dolazi do raspodjele proteina između faza ovisno o afinitetu proteina BSA prema pojedinoj fazi. Ta je činjenica također uočljiva ako se iz vrijednosti konstanti brzina uspostave ravnoteže izračuna vrijeme koje je potrebno da bi se uspostavila ravnoteža između dvije faze, a ono iznosi za PEG<sub>6000</sub>,  $t \approx 16,92 \text{ min}$  i za amonij - sulfat,  $t \approx 17,03 \text{ min}$  dok je za protein BSA vrijeme uspostave ravnoteže u sustavu,  $t \approx 17,77 \text{ min}$ .

Na slici 4.5 prikazani su rezultati eksperimenta i rezultati simulacija pomoću pretpostavljenog modela za koncentraciju proteina BSA u sekciji mješača i u sekciji taložnika (rafinatna faza i ekstraktna faza).



Slika 4.5 Vremenska promjena koncentracije proteina BSA u sekciji mješača i taložnika  
 $\pm$  - standardna devijacija eksperimentalnih podataka.

#### 4.2.2 Ocijena valjanosti modela

Kontinuirana ekstrakcija proteina BSA u vodenom dvofaznom sustavu u laboratorijskom separatoru tipa mješač – taložnik pri različitim protocima, provedena je uz pretpostavku da su volumeni ekstraktne i rafinatne faze nakon uspostave fazne ravnoteže jednaki.

Dakle, ako sa  $x$  označimo omjer volumena dviju faza:

{ EMBED Equation.3 }

(4.1)

tada sljedi  $x = 1$  za navedeni sustav.

Rezultati eksperimenata uspoređeni su sa rezultatima simulacija matematičkog modela procesa (poglavlje 2.2.5) te je procijenjen koeficijent raspodjele  $K$ . Koeficijent raspodjele,  $K$ , procijenjen je na osnovu vladanja sustava pri navedenim uvjetima i korištenjem jednadžbi modela procesa 2.35 i 2.36 te jednadžbe 2.21.

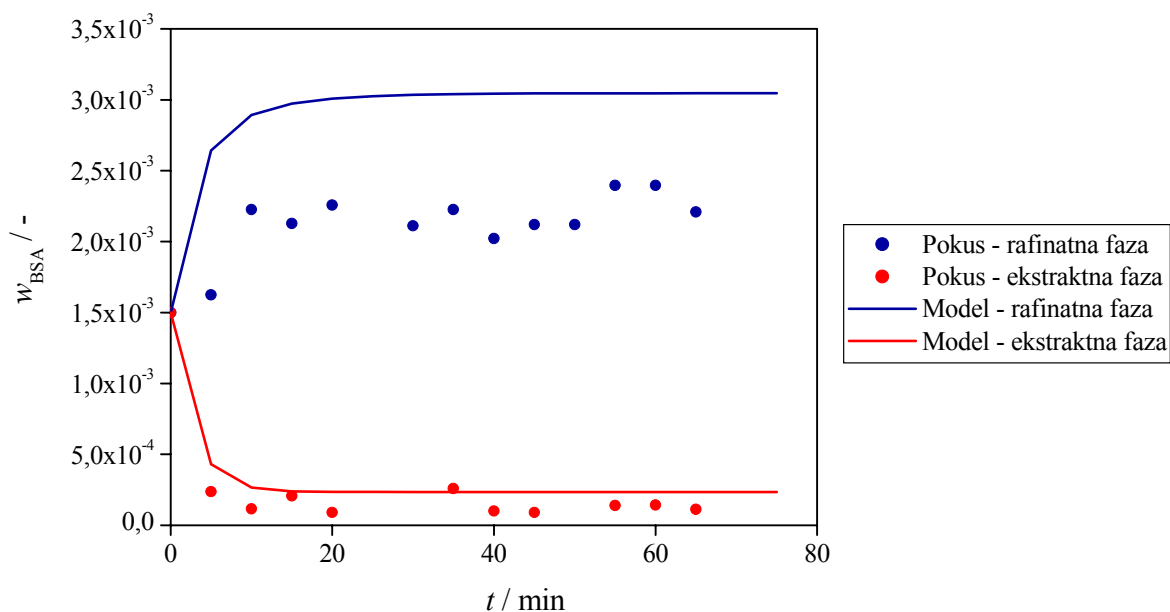
Na slikama 4.6 i 4.7 prikazana je usporedba rezultata simulacije procesa pomoću modela i eksperimentalnih rezultata za koncentraciju proteina BSA u sekciji mješača i sekciji

taložnika: i to u odjeljku s rafinatnom fazom i u odjeljku s ekstraktnom fazom pri uvjetima koji su navedeni u tablicama 4.12 i 4.14.

Tablica 4.14 Uvjeti provedbe kontinuiranog eksperimenta za  $Q_0 = 26,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ .

	0	1	2	3
$Q / \text{cm}^3 \text{ min}^{-1}$	26,3	26,3	14,47	11,84

Na slici 4.6 prikazana je usporedba rezultata simulacije procesa pomoću modela i eksperimentalnih rezultata za koncentraciju proteina BSA u sekciji taložnika i to u odjeljku s rafinatnom fazom i u odjeljku s ekstraktnom fazom uzimajući u obzir pretpostavku da su volumeni ekstraktne i rafinatne faze nakon uspostave fazne ravnoteže jednaki, odnosno da je  $x = 1$ .



Slika 4.6 Koncentracije proteina BSA u sekciji taložnika,  $Q_0 = 26,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $x = 1$ .

Pri danim uvjetima provedbe eksperimenta su procijenjeni koeficijent raspodjele u kontinuiranom sustavu, izračunata je učinkovitost laboratorijskog separatora kao i učinkovitost pojedine faze. U tablici 4.15 su prikazani koeficijent raspodjele,  $K$ , učinkovitost separatora tipa mješač – taložnik,  $\eta$ , i učinkovitost pojedine faze,  $\gamma$ , pri danim uvjetima i u navedenom sustavu.

Tablica 4.15 Koeficijenti raspodjele, učinkovitost separatora i učinkovitost rafinatne i ekstraktne faze pri  $Q_0 = 26,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  i  $x = 1$ .

$K_{\text{eksperiment}} / -$	0,0661
$K_{\text{model}} / -$	0,1486
$\eta / -$	0,4450
$\gamma^E / -$	0,1294
$\gamma^R / -$	0,8706

Ako pretpostavimo da tijekom procesa kontinuirane ekstrakcije proteina BSA u vodenom dvofaznom sustavu, u sekciji taložnika, dolazi do promjene volumena faza tada se sastav radne otopine može prikazati točkom koja leži na istoj spojnoj liniji pri čemu se raslojava na ekstrakt i rafinat istog sastava, ali je omjer volumena ekstraktne i rafinatne faze različit, odnosno različit je od 1. Ako promjenu volumena faza u sekciji taložnika izrazimo odnosom volumena, (jednadžba 4.1), a promjenu koncentracije proteina koeficijentom raspodjele, tada se ravnotežna koncentracija proteina BSA u pojedinim odjeljcima može izraziti sljedećim jednadžbama:

