

ENZYMATISK HYDROLYS AV CELLULOSA I TVAFAS-SYSTEM

BERNT NILSSON

DEPARTMENT OF AUTOMATIC CONTROL
LUND INSTITUTE OF TECHNOLOGY
DECEMBER 1984

TILLHÖR REFERENSBIBLIOTEKET
UTLÄNAS EJ

LUND INSTITUTE OF TECHNOLOGY DEPARTMENT OF AUTOMATIC CONTROL Box 118 S 221 00 Lund Sweden		Document name Master thesis
		Date of issue December
		Document number CODEN:LUTFD2/(TFRT-5316)/1-063/(1984)
Author(s) Bernt Nilsson		Supervisor Per Hagander
		Sponsoring organization
Title and subtitle (Enzymatic hydrolysis of cellulose in two-phase systems.) Enzymatisk hydrolys av cellulosa i tvåfas-system.		
Abstract A comparison of experiment and publiced models of enzymatic hydrolysis of cellulose gives: The three models, that have been studied, predict batchwise experiments with satisfaction. The models do not give satisfactory predicts for a continuous process.. The models were not good enough for wider studies of a continuous process, like for process engineering purpose or automatic control design. A Flow Injection Analysis-system with a dialysis probe is a good alternativ for on-line analysis of enzymatic hydrolysis, also for the purpose of automatic control. In a continuous two-phase process for production of glucose a SISO-regulator can be used for control of glucoseconcentration. Reconstruction should be used in controlling enzym activities in the process. Continuous time control design is enough, because the hydrolysis dynamics is slow.		
Key words		
Classification system and/or index terms (if any)		
Supplementary bibliographical information		
ISSN and key title		ISBN
Language Swedish	Number of pages 63	Recipient's notes
Security classification		

DOKUMENTATABLAD RT 3/81

Distribution: The report may be ordered from the Department of Automatic Control or borrowed through the University Library 2, Box 1010, S-221 03 Lund, Sweden, Telex: 33248 lubbis Lund.

ENZYMATISK HYDROLYS av CELLULOSA

i

TVAFAS-SYSTEM

—
en reglerteknisk och processteknisk förstudie

Bernt Nilsson

Examensarbete nov. 1984
Institutionen för Reglerteknik
Lunds Tekniska Högskola

Handledare:
Per Hagander, Reglerteknik
Carl-Fredrik Mandenius, Tillämpad Biokemi

SAMMANFATTNING.

Vid jämförelse av försök och publicerade modeller av enzymatisk hydrolys har följande framkommit:

att de tre modeller som studerats predikterar satsvisa förlopp tillfredställande.

att de i kontinuerliga processer är otillräckliga.

För en kontinuerlig process utgör inte modellerna någon bas, varken process-teknisk dimensionering eller reglerteknisk design.

Ett FIA-system med en dialysprobe utgör ett bra alternativ för on-line mätningar för reglering av enzymatisk hydrolys.

I en kontinuerlig process för produktion av glukos kan en SISO-regulator användas vid regleringen av glukoskoncentrationen.

Rekonstruktion bör tillämpas vid reglering av enzymaktiviteter i processen.

Tidskontinuerlig design är tillräcklig eftersom hydrolysen har en långsam dynamik.

INNEHALLSFÖRTECKNING.

1.	Inledning.	
2.	Enzymatisk Hydrolys.	
2.1	Kvalitativ beskrivning.	2.1
2.2	Kvantitativ beskrivning.	2.5
2.3	Jämförelse av modeller och ett satsvis försök.	2.15
3.	Tvåfas-system För Kontinuerlig Produktion.	
3.1	Processbeskrivning.	3.1
3.2	Fasval och fasjämvikter.	3.3
3.3	Processmodellering.	3.4
3.4	Jämförelse av processmodell och ett kontinuerligt försök.	3.7
4.	Processreglering.	
4.1	Processreglering. En översikt.	4.1
4.2	Processanalyssystemet FIA-glukos.	4.4
4.3	Glukosreglering.	4.6
4.4	Enzymreglering.	4.7
4.5	Ett övergripande kontrollsystem.	4.9
5.	Processtekniska aspekter.	

APPENDIX I	Simnon-program ; Kinetikmodeller.
II	Simnon-program ; Processmodeller.

Nomenklatur.

Referenser.

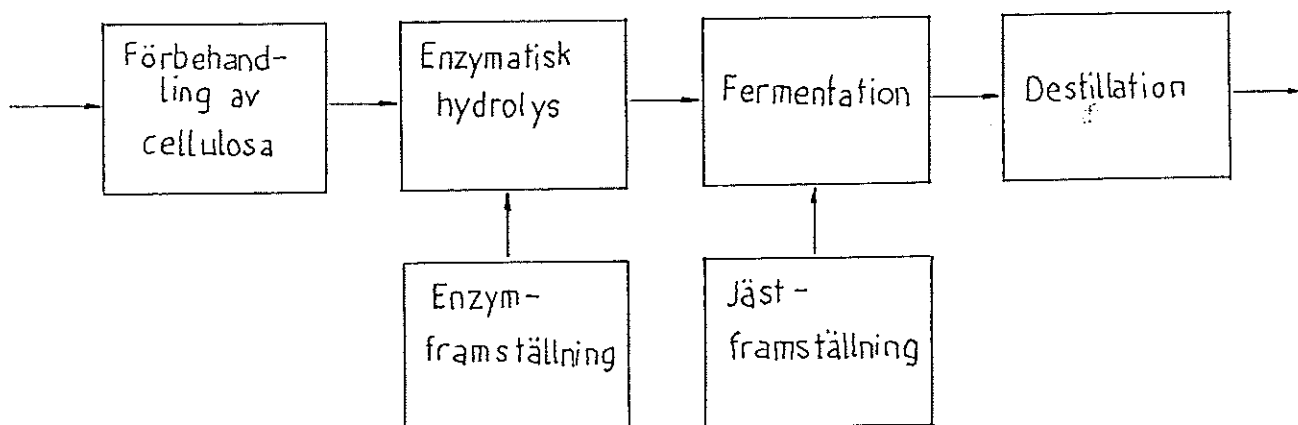
1. INLEDNING.

Att utnyttja en förnyelsebar råvarukälla, som cellulosa, utgör ett mycket lockande alternativ till traditionella råvaror. Enzymatisk hydrolys av cellulosa till socker, tillsammans med fermentation, utgör de primära processerna för produktion av basråvaran etanol.

Både socker och etanol kan utnyttjas för vitt skilda ändamål samt för vidareförädling.

Etanol kan bl.a. användas som bränsle. Detta är utgångspunkten för ett större projekt vid Kemicentrum.

De delprocesser som studeras är förbehandling av cellulosa, enzymatisk hydrolys, fermentation samt destillation.



Rapporten behandlar endast processteget enzymatisk hydrolys, d.v.s. processtekniska och reglertekniska synpunkter på ett processalternativ där man utnyttjar ett tvåfas-system.

Detta arbete är ett led i ett samarbete mellan institutionen för Reglerteknik och avdelningen för Tillämpad Biokemi/Bioteknik.

Enzymatisk hydrolysis

2. ENZYMATISK HYDROLYS

2.1 KVALITATIV BESKRIVNING

Reaktionsmekanismer

Nedbrytningen av cellulosa med enzymer från *Trichoderma reesei* och andra mikroorganismer är av en komplex natur med flera reaktionsvägar. A.Humphrey m.fl. (1977,ref.9) studerade produktion av Cellprotein (Single Cell Protein) och föreslog följande reaktionsvägar (se fig. 2.1).

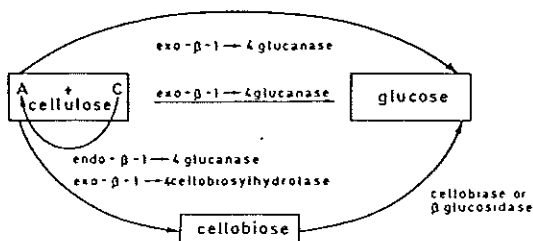


Fig. 2.1 Reaktionsvägar enligt ref. 9.

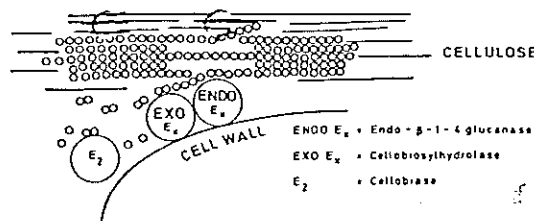


Fig. 2.2 Enzymatisk hydrolysis av cellulosa enligt ref. 9.

Enzymsystemet är i huvudsak uppbyggt av tre viktiga enzymer; exo-β-1,4 glukanas, endo-β-1,4 glukanas samt β-glukosidas. Exo-cellulaset bryter ner cellulosan helt slumpmässigt, medan endo-cellulaset frigör cellobios från polymerändan av cellulosamolekylen. För att endo-cellulaset skall kunna arbeta effektivt krävs utrymme för enzymet dvs. denna nedbrytning är beroende av substratets natur.

En mer komplex mekanism är presenterad av Klyosov (1980) som introducerade ytterligare ett enzym, cellobiohydrolas, som arbetar tillsammans med endo-cellulase och producerar cellobios från polymerändan av cellulosan. (se fig. 2.3)

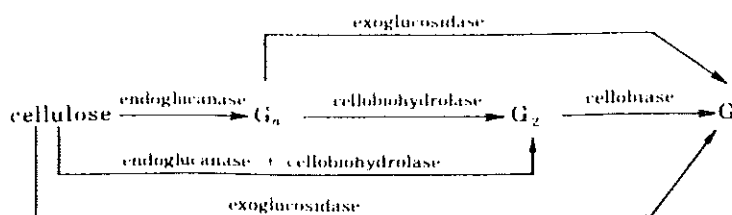


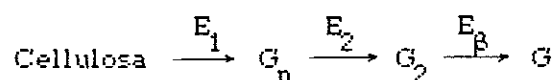
Fig. 2.3 Reaktionsvägar vid cellulosanedbrytning enligt ref.4.

Enzymatisk hydrolyt

Det har dock visats sig att den mest betydande reaktionsvägen är den via cellobios (ref. 1 och 4).

Ytterligare ett intressant fenomen som gör en teoretisk beskrivning oerhört komplex är att enzymsystemet uppvisar synergism-effekter (ref. 16). Det vill säga enzymerna arbetar avsevärt effektivare tillsammans än var för sig.

Man kan alltså approximera nedbrytningen av cellulosa som om det vore en tre-steps reaktion. Cellulosa klipps sönder till kortare cellulosakedjor (glukosoligomerer) som tuggas sönder till cellobiosmolekyler, som i sin tur klyvs av ett tredje enzym till glukosmonomerer.



Inhibering

Som de flesta enzymreaktioner finns här betydande produktinhiberingar. Cellobios har en kraftig inverkan på cellulosa hydrolysen. Glukos inhiberar cellulosa hydrolysen avsevärt mindre än cellobios men inverkar också på cellobios hydrolysen.

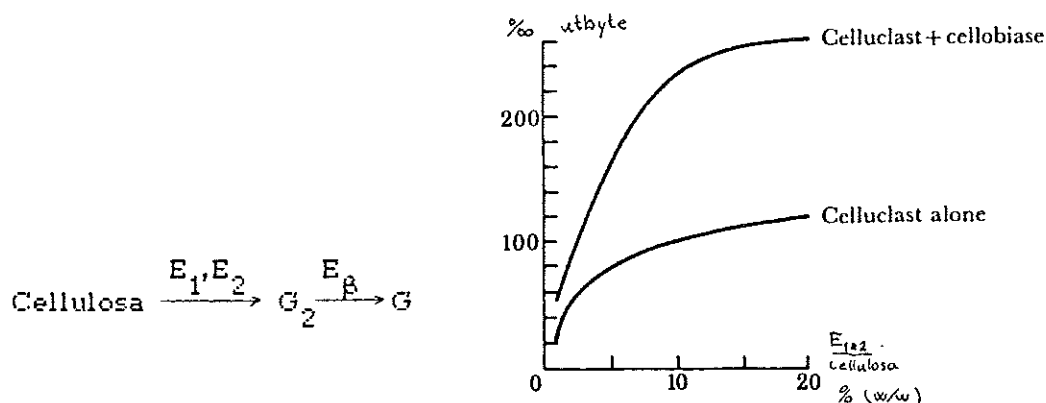


Fig. 2.4 Hydrolyt av Avicel med Celluclast och cellobias vid olika koncentrationer. 20% cellulosa, pH 5, temperatur 50°C, reaktionstid på 24 h, Cellobias koncentration på 20% av cellulaskoncentrationen (ref. 4).

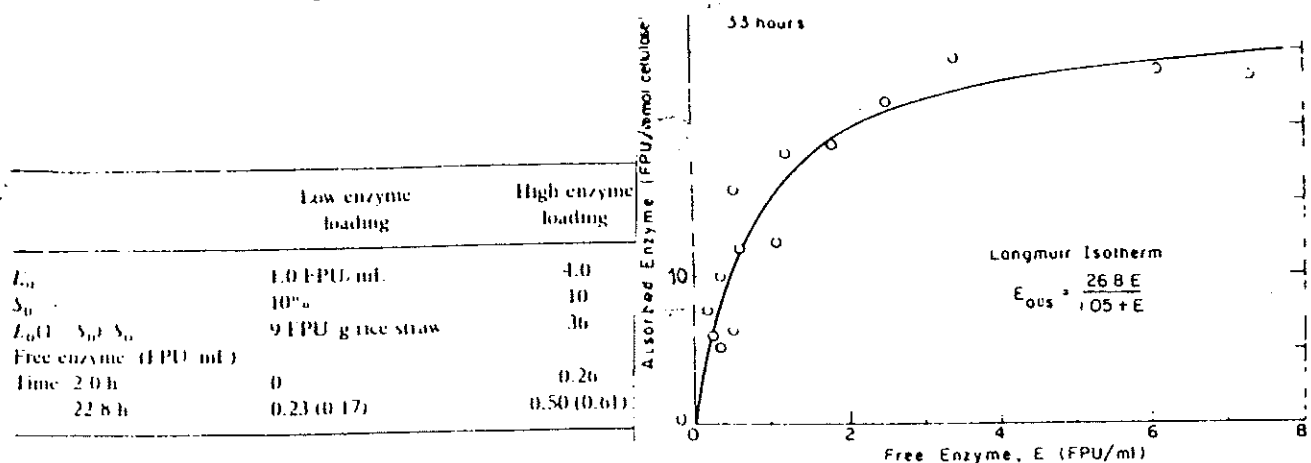
Vi ser direkt att då β -glukosidase är det hastighetsbestämmande enzymet skjunker utbytet drastiskt. Humphrey m. fl. (ref. 17) har gjort omfattande studier av inhibering vid cellulosa hydrolyt. De fann att cellobios är ca. 14 gånger så inhiberande som glukos vid cellulosa hydrolyt.

Enzymadsorption

Flera författare (ref 1 och 5) har studerat hur cellulaser adsorberas på

Enzymatisk hydrolyt

cellulosa. Både irreversibel som reversibel adsorption har föreslagits men sanningen är nog att båda processerna kan äga rum. Blanch m. fl. (ref. 5) föreslog att man kunde beskriva adsorptionen med en Langmuir isoterm och att denna adsorption var reversibel.



Tabell 2.5 Reversibel adsorption enligt ref. 5.

Fig. 2.6 Adsorptionsisoterm för cellulaser på cellulosa.

Likaledes gjorde Dietrichs m. fl. (ref. 1) och de tog fram adsorptionsdata för olika substrat och cellulaser, se tabell 2.7 nedan.

$$E_a = \frac{E_{\max} * E}{E + 1/K_a}$$

Source of enzymes	Substrate, conditions	$E_{a, \max}$ (g/g)	K_a (l/g)
Trichoderma reesei	Avicel, 40°C, pH 4-5	0,06	0,5
Penicillium funiculosum	Avicel 40°C, pH 5	0,05-0,1	ca. 1
Trichoderma reesei	amorphous cellulose	0,3	1,7

Tabell 2.7 Adsorptionsdata för olika cellulaser (ref. 1)

Det har också rapporterats (ref. 1) att β -glukosidase inte adsorberas på cellulosa.

Enzyminaktivering

Det är ett välkänt faktum att enzymer förlorar aktivitet under reaktionen. Detta beror på många faktorer så som termodynamisk resp. kemisk protein denaturering, irreversibel adsorption, proteases interaktion samt mikrobiell contamination (ref.1).

Det senare kan minimeras genom tillsättning av Natriumazid. Temperaturer över 50°C ger en avsevärd enzymdenaturering (ref. 16). Även pH är en

Enzymatisk hydrolyt

väsentlig parameter för enzymstabiliteten. Vid temperaturen 37°C och pH 5 observerades en anmärkningsvärd stabilitet (ref. 16). I tvåfas-systemet Dextran/Polyetenglykol har enzymssystemet en lika god stabilitet för pH 5 och temperaturer upp till 50°C (ref. 10).

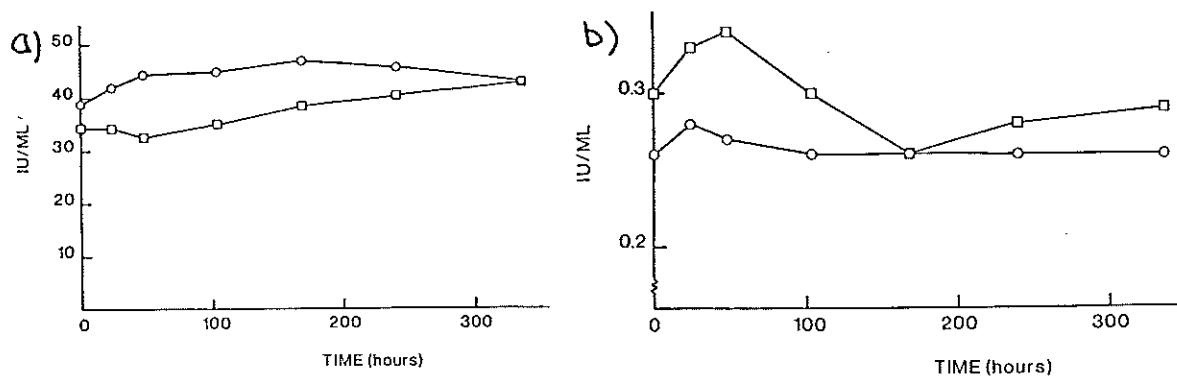


Fig. 2.8 Enzymaktivitet i ett tvåfas-system Dextran/Polyetenglykol vid pH 5 och 50°C a) endo- β -glukanase b) β -glukosidase

Med detta som bakgrund är den mest betydande deaktiveringsparametern irreversibel adsorption.

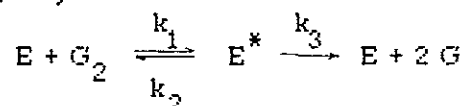
Enzymatisk hydrolysis

2.2 KVANTITATIV BESKRIVNING

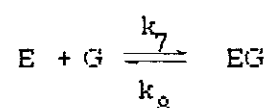
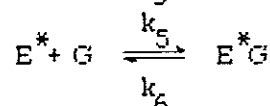
Nedan beskrivs tre modeller för enzymatisk hydrolysis av cellulosa. Modellerna har en fysikalisk-kemisk bakgrund och har hämtats ur publicerade artiklar. Modellerna har simulerats m.h.a. simuleringspaketet SIMNON (ref. 19). Kapitlet avslutas med en jämförelse av modellerna med experimentella data. Vi börjar dock med att ta fram ett kinetikuttryck för cellobioshydrolysen.

Cellobioshydrolysis

Glukos bildas då β -glukosbindningen i cellobiosmolekylen klyvs. Denna klyvning görs av ett enzym, cellobias eller β -glukosidas. Ladisch m. fl. (ref. 11) föreslog följande reaktion vid cellobioshydrolysis



och följande inhiberingsreaktioner (nonkompetativ resp. kompetativ)



vilket kan beskrivas med vanlig enzymkinetik.

$$\begin{aligned} \frac{dG}{dt} &= 2k_3 E_{\text{tot}} G_2 / \left[\frac{k_2+k_3}{k_1} \left(1 + \frac{G}{k_8/k_7}\right) + G_2 \left(1 + \frac{G}{k_6/k_5}\right) \right] \\ &= k_b E_b G_2 / \left[G_2 \left(1 + \frac{G}{K_{i,1}}\right) + K_m \left(1 + \frac{G}{K_{i,2}}\right) \right] \end{aligned}$$

där $k_b = 2k_3$, $K_{i,1} = k_6/k_5$, $K_{i,2} = k_8/k_7$, $K_m = (k_2+k_3)/k_1$

I samma artikel är också några värden på konstanterna publicerade.

$$\begin{aligned} k_b &= 116 \mu\text{mol glukos/min, mg protein} = 1.25 \text{ g glukos/h, mg protein} \\ K_m &= 2.5 \text{ mM} = 0.856 \text{ g cellobios/liter} \\ K_{i,1} &= 15 \text{ mM} = 2.7 \text{ g glukos/liter} \\ K_{i,2} &= 2 \text{ mM} = 0.36 \text{ g glukos/liter} \end{aligned}$$

Enzymatisk hydrolys

Figuren nedan består av tre kurvor direkt tagna från de citerade författarna samt två simuleringar av motsvarande kurvor. I modellen användes enheten mg/l som ett mått på enzymmängden. En mer adekvat sätt är att använda enzymaktivitet, vilket enkelt går att modifiera genom att kalibrera om reaktionskonstanten, k_p .

