

**Автоматизированная система управления
процессом биосинтеза ферментов**

к.т.н. доц. Зубов Д.В., Толченев А.А.

Университет машиностроения

zubov@msuie.ru

Аннотация. Рассмотрен процесс получения кормовой добавки, содержащей ферментный комплекс. Создана математическая модель процесса, предложена система автоматизации и определения оптимального времени прекращения процесса.

Ключевые слова: математическое моделирование биотехнологических процессов, автоматизация биотехнологических производств.

В настоящее время в России стоит проблема переработки послеспиртовой барды: завод по производству этанола мощностью 42000 дал/сутки ежедневно производит порядка 5000 тонн содержащей жидкой барды, причем из них перерабатывается не более 5%. Невостребованную барду большинство предприятий стараются слить в близлежащие водоемы либо на поля, что серьезно ухудшает экологическую ситуацию вокруг спиртзаводов. Проблема усложняется тем, что барда – скоропортящаяся жидкость и становится зараженной посторонней микрофлорой в течение нескольких часов.

Одним из способов решения данной проблемы является переработка барды в кормовой продукт [1, 2] с помощью целлюлозоразрушающих бактерий рода *Cellulomonas*, которые характеризуются способностью экскретировать в среду эндоглюконазы – фермент, преобразующий содержащуюся в барде целлюлозу в углеводы (сахара – смесь моносахаридов и дисахаридов), которые усваивает микроорганизм.

Послеспиртовая барда (нестерильная, но содержащая весьма мало контаминантов) поступает в предварительно простерилизованный ферментёр. Стерилизация всей среды не имеет смысла, т.к. резко удорожает проведение процесса (энергозатраты на прогрев барды, стерилизацию подаваемого воздуха и т.д.), и вследствие малой продолжительности процесса (порядка 50 часов) контаминанты не успевают развиться до заметных концентраций. Стерилизация же аппарата необходима для устранения потенциальных очагов заражения. Среда в ферментёре доводится подачей титранта до необходимого значения показателя pH, после чего вносится из посевного ферментёра порция среды, содержащей микроорганизмы рода *Cellulomonas* и выработанный ими ферментный комплекс. Микроорганизмы, попадая в благоприятную среду, выделяют комплекс целлюлатических ферментов – эндоглюконаз, которые расщепляют целлюлозу (полимер) на короткие углеводы (сахара), которые могут быть питательным субстратом. Таким образом, идёт рост (и параллельно ему – отмирание) биомассы, потребление сахаров, синтез (и параллельно ему – инактивация) фермента, превращение целлюлозы в сахара. Конечный продукт – кормовая добавка: смесь остатков целлюлозы с биомассой и ферментом.

Процесс периодический (ввиду опасности заражения посторонней микрофлорой), в ходе процесса подаётся воздух для поддержания концентрации растворённого кислорода, поддерживаются на заданных уровнях температура (подачей охлаждающей воды в рубашку) и показатель pH. Схема основных контуров автоматизации приведена на рисунке 1.

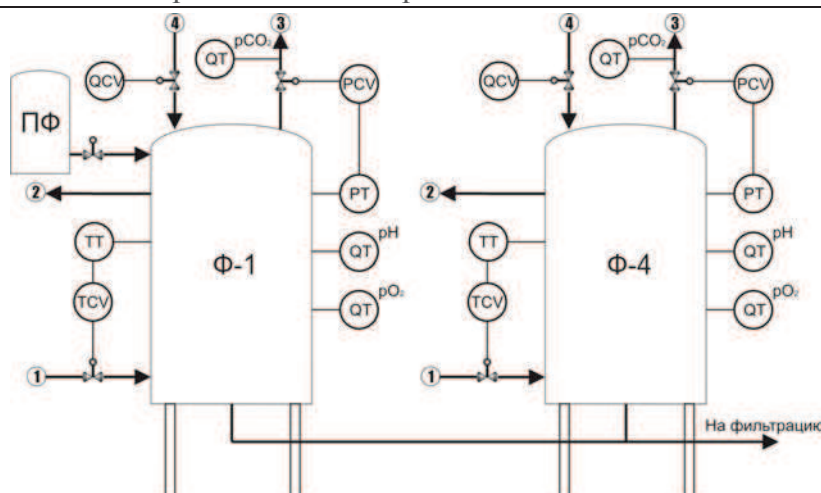


Рисунок 1. Схема автоматизации процесса промышленной ферментации:
 1, 2 – подача и отвод охлаждающей воды; 3 – линия отходящих газов; 4 – линия подачи подпитков; ПФ – посевной ферментёр; Φ1-4 – батарея ферментёров

Для оптимизации процесса составим его математическую модель [2].

