

ISSN 0280-5316
ISRN LUTFD2/TFRT--5613--SE

Modellering av glukos-
och acetat-metabolism
i *Escherichia coli*

Mattias Henriksson

Department of Automatic Control
Lund Institute of Technology

Department of Automatic Control Lund Institute of Technology Box 118 SE-221 00 Lund Sweden	<i>Document name</i> MASTER THESIS	
	<i>Date of issue</i> September 1999	
	<i>Document Number</i> ISRN LUTFD2/TFRT--5613--SE	
<i>Author(s)</i> Mattias Henriksson	<i>Supervisor</i> Mats Åkesson Per Hagander	
	<i>Sponsoring organisation</i>	
<i>Title and subtitle</i> Modellering av glukos- och acetat-metabolism i <i>Escherichia coli</i> (Modeling of glucose and acetate metabolism in <i>Escherichia coli</i>)		
<i>Abstract</i> <p>This report discuss two models for glucose and acetate metabolism in <i>Escherichia coli</i> cultivations. The first model describes relations between specific rates of glucose consumption, oxygen consumption, cell growth, acetate consumption, and acetate production. It is used to investigate possible effects from acetate consumption on dissolved oxygen responses to transients in the glucose feed rate. In the second model a dynamical limitation is introduced in the anabolic capacity is introduced. This enables a possible explanation of experimental observations that are hard to explain with the first model. Simulations agrees qualitatively with measurements from experiments.</p>		
<i>Key words</i> Model, <i>Escherichia coli</i>, metabolism, dissolved oxygen, acetate, glucose, growth rate.		
<i>Classification system and/or index terms (if any)</i>		
<i>Supplementary bibliographical information</i>		
<i>ISSN and key title</i> 0280-5316		<i>ISBN</i>
<i>Language</i> Swedish	<i>Number of pages</i> 37	<i>Recipient's notes</i>
<i>Security classification</i>		

The report may be ordered from the Department of Automatic Control or borrowed through:
University Library 2, Box 3, SE-221 00 Lund, Sweden
Fax +46 46 222 44 22 E-mail ub2@ub2.lu.se

Innehåll

1. Inledning	3
1.1 Om arbetet	3
2. Bakgrund	3
2.1 Odlingsreaktor	3
2.2 Fed-batch	3
2.3 Kontinuerlig process.	4
3. Enkel modell av ämnesomsättning i <i>E. coli</i>-cellen . .	5
3.1 Beskrivning av glukosupptaget	5
3.2 Beskrivning av produktion och konsumtion av acetat .	7
3.3 Beskrivning av syreupptaget	7
3.4 Modell för celltillväxten	8
3.5 Liten sammanfattning	10
3.6 Sammanfattning av ekvationerna	11
3.7 Simulering	11
4. Bättre modell för glukosupptaget.	16
4.1 Exempel	16
4.2 Modell för bakterien	19
4.3 Begränsningens dynamik	25
4.4 Simulering av en "fed-batch"-process	28
4.5 Förslag på verifiering	30
5. Sammanfattning	30
A. Nomenklatur	31
A.1 Konstanter och flödesvariabler i cellen.	31
A.2 Övriga konstanter	32
A.3 Övriga variabler	32
A.4 Värdet på konstanter	32
B. Modell med begränsning	34

1. Inledning

Med dagens genteknik kan man få mikroorganismer att framställa komplexa molekyler. En vanlig värdorganism för detta ändamål är bakterien *Escherichia coli* som kan odlas till höga celltätheter. Efter odlingen skördas biomassan och det önskade ämnet, vanligtvis ett protein, extraheras. Under en pågående odling tillförs cellerna bl.a. syre och glukos. Vid överskott av glukos eller underskott av syre bildar cellerna acetat, vilket i stora koncentrationer har en negativ verkan på tillväxten och den önskade produktionen.

För att undvika att acetat ackumulerar (pga. överskott av glukos) vill man tillföra glukos i kontrollerade former. En metod att göra detta bygger på att bildning av acetat kan upptäckas genom att överlagra pulser i glukosflödet till odlingen, se [2]. Pulserna ger tydlig variation i halten av löst syre och försvinner då acetat bildas vilket kan utnyttjas för att justera tillflödet av glukos.

För att kunna analysera och simulera en sådan metod är det viktigt med en modell för metabolismen hos *E. coli*. En tidigare använd modell beskriver sambandet mellan glukosupptag, syreupptag och produktion av acetat, men acetat kan även konsumeras. Ett av målen med detta arbete är därför att se vilka effekter acetatkonsumtionen kan ha på syrehalten då pulser i glukoshalten görs.

1.1 Om arbetet

Denna rapport kommer först behandla kortfattat hur odlingprocessen går till. I efterföljande avsnitt, nummer tre, redovisas en modell där snabba förändringar av tillväxten tillåts. Här beskrivs de upptag av glukos, acetat och syre, som den enskilda *E. coli*-cellen gör. I avsnitt fyra kommer en bättre modell att presenteras där hänsyn har tagits till att celltillväxten ej kan förändras obehindrat snabbt.

2. Bakgrund

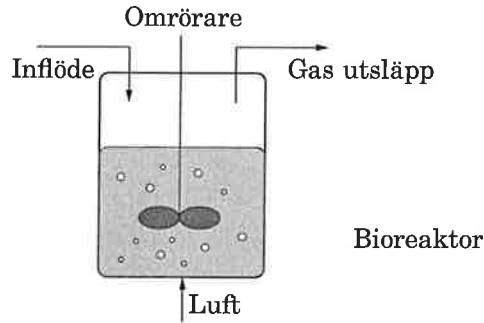
2.1 Odlingsreaktor

En cellodling sker i en reaktor, se figur 1, och måste tillföras luft och substrat (exempelvis glukos) samt kylas för att hålla rätt temperatur. Dessutom bör en bra pH-halt hållas och gaser från processen vädras ut. Kväve och fosfor, bundet i olika föreningar, tillförs vid odlingens början i tillräcklig mängd att det inte uppstår någon brist. En omrörare ser till att blandningen är homogen och kan också användas för att påverka syrekonzentrationen i lösningen.

Vanligtvis önskas en någorlunda konstant tillväxt, varpå inflödet måste ha en exponentiell profil om processen ej har något utflöde. Det finns olika sätt att odla på, nedan kommer två.

2.2 Fed-batch

I en fed-batch-odling finns ett inflöde med hög glukoshalt, men inget utflöde. Några av de viktigaste parametrarnas massbalansekvationer i en



Figur 1 En bioreaktor med inkommande flöde.

fed-batch odling är:

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (1)$$

$$\frac{d(VX)}{dt} = \mu V X \quad (2)$$

$$\frac{d(VG)}{dt} = F G_{in} - q_g V X \quad (3)$$

$$\frac{d(VO)}{dt} = K_L a(N) V (O^* - O) - q_o H V X \quad (4)$$

$$\frac{d(VA)}{dt} = V X (q_a^p - q_a^c) \quad (5)$$

Här är G , X och O glukos-, cell- och syre-koncentrationen i tanken. F , V , H , O^* , N och G_{in} är inflödet, vätskemängden, proportionalitetskonstant¹, mättnadskoncentrationen för syre¹, varvtalet hos omrörare och glukoskoncentrationen på inflödet. Genom att förändra varvtalet (N) ändras syresättningen, via termen $K_L a$, hos processen. Parametrarna μ , q_g , q_o , q_a^c och q_a^p är celltillväxten, specifika glukosupptaget, specifika syreupptaget, specifika acetatupptaget och specifika acetatproduktionen. Dessa kommer att behandlas i nästa avsnitt.

2.3 Kontinuerlig process.

Det går att utforma processen på ett sådant sätt att den har både in- och ut-flöde. Processens massbalansekvationer är:

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad (6)$$

$$\frac{d(VX)}{dt} = \mu V X - F X \quad (7)$$

$$\frac{d(VG)}{dt} = F (G_{in} - G) - q_g V X \quad (8)$$

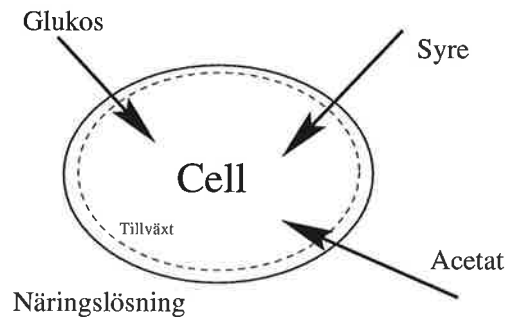
$$\frac{d(VA)}{dt} = V X (q_a^p - q_a^c) - F A \quad (9)$$

Processen är så utformad att volymen V hålls konstant och flödet F kan ändras. Vanligtvis brukas beteckningen D istället för $\frac{F}{V}$.

¹se appendix A för närmare beskrivning

3. Enkel modell av ämnesomsättning i *E. coli*-cellen

Modellen, som baseras på Xu, Jahic och Enfors artikel [1], beskriver specifika glukos- (q_g), acetat- (q_a) och syre-upptaget (q_o) samt specifika tillväxthastigheten (μ) hos cellen. Upptaget av glukos (q_g) drivs av glukoskoncentrationen (G) utanför cellen, medan acetatupptaget drivs huvudsakligen av acetatkoncentrationen (A) utanför cellen. Syreupptaget däremot bestäms av konsumtionen av de förra upptagen. Under förhållanden med en tillräckligt hög glukoskoncentration produceras acetat som biprodukt. Acetat kan även konsumeras då glukoshalten är låg. I figur 2 illustreras



Figur 2 Cellens förhållande till omvärlden.

hur den omgivande miljöns faktorer verkar. Följande förutsättningar görs i modellen.

- Det finns tre olika flöden in till cellen: syre, glukos och acetat.
- Celler prioriterar glukos före acetat om båda finns tillgängliga.
- Acetat kan produceras av cellen om andningen har mättats.
- Cellen kan ej lagra glukos, acetat eller syre.
- Acetat-koncentrationens negativa inverkan på tillväxten försummas.
- Glukos- och acetat-upptag beskrivs av sk. Monodkinetik

Det har observerats i försök att *E. coli* producerar acetat och andra ämnen då en mätning i syreupptaget har uppmätts, se [6], [4] och [3], för enkelhets skull används acetat som benämning för alla dessa biprodukter fortsättningsvis. För att minska komplexiteten hos modellen säger vi att dynamiken hos metabolismen är snabb i förhållande till den långsamma dynamiken hos syre-, glukos- och acetat-koncentrationerna, dvs. q_o , q_g och q_a saknar begränsande dynamik i den tidsskala som vi observerar processen.

3.1 Beskrivning av glukosupptaget

Cellunderhåll

En viss mängd av glukosflödet går åt till cellunderhåll (q_m), engelska maintenance. Detta går bland annat åt till att återbilda proteiner, upprätthålla koncentrationsskillnader samt ett tryck mot omgivningen. De beskrivna modellerna nedan är endast giltiga för $q_g > q_m$, dvs då cellen inte svälter.

Glukosupptaget

Glukosupptaget (q_g) begränsas endast av glukoskoncentrationen utanför cellen och antas följa Monodkinetik dvs

$$q_g = q_g^{max} \frac{G}{(G + K_g)}$$

Då glukosupptaget in till cellen inte är för stort klarar cellandningen av att erhålla nödvändig energi till metabolismen via förbränning. Vid högre glukosflöde begränsar respirationskapaciteten och metabolismen sker med hjälp av att utsöndra acetat.