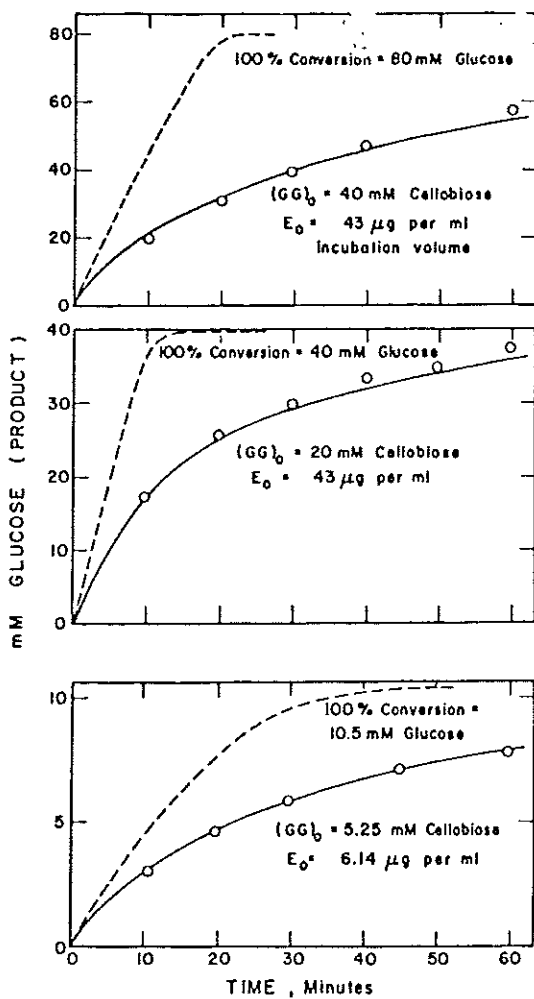


Fig. 2.9 Tidsprofiler hos cellobioshydrolys vid pH 4.75 och 50°C

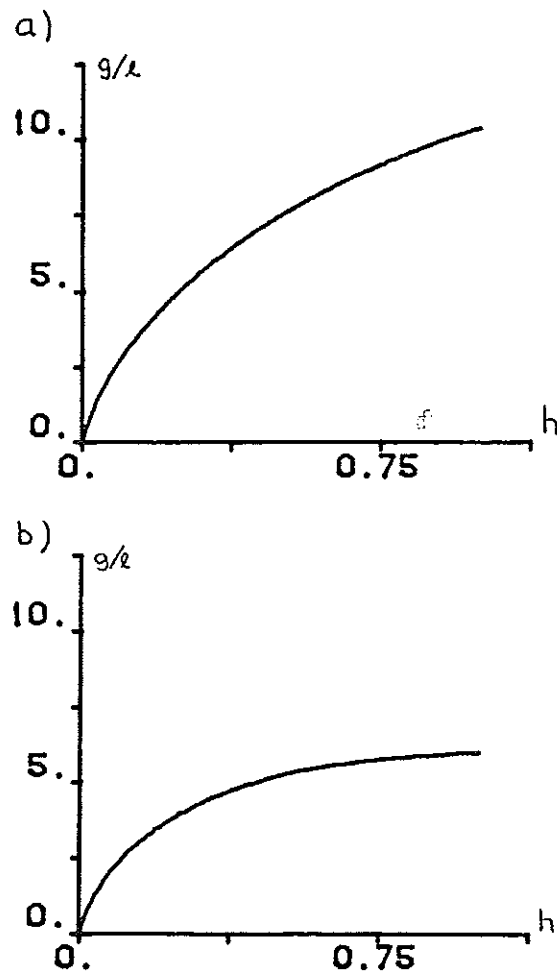


Fig. 2.10 Simulering av cellobioshydrolys enligt ref. 11. 43 µg β -glukosidas samt initial konc.
a) 40 mM eller 13.7 g/l
b) 20 mM eller 6.8 g/l
(OBS! gram glukos/liter som funktion av tiden (h))

Enzymatisk hydrolyt

'Shrinking site'-modellen

Denna modell föreslog A.Humphrey m. fl. (ref. 9) i samband med att de studerade produktionen av SCP (Single cell protein). De antog att cellulosa hydrolysen är av första ordningen m.a.p. adsorberad enzym och av antalet aktiva centra för hydrolyt samt även en inhiberingsterm.

$$\frac{dC_x}{dt} = -k_1 \Theta \xi i$$

där k_1 = en reaktionshastighetskonstant

Θ = antalet centra = antalet centra/ytenhet * ytan = ηS

ξ = adsorberad enzym = Langmuirisotermen = $k'SE_x / (\alpha + E_x)$

i = inhiberingsterm = $I_2 / (I_2 + c)$ (kompetativ inhibering där I_2 är en inhiberingskonstant)

D.v.s

$$\begin{aligned} \frac{dC_x}{dt} &= -k_1 \eta S * \left[\frac{k'SE_x}{\alpha + E_x} \right] * \left[\frac{I_2}{I_2 + c} \right] \\ &= -K_2 S^2 \left[\frac{E_x}{\alpha + E_x} \right] \left[\frac{I_2}{I_2 + c} \right] \end{aligned}$$

där $K_2 = k_1 \eta k'$

Om vi nu antar att cellulosa är sfärisk så har den ytan S , $S = 4\pi R^2 n$ (R = partikelradie, n = antalet partiklar), samt att koncentrationen C_x , $C_x = 4/3 \pi R^3 \rho$ (ρ = cellulosadensiteten), så ger detta

$$\frac{dC_x}{dt} = -K_3 C_x^{4/3} * \left[\frac{E_x}{\alpha + E_x} \right] * \left[\frac{I_2}{I_2 + c} \right]$$

där $K_3 = K_2 * 16 * (3/4)^{4/3} * \pi^{2/3} * n^{2/3} * \rho^{-4/3}$.

Enzymatisk hydrolysis

Simulering av denna differentialekvation tillsammans med modellen för cellobioshydrolysis kan ses nedan. Vi förutsätter alltså att all hydrolyserad cellulosa övergår till cellobios innan glukos bildas.

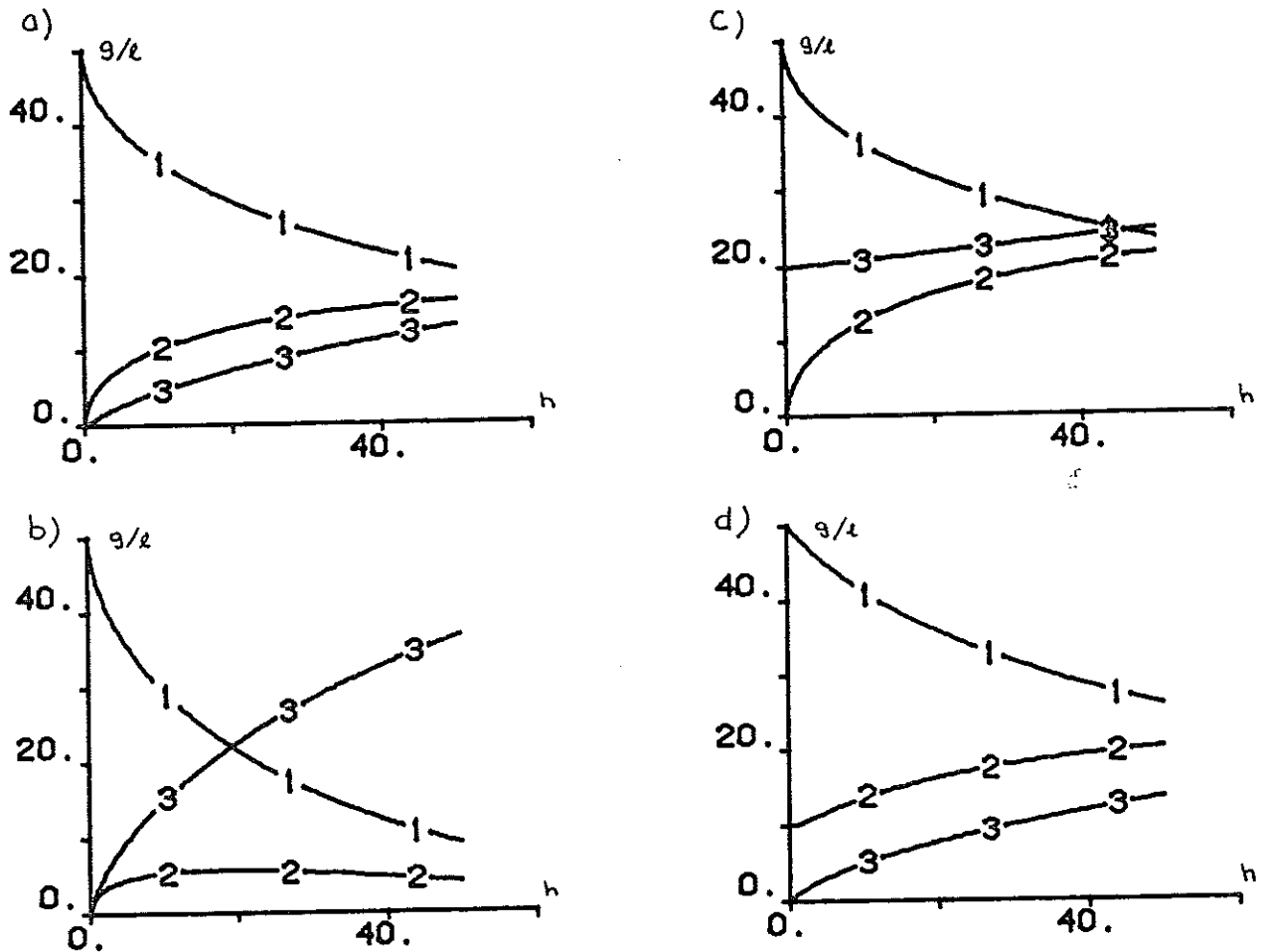
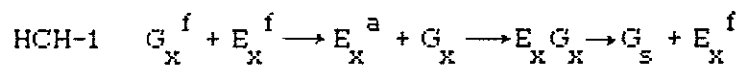
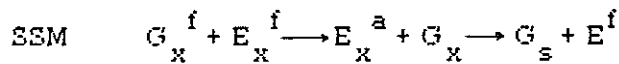


Fig. 2.11 Simulering av SEM med initial koncentrationerna:
 cellulosa 50 g/l, Celluclast 2 FPU/ml, β -glukosidas 20 IU/l
 (1:Cellulosa , 2:Cellobios , 3:Glukos)
 a) som ovan
 b) som ovan utom β -glukosidas 2 IU/ml
 c) som ovan samt en glukoshalt på 20 g/l
 d) som ovan samt en cellobioshalt på 10 g/l

Enzymatisk hydrolyt

'HCH-1'-modellen

HCH står för initialerna för upphovsmännen Holtzapfle, Caram och Humphery. Detta är en vidareutveckling av SSM där vi antog att reaktionen var proportionell m.a.p. adsorberat enzym och aktiva centra för hydrolyt. I HCH-1 har man gått ett steg längre och säger att det inte räcker med detta utan ytterligare en komplexbildande reaktion är nödvändig.



Jämte dessa kemiska och fysikaliska reaktioner sker olika inhiberande reaktioner (se fig. 2.12).

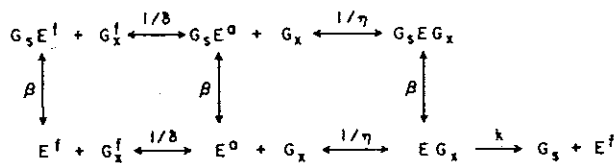


Fig. 2.12 Reaktionsmekanism för HCH-1 modellen.

Om vi startar med att säga att reaktionen är av första ordningen m.a.p. enzym-substratkomplexet:

$$\frac{dG_s}{dt} = k E G_x$$

konstanterna i modellen fås vid jämvikt.

$$1/\delta = E^a / (E^f G_x^f)$$

$$1/\eta = E G_x / E^a$$

$$\beta = G_s E^f / (E^f G_s) = G_s E^a / (G_s E^a) = G_s E G_x / (G_s E G_x)$$

Enzymatisk hydrolyt

En enzymbalans ger då

$$E^f = \frac{E_0}{(1+\beta G_x)(1+(1/\delta+1/(\delta\eta))G_x^f)}$$

och en cellulosabalans ger

$$G_x^f = \frac{G_x}{(1+\epsilon(1+\beta G_x)(1/\delta+1/(\delta\eta))E^f)}$$

där ϵ är antal upptagna hydrolyscentra.

Reaktionsuttrycket kan nu skrivas

$$\frac{dG_x}{dt} = kEG_x = k/\eta E^a G_x^f = k/(\delta\eta) E^f G_x^f$$

eller om vi gör om det lite

$$\frac{dG_x}{dt} = \frac{\kappa G_x E}{\alpha + \phi G_x + \epsilon E} \left[\frac{1}{1 + \beta G_x} \right]$$

där konstanterna ovan är

$$\kappa = k/(\eta+1)$$

$$\alpha = \eta\delta/(\eta+1)$$

$$\phi = \frac{\text{fria antalet centra}}{\text{totala antalet centra}} = \frac{G_x - \alpha - \epsilon E + \sqrt{(G_x - \alpha - \epsilon E)^2 + 4\alpha G_x}}{2G_x}$$

Författarna har gjort omfattande studier och erhållt följande parametrar vid resp. parameteranpassning

	κ	α	ϵ	β	fel%
Tidsprofil	26.3	8.87	36.8	0.45	9.98
Medelhastighet	43.6	16.2	67.8	0.4	5.15
Initialhastighet	11.3	2.49	49.1	-	7.72

Enzymatisk hydrolys

HCH-1 modellen har simulerats nedan med de parametrar som erhöles för tidsprofilanpassning.

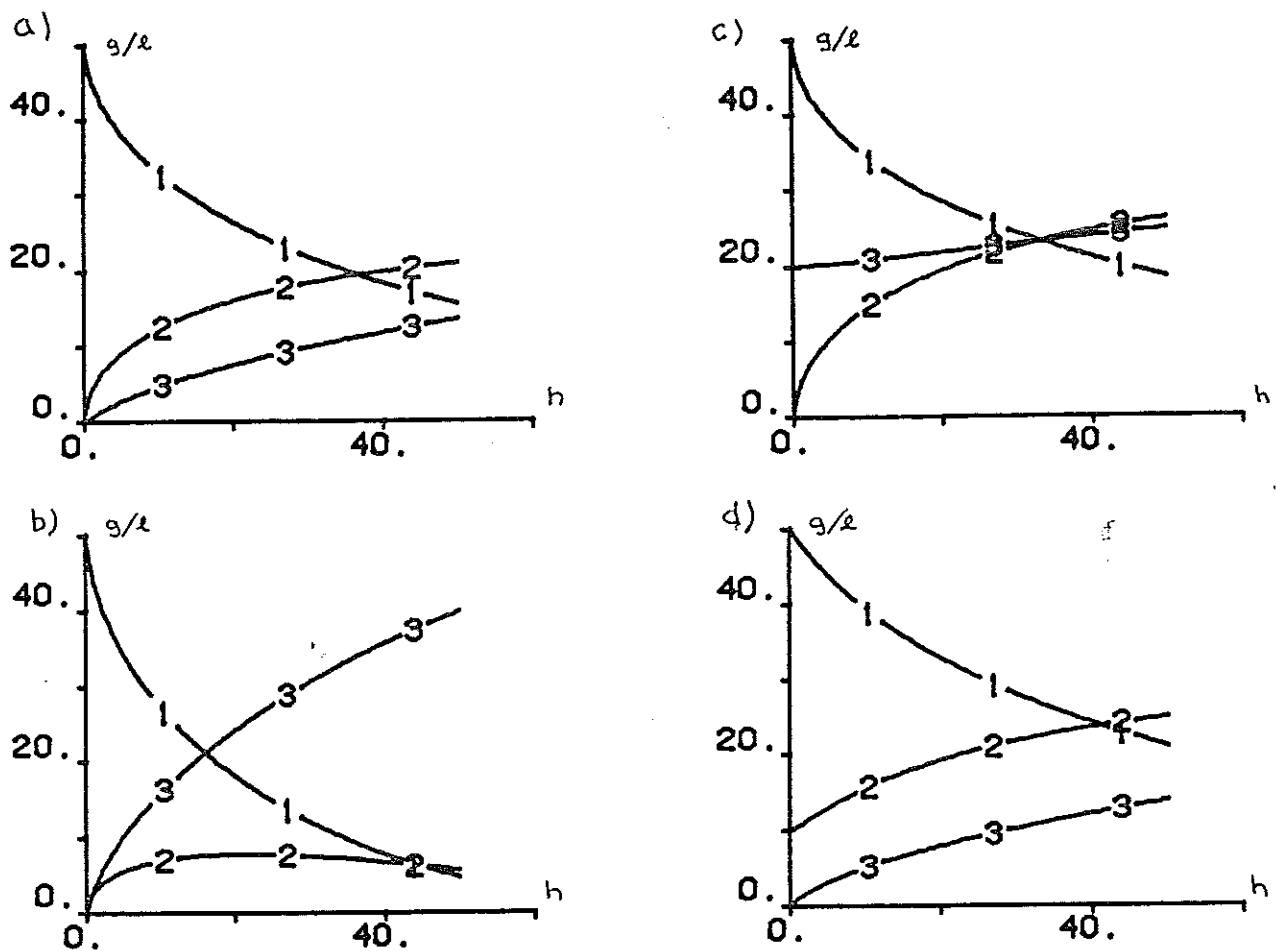


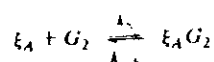
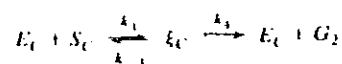
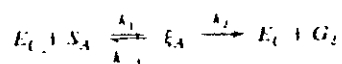
Fig. 2.13 Simulering av HCH-1 med initial koncentrationerna
 cellulosa 50 g/l, Celluclast 2 FPU/ml, Novozym 0.02 IU/ml
 (1:Cellulosa , 2:Cellobios , 3:Glukos)
 a) som ovan
 b) som ovan utom Novozym 2 IU/ml
 c) som ovan samt en glukoshalt på 20 g/l
 d) som ovan samt en cellobioshalt på 10 g/l

Enzymatisk hydrolys

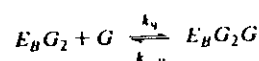
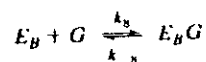
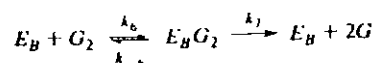
'Amorf och kristallin cellulosa'-modellen

Denna modell publicerades av Blanch m. fl. (ref. 5). De dominerande reaktionerna enligt författarna är följande:

Heterogeneous reactions:



Homogeneous reactions:



Tabell 2.14 Reaktionsvägar för cellulosa-hydrolys enligt ref.5.

De homogena reaktionerna känner vi igen från cellobioshydrolysen ovan. De heterogena reaktionerna består av två olika reaktioner för hydrolys av amorf resp. kristallin cellulosa. Även en inhiberingsreaktion av det amorfa enzymkomplexet har antagits.

Hastighetsekvationerna för de heterogena reaktionerna är snarlika de för ESM, d.v.s. är av första ordningen m.a.p. enzym-substratkomplexet.

$$r_c = k_c \xi_c \quad r_a = k_a \xi_a \left[\frac{1}{1 + K_1 c} \right]$$

Enzymadsorption $\xi = n_s SE / (K + E)$

Substratyta (sfärisk) $S = 4\pi R^2 n$

Substratkoncentration $C = 4/3 \pi R^3 n c$

vilket ger

$$\xi = B' C' E / (E + K)$$

där $B' = 3n_s / (4\pi R^2)$ och $C' = C^{1/3} C^{2/3}$

tillsammans med en enzymbalans

$$E_0 = E + \beta M_e \xi$$

(βM_e är omräkningsfaktorer från mol till aktiviteter).

Vi eliminerar E (samt gör ett variabelbyte) och får följande

$$(E_0 - \xi') (\xi' - BC) = -\xi' K$$

eller $\xi' = b/2 \pm (b^2/4 - c)^{1/2}$

Enzymatisk hydrolys

$$\begin{aligned} \text{där } b &= BC + K + E_0 && (\text{samnt } \xi' = \beta M \xi) \\ c &= BCE_0 && (\text{och } B = \beta M E_0^{\beta}) \end{aligned}$$

Detta ger hastighetsekvationerna

$$r_c = k_c \xi_c = \alpha_c \left[\frac{b_c - (b_c^2 - 4c_c)^{1/2}}{2} \right]$$

$$\begin{aligned} \text{där } b_c &= \beta_c \gamma_c + \alpha_c + E_0 \\ \gamma_c &= f_c s_{c0}^{1/3} s_c^{2/3} \end{aligned}$$

$$c_c = \beta_c \gamma_c E_0$$

(β_c , f_c samt α_c är konstanter)

och motsvarande för amorf cellulosa

$$r_a = k_a \xi_a \left[\frac{1}{1 + K_I} \right] = \alpha_a \left[\frac{b_a - (b_a^2 - 4c_a)^{1/2}}{2} \right] \left[\frac{1}{1 + K_I} \right]$$

$$\begin{aligned} \text{där } b_a &= \beta_a \gamma_a + \alpha_a + E_0 \\ \gamma_a &= f_a s_{a0}^{1/3} s_a^{2/3} \end{aligned}$$

$$c_a = \beta_a \gamma_a E_0$$

I samma artikel redovisas de erhållna värdena på konstanterna för rishalm som substrat.

$$\begin{array}{ll} \beta^a = 41.4 & \beta^c = 203.4 \\ \alpha^a = 314 & \alpha^c = 1050 \\ f^a = 0.0375 & f^c = f^a \\ k^a = 2.11E-3 \text{ min}^{-1} & k^c = 3.24E-4 \text{ min}^{-1} \\ K_I^a = 0.14 \text{ mM}^{-1} & \end{array}$$

Vidare konstateras den amorfa andelen cellulosa vara 38% av den nerbrytbara andelen cellulosa i rishalm (nerbrytbar andel är cirka 65%).

