

Automatizovaný systém riadenia submerznej fermentácie kyseliny citrónovej

665.127
665.122

RNDr. JOZEF KOČAN, Slovenské škrobárne, Trnava

Ing. IUDOVÍT BOHÁČIK, Ing. STANISLAV KRČMÁŘ, Výskumný ústav Liehovarov a konzervární, Bratislava

Kľúčové slová: *kyselina citrónová (KC), Aspergillus niger, submerzná fermentácia, referenčná jednotka KC, matematický model procesu, biomasa, simulácia, hardware riadiaceho systému, software riadiaceho systému, fermentačné médium, produkčné bunky, deaktivované bunky, dusíkatý zdroj, fermentor*

V truste VHJ Liehovary a konzervárne (LIKO), Bratislava je v súčasnosti rozpracovaných niekoľko biotechnológií. Predovšetkým sa jedná o kvasničné bielkoviny, enzýmy, kyselinu citrónovú a niektoré organické kyseliny (kójová, mliečna). Kyselina citrónová (KC) má medzi týmito technológiami významné miesto. KC sa v Československu získava už od r. 1924 fermentačnou cestou z povrchovej fermentácie plesne *Aspergillus niger*. Táto technológia je v súčasnosti už prekonaná. Nastupuje oveľa progresívnejšia submerzná technológia. Svedčí o tom i ten fakt, že asi 80 % svetovej produkcie KC je už zo submerzného procesu. Vo VÚ LIKO je rozpracovaná projektová príprava tzv. referenčnej jednotky submerznej fermentácie KC o kapacite 1 500 ton za rok s objemom fermentačných nádob 150 m³ a 200 m³.

Prednosti submerznej fermentácie oproti povrchovému spôsobu sú predovšetkým v možnosti totálneho nasadenia meracej a automatizačnej techniky. Komplexne monitorovaný a riadený proces je potom schopný dávať väčšie výťažky, vyššiu kvalitu, klesajú nároky na energiu a pracovné sily. V tomto procese platí ale i to, že bez nasadenia meracej a automatizačnej techniky je optimálne riadenie procesu prakticky nemožné.

Pri realizácii referenčnej jednotky KC sa vypracovanie automatizovaného systému riadenia stalo jednou z kľúčových úloh. Vo VÚ LIKO sme rozpracovali matematický model procesu. Pomocou matematického modelu sme sa pokúsili o simuláciu procesu a jeho optimalizáciu. Návrh „hardware“ pre riadenie procesu vychádza zo simulácií a spočíva v návrhu meraných a regulovaných miest.

Analýza procesu

Analyzuje sa proces fermentácie vláknitej mikroskopické plesne *Aspergillus niger* na glycidovom substráte. Fermentačná produkcia KC sa z hľadiska riadenia procesu člení

— na prípravu základného fermentačného média s redukovaným obsahom stopových prvkov a definovanou koncentráciou amóniových a fosfátových iónov; je to proces kontinuálny a úlohou AS RTP (automatický systém riadenia technologických procesov) je stabilizácia charakteristických premenných veličín (pH, ORP — oxido-redukčný potenciál), teploty, koncentrácie;

— prípravu vegetatívneho inokula; za podmienok optimálneho miešania a prevzdušňovania sterilným vzduchom sa v sterilnom médiu uskutočňuje prechod produkčného mikroorganizmu z pokojovej formy - konfidiospór do formy morfoloogicky a biochemicky diferencovanej — vláknitých útvarov (hýf), vytvárajúcich postupne zložitú agregáciu — pelety; proces je podmienený nielen parametrami fermentačného média (pH, ORP, pO₂, teplota, koncentrácia živín, intenzita miešania a aerácie), ale aj (a to v rozhodujúcej miere) kvalitou konfidiospór. Z hľadiska AS RTP ide o diskontinuálny proces (batch proces) — optimalizujúci sa na základe morfoloogických indikácií rýchlosti syntézy biomasy. Výsledným produktom je vegetatívne inokulum. Inokulácia fermentera, v ktorom sa tento proces uskutočňuje, inicializuje časovú bázu procesu.