I ett försök att strukturera glukosflödet kan vi dela upp detta i en oxidativ väg och en fermentativ väg (metabolismen sker, i motsats till föregående, utan syre), där namnet anger hur energin till metabolismen förvärvas. Dvs:

$$q_g = q_g^{ox} + q_g^{fe}$$

Glukosen används till att bygga upp cellens beståndsdelar (anabolism) och att ge den energi som behövs till denna process.

$$q_g^{ox} = q_g^{ox,an} + q_g^{ox,en} + q_m$$

Andelen som går till anabolismen antas vara konstant, dvs:

$$q_g^{ox,an} = (q_g^{ox} - q_m) Y_{xg}^{ox} \quad (10)$$

Mängden syre som förbrukas antas vara proportionell mot glukosen som förbränns för att ge energi.

$$q_o^g = Y_{og}^{ox} (q_g^{ox,en} + q_m)$$

Andningen mättar vid q_o^{max} , vilket ger olikheten:

$$q_o^g \leq q_o^{max}$$

Brytpunkten (q_g^{crit}), det glukosflöde där mättningen i andningen nås, kan beräknas, enligt.

$$q_g^{crit} = \frac{q_o^{max} - Y_{og}^{ox} q_m}{Y_{og}^{ox} (1 - Y_{xg}^{ox})} + q_m$$

och det oxidativa glukosupptaget kan därmed skrivas:

$$q_g^{ox} = \begin{cases} q_g & , q_g \leq q_g^{crit} \\ q_g^{crit} & , q_g > q_g^{crit} \end{cases}$$

När $q_g > q_g^{crit}$ kan inte all glukos gå via den oxidativa vägen. Då kommer den överskjutande delen gå via den fermentativa vägen. På analogt sätt som förra fallet bidrar en del till anabolismen och en del med energin.

$$q_g^{fe} = q_g^{fe,an} + q_g^{fe,en}$$

Andelen glukos som går till anabolismen ges av:

$$q_g^{fe,an} = q_g^{fe} Y_{xg}^{fe} \quad (11)$$

3.2 Beskrivning av produktion och konsumtion av acetat

Cellen kan både konsumera och producera acetat men detta kan inte ske samtidigt. Acetatproduktionen (q_a^p) antas vara proportionellt mot glukosens energi-metabolism som sker under fermentation ($q_g^{fe,en}$) och sker endast då $q_g > q_g^{crit}$.

$$q_a^p = q_g^{fe,en} Y_{ag}$$

Cellen konsumerar acetat när detta finns tillgängligt och $q_g \leq q_g^{crit}$. Detta därför att *E. coli* föredrar glukos. Acetatupptaget begränsas av två faktorer, upptag av befintligt acetat, som antas följa Monodkinetik $q_a^{pot} = q_a^{max} \frac{A}{(A+K_a)}$, samt tillgänglig respiratorisk kapacitet ($q_o^{max} - q_o^g$). Konsumtion av acetat (q_a^c) går till anabolism ($q_a^{c,an}$) och energi ($q_a^{c,en}$), genom oxidation, på liknande sätt som glukosomvandlingen

$$q_a^c = q_a^{c,an} + q_a^{c,en}$$

där förhållandet mellan q_a^c och $q_a^{c,an}$ ges av.

$$q_a^{c,an} = q_a^c \gamma_{xa}^{ox} \quad (12)$$

Det syreflöde som krävs för att oxidera acetatet antas vara proportionellt mot $q_a^{c,en}$.

$$q_o^a = Y_{oa} q_a^{c,en}$$

Andningens begränsning tillsammans med att glukosen prioriteras före acetat ger olikheten

$$\begin{aligned} q_o^a &\leq q_o^{max} - q_o^g \Rightarrow \\ q_a^{c,en} Y_{oa} &\leq q_o^{max} - Y_{og}^{ox} (q_g^{ox,en} + q_m) \end{aligned}$$

Därför gäller:

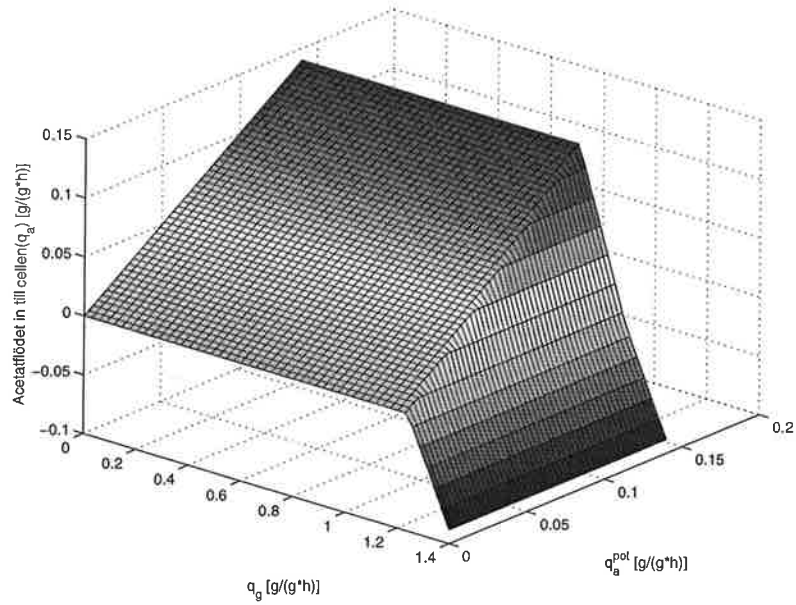
$$q_a^c = \begin{cases} q_a^{pot} & , q_g^{ox,en} \leq \frac{q_o^{max} - q_a^{pot} Y_{oa} (1 - \gamma_{xa}^{ox})}{Y_{og}^{ox}} - q_m \\ \frac{q_o^{max} - Y_{og}^{ox} (q_g^{ox,en} + q_m)}{Y_{oa} (1 - \gamma_{xa}^{ox})} & , q_g^{ox,en} > \frac{q_o^{max} - q_a^{pot} Y_{oa} (1 - \gamma_{xa}^{ox})}{Y_{og}^{ox}} - q_m \end{cases}$$

I figur 3 visas acetatupptaget (q_a) för olika glukosupptag samt möjliga acetatupptag, observera att det negativa upptaget motsvarar acetatproduktion. Figur 4 visar acetatupptaget vid ingen (den undre heldragna linjen) samt oändlig acetatkoncentration. Vid lägre glukosflöden begränsar q_a^{pot} upptaget. Vid lite högre glukosflöden räcker inte den respirativa kapaciteten till, vilket gör att acetatkonsumtionen minskar.

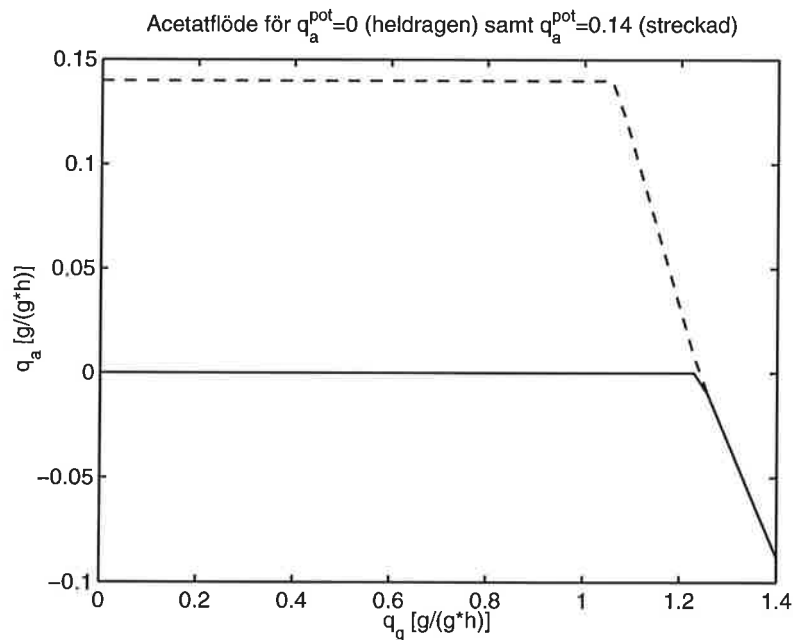
3.3 Beskrivning av syreupptaget

Under odlingen låter man syrehalten i näringslösningen vara så hög att inte metabolismen ska begränsas av för låg syrehalt. Detta gör att det alltid är den begränsade respiratoriska kapaciteten som begränsar syreupptaget. Det maximala syreupptaget sägs vara (q_o^{max}). Den totala syrekonsumtionen beror på hur mycket som förbränns av glukos och acetat.

$$q_o = q_o^g + q_o^a$$



Figur 3 Figur över acetatupptaget i cellen som funktion av q_g och q_a^{pot} .

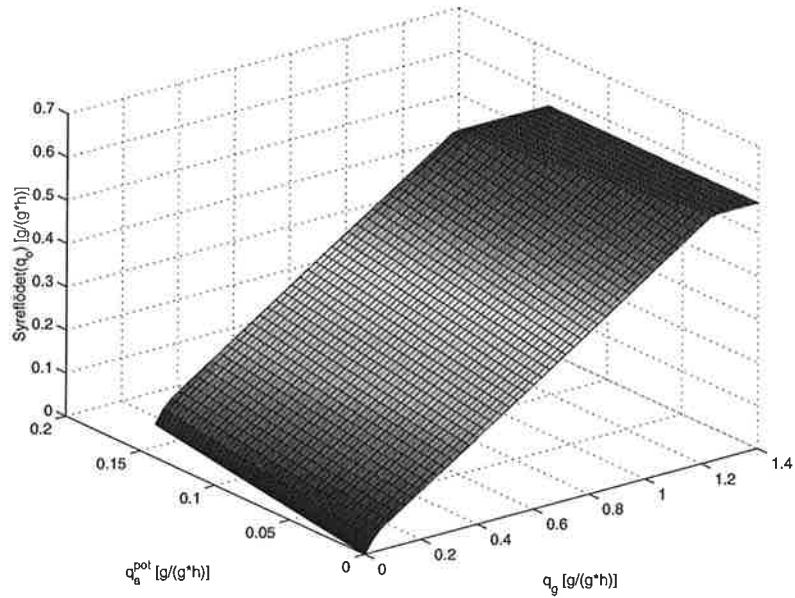


Figur 4 Acetatupptag i cellen som funktion av q_g .

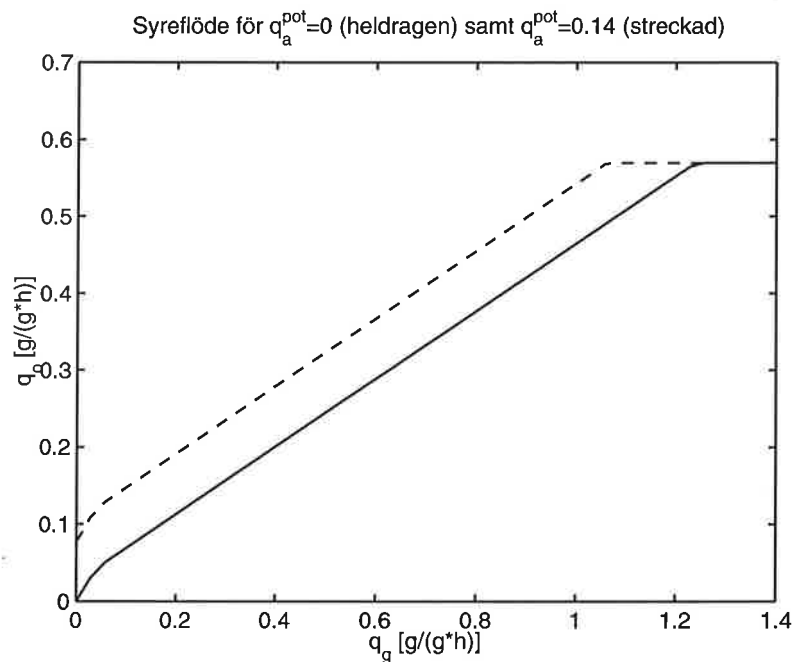
Figur 5 och 6 visar hur syreupptaget mättar vid stora flöden av acetat och glukos. I vänstar delen av figur 6 syns påverkan av cellunderhållet på syreupptaget. Den streckade linjen (överst i figuren) är med stora mängder acetat i lösningen.

3.4 Modell för celltillväxten

De olika anabola delflödena ($q_g^{ox,an}$, $q_g^{fe,an}$ och q_a^{an}) antas alla ge bidrag till den specifika celltillväxten (μ) med olika proportionalitets-konstanter



Figur 5 Figur över syreupptaget som funktion av q_g och q_a^{pot} .