Enzymatisk hydrolysis

Dessa konstanter har omräknats för att passa de experimentella resultat som redovisas i samma artikel samt för att byta enheter till de som användes i fortsättningen nämligen g/l och h.

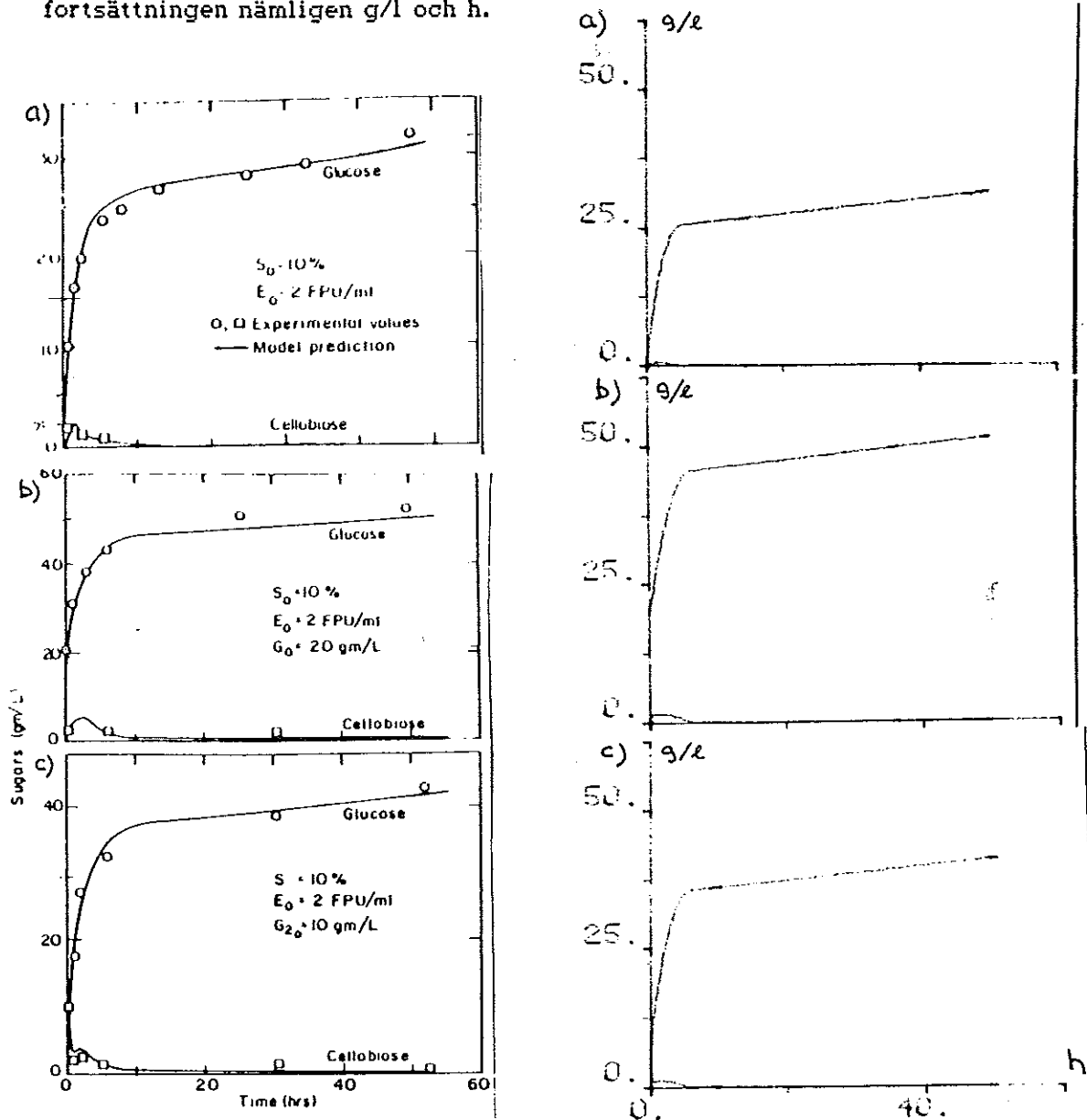


Fig. 2.15 Försök och simuleringar av ACCM enligt ref. 5.

a) Initialkoncentration 100 g/l och 2 FPU/ml

b) samt cellobioskoncentrationen 10 g/l

c) samt glukoskoncentrationen 20 g/l

(höger ref. 5, vänster simnonprogram ACCM)

Enzymatisk hydrolys

2.3 JÄMFÖRELSE AV MODELLER OCH ETT SATSVIS FÖRSÖK.

Försök

Ett satsvis försök gjordes för att försöka utvärdera de modeller som presenterats tidigare. Försöket gjordes i ett tvåfas-system, Rådextran(8%)/Polyetenglykol(6%) (DEX/PEG) med pH 4,8 och vid temperaturen 40 C. Substratet vid försöket utgjordes av ett modellsubstrat, Solka Floc BW 200. Enzymerna kom från det danska företaget Novo. Cellulaserna var preparerade från Trichoderma reesii med produktnamnet Celluclast. Cellobias var preparerade från Aspergillus niger och går under namnet Novozym.

Under försöket gjordes analyser av cellulosa, reducerat socker samt glukos. Cellulosahalten analyserades gravimetriskt. DNS-metoden utnyttjades för att bestämma mängden reducerat socker. Koncentrationen glukos analyserades m.h.a. två olika metoder. Den första metoden var att utnyttja det FIA-system (Flow Injection Analysis) som finns beskrivet i 4.2. Metod nummer två var att utnyttja en enzymatisk metod, GOD-PAP, som bygger på att en enzymreaktion av glukosen bildar ett färgkomplex som kan mätas spektrofotometriskt.

Resultatet är presenterat i figur 2.16. Försöket startades med 52.6 gram Solka Floc (5%), 26 ml Celluclast (2 FPU/ml). Efter 120 timmar tillsattes ytterligare 52.6 gram Solka Floc och efter 144 timmar tillsattes 1.13 gram Novozym (600 IU/l). Ytterligare 1.13 gram Novozym och 26.3 gram Solka Floc tillsattes efter 182 timmar.

Enzymatisk hydrolys

Modelljämförelser

Det mest förvånande är att alla tre modellerna utan större problem kan anpassas till försöksresultaten.

SSM ger ett långsamt reaktionsförlopp. Modellen är något långsammare än försöksresultaten men som helhet kan nog modellen klassas som tillfredställande.

HCH-1 ger nästan identiska kurvor som SSM, vilket inte är helt överaskande med tanke på dess fysikaliska bakgrund. Att kurvorna skiljer sig lite åt är endast p.g.a. olika initialkoncentrationer.

ACCM ger ett mycket snabbt hydrolysförlopp, men överpredikterar cellobios något. Denna modell ger också möjligheten att välja utseende på hydrolysen m.h.a. att variera andelen amorf cellulosa och inhiberingskonstanten k_i . Ett högt k_i och stor andel amorf cellulosa ger ett hydrolysförlopp mycket likt de två tidigare, SSM och HCH-1.

Några förslag till förbättrade modeller skulle vara att modifiera tanken bakom ACCM, d.v.s. utnyttja flera tillstånd att beskriva cellulosan. Det första skulle vara att knyta an till den reaktionsmekanismen som visades i kapitel 2.1 (ref. 4). Där antog man ytterligare en intermediär, glukosoligomerer.

Ett annat förslag är att stoppa in ytterligare ett tillstånd, nämligen icke nedbrytbart material. Detta tillstånd påverkar ej kinetiken men gravimetriska och viskositetsbaserade analyser störs avsevärt.

Substratet Solka Flocc är naturligtvis industriellt ointressant, men en modellanpassning av andra substrat, såsom sälg, kan säkert göras. En sådan anpassning skulle kunna göras m.h.a. försök liknande de ovan gjorda.

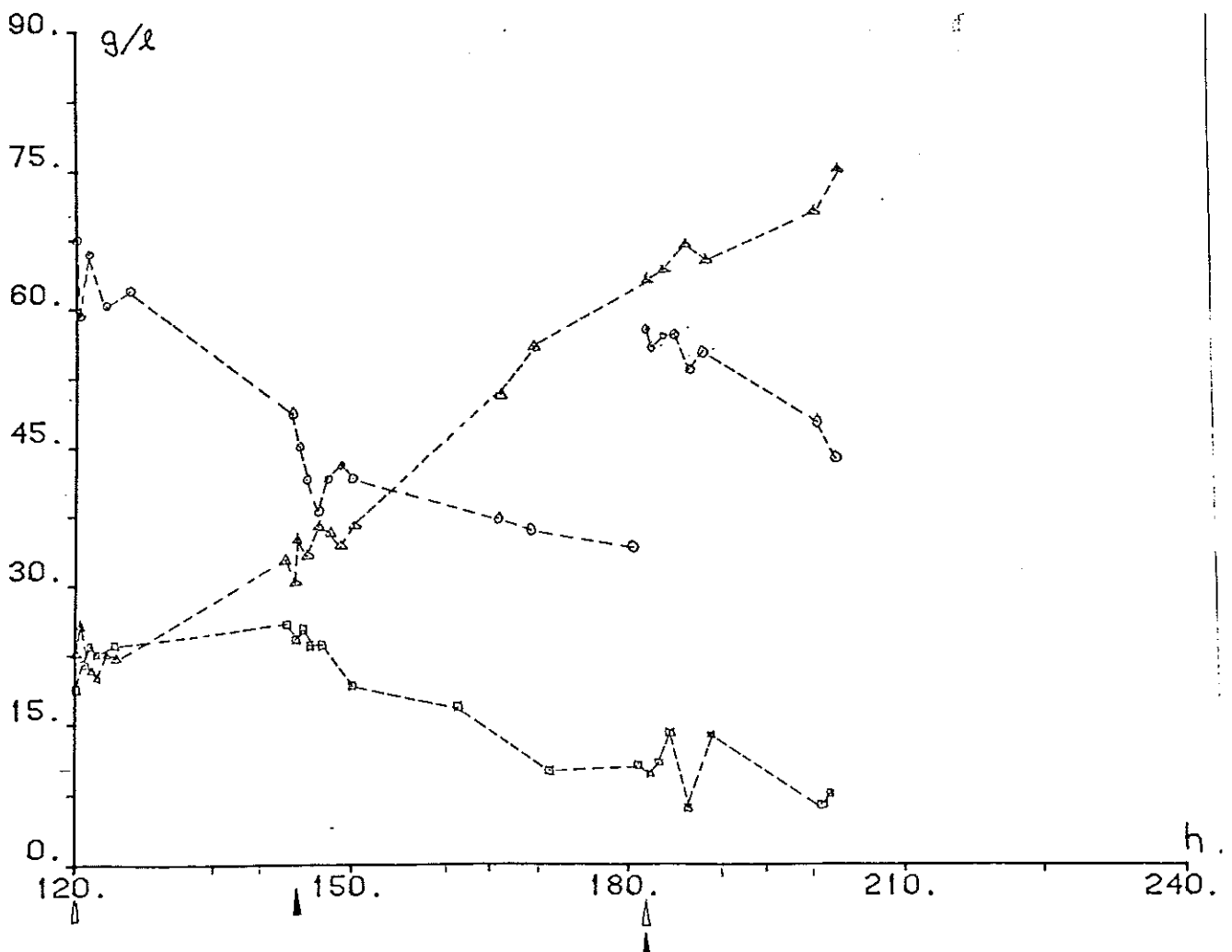
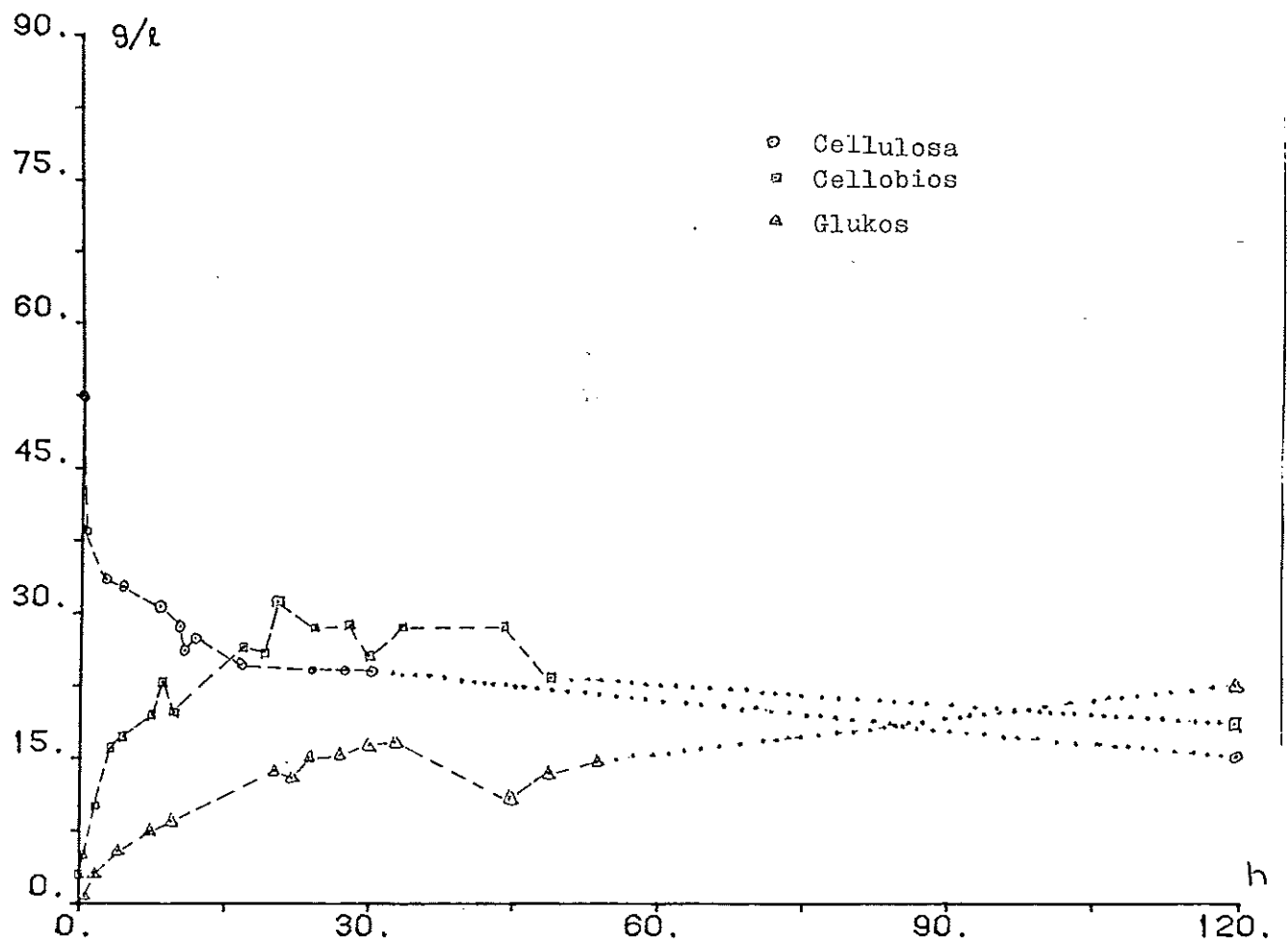


Fig. 2.16 Ett satsvis försök med substratet Solka Floc.

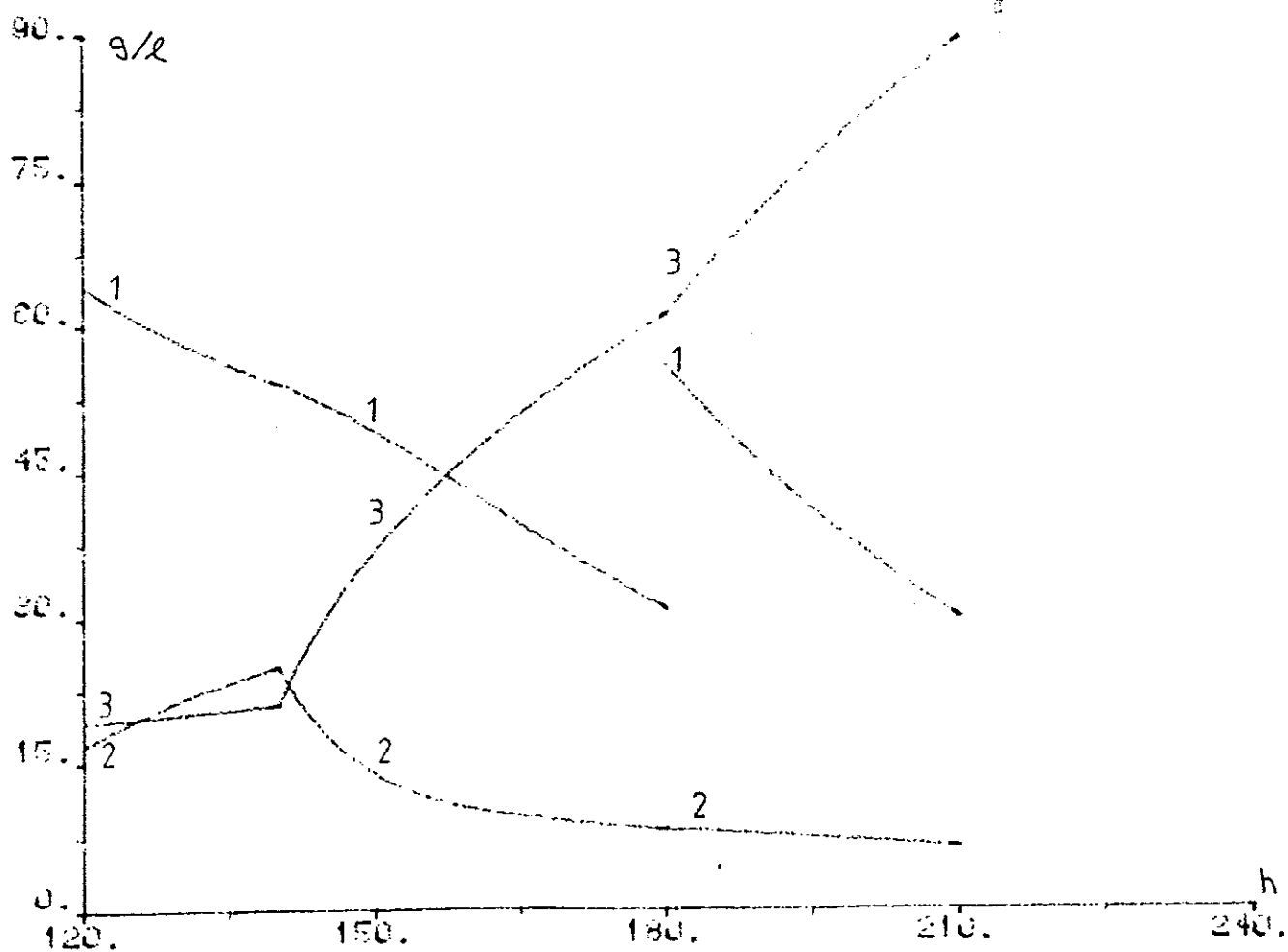
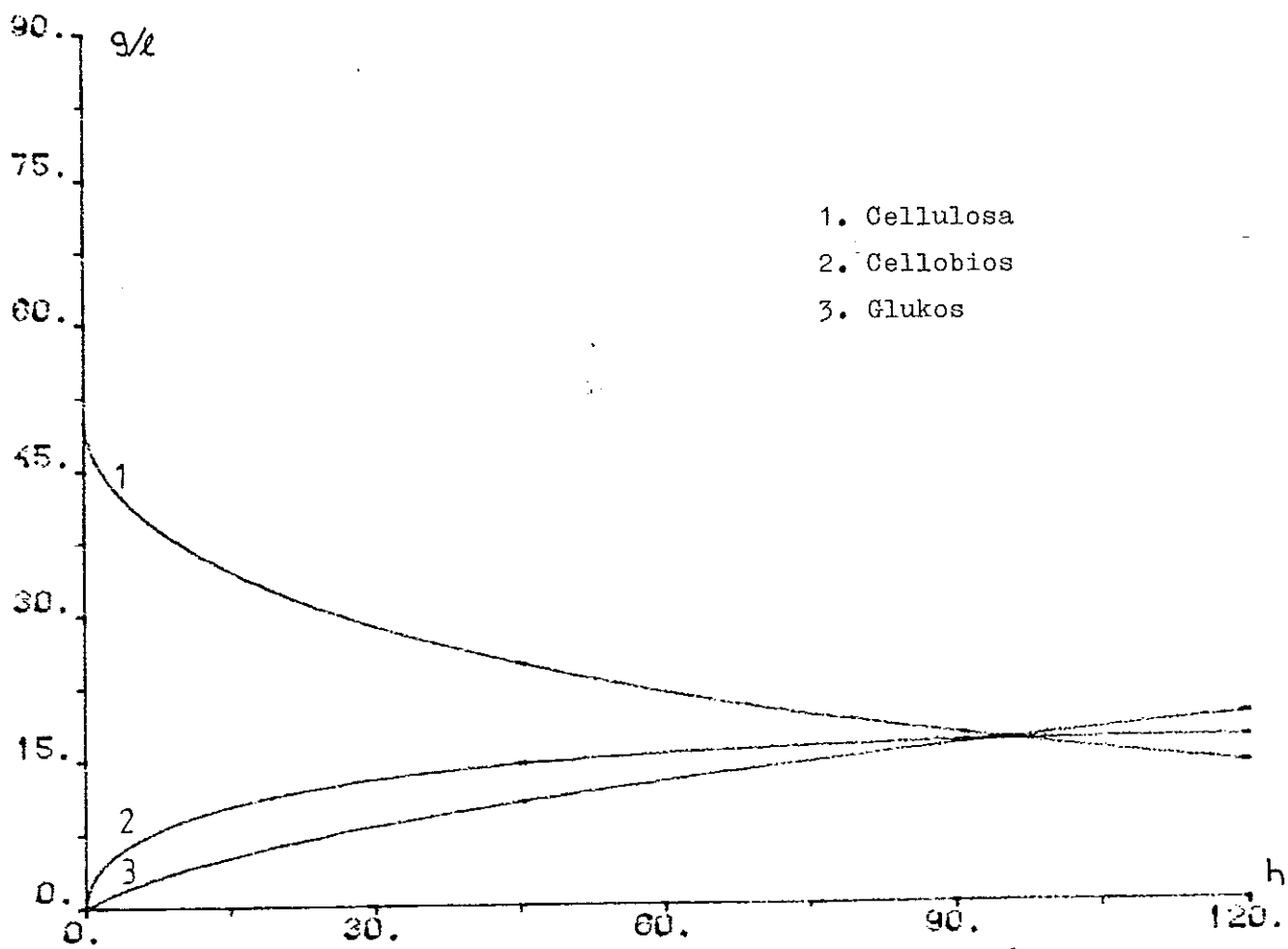