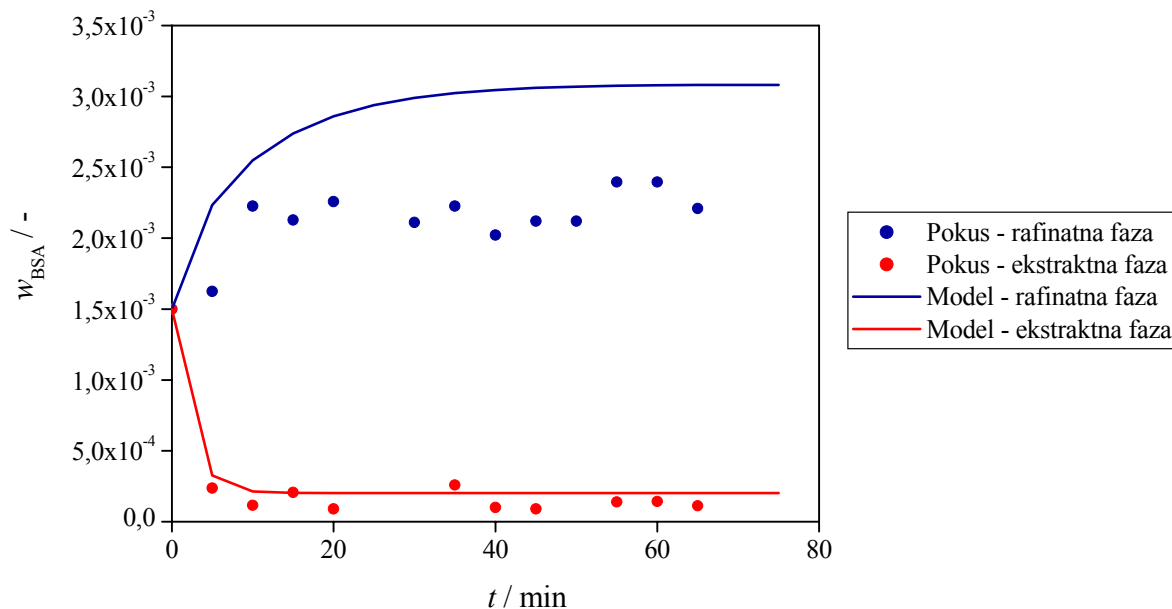
$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (4.2)$$

$$\{ \text{EMBED Equation.3} \} \quad (4.3)$$

Uvrštavajući jednadžbe 4.2 i 4.3 u jednadžbe modela 2.35 i 2.36 je provedena simulacija procesa pomoću pretpostavljenog modela.

Na slici 4.7. prikazane su koncentracije proteina BSA u sekciji taložnika i to u odjeljku s rafinatnom fazom i u odjeljku s ekstraktnom fazom uzimajući u obzir da su volumeni ekstraktne i rafinatne faze nakon uspostave fazne ravnoteže različiti, odnosno  $x \neq 1$ .

Na slici 4.7 prikazana je usporedba rezultata simulacije procesa pomoću modela i eksperimentalnih rezultata uzimajući u obzir da su volumeni ekstraktne i rafinatne faze nakon uspostave fazne ravnoteže različiti.



Slika 4.7 Koncentracije proteina BSA u sekciji taložnika,  $Q_0 = 26,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $x \neq 1$ .

Pri danim uvjetima provedbe eksperimenta procijenjeni su koeficijent raspodjele u kontinuiranom sustavu, odnos volumena faza i izračunata je učinkovitost laboratorijskog separatora i učinkovitost pojedine faze.

U tablici 4.16 prikazani su koeficijent raspodjele,  $K$ , učinkovitost separatora tipa mješač – taložnik,  $\eta$ , i učinkovitost pojedine faze,  $\gamma$ , pri danim uvjetima i u navedenom sustavu.

Tablica 4.16 Koeficijent raspodjele, učinkovitost separatora i učinkovitost rafinatne i ekstraktne faze pri  $Q_0 = 26,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  i  $x \neq 1$ .

$K_{\text{eksperiment}} / -$	0,0661
$K_{\text{model}} / -$	0,1963
$x / -$	0,6011
$\eta / -$	0,3367



$\gamma^E / -$	0,1055
$\gamma^R / -$	0,8945

Usporedbom rezultata simulacija procesa pomoću modela s eksperimentalnim rezultatima se može uočiti da zadovoljavajuće slaganje eksperimentalnih rezultata s modelom nije postignuto. Najvjerojatnije je protok bio prevelik s obzirom na konstrukcijsku izvedbu separatora te su promjene volumena faza bile izraženije. Usporedbom procijenjenih parametara modela i učinkovitosti prikazanih u tablicama 4.15 i 4.16 vidljivo je da je slučaju kada je  $x \neq 1$  koeficijent raspodjele nešto veći od onog kada je  $x = 1$  i od onog procijenjenog u šaržnim eksperimentima. Učinkovitost procesa je nešto manja u slučaju kada je  $x \neq 1$ . Razlog tomu je promjena omjera volumena faza koji je manji od onog pretpostavljenog i procijenjen je  $x = 0,6011$  pa se početna pretpostavka da je  $x = 1$  pri protoku  $Q_0 = 26,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  ne može primjeniti.

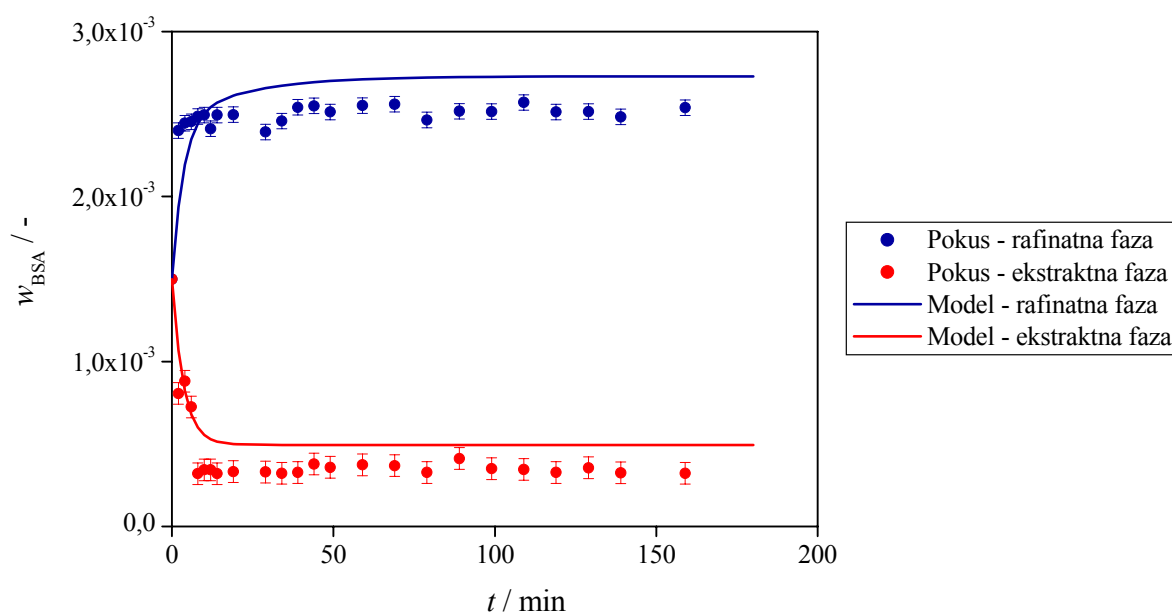
Simulacije procesa pomoću modela provedene su na temelju poznatih geometrijskih značajki separatora tipa mješač - taložnik te konstanti brzina uspostave ravnoteže za PEG<sub>6000</sub> i amonij - sulfat te protein BSA. Geometrijske značajke separatora dane su u tablici 3.1, konstante brzine uspostave ravnoteže za PEG<sub>6000</sub> i amonij – sulfat, u tablici 2.2 dok je konstanta brzine uspostave ravnoteže proteina BSA u navedenom sustavu procijenjena u poglavlju 4.2.1.

Na slikama 4.8 i 4.9 prikazana je usporedba rezultata simulacije procesa pomoću modela i eksperimentalnih rezultata za koncentraciju proteina BSA u sekciji mješača i sekciji taložnika: i to u odjeljku s rafinatnom fazom i u odjeljku s ekstraktom fazom pri uvjetima koji su navedeni u tablicama 4.12 i 4.17.

