

Capitolulul trei

CONDUCEREA INTELIGENTA A BIOPROCESELOR

*In acest capitol este configurata ideea generala de conducere inteligenta a unor clase largi de bioprocese. Astfel in # 3.1. vor fi prezentate o serie de modele originale si rezultatele corespunzatoare obtinute in urma modelarii bioprociselor. Varietatea modelelor e datorata variabilitatii tipurilor de microorganisme si de procese studiate. Pornindu-se de la aceste modele, in # 3.2. va fi stabilit criteriul general de conducere, abordandu-se problematica generala a optimizarii in controlul de bioproces ca si modalitatea conceptuala de tratare a unei variabilitati atat de mari de modele. In sfarsit, in # 3.3. va fi configurata structura generala de conducere, pornindu-se de la ipotezele de lucru avansate: un nivel de **recunoastere** a tipului de bioproces dintr-o clasa data si un nivel de **conducere** propriu-zisa. Baza de date a sistemului de conducere este configurata pe un sistem de clasa medie de tip AS400.*

Analiza datelor experimentale din cadrul diferitelor tipuri de bioprocese a dus la concluzia imposibilitatii structurarii unor modele globale care sa formalizeze din punct de vedere matematic toate fazele culturii. Abordari fractionate, pe zone de lucru, au condus la realizarea unor modele locale, utilizabile in anumite conditii de evolutie a populatiei de microorganisme. Posibilitatea utilizarii unor structuri de conducere cu model *a priori* este strict limitata din acest motiv. De asemenea, utilizarea unor sisteme adaptive prin liniarizarea evolutiei parametrilor de bioproces de-alungul unor

esantioane temporale, apare in final insuficienta, prin furnizarea de solutii global suboptimale.

In aceste conditii s-a impus solutia tehnicilor de inteligenta artificiale, capabile, prin preluarea unor concepte subiective de la operatorul uman, sa suplineasca lipsa de informatie si legitatile obiective (in general necunoscute) ce guverneaza procesele fermentative. In acest fel poate fi construit un sistem inteligent, in masura sa conduca optimal diverse tipuri de bioprocese.

3.1. PARTICULARITATI STUDIATE MODELE PROPUSE

ALE BIOPROCESELOR

3.1.1. Modelarea matematica a hidrolizei enzimatice a paielor de grau in conditiile acumularii de produs

Celuloza este cea mai abundenta resursa naturala regenerabila, hidroliza ei la glucoza fiind o cale importanta de valorificare. Materialele celulozice pot fi hidrolizate folosind acizi sau enzime, ambele metode prezentand atat avantaje cat si dezavantaje (Marsden, Gray, 1986).

Hidroliza enzimatica este un proces ce se desfasoara in sistem heterogen, constand intr-un substrat celulozic insolubil si un agent hidrolitic in solutie, celuloza. Denumirea de celulaza cuprinde un sistem enzimatic complex, format din trei tipuri de activitati: endoglucanazice, celobiohidrolazice si beta-glucozidazice. Degradarea materialului la glucoza este realizata prin actiunea cooperanta (sinergism) a celor trei tipuri de celulaze. Mecanismul hidrolizei enzimatice, desi studiat de numerosi cercetatori (Estebauer *et al.*, 1991, Kuhard *et al.*, 1993, Steiner, 1994, Maheswari, 1993, Olama, 1993), nu a fost complet elucidat, consecinta

a proprietatilor compexe ale substratului si reactiilor enzimatice.

Cinetica hidrolizei enzimatice a celulozei insolubile depinde, in principal de urmasorii factori (David *et al.*, 1986, Morisson, 1988, Ramos *et al.*, Ropars *et al.*, 1992, Zacchi *et al.*, 1988): caracteristicile structurale ale substratului, natura sistemului enzimatic folosit, modul de interactiune dintre celuloza si enzima. In plus, sunt implicati si alti factori, d.e.: amestecarea, transferul de masa, adsorbtia si desorbtia enzimei, inhibitia prin produs final, etc.

Conditii de cultivare:

- *enzima*: complexul celulazic a fost obtinut prin cultivarea (Archer, 1994, Orsson, 1993, Szewczyk, 1994) unei tulpini de *Aspergillus niger* (Mandels, 1969). Lichidul de cultura, centrifugat a reprezentat preparatul enzimatic brut, utilizat in experiment.
- *substrat*: substratul a fost reprezentat de paie de grau tocate la dimensiunea de 0,2-0,3 cm. In scopul maririi accesibilitatii enzimei la substrat, paieile au fost tratate

cu solutie NaOH 1%, o ora, la 120°C (Jecu, 1992)

- *hidroliza enzimatica*: experimentele s-au desfasurat la 45°C, temperatura optima de actiune a enzimei. pH-ul a fost ajustat la 4,5, folosind tampon acid acetic - acetat de sodiu 0,01M. Substratul celulozic a fost adaugat in concentratii diferite: 10, 20, 40, 60 g/L. Pentru a preveni contaminarea bacteriana s-a adaugat azida de sodiu 0,3%. Influenta acumularii de zaharuri a fost studiata prin suplimentarea mediului de reactie cu glucoza, concentratiile finale fiind: 10, 20, 40 g/L. Dupa 24h de hidroliza au fost prelevate probe determinandu-se continutul in zaharuri reductoare, cu reactiv 3,5-dinitrosalicilic, conform metodei Miller (Miller, 1959).

Analiza datelor experimentale a pornit de la ideea punerii in evidenta a rolului inhibitorilor in acumularea de produs. In aceste conditii (Caramihai, Jecu, 1995), pentru o functie $P=f(\text{inhibitor})$ trebuie tinut cont, in primul rand, de conditiile la limita: pentru o concentratie finita de inhibitor ($I=I_{\text{lim}}$), acumularea de produs este 0, iar in lipsa inhibitorilor, poate exista cel mult o inhibitie prin substrat. In aceste conditii, modelul propus intr-o prima faza, pentru o concentratie data de substrat, este:

$$P = P_0 \left(1 - \frac{I}{I_{\text{lim}}}\right) e^{-kI} \quad 3.1.1.1$$

unde: P_0 = produsul obtinut in absenta inhibitorilor [mg/mL];

I = concentratia de inhibitori [g/L];

I_{lim} = concentratia limita de inhibitori, pentru care produsul este zero [g/L];

k = constanta.

Daca se are in vedere si rolul limitativ al substratului, atunci ecuatiea (3.1.1.1) devine:

$$P = \frac{c_1 S}{c_2 + S} \left(1 - \frac{I}{I_{\text{lim}}}\right) e^{-kI} \quad 3.1.1.2$$

cu mentiunea ca, in acest caz, P_0 este o functie directa de substrat (cu c_1 si c_2 constante). Profilul tipic al hidrolizei enzimaticice la concentratii mici de substrat indica o dependenta lineara a formarii produsului de concentratia de substrat (fig.3.1.1.1).

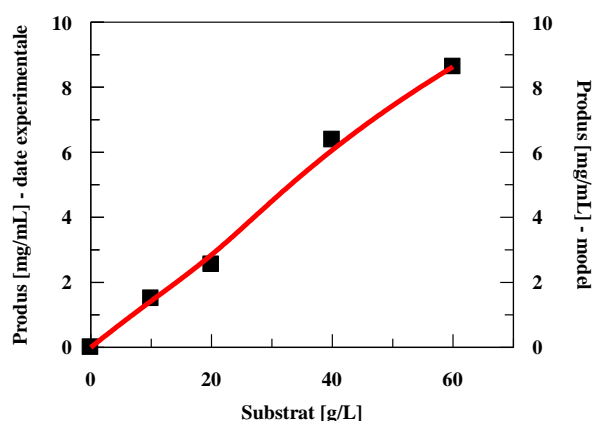


Figura 3.1.1.1 Dependenta produs vs. substrat pentru concentratie nula de inhibitori ■ date reale, ■ model

Peste anumite valori ale concentratiei de substrat ($S=100-120$ g/L) se inregistreaza o diminuare a reactiei, consecinta a modificarilor suferite de substrat, cat si a adsorbției enzimei pe substrat (Caramihai, Jecu, 1995). Conform datelor prezentate intr-o lucrare precedenta (Caramihai, Jecu, 1995), experimentele de hidroliza s-au desfasurat in intervalul concentratiei de substrat 10-60 g/L, pentru care se mentine dependenta lineara dintre formarea de produs si substrat.

In reactiile enzimaticice, acumularea de produs final exercita o actiune inhibitoare asupra continuarii reactiei. In acest caz, glucoza este in competitie cu substratul celulozic pentru centrul activ al enzimei.

In conditiile suplimentarii mediului de reactie cu 10 sau 20 g/L glucoza, s-au inregistrat

diminuari ale concentratiei de produs (Anexa 1, Tabel 1).

Analizand reprezentarile grafice 3.1.1.1, 3.1.1.2, 3.1.1.3 se observa ca cea mai semnificativa micșorare a cantitatii de produs s-a inregistrat pentru suplimentarea cu 20 g/L glucoza.

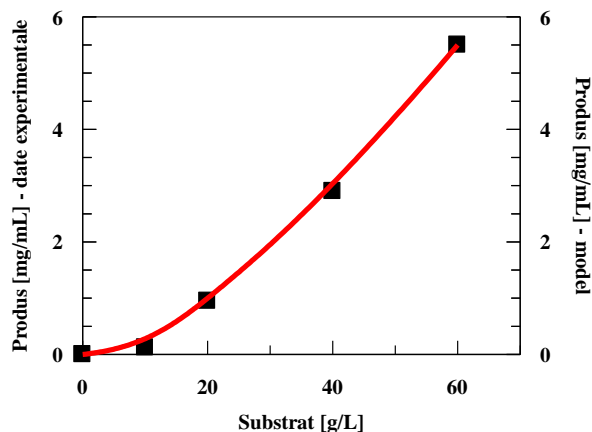


Figura 3.1.1.2 Dependenta produs vs. substrat pentru concentratie 10 g/L de glucoza ■ date reale, ■ model

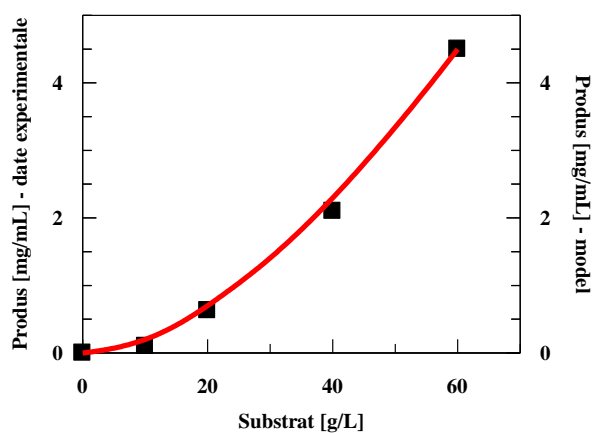


Figura 3.1.1.3 Dependenta produs vs. substrat pentru concentratie 20 g/L de glucoza ■ date reale, ■ model

Rezultatele modelarii sunt date in Anexa 1, tabelul 2, cu precizarea ca $I_{lim} = 100$ g/L in toate experimentele.