Материальный баланс по биомассе запишем с использованием уравнения Моно-Иерусалимского:

$$\frac{dX}{dt}(X, S) = \frac{\mu_m SX}{K_s + S} - Q(X, S),$$

где X – концентрация биомассы, г/л; S – концентрация сахаров, потребляемых микроорганизмами, Q – скорость отмирания биомассы г/л·час; μ_m – максимальная удельная скорость роста, час⁻¹; K_s – параметр модели.

Скорость отмирания биомассы запишем по уравнению Колпикова:

$$Q(X, S) = \frac{\mu_d X}{1 + S/K_d},$$

где μ_d – максимальная удельная скорость диссимилиации при нулевой концентрации субстрата, час⁻¹; K_d – константа субстратного ингибирования процесса диссимилиации.

Скорость преобразования биодоступной целлюлозы в сахара, поскольку это ферментативная реакция, запишем по уравнению Михаэлис-Ментен:

$$\frac{dC}{dt}(C, E) = -\frac{\alpha EC}{K_m + S},$$

где C – концентрация биодоступной целлюлозы, г/л; E – концентрация фермента, Еа/л (концентрацию фермента принято указывать в единицах активности Еа, в данном случае за Еа принято количество фермента, катализирующего превращение 1 г субстрата за 1 минуту при концентрации субстрата 1 г/л), α , K_m – параметры модели.

Материальный баланс по ферменту запишем с использованием уравнения Андрюса, с учётом деградации фермента:

$$\frac{dE}{dt}(X, S, E) = \frac{K_{EP} SX}{K_f + S + S^2/K_i} - \beta E,$$

где K_{EP} , K_f , K_i – параметры модели, характеризующие биосинтез фермента, β – параметр модели, характеризующий деградацию фермента.

Совместное решение уравнений модели приведено на рисунке 2.

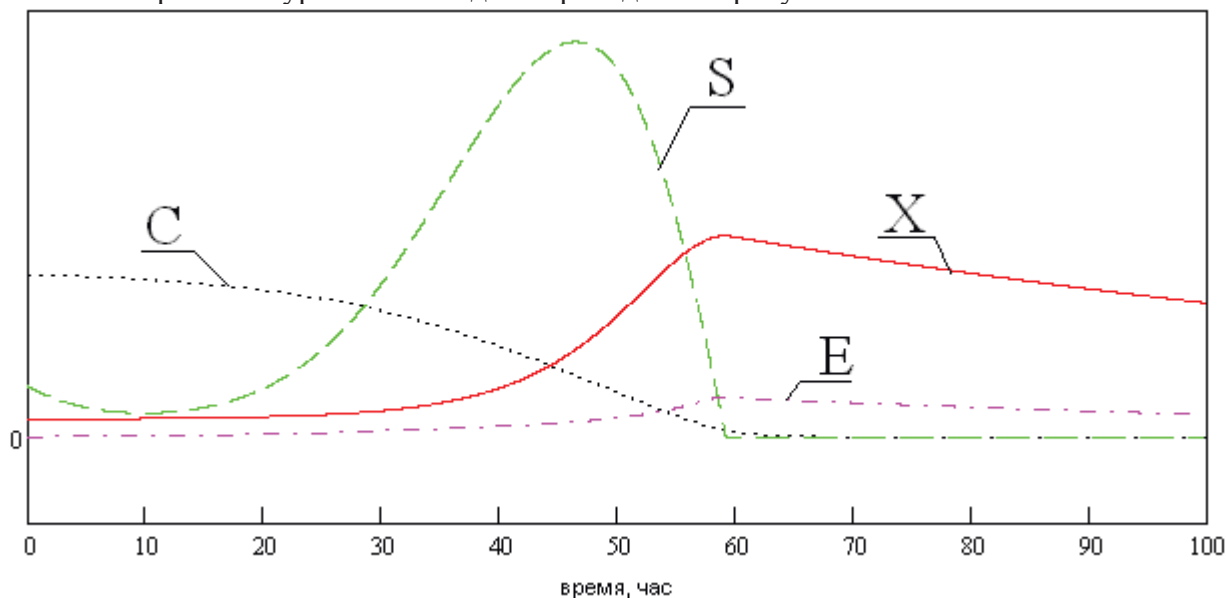


Рисунок 2. Зависимость концентраций от времени в процессе биосинтеза

Задавшись величинами стоимостей сырья, энергоресурсов и продукции как функции от продолжительности процесса (см. рисунок 3), получим, что существует оптимальная продолжительность процесса, которая почти совпадает с моментом времени, когда концентрация сахаров выходит на стационарное значение вблизи 0.