Tablica 4.17 Uvjeti provedbe kontinuiranog eksperimenta za  $Q_0 = 10,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ .

	0	1	2	3
$Q / \text{cm}^3 \text{min}^{-1}$	10,0	10,0	5,5	4,5

Na slici 4.8 prikazana je usporedba rezultata simulacije procesa pomoću modela i eksperimentalnih rezultata za koncentraciju proteina BSA u sekciji taložnika i to u odjeljku s rafinatnom fazom i u odjeljku s ekstraktnom fazom uzimajući u obzir pretpostavku da su volumeni ekstraktne i rafinatne faze nakon uspostave fazne ravnoteže jednaki, odnosno da je  $x = 1$ .



Slika 4.8 Koncentracije proteina BSA u sekciji taložnika,  $Q_0 = 10,0 \text{ cm}^3 \text{min}^{-1}$ ,  $x = 1$   
 $\pm$  - standardna devijacija eksperimentalnih podataka.

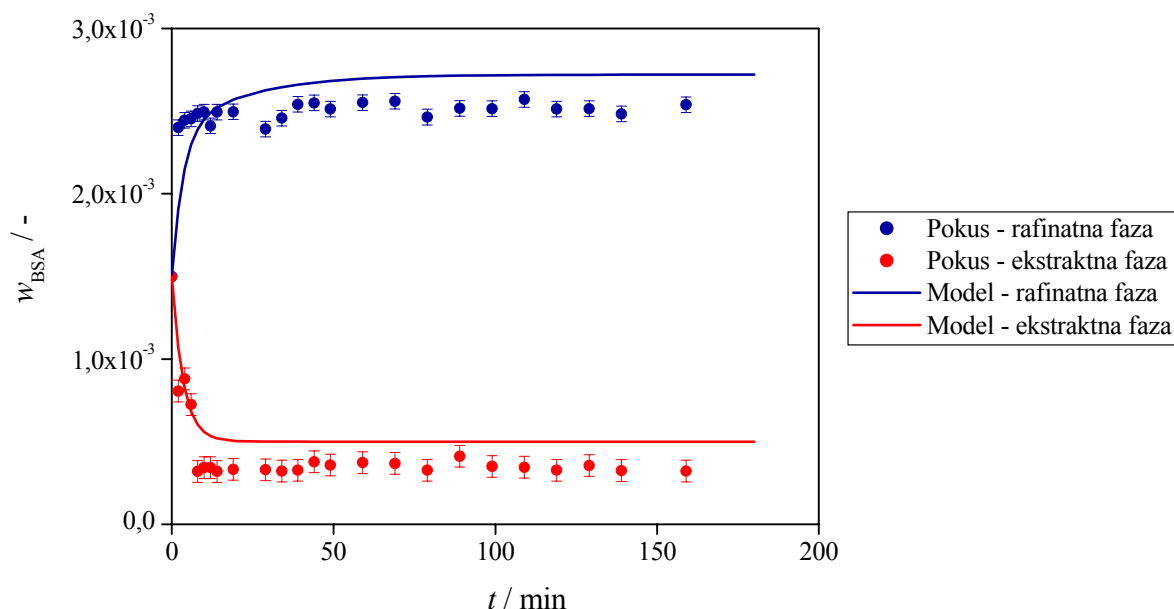
Pri danim uvjetima provedbe eksperimenta procijenjeni su koeficijent raspodjele u kontinuiranom sustavu, izračunata je učinkovitost laboratorijskog separatora kao i učinkovitost pojedine faze. U tablici 4.18 prikazani su koeficijent raspodjele,  $K$ , učinkovitost separatora tipa mješać – taložnik,  $\eta$ , i učinkovitost pojedine faze,  $\gamma$ , pri danim uvjetima i u navedenom sustavu.

Tablica 4.18 Koeficijenti raspodjele, učinkovitost separatora i učinkovitost rafinatne i ekstraktne faze pri  $Q_0 = 10,0 \text{ cm}^3 \text{min}^{-1}$  i  $x = 1$ .

$K_{\text{eksperiment}} / -$	0,1842
$K_{\text{model}} / -$	0,2589
$\eta / -$	0,7115
$\gamma^E / -$	0,2057
$\gamma^R / -$	0,7943

Na slici 4.9 prikazane su koncentracije proteina BSA u sekciji taložnika i to u odjeljku s rafinatnom fazom i u odjeljku s ekstraktnom fazom uzimajući u obzir da su volumeni ekstraktne i rafinatne faze nakon uspostave fazne ravnoteže različiti, odnosno  $x \neq 1$ .

Na slici 4.9 prikazana je usporedba rezultata simulacije procesa pomoću modela i eksperimentalnih rezultata uzimajući u obzir da su volumeni ekstraktne i rafinatne faze nakon uspostave fazne ravnoteže različiti.



Slika 4.9 Koncentracije proteina BSA u sekciji taložnika,  $Q_0 = 10,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $x \neq 1$

I- standardna devijacija eksperimentalnih podataka.

Pri danim uvjetima provedbe eksperimenta procijenjeni su koeficijent raspodjele u kontinuiranom sustavu, odnos volumena faza i izračunata je učinkovitost laboratorijskog separatora i učinkovitost pojedine faze. U tablici 4.19 prikazani su koeficijent raspodjele,  $K$ , učinkovitost separatora tipa mješač – taložnik,  $\eta$ , i učinkovitost pojedine faze,  $\gamma$ , pri danim uvjetima i u navedenom sustavu.

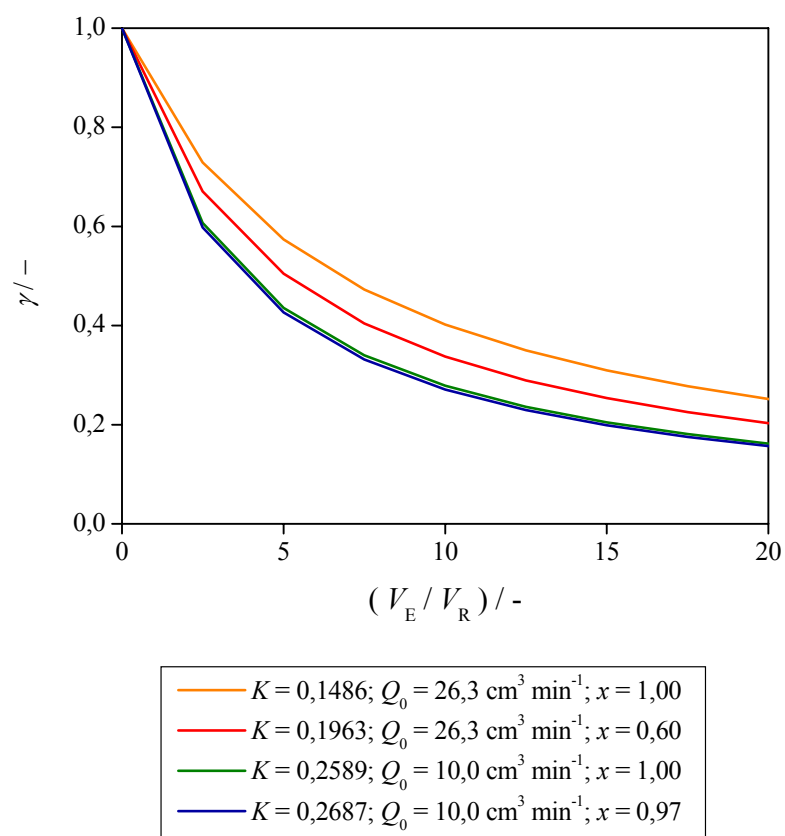
Tablica 4.19 Koeficijent raspodjele, učinkovitost separatora i učinkovitost rafinatne i ekstraktne faze pri  $Q_0 = 10,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  i  $x \neq 1$ .