— produkčnú fermentáciu — typický dvojfázový proces, pri ktorom najprv pokračuje za podmienok definovaných hodnotami pH, ORP, teploty, pO₂ a koncentrácií glycidov, amóniových a fosfátových iónov, biosyntéza mycélia vo forme peliet, pričom sa optimalizuje rýchlosť nárastu biomasy korekčnými prídavkami roztokov látok korigujúcich priebeh pH, ORP (oxido-redukčný potenciál), pO₂, pNH₃, a P₂O₅. Pritom sa trvale monitoruje hodnota rýchlosti spotreby kyslíka (OUR), rýchlosti produkcie oxidu uhličitého (CRP) a koncentrácie glycidového substrátu S; z údajov sa na základe bilančných vzťahov určuje aktuálna koncentrácia biomasy X.

Syntéza matematického modelu

I keď sú rozdiely v názoroch na kvantitatívne vyjadrenie podielu jednotlivých vetiev metabolizmu a mechanizmu regulácie kľúčových alosterických enzýmov, možno z biochemického hľadiska formulovať tieto základné aspekty modelu.

1. ovplyvňovanie toku intermediátov premeny glycidu cez glykolytickú dráhu s alosterickým enzýmom fosfofruktokinázou, slúžiacou ako zdroj C₄ a C₂ prekurzorov syntézy citrátů a cez pentózofosfátový cyklus, produkujúci prekurzory DNA a RNA, látok podmieňujúcich vzrast biomasy; výrazne sa tu prejavuje efekt iónov Mn²⁺;

2. spätnoväzbová kontrola fosfofruktokinázy citrátom a ATP (negatívna), PO₄³⁻, NH₄⁺ a c-AMP (pozitívna);

3. necitlivosť pyruvátkarboxylázového komplexu na vyššiu koncentráciu acetyl-KoA Wood-Werkmanovou reakciou;

4. podkovovitá forma Krebsovho cyklu v dôsledku regresie aktivity 2-oxoglutarátdehydrogenázy nedostatkom Mn²⁺ iónov.

Inými slovami povedané, pokiaľ je vo fermentačnom médiu k dispozícii dostatok iónov Mn²⁺, Cu²⁺ a Fe²⁺ ako aj NH₄⁺ a PO₄³⁻, prebieha syntéza biomasy a aktívne pracujú pentózový cyklus a glukózooxidázy; pH roztoku klesá v dôsledku spotreby NH₄⁺ (uvoľňuje sa zo solí H₂SO₄, HNO₃) a produkcie kyseliny glukónovej.

Akonáhle sa živiny (najmä NH₄⁺) prakticky vyčerpajú aktivita pentózofosfátového cyklu klesá na minimum a limituje sa biosyntéza prekurzorov rastu a tvorba hmoty je vyvolaná akumuláciou glycidu (lipidy, chitín). Súčasne však intracelulárny poolový NH₄⁺ alebo PO₄³⁻ spolu s c-AMP prekonáva negatívne alosterické ovplyvnenie aktivity fosfofruktokinázy, čo vedie k nadprodukcii pyruvátu a tým aj oxalacetátu. Vysoká koncentrácia acetyl-KoA a oxalacetátu dovoľuje naplniť kapacitu citrátůsyntetázy, ale vo vratnej reakcii aj malálddehydrogenázy a tak sa ustália rovnovážne koncentrácie

intermediátov Krebsovho cyklu a dôjde k modifikácii mitochondriálnej a bunkovej membrány, vedúcej k sekrécii kyseliny citrónovej do média.

Pokles pH v dôsledku sekrécie KC do média spôsobí pokles aj vnútrobunkového pH, citlivo reagujú enzýmy cytoplazmy — najmä systém pyruvátkarboxylázy a rýchlosť sekrécie KC klesá. Súčasne sa však inhibuje izocitrátová dehydrogenáza a kyselina citrónová sa ďalej neodbúrava. Nízke hodnoty pH samozrejme ovplyvňujú aj rovnovážnu koncentráciu rozpustného CO₂ a tým opäť priebeh Wood-Werkmanovej fixácie CO₂ pyruvátkarboxylázovým komplexom.

Uvedené skutočnosti nemôže postihnúť jednoduchý model, a preto treba použiť model segregatívny, kde sa uplatní diferenciácia napr. z fyziologického hľadiska, ktorú uplatňujeme aj v našom prípade.