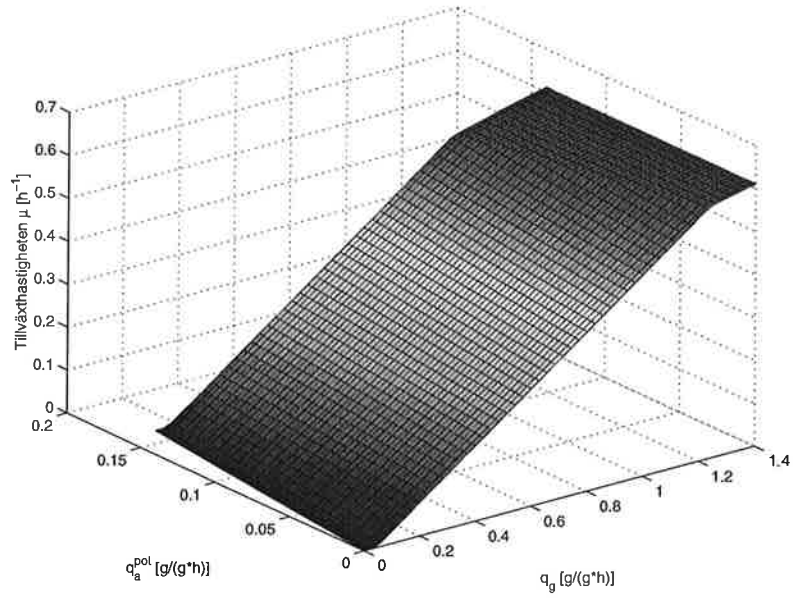


Figur 6 Syreupptaget som funktion av q_g .

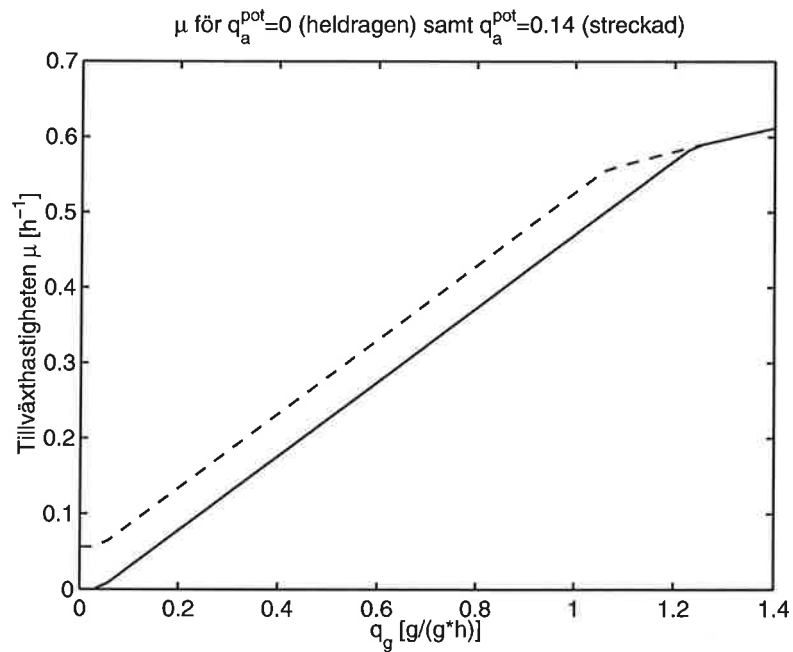
vilket uttrycks i ekvation 13.

$$\mu = q_g^{ox,an} Y_{xg}^{ox,an} + q_g^{fe,an} Y_{xg}^{fe,an} + q_a^{c,an} Y_{xa}^{ox,an} \quad (13)$$

Figurerna 7 och 8 visar tillväxten för olika acetat- och glukos-koncentrationer. Som synes är μ störst vid stora flöden av glukos och acetat. Ekvationen (13) går att skriva om till (14) med den fördelen att konstanterna Y_{xg}^{ox} ,



Figur 7 Figur över tillväxthastigheten (μ).



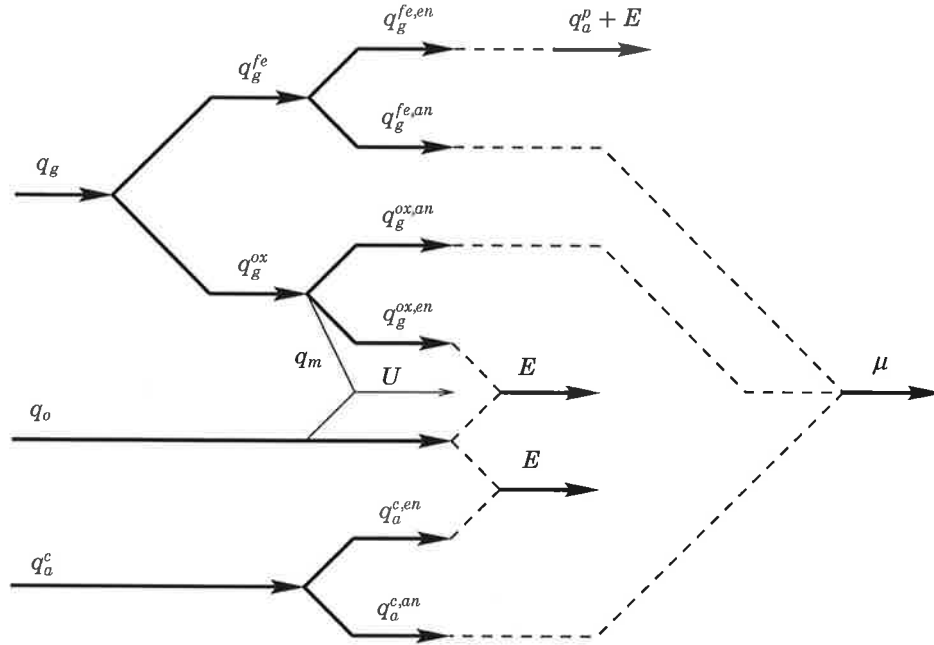
Figur 8 Tillväxthastigheten (μ).

Y_{xg}^{fe} och Y_{xa}^{ox} är lättare att verifiera experimentellt.

$$\mu = q_g^{ox} Y_{xg}^{ox} + q_g^{fe} Y_{xg}^{fe} + q_a^c Y_{xa}^{ox} \quad (14)$$

3.5 Liten sammanfattning

I figur 9 åskådliggörs de olika delflöden som har diskuterats och deras förhållande till energi(E), tillväxt(μ) och cellunderhållet(U).



Figur 9 Relationer mellan metaboliska flöden i cellen.

3.6 Sammanfattning av ekvationerna

Ur ekvationerna ovan går det sammanfattningsvis att skriva hur de önskade parametrarna μ , q_g , q_o , q_a^c och q_a^p beror på koncentrationerna G och A :

$$q_g = q_g^{max} \frac{G}{(G + K_g)} \quad (15)$$

$$q_a^{pot} = q_a^{max} \frac{A}{(A + K_a)} \quad (16)$$

$$q_g^{ox} = \begin{cases} q_g & , q_g \leq q_g^{crit} \\ q_g^{crit} & , q_g > q_g^{crit} \end{cases} \quad (17)$$

$$q_g = q_g^{ox} + q_g^{fe} \quad (18)$$

$$q_o = Y_{oa} (1 - \gamma_{xa}^{ox}) q_a^c + Y_{og}^{ox} (1 - \gamma_{xg}^{ox}) q_g^{ox} \quad (19)$$

$$q_a^p = (1 - \gamma_{xg}^{fe}) \cdot q_g^{fe} Y_{ag} \quad (20)$$

$$q_a^c = \begin{cases} q_a^{pot} & , q_g^{ox,en} \leq \frac{q_o^{max} - q_a^{pot} Y_{oa} (1 - \gamma_{xa}^{ox})}{Y_{og}^{ox}} - q_m \\ \frac{q_o^{max} - Y_{og}^{ox} (q_g^{ox,en} + q_m)}{Y_{oa} (1 - \gamma_{xa}^{ox})} & , q_g^{ox,en} > \frac{q_o^{max} - q_a^{pot} Y_{oa} (1 - \gamma_{xa}^{ox})}{Y_{og}^{ox}} - q_m \end{cases} \quad (21)$$

$$\mu = q_g^{ox} Y_{xg}^{ox} + q_g^{fe} Y_{xg}^{fe} + q_a^c Y_{xa}^{ox} \quad (22)$$

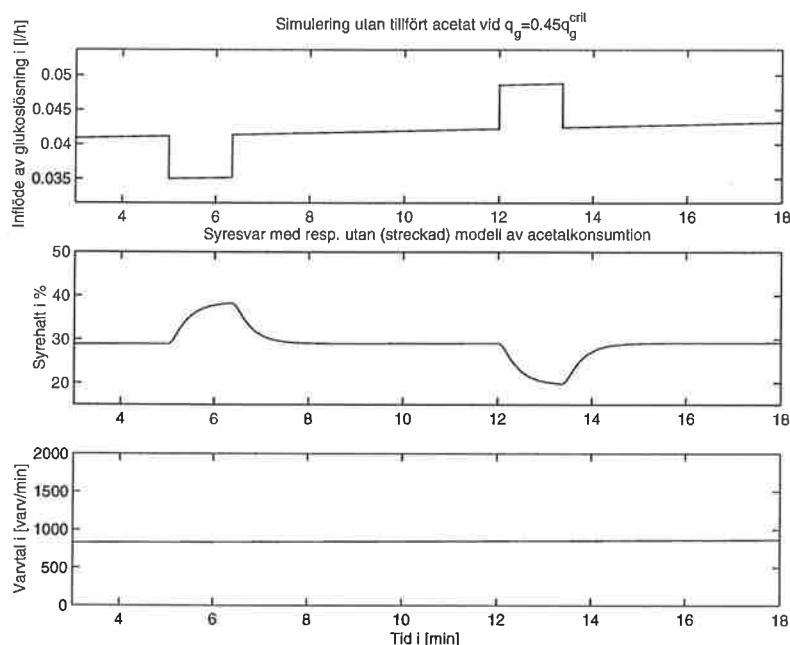
3.7 Simulering

För en uppfattning om modellens beteende kan pulssvar simuleras. Simuleringarna är gjorda för en "fed-batch" process med pulssvarsmetoden. Flödesprofilen är exponentiell för att tillväxten ska vara konstant.

Ingen initial acetatkoncentration

I figur 10 ses hur pulserna i flödet ger syresvar, dvs. syrekoncentrationen

ändras. Den heldragna linjen motsvarar modellen då cellen konsumera acetat och hos den streckade är detta ej möjligt. Någon skillnad kan ej observeras mellan modellerna i figur 10. Därför att glukosupptaget (q_g) är långt mindre än det kritiska glukosupptaget (q_g^{crit}) och således finns inget acetat. I början av figur 11 är glukosupptaget (q_g) lite under kritiska glu-



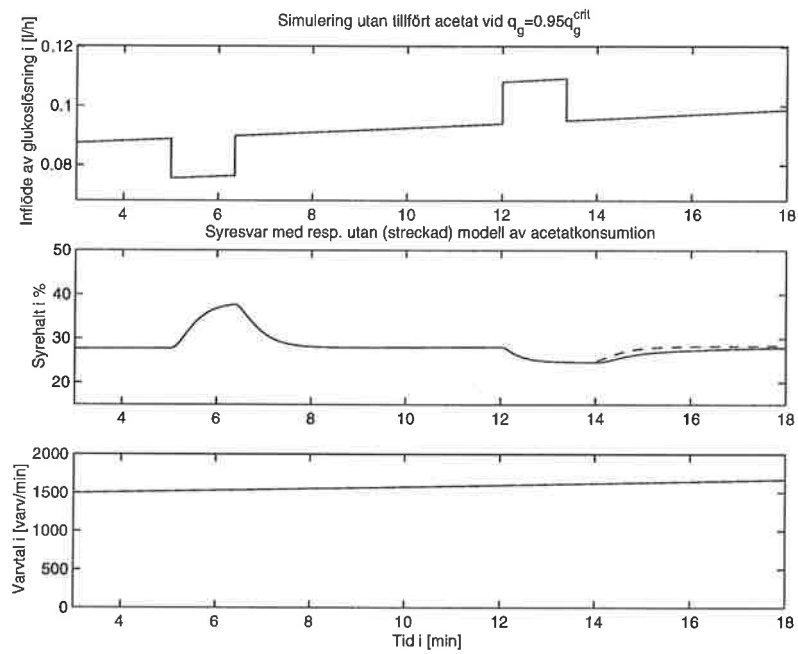
Figur 10 Simulering med (heldragen) och utan (streckad) acetatkonsumtionsmodell.

kosupptaget (q_g^{crit}). Den senare pulsen överskrider dock q_g^{crit} , vilket gör att en liten mängd acetat produceras och det specifika syreupptaget (q_o) är mättat. Det blir en tydligare skillnad vid större cellkoncentrationer. I figuren 12 syns att en mindre mängd acetat producerats innan första pulsen, vilket gör att en liten skillnad kan observeras mellan båda modellerna. Den andra pulsen ger ej upphov till något syresvar eftersom $q_g > q_g^{crit}$, vilket innebär att $q_o = q_o^{max}$.