Valorile experimentale prezinta o buna corespondenta cu valorile teoretice, ceea ce ne indreptateste sa apreciem ca modelul

matematic ales corespunde acestui tip de reactie.

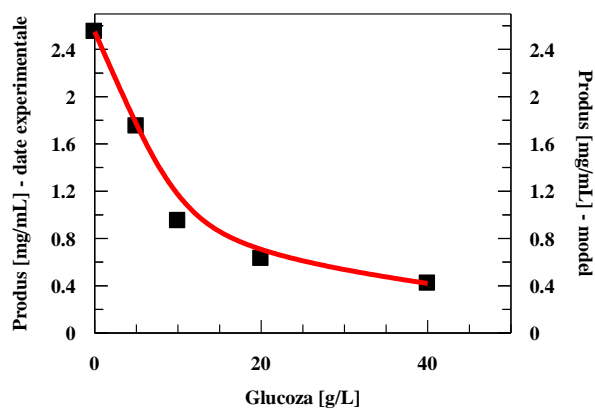


Figura 3.1.1.4 Dependenta produs vs. inhibitor pentru o concentratie initiala de substrat $S = 20$ g/L; ■ date reale, ■ model

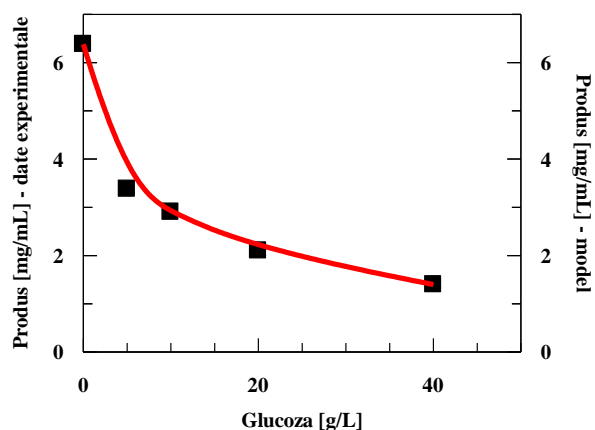


Figura 3.1.1.5 Dependenta produs vs. inhibitor pentru o concentratie initiala de substrat $S = 40$ g/L; ■ date reale, ■ model

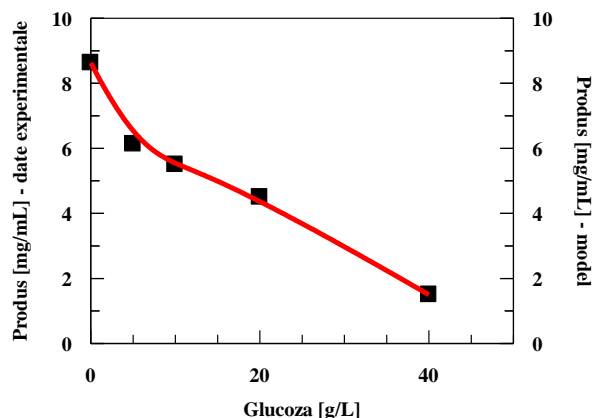


Figura 3.1.1.6 Dependenta produs vs. inhibitor pentru o concentratie initiala de substrat $S = 60$ g/L; ■ date reale, ■ model

In fig. 3.1.1.4, 3.1.1.5, 3.1.1.6 sunt prezentate variatiile concentratiei de produs cu cantitatea de inhibitor suplimentar, pentru trei valori ale concentratiei initiale de substrat in bioprocese discontinue. Tabelul 3, anexa 1 cuprinde rezultatele experimentale, iar tabelul 4, anexa 1, centralizarea erorilor de modelare.

Se poate spune in concluzie, ca ecuatiile de tipul (3.1.1.1) si (3.1.1.2) sunt exprimari matematice ale unor procese de hidroliza enzimatica, care pot conduce la determinarea in cadrul unor experimente ulterioare, a domeniului optimal de lucru. Ramane de vazut daca punctul de optim global al unei functii in doua variabile, $P=f(S,I)$, usor determinate analitic in acest moment, poate fi atins cu ajutorul unui sistem de conducere inteligent.

3.1.2. Modelarea matematica a acumularii de catalaza intr-un bioproces aerob

In cadrul bioprocесelor aerobe de cultivare batch a tulpinei *Micrococcus lysodeiktitus* se constata aparitia apei oxigenate (H_2O_2) in mediu datorita respiratiei celulare. Bacteria biosintetizeaza o enzima intracelulara (catalaza) care are rolul de a descompune apa oxigenata, toxica pentru organismul celular.

Dupa cum s-a aratat si in # 2.1.1.3, conform clasificarii lui Gaden (Gaden, 1959), acumularea de produs poate fi corelata cu cresterea populatiei de microorganisme in urmatoarele conditii (Moser, 1984):

a) *tip I*: cinetica formarii produsului este functie de rata de consum a substratului, iar variatia totala a entalpiei sistemului este negativa ($\Delta G < 0$);

b) *tip II*: cinetica formarii produsului depinde de rata de consum de substrat, iar variatia totala a entalpiei sistemului este de asemenea negativa ($\Delta G < 0$);

c) *tip III*: cinetica formarii produsului nu depinde de consumul de substrat, iar variatia totala de entalpie a sistemului este pozitiva ($\Delta G > 0$).

Pornind de la aceste consideratii generale, in cultivarea unei bacterii de tip *Micrococcus lysodeiktitus* acumularea intracelulara a produsului catalaza poate fi considerata ca respectand o cinetica de tipul I.

Conditii experimentale:

Cultivarea s-a facut intr-un reactor de laborator cu agitare mecanica¹, avand un volum util de 10L. Durata unui experiment a fost de 20-24 h. Principalii parametrii de cultivare au fost:

- *temperatura*: 30°C
- *suprapresiunea*: 0,5 atm
- *agitare*: 450-550 rpm
- *valoare pH*: 9
- *debit de aer*: 400 - 800 L/h
- *compozitia mediului*: $NaHCO_3$ 17%; $CaHPO_4$ 0,2%; extract de drojdie 2%, melasa 1% r.s., microelemente.

De-a lungul fazei exponentiale, substratul este utilizat atat pentru formarea produsului (catalaza) cat si pentru obtinerea energiei de crestere, in faza stationara ponderea substratului utilizat la crestere scazand drastic in favoarea celei necesare formarii de produs si energiei de mentinere.

In aceste conditii, pornind de la modelul general (Schugerl, 1987, Schugerl, 1993):

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad 3.1.2.1$$

si tinand cont ca parametrii α si β sunt in general variabili in raport cu timpul, se pot exprima (Caramihai *et al.*, 1995) urmatoarele dependente:

$$\alpha = \frac{k_1}{1 + e^{k_2 t}} \quad 3.1.2.2$$
$$\beta = k_3$$

¹ dotat cu o automatizare conventionala, pe bucle independente. Parametrii controlati au fost: agitare, suprapresiune, debit de aer.

unde k_1 reflecta contributia noilor celule la formarea produsului, iar k_2 scaderea in raport cu timpul a contributiei vitezei specifice de crestere la formarea produsului. In general, parametrul α indica faptul ca, spre finalul procesului batch, formarea catalazei este din ce in ce mai putin dependenta de viteza specifica de crestere (aceasta dependenta tinzand in final asimptotic spre zero). Pe de alta parte, constanta k_3 demonstreaza faptul ca celulele existente au o contributie constanta la formarea produsilor de metabolism. In aceste conditii, forma finala a ecuatiei devine:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_1}{1 + e^{k_2 t}} \frac{dX}{dt} + k_3 X \quad 3.1.2.3$$

Rezultatele experimentale ale masuratorilor sunt date in Anexa 2, Tabel 1. Au fost realizate doua experimente, fiecare cu durata de 20 h. Concentratia celulara (ca substanta uscata) si activitatea enzimatica au fost determinate din 4h in 4h, pentru a putea fi sesizate modificarile semnificative.

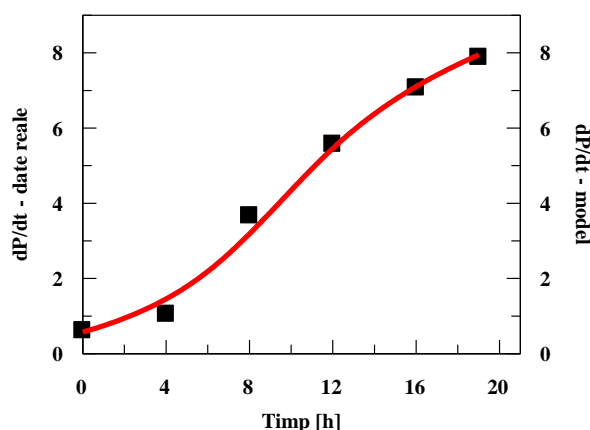


Figura 3.1.2.1 Viteza formarii produsului in raport cu timpul (experiment 1); ■ date reale, ■ model

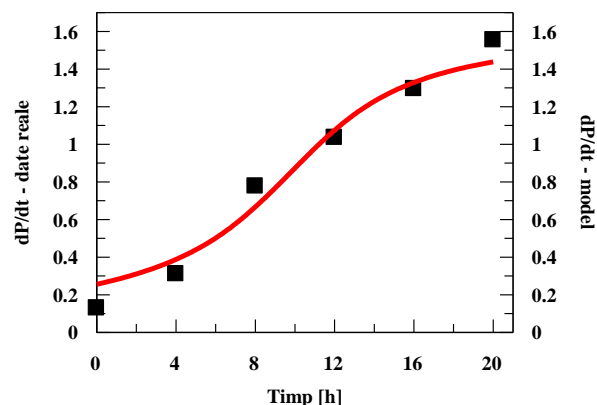


Figura 3.1.2.2. Viteza formarii produsului in raport cu timpul (experiment 2); ■ date reale, ■ model

In fig. 3.1.2.1 si 3.1.2.2 sunt reprezentate valorile experimentale si curbele de modelare, conform ecuatiei propuse.

Se observa o foarte buna aproximare a datelor experimentale (eroare generala de modelare fiind mai mica de 2,5%) mult mai buna decat cea a modelului clasic (conform Anexa 2, Tabel 2).