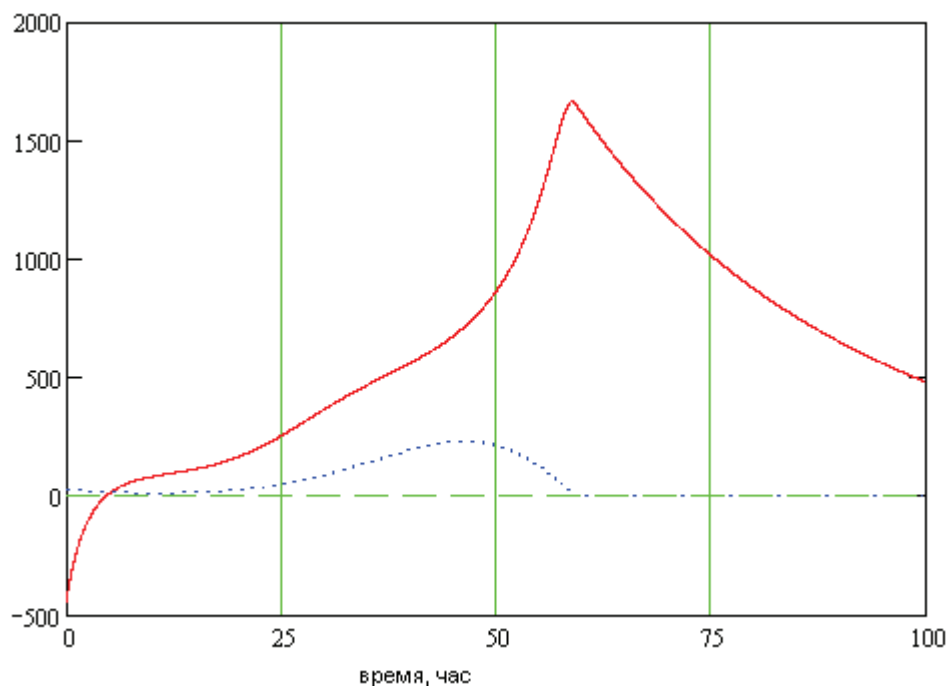


Рисунок 3. Зависимость удельной прибыли (руб/час) от продолжительности процесса

Логично прекращать процесс в этот момент времени, однако сложность в том, что основные показатели качества проведения процесса (концентрации ферментов, сахаров, биомассы) определяются с существенными погрешностями и запаздыванием в несколько часов.

В работах [3, 4] предложены компьютеризованные модификации методик анализов проб на содержание углеводов и ферментов, которые существенно повысили точность анализа, но его продолжительность по-прежнему составляет порядка нескольких часов при определении активности ферментов и не менее 30-40 мин при определении концентрации углеводов (в данном случае – сахаров). В этом случае может помочь использование модели. Но построение аналитической модели сопряжено с рядом трудностей:

– при помощи химического анализа определяется концентрация всей целлюлозы, поэтому исходную концентрацию биодоступной целлюлозы можно узнать только когда процесс закончится;

– ряд параметров модели (β, μ_d) можно определить в отдельных экспериментах, но параметрическая идентификация всего процесса сводится к задаче минимизации функции многих переменных. Значительные вычислительные трудности возникают по причине многоэкстремальности задачи, наличие нескольких близких по качеству решений в различных областях пространства параметров осложняет поиск глобального экстремума и препятствует эффективному применению итерационных методов.

Учитывая зашумлённость исходных данных, можно предложить аппроксимировать экспериментально определённую концентрацию сахаров (обозначим её как y^3) гауссианом 2-го порядка:

$$y = a_1 \exp\left(-\left(\frac{x_i - b_1}{c_1}\right)^2\right) + a_2 \exp\left(-\left(\frac{x_i - b_2}{c_2}\right)^2\right),$$

где $a_1, a_2, b_1, b_2, c_1, c_2$ – параметры, которые можно найти с помощью МНК.

Запишем функцию невязки:

$$F(a_1, a_2, b_1, b_2, c_1, c_2) = \sum_{i=0}^N \left(a_1 \exp\left(-\left(\frac{x_i - b_1}{c_1}\right)^2\right) + a_2 \exp\left(-\left(\frac{x_i - b_2}{c_2}\right)^2\right) - y_i^3 \right)^2 \rightarrow \min_{a_1, a_2, b_1, b_2, c_1, c_2}$$