$K_{\text{eksperiment}} / -$	0,1842
$K_{\text{model}} / -$	0,2687
$x / -$	0,9652
$\eta / -$	0,6855
$\gamma^E / -$	0,2059
$\gamma^R / -$	0,7941

Usporedbom simulacija pretpostavljenog modela s eksperimentalnim rezultatima može se uočiti da je pri protoku  $Q_0 = 10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  postignuto zadovoljavajuće slaganje eksperimentalnih rezultata s modelom. Usporedbom procijenjenih parametara modela i učinkovitosti prikazanih u tablicama 4.18 i 4.19 vidljivo je da su koeficijenti raspodjele u slučaju kada je pretpostavka da je  $x = 1$  i u slučaju kada je  $x \neq 1$  približno jednaki, ali bitno različiti od onog procijenjenog u šaržnim eksperimentima. Učinkovitost procesa je nešto manja u odnosu na učinkovitost koja je postignuta pri protoku  $Q_0 = 26,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . To je zbog manje promjene omjera volumena faza koji je približno jednak onom pretpostavljenom pa se pretpostavka o jednakosti volumena faza može uvažiti.

Kako se BSA pretežno nakuplja u rafinatnoj fazi, da bi se postigla što veća učinkovitost rafinatne faze potrebno je primjeniti sustav takvog sastava pri kojem će vrijednost omjera volumena ekstraktne i rafinatne faze biti što manji, pri čemu će koeficijent raspodjele, usljed smanjenja volumena rafinatne faze, težiti prema manjim vrijednostima (slika 4.10).

Na slici 4.10 su prikazane učinkovitosti rafinatne faze u ovisnosti o koeficijentu raspodjele i omjeru volumena ekstrakte i rafinatne faze pri sljedećim uvjetima  $Q_0 = 26,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $Q_0 = 10,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $x = 1$  i  $x \neq 1$ .



Slika 4.10 Utjecaj koeficijenta raspodjele i omjera volumena faza na učinkovitost u rafinatnoj fazi pri  $Q_0 = 26,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $Q_0 = 10,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $x = 1$  i  $x \neq 1$ .

## **5. ZAKLJUČAK**

Određene su ravnotežne značajke vodenog dvofaznog sustava PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Definirani su parametri genetskog algoritma i funkcija usklađenosti.

Koeficijent raspodjele BSA je optimiran pomoću genetskog algoritma kroz pet generacija. Dobiven je optimalni koeficijent raspodjele  $K = 0,0874$  koji je postignut pri sljedećim uvjetima pH = 5,5; koncentraciji otopine BSA,  $c_{BSA} = 1,5\text{mgcm}^{-3}$ ; masenom udjelu PEG-a,  $w_{PEG} = 0,1138$  i masenom udjelu amonij - sulfata,  $w_{AMS} = 0,0970$ ;  $TLL = 18$ .

Postavljena je aparatura i razvijen je proces ekstrakcije proteina BSA u laboratorijskom separatoru tipa mješač - taložnik.

Pretpostavljen je dinamički matematički model procesa ekstrakcije u vodenom dvofaznom sustavu za laboratorijski separator tipa mješač - taložnik te je procijenjena konstanta brzine uspostave ravnoteže proteina BSA.

Usporedbom rezultata simulacije procesa pomoću modela i eksperimentalnih rezultata je pokazana primjenjivost modela za opisivanje procesa ekstrakcije proteina BSA u vodenom dvofaznom sustavu.

U ovom radu je pokazana mogućnost primjene ekstrakcije kao separacijske metode, pri čemu je u separatoru tipa mješač – taložnik postignuta učinkovitost od 71,2 %. Da bi se proces ekstrakcije mogao primjeniti u biotehnološkim procesima potrebno je zadovoljiti zahtjevima ekonomičnosti procesa, eksperimentalno istražiti ravnotežne značajke sustava, fizikalno - kemijske parametre, odrediti optimalne uvjete, odrediti značajke separatora, opisati kinetiku procesa itd.

## **6. LITERATURA**



1. Shioya S., Shimizu K., Yoshida T., Knowledge-Based Design and Operation of Bioprocess System, *J. Biosc. Bioeng.*, **1999**, 87, 261 – 266.
2. Bogdan S. , Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, **1997**
3. <http://www.zemris.fer.hr/~golub/ga/ga.html>
4. Chipperfield A., Fleming P., Pohlheim H., Fonseca C. Genetic Algorithm Toolbox, User's guide, version 1.2
5. Hoh C., Dudziak G., Liese A., Optimization of Enzymatic Synthesis of O-Glycan Core 2 Structure by Use of a Genetic Algorithm, *Bioorgan. Med. Chem.*, **2002**, 12, 1031 – 1034.
6. Gündüz U., Korkmaz K., Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration, *J. Chromatogr.*, **2000**, 743, 255 – 258.
7. Ranganath M., Renganathan S., Gokulnath C., Identification of bioprocesses using Genetic Algorithm, *Bioprocess. Eng.*, **1999**, 21, 123 – 127.
8. Weuster-Botz D., Experimental Design for fermentation Media Development: Statistical Design or Global Random Search, *J. Biosci. Bioeng.*, **2000**, 90, 473 – 483.
9. Weuster - Botz D., V. Pramatarova, G. Spassov, C. Wandrey, Use of Genetic Algorithm in the Development of a Synthetic Growth Medium for *Arthrobacter simplex* with High Hydrocortisone  $\Delta^1$ -Dehydrogenase Activity, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **1995**, 64, 386 – 392.
10. Andrews B. A., Asenjo J. A., Merchuk J. C., Salamanca M. H., On the kinetics of phase separation in aqueous two – phase systems, *J. Chromatogr.*, **1998**, 711, 319 – 329.
11. Kula M.R., Thömmes., Steffen B., Nellen F., Selber K., Investigation of mathematical methods for efficient optimisation of aqueous two – phase extraction, *J. Chromatogr.*, **2000**, 743, 21 – 30.
12. Rito – Palomares M., Solano – Castillo C., Kinetics of phase separation under different process and design parameters in aqueous two – phase system, *J. Chromatogr.*, **2000**, 743, 195 – 201.
13. Andrews B. A., Asenjo J., Graber A. T., Model for the partition of metal ions in aqueous two – phase systems, *J. Chromatogr.*, **2000**, 743, 57 – 64.
14. Lin D., Mei L., Yao S., Zhu Z., Wu Y., Modeling the protein partitioning in aqueous polymer two – phase systems: influence of polymer concentration and molecular weight, *Chem. Eng. Science*, **2003**, 58, 2963 – 2972.

15. Haynes C. A, Johansson H. O, Karlström G., Tjerneld F., Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two – phase systems, *J. Chromatogr.*, **1998**, 711, 3 – 17.
16. Kleinlanghorst L. B, Knieps E. A, Kula M. R., Rämisch C., Thömmes J., Aqueous two – phase systems containing urea: Influence on phase separation and stabilization of protein conformation by phase components, *Biotechnol. Prog.*, **1999**, 15, 493 – 499.
17. Ezawa M., Matsuyama K., Mishima K., Nagatani M., Takarabe S., Taruta Y., Interfacial tension of aqueous two – phase systems containing polyethylene glycol and dipotassium hydrogenphosphate, *J. Chromatogr.*, **1998**, 711, 313 – 318.
18. Jarudilokkul S., Paulsen E., Stuckey C. D., The hydrodynamics of graesser ("raining bucket") contactor with a reverse micellar phase, *Biotechnol. Prog.*, **2000**, 16, 1071 – 1078.
19. Asenjo J. A., Iribarren O. A., Montagna J. M., Pinto J. M., Vecchiotti A. R., Optimal design of protein production plants with time and size factor process models, *Biotechnol. Prog.*, **2000**, 16, 228 – 237.
20. <http://cs.felk.cvut.cz/~xobitko/ga/main.html>
21. [http://www.doc.ic.ac.uk/~nd/surprise\\_96/journal/vol4/tcw2/report.html](http://www.doc.ic.ac.uk/~nd/surprise_96/journal/vol4/tcw2/report.html)
22. <http://www.rennard.org/alife/english/gavintrgb.html>
23. <http://lancet.mit.edu/~mbwall/presentations/IntroToGAs/>
24. GALOP, User Manual for Program Version 1.24, **1995**
25. Rauscher, K., Voigt, J., Wilke, I., Wilke, K. Th. Chemische Tabellen und Rechentafeln fuer die analytische Praxis. VEB, Leipzig **1972**