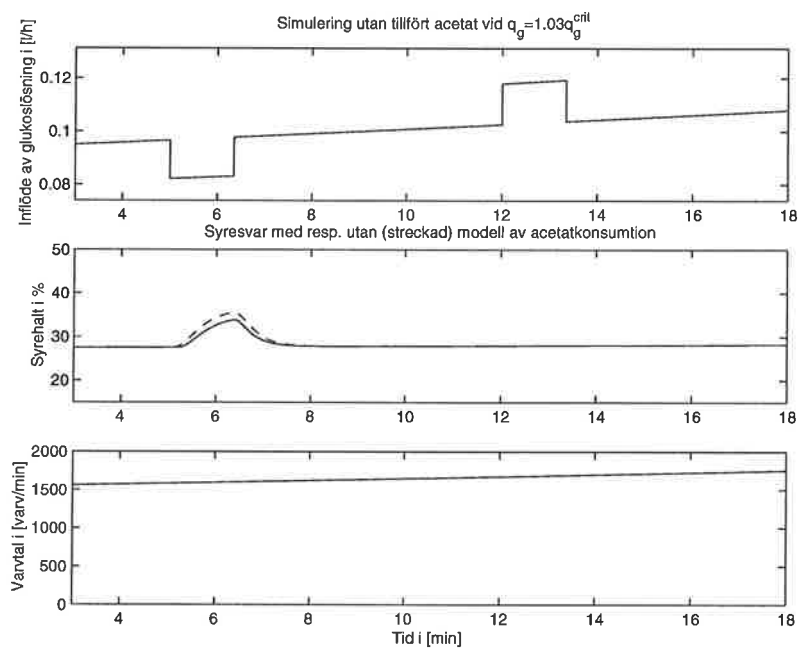
Stor initial acetatkoncentration

I figur 14 och 15 finns så stora mängder acetat från början att $q_a^{pot} = 0.14$. I figur 14 ser vi att varvtalen skiljer mellan modellerna trots att vi inte är nära q_g^{crit} . Om vi nu beaktar nedanstående jämviktsekvation, med ursprung ur ekvationerna 2 till 5 och 3.6 till 20, kring O_0 och F_0 , med beteckningar från figur 13 och då $q_o \leq q_o^{max}$:

$$\begin{aligned}
 F_0 G_{in} &= q_g V X \\
 V (O^* - O_0) K_L a &= q_o H V X \\
 q_o &= q_g^g + q_o^a \\
 \Delta O &= -\frac{H V X}{K_L a} \Delta q_o \\
 \Delta q_o &= Y_{og} (1 - \gamma_{xg}^{ox}) \Delta q_g \\
 \Delta q_g &= \frac{G_{in}}{V X} \Delta F
 \end{aligned}$$



Figur 11 Simulering med (heldragen) och utan (streckad) acetatkonsumtionsmodell.

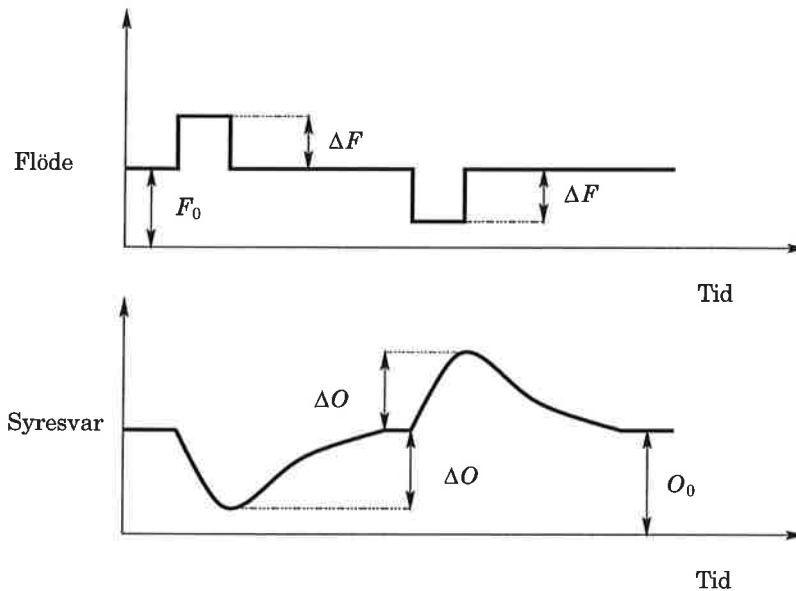


Figur 12 Simulering med (heldragen) och utan (streckad) acetatkonsumtionsmodell.

Detta leder till att

$$\Delta O = -\frac{H G_{in} (1 - Y_{xg}^{ox}) Y_{og}}{K_L a} \Delta F$$

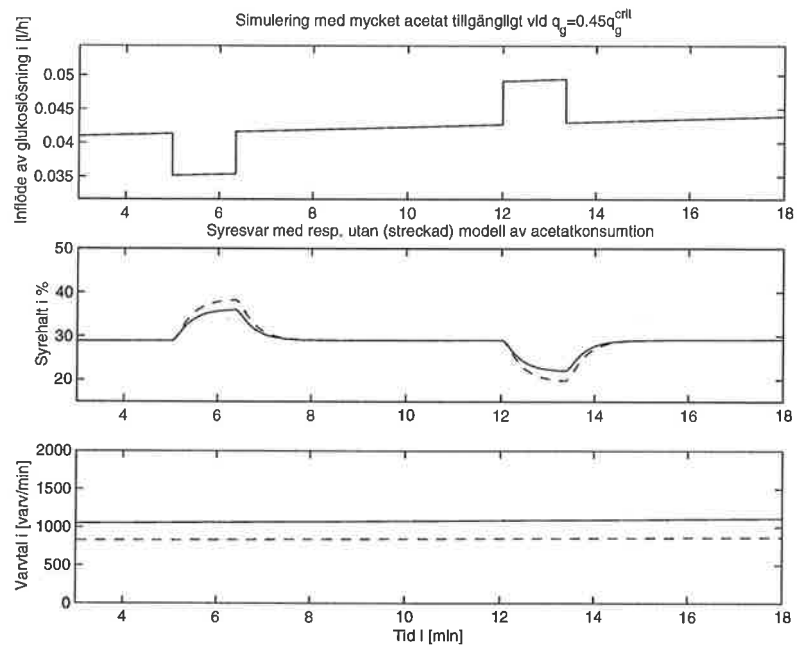
vilket bland annat säger att syresvarets amplitud är beroende på varvtal hos processen. Eftersom q_o är olika med eller utan acetatkonsumtion, kommer även $K_L a$ -termen att skilja för att de båda ska ha samma jämviktpunkt O_0 . $K_L a$ -termen är större för större varvtal och ökar därmed syretillförsen till reaktorn, detta innebär också att syresvaret blir mindre med en modell som tar hänsyn till acetatkonsumtion.



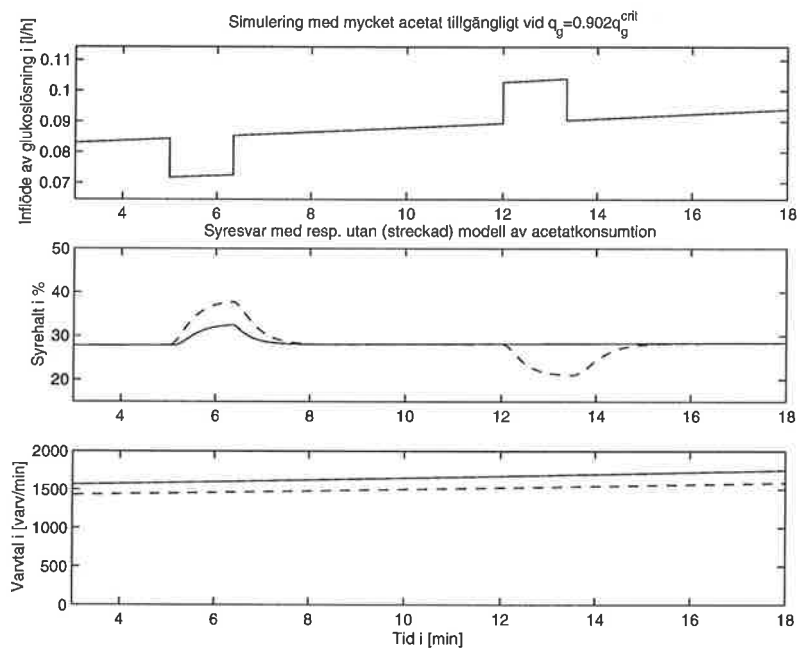
Figur 13 Principskiss över pulssvar.

I undre diagrammet i figur 14 syns att omröraren har högre varvtal för modellen med acetatkonsumtion, vilket är det samma som att $K_L a$ -termen är olika.

I figur 15 kan ej något syresvar ses under andra glukospulsen för modellen med acetatkonsumtion, trots att $q_g < q_g^{crit}$. Anledningen är att glukosupptaget tillsammans med acetatupptaget gör att $q_o = q_o^{max}$. Det som inträffar är en skenbar skiftning i q_g^{crit} , se figur 6. Under första glukospulsen kommer samma fenomen som figur 14 dyka upp. Det kan därför vara motiverat att ta hänsyn till acetatupptaget i en modell.



Figur 14 Simulering med (heldragen) och utan (streckad) acetatkonsumtionsmodell där $q_o < q_o^{max}$.



Figur 15 Simulering med (heldragen) och utan (streckad) acetatkonsumtionsmodell.

4. Bättre modell för glukosupptaget.

Det finns observerade fenomen som inte kan beskrivas med föregående modell.

4.1 Exempel

Under en "fed-batch" process kan, enligt föregående modell, anomalier genom osymmetriska syresvar uppträda. Genom att använda ekvationerna 2 till 5 och linjärisering av dessa kring O_0 och F_0 samt specifikt syreupptag kan maxamplituden fås.

$$\begin{aligned} F_0 G_{in} &= q_g V X \\ V (O^* - O_0) K_L \alpha &= q_o H V X \\ \Delta q_o &= Y_{og} (1 - \Upsilon_{xg}^{ox}) \Delta q_g \\ \Delta q_g &= \frac{G_{in}}{V X} \Delta F \\ \Delta O &= -\frac{H V X}{K_L \alpha} \Delta q_o \\ q_o^g &= Y_{og} ((1 - \Upsilon_{xg}^{ox}) q_g + q_m) \\ q_o &= q_o^g + q_o^a \end{aligned}$$

Ekvationerna ovan ger

$$\begin{aligned} \Delta O &= -(O^* - O_0) \frac{\Delta q_o}{q_o} \\ \Delta q_g &= q_g \frac{\Delta F}{F_0} \end{aligned}$$

vilket leder till

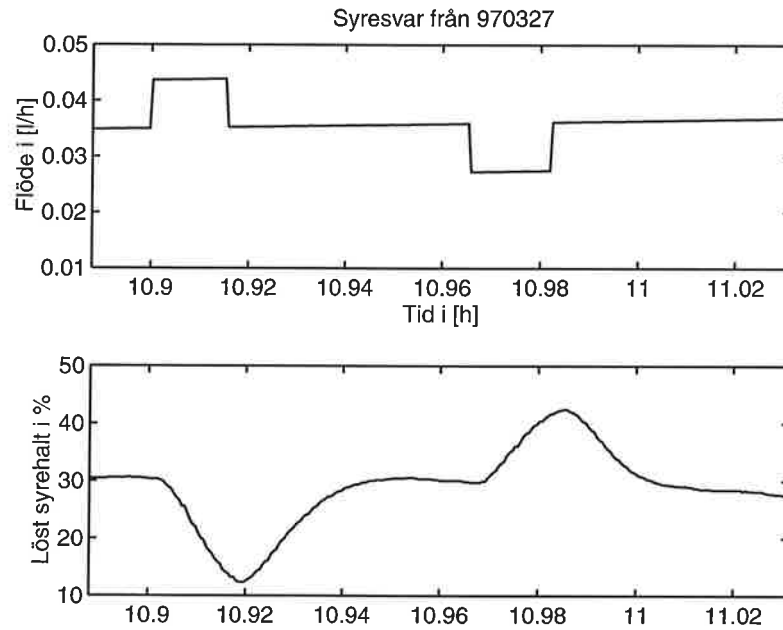
$$-\frac{\Delta O}{O^* - O_0} = \frac{\Delta q_o}{q_o^g + q_o^a} \leq \frac{\Delta q_g}{q_g} = \frac{\Delta F}{F_0}$$

och slutligen kan ΔO fås fram, ty alla storheter är större än 0.

$$\Delta O \leq -(O^* - O_0) \frac{\Delta F}{F_0}$$

Syresvaren är ibland osymmetriska på så sätt att det nedåtgående syresvarets amplitud är större än det uppåtgående. Ett sådant exempel från en "fed-batch"-process syns i figur 16. Förekomst av acetat kan inte ge denna verkan. Omrörarens varvtal har varit konstant under hela visade tidsintervallet. Uppamplituden i syresvaret från detta exempel är 13.2% och nedamplituden 18.2%, där enheten är % av den mättade syrehalten. Den teoretiska maxamplituden är enligt ekvationen ovan i detta fall 17.5% av den mättade syrehalten. Detta gäller då pulsen är tillräckligt bred, i figur 16 har syresvarets amplitud ej nått sitt maximala värde, vilket gör det troligt att nedamplituden är mindre än 18.2%.