Fig. 2.17 Simulering av modellen SSM

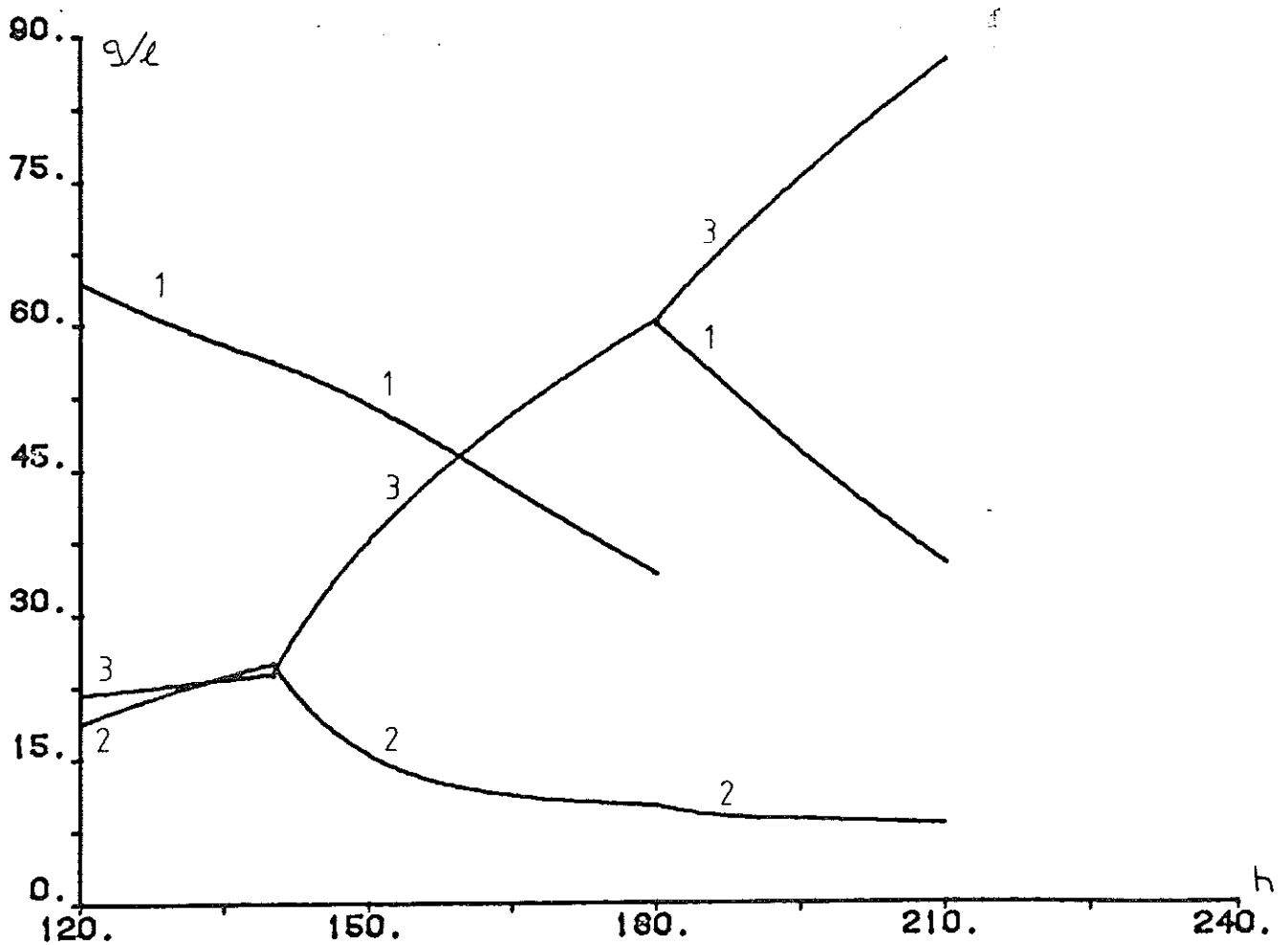
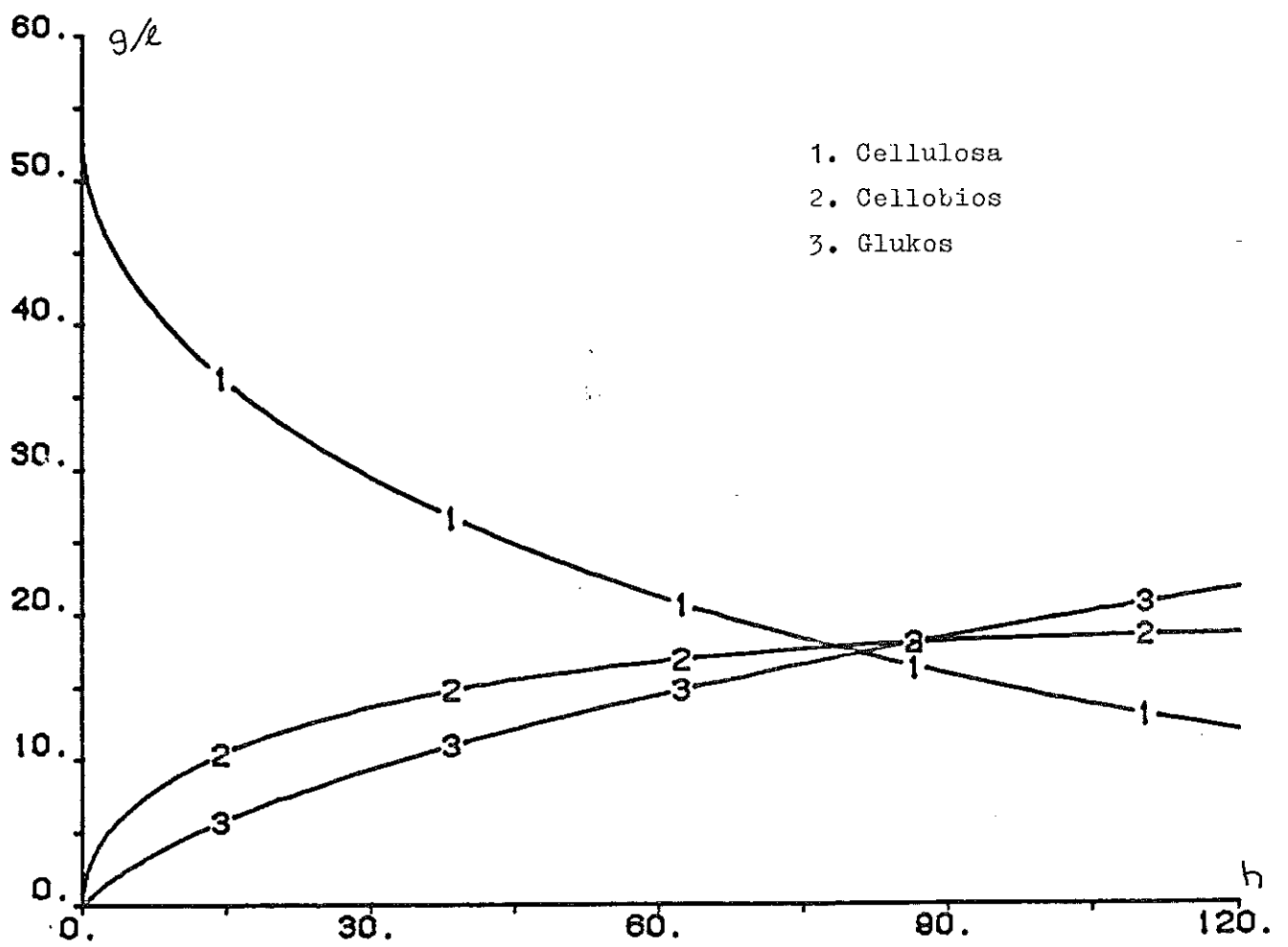


Fig. 2.18 Simulering av modellen HCH-1

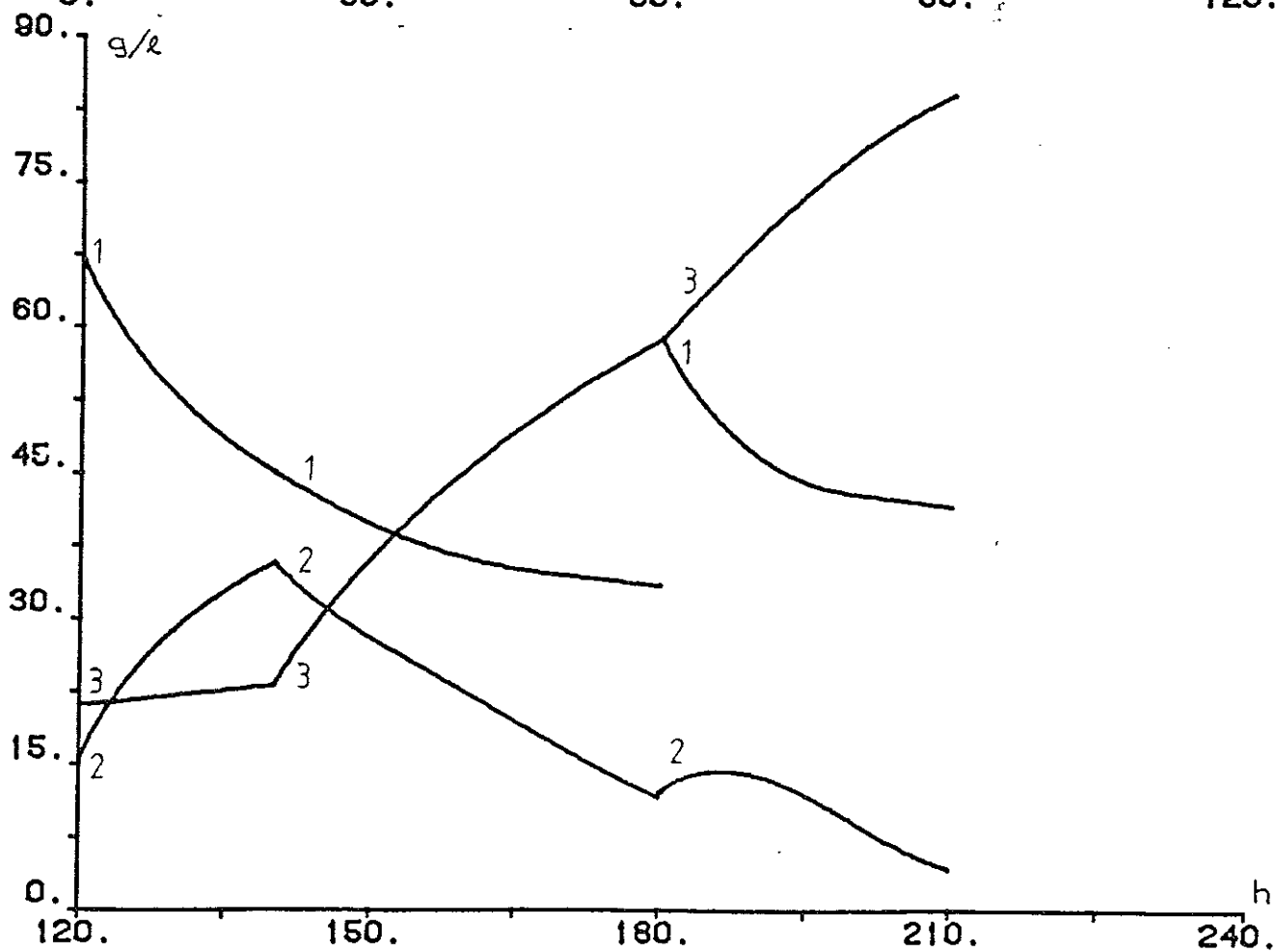
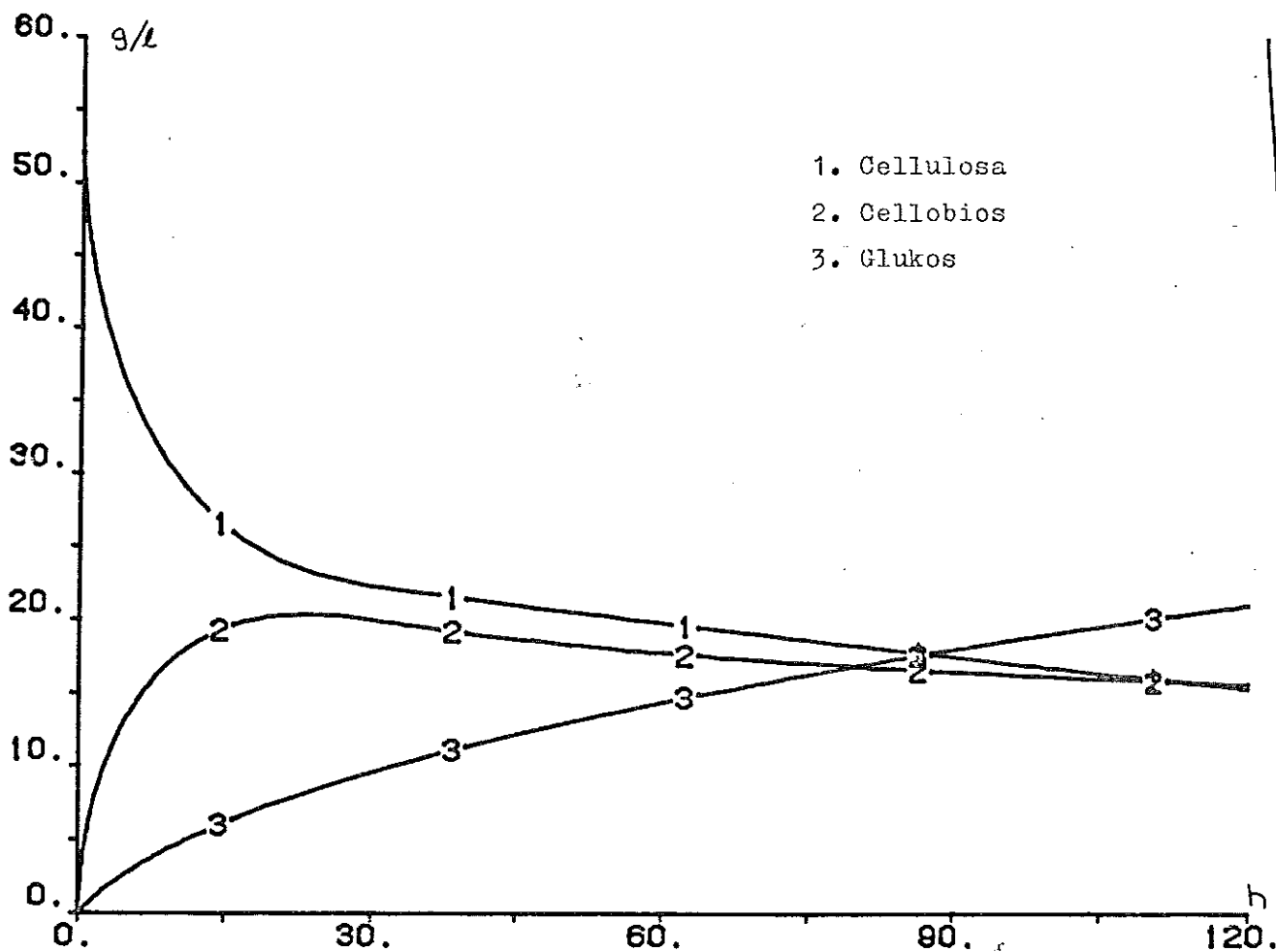


Fig. 2.19 Simulering av modellen ACCM

Tvåfas-system för kontinuerlig produktion

3. TVAFAS-SYSTEM FÖR KONTINUERLIG PRODUKTION

3.1 PROCESSBESKRIVNING

Ett tvåfas-system utnyttjar två icke blandbara faser, som man först blandar väl i en mixer och sedan låter separera i en settler. Genom att utnyttja kunskapen om olika komponenters fördelning i de båda faserna, kan vi separera olika komponenter från varandra. I det fall som studerats har man använt två vattenlösliga polymerfaser. Detta innebär att ingen fasjämvikt existerar för "vanliga" molekyler utan endast för makromolekyler, typ cellulosa och enzymer. Den enzymatiska hydrolysen bör ske vid temperaturer över 40°C, men fassetparationen sker avsevärt bättre vid låga temperaturer. Därför är mixern i vårt fall uppvärmd till 40°C, medan flödet till settlern kyls för att förbättra separationen. Det är alltså mer adekvat att tala om en tankreaktor och en separator istället för en mixer-settler.

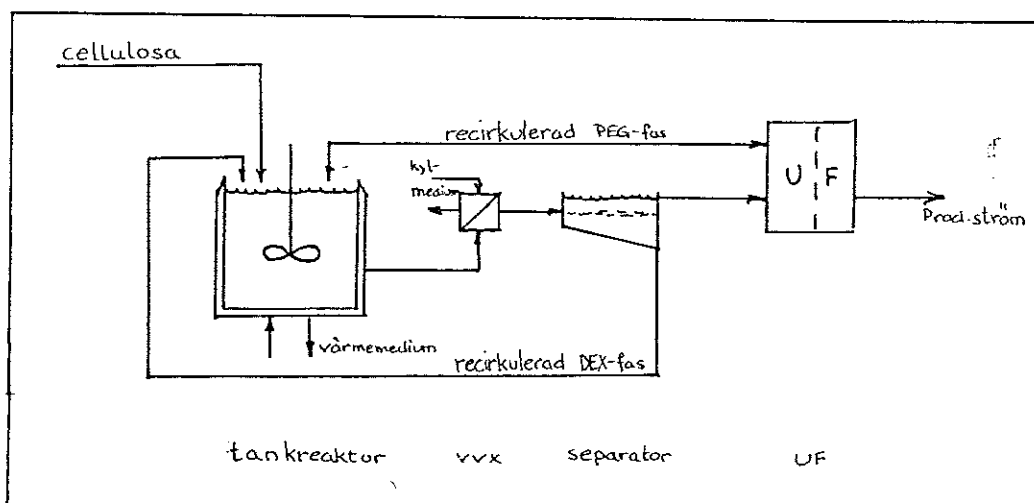


Fig. 3.1 Översiktligt processschema

De vattenlösliga polymerfaser som använts är rådextran (DEX) och polyetenglykol (PEG). DEX-fasen är den tyngre och fås som bottenfas i separatorn. DEX-fasen kommer också att innehålla all cellulosa och det mesta enzymet. PEG-fasen, fås som toppfas ur separatorn, innehåller reaktionsprodukter, så som glukos och cellobios samt en del enzym. Bottenfasen recikuleras till tanken medan toppfasen går vidare till en ultrafiltreringsenhet för koncentring av PEG-fasen för recikulation till tanken.

Den maximala cellulosakoncentration som praktiskt är möjlig i tanken, begränsas av motsvarande koncentration (eller snarare viskositet) i den recikulerande DEX-fasen. I denna ström råder dubbla ca. cellulosa-koncentrationen jämfört med tanken. Här är det lämpligaste pumpvalet en skruvpump. Ett analogt problem kan uppstå i ultrafiltreringsenheten. Det minsta PEG-flödet som kan recikuleras begränsas av maximala PEG-koncentrationen under ultrafiltreringen eller viskositeten vid pumpningen.