Bunky s výraznou reprodukčnou aktivitou (rastové bunky) sa premieňajú na produkčné bunky v podmienkach deficitu dusíka; avšak v dôsledku spojenia buniek do hýf je možné prúdenie metabolitov v mycéliu a bez prídavku amóniových iónov by sa rýchlo podstatná časť zmenila na pokojovú — deaktivovanú formu, netvoriacu kyselinu citrónovú, ale hromadiacu zásobné látky. Toto odstraňujeme buď kontinuálnym prítokom N-zdroja, alebo jeho jednorázovými dávkami.

Matematický model predstavuje sústava diferenciálnych rovníc 1—7 s radom experimentálne zisťovaných konštánt a parametrov

$$\frac{dX_b}{dt} = \mu_b X_b - K_t X_b - X_c \cdot \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \quad (1)$$

$$\frac{dX_c}{dt} = \mu_c X_c + K_t X_b - k_d X_c - X_c \cdot \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \quad (2)$$

$$\frac{dX_d}{dt} = k_d X_c - X_d \cdot \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \quad (3)$$

$$\frac{dN}{dt} = \mu_b \frac{X_b}{Y_N} + \frac{F_N \cdot c_N}{V} - \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \quad (4)$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \mu_c X_c + \beta X_c - \nu P - \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \quad (5)$$

$$\frac{dS}{dt} = \mu_b \frac{X_b}{Y_b} - \mu_c \frac{X_c}{Y_c} + \frac{\alpha \mu_c X_c + X_c - \nu P}{Y_p} + \frac{F_S \cdot c_S}{V} - \frac{S}{V} \frac{dV}{dt} \quad (6)$$

$$\frac{dV}{dt} = F_N + F_S \quad (7)$$

- X_b sú rastové bunky,
X_c — produkčné bunky,
X_d — deaktivované bunky,
N — dusík,
P — glycid,
S — kyselina citrónová,
μ_b — špecifická rastová rýchlosť pre rastovú fázu,
μ_c — špecifická rastová rýchlosť pre produkčnú fázu,
K_t — rýchlosť transformácie X_b na X_c,
k_d — rýchlosť deaktivácie,
ν — korekčný faktor na konc. KC v médiu,
α — konštanta (súvisiaca) s hodnotou pH,
Y_b — výťažkový koeficient pre rastové bunky,
β — koeficient produkčnej aktivity mikroorganizmu,
c_S — koncentrácia glycidu v prítoku,
c_N — koncentrácia dusíka v prítoku,
Y_b — výťažkový koeficient pre produkčné bunky,
Y_p — výťažkový koeficient pre KC,
Y_N — výťažkový koeficient pre dusík,
F_N — prítoková rýchlosť dusíkatého zdroja,
F_S — prítoková rýchlosť glycidového zdroja.

Pri identifikácii konštánt a parametrov modelu sa výhodne uplatnila výpočtová technika, konkrétne zostava počítača Olivetti M20. Pre tieto účely sa vytvoril regresný program, ktorý interpretoval trajektórie jednotlivých parametrov ako polynómy. Ďalšími numericko-matema-

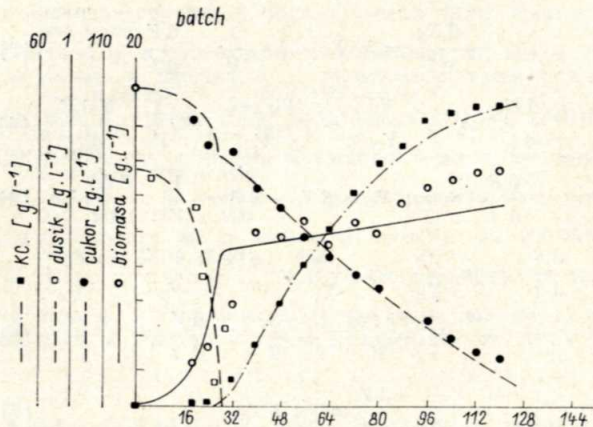
tickými operáciami sme získali hodnoty pre výpočty uvedených konštánt.

Získané parametre a matematický model procesu do volili vytvoriť simulačný program — mimoriadne cennú pomôcku pre analýzu procesu z hľadiska návrhu hardware ARSTP.