## **7. POPIS SIMBOLA I OZNAKA**

$c$  – koncentracija tvari [ $\text{mol m}^{-3}$ ]

$K$  – koeficijent raspodjele [-]

$k$  – konstanta brzine uspostave ravnoteže [ $\text{min}^{-1}$ ]

$m$  – masa [kg]

pH – pH

$Q$  – protok [ $\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ ]

$T$  – temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]

$V$  – volumen [ $\text{m}^3$ ]

$w$  – maseni udio [-]

$x$  – kvocijent volumena faza [-]

$z$  – nabojni broj [-]

$\Delta\Phi$  – razlika potencijala [V]

$\lambda$  - valna duljina [nm]

$\gamma$  – učinkovitost faze [-]

$\eta$  – učinkovitost separatora [-]

$F$  – Faraday-eva konstanta [ $96487 \text{ C mol}^{-1}$ ]

$R$  – plinska konstanta [ $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ]

AMS – amonij - sulfat

$b$  – binarni broj

$c$  - križanje

BSA – bovine serum albumin

$d$  – duljina intervala

$dg$  – donja granica intervala

D - disperzija

E - ekstrakt

$F$  – usklađenost

$g$  – genetski operator

$gg$  – gornja granica intervala

GA – genetski algoritam

$H$  – shema

$k$  – koeficijent pravca

$l$  – odsječak pravca

$m$  – mutacija

mix – sekcija mješača

$n$  – veličina populacije

$o(H)$  – red sheme

$p$  – preciznost, vjerojatnost

$r$  - znak

PEG - polietilenglikol

R - rafinat

Q – točka sastava

$t$  – generacija

$TLL$  – duljina spojne linije

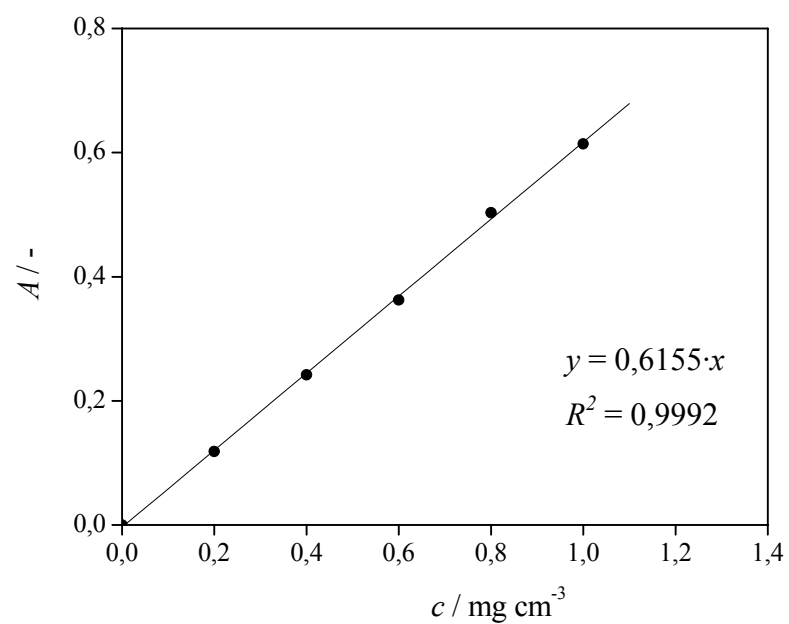
$v$  – binarni vektor

$\delta(H)$  – dužina sheme

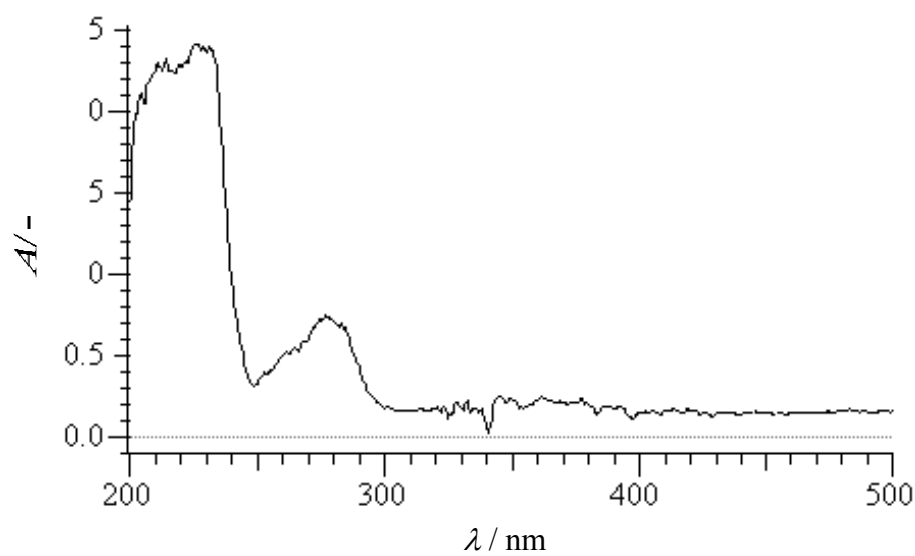
## **8. PRILOG**

{ PAGE }

Prilog 1. Baždarna krivulja: koncentracija BS albumin – apsorbancija



Prilog 2. "Wavelength scan" otopine BS albumin



Prilog 3. Algoritam za izračunavanje ravnotežnih koncentracija vodenog dvofaznog sustava PEG<sub>6000</sub> – H<sub>2</sub>O – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

```
clear;
clc;
%parametri

A = 0,66377;
B = 15,224;
C = 75,499;
k = -2,2089;
d = 0,18;

for l = 0,3000:0,001:0,515
    x1 = 0;
    x2 = 0;
    for x = 0,01:0,001:0,235
        y1 = k*x+1;
        y2 = A*exp(-(B*x+C*x,^2));

        if abs(y1-y2)<=0,01 & y1 >= 0
            if x1>0
                x2 = x;
            else
                x1 = x;
            end
        end
    end

    if abs(abs(x2-x1)-(d/(sqrt(1+k,^2))))<=,001 & x1>0 & x2>0
        x1
        x2
        z1 = x1*k+1;
        z2 = x2*k+1;
        z1
        z2
        l
        break
    end
end
end
```



Prilog 4. Algoritam za procijenu parametra modela.