3.1.3. Modelarea productiei de alcooloxidaza obtinuta prin cultivarea drojdiei metilotrofe *Hansenula polymorpha*

Conditii experimentale:

Cultivarea drojdiei *Hansenula polymorpha* CBS-4732 s-a facut intr-un reactor de tip air-lift cu draft concentric si circulatie normala. Mediul de cultura contine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , extract de drojdie si microelemente (Fe, B, Cu, I, Mn, Zn, Mo). Principalii parametri de bioproces, reglati pe bucle independente, sunt:

- temperatura: 37-38°C
- nivelul minim de oxigen: 10% din concentratia de saturatie
- pH: 4,5-5

In acest bioproces fed-batch, singura sursa de carbon, metanolul, a fost introdusa discontinuu in raport cu viteza de consum, pentru a elimina posibilitatea inhibitei prin substrat.

Conform unor studii recente de optimizare de bioproces (Chirvase, Marica, 1992), s-a constatat ca ipoteza acumulării enzimei (în principal) în prima parte a fazei exponentiale de creștere (conform teoriilor lui Gaden) este susținută experimental. În aceste condiții poate fi propus (Caramihai *et al.*, 1995) un model de acumulare a produsului asociat creșterii (în sensul definit de Gaden) de forma:

$$\frac{dP}{dt} = k_1 \frac{dX}{dt} e^{k_2(X_p - X)} \quad 3.1.3.1$$

unde: $k_1, k_2 = \text{constante}$

$e^{k_2(X_p - X)}$ = factor de autocataliza

X = concentrația de celule (substanța uscată, g/L)

X_p = concentrația de celule corespunzătoare unei valori de prag, astfel:

1. dacă $X_p = X$, avem cazul particular al modelului Gaden;
2. dacă $X_p < X$, rata de formare a produsului este mai mare decât în cazul Gaden propriu zis;
3. dacă $X_p > X$, rata de formare a produsului este mai mică decât în cazul Gaden;

P = activitatea alcooloxidazică (EA/mL extract).

Trebuie menționat faptul că valorile lui k_1, k_2 și X_p sunt inițial necunoscute.

Alcooloxidaza fiind o enzimă intracelulară, este necesară o procedură complexă de extracție a ei după biosinteză. Rata de evoluție a produsului poate fi exprimată într-o primă formă prin activitatea enzimatică raportată la un volum determinat de extract (mL), obținut după ruperea peretelui celular conform analizei biochimice standard pentru alcooloxidaza.

S-au efectuat trei experimente, pe o durată de 40 - 44 h, în condițiile mai sus menționate, determinându-se densitatea optică ca măsură

a concentrației celulare și activitatea enzimatică (conform Tabel 1, Anexa 3). Prelucrarea matematică a datelor a condus la valori ale parametrilor prezentate în Tabel 2, Anexa 3. S-a constatat o bună aproximare a datelor experimentale (eroare de modelare $\chi^2 < 0.1$, mai bună decât în cazul utilizării modelului clasic) ceea ce confirmă faptul că introducerea factorului de autocataliza exprimă corespunzător caracterul special al enzimei ca produs catalizator al creșterii celulare.

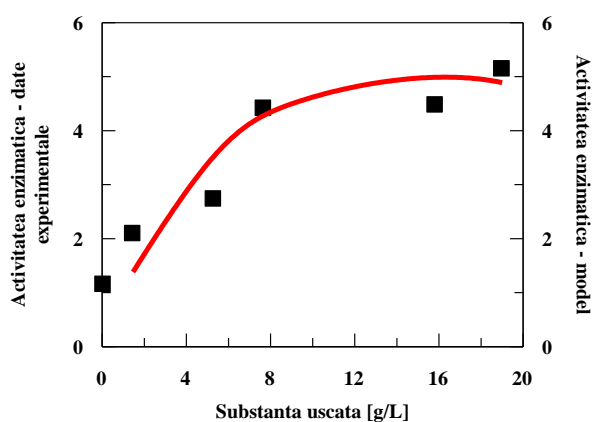


Figura 3.1.3.1 Viteza formării produsului în raport cu substanța uscată (experiment 1); ■ date reale (AE[microMol metanol/min/mL de extract], ■ model [AE[microMol metanol/min/mL de extract]])

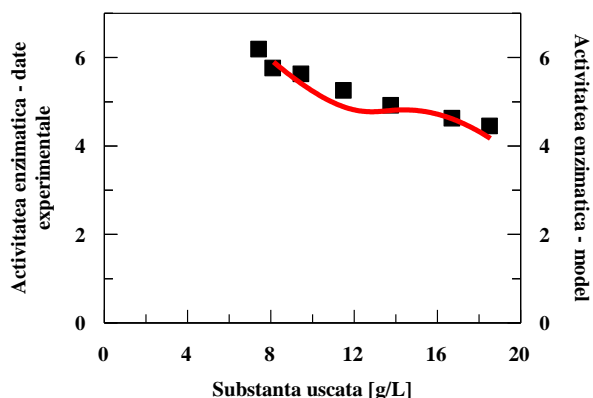


Figura 3.1.3.2 Viteza formării produsului în raport cu substanța uscată (experiment 2); ■ date reale (AE[microMol metanol/min/mL de extract], ■ model [AE[microMol metanol/min/mL de extract]])

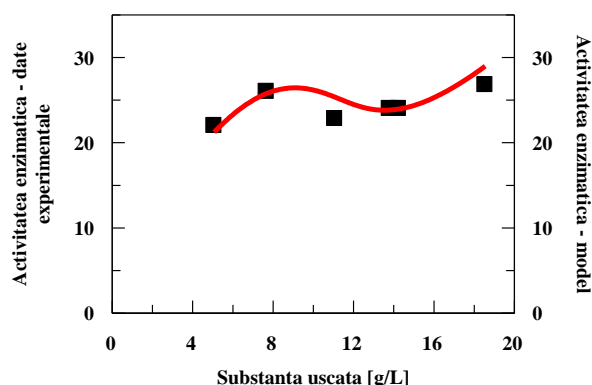


Figura 3.1.3.3. Viteza formarii produsului in raport cu substanta uscata (experiment 3); ■ date reale (AE[microMol metanol/min/mL de extract]), — model (AE[microMol metanol/min/mL de extract])

In fig. 3.1.3.2, 3.1.3.2, 3.1.3.3 sunt prezentate comparativ datele experimentale si rezultatele obtinute prin modelare.

Se constata existenta a doua nivele de activitate enzimatica datorate unor metabolisme celulare diferite: parametrul k_1 este mult mai mic in experimentele 1 si 2 decat in 3. Astfel, printr-o procedura de control adecvata poate fi impusa o anumita strategie de evolutie a culturii.

3.1.4. Modelarea matematica a hidrolizei enzimactice a paielor de grau

In timpul procesului de hidroliza enzimatica, substratul sufera modificari de structura chimica datorita formarii unor fractii solubile (Gupta, 1992, Wyman *et al*, 1993). In general, concentratia de substrat este un factor important in hidroliza enzimatica: sub o valoare de optim, cresterea concentratiei de substrat determina o crestere a productiei de glucoza; peste aceasta valoare, productia de glucoza scade. Modelarea matematica isi propune o descriere cantitativa a hidrolizei enzimactice a descompunerii paielor de grau cu complex enzimatic celulozic.

Conditii experimentale:

- *microorganismul* utilizat a fost *Aspergillus niger* 38 din colectia ICECHIM;
- *mediul de cultura* este conform Mandels si Weber (Mandels, Weber, 1969). Sursa de carbon a fost de 3,5% paie de grau. Cultura a fost incubata in baloane agitate de 750 mL, la 29°C si apoi centrifugata la 4000 rpm. Activitatea celulozica determinata in supernatant a fost de 8.77 U/mL (activitatea carboximetilcelulozica). O unitate de activitate enzimatica reprezinta cantitatea de enzima ce determina producerea unui micromol de glucoza per minut. Continutul de glucoza a fost determinat prin metoda cu acidul 3,5-dinitrosalicilic (Miller, 1959);
- *pretratarea* paielor de grau s-a facut cu o solutie de 1% NaOH (hidromodul 1:50) la 120°C si sub presiune, urmata de spalarea cu apa distilata si uscarea la 70°C;
- *hidroliza enzimatica* s-a realizat in baloane de 25mL, la pH 4.5. Baloanele au fost scufundate intr-o baie termostata la 50°C (temperatura optima de actiune celulo litica a enzimei). Substratul celulozic a fost adaugat in concentratii initiale variabile: 0.02; 0.035; 0.04; 0.06; 0.08; 0.1; 0.12; 0.14; 0.16; 0.18; 0.2; 0.21 g/mL. Pentru prevenirea contaminarii bacteriene s-a adaugat o cantitate de 0.1 mL de azida de sodiu in concentratie de 0,30% (w/v).
- *durata* totala a procesului: 24 ore.

Pretratamentul materialelor lignocelulozice inaintea hidrolizei enzimactice are ca scop cresterea accesibilitatii substratului in vederea degradarii polizaharidelor (conform Tabel 1, Anexa 4).

Modelare matematica a vitezei specifice in raport cu concentratia de substrat a pornit de la extinderea modelului clasic Michaelis - Menten (Michaelis, Menten, 1913) in conditiile inhibitei prin substrat (Caramihai, Jecu, 1995). Prin testari succesive asupra

datelor experimentale, a rezultat urmatoarea expresie matematica:

$$v = \frac{k_1 S}{k_2 + S} (1 - e^{k_3 (S - S_{\text{lim}})}) \quad 3.1.4.1$$

unde: S = concentratia de substrat (g/mL);
 S_{lim} = concentratia limita de substrat,
 pentru care avem viteza zero (g/mL);
 k_1, k_2, k_3 = constante.

Valorile parametrilor rezultati in urma modelarii ca si erorile de modelare sunt prezentate in Tabel 2, Anexa 4. Se observa ca eroarea de modelare este mult mai mare in cazul paielor tratate decat in cazul celor netratate, in speta datorita diverselor operatii si erori aferente corespunzatoare masuratorilor off-line si interventiei unor parametrii structurali ai substratului. In fig. 3.1.4.1 si 3.1.4.2 sunt prezentate rezultatele modelarii in raport cu datele reale.

Se constata o buna predictie a evolutiei procesului (in raport cu modelul clasic, Tabel 3, Anexa 4), putandu-se determina valoarea de optim a substratului in raport cu care poate fi condus un proces automat de hidroliza enzimatica.