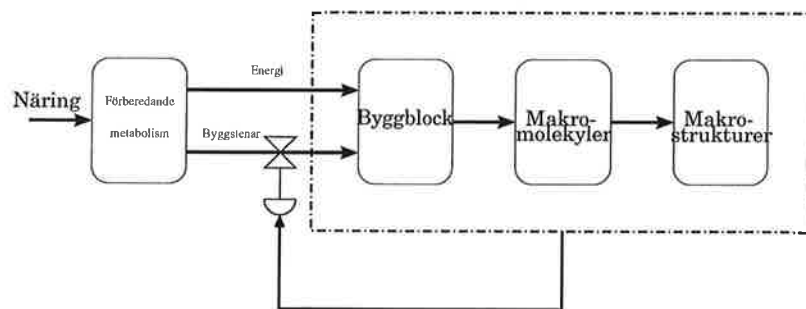
En ökad glukoskoncentration ger vid linjärisering av Monodkinetiken upphov till en lägre amplitud, dvs. en motsatt effekt mot vad som nu är fallet. Tillsammans ger oss ett första indicium på att modellen saknar



Figur 16 Asymmetriskt syresvar från fed-batch odling.

väsentliga bitar för att korrekt beskriva fenomenet. Det kan ske ett ökat syreupptag under den uppåtgående glukospulsen.

I cellen reglerar enzymer glukosflödet genom cellen. Dessa enzymer måste oftast tillverkas inne i cellen. Vi har hittills antagit att cellens metabolism saknar begränsning i dynamiken. Illustrationen 17 försöker i mycket grova drag visa hur cellen är uppbyggd. Näringen (glukos, syre, acetat, fosfor, kväve mm) fabriceras i ett första led till energirika molekyler (sk. ATP-molekyler) samt byggstenar för senare bruk. I andra ledet bildar byggstenarna större byggblock. Byggblocken är tex. aminosyror och fettsyror. Det tredje ledet omvandlar byggblocken till makromolekyler, till dessa hör proteiner, RNA, DNA och lipider. I sista ledet tillverkas tex. cellkärna, flageller och cellmembran. Naturligtvis måste alla led vara i fas för



Figur 17 Principskiss över cellaktiviteter.

att en tillväxtsökning ska kunna inträffa. Intuitivt kan de sista leden ta länge tid på sig, vilket gör att det kan finnas en begränsande faktor för en kraftig tillväxtökning. I försöket ovan (figur 16) indikerades att fler syremolekyler per glukosmolekyl konsumerats. Flödet av byggstenar tycks inte

öka och istället tillverkas energirika molekyler (ATP-molekyler), vilka kan bildas med hjälp av syre (därför den ökade syreförbrukningen). Man tror att *E. coli* kan göra sig av med de energirika molekylerna utan att någon uppbyggnad sker, detta för att skydda cellen från för höga koncentrationer. För att styrka denna hypotes visas ett försök nedan.

Ytterligare exempel

I ett försök av [5], syns att tillväxthastigheten inte kan öka obegränsat med omedelbart varsel, trots tillgång på näringsämnen. I försöket (se figur 18) syns hur tillväxthastigheten ej beter sig som förväntat med föregående modell, eftersom D (se kontinuerligodling) är skild från tillväxthastigheten (μ). Vi kan under vissa omständigheter förvänta oss en begränsad tillväxtökning per tidsenhet.

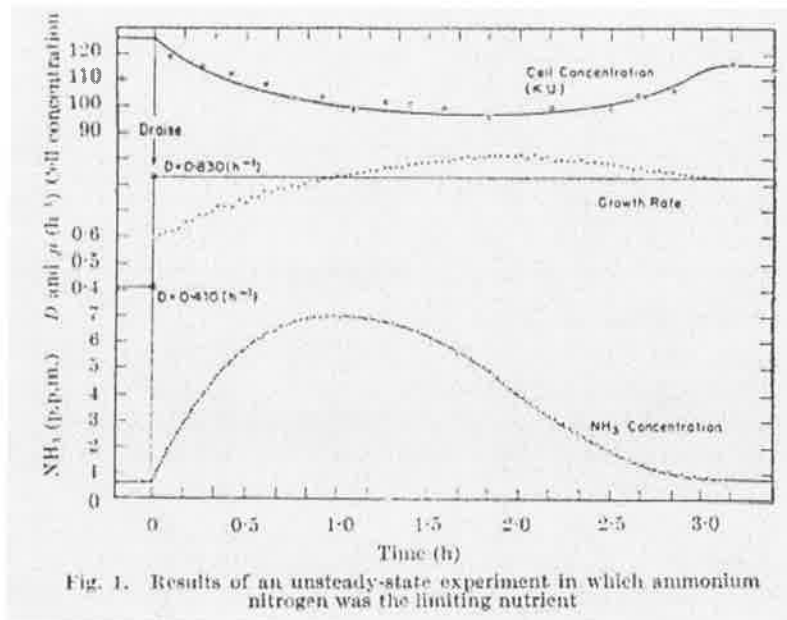


Fig. 1. Results of an unsteady-state experiment in which ammonium nitrogen was the limiting nutrient

Figur 18 Ett intressant försök från en kontinuerlig odling.

4.2 Modell för bakterien

Hypotes

E. coli:s glukosupptag tycks, enligt försök, alltid följa Monodmodellen, trots att en potentiell tillväxt (μ^{pot}) vilket är ekvivalent med tillväxten (μ) i föregående modell, är större än en begränsande faktor B . Hypotesen är att den faktiska tillväxten är mindre än både den potentiella samt begränsningen, dvs $\mu \leq \mu^{pot}$ och $\mu \leq B$. Den eventuellt överskjutande delen av glukos eller acetat kommer att ge upphov till en ökande specifik syreförbrukning samt eventuellt acetatproduktion. Enligt observationer bör begränsningen ha en långsam dynamik.

Nedan kommer att redovisas två ingående modeller att beskriva denna strategi, först där begränsningen (B) är statisk och sedan dynamisk.

En heuristisk modell

Denna modell liksom föregående prioriterar glukos före acetat då all tillgänglig respiratorisk kapacitet används. I figur 19 syns de olika fallen som kan uppträda hos cellen. Fall **I** och **II** är tillsammans identisk med föregående modell. Fall **III** och **IV** tillkommer. Denna nya modell kan skådas i detalj i bilaga B.

$\mu^{pot} \leq B$ $q_o < q_o^{max}$ I	$\mu^{pot} \leq B$ $q_o = q_o^{max}$ II
$\mu^{pot} > B$ $q_o < q_o^{max}$ III	$\mu^{pot} > B$ $q_o = q_o^{max}$ IV

Figur 19 De olika fallen som uppträder i den heuristiska modellen.

Ett annat angreppssätt

För en något enklare beskrivning för senare bruk slås nu $q_g^{ox,an}$ och $q_g^{fe,an}$ samman.

$$\begin{aligned}
 q_g^{an} &= q_g^{ox,an} + q_g^{fe,an} \\
 \Rightarrow \\
 \mu &= \frac{C_g}{C_x} q_g^{an} + \frac{C_a}{C_x} q_a^{c,an}
 \end{aligned}$$

Det går att formulera kriterierna ovan med hjälp av en ansats. Maximera μ med avseende på q_g^{an} , $q_g^{ox,an}$, $q_g^{fe,an}$, $q_a^{c,an}$ och $q_a^{c,ox}$ samt under

bivillkoren

$$q_g = q_g^{an} + q_g^{ox,en} + q_g^{fe,en} + q_m \quad (23)$$

$$q_a^{c,an} + q_a^{c,ox} \leq q_a^{pot} \quad (24)$$

$$q_g^{an} \leq \alpha q_g^{ox,en} + \beta q_g^{fe,en} \quad (25)$$

$$q_a^{c,an} \leq \gamma q_a^{c,ox} \quad (26)$$

$$\mu = \frac{C_g}{C_x} q_g^{an} + \frac{C_a}{C_x} q_a^{c,an} \leq B \quad (27)$$

$$q_o = Y_{og} q_g^{ox,en} + Y_{oa} q_a^{c,ox} + q_m Y_{og} \leq q_o^{max} \quad (28)$$

där beteckningarna α , β och γ står för:

$$\alpha = \frac{\Upsilon_{xg}^{ox}}{1 - \Upsilon_{xg}^{ox}}$$

$$\beta = \frac{\Upsilon_{xg}^{fe}}{1 - \Upsilon_{xg}^{fe}}$$

$$\gamma = \frac{\Upsilon_{xa}^{ox}}{1 - \Upsilon_{xa}^{ox}}$$

De två första ekvationerna säger att glukosflödet är givet och acetatkonsumtionen kan ej vara större än q_a^{pot} . olikheterna 26 och 27 beskriver hur stor andel som minst är nödvändig för att erhålla tillräcklig energi till användandet av byggstenarna, jämför med ekvation 10, 11 och 12.

De två sista olikheterna beskriver den begränsade tillväxten samt begränsad respiratorisk kapacitet. Lösningen till detta problem är inte entydig med avseende på syreupptag, acetatupptag och acetatproduktion. I hypotesen önskas en prioritering av glukos före acetat. Genom att maximera

$$\phi \mu + \varepsilon q_g^{ox,en} + \varepsilon^2 q_a^{c,ox}$$

där $\|\phi + \varepsilon + \varepsilon^2\| = 1$ nås en entydig lösning för tillräckligt litet ε . Detta är ett sätt att säga att glukos- och acetat-konsumtionen, som prioriteras i nämnd ordning, ska vara så hög som möjligt om inte μ påverkas. Att maximera $\phi \mu + \varepsilon q_g^{ox,en}$ ger samma resultat.

Lösningen av parametrarna/tillstånden q_g^{an} , $q_g^{ox,en}$, $q_g^{fe,en}$, $q_a^{c,an}$, $q_a^{c,ox}$ och μ fås enkelt med linjär programmering.