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: wbr,wbe
```

```
Params: k1,K
```

```
Mo=26.3
```

```
M1=Mo
```

```
M2=0.55*Mo
```

```
M3=0.45*Mo
```

```
mtr=98.65
```

```
mte=98.65
```

```
mm=103.3
```

```
wb=0.0015
```

```
wbe' =-wbe*(M2/mte)+k1*(2*wb*K/(K+1)-wbe)
```

```
wbr' =wb*(M1/mtr)-wbr*(M3/mtr)-(k1/mtr)*(2*wb*mte*K/(K+1)-mte*wbe)
```

```
k1=0.22514
```

```
K=0.0874
```

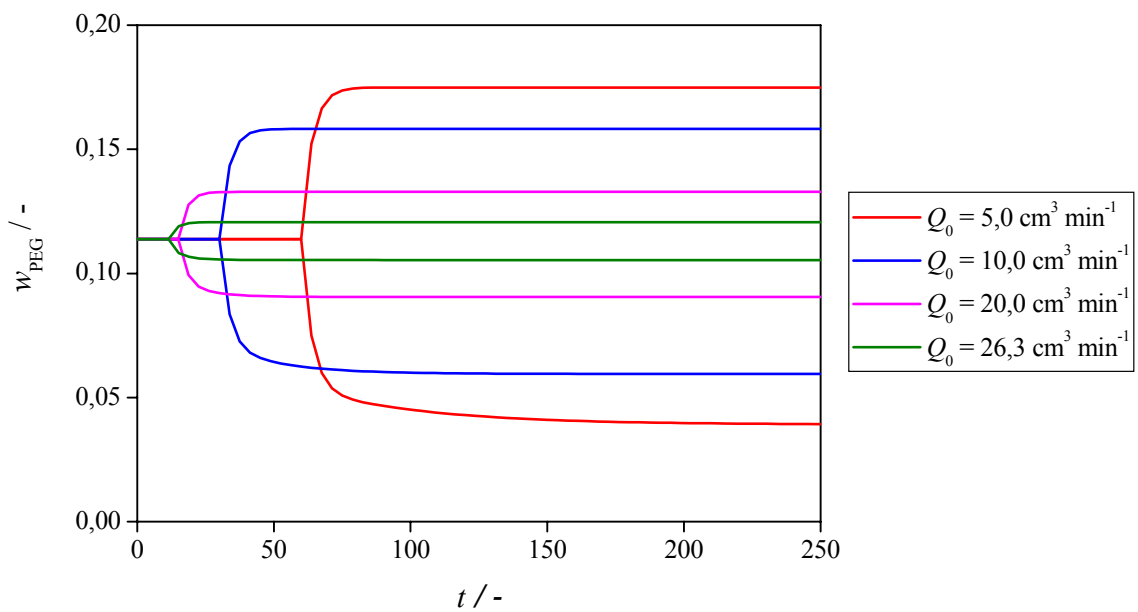
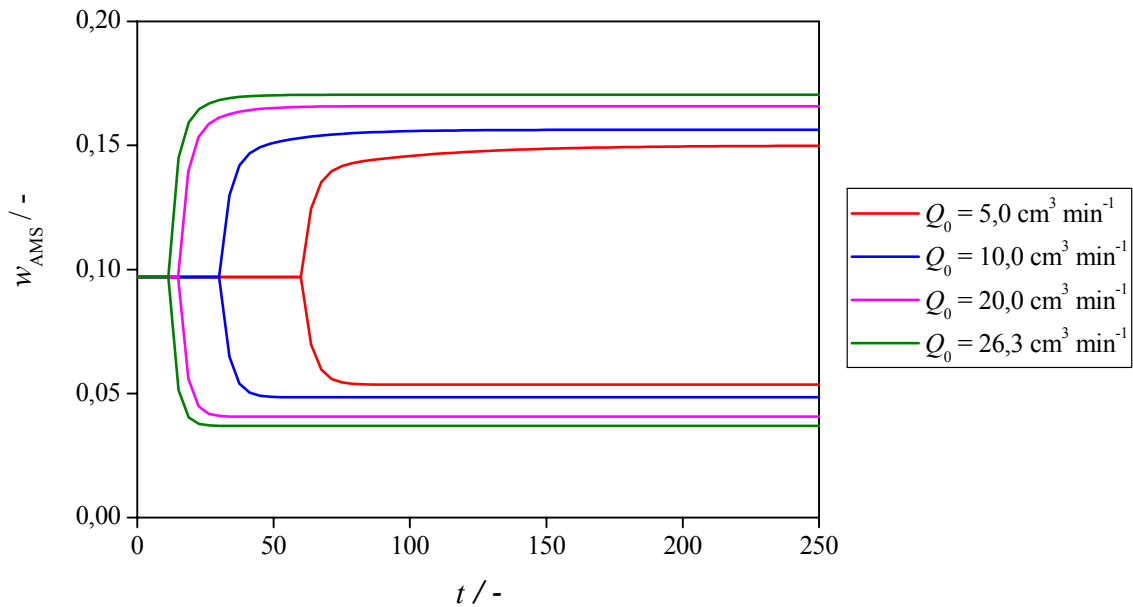
```
t=0
```

```
wbe=0.0015
```

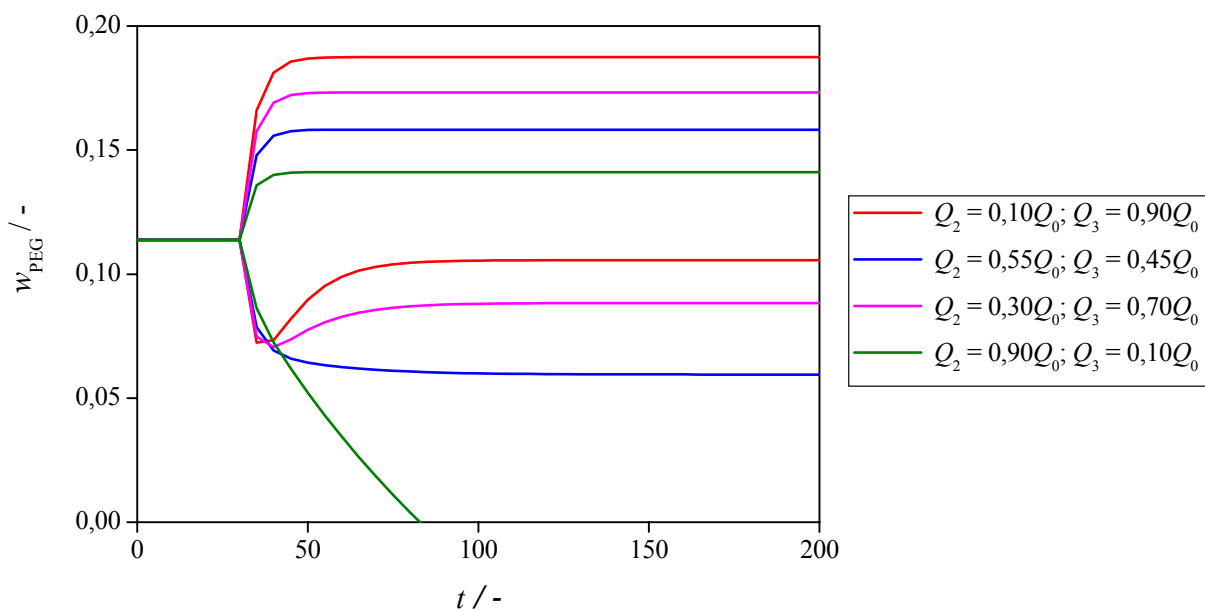
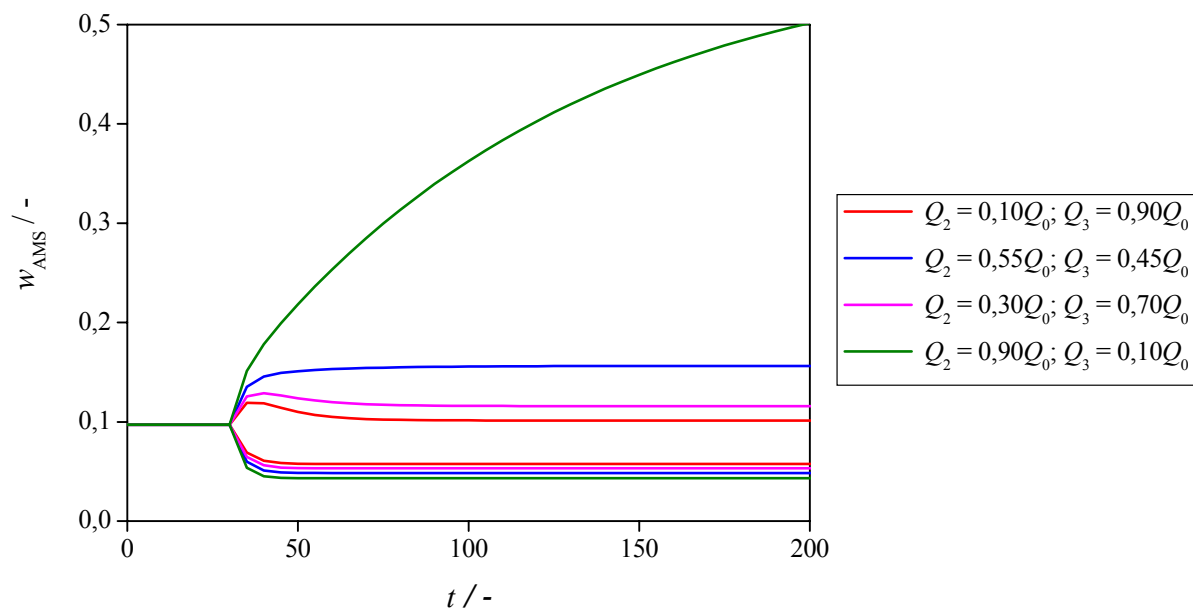
```
wbr=0.0015
```