Поскольку задача является выпуклой, найдём параметр a_1 из уравнения:

$$\frac{\partial F}{\partial a_1} = \sum_{i=0}^N \left(a_1 \exp\left(-\left(\frac{x_i - b_1}{c_1}\right)^2\right) + a_2 \exp\left(-\left(\frac{x_i - b_2}{c_2}\right)^2\right) - y_i \right) \exp\left(-\left(\frac{x_i - b_1}{c_1}\right)^2\right) = 0$$

$$a_1 \sum_{i=0}^N \left(\exp\left(-\left(\frac{x_i - b_1}{c_1}\right)^2\right) \right)^2 + a_2 \sum_{i=0}^N \left(\exp\left(-\left(\frac{x_i - b_2}{c_2}\right)^2\right) \exp\left(-\left(\frac{x_i - b_1}{c_1}\right)^2\right) \right) - \sum_{i=0}^N \left(y_i \exp\left(-\left(\frac{x_i - b_1}{c_1}\right)^2\right) \right) = 0$$

Аналогично получаем для параметра a_2 :

$$a_1 \sum_{i=0}^N \left(\exp\left(-\left(\frac{x_i - b_1}{c_1}\right)^2\right) \right)^2 + a_2 \sum_{i=0}^N \left(\exp\left(-\left(\frac{x_i - b_2}{c_2}\right)^2\right) \exp\left(-\left(\frac{x_i - b_2}{c_2}\right)^2\right) \right) - \sum_{i=0}^N \left(y_i \exp\left(-\left(\frac{x_i - b_2}{c_2}\right)^2\right) \right) = 0$$

Полученные уравнения образуют линейную систему, решая которую можно найти a_1 и a_2 .

Параметры b_1, b_2, c_1, c_2 можно найти численно, например методом сканирования.

Таким образом, можно по данным 6 проб определить параметры $a_1, a_2, b_1, b_2, c_1, c_2$ и построить аппроксимирующий гауссиан 2-го порядка, который можно использовать для экстраполяции на 2-3 часа вперёд концентрации сахаров и таким образом оперативно находить время оптимального слива ферментационной среды.

Литература

1. Тулякова Т.В., Мордвинова Е.М., Сергеева А.В., Пасхин А.В. Способ переработки спиртовой барды в кормовой продукт. Патент РФ 2384203
2. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. - М.: КолосС, 2004 - 296 с.
3. Зубов Д.В., Толченев А.А. Экспресс-методика контроля активности ферментного комплекса // Вестник Саратовского государственного технического университета. 2012. Т. 1. № 2с. с. 389-392.
4. Зубов Д.В., Парамонов Е.А. Применение компьютерной обработки изображения для повышения точности анализа методом тонкослойной хроматографии // Инженерная физика. – 2008 №4 –с.53-58

Автоматизация стендового комплекса для изучения фототрофов и анализ возможностей повышения энергоэффективности процесса

к.т.н. доц. Зубов Д.В., Строков С.С.
Университет машиностроения
zubov@msuie.ru

Аннотация. Рассмотрено создание системы автоматизации стендового комплекса для изучения фототрофов. Проведён анализ возможностей снижения энергозатрат.

Ключевые слова: автоматизация биотехнологических установок, энергосбережение, фотозависимые микроорганизмы.

В традиционных процессах культивирования аэробных микроорганизмов основные энергозатраты приходятся на:

- перемешивание культуральной среды (для обеспечения массообмена с подаваемым на аэрацию воздухом, при этом среда может обладать значительной вязкостью);
- стерилизацию (как правило – термическую) аппаратов, питательных сред и подпиток;
- компримирование аэрирующего воздуха (расход аэрирующего воздуха примерно равен 1 объёму воздуха на 1 объём культуральной среды в минуту, при стерильном проведении процесса его приходится сжимать до 1,5–2,2 атм, которые теряются при прохождении стерилизующих фильтров и культуральной среды);
- стабилизацию температуры культуральной среды (как правило, путём подачи охлаждающей воды в рубашку аппарата).

При проведении фотозависимых процессов появляются дополнительные энергозатраты на освещение культуральной среды, которые можно существенно снизить, выбрав оптимальный режим освещения.

Изменение уровня освещённости среды течения процесса может быть целесообразным при периодическом культивировании фототрофных микроорганизмов – микроводорослей: при увеличении концентрации микроводорослей повышается оптическая плотность среды и на одну клетку микроводорослей в среднем приходится меньше световой энергии, необходимой для фотосинтеза органических веществ из углекислого газа. Соответственно, имеет смысл увеличивать освещённость в ходе процесса. Аналогичные соображения применимы для фотозависимых микроорганизмов (биосинтез в которых зависит от уровня освещённости), например дрожжей *Phaffia rhodozyma* [1]. При выборе режима освещения нужно учитывать, что высокий уровень освещённости может угнетать микроорганизмы и разрушать накопленные в культуральной среде продукты биосинтеза.

Другим способом снижения затрат на освещение является применение импульсных режимов [2]. Известно, что в процессе фотобиосинтеза можно выделить несколько стадий –