Resultat av ansatserna

De ur systemets synvinkel intressanta parametrarna är μ , q_o , q_a^c och q_a^p är:

$$\mu = \frac{C_g}{C_x} q_g^{an} + \frac{C_a}{C_x} q_a^{c,an} \quad (29)$$

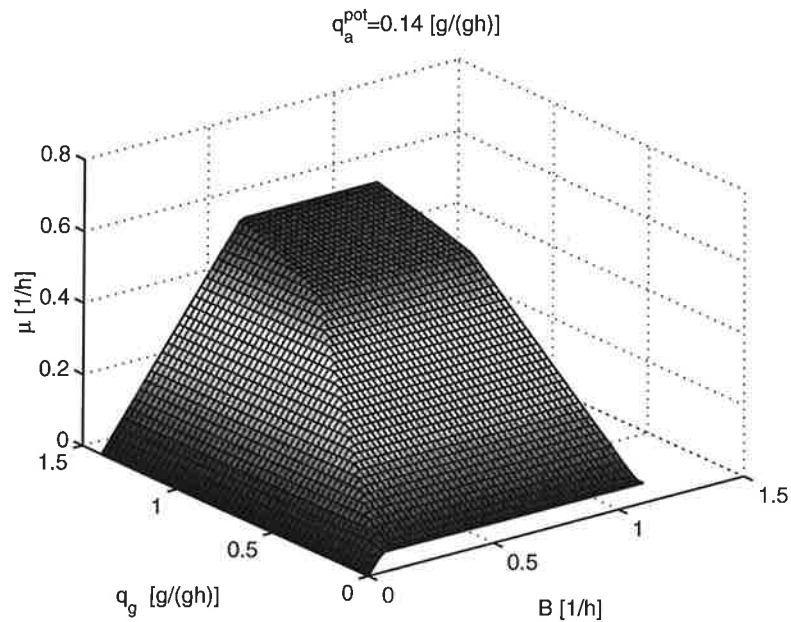
$$q_o = Y_{og} q_g^{ox,en} + Y_{oa} q_a^{c,ox} + Y_{og} q_m \quad (30)$$

$$q_a^c = q_a^{c,an} + q_a^{c,ox} \quad (31)$$

$$q_a^p = Y_{ag} q_g^{fe,en} \quad (32)$$

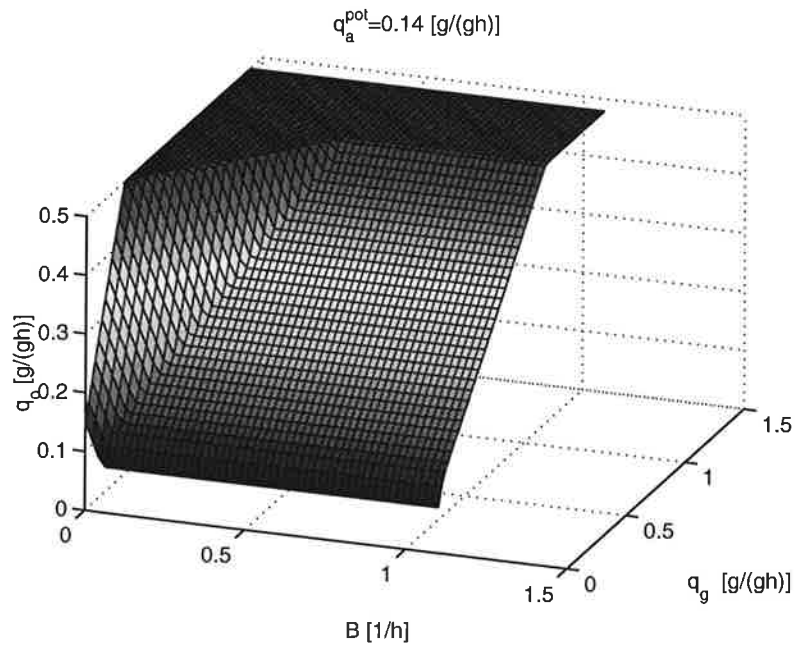
Eftersom det förhåller sig så att $\frac{C_g}{C_x} = \frac{C_a}{C_x}$ och $Y_{og} = Y_{oa}$ så är parametrarna q_g^{an} , $q_g^{ox,en}$, $q_g^{fe,en}$, $q_a^{c,an}$ och $q_a^{c,ox}$ linjärt beroende. Vilket gör det omöjligt att entydigt bestämma dessa.

I figur 20 syns en graf över tillväxten (μ) för olika glukosflöden (q_g) och begränsningar (B) vid mycket stor acetatkoncentration ($q_a^{pot} = q_a^{c,max}$). Figur 21 visar hur syreupptaget (q_o) varierar. Begränsningens verkan kan



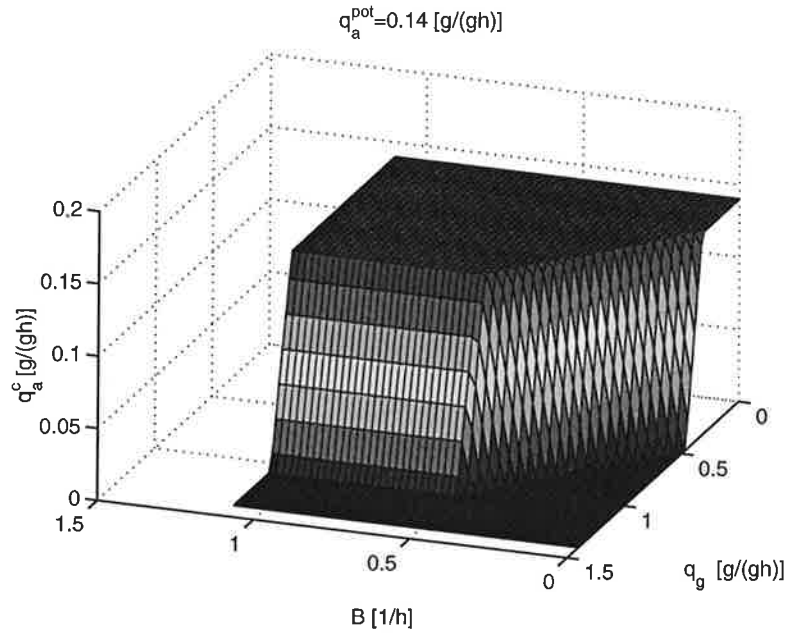
Figur 20 Graf över tillväxten

tydligt ses i vänstra delen av grafen. Graf 22 visar acetatkonsumtionen

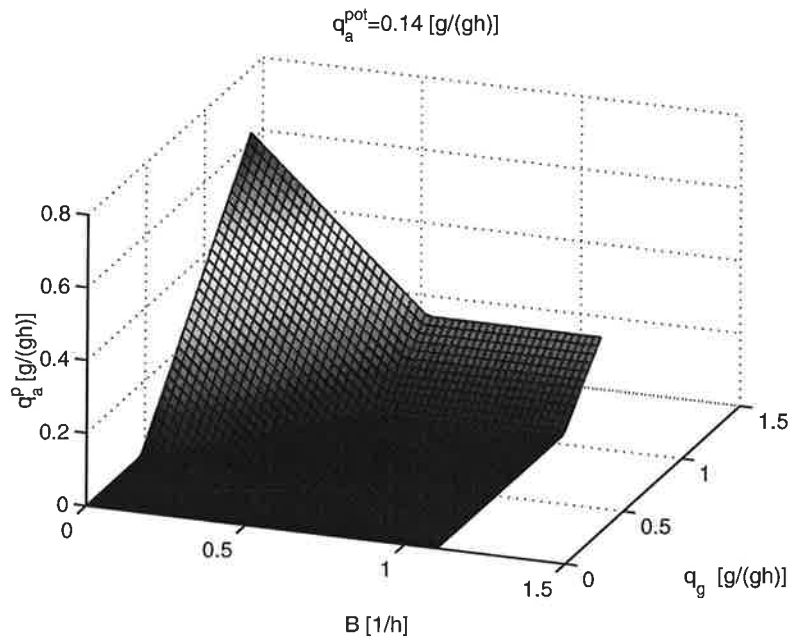


Figur 21 Graf över syreupptaget (q_o)

(q_a^c). Observera att q_g axeln är vänd. I figur 23 syns åter begränsningens verkan på produktionen av acetat (q_a^p).

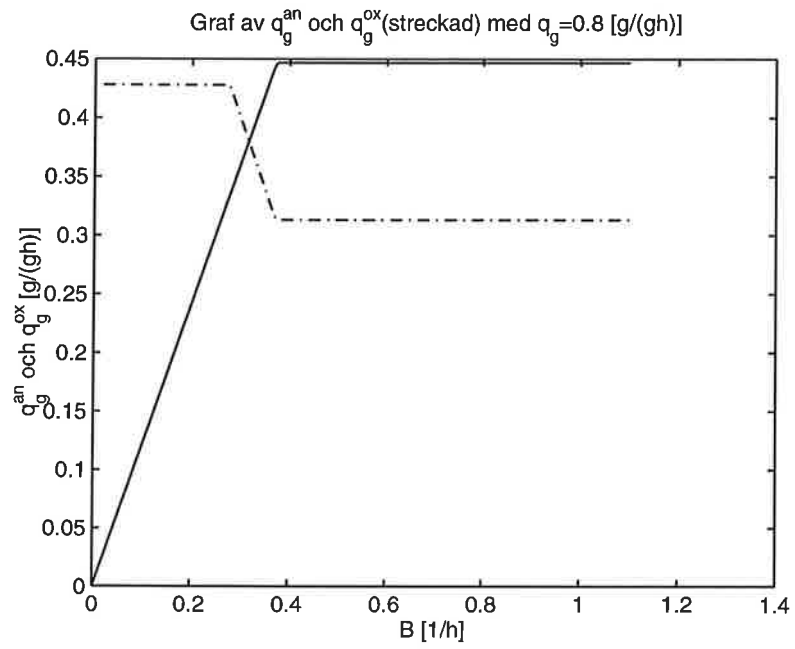


Figur 22 Graf över acetatkonsumtionen (q_a^c)

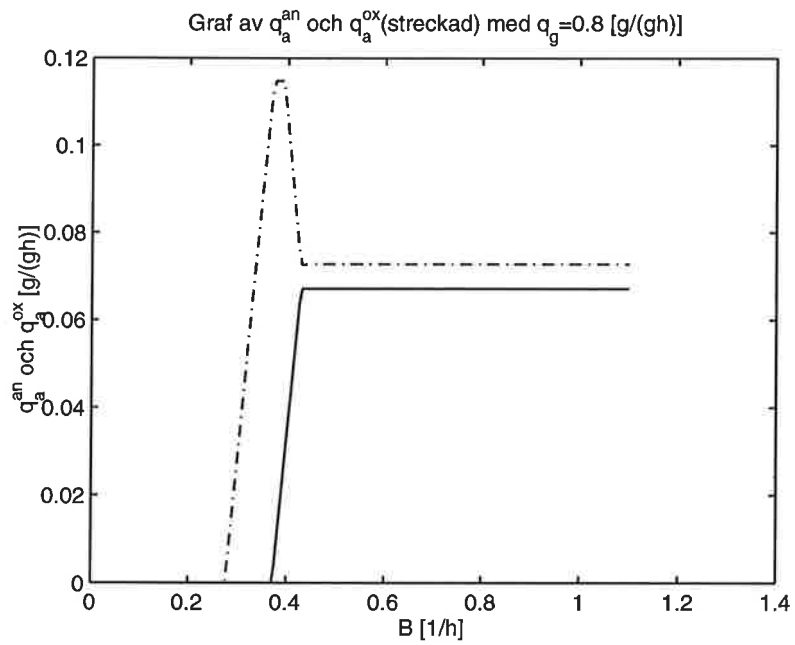


Figur 23 Graf över acetatproduktion (q_a^p)

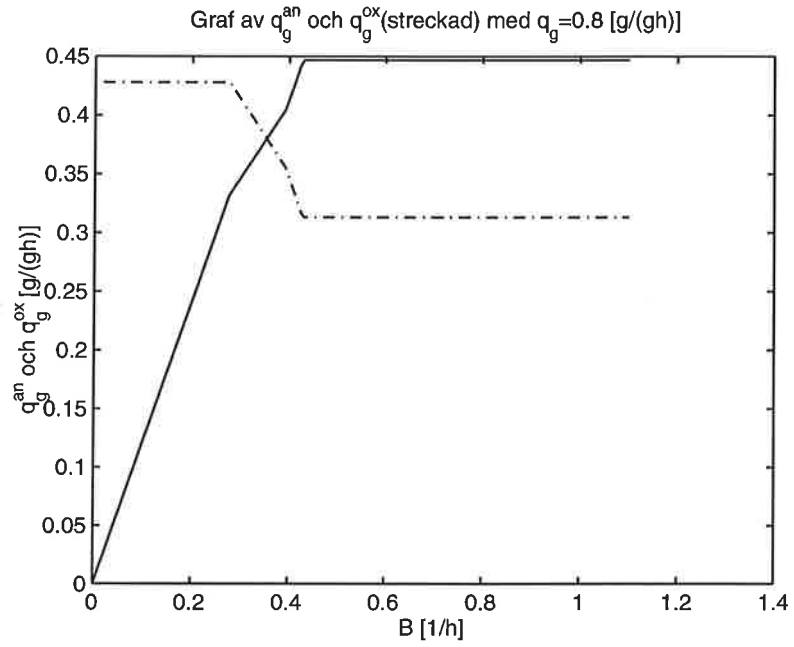
De båda ansatserna (heuristiska och optimeringsansatsen) är identiska med avseende på μ , q_o , q_a^c och q_a^p (se figur 20, 21, 22 och 23) men ej q_g^{an} , $q_g^{ox,en}$, $q_a^{c,an}$ och $q_a^{c,ox}$. Detta kan ses om figurer 24 jämförs med 26 och 25 med 27.