```
***
```

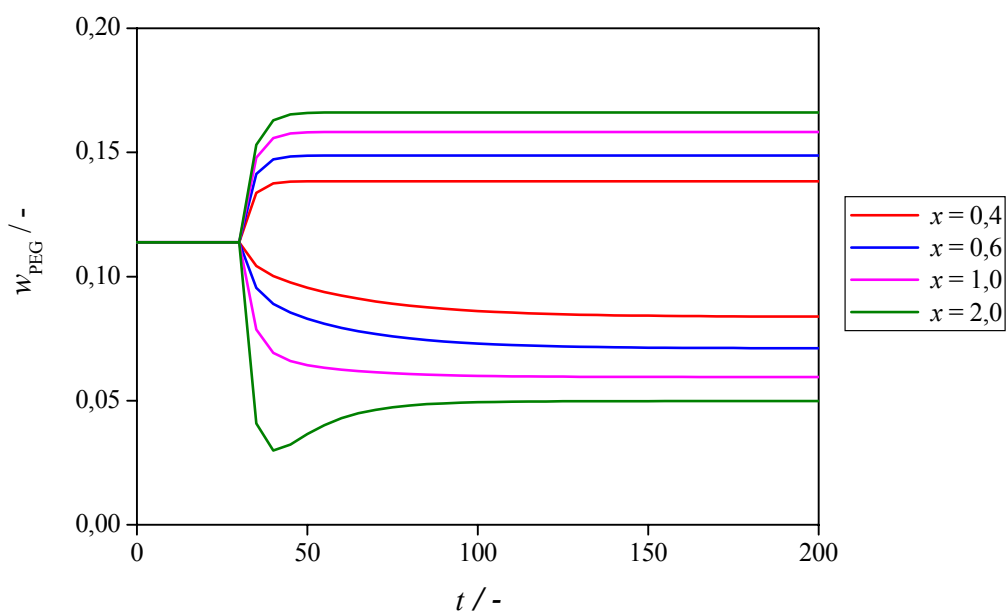
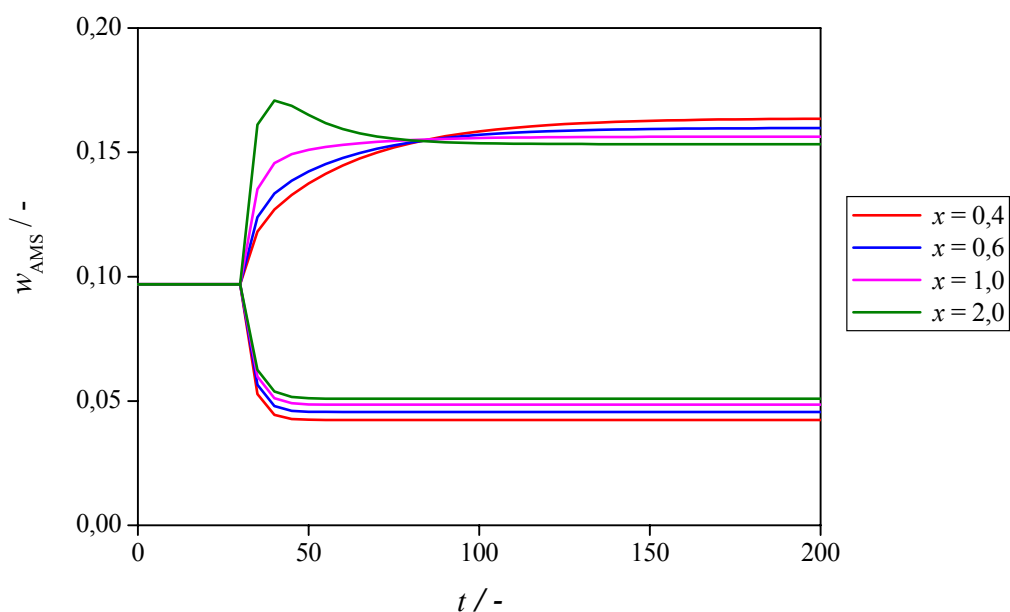
Prilog 5. Simulacije procesa kontinuirane ekstrakcije u separatoru tipa mješač – taložnik za PEG i amonij - sulfat u sekciji mješača i sekciji taložnika pri različitim protocima,  $Q_0$ , pri čemu su:  $Q_2 = 0,55 \cdot Q_0$ ;  $Q_3 = 0,45 \cdot Q_0$  i  $x = 1$ .



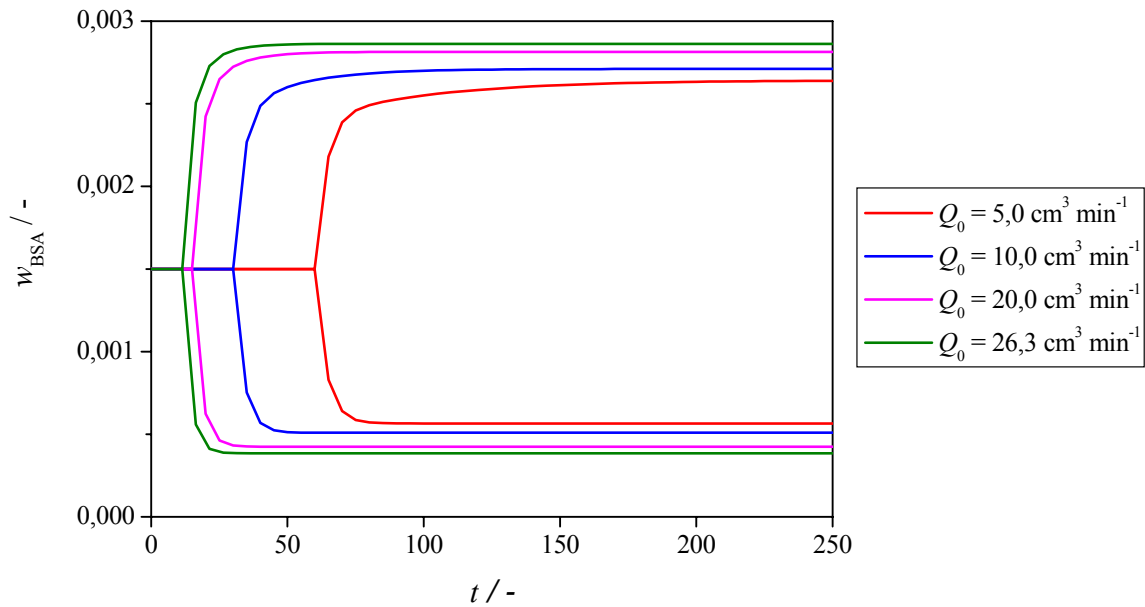
Prilog 6. Simulacije procesa kontinuirane ekstrakcije u separatoru tipa mješač – taložnik za PEG i amonij - sulfat u sekciji mješača i sekciji taložnika pri različitim protocima,  $Q_2$ ,  $Q_3$ , pri čemu su:  $Q_0 = 10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  i  $x = 1$ .



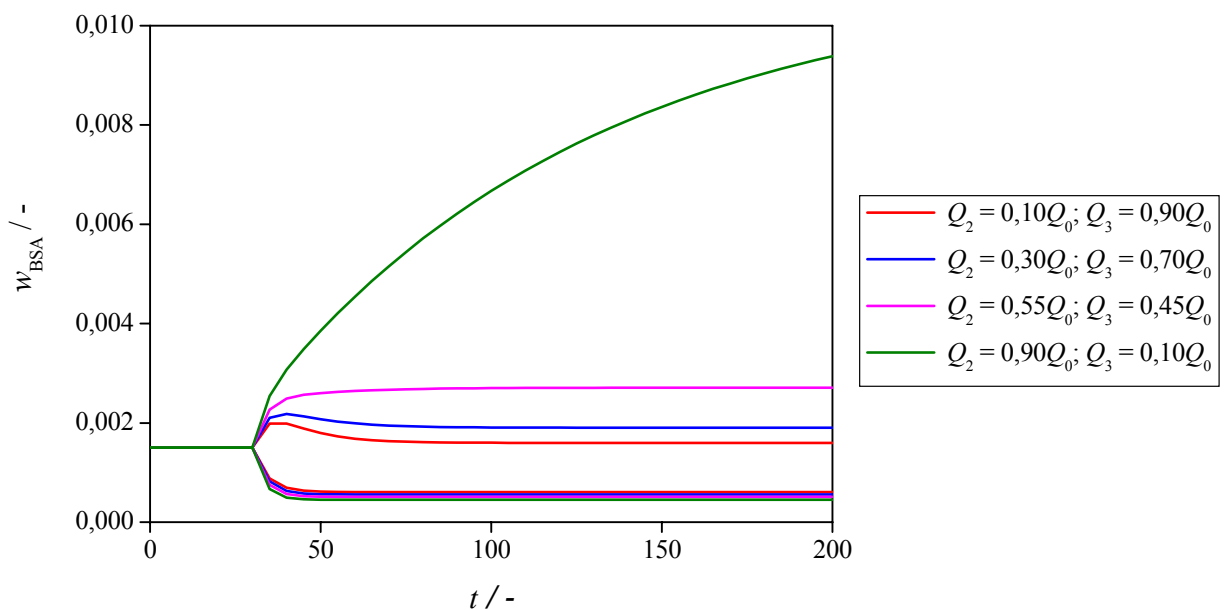
Prilog 7. Simulacije procesa kontinuirane ekstrakcije u separatoru tipa mješač – taložnik za PEG i amonij - sulfat u sekciji mješača i sekciji taložnika za različite omjere volumena faza,  $x$ , pri čemu su:  $Q_0 = 10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ;  $Q_2 = 0,55 \cdot Q_0$ ;  $Q_3 = 0,45 \cdot Q_0$  i  $x = 1$ .



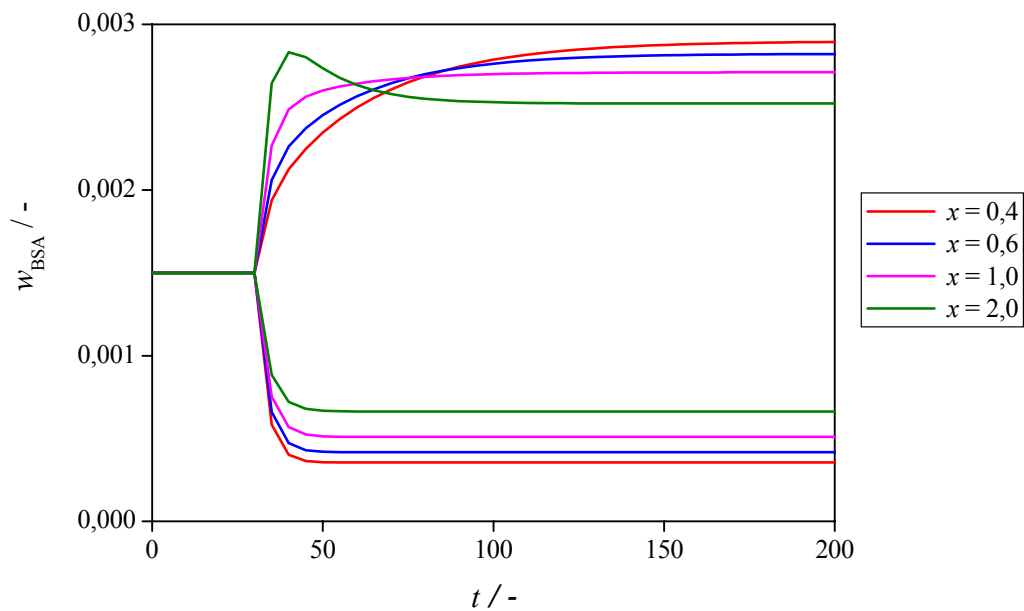
Prilog 8. Simulacije procesa kontinuirane ekstrakcije u separatoru tipa mješač – taložnik za BSA u sekciji mješača i sekciji taložnika pri različitim protocima,  $Q_0$ , pri čemu su:  $Q_2 = 0,55 \cdot Q_0$ ;  $Q_3 = 0,45 \cdot Q_0$  i  $x = 1$ .



Prilog 9. Simulacije procesa kontinuirane ekstrakcije u separatoru tipa mješač – taložnik za BSA u sekciji mješača i sekciji taložnika pri različitim protocima,  $Q_2$ ,  $Q_3$ , pri čemu su:  $Q_0 = 10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  i  $x = 1$ .