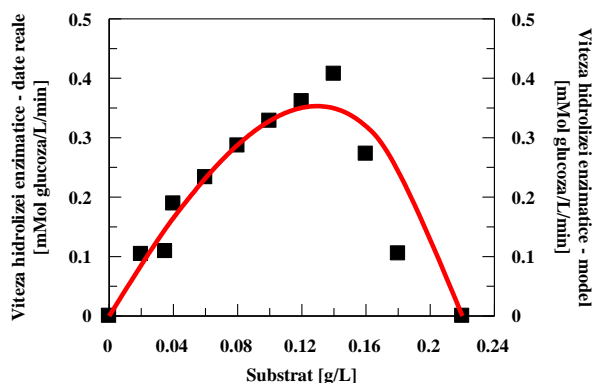


Figura 3.1.4.1 Paie netratate: ■ viteza hidrolizei enzimatic (date reale), ■ viteza hidrolizei enzimatic (model)

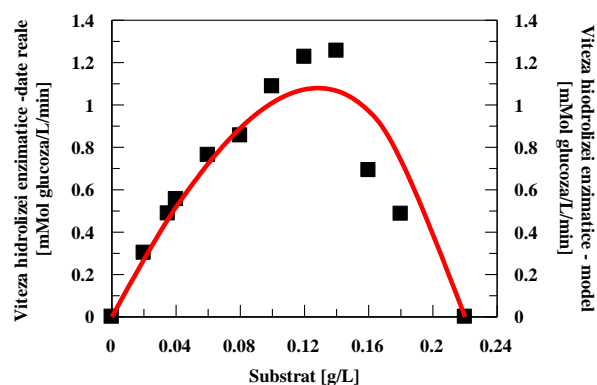


Figura 3.1.4.2 Paie tratate alcalin: ■ viteza hidrolizei enzimatic (date reale), ■ viteza hidrolizei enzimatic (model)

In acelasi timp, valorile de maxim, obtinute pe cale experimental, sunt mai mari decat cele furnizate de modelul propus si aceasta in principal datorita valorii concentratiei limita de substrat determinata sub raport strict empiric.

3.1.5. Modelarea inhibitiei prin produs a hidrolizei enzimatic a paielor de grau

In conditiile in care are loc o acumulare a produsilor de metabolism (i.e. glucoza) in urma unui proces de hidroliza enzimatic (Wood, 1992, Robson *et al.*, 1989) a paielor de grau (conform #3.1.4), se constata o inhibitie generala a procesului prin principalul produs de metabolism.

Conditii de cultivare:

- *substratul celulozic* a fost tratat cu o solutie de 1% NaOH la 120°C, sub presiune, timp de 1h;
- *enzima*: produsa prin cultivarea unei tulpini de *Aspergillus niger*;
- *hidroliza enzimatic*: substratul celulozic a fost adaugat in concentratie de 10-120 g/L, in vederea eliminarii posibilitatilor de inhibitie prin substrat (conform # 3.1.4). Pentru a studia influenta glucozei asupra bioprocesului, aceasta a fost adaugata suplimentar in portii de 10, 20 si 40 g/L. Continutul in glucoza a hidrolizatului a fost determinat prin

metoda Miller (Miller, 1959) cu acid dinitrosalicilic;

- *durata* procesului batch: 24h.

Din analiza datelor experimentale se constata o crestere a valorii produsului final (glucoza), spre o valoare maxima asimptotica.

De asemenea, pe masura cresterii concentratiei de glucoza suplimentara (Caramihai, Jecu, 1995), valoarea de maxim tinde sa scada. In aceste conditii, un model (Caramihai, Jecu, 1996) de tipul:

$$P = \frac{P_{\max}}{1 + e^{\frac{k_m - S}{k_i}}} \quad 3.1.5.1$$

unde: P = concentratia de produs (g/L)

P_{\max} = concentratia maxima de produs (g/L)

S = concentratia de substrat (g/L)

k_m = constanta de tip Michaelis & Menten (g/L)

k_i = constanta de inhibitie (g/L)

reprezinta, pe langa o extensie a modelului clasic, si o exprimare mai adecvata a dependentei complexe ce leaga formarea produsului final de diverse fenomene de inhibitie.

In fig. 3.1.5.1 sunt redate comparativ rezultatele modelarii in raport cu valorile reale, determinate experimental, pentru 4 cazuri diferite: fara adaos de glucoza si cu adaosuri de 10, 20 si 40 g/L.

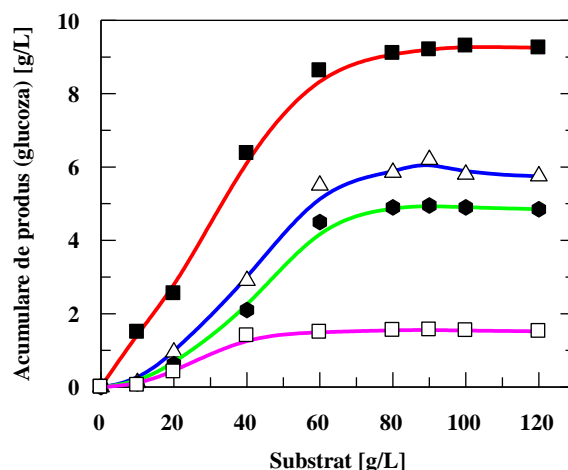


Figura 3.1.5.1. Acumulare de produs vs. concentratie de substrat

- date reale, ■ model (0 g/L adaos de glucoza)
- △ date reale, ■ model (10 g/L adaos de glucoza)
- date reale, ■ model (20 g/L adaos de glucoza)
- date reale, ■ model (40 g/L adaos de glucoza)

Valorile parametrilor obtinute in urma modelarii ca si erorile generale de modelare sunt prezentate in Anexa 5, Tabelul 1. Se constata in acest caz posibilitatea determinarii valorii produsului final maxim atat in raport cu substratul cat si cu acumularile din timpul procesului.

3.1.6. Modelarea unui bioproces inhibitiv de cultivare de drojdii pe un mediu simulat

Procedeele industriale de obtinere a celulozei chimice includ o etapa de prehidroliza in cadrul careia materialul lemnos este tratat cu vapori de apa la temperaturi si presiuni inalte (Wenzl, 1970). Acidul acetic existent initial in structura hemicelulozica este eliberat in mediu si are un efect inhibitor asupra cultivarii drojdiei *Candida utilis* (Leonard, Hajni, 1945). Studiul acestui efect poate fi facut intr-un mediu sintetic in conditii de laborator, simulandu-se conditiile reale.

Conditii de cultivare:

- *mediu de cultura:* glucoza, 20 g/L sau xiloza 10g/L; extract de drojdii 4g/L,

peptona 5g/L; agent inhibitor: acid acetic in portii de 1/100;

- *microorganism*: *Candida utilis*;
- *agitare*: 180 rpm;
- *temperatura*: 35°C
- *durata proces*: 10h
- *metoda de lucru*: concentratia de biomasa a fost determinata prin masurarea densitatii optice (DO), substanta uscata fiind estimata prin metoda lui Jeffries si Streenath (Jeffries, Streenath, 1988): 1DO = 0,19 g/L SU. Acidul acetic a fost determinat cu ajutorul unui gas cromatograf de tipul Perkin-Elmer (Model B).

In vederea modelarii vitezei specifice de crestere (μ) a fost realizat (Caramihai *et al.*, 1995) pentru inceput un model de evolutie a concentratiei de inhibitori:

$$I = I_0 e^{k(I_0 - I_{lim})} \quad 3.1.6.1$$

unde: I_0 = concentratia initiala a inhibitorilor (g/L);

I_{lim} = concentratia limita a inhibitorilor (daca $I = I_{lim}$, $\mu = 0$);

t = timp(h);

k = constanta

Tinand cont ca procesul are loc pe doua substraturi, dintre care unul are rol inhibitor si celalalt usor metabolizabil (Caramihai *et al.*, 1995), viteza specifica de crestere poate fi scrisa:

$$\mu = \frac{k_1 S}{k_2 + S} (1 - e^{k_3(I_0 - I_{lim})}) \quad 3.1.6.2$$

unde: S = concentratia de substrat de crestere, neinhibitor, (g/L);

I = concentratia de substrat inhibitor (g/L)

k_1, k_2, k_3 = constante.

Influenta concentratiei initiale de acid acetic asupra cresterii drojdiei este prezentata in Anexa 6 Tabel 1. Se observa ca rata de transformare a substratului in biomasa este mai mare in cazul utilizarii xilozei ca substrat primar decat in cazul glucozei. In cazul lipsei acidului acetic initial, situatia se inverseaza. In fig. 3.1.6.1 si 3.1.6.2. sunt prezentate datele reale si cele de modelare in cazul substratului de tip glucoza, respectiv xiloza.

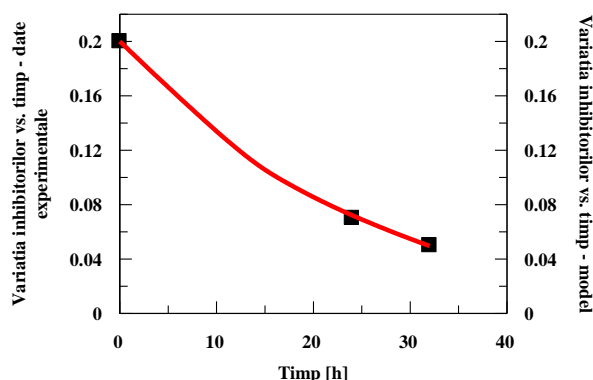


Figura 3.1.6.1 Modelarea inhibitorilor in raport cu timpul (substrat glucoza) ■ date reale [g/L], ■ model [g/L]

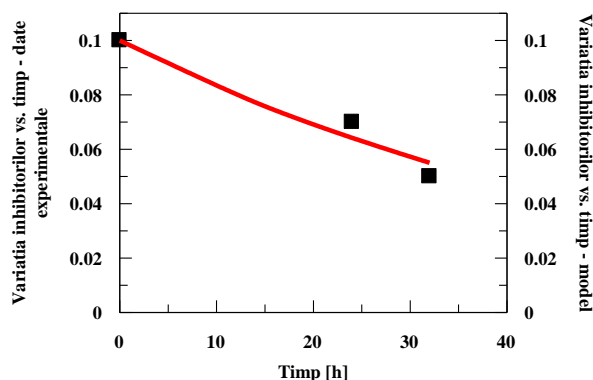


Figura 3.1.6.2. Modelarea inhibitorilor in raport cu timpul (substrat xiloza) ■ date reale [g/L], ■ model [g/L]

In Tabel 2 din Anexa 6 sunt prezentate valorile estimate pentru parametrul k (din ec. 3.1.6.1) ca si erorile de estimare si modelare, iar in Tabel. 3 valorile corespunzatoare parametrilor k_1, k_2, k_3 din ec. 3.1.6.2. Tot in Tabel 3 sunt date rezultatele comparative obtinute in urma utilizarii unor modele clasice din literatura (pentru ec. 3.1.6.1. nu

exista date comparative). In fig. 3.1.6.3 si 3.1.6.4 sunt reprezentate dependentele vitezei specifice de crestere in raport cu substratul si concentratia de inhibitori pentru fiecare caz in parte (glucoza / xiloza).