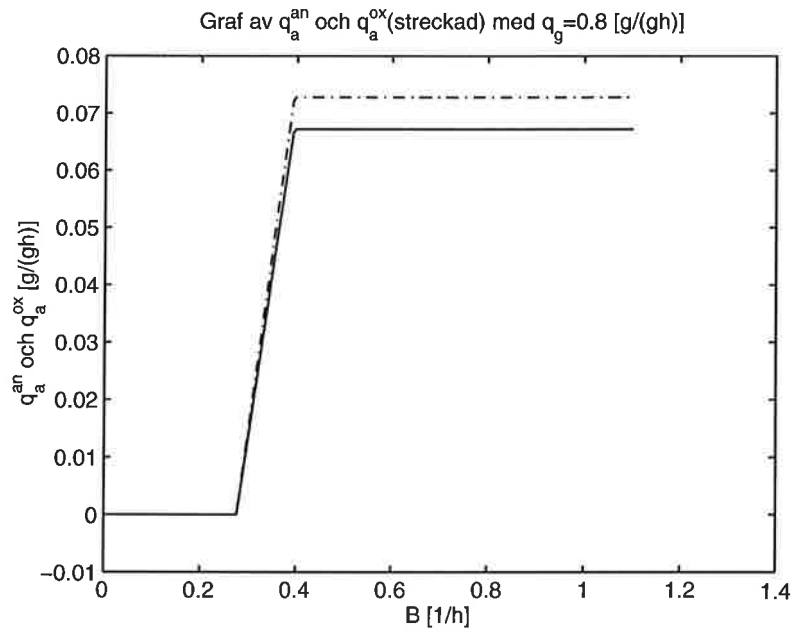
Figur 24 q_g^{an} och $q_g^{ox, en}$ med den heuristiska modellen



Figur 25 $q_a^{c, an}$ och $q_a^{c, ox}$ med den heuristiska modellen



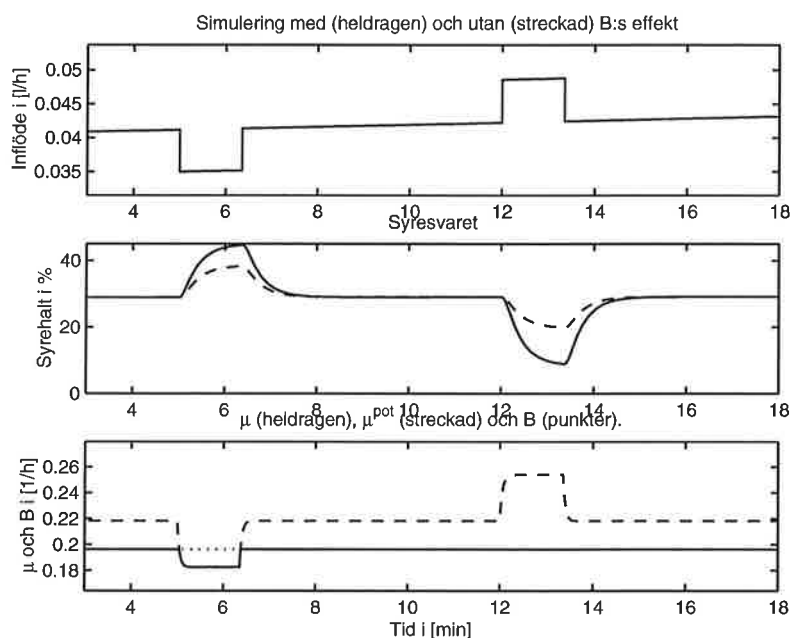
Figur 26 q_g^{an} och $q_g^{ox, en}$ med optimeringsansatsen



Figur 27 $q_a^{c, an}$ och $q_a^{c, ox}$ med optimeringsansatsen

Simulering av pulser

För att återknyta till gjorda observationer kommer nedan en jämförelse mellan modellerna utan och med begränsning av tillväxten. I figurer-



Figur 28 Begränsningens effekt vid pulssvar.

na 28, 29 och 30 visar simuleringar av pulssvar i en "fed-batch"-process. Begränsningen (B) är här under, på och över den potentiella tillväxten (μ^{pot}) då pulserna ej är aktiva.

I figurerna kan modeller med och utan momentan begränsning i tillväxten jämföras, där den senare modellen är ekvivalent med $\mu = \mu^{pot}$. En jämförelse mellan figur 16 och figurerna 28 till 30 visar likheter när det gäller asymmetriska pulssvar och amplituden hos pulssvaren.

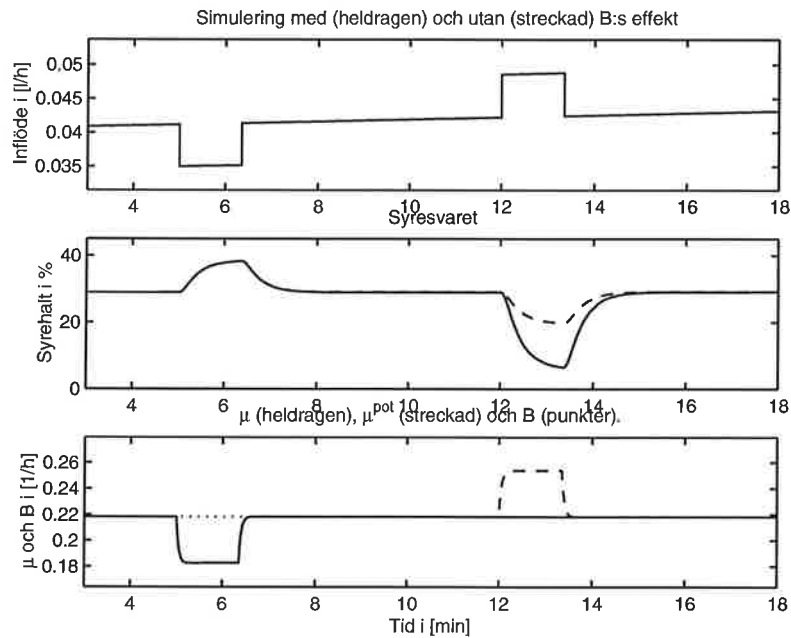
4.3 Begränsningens dynamik

Begränsningen (B) antas kunna ändras med tiden med en första ordningens modell, men med olika tidskonstanter. Detta är ett naturligt val ty en naturlig nedbrytning av de stora molekylerna är av första ordningen eftersom $\dot{B} \sim -B$. Om cellen minskar den begränsande faktorns inverkan, dvs. då $\dot{B} > 0$ så antar vi att \dot{B} är proportionellt mot B eftersom de stora molekylerna antas behövas även då de själva bildas. Försök indikerar att cellen kan göra en liten momentant tillväxtökning men ej en större efter en längre tids stabil tillväxt. Jämviktsläget för B antas vara $(1 + \kappa) \mu^{pot}$, där κ är ett positivt tal. Därför modelleras B -dynamiken som:

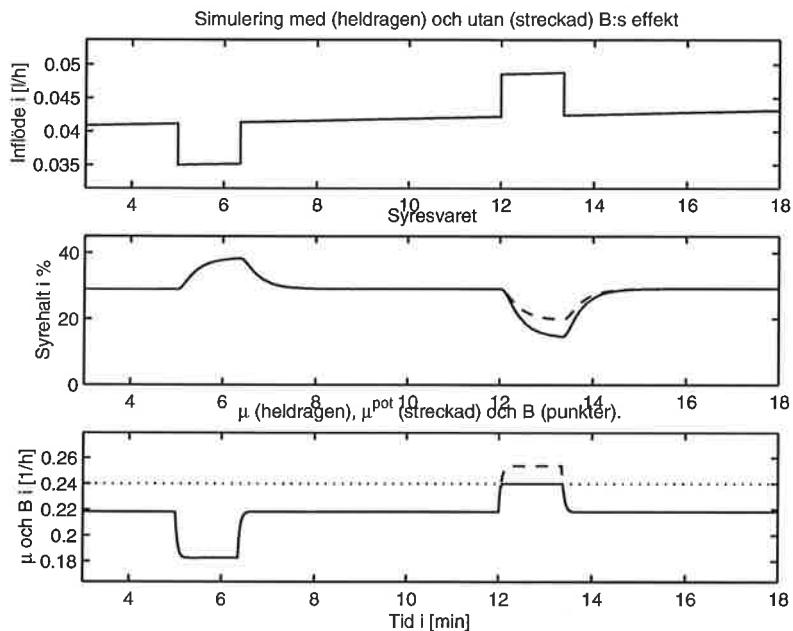
$$\tau_+ \dot{B} = (1 + \kappa) \mu^{pot} - B \quad , \mu^{pot} (1 + \kappa) > B \quad (33)$$

$$\tau_- \dot{B} = (1 + \kappa) \mu^{pot} - B \quad , \mu^{pot} (1 + \kappa) \leq B \quad (34)$$

Genom att titta på pulssvarens asymmetri kan en ungefärlig uppskattning av κ göras. Jag uppskattar från observationer av odlingar κ till ca 0.14 och τ_+ , τ_- till 50 respektive 80 minuter.



Figur 29 Begränsningens effekt vid pulssvar.

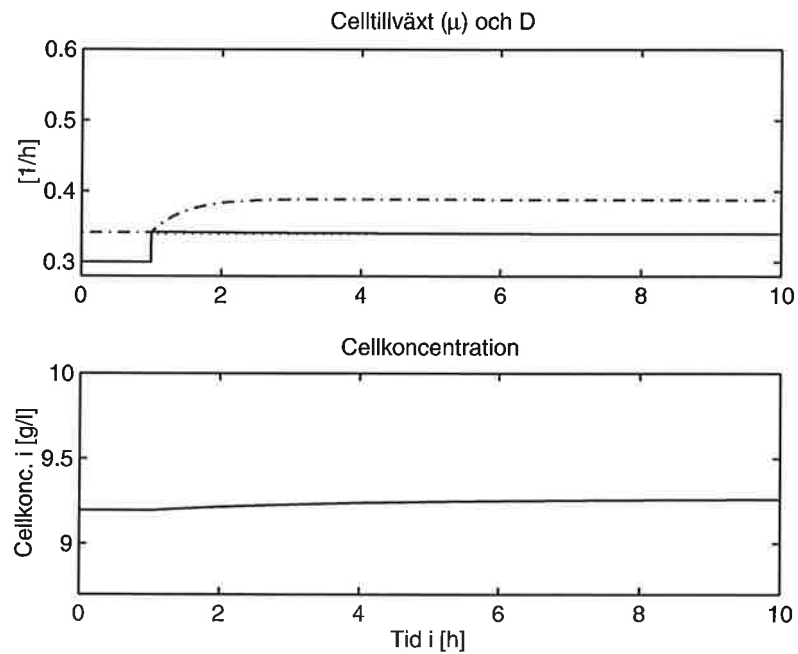


Figur 30 Begränsningens effekt vid pulssvar.