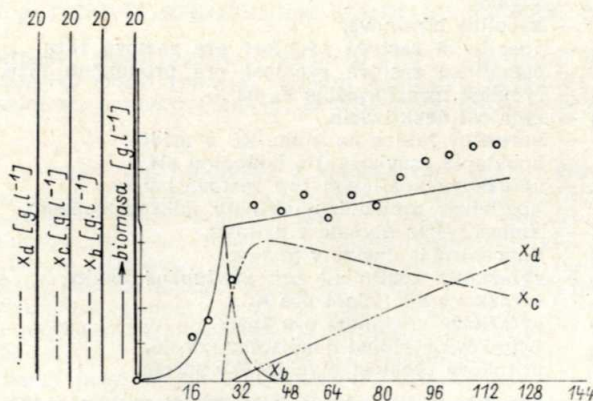
Simulácia procesu

Matematický model nám umožnil vykonať dôkladnú analýzu procesu. Ukázalo sa, že kritická — regulačná koncentrácia dusíka v médiu je v okolí $0,1 \text{ g.l}^{-1}$. Pri tejto koncentrácii nastáva transformácia rastových buniek na produkčné. Platí však, že rýchlosť produkcie KC produkčnými bunkami už nie je spätne ovplyvnená koncentraciou dusíka v médiu. Na základe matematického modelu sme sa pokúsili o simuláciu optimálneho dávkovania N-zdroja.

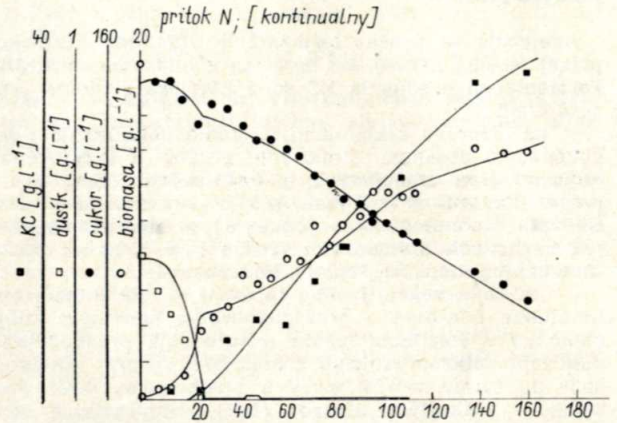
Z obr. 1, ktorý predstavuje batch experiment, vidíme, že koncentrácia biomasy dosiahne po 25. hodine $\frac{3}{4}$ výslednej koncentrácie. Počas ďalších 120 hodín fermentácie sa značné percento biomasy deaktivuje a súčasne klesá koncentrácia produkčných buniek (obr. 2). Snahou bolo zlepšiť tieto pomery. Na obr. 3 je priebeh experimentu s kontinuálnym prítokom dusíkatého zdroja. Do média bolo v 0-tej hodine pridané $\frac{2}{3}$ celkového dusíka a potom v priebehu 40—110 hodín bol rovnomerne prítokovaný zbytok — $\frac{1}{3}$ dusíkatého zdroja. Na obr. 4 je vidno zlepšenie pomerov v zložení biomasy. Koncentrácia produkčných buniek bola udržiavaná na vyšších a stále rastúcich hodnotách, kým koncentrácia deaktivovaných buniek nedosiahla také hodnoty ako na obr. 2. Na základe tohto experimentu sme zistili i závažný fakt, že kon-



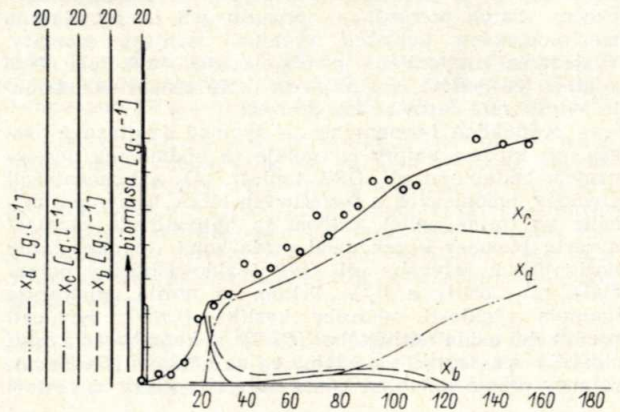
Obr. 1. Priebehy koncentrácií biomasy, KC, dusíka, glycidov v experimente realizovanom bez prítoku dusíka