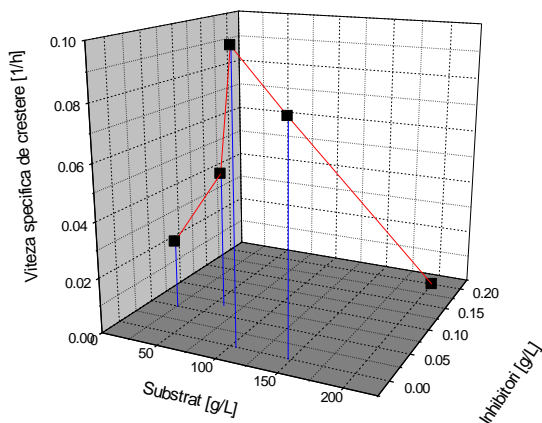


Figura 3.1.6.3 Dependenta vitezei specifice de crestere de concentratia de substrat si de inhibitori (substrat glucoza)

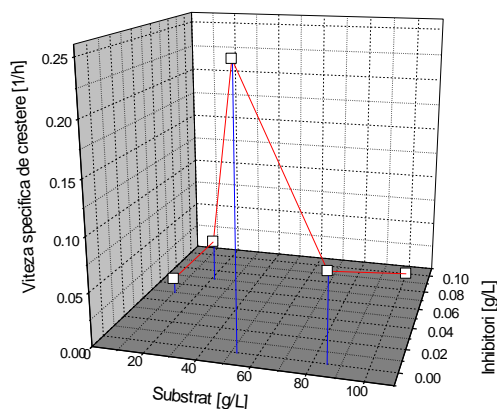


Figura 3.1.6.4 Dependenta vitezei specifice de crestere de concentratia de substrat si de inhibitori (substrat xiloza)

Rezultatele modelarii dovedesc o puternica interactiune in dinamica cresterii intre concentratia de substrat / inhibitor si viteza specifica de crestere. Reducerea influentei inhibitorilor poate duce la o crestere a randamentului de acumulare a masei celulare.

3.1.7. Modelarea unui bioproces de crestere de proteine monocelulare din bacterii pe metanol

Datorita faptului ca drojdiile au un randament mic de conversie a metanolului si o rata redusa de crestere celulara, iar continutul in proteine este redus, procedeele de obtinere de proteine monocelulare din bacterii metilotrofe devin atractive. In acest caz:

- randamentul de utilizare a metanolului este mult mai mare;
- continutul in proteina bruta este mai bun (75-80% raportat la biomasa uscata, fata de 45-50% in cazul drojdiilor).

Conditii de cultivare:

- *mediul de cultura* contine: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,5 g); KH_2PO_4 (1,5 g); NaHPO_4 (1,5 g); MgSO_4 (0,2 g); FeSO_4 (0,2 g); CuSO_4 (0,005 g); CaCl_2 (0,01 g)- cantitatile fiind raportate la 1000mL apa; mediul se sterilizeaza la 130°C;
- *continutul de metanol* in mediu este mentinut in intervalul de concentratie: 0,1-0,2%, pe tot parcursul procesului fed-batch;
- *valoarea pH*: 6.7 - 6.9, corectat prin adaos de amoniac;
- *temperatura de lucru*: 35°C +/-1°C
- *suprapresiune*: 0.1 - 0.2 atm
- *debit aer*: 1 vvm
- *instalatie de bioproces*: fermentator micropilot Biotec LKB de 14L, cu o capacitate utila de 8,4L; agitare mecanica prin intermediul a doua turbine / 6 palete;
- *bacterie*: *Methylomonas ICCF-27*;
- *durata proces*: 36-40h
- au fost luate in considerare datele din 13 sarje experimentale.

Modelarea matematica de crestere de proteine monocelulare pe metanol porneste (Caramihai *et al*, 1992) de la caracterul puternic inhibitor al substratului (Anexa 7, Tabel 1 - 12), asa cum se poate observa din datele experimentale. Calculul lui μ conduce la o dependenta $\mu = f(S)$ (Anexa 7, Tabel 13) ca aceea din fig. 3.1.7.1. In acest caz, exista valori finite ale lui S pentru care avem viteza specifica nula.

În aceste condiții se poate presupune existența unui factor de reducere metabolică ($R(S)$) aflat în conjuncție cu un model clasic de tip Haldane (Andrews). Factorul de reducere metabolică are valoarea zero în cazul excesului de substrat ($S = S_{lim}$) și valoarea apropiată de cea unitară la valori mici ale substratului (practic, la aceste concentrații caracterul inhibitor al metanolului este neglijabil). În aceste condiții se poate considera μ de forma:

$$\begin{aligned}\mu &= \frac{k_1 S}{k_2 + S + k_3 S^2} R(S) \\ &= \frac{k_1 S}{k_2 + S + k_3 S^2} (1 - e^{-k_4 (S - S_{lim})})\end{aligned}\quad 3.1.7.1$$

unde: $R(S)$ = factor de reducere metabolică;
 μ = viteza specifică de creștere (h^{-1});
 S = concentrația de metanol (g/L, g%);
 k_1, k_2, k_3, k_4 = constante

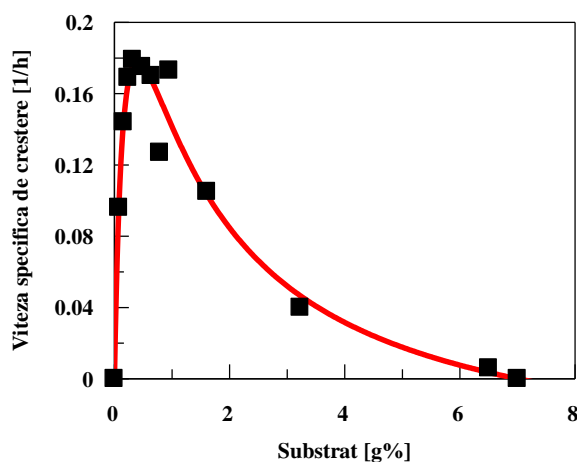


Figura 3.1.7.1 Modelarea vitezei specifice de creștere în raport cu concentrația de substrat ■ date reale, ■ model

Din fig. 3.1.7.1 se observă că modelul propus oferă o foarte bună aproximare a datelor experimentale. Erorile de modelare și valorile parametrilor sunt date în Tabel 14 din Anexa 7. În Tabel. 15 din aceeași Anexa sunt prezentate comparativ rezultatele modelării

obținute prin utilizarea unor ecuații clasice din literatură.

3.1.8. Modelarea bioprocesului de obținere de celule fungice

Microorganismele crescute pe medii celulozice biosintetizează enzime extracelulare celololitice, capabile să degradeze polizaharidele la zahăruri solubile. Glucoza și celobioza obținute sunt utilizate ulterior ca sursă de carbon pentru asigurarea creșterilor celulare.

Condiții de cultivare:

- *microorganism:* tulpina de tip *Aspergillus niger* din colecția Institutului de Cercetări Chimice - București.
- *cultura:* mediul de bază este cel clasic (Mandels, 1969) în care există în plus o sursă de carbohidrați (1% celuloză din lemn), la pH=4.5. Cultura a fost incubată aerob la 30°C timp de 48h și la 28°C până la sfârșitul fermentației. În final lichidul de cultură a fost centrifugat, iar activitatea enzimatică determinată în supernatant;
- *activitatea enzimatică:* concentrația zaharurilor redatoare a fost măsurată prin metoda descrisă de Miller (Miller, 1959) cu acid 3,5-dinitrosalicilic;
- *proteina miceliana:* a fost extrasă succesiv cu NaOH; proteina a fost determinată pe extracte combinate, prin utilizarea unui reactiv de tip Folin;
- *durata proces:* 120 h.

Modelarea matematică a procesului de obținere a celulelor fungice porneste de la ipotezele lui Gaden (Gaden, 1959), putându-se considera cinetica de formare a unui produs asociat creșterii, luându-se însă în considerare și influența substratului rezidual (Caramihai *et al.*, 1996). Ecuația ce descrie aceasta dependentă este de forma:

$$P = \frac{aX}{b + X} e^{-cS^2} \quad 3.1.8.1$$

unde: X = concentrația de celule, exprimată în substanța uscată (mg/mL);

S = substratul rezidual (g/L);

P = activitatea endoglucanazică (IU/min);

a, b, c = constante.

Rezultatele experimentale sunt indicate în Anexa 8, Tabel 1. În fig. 3.1.8.1 sunt prezentate comparativ dependența reală a activității endoglucanazice de proteina miceliana, respectiv rezultatele modelării.

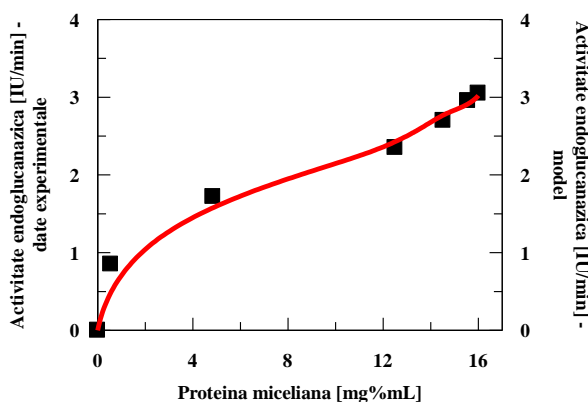


Figura 3.1.8.1 Productia de endoglucanaze vs. proteina miceliana ■ date reale, ■ model

În fig. 3.1.8.2 sunt prezentate dependența reală și cea modelată a activității enzimice de concentrația de substrat, constatându-se un foarte bun *fitting* al datelor experimentale

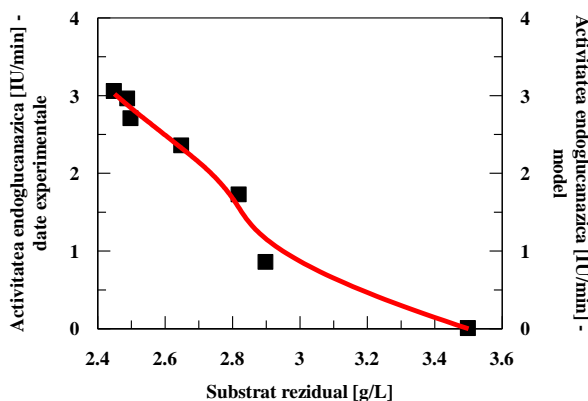


Figura 3.1.8.2. Productia de endoglucanaze vs. substrat rezidual ■ date reale, ■ model

cele două variabile: concentrația de substrat și concentrația biomasei fungice.