Tvåfas-system för kontinuerlig produktion

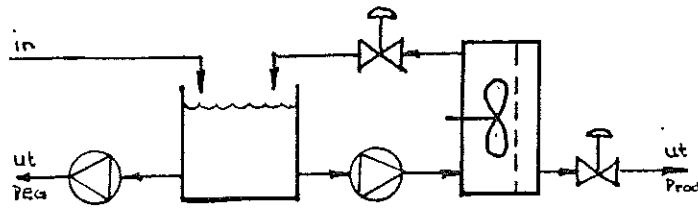


Fig. 3.2 Kontinuerlig ultrafiltrering.

Den naturliga cellulosan som kommer att vara av intresse vid industriell tillämpning förbehandlas i ett tidigare steg. Om detta innebär ett tillflöde i form av ett fast material, som måste transporteras med band eller skruv, eller ett pumpbart medium så krävs ytterligare tillflöde av lösningsmedel (buffertlösning). Detta för att ge möjligheter att variera cellulosa-koncentrationen i tanken och ändå behålla produktflödet.

Naturlig cellulosa innehåller naturligvis en hel del icke nedbrytbart material. Den större delen kommer att ackumuleras i DEX-fasen, om ej något görs. Detta innebär att det är nödvändigt med en avtappingsström och ett tillflöde av ny DEX-fas för att återställa fasförhållandet.

För att återanvända den avtappade DEX-fasen krävs någon form av rening. För att få veta hur denna ska gå till krävs en ingående studie i vad som ackumuleras och hur detta kan åtgärdas. Det bör påpekas att detta kan vara av stort ekonomiskt intresse.

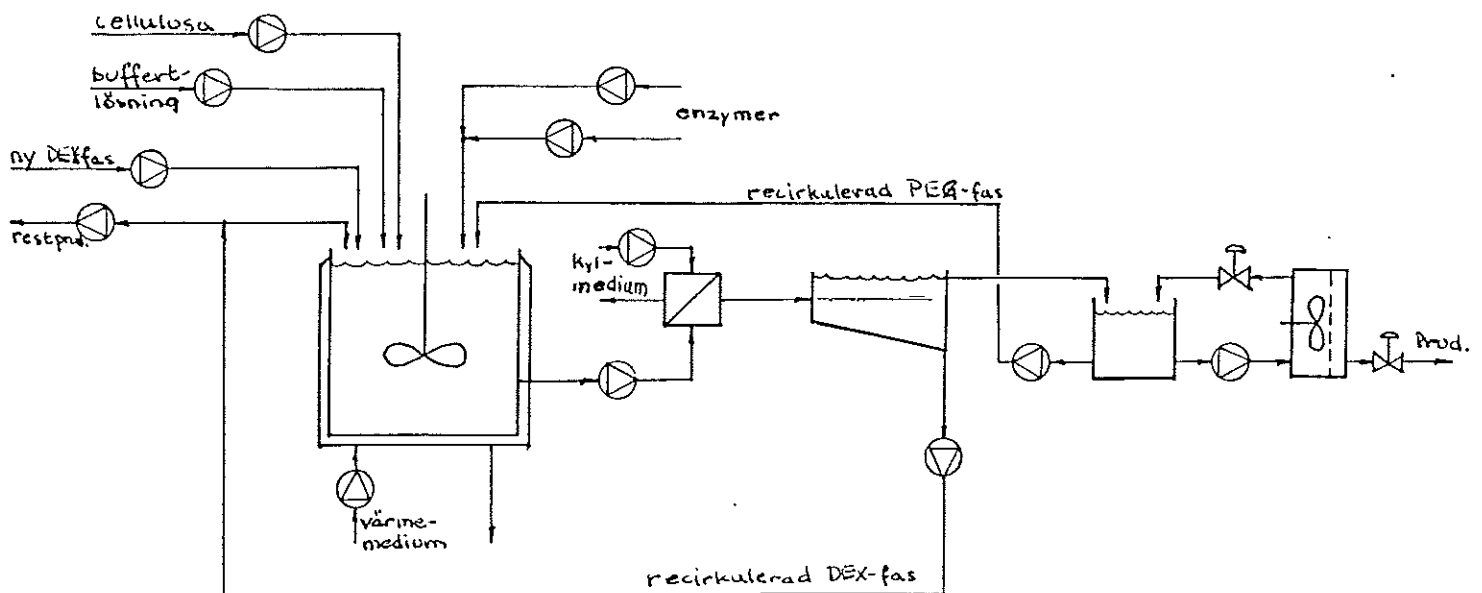


Fig. 3.3 Processchema för kontinuerlig produktion av glukos i ett tvåfas-system enligt ovan.

Tvåfas-system för kontinuerlig produktion

3.2 FASVAL OCH FASJÄMVIKTER

Ett fassystem för enzymatisk hydrolys har utarbetats vid avdelningen för Biokemi (ref. 6 och 10). En ingående studie av ett tvåfas-system av dextran (DEX) och polyetenglukol (PEG) har gjorts m.a.p. molvikt, koncentration, jonstyrka, pH, temperatur och enzym/substrat-förhållandet. Det "bästa" fassystemet bestämdes till att vara DEX 40 - PEG 40000. Av ekonomiska skäl är rådextran att föredra framför dextran 40. Ungefärliga jämviktskonstanter för endo- β -glukanas och β -glukosidas för olika medier kan ses nedan.

enzym \ media	DEX 40/PEG 40000	Rådex/PEG 40000
endo- β -glukanas	0.02	0.16
β -glukosidase	0.005	0.14

Tabell 3.4 Jämviktskonstanter (fördeln. i topfas/bottenfas)
för resp. enzym vid 20°C med mycket cellulosa närvarande.

Tvåfas-system för kontinuerlig produktion

3.3 PROCESSMODELLERING.

Som antydes i kap. 3.1 är kan man betrakta reaktorsystemet som en tankreaktor och en separator. Den enklaste modellen av processen utgör antagandet att omrörningen i tanken är så god att man kan betrakta tanken som ideal (d.v.s. inga koncentrationsgradienter). Ytterligare en förenkling är att försumma reaktionen i separatoren.

Tankreaktorn.

Tankreaktorn kan nu skrivas som

$$\begin{array}{l}
 \text{Ackumulering} = \text{In} - \text{Ut} + \text{Produktion} \\
 V_m \frac{dc_m}{dt} = \Sigma q_t c_t - \Sigma q_{ut} c_m + V_m r_m \\
 \frac{d \text{DEX}_m}{dt} = B - R \frac{\text{DEX}_m}{V_m} \\
 \frac{d \text{PEG}_m}{dt} = T + F - R \left(1 + \frac{\text{DEX}_m}{V_m}\right) - (T + P)
 \end{array}$$

där V är tankvolymen, c_m och c_t koncentrationen av komponent i i tanken resp. i tillflödet (feed), q_t och q_{ut} är volymsflöde i tillflöde resp. utflöde ($V = \text{konstant}$, $q_t = q_{ut}$) samt r_m är reaktionshastigheten för komponent i .

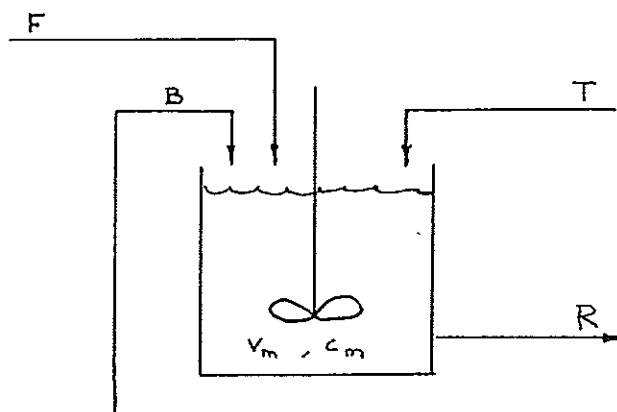


Fig. 3.4 Tankreaktor.

Ytterligare en parameter införes, nämligen recirkulationsförhållandet eller Θ ($\Theta = T/F$). Med hjälp av enkel massbalans över hela processen fås följande flöden (volymsackumuleringen = 0):

$$T = \Theta F, \quad B = F(1 + \Theta), \quad R = 2F(1 + \Theta)$$

Tvåfas-system för kontinuerlig produktion

Separatorm.

Ovan antogs att reaktionen i separatorm är försumbar. Detta förenklar separatorm avsevärt. Det medför att man inte får någon produktionsterm.

$$\text{Ackumulering} = \text{In} - \text{Ut} + \text{Produktion}$$

$$V_s \frac{dc_s}{dt} = \sum q_t c_t - \sum q_{ut} c_s$$

$$\frac{d \text{DEX}_s}{dt} = R \frac{\text{DEX}_m}{V_m} - B$$

$$\frac{d \text{PEG}_s}{dt} = R \left(1 + \frac{\text{DEX}_m}{V_m}\right) - (T + P)$$

I separatorm har vi dock två olika faser med olika koncentrationer. Man kan se separatorm som en vanlig tank utan reaktion men med olika koncentrationer i olika utflöden. På molkyllärnivå fås, enligt ovan, ingen fasjämvikt, med andra ord har man samma koncentration av cellobios och glukos i topfasen som i bottenfasen. Men på makromolekyllärnivå fås en fasjämvikt. Cellulosan återfinnes helt och hållet i DEX-fasen, d.v.s. cellulosan ackumuleras endast i DEX-fasen, och vid stationära förhållanden är bottenfasflödet halva R-flödet, vilket medför dubbla koncentrationen cellulosa i bottenfasen jämfört med R och tanken.

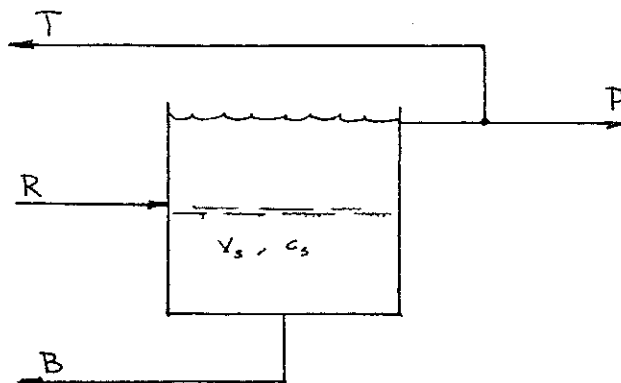


Fig. 3.5 Tvåfas-separatorm eller settlern.

Ultrafiltrering.

Kontinuerlig UF kan betraktas som en tank utan reaktion. D.v.s. vid stationäritet finnes inga koncentrationsgradienter och alla utflödena har samma glukos- och cellobioskoncentrationer. Dess dynamik är mycket långsam p.g.a. den stora volym som finns i bufferttanken och i recirkulationsflödet. Dynamiken över membranet kan betraktas som relativt snabb jämfört med den "vanliga" massbalansdynamiken. Med detta som grund kommer vi i fortsättningen ej att ta upp UF-enheten.

Tvåfas-system för kontinuerlig produktion

Modell av enzymförluster

Detta utgör kanske den viktigaste delen av hela processproblematiken. Enzymerna är den viktigare processvariabeln ur både processteknisk och ekonomisk synvinkel. I processen, beskriven ovan, har man två olika förluskällor. Den första är helt enkelt att enzymer följer med i olika flöden ut ur processen, och då i första hand med avtappningsströmmen. Detta flöde måste naturligtvis minimeras. Den andra källan är deaktivering av enzymerna. Enligt ovan (kap 2.1) är den största källan till deaktivering, irreversibel adsorption på cellulosan.

Tvåfas-system för kontinuerlig produktion

3.4 JÄMFÖRELSE AV PROCESSMODELL OCH ETT KONTINUERLIGT FÖRSÖK.

Ett kontinuerligt försök

Vid försöket användes samma tvåfas-system, pH, temp., enzymtyper samt substrat som i det satsvisa försök som presenterades i kapitel 2.3. Analyserna av torrsbstans, reducerat socker samt glukos gjordes också som tidigare. Försöket gjordes med en tankreaktor på 1 liter, en separator på 0.25 liter (0.4 dm³). Tanken värmdes i ett vattenbad medan R-flödet kylades m.h.a. en "vanlig" vattenkylare.

Försöket startade med en cellulosahalt på 6% och en celluclasttillsats motsvarande 2 FPU/ml. Tillflödet hade en cellulosahalt på 4,4%. Försöket fick fortgå till stationäritet, d.v.s. i ca. 6 dygn. Då gjordes först ett stegsvar m.a.p. cellulosahalten i tillflödet (en ökning från 4,4% till 5,9%). Därefter gjordes ett stegsvar m.a.p. celluclast (en tillsats på 20 ml). Till sist gjordes en tillsats med Novozym på 3.8 gram. Under hela försöket hölls produktflödet på 15 ml per timma och recirkulationsförhållandet var ungefär lika med noll ($\Theta=0$), d.v.s. R-flödet var vid stationäritet lika med 30 ml per timma. Hela försöket tog ca. 2 veckor.

Det visade sig dock vara svårt att hålla stationära betingelser under en längre tid. Främst gäller detta flöden och då i första hand de som innehöll cellulosa. Svårast var att kontrollera R-flödet p.g.a. varierande och mycket höga cellulosakoncentrationer.

Analyser av cellulosakoncentrationen i tankreaktor gjordes för att utröna om approximationen: inga koncentrationsgradienter var godtagbar. Analyserna gav högst 2%-s avvikelser, vilket medför att approximationen var godtagbar.

Även försummandet av reaktion i separatorn kontrollerades. I separatorn mättes koncentrationer som var ca. 5-10 % högre än i tankreaktor. Denna försumning kan alltså ifrågasättas.

Tvåfas-system för kontinuerlig produktion

Modelljämförelser

Om det var förvånande hur bra alla tre kinetikmodellerna predikterade det satsvisa försöket, så måste man nog säga att det är förvånande hur dåligt processmodellen och försöksresultaten stämmer överens. Naturligtvis ligger det många approximationer bakom processmodellen, men den största avvikelsen utgör nog försöket i sig. Frånsett analysfel så utgör approximationen att alla flöden är konstanta en stor felkälla.

Eftersom SSM och HCH-1 ger nästan identiska simuleringar, har endast SSM och ACCM studerats, och först med konstanta enzymaktiviteter.

SSM-simuleringen bekräftar vad som sades i kapitel 2.3, d.v.s. att modellen ger långsamma förlopp. På enzymstegsvaren ger modellen mycket svaga stegsvar.

ACCM ger ett något bättre resultat och reagerar i rätt riktning på de olika stegsvaren. Den utgör ändå inte någon direkt bra modell.

Ingen av modellerna, i nuvarande skick, kan användas för en mer ingående analys, varken processteknisk eller reglerteknisk.

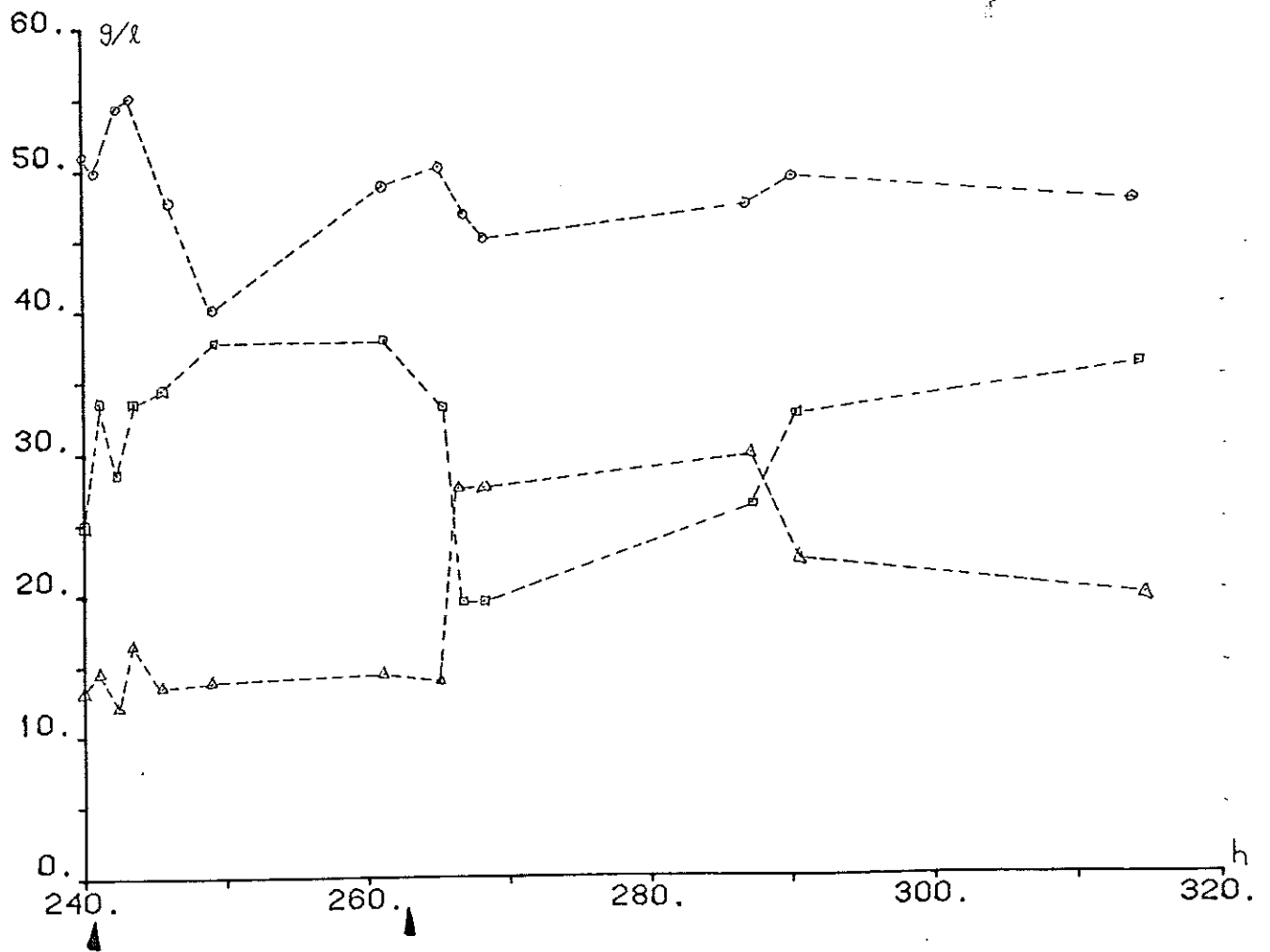
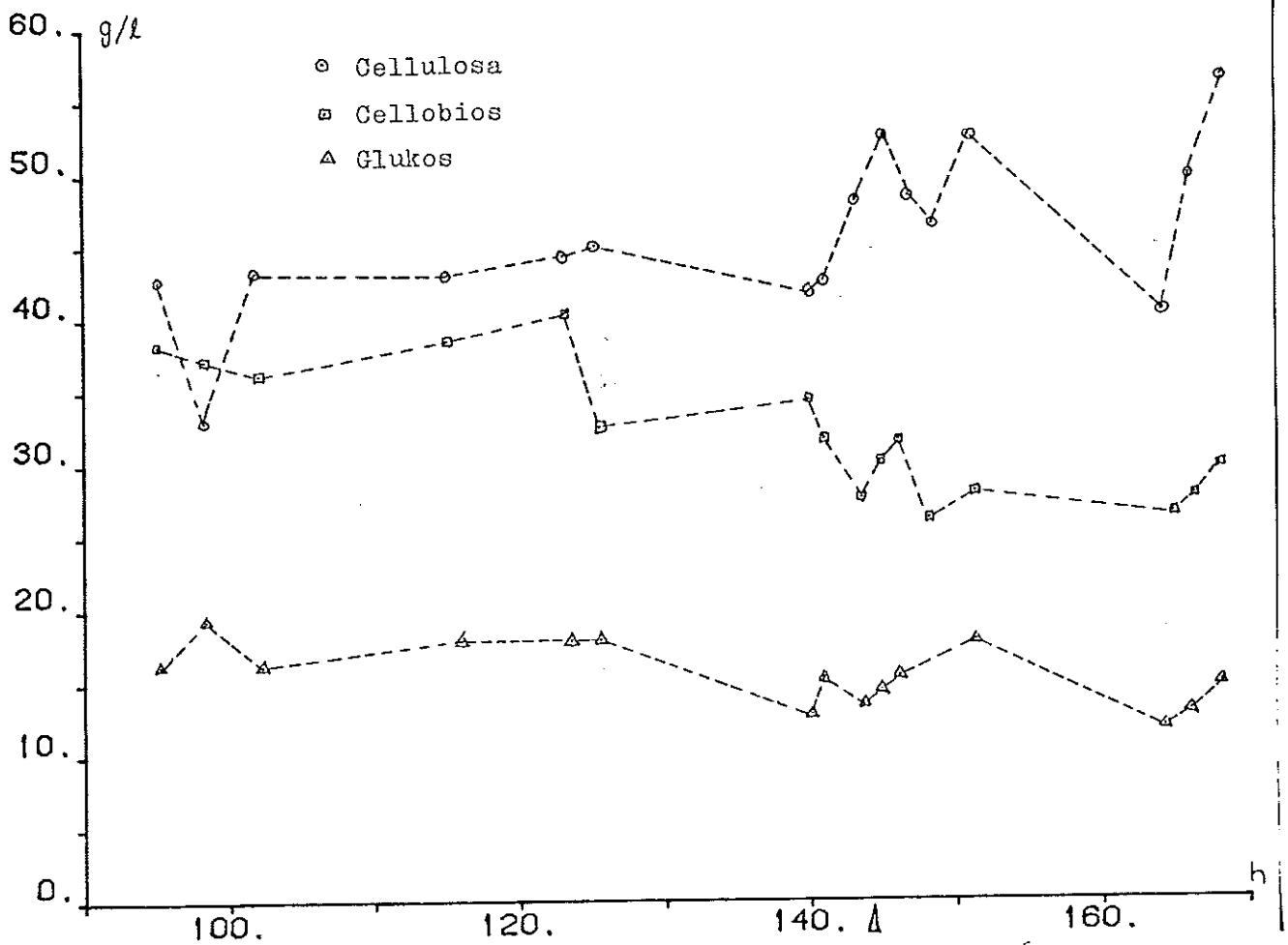