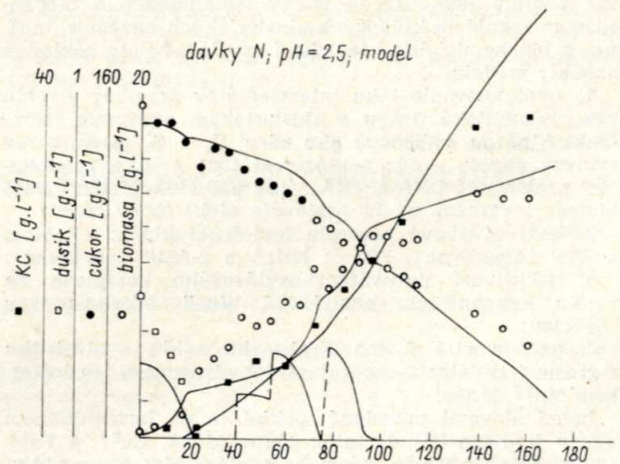
Obr. 2. Modelové priebehy rastovej biomasy- X_b , pro-
produkčnej biomasy X_c , deaktivovanej biomasy-
 X_d v experimente bez prítoku dusíka



Obr. 3. Krivky biomasy, KC, dusíka, glycidov v experimente s kontinuálnym prítokom dusíkatého zdroja



Obr. 4. Modelové priebehy X_b , X_c , X_d v experimente s kontinuálnym prítokom dusíkatého zdroja

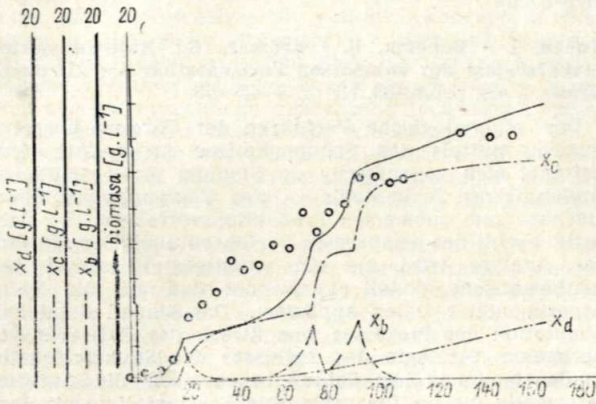


Obr. 5. Krivky biomasy, KC, dusíka, glycidov v experimente s dávkami dusíka — tri miesta dávok sú evidentné z grafu

centráciu N-zdroja nie je potrebné udržiavať na určitej kritickej koncentrácii vzhľadom k produkcii kyseliny citrónovej. Tá časť biomasy, ktorá sa pretransformuje za limitu dusíka na produkčné bunky, je schopná extracelulárnej produkcie KC i za podmienok ďalšej zvýšenej koncentrácie dusíka v médiu.

Pomocou matematického modelu bol spracovaný modelový experiment s nasledujúcimi dávkami N-zdroja:

0-hodin — 0,2 g.l⁻¹, 40-hodin — 0,12 g.l⁻¹, 55-hodin — 0,13 g.l⁻¹, 80-hodin — 0,25 g.l⁻¹. Modelové priebehy sú na obr. 5 a 6. Tieto podmienky sú najoptimálnejšie z hľadiska zloženia biomasy i z hľadiska výťažnosti procesu na KC.



Obr. 6. Modelové priebehy X_b , X_c , X_d v experimente s dávkami dusíkatého zdroja

On-line riadenie fermentácie

Po zistení citlivosti procesu na regulačné zásahy bolo možné pristúpiť k návrhu hardware a software riadiaceho systému. Štruktúra hardware je schematicky znázornená na obr. 7. Programové vybavenie sa skladá z podprogramu pre meranie a štatistické vyhodnotenie snímaných údajov, výpočtu sekundárnych údajov (výťažkové koeficienty, prechodové koeficienty, špecifickej rastovej rýchlosti), spracovanie v riadiacom algoritme, resp. v matematickom modeli a riadiacich príkazoch pre akčné členy. Zvlášť významné je meranie okamžitých hodnôt CPR a OUR a z nich počítaný respiračný kvocient RQ. Medzi CPR (rýchlosť produkcie oxidu uhličitého) a koncentraciou biomasy platí v určitom priblížení lineárny vzťah. Na základe experimentálne určenej hodnoty výťažkového koeficientu pre produkciu CO₂ vzhľadom na tvorbu biomasy — Y_{X/CO_2} , sa vyráta koncentrácia biomasy a odhadne sa rastová rýchlosť. Potom sa z výsledkov plynovej analýzy vykoná test, v akej fáze sa systém nachádza (rast-produkcia). Hodnota koncentrácie biomasy sa testuje vzhľadom k predeterminovanej hodnote, ktorú má

proces dosiahnuť. Akčný zásah predstavuje veľkosť dávky dusíkatého zdroja, resp. nastavenie rýchlosti prítoku dusíkatého zdroja.