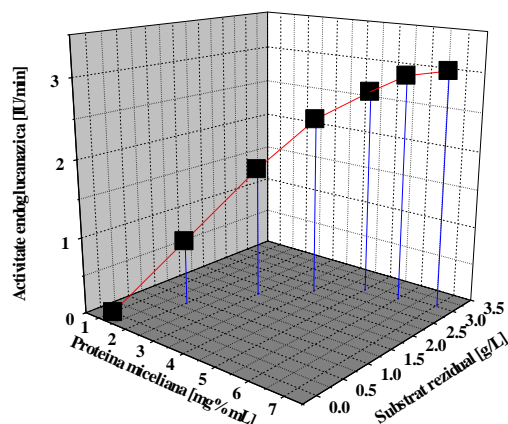


Figura 3.1.8.3. Productia de endoglucanaze vs. proteina miceliana și substrat rezidual; ■ date reale, ■ model

Valorile parametrilor și erorile de modelare sunt date în Tabel 2 din Anexa 8.

În sfârșit, în fig. 3.1.8.3 este reprezentată dependența activității endoglucanazice de

3.2. PROBLEMATICA OPTIMIZARII

Modelarea si conducerea inteligenta a unui bioproces impune structurarea unui sistem capabil sa sesizeze etapele evolutiei culturii si sa elaboreze comenzile corespunzatoare controlului optimal al acesteia (Montague *et al.*, 1991). S-a demonstrat in capitolele precedente caracterul puternic nelinear si multivariabil al proceselor de fermentatie ca si dificultatile de modelare si conducere cu model *a priori*, in conditiile in care informatia directa din proces ca si fundamentarile teoretice cu privire la metabolismul celular si influenta lui asupra populatiilor, sunt reduse.

In aceste conditii apare necesitatea inlocuirii metodelor clasice de conducere cu cele bazate pe inteligenta artificiala. Utilizarea exhaustiva a procedurilor clasice sau a conducerii inteligente duce, asa cum a fost deja aratat, la impas, fie datorita necunoasterii in profunzime a legatilor bio-fizico-chimice ce guverneaza evolutia populatiilor de microorganisme, fie datorita utilizarii intr-o prea mare masura a informatiilor provenite de la expertul uman, afectat de subiectivism si de modalitatile diferite de comunicare (Thibault, Najim, 1993).

Astfel, s-a considerat necesar a se construi un sistem de conducere capabil sa decida on-line asupra strategiilor de control, pornind de la niste algoritmi inteligenti, avand insa la baza modele analitice, care surprind diferitele faze ale unei culturi.

In general, structura unui sistem de conducere de bioproces porneste de la specificitatea acestuia (Chang *et al.*, 1988; Lim *et al.*, 1986, Semones, Lim, 1989), i.e. exista cate o configuratie pentru fiecare proces in parte. Varietatea tipurilor de bioprocese impune o varietate la fel de mare a tipurilor de algoritmi de control.

Astfel, o limitare a tipurilor de structuri de reglare se poate face prin stabilirea unor clase de bioprocese (de crestere celulara, de obtinere a unor produse finali de metabolism, de hidroliza enzimatica, etc.), fiecarei clase revenindu-i o multime finita de algoritmi de reglare, in functie de particularitatile bioprocesului din clasa respectiva. Este rolul sistemului inteligent, in baza unei informatii *a priori* data de operatorul uman, de a stabili tipul bioprocesului din clasa respectiva.

O data stabilit tipul de bioproces dintr-o anumita clasa, i se atribuie de catre sistemul inteligent modelul analitic corespunzator, aflat intr-o biblioteca de modele. Avantajele oferite de modelele *a priori* pornesc de la posibilitatile determinarii analitice a punctelor de optim, independent de informatia subiectiva a expertului uman.

Descrierea calitativa, de catre operatorul uman, a conditiilor de evolutie optima a unui bioproces, este in general alterata de catre factorii psihologici si de perceptie proprie. De aceea s-a constatat (Garrido-Sanchez *et al.*, 1993) ca implementarea unor sisteme de conducere inteligente, bazate doar pe informatia oferita de catre operatorul uman, sunt in general mai putin performante decat sistemele de conducere care utilizeaza informatia obiectiva oferita de existenta unui model conceptual. Este si motivul pentru care in literatura de specialitate (Fonteix *et al.*, 1994) se recomanda utilizarea structurilor de conducere bazate pe inteligenta artificiala doar in conditiile in care nu exista modele cantitative de evolutie de bioproces si deci, sisteme de reglare axate pe acestea.

In aceste conditii, utilizarea unor modele conceptuale adecvate in conjunctie cu o structura inteligenta de conducere, pare atragatoare (Chtourou *et al.*, 1993;

Normandin *et al.*, 1994; Willis *et al.*, 1992). Prin intermediul modelului analitic sunt determinate coordonatele de optim, in timp ce *modalitatile* de atingere a acestor coordonate sunt recomandate de sistemul inteligent (Thibault, van Breusegem, 1991). In acest fel sunt juxtapuse elementele subiective (provenite de la expertul uman) de atingere a optimalitatii, cu cele obiective (provenite din formalismul matematic), de existenta a coordonatelor de optim. Este evident ca in conditiile in care biosistemele se caracterizeaza prin multivariabilitate, existenta unui optim (determinat analitic) in raport cu o anumita variabila (sau cu un grup de variabile, daca modelul este multivariabil), nu presupune *ipso facto* ca acest optim coincide cu cel global in raport cu toate variabilele procesului (Luttman *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1991; Modak *et al.*, 1986)). Alegerea dependentelor s-a facut in baza experientei si a cunostintelor expertului uman care a definit clase de marimi de importanta deosebita in cazul unui proces de fermentatie, ca si obiectivele ce trebuiesc atinse.

3.3. CONFIGURATIA UNEI STRUCTURI INTELIGENTE DE CONDUCERE DE BIOPROCES

Elaborarea modelelor bazate pe cunostiinte si conducerea bioproceselor pornind de la asemenea modele, reprezinta obiectivul actual al automatizarii proceselor viului. Insatisfactia cauzata de suboptimalitatea procedeelor clasice de conducere, dupa cum s-a aratat anterior, conduce spre o deplasare tot mai accentuata a interesului catre tehnicile de inteligenta artificiala care sa suplineasca imposibilitatea cunoasterii exhaustive a legilor ce guverneaza procesele de fermentatie.

Pornind de la considerentele de optimalitate analizate in paragraful precedent, va fi propusa in continuare o structura integrata de conducere de bioproces, capabila *sa discearna* tipul procesului, *sa realizeze o modelare on-line* si *sa conduca optimal bioprocesul in baza unor tehnici inteligente*, in vederea maximizarii unui indice de performanta impus. Recunoasterea tipului de bioproces se face in baza unor informatii *a priori* oferite de operatorul uman si este urmata in continuare de modelarea acestuia prin selectia modelului adecvat, identificarea si estimarea parametrilor in vederea determinarii curbei (optime) de evolutie si a valorilor de optimalitate. Conducerea propriu-zisa se realizeaza in baza unui set de reguli stabilite de expertul uman, reguli ce au in vedere optimul traiectoriei de stare a procesului si maximizarea indicelui de performanta ales.

Trebuie specificat faptul ca, in paralel cu realizarea configuratiei de conducere, se considera necesara realizarea unei baze centrale de date, accesibila in oricare moment de catre diversele sisteme de conducere si capabila sa ofere informatii cu privire la evolutia in timp a bioprocesului in lucru sau sa monitorizeze date la cererea operatorului uman.

O asemenea structura integrata de conducere poate deveni o componenta importanta in domeniul bioindustrii.

3.3.1. Baze de date sub AS400

Ideea creerii unei baze de date sub AS/400 porneste (Caramihai *et al.*, 1996) de la necesitatea asigurarii integritatii si sigurantei bazei de date respective. Astfel, intr-o configuratie client/server, operatorul uman poate lucra la nivel client, prin intermediul unei structuri locale PC, cu un cost scazut si o interfata prietenoasa, el putand accesa in acelasi timp, prin intermediul serverului AS/400, o uriasa baza de date, fundamentata pe informatiile culese on-line de la diversele procese fermentative aflate in studiu pe intervale mai mari de timp (ani de zile). In acest fel se poate asigura o siguranta si o securitate a datelor mult mai buna decat in structuri de tip retea de PC-uri.

3.3.2. Sistem de conducere inteligenta a bioproceselor

O abordare a unei structuri integrate de conducere porneste de la prezenta unui sistem inteligent capabil sa sesizeze tipul de evolutie a bioprocesului si sa ia decizii de conducere a acestuia in vederea maximizarii unui indice de performanta impus.

Astfel, intr-o prima faza, are loc achizitia datelor din proces si filtrarea lor in vederea eliminarii unor posibile valori eronate. Pe baza acestor date, are loc o estimare a marimilor ce nu pot fi determinate on-line (Walter, Pranzato, 1994). Evolutia in timp a variabilelor estimate este comparata cu o serie de curbe calitative, aflate in baza de date a unui sistem expert, ceea ce conduce la "recunoasterea" tipului de proces. Urmeaza secventa de identificare si estimare a valorilor de optim ale parametrilor modelului si in

final, intervine structura de control fuzzy, capabila sa maximizeze un indice de performanta impus de catre operatorul uman.

Structura bloc a sistemului inteligent de conducere este prezentata in fig.3.3.2.1.

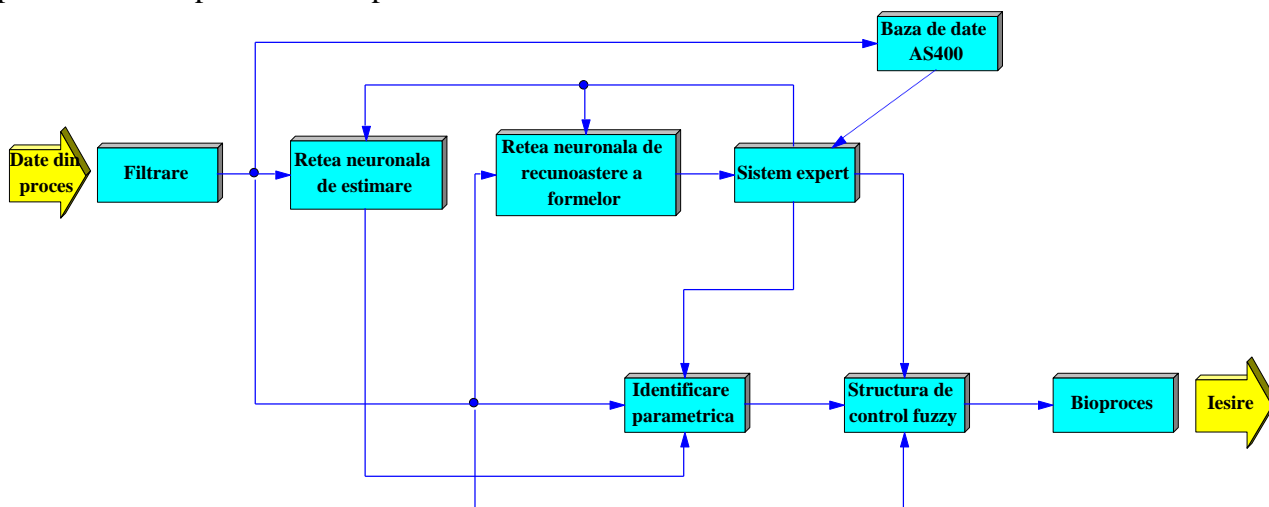


Figura 3.3.2.1. - Structura bloc de conducere inteligenta a unui bioproces

Mecanismul recunoasterii formelor

Utilizarea unei rețele neuronale în recunoașterea tipului de bioproces (Garrido-Sanchez, 1993; Dumitrache *et al.*, 1993) se justifică prin calitățile intrinseci ale acestuia: o bună capacitate de generalizare și o foarte bună rezistență la zgomote. Ținând cont de marea variabilitate a bioproceselor, rețelele neuronale par a fi singura soluție de estimare calitativă a acestora (Psaltis *et al.*, 1989; Guez *et al.*, 1990; Nguyen, Widrow, 1990; di Massimo *et al.*, 1991). În plus, pentru ca rețeaua să nu fie afectată de numărul de determinări experimentale, acestea sunt transformate în imagini (curbe caracteristice). Conform unor studii recente (Fonteix *et al.*, 1995; Fonteix *et al.*, 1994), rezoluția imaginii depinde de numărul de clase definite pe fiecare axă (fig.3.3.2.2.).