Fig. 3.5 Ett kontinuerligt försök

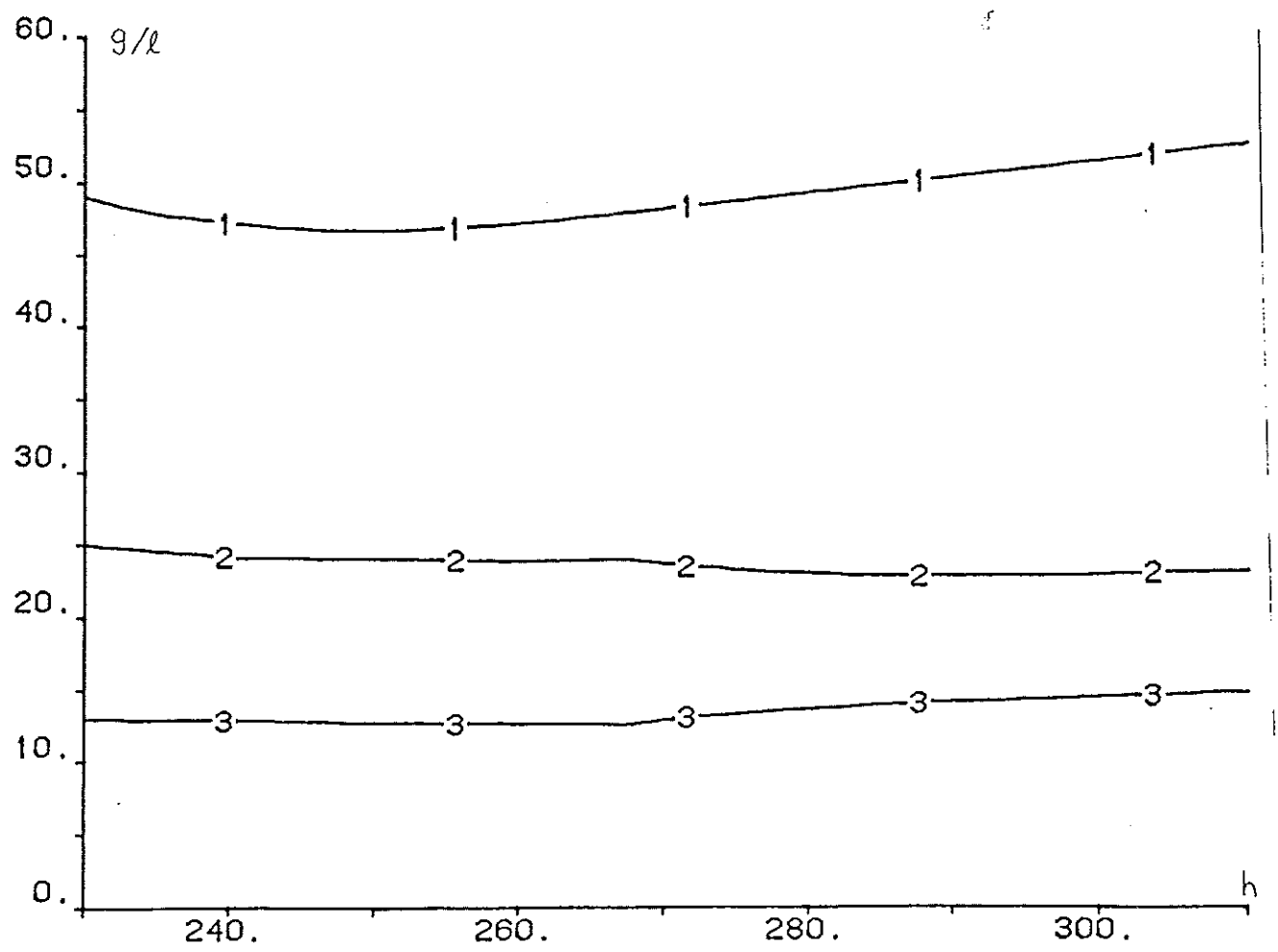
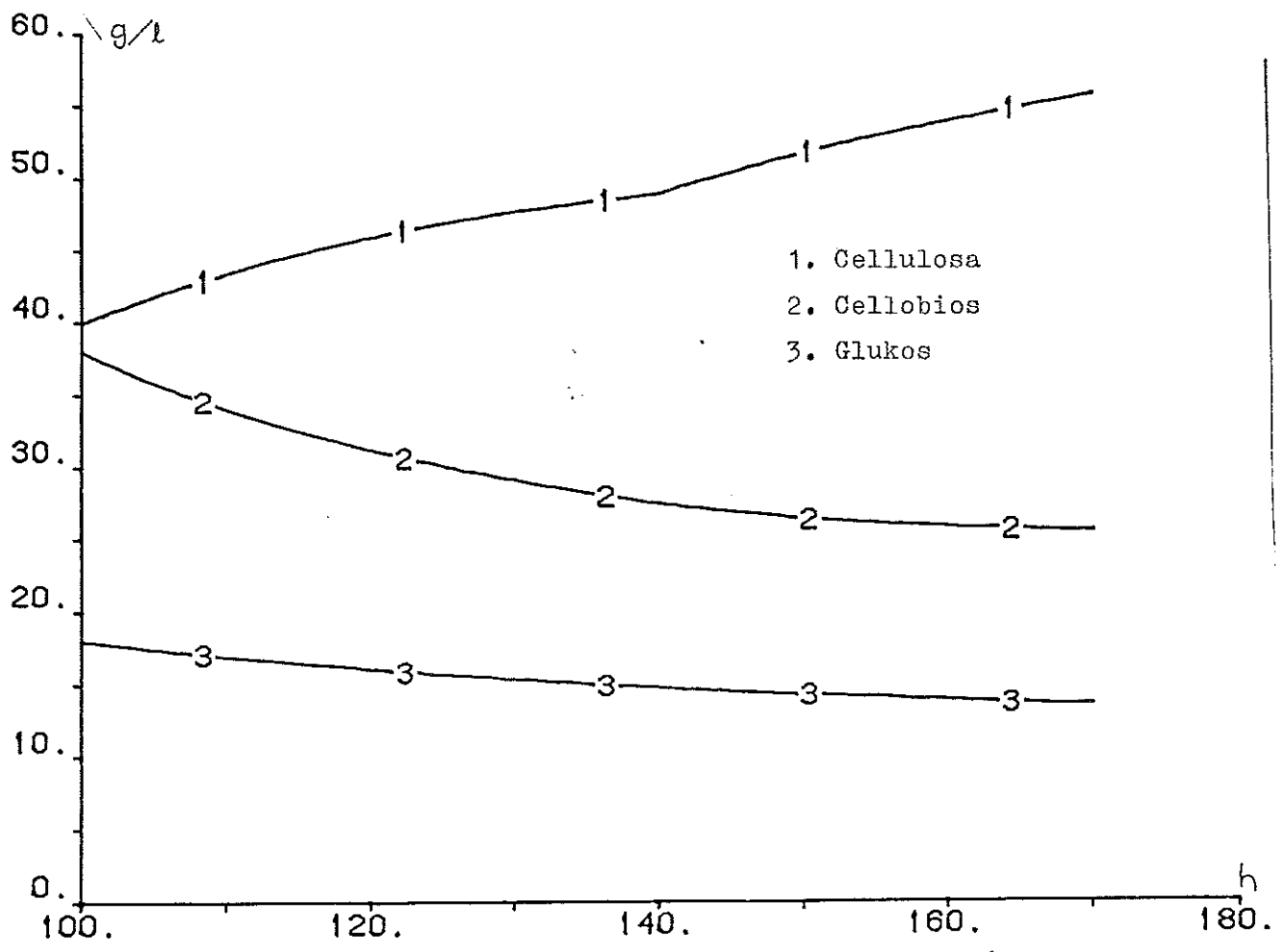


Fig. 3.7 Simulering av processmodellen med SSM-kinetik.

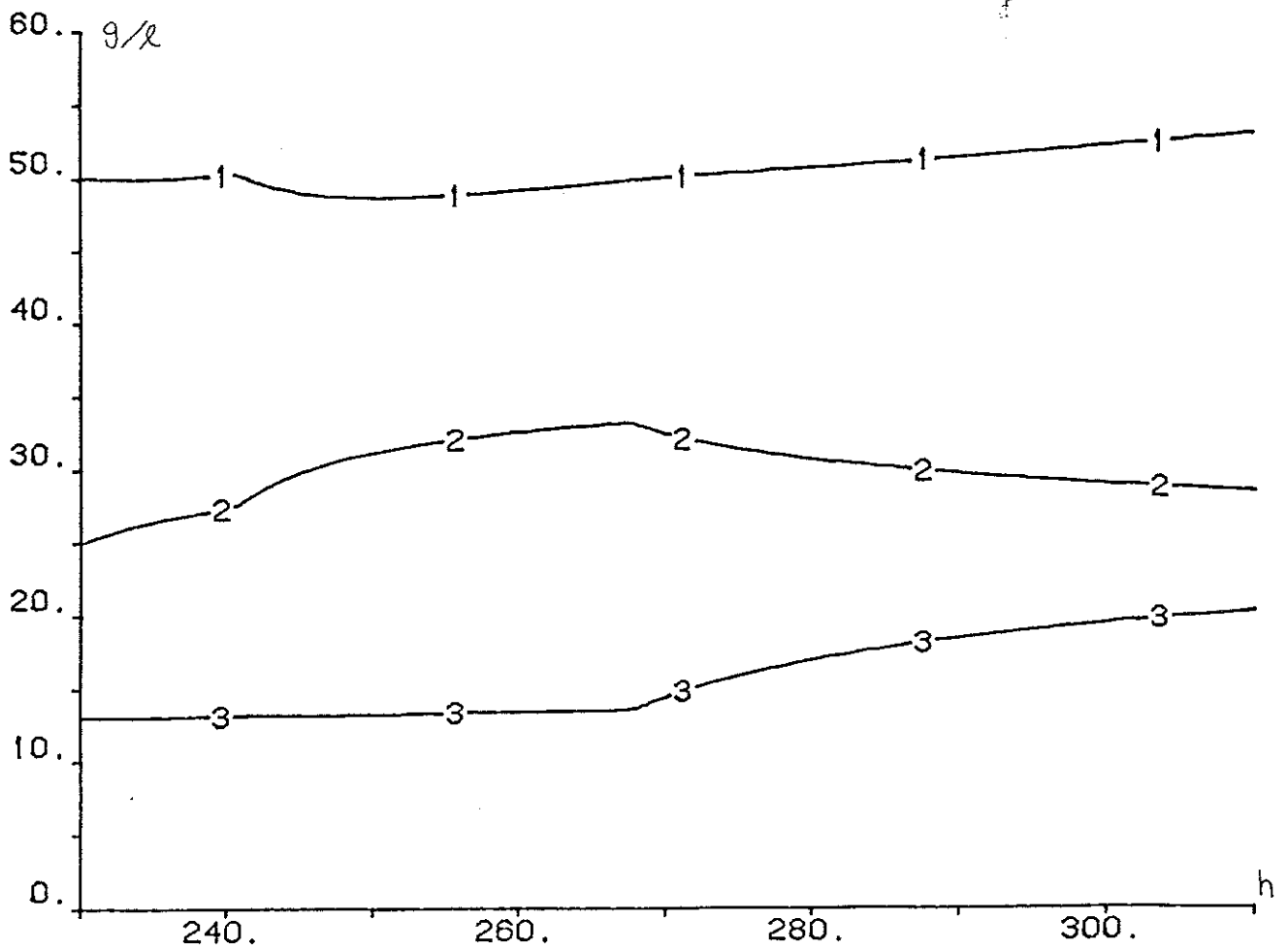
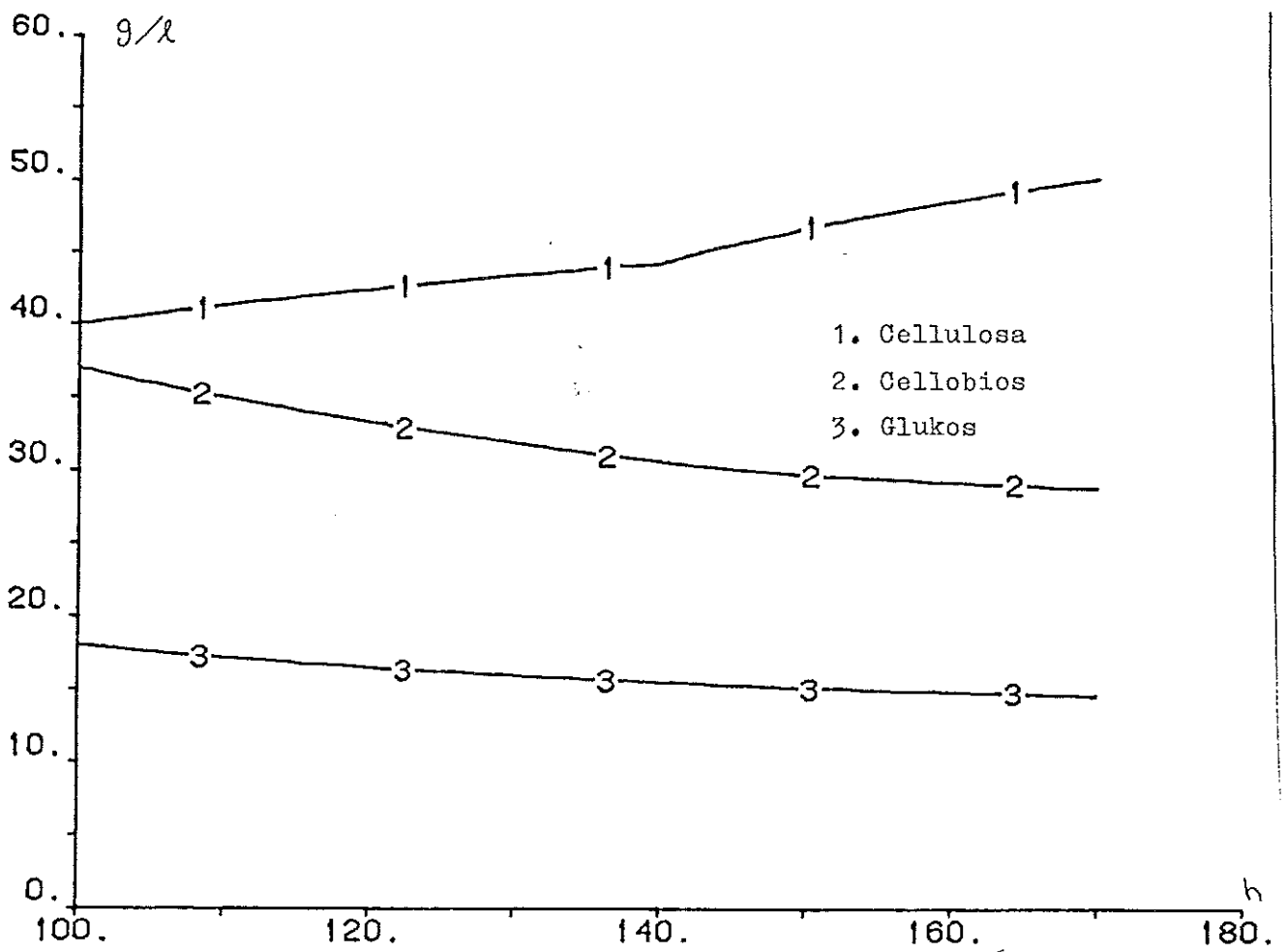


Fig. 3.8 Simulering av processmodellen med ACCM-kinetik.

4. PROCESSREGLERING

4.1 PROCESSREGLERING. EN ÖVERSIKT.

Volymsreglering

Processen kan delas upp i tre olika delar; tankreaktor(mixer), separator (settler) samt ultrafiltrering.

Volymsreglering av tanken sker enklast genom en nivåvakt i tanken som styr utflödet (Regulator R1, fig. 4.1). För att förbättra denna reglering kan framkoppling av stör signaler göras, men p.g.a. det stora antalet stör signaler, är det svårt att på ett så här tidigt stadium föreslå en lämplig sådan.

Separatören har ett tillflöde och två frånflöden. Ett exempel på reglering av separatören är att med hjälp av naturlig avrinning styra nivån och toppfasflödet samt med hjälp av fasnivåmätning styra bottenfasflödet (Regulator R2, fig. 4.1) Mätning av fasnivån kan t.ex. göras konduktrometriskt, om faserna har olika ledningsförmåga. Ett annat alternativ kan vara optisk mätning, då de har olika ljusgenomsläpplighet.

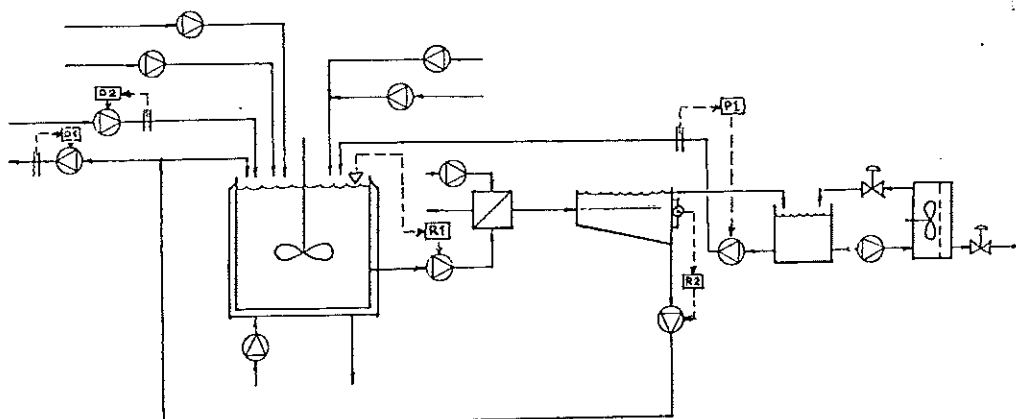


Fig. 4.1 Volymsreglering av tvåfas-systemet.

Den recirkulerande DEX-fasen ackumulerar icke-nerbrytbara ämnen. Därför måste viss avtappning ske, vilket kräver motsvarande tillflöde av ny DEX-fas. Dessa båda flöden måste naturligtvis regleras för att ej få oönskad fasfördelning, men en styrning av den ger också möjlighet att välja fasfördelning och avtappingsgrad (Regulator D1 resp. D2, fig. 4.1)

Ultrafiltreringen arbetar med högt flödesförhållande och tryckgradient över membranet. P.g.a. variationer hos flödet till UF-enheten samt att denna arbetar med mycket högre flöde än tillflödet, så krävs en bufferttank. De processbetingelser som är intressanta för reglering är nivå i bufferttank, arbetstryck samt flödesförhållandet.

Processreglering

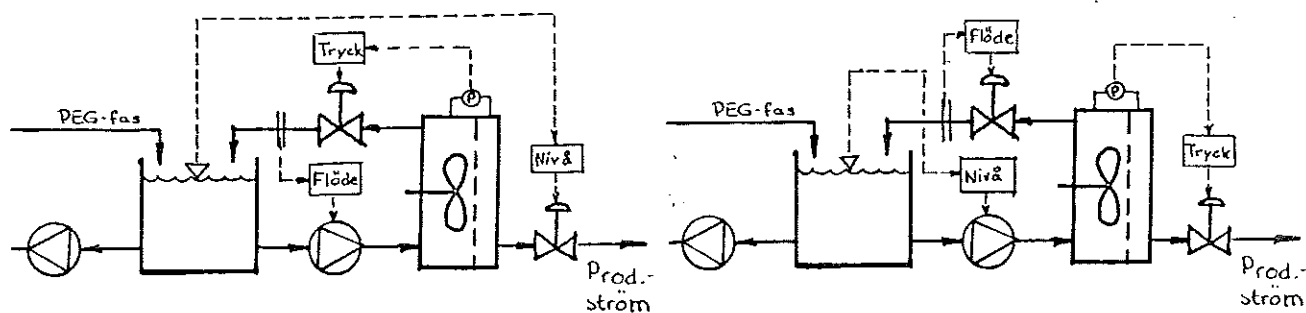


Fig. 4.2 Exempel på reglering av ultrafiltrering

Som kan ses i fig. 4.2 kan UF regleras på ett flertal olika sätt. Det kräver en ingående analys av processvariablerna för att välja lämplig reglerstrategi.

Temperaturreglering

Reaktionen bör ske vid 40-50 °C medan separationen gynnas av lägre temperaturer t.ex. 20 °C. Detta kräver en temperaturreglering av tankreaktorn. D.v.s. flödesreglering av värmemediet med avseende på temperaturen i tanken (Regulator T1, fig. 4.3). Temperaturen vid separation regleras med hjälp av flödet hos kylmediet i värmeväxlaren (Regulator T2, fig 4.4).