Z hľadiska regulácie procesu v priemyselných podmienkach bude akčných zásahov viac. Okrem dávok činidiel na úpravu pH a odpeňovadla to bude tiež prítokovanie glycidového substrátu. Prítokovanie C-zdroja má však význam predovšetkým z hľadiska úspory energie, jeho regulačný význam je zatiaľ zanedbateľný.

Riadiaci počítačový systém

Problematiku vyšpecifikovania riadiaceho počítačového systému sme riešili vo VU LIKO v spolupráci s inžiniersko-dodávateľským záväzom Chepos Brno. Z hľadiska návrhu ASRTP vystupuje do popredia hardwarovo náročná úloha ovládania asi 300 ventilov v režime sekvenčno-logického automatu pri príprave produkčného fermentora (skúška hermetičnosti, sterilizácia prázdneho fermentora, plnenie fermentora základným médiom, úprava parametrov základného média pred inokuláciou a vlastná inokulácia.)

Boli vypracované dopyty u zahraničných firiem Foxboro, Kent, OY-Rintekno a u GRW — Teltow (NDR). Po vyhodnotení ponúk bolo konštatované, že ponuky sú príliš vysoké z hľadiska ceny a popri tom zariadenie je treba upravovať na špecifické požiadavky fermentačného procesu KC. Výrobcovia ponúkajú zariadenie síce vysoko spoľahlivé a presné, ale s univerzálnym použitím (napr. petrochémiá), čo zvyšuje jeho cenu. Na ponúkaných zariadeniach by bolo napr. nutné dopracovať špeciálne programové vybavenie.

Po analýze domácich riadiacich systémov bolo konštatované, že práve požadované systémy logických a sekvenčných automatov doteraz nemá väčšina distribuovaných riadiacich systémov riadených na báze mikroprocesorov, čo bolo napokon rozhodujúce pri voľbe a jednou z hlavných príčin pre použitie systému DASOR 601 A z k.ú. Metra Blansko. Riadiaci systém má dokonale prepracované programové vybavenie na riadenie práve logicko-sekvenčných automatov. Jeho veľkou nevýhodou je v súčasnosti už zastaralá koncepcia vlastného hardware s centrálnym riadiacim počítačom bez použitia mikroprocesorovej techniky. Systém ale vykazuje vysokú spoľahlivosť preverovanú pri nasadení v riadiacich veľinách čs. elektrární. Napriek tomu, že riadiaci systém DASOR 601 A bol už vyšpecifikovaný a objednaný, pokračujeme v analýze ďalších systémov vyvíjaných v ČSSR. Perspektívny sa ukazuje riadiaci systém MARK z ČKD Polovodiče. Zariadenie nadväzuje na riadiaci systém PPC 4 od toho istého výrobcu. Po zahájení výroby v r. 1986 bude mať tento systém všetky prednosti ponúkaných zahraničných riadiacich systémov vrátane vyhovujúceho programového vybavenia.

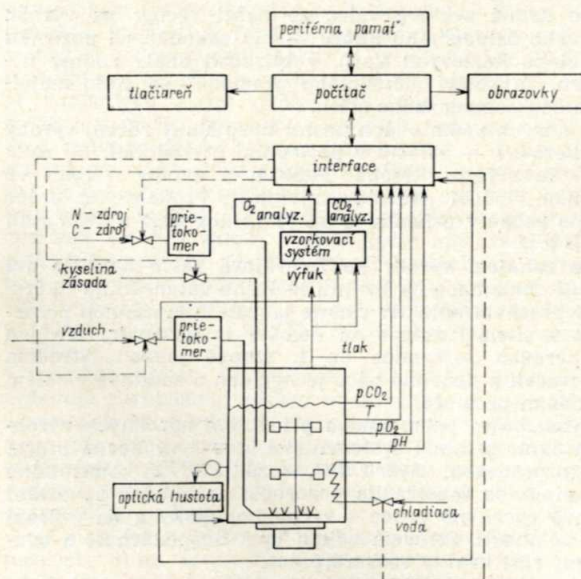
Literatúra

- [1] KRČMÁŘ, S., KOČAN, J.: Technologické podklady pre projektoú úlohu overovacej jednotky KC v závode Slovlik Leopoldov
- [2] BOHÁČIK, E.: Riadenie procesu submerznej fermentácie KC; Diplomová práca, Katedra biofyziky MFF UK Bratislava a ÚV LIKO; 1984

Lektoroval dr. V. Jirků, CSc.