Cazul cel mai simplu este cel al imaginii binare, în care prezenta sau absența punctului experimental în cadrul caroiajului este indicat prin rețeaua unei variabile de valoare 1 respectiv 0. Rezultă o clasificare a curbelor cinetice prin intermediul rețelei neuronale, care dă la ieșire un sir binar, indicând prezenta (1) sau absența (-1) a valorilor corespunzătoare.

Antrenarea rețelei neuronale se face prin intermediul unor imagini binare obținute pe baza curbelor caracteristice, utilizând datele provenite din baza de date stocate pe AS/400. Raspunsul rețelei corespunde recunoașterii formei respective și implicit a tipului de evoluție de bioproces. În cazul în care recunoașterea este incertă, rețeaua va da la ieșire o marime aleatoare (Fonteix *et al.*, 1995). În acest caz este necesară o analiză statistică a ieșirilor care să determine gradul de încredere pentru fiecare dintre curbele posibile.

Sistemul expert

Rolul sistemului expert este de a selecta, în baza unei informații *a priori* obținute de la operatorul uman, clasa de bioprocese care îi corespunde procesul de fermentație în studiu (Gehlen, Tolle, 1992; Aynsley *et al.*, 1993). Prin selectarea clasei, se determină implicit parametrii de estimat prin intermediul unei rețele neuronale, iar apoi, după recunoașterea formei de evoluție a bioprocesului de către rețeaua neuronală specializată, este stabilit tipul modelului de evoluție și parametrii ce trebuie estimati. În acest fel, sistemul expert are un rol de supervisor în cadrul

structurii de conducere a bioprocesului (Jamshidi et al., 1991).

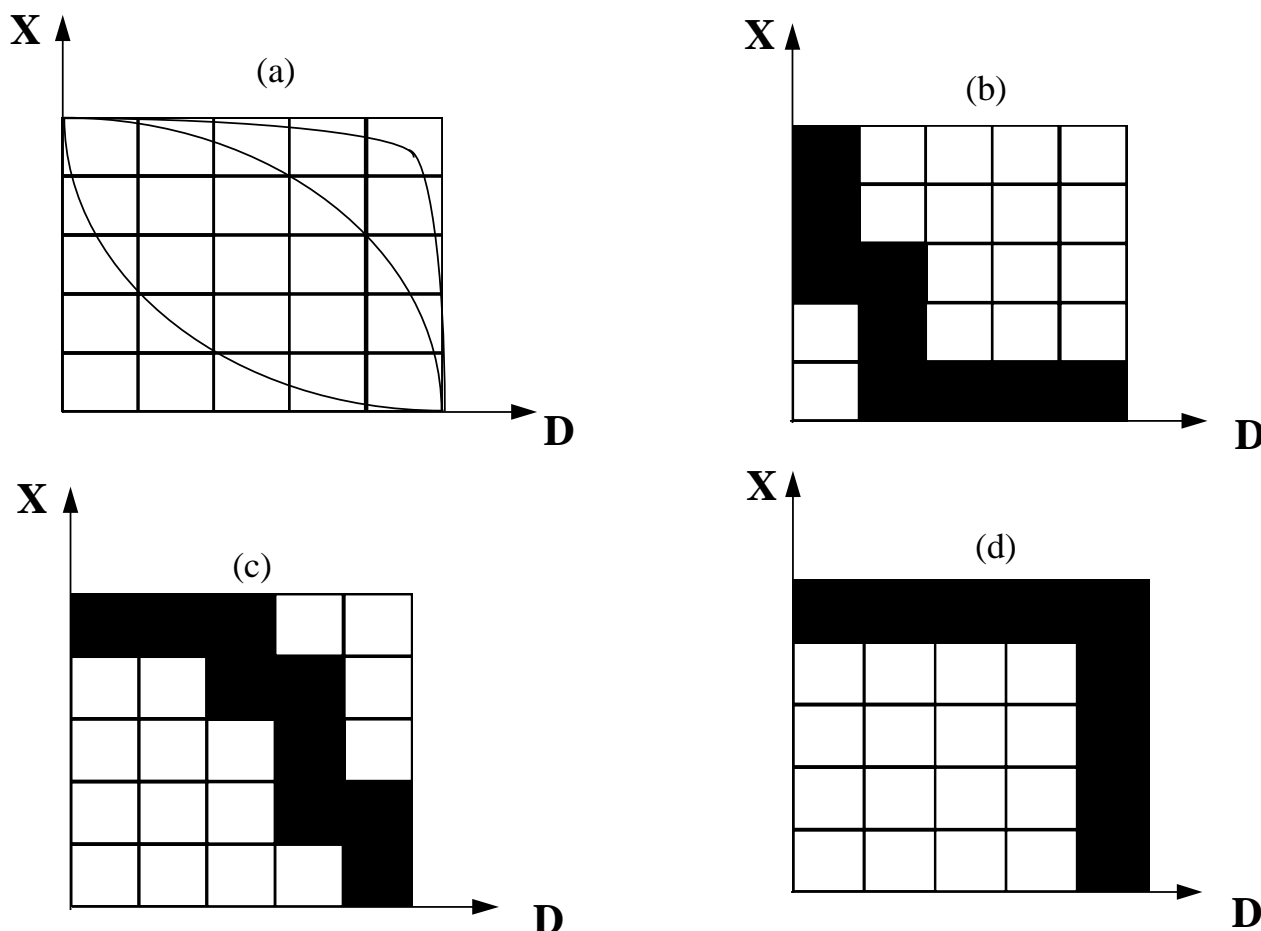


Figura 3.3.2.2 Detectarea de catre o retea neuronală a tipurilor de dependenta $X = f(D)$

Pe de alta parte, in cadrul procesului de modelare, sistemul expert se afla situat la un nivel euristic (Konstantinov, 1993), el stabilind in cadrul clasei de bioprocese, tipul specific al procesului aflat in studiu. In acest fel, in cadrul procedurilor de identificare a tipului de proces de fermentatie, se poate vorbi despre un nivel *euristic* (prin sistemul expert) si un nivel *conexionist* (prin retea neuronală de recunoastere a formelor).

Din punct de vedere structural, sistemul expert are la baza cunostiintele unui expert uman, configurate sub forma unor reguli. In momentul in care a fost recunoscuta imaginea evolutiei bioprocesului, este setata regula corespunzatoare din baza de date. Termenul de *regula* este utilizat in cazul de fata in sens

larg, el ingloband ansamblul de elemente si cunostiinte corespunzatoare bioprocesului in studiu. Astfel, elementele contin informatii cu privire la principalii parametri de bioproces, valorile lor de optim, curbele lor generale de evolutie etc. cunostiintele corespunzand unor forme sintactice de tipul **if...then**, necesare in configurarea structurii fuzzy de catre sistemul expert. In acest fel, prin selectarea unei anumite reguli de catre sistemul expert, este pusa in aplicare o anumita strategie de conducere, configurata pe baza cunostiintelor subiective ale expertului uman. In sfarsit, sistemul expert are si rolul de a urmări in totalitate evolutia procesului, urmand a schimba strategia de conducere in cazul in care aceasta se dovedeste inefficienta.

Conducerea fuzzy a bioprocesului

Utilizarea structurilor fuzzy in conducerea bioprocesului constituie o tematica relativ raspandita in literatura de specialitate recenta (Hu, Yuan, 1995, Srinivas, Chidambaram, 1995, Ramkumar, Chidambaram, 1995, Besli *et al.*, 1996). Modul de abordare este principial de doua feluri, in raport cu fundamentarea regulilor de inferenta:

- pe baza unor valori tipice tipului de bioproces (Ye *et al.*, 1994; Nyttle, Chidambaram, 1994);
- pe baza curbei de evolutie a bioprocesului in studiu (Nyttle, Chidambaram, 1993).

Dupa cum s-a aratat (Jecu, Caramihai, 1996), cel de-al mod de abordare ofera rezultate superioare si usurinta mai mare in formalizarea informatiilor provenite de la expertul uman. In acest fel, se elimina posibilitatea erorilor generale de apreciere prin stabilirea unei curbe specifice de evolutiei a parametrilor, judecatile de inferenta de tip *modus ponens* fiind legate strict de o asemenea curba (Dubois, Prade, 1992). Se obtine astfel o imbinare a avantajelor conducerii prin model *a priori* cu tehnicile fuzzy, capabile sa sintetizeze experienta operatorului uman. O data stabilit tipul bioprocesului, indentificati parametrii si stabilit modelul general de evolutie, sistemul expert coboara la nivelul structurii de control fuzzy setul de reguli aferent maximizarii indicelui de performanta ales. In baza acestui set de reguli, este elaborata o comanda optimala.. Ramane in sarcina structurii fuzzy controlul procesului de fermentatie, ea luand decizii conform evolutiei parametrilor, determinati in continuare prin intermediul modulului de identificare parametrica.