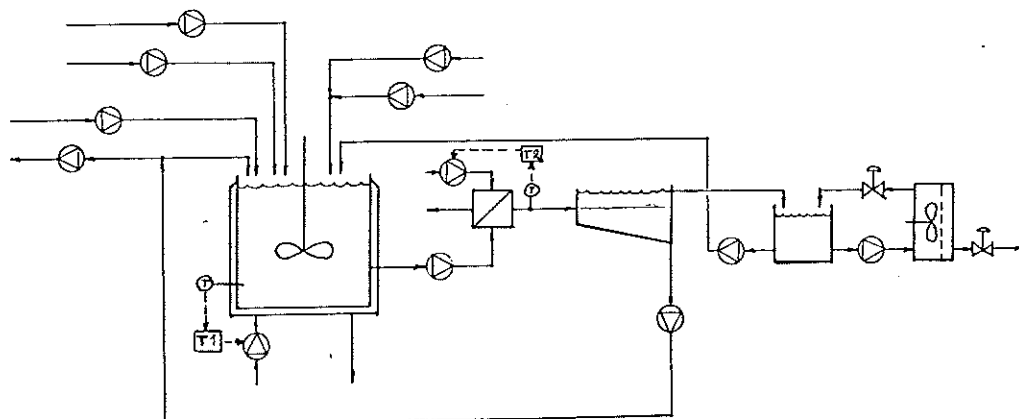


Fig. 4.3 Temperaturreglering

Koncentrationsreglering

Om man förutsätter att man har konstanta (reglerade) flöden och volymer, samt att man önskar hålla en viss produktion av glukos, krävs en reglering av dess koncentration i produktströmmen. Då man tidigare antagit att det ej sker någon reaktion utanför tanken, medför det att produktströmmen och tanken har samma koncentration (vid stationäritet).

Glukoshalten regleras antingen med hjälp av uppehållstiden eller cellulosa-koncentrationen i tanken. Om flödet (uppehållstiden) hålls konstant återstår reglering med hjälp av cellulosa-halten i tanken.

Processreglering

Om enzymaktiviteten antas vara konstant kan glukoskoncentrationen regleras med en enkel SISO-regulator (Single Input/Single Output) med cellulosa-koncentrationen i tillflödet som styrsignal.

Enzymreglering

Den ovan diskuterade koncentrationsregleringen förutsatte att enzymaktiviteten är konstant. Detta är naturligtvis inte fallet vid kontinuerlig produktion under långa tider. Att direkt mäta enzymaktiviteter är mycket svårt och tidskrävande.

Det enda realistiska alternativet är att uppskatta eller rekonstruera enzymaktiviteten i tanken. Detta kan göras med en observerare som estimerar aktiviteten, vilken kan utnyttjas för att reglera produktionen.

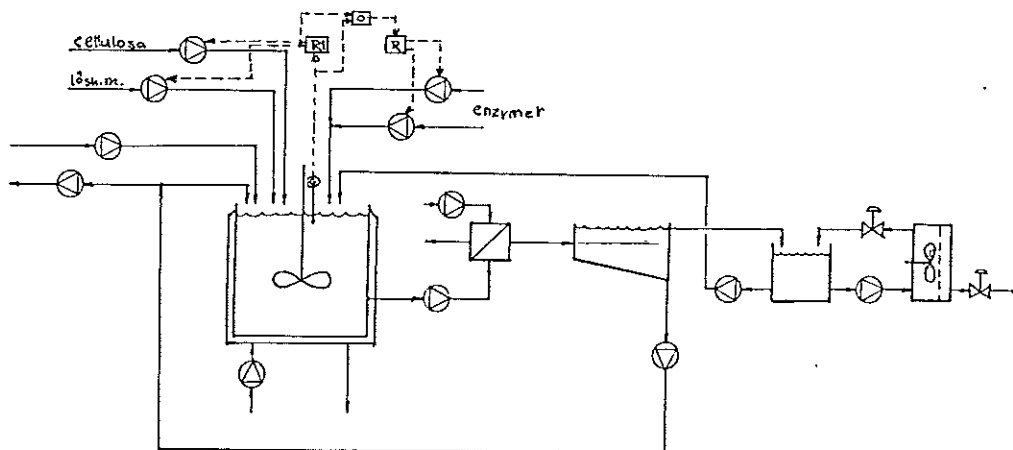


Fig. 4.4 Exempel på reglering av glukoshalten samt enzymaktiviteten.
(R1:Glukosregulator , O:Enzymobserverare , R:Enzymregulator)

Slutsats

Som redovisats ovan krävs en lång rad mer eller mindre kvalificerade reglerkretsar för den kontinuerliga processen. Dessa kan i hög grad förbättras t.ex. med framkoppling, samt modifiering av reglerstrategier för optimal reglering. De flesta reglerkretsarna är traditionella nivå-, flödes- och temperaturregleringar, vilka ej är speciellt intressanta på detta stadium av processutvecklingen. De mer speciella och unika reglerformerna är dock av desto större intresse. Nedan kommer därför endast koncentrations- och enzymregleringen att studeras mer ingående.

Processreglering

4.2 PROCESSANALYSSYSTEMET FIA-GLUKOS

Flow injection analysis - FIA

FIA bygger på att ett injicerat prov får passera en kolonn med immobiliserade enzymer. Under passagen sker reaktioner specifika för de enzymer som finns i kolonnen. I vårt fall enzymer som reagerar med glukos. Efter kolonnen kommer det reagerade provet ut i form av ett färgkomplex som går att detektera med hjälp av en spektrofotometer. Vid glukosanalys användes två seriekopplade enzymkolonnen med enzymerna glukosoxidas och peroxididas i nämnd ordning.

Dialysprobe

FIA-systemet kräver en ren lösning för att man ej skall skada eller sätta igen kolonnerna. För att erhålla detta utnyttjas en dialysprobe där molekylerna får diffundera genom ett membran, in i en buffertlösning. På detta sätt hålls cellulosa och makromolekyler borta från provlösningen.

Diffusion är mycket känslig för bl.a. temperatur, omrörning och viskositet, vilket medför att analysystemet är känsligt för förändringar hos olika processbetingelser. Det har dock visat sig att systemet beter sig bra och har en god reproducerbarhet i både enkla och komplexa medier med konstanta yttre betingelser.

Dynamik och mätbrus

I processanalyssystemet kan man urskilja tre olika effekter som påverkar dynamiken. Den första åstadkommes av transportfördröjning i slangarna. Denna provtagningsfördröjning är proportionell mot flödet i FIA-systemet och varierar med valt koncentrationsområde. I de koncentrationsområde som försöken gjordes uppskattades transportfördröjningen till 2.5 minuter. Den andra är diffusionen över membranet. Dynamiken kan beskrivas som en exponentialfunktion med en ungefärlig tidskonstant på 5 minuter.

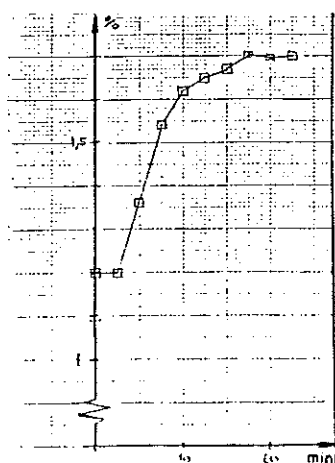


Fig. 4.5 Stegsvvar

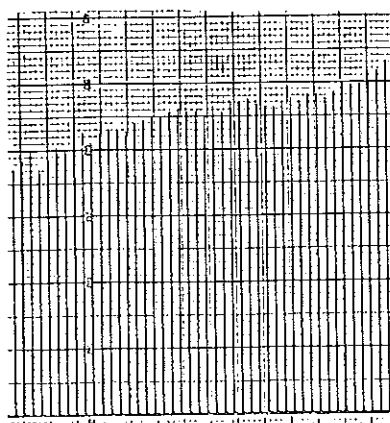


Fig. 4.6 Exempel på mätsignal

Mätsignalen kommer att brusa vilket orsakas av varierande betingelser vid

Processreglering

diffusionen. Bruset kan behandlas som ett glidande medelvärde (moving average) vilket medför att bruset kan filtreras bort.

Slutsats

Ett FIA-system med en dialysprobe har visat sig fungera bra och trots en anseelig dynamik är detta mätsystem tillfredställande för reglering. Ovanstående mätsystem kan lätt inkludera analys av cellobios genom att ytterligare en kolonn med immobiliserad β -glukosidas sätts in i systemet före de andra två.

4.3 GLUKOSREGLERING

I kapitel 4.1 konstaterades att reglering av glukoskoncentrationen görs enklast med en SISO-regulator som styr cellulosa-koncentrationen i tillflödet. Att förverkliga denna reglering innebär att ytterligare två algoritmer måste tas fram. Detta p.g.a. att cellulosan och lösningsmedlet tillförs separat.

Den första algoritmen omvandlar cellulosa-koncentrationen (styrsignal från regulatorn) till ett flödesförhållande.

$$c_{12} = (c_1 F_1 + c_2 F_2) / F_0$$

$$\text{antag } c_2 = 0 \Rightarrow c_{12} = c_1 F_1 / F_0$$

$$\text{eller } \varphi = F_1 / F_0 = c_{12} / c_1$$

Den andra algoritmen omvandlar flödesförhållandet till två flöden.

$$F_1 = \varphi F_0$$

$$F_2 = (1 + \varphi) F_0$$

FIA-systemet lämnar en tidsdiskret mätsignal, vilket medför att regulatorn måste vara digital. Men eftersom att hydrolysen är långsam så är tids-kontinuerlig design av den tidsdiskreta regulatorn godtagbar.

Processreglering

4.4 ENZYMREGLERING

Enligt kapitel 4.1 är det enda realistiska alternativet till direkt mätning av enzymaktiviteter, rekonstruktion av enzymaktiviteten i tanken med hjälp av glukosmätningen. Eftersom enzymatisk hydrolys kräver flera olika enzymer uppstår ett nytt problem; att prediktera de olika enzymslagen.

En första lösning på detta problem är att alltid ha överskott av β -glukosidas så att enzymregleringen sker med avseende på cellulaserna. Rekonstruktion sker med hjälp av glukosmätningen och cellulosahalten i tanken eller rättare sagt cellulosa-koncentrationen i tillflödet (styrsignal från glukosregulatorn). För ett värde på cellulosa- och glukoskoncentrationerna finns ett motsvarande värde på enzymaktiviteten.

$$\hat{e}_x = f_x(\text{cellulosa, glukos}) \quad (e_\beta = \text{konstant})$$

Det rekonstruerade värdet kan användas som en mätsignal till en "vanlig" regulator.

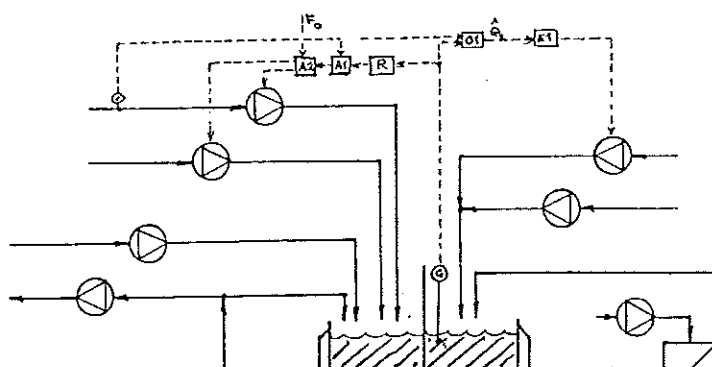


Fig. 4.7 Glukos- och cellulaserreglering vid enzymatisk hydrolys
(R:Glukosregulator, A1:Algorithm ett, A2:Algorithm två
O1:Enzymobserverare (cellulaser), E1:Enzymregulator)

Att styra processen enligt ovan har en stor nackdel i de stora β -glukosidas kostnader som ovanstående processalternativ innebär.

Genom att introducera ytterligare en observerare som rekonstruerar cellobiasaktiviteten minimeras även detta problem. Rekonstruktion kan göras genom att man mäter glukos- och cellobioskoncentrationerna i tanken. FIA-systemet kan lätt modifieras för att klara av detta. Likt tanken bakom rekonstruktion av cellulaserna kan man uppskatta β -glukosidasaktiviteten.

$$\hat{e}_\beta = f_\beta(\text{cellobios, glukos})$$

Processreglering

En regulator kan utnyttja den uppskattade aktiviteten för att reglera β -glukosidasetillsatsen.

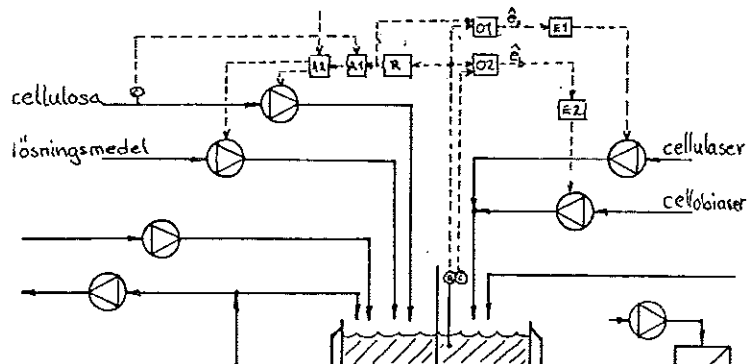


Fig. 4.8 Ytterligare en observerare för β -glukosidasreglering är nödvändig för optimal drift.

(R:glukosreg. , A1:algoritm 1 , A2:algoritm 2

O1:cellulasobserverare , E1:cellulasaktivitetsreg.

O2:cellobiasobserverare , E2:cellobiasaktivitetsreg.)

Enzymerna som är temperaturkänsliga och ej går att lagra någon längre tid, tillverkas troligen satsvis parallellt med hydrolysen. Tekniskt sett kan det vara nödvändigt att pulsmodulera enzymregulatorerna så att enzymtillsatser sker satsvis.

4.5 ETT ÖVERGRIPANDE KONTROLLSYSTEM

Även om man förutsätter att de reglerkretsar som tidigare diskuterats går att förverkliga och att de klarar av att reglera processen, då kommer regleringen att bete sig konstigt vid en drastisk störning utifrån, t.ex. då andelen icke nedbrytbar cellulosa ökar i tillflödet.

När andelen nedbrytbar cellulosa minskar kommer glukoskoncentrationen att sjunka. Det innebär att regulatorn svarar med att öka cellulosatillförseln. Denna störning kommer enzymobserverarna att uppfatta som om enzymaktiviteten minskat och vill naturligtvis kompensera detta.

Om detta får fortgå under en lång tid fylls hela systemet med enzymer och svårnedbrytbar cellulosa.

En sådan störning kan inte regleras bort, men man kan lindra konsekvenserna av den genom att införa ett övergripande kontrollsystem. Det bör ha som uppgift att kontrollera regulatorernas styrsignaler. I detta fall bör kontrollsystemet gå in och begränsa eller stänga av olika regulatorer då flera styrsignaler skulle öka utanför satta gränser. Även vissa åtgärds paket skulle kopplas in automatiskt, t.ex. i detta fall öka avtappningen.

Problemet vid denna typ av störning blir att skilja mellan brist på enzym och ändrad andel svårnedbrytbar cellulosa. Genom att studera dynamiken vid enzymtillsatser kan man uppskatta enzym/nedbrytbar cellulosa-förhållandet. Snabb dynamik indikerar enzymbrist medan långsam och ingen dynamik betyder brist på nedbrytbar cellulosa.

Om det av någon anledning skulle vara mycket låg enzymaktivitet i enzymtillsatsen, kommer dynamiken att vara långsam, och om inte vet enzymaktiviteten, kommer ovanstående kontrollmekanism att ge fel svar. Detta medför att man måste känna till enzymaktiviteten i tillsatsen.

En sådan lösning kan man kalla en rekonstruktion av nedbrytbar cellulosa. Genom att mäta tillsatsen av enzym och samtidigt studera dynamiken vid cellulosanedbrytningen (d.v.s. styrsignalen från glukosregulatoren), kan man uppskatta andelen nedbrytbar och icke nedbrytbar cellulosa.

Prediktionen an andelen nedbrytbar resp. icke nedbrytbar cellulosa kan användas som underlag för åtgärder som föreslagits tidigare.

5. PROCESSTEKNISKA ASPEKTER

Koncentrationsbegränsningar

I kapitel 3 kommenterades praktiska begränsningar i nämnda processval. Den maximala cellulosa-koncentrationen i tanken begränsas alltså av motsvarande koncentration i den recirkulerade DEX-fasen.

Cellobios som är det ämne som inhiberar hydrolysen starkast, bör naturligtvis minimeras. Det innebär att β -glukosidasaktiviteten bör hållas relativt hög.

Glukosen inhiberar visserligen hydrolysen, men har inte alls samma kritiska inverkan som cellobios. Av ekonomiska skäl bör ej glukoskoncentrationen vara för låg, då det innebär höga kostnader vid efterföljande koncentrationssteg.

Processvariablerna eb/ex och ex/s

Med simuleringarna i kapitel 2 som bakgrund har man uppskattat β -glukosidasaktiviteten i Celluclast till ca. 1 IU/ml, vilket kan jämföras med Novozym som har ca. 500 IU/ml.

Genom att utnyttja SIMNON-simuleringar kan man mycket lätt ta fram kurvor t.ex. med reaktionshastigheten som funktion av någon parameter. Detta kan utnyttjas för att bestämma ett riktmärke på eb/ex. Som visas i fig. 5.1 är förhållanden under 0.02 IU/FPU helt förkastliga p.g.a. den snabbt låga reaktionshastigheten, orsakat av inhibering. Till omsättningar upp till 80% kan ett riktvärde vara 0.2-0.3 IU/FPU (eller 5-10% (Novozym/Celluclast))

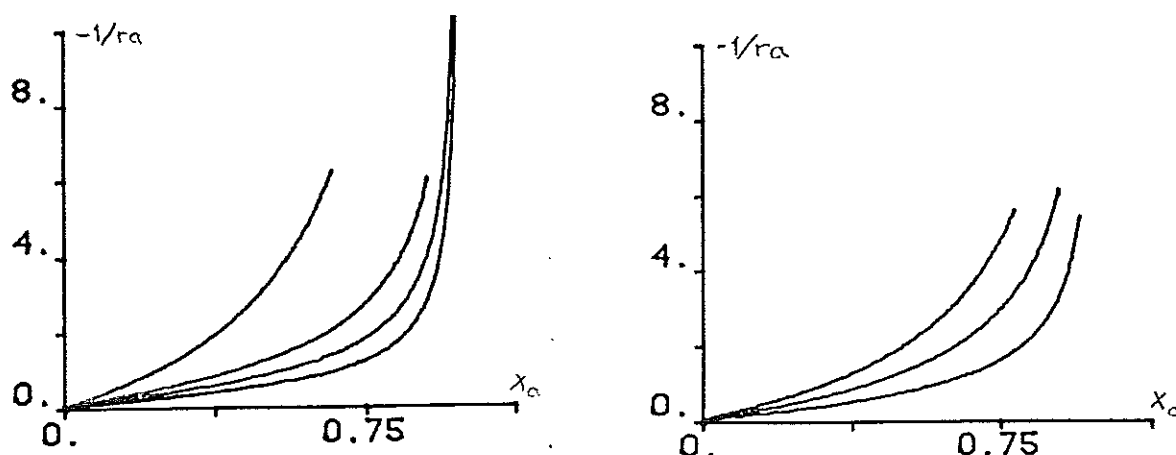


Fig. 5.1 $-1/ra$ (ra = reaktionshastigheten) som funktion av x_a
($x_a = (s_0 - s)/s_0$ = omsättningen)

a) $ex = 2$ FPU/ml, $eb/ex = 0.01, 0.02, 0.2$ samt 0.4 (åt höger)

b) $eb/ex = 0.04$, $ex = 2, 4$ samt 10 FPU/ml

En parameter som beskriver hydrolysförloppets utseende är ex/s -förhållandet. Samma ex/s , men olika cellulosa-koncentrationer, ger kvalitativt samma reaktionsförlopp.

Processtekniska aspekter

Ur kurvorna i figur 5.1 kan man även utläsa uppehållstider för vald reaktortyp. I figur 5.2 visas hur man erhåller uppehållstiden för en tank- resp. tubreaktor för samma reaktionsbetingelser.