Kočan, J. — Boháčik, E. — Krmář, S.: Automatizovaný systém riadenia submerznej fermentácie kyseliny citrónovej. Kvas. prům. 33, 1987, č. 2, s. 46—50.

Technologický postup výroby kyseliny citrónovej plesňou *Aspergillus niger* v súčasnej dobe prechádza štádiom radikálnej zmeny technológie — z povrchového na submerzný spôsob. V práci je analyzovaný submerzný spôsob. V tejto analýze sa významnou pomôckou stal matematický model, ktorý bol aplikovaný na sériu experimentálnych dát. Modelom bol proces simulovaný za účelom navrhnutia optimálnej stratégie prítoku dusíkatého zdroja do média. V závere je informatívny popis on-line riadenia fermentácie s riadiacim počítačovým systémom DASOR 601. Vo VU LIKO sa pripravuje aplikácie navrhnuté zostavy v referenčnej jednotke kyseliny citrónovej s objemom produkčného fermentora 150 m³.



Obr. 7. Štruktúra hardware on-line fermentácie

Кочан, И. — Бохачик, Л. — Крчмарж, С.: Автоматизированная система управления глубиной ферментацией лимонной кислоты. Квас. прум. 33, 1987, № 2, стр. 46—50.

Технологический процесс производства лимонной кислоты при помощи гриба *Aspergillus niger* в настоящее время проходит этапом резкого изменения технологии от поверхностного способа к глубинному. В статье рассматривается глубинный способ. В этом анализе знаменитым пособием стала математическая модель. Математическую модель применяли для серии опытных данных, имитировали процесс в целях проекта оптимальной стратегии подвода источника азота в среду. В конце статьи информационного описывается ферментация, управляемая онлайн управляющей ЭВМ-системой ДАСОР 601. В Научно-исследовательском институте Лико предусматривают применение предлагаемого состава в референционной единице производства лимонной кислоты с емкостью производственного ферментора 150 м³.

Kočan, J. - Boháčik, L. - Krčmář, S.: Automated Control System for Submerge Fermentation of Citric Acid. Kvas. prům. 33, 1987, No. 2, pp. 46—50.

The technology of the citric acid production by *Aspergillus niger* changes from the surface growth procedure to the submerge one at present. The submerge procedure was analyzed by the help of a mathematical model. The procedure was simulated by the model using experi-

mental results with the aim to optimize the inflow of nitrogen source into the medium. At the end the informative description of the on-line controlled fermentation with the computer system DASOR 601 is made. The application of this system on the production fermenter of 150 m³ is in preparation in Research Institute of LIKO at present.

Kočan, J. - Boháčik, L. - Krčmář, S.: Automatisiertes Steuersystem der submersen Fermentation der Zitronensäure. Kvas. prům. 33, Nr. 2, S. 46—50.

Das technologische Verfahren der Zitronensäureproduktion mittels des Schimmelpilzes *Aspergillus niger* befindet sich gegenwärtig im Stadium einer radikalen Änderung der Technologie — des Übergangs vom Oberflächen- zum submersen Produktionsverfahren. In dem Artikel wird das submerese Verfahren analysiert. In dieser Analyse wird als ein wichtiges Hilfsmittel das mathematische Modell angewendet und auf die Serie experimentaler Daten appliziert. Das Modell dient zur Simulation des Prozesses zum Zweck des Entwurfs der optimalen Strategie des Zuflusses der Stickstoffquelle in das Medium. Zum Schluß beschreiben die Autoren informativ die on-line gesteuerte Fermentation mit dem Steuer-Computersystem DASOR 601. In dem Forschungsinstitut der Spiritus- und Konservenindustrie wird die Applikation des vorgeschlagenen Systems in einer Referenzeinheit für Zitronensäure mit dem Produktionsfermentatorvolumen 150 m³ vorbereitet.