Prilog 10. Simulacije procesa kontinuirane ekstrakcije u separatoru tipa mješač – taložnik za BSA u sekciji mješača i sekciji taložnika za različite omjere volumena faza,  $x$ , pri čemu su:  $Q_0 = 10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ;  $Q_2 = 0,55 \cdot Q_0$ ;  $Q_3 = 0,45 \cdot Q_0$  i  $x = 1$ .



## ŽIVOTOPIS

*Dubravka Maretić rođena je 20. ožujka 1979. godine u Puli. Osnovnu školu Stoja završava u Puli nakon čega upisuje Opću gimnaziju Pula. 1999. godine upisuje se na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Tijekom studiranja dobiva državnu stipendiju. Sudjelovala je na V. susretu mladih kemijskih inženjera 2004. godine. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije završava 2004. godine.*

Naziv datoteke:       Diplomski rad  
Imenik:                C:\Documents and Settings\Bruno1\My Documents\My  
                          Documents\Nastava\Diplomski\_radovi\Dubravka\_Maretić  
Predložak:            C:\Documents and Settings\Bruno1\Application  
                          Data\Microsoft\Predlošci\Normal.dot  
Naslov:                SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
Predmet:  
Autor:                 Dubravka  
Ključne riječi:  
Komentari:  
Datum stvaranja:     29/09/2004 8:13 AM  
Broj promjene:        2  
Posljednje spremanje dana: 29/09/2004 8:13 AM  
Posljednji spremio:  Dubravka  
Ukupno vrijeme uređivanja: 3 min.  
Posljednji ispis datuma: 29/09/2004 12:51 PM  
Prema posljednjem potpunom ispisu  
    Broj stranica:     87  
    Broj riječi:       14.465 (cca.)  
    Broj znakova:     82.453 (cca.)