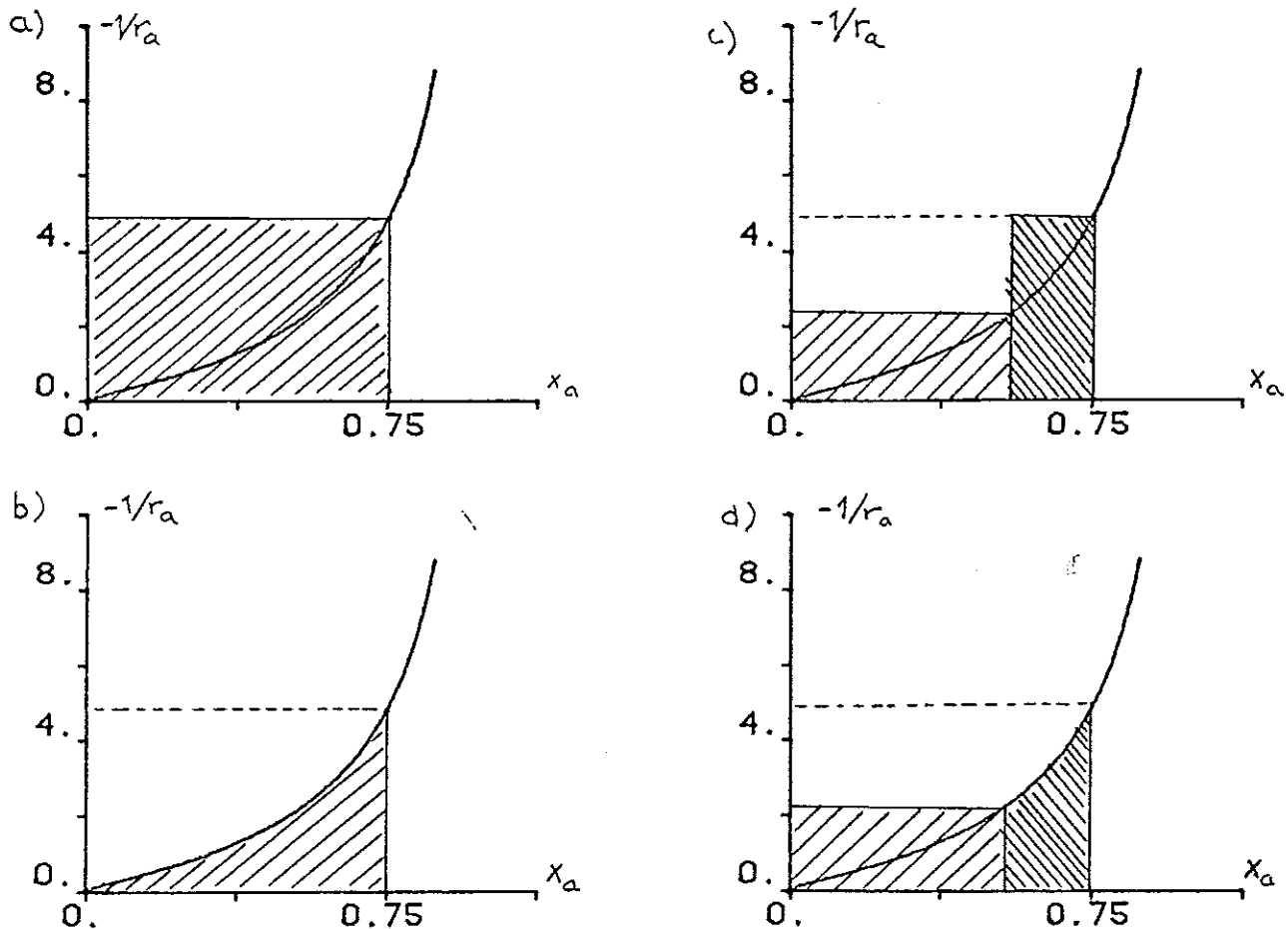


Fig. 5.2 Upphållstider för olika reaktorsystem

Den streckade arean representerar $V/F_{ao} = \theta/C_{ao}$
 (uppehållstid/cellulosakonc. i tillflödet)

- a) en tankreaktor
- b) en tubreaktor
- c) två seriekopplade tankar
- d) seriekopplad tank och tub

Driftpunkt kan väljas på två olika sätt; genom att variera antingen cellulasaktivitet (d.v.s. flytta kurvan) eller uppehållstiden (d.v.s. reaktortyp och/eller reaktorvolym).

Reaktionssteget vid enzymatisk hydrolyt kan förbättras med en tubreaktor eller med en tankserie jämfört med en tank.

APPENDIX I Simnonprogram ; Kinetikmodeller

- a) CGKIN - Cellobioshydrolys (enligt ref. 11)
- b) SSM - 'Shrinking Site Model' (enligt ref. 9)
- c) HCH-1 - 'HCH-1' modellen (enligt ref. 18)
- d) ACCM - Modell framtagen av Blanch et al (ref. 5)

CONTINUOUS SYSTEM CGKIN

STATE g c
DER dg dc

$dg = Kb*EB*c / ((1+g/i1)*c + (1+g/i2)*Km)$
dc = -dg

Kb:1.25
Km:.856
i1:2.7
i2:0.36

EB:43
c:13.7
END

CONTINUOUS SYSTEM SSM

STATE s g c

DER ds dg dc

$ds = -kx*s^{4/3}*(ex/(ex+alfa))*(ix/(ix+c))$

$dg = k2*eb*c/(km*(1+g/i2)+c*(1+g/i1))$

$dc = -ds-dg$

$rs = c+g$

kx:0.2

alfa:1.05

ix:0.5

k2:1.25

km:0.856

i1:2.7

i2:0.36

s:50

"initial concentration

ex:2

eb:1

END

CONTINUOUS SYSTEM HCH1

STATE s c g

DER ds dc dg

$ds = -k1*s*ex / ((alfa+fi+epi*ex)*(1+beta*c))$

$dc = -ds-dg$

$dg = kb*eb*c / (km*(1+g/i2)+c*(1+g/i1))$

$fi1 = s - alfa - epi*ex$

$fi2 = (fi1 + \sqrt{\text{abs}(fi1)^2 + 4*alfa*s}) / 2$

$fi = \text{if } fi2 > 0 \text{ then } fi2 \text{ else } 0$

$rs = c + g$

k1:26.3

alfa:8.97

beta:0.45

epi:36.8

kb:1.25

km:.856

i1:2.7

i2:.36

s:50

"initial concentration

ex:2

eb:1.5

END

CONTINUOUS SYSTEM ACCM

STATE sa sc c g
 DER dsa dsc dc dg
 TIME t

dsa=if epia>0 then -ka*epia*(1/(1+ki*c)) else 0
 dsc=if epic>0 then -kc*epic else 0
 dc=-dsa-dsc-dg
 dg=kb*eb*c/((1+g/i1)*c+(1+g/i2)*km)

ba=betaA*gammaA+alfaA+e0
 gammaA=if sa>0 then fa*sa0^{1/3}*sa^{2/3} else 0
 ca=betaA*gammaA*e0
 epia=(ba-sqrt(ba*ba-4*ca))/2

bc=betaC*gammaC+alfaC+e0
 gammaC=if sc>0 then fc*sc0^{1/3}*sc^{2/3} else 0
 cc=betaC*gammaC*e0
 epic=(bc-sqrt(bc*bc-4*cc))/2

s=sc+sa

ka:70 "amorf cellulosa hydrolys

betaA:41.4

ki:0.40

alfaA:314

fa:0.0375

kc:0.3

"kristallin cellulosa hydrolys

betaC:203.4

* fc:0.0375

kb:75

"cellobios-hydrolys

i1:2.7

i2:0.36

km:0.856

alfaC:1050

sa:25

"initial koncentration

sa0:25

sc:40

sc0:40

e0:2

eb:5

END

APPENDIX II Simnonprogram ; Processmodeller

- a) pSEM - processmodell med 'SEM'-kinetik.
 - pSEMm : tankreaktor
 - pSEMs : separator
 - pSEMc : 'connecting system'

- b) pACCM - processmodell med 'ACCM'-kinetik
 - pACCMm : tankreaktor
 - pACCMs : separator
 - pACCMc : 'connecting system'

CONTINUOUS SYSTEM pSSMm

INPUT F fi sf exf ebf ssb cs gs exsb exst ebsb ebst
OUTPUT sm cm gm exm ebm

STATE s c g ex eb
DER ds dc dg dex deb

$ds = F*(sf+(1+fi)*ssb-2*(1+fi)*s)/Vm + kins$
 $dc = F*((fi+1+fi)*cs-2*(1+fi)*c)/Vm + kinc$
 $dg = F*((fi+1+fi)*gs-2*(1+fi)*g)/Vm + king$
 $dex = F*(exf+fi*exst+(1+fi)*exsb-2*(1+fi)*ex)/Vm + deakex$
 $deb = F*(ebf+fi*ebst+(1+fi)*ebsb-2*(1+fi)*eb)/Vm + deakeb$

$kins = -kx*s^{4/3}*(ex/(ex+alfa))*(ix/(ix+c))$
 $king = kb*eb*c/((1+g/i1)*c+(1+g/i2)*km)$
 $kinc = -kins-king$

sm=s
cm=c
gm=g
exm=ex
ebm=eb

deakex:0 "enzymdeaktivering
deakeb:0

kx:0.2 "cellulosa hydrolysis
alfa:1.05
ix:0.5
kb:1.25 "cellobioshydrolysis
i1:2.7
i2:0.36
km:0.856

s:60 "initialkoncentrationer
ex:2
eb:1

Vm:1

END

CONTINUOUS SYSTEM pSSMs

INPUT F fi sm cm gm exm ebm

OUTPUT ssb cs gs exsb exst ebsb ebst

STATE s c g ex eb

DER ds dc dg dex deb

$ds = F*(2*(1+fi)*sm-(1+fi)*s)*ff/Vs$

$dc = F*(2*(1+fi)*cm-2*(1+fi)*c)/Vs$

$dg = F*(2*(1+fi)*gm-2*(1+fi)*g)/Vs$

$dex = F*(2*(1+fi)*exm-(1+fi)*exsb-(1+fi)*exst)/Vs$

$deb = F*(2*(1+fi)*ebm-(1+fi)*ebsb-(1+fi)*ebst)/Vs$

$exsb=ex/((1-ff)+kex*ff)$

$exst=kex*exsb$

$ebsb=eb/((1-ff)+keb*ff)$

$ebst=keb*ebsb$

$ssb=s$

$cs=c$

$gs=g$

$kex:0.16$

$keb:0.02$

$ff:0.5$

$Vs:0.25$

END

CONNECTING SYSTEM pSSMc

TIME t

F[PSSMM]=FC
F[PSSMS]=FC
fi[PSSMM]=fic
fi[PSSMS]=fic
sf[PSSMM]=sfc
exf[PSSMM]=exfc
ebf[PSSMM]=ebfc

ssb[PSSMM]=ssb[PSSMS]
cs[PSSMM]=cs[PSSMS]
gs[PSSMM]=gs[PSSMS]
exst[PSSMM]=exst[PSSMS]
exsb[PSSMM]=exsb[PSSMS]
ebst[PSSMM]=ebst[PSSMS]
ebsb[PSSMM]=ebsb[PSSMS]

sm[PSSMS]=sm[PSSMM]
cm[PSSMS]=cm[PSSMM]
gm[PSSMS]=gm[PSSMM]
exm[PSSMS]=exm[PSSMM]
ebm[PSSMS]=ebm[PSSMM]

exfc= if t>241 then 0 else if t<240 then 0 else 100
ebfc= if t>268 then 0 else if t<267 then 0 else 50
sfc= if t<140 then 44 else 59

FC:0.015
fic:0

END

CONTINUOUS SYSTEM pACCMm

INPUT F fi ccf acf exf ebf ccsb acsb cs gs exsb exst ebsb ebst
 OUTPUT ccm acm cm gm exm ebm

STATE cc ac c g ex eb
 DER dcc dac dc dg dex deb

$dcc = F * (ccf + (1 + fi) * ccsb - 2 * (1 + fi) * cc) / Vm + kincc$
 $dac = F * (acf + (1 + fi) * acsb - 2 * (1 + fi) * ac) / Vm + kinac$
 $dc = F * ((fi + 1 + fi) * cs - 2 * (1 + fi) * c) / Vm + kinc$
 $dg = F * ((fi + 1 + fi) * gs - 2 * (1 + fi) * g) / Vm + king$
 $dex = F * (exf + fi * exst + (1 + fi) * exsb - 2 * (1 + fi) * ex) / Vm + deakex$
 $deb = F * (ebf + fi * ebst + (1 + fi) * ebsb - 2 * (1 + fi) * eb) / Vm + deakeb$

$kincc = \text{if } epic > 0 \text{ then } -kc * epic \text{ else } 0$
 $kinac = \text{if } epia > 0 \text{ then } -ka * epia * (1 / (1 + ki * c)) \text{ else } 0$
 $king = kb * eb * c / ((1 + g / i1) * c + (1 + g / i2) * km)$
 $kinc = -kincc - kinac - king$

$b1 = \text{betaA} * \text{gammaA} + \text{alfaA} * \text{ex}$
 $\text{gammaA} = \text{if } ac > 0 \text{ then } fa * ac^{1/3} * ac^{2/3} \text{ else } 0$
 $b2 = \text{betaA} * \text{gammaA} * \text{ex}$
 $epia = (b1 - \text{sqrt}(b1^2 - 4 * b2)) / 2$

$a1 = \text{betaC} * \text{gammaC} + \text{alfaC} * \text{ex}$
 $\text{gammaC} = \text{if } cc > 0 \text{ then } fa * cc^{1/3} * cc^{2/3} \text{ else } 0$
 $a2 = \text{betaC} * \text{gammaC} * \text{ex}$
 $epic = (a1 - \text{sqrt}(a1^2 - 4 * a2)) / 2$

cell=ac+cc

ccm=cc
 acm=ac
 cm=c
 gm=g
 exm=ex
 ebm=eb

deakex:0 "enzymdeaktivering
 deakeb:0

ka:70 "amorf cellulosa hydrolysis
 betaA:41.4
 ki:0.4
 alfaA:314
 fa:0.0375
 kc:0.3 "kristallin cellulosa hydrolysis
 betaC:203.4
 alfaC:1050
 kb:75 "cellobioshydrolysis
 i1:2.7
 i2:0.36
 km:0.856

ac:30 "initialkoncentrationer
 ac0:30
 cc:30
 cc0:30
 ex:2
 eb:0.015

Vm: 1

END

CONTINUOUS SYSTEM pACCMS

INPUT F fi ccm acm cm gm exm ebm
OUTPUT ccsb acsb cs gs exsb exst ebsb ebst

STATE cc ac c g ex eb
DER dcc dac dc dg dex deb

$dcc = F * (2 * (1 + fi) * ccm - (1 + fi) * cc) * ff / Vs$
 $dac = F * (2 * (1 + fi) * acm - (1 + fi) * ac) * ff / Vs$
 $dc = F * (2 * (1 + fi) * cm - 2 * (1 + fi) * c) / Vs$
 $dg = F * (2 * (1 + fi) * gm - 2 * (1 + fi) * g) / Vs$
 $dex = F * (2 * (1 + fi) * exm - (1 + fi) * exsb - (1 + fi) * exst) / Vs$
 $deb = F * (2 * (1 + fi) * ebm - (1 + fi) * ebsb - (1 + fi) * ebst) / Vs$

$exsb = ex / ((1 - ff) + kex * ff)$
 $exst = kex * exsb$
 $ebsb = eb / ((1 - ff) + keb * ff)$
 $ebst = keb * ebsb$

$ccsb = cc$
 $acsb = ac$
 $cs = c$
 $gs = g$

$cell = cc + ac$

$kex = 0.16$
 $keb = 0.02$
 $ff = 0.5$
 $Vs = 0.25$

END

CONNECTING SYSTEM PACCMc

TIME t

F[PACCM] = FC
F[PACCMS] = FC
fi[PACCM] = fic
fi[PACCMS] = fic
ccf[PACCM] = ccfc
acf[PACCM] = acfc
exf[PACCM] = exfc
ebf[PACCM] = ebfc

ccsb[PACCM] = ccsb[PACCMS]
acsb[PACCM] = acsb[PACCMS]
cs[PACCM] = cs[PACCMS]
gs[PACCM] = gs[PACCMS]
exst[PACCM] = exst[PACCMS]
exsb[PACCM] = exsb[PACCMS]
ebst[PACCM] = ebst[PACCMS]
ebsb[PACCM] = ebsb[PACCMS]

ccm[PACCMS] = ccm[PACCM]
acm[PACCMS] = acm[PACCM]
cm[PACCMS] = cm[PACCM]
gm[PACCMS] = gm[PACCM]
exm[PACCMS] = exm[PACCM]
ebm[PACCMS] = ebm[PACCM]

exfc = if t > 241 then 0 else if t < 240 then 0 else 100
ebfc = if t > 268 then 0 else if t < 267 then 0 else 2.5
ccfc = if t < 140 then 21 else 28
acfc = if t < 140 then 23 else 31

FC = 0.015
fic = 0

END

Nomenklatur

NOMENKLATUR.

Allmänna.

E_1, E_2	Enskilda cellulaser
E^x	Cellulaser
E^a, E^b	Cellobiaser
E^a	Adsorberad enzym (cellulaser)
C^a, \max, K_a	Adsorptionskonstanter
C^x, G_2	Cellulosa
G^x, G_2	Cellobios
G^n	Glukosoligomerer
G^n	Glukos

Cellobioshydrolys.

E^*	Cellobiaser
E^*	Cellobias/Cellobios-komplex
k_b	Hastighetskonstant
K_b	Inhiberingskonstant
$K_{i,1}$	Inhiberingskonstant
$K_{i,2}$	Michaelis-Menten konstanten
K_m	

SSM.

θ	Aktiva centra
η	Aktiva centra/ytenhet
i	Inhiberingsterm
k_1, K_2, K_3	Hastighetskonstanter
I_2	Inhiberingskonstant
α^2	Adsorptionskonstant

HCH-1.

E^f	Fritt enzym
E^a	Adsorberad enzym
G^f	Fritt aktivt centra
G^x	Blockerat centra
EG^x	Enzym/centra-komplex
G^x	Produkt (cellobios)
$G^s E^f, G^s E^a$	Inhiberade enzymer
$G^s EG^x$	Produktinhiberat komplex
k^s	Hastighetskonstant
β	Inhiberingskonstant
δ	Adsorptionskonstant
η	Komplexbildningskonstant
ϵ	Andelen upptagna centra
ϕ	Andelen fria cellulosa centra

ACCM.

E	Cellulaser
e_c	Amorf cellulosa
e_a	Kristallin cellulosa
e_c	

Nomenklatur

r _a	Amorf cellulosa/enzym-komplex
r _c	Kristallin cellulosa/enzym-komplex
r _a ²	Produktinhibering av amorf cellulosa/enzym-komplex
r _a	Reaktionshastighet, kristallin cellulosa
r _c	Reaktionshastighet, amorf cellulosa
K _I	Inhiberingskonstant, amorf cellulosa
k _I	Hastighetskonstant, amorf cellulosa
k _c	Hastighetskonstant, kristallin cellulosa

kap 3.

F	Tillflöde, tank
R	Frånflöde, tank eller tillflöde, separator
T	Recirkulerande toppfasflöde
B	Recirkulerande bottenfasflöde
P	Produktflöde

REFERENSER

1. Buchholz K., Puls J., Gödelmann B. och Dietrichs H.H.: Hydrolysis of cellulosic wastes. *Process Biochem* Dec/Jan 80-81
2. Aly G. och Wittenmark B.: Dynamic behaviour of mixer-settlers. II: Mathematical models and identification methods. 1972 *J Appl Chem Biotechnol*
3. Aly G.: Dynamic behaviour of mixer-settlers: Applicability of ortogonal collocation method. 1982 *Trans I ChemE*
4. Lutzen N.W. et al: Cellulases and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars. 1983 *Phil Trans R. Soc ,London B* 300
5. Wald S., Wilke C.R. och Blanch H.W.: Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose. 1984. *Biotech and Bioeng* 26
6. Tjerneld F. et al : Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. I: Partition of celluloses from *Trichoderma reesei*.
7. Lee J.H., Pagan R.J. och Rogers P.L. : Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using *Zymomonas mobilis*, 1983, *Biotech and Bioeng* 25
8. Humphrey A.E.: The use of computers in fermentation system, *Proc Biochem.*, marsh, 1977,
9. Humphrey A.E., Moreira A., Armiger W. och Zabriskie D.: Production of Single cell protein from cellulose wastes, *Biotech. Bioeng. Symp.* 7, 45-64, 1977
10. Tjerneld F., Persson I., Albertsson P-A och Hahn-Hägerdal B.: Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. II: Semi-continuous conversion of a model substrate, *Solka Floc BW 200*.
11. Gong C-S, Ladisch M.R. och Tsao G.T.: Cellobiase from *Trichoderma viride*: Purification, properties, kinetics and mechanism. *Biotech. Bioeng.* XIX, 959 ,1977,
12. Tangnu S.K., Blanch H.W. och Wilke C.R.: Enhanced production of cellulase, hemicellulase and β -glukosidase by *Trichoderma reesei*. *Biotech. Bioeng.* XXIII, 1837, (1981)
13. Wilke C.R., Yang R.D., Sciamanna A.F. och Freitas R.P.: Raw materials evaluation and process development studies for conversion of biomass to sugar and ethanol. *Biotech. Bioeng.* XXIII, 163, (1981)
14. Mandenius C.F, Danielsson B. och Mattiasson B.: Process control of an ethanol fermentation with an enzym thermistor as a sucrose sensor. *Biotechnol. letters.* 313 , 11, 629, (1981)

Referenser

15. Mandenius C.F., Danielsson B. och Mattiasson B.,: Evaluation of a dialys probe for continuous sampling in fermentors and complex media. Anal. Chim (84), Acta vol. 163.
16. Wood T.M.: Properties and model of action of cellulases. Biotechnol. Bioeng., 5, 111 (1975)
17. Holtzapple M.T., Caram H.S. och Humphrey A.E. : Determining the inhibition constants in the HCH-1 model of cellulose hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. vol. XXVI, 753 (1984)
18. Holtzapple M.T., Caram H.S. och Humphrey A.E. : The HCH-1 model of enzymatic cellulose hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. vol XXVI, 775 (1984)
19. Aström K-J, A Simmon tutorial (okt 1992). Dept. of Automatic Control, Lund Institute of Technology, Lund, Sweden,