CONCLUZII

1. Studiul evolutiei diverselor bioprocese a permis configurarea unor modele capabile sa dea o aproximare mai exacta curbilor de evolutie reala a acestora. A fost trecuta in revista o succesiune de clase de procese de biosinteza, propunandu-se modelele originale care, dupa cum rezulta si din studiile comparative din Anexe, sunt capabile sa ofere erori de estimare mai mici decat cele din literatura de specialitate.
2. Diversitatea modelelor propuse pentru diferite clase de bioprocese poate fi tratata, din punct de vedere conceptual, intr-o structura unica de conducere, bazata atat pe rezultatele modelarii analitice cat si pe structuri inteligente de control automat. Astfel, a fost sintetizata o configuratie hibrida capabila sa recunoasca, in baza unor informatii a priori obtinute de la operatorul uman, tipul de bioproces si sa decida in consecinta, algoritmul de conducere care sa optimizeze performantele acestuia.
3. Baza de date necesara unei asemenea structuri de conducere a fost configurata pe un sistem de tip AS400, datorita avantajelor deosebite pe care un asemenea calculator de clasa medie il ofera. Accesul la aceasta baza de date permite, pe de o parte, monitorizarea la cerere a rezultatelor experimentale pe diverse orizonturi de timp, iar pe de alta parte, posibilitatea stabilirii unor curbe de evolutie "standart" a diferitelor tipuri de bioprocese.

BIBLIOGRAFIE

- Archer, D. Bioprocess Technol., **19**, p.373, 1994
- Aynsley, M., Hofland, A., Morris, A. J., Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol., **48**, p.3, 1993
- Montague, G. A., di Massimo, C.
- Besli, N., Turker, M., Gul, E. Bioproc. Eng., **14**, p.141, 1996
- Caramihai, M., Chirvase, A.A., Marica, E., *Modelling of alcoholoxidase production with Hansenula polymorpha*, 6th International Conference on Computer Applications in Biotechnology =CAB 6=, Garmisch-Partenkirchen, Germany, p.57, 14-17 May 1995
- Muntean, Ov. *Kinetic model of catalase accumulation in aerobic bioprocess with Micrococcus lysodeikticus*, M²SABI'95 IMACS-IFAC First Intern. Symp. Math. Modelling Sim. Agriculture Bioindustries p.1199, 12 May 1995, Brussels, Belgium,
- Caramihai, M., Dumitrache, I., Chirvase, A.A., Marica, E., Arsene, M. *Modelling of yeast cultivation on prehydrolysis simulated liquor*, 6th. International Conference on Computer Applications in Biotechnology =CAB 6=, Garmisch-Partenkirchen, Germany, p.121, 14-17 May 1995,
- Caramihai, M., Gazdaru, V., Muntean, Ov. *Modelarea matematica a hidrolizei enzimatice a paielor de grau in conditiile acumularii de produs*, Conferinta Nationala de Chimie si Inginerie Chimica, Bucuresti, p.105, 20-21 Oct.1995,
- Caramihai, M., Jecu, L. *Kinetics and mathematical model of Agricultural Residues Biodegradation*, 10th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, **133**, p.695, 15-18 Sep. 1996, Hamburg/Germany,
- Caramihai, M., Jecu, L. *Kinetic study of the enzymatic hydrolysis of wheat straw*, M²SABI'95 IMACS/IFAC First Internat.Symp. on Math. Modelling and Sim. in Agriculture and Bioindustries, p.14, 19-12 May 1995, Brussels, Belgium
- Caramihai, M., Jecu, L. Biotechnol. Bioeng., **31**, p.944, 1988
- Chang, Y. K., Pyun, Y. R., Lim, H. C. *Air - lift bioreactors for microbial cultivation*, Working Party Bioreactor Perf., p.125, Albarella, Italy, 1992,
- Chirvase, A. A., Marica, E. Bioproc. Eng., **8**, p.251, 1993
- Chtourou, M., Najim, K., Roux, G., Dahhou, B.
- David, C., Fornasier, R. Macromolecules, **19**, p.552, 1986
- Dubois, D., Prade, H. Analysis of Fuzzy Informations, J. Bezdek (Ed.), Boca Raton, 1992
- Dumitrache, I., Calcev, G., Caramihai, M. *Neural networks in modelling and control of bioprocesses*, IMACS/IFAC 2nd Intern. Symp., Bruxelles, 1993
- Esterbauer, H., Steiner, W., Labudova, I., Hermann, A. Bioresources Technol., **36**, p.51, 1991

- Fonteix, C., Corriou, J. P., Marc, I.
Fonteix, C., Marc, I., Kuehm, N., Engasser, J. M.
Gaden Jr., E. L.
Garrido-Sanchez, L.
- Garrido-Sanchez, L., Fonteix, C., Lourenco, A., Kuehm, N., Engasser, J. M.
- Gehlem, S., Tolle, H.
- Grohman, K.
Guez, A., Ellbert, J. L., Kam, M.
Gupta, V. K.
Hu, D. Z., Yuan, Y. J.
Jamshidi, M., Baugh, S., Barak, D., Vadice, N.
- Jecu, L.
Jecu, L., Caramihai, M.
- Jeffries, T. W., Sreenath, H. K.
Konstantinov, K. B.
- Kuhard, R. C.
Lee, S. C., Hwang, Y. B., Chang, H. N., Chang, Y. K.
Leonard, R. H., Hajny, G. J.
Lim, H. C., Tayeb, Y. J., Modak, J. M., Bonte, P.
Luttmann, R., Munack, A., Thoma, M.
Maheswari, D. K.
Mandels, M., Reese, E. T.
Mandels, M., Sternberg, D.
Mandels, M., Weber, J.
Marsden, W. L., Gray, P. P.
di Massimo, C., Willis, M. J., Montague, G. A., Tham, M. T., Morris, A. J.
Michaelis, L., Menten, M. L.
Miller, G.
Modak, J. M., Lim, H. C., Tayeb, Y. J.
Montague, G. A., Peel, C., Willis, M. J., Morris, A. J.
- Lavoisier Techn. Docum., **37**, Paris, p.121, 1995
Fuzzy dynamic experimental design, 5th Int. Conf. IPMU, 1994
Biotechnol. Bioeng., **1**, p.413, 1959
Conception et mise en oeuvre d'un systeme d'aide a la modelisation de procede de ferm.utilisant un systeme expert et de reseaux de neurones, Thesis, Inst. Nat. Polytech. de Lorraine, 1993
SAM, An expert system for automatic modelling of bioprocess, IMACS/IFAC 2nd International Symposium, Bruxelles, 1993
Integration of Expert Systems and Neural Networks for the Control of Fermentation Processes, IFAC Symp. Model. Contr. Biotech. Proc., Keystone, USA, 1992
Biotechnol. Agric. Ser., **9**, p.183, 1993
IEEE Contr. Sys. Mag., **27**, p.22, 1990
J. Res., **29(2)**, p.219, 1992
Chem. Eng. Sci., **50**, p.3297, 1995
A Comparison of an Expert and an Adaptive Fuzzy Control Approach, 30th Conf. Dec. Contr., England, 1991
Rev. Roum. Biochim., **32**, p.512, 1995
Control of enzymatic hydrolysis of agricultural wastes by intelligent techniques, CLEAN TECH '96, 19-21 June, 1996, London, UK
Biotechnol. Bioeng., **31**, p.502, 1988
Control of Bioprocesses using Knowledge-Based Approaches EFB Symp., WP Bioreac. Perf., Bratislava, 1993
World J. Microbiol. Biotechnol., **9(1)**, p.100, 1993
Biotechnol. Bioeng., **37**, p.597, 1991
Ind. Eng. Chem., **57**, p.390, 1945
Biotechnol. Bioeng., **28**, p.1408, 1986
Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol., **32**, p.205, 1985
J. Microbiol. Biotechnol., **9(1)**, p.120, 1993
J. Bacteriol., **73**, p.269, 1957
J. Ferment. Technol., **54**, p.267, 1976
Adv. Chem. Ser., **95**, p.391, 1969
CRC Critical Rev. Biotechnol., **3**, p.235, 1986
Bioproc Eng., **7**, p.77, 1991
Biochem. Z., **49**, p.333, 1913
Anal. Chem., **31**, p.426, 1956
Biotechnol. Bioeng., **28**, p.1396, 1986
EFB Bioreact. Eng. Course, Italy, 1991

- Morrison, I. M.
Moser, A.
- Nguyen, D. H., Widrow, B.
Nidetzky, B.
Nyttle, V. G., Chidambaram, M.
Nyttle, V. G., Chidambaram, M.
Normandin, A., Thibault, J., Grandjean, B. P.
A.
Olama, Z. A.
Orsson, L.
Psaltis, D., Sideris, A., Yamamura, A. A.
Ramos, L.P., Breuil, C., Saddler, J. N.
Ramkumar, K.B., Chidambaram, M.
Robson, L. M., Chamblis, G. H.
Ropars, M., Marchal, R., Pourquoi, J.
Schugerl, K.
Schugerl, K.
- Semones, G. B., Lim, H. C.
Srinivas, M., Chidambaram, M.
Steiner, J.
Szewczyk, K. W.
Thibault, J., Najim, K.
Thibault, J., van Breusegem, V.
- Walter, E., Pronzato, L.
- Wenzel, H.
- Willis, M. J., Montague, G. A., di Massimo, C., Tham, M. T., Morris, A. J.
Wood, T. M.
Wyman, C., Goodman, B.
Zacchi, G., Skoog, K.
- J. Sci. Food Agric., **42**, p.295, 1988
Biotechnology, H. J. Rehm & G. Reed (Ed.), **2**, Springer Verlag, Berlin, p.243, 1984
IEEE Contr. Sys. Mag., **27**, p.16, 1990
Enzyme Microbiol. Technol., **16**(1), p.43, 1994
Bioproc Eng., **9**, p.115, 1993
Bioproc Eng., **10**, p.225, 1994
Bioproc. Eng., **10**, p.109, 1994
- Food Chem., **47**(3), p.221, 1993
Process Biochem., **28**(4), p.249, 1993
IEEE Contr. Sys. Mag., **26**, p.7, 1989
Enzyme Microbiol. Technol., **15**, p.19, 1993
Bioprocess Eng., **12**, p.263, 1995
Enzyme Microbiol. Technol., **11**, p.626, 1989
Bioresour. Technol., **42**, p.197, 1992
Bioprocess Eng., **9**(2), p.215, 1993
Bioreaction Eng., **1**, J.Wiley & Sons (Ed.), New York, p.35, 1987
Biotechnol. Bioeng., **33**, p.16, 1989
Bioprocess Eng., **12**, p.135, 1995
World Microbiol. Biotechnol., **10**(3), p.280, 1994
Bioprocess Eng., **10**(3), p.123, 1994
Bioproc. Eng., **9**, p.107, 1993
Modelling, Prediction, and Control of Fermentation Processes via Neural Networks - Europ. Contr. Conf., Grenoble, 1991
Identif. de modeles param. a partir de donnees experim., Ed. Masson, 1994
Chemical technology of wood, Acad.Press, New York, 1970
Automatica, **28**, p.1181, 1992
- Biochem. Soc.Trans., **20**, p.46, 1992
Appl. Biochem. Biotechnol., **39/40**, p.41, 1993
Biotechnol. Bioeng., **32**, p.460, 1988