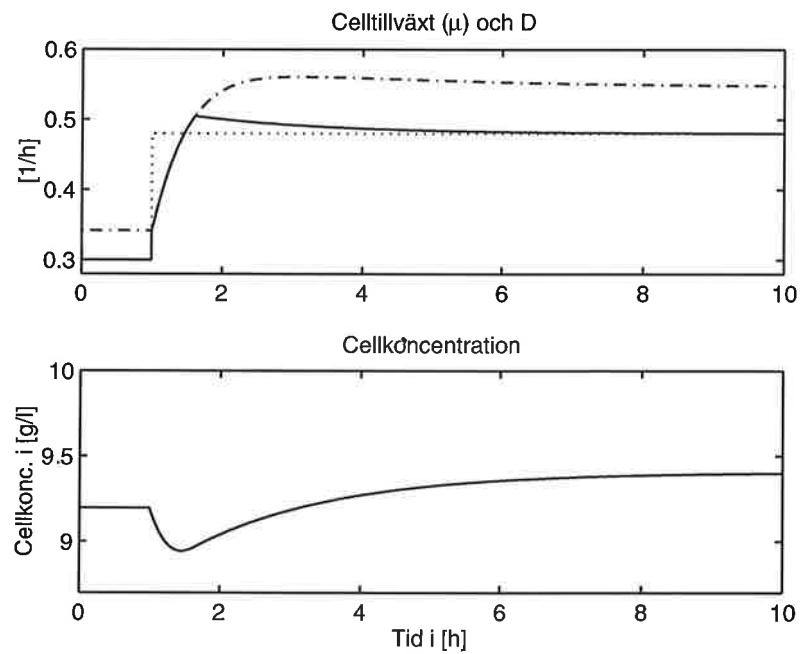
En jämförelse

Det går vid simulering av en kontinuerlig process hitta likheter med figur 18. Figur 31 och 32 visar simuleringar där flödet till processen ändras i ett steg. Den övre punktstreckade linjen är begränsningen (B), den streckade celltillväxten (μ) och prickade linjen motsvarar (D). Med ett modest steg kan flödet förutsägas med en modell som ej tar hänsyn till begränsningen. En sådan modell kommer tilldela tillväxten (μ) till (D) efter re-

lativt kort tid. Vid en stor stegändring är så dock ej fallet. Som tydligt framgår av figur 32 kommer cellmassan att minska i reaktorn innan den ökar, samt tillväxten (μ) är först mindre än D för att senare vara större än D . Samma observationer kan göras i figur 18.



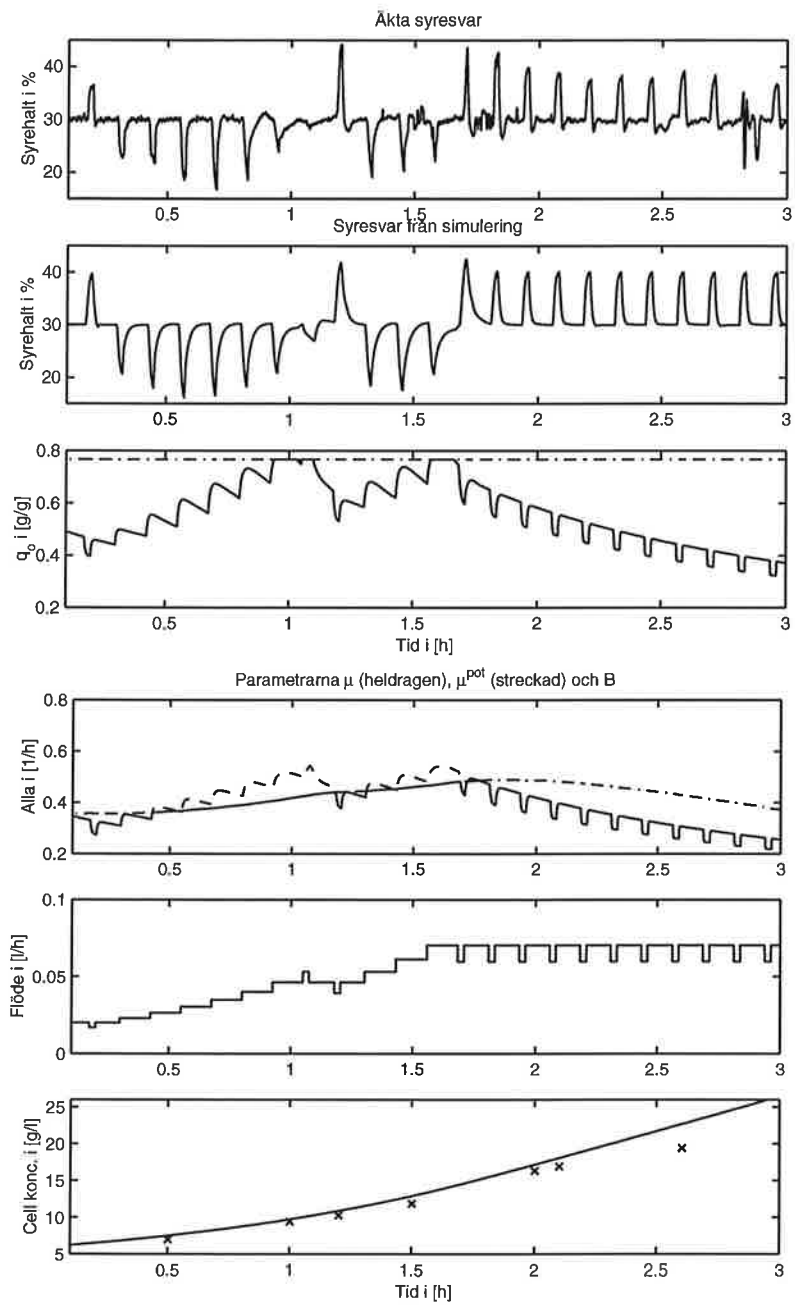
Figur 31 Liten flödesändring i kontinuerlig reaktor.



Figur 32 Stor flödesändring i kontinuerlig reaktor.

4.4 Simulering av en "fed-batch"-process

I figur 33 kan syresvaren jämföras med en riktig process med samma inflöde och cellkoncentration. Tydliga samband kan observeras under tiden 0.5 till 0.8 timmar då syresvarens amplitud är för stora, jämfört med modellen utan begränsad tillväxt, samt ökande. Under perioden 1.6 till 2.2 avtar syresvarens amplitud på ett sätt som ej är förenligt med en modell utan begränsad tillväxt. Under försöket växer biomassan inte bara på glukos utan även komplexa kolkällor, i simuleringen är hänsyn taget till detta och tillväxten adderas med 0.1 [1/h] för att få en överensstämmelse i cellmassan. I simuleringen är även andra parametrar, q_o^{max} , q_g^{max} och q_a^{max} anpassade för att få en bra överensstämmelse.



Figur 33 Exempel med för stora syresvar.

4.5 Förslag på verifiering

Det återstår många försök för att få ovanstående modell med begränsning i den momentana tillväxtsökningen bekräftad. Bland annat måste termerna κ , τ_+ och τ_- skattas.

Termen κ kan uppmätas genom att göra pulssvarexperiment i en "fed-batch"-process och med hjälp av syresvaret beräkna förhållandet mellan pulsstorlek och begränsningen (B), jämför med figur 28, 29 och 30. Man kan även tänka sig att κ kan uppmätas i en kontinuerlig process. Med hjälp av steg och tålamod kan då κ -termen ringas in.

I en kontinuerlig process kan κ -termen uppskattas vid ett kraftigt steg i inflödet, se simuleringen i figur 32, och tillväxten, cellmassan och utgaser mäts under försöket.

Det är svårt att bestämma termerna τ_+ och τ_- med god noggrannhet. För att bekräfta hypotesen kan ett stegsvarsexperiment i en kontinuerlig process kan halter av någon stor molekyl som är essentiell vid celltillväxt, tex. RNA, mätas vid olika tidpunkter efter stegförändringen i inflödet (F). Under försöket kan även tillväxten, cellmassan och utgaser mätas för att få en uppfattning om τ_+ .

Om de för tillväxten begränsande molekylerna är kända, kan ett nedstegsvarsexperiment genomföras i en kontinuerlig process. Då kan τ_- skattas.

5. Sammanfattning

De utökade modellerna, dvs med acetatkonsumtion kontra utan acetatkonsumtion samt med begränsad momentan tillväxtökning gentemot obegränsad momentan tillväxtökning, kan förklara fenomen som praktiskt kan uppträda vid cellodling. Med en acetatkonsumtions modell kan skiftningar hos brytpunkten förklaras, se figur 6, och syresvarets minskade amplitud, se figur 14. Man kan även förklara tendenser till pulsbreddning hos syresvaret, se figur 11.

Det går att förklara för stora nedåtpulser i syresvaret samt osymmetriska syresvar med hjälp av momentan begränsning i tillväxtsökningen, se figur 30 och 29. Denna modellen är i sin natur mycket enkel i förhållande till cellens alla komplicerade flödesvägar och många försök måste göras för att kunna acceptera modellen. Om modellen visar sig framgångsrik kan den vara till hjälp då nya reglerings strategier av processen ska tas fram.

Det finns modeller som tar hänsyn till ett dämpat glukosupptag då höga halter av acetat är närvarande. I alla figurer där effekten av höga koncentrationer av acetat finns illustrerade är för att göra effekterna av acetat mer tydliga.

A. Nomenklatur

A.1 Konstanter och flödesvariabler i cellen.

Variabler och konstanter relaterade till syreupptaget.

q_o	Specifikt syreupptaget i [g/(g h)].
q_o^g	Specifikt syreupptag som förbränner glukos i [g/(g h)].
q_o^a	Specifikt syreupptag som förbränner acetat i [g/(g h)].
q_o^{max}	Det maximala specifikt syreupptaget in till cellen i [g/(g h)].
Y_{og}^{ox}	Utbyte av syre med glukos i [g/g].
Y_{oa}	Utbyte av syre med acetat i [g/g].

Variabler och konstanter relaterade till glukosupptaget.

q_g	Specifikt glukosupptag i [g/(g h)].
q_g^{ox}	Specifikt oxidativ-glukosupptag i [g/(g h)].
$q_g^{ox,en}$	Specifikt oxidativ-glukosupptag till energimetabolism i [g/(g h)].
$q_g^{ox,an}$	Specifikt oxidativ-glukosupptag till anabolism i [g/(g h)].
q_g^{fe}	Specifikt fermentativ-glukosupptag i [g/(g h)].
$q_g^{fe,en}$	Specifikt fermentativ-glukosupptag till energi i [g/(g h)].
$q_g^{fe,an}$	Specifikt fermentativ-glukosupptag till anabolism i [g/(g h)].
q_g^{crit}	Specifikt glukosflöde som konsumerar q_o^{max} syreflödet i [g/(g h)].
K_g	Mättnadskonstant i Monod modellen i [g/l].
q_g^{max}	Maximalt specifikt glukosupptag i [g/(g h)].
Y_{xg}^{fe}	Utbyte av biomassa för glukos fermentativt i [g/g].
Y_{xg}^{ox}	Utbyte av biomassa för glukos oxidativt i [g/g].
Υ_{xg}^{ox}	Proportionalitetskonstant i oxidativ miljö i [g/g].
Υ_{xg}^{fe}	Proportionalitetskonstant i fermentativ miljö i [g/g].

Variabler och konstanter relaterade till acetatupptaget.

q_a	Specifikt acetatupptaget av cellen i [g/(g h)].
q_a^{pot}	Det maximala inflödet vid given acetatkoncentration i [g/(g h)].
q_a^p	Specifikt acetatproduktionen i cellen i [g/(g h)].
q_a^c	Specifikt acetatupptaget av cellen i [g/(g h)].
$q_a^{c,an}$	Specifikt acetatupptaget till anabolism i [g/(g h)].
$q_a^{c,en}$	Specifikt acetatupptaget till energi i [g/(g h)].
q_a^{max}	Maximalt specifikt acetatupptag i [g/(g h)].
K_a	Mättnadskonstant i Monod modellen i [g/l].
Y_{xa}	Utbyte av biomassa för acetat i [g/g].
Υ_{xa}	konstant mellan tillväxt och acetat i [g/g].

Variabler och konstanter relaterade till tillväxten.

μ	Tillväxt i [1/h].
μ^{pot}	Tillväxten utan begränsning i [1/h].
B	Begränsningen av tillväxten i [1/h].

A.2 Övriga konstanter

μ	Specifik tillväxthastighet i [1/h]
C_x	Kolflöde som omvandlas till biomassa [mol C/g].
C_g	Kol som avges av glukosen [mol C/g].
C_a	Kol som avges av acetatet [mol C/g].

A.3 Övriga variabler

A	Acetatkoncentrationen i bioreaktorn i [g/l].
G	Glukoskoncentrationen i bioreaktorn i [g/l].
O	Syrekoncentrationen i bioreaktorn i [%]
X	Cellkoncentrationen i bioreaktorn i [g/l].
V	Volymen i bioreaktorn i [l].
G_{in}	Glukoskoncentrationen i inflödet till bioreaktorn i [g/l].
F	Inflödet till bioreaktorn i [l/h].
H	Konstant i [1%/g].
O_{stj}	Mättad syrekoncentration i [%].
N	Varvtalet i [varv/min].

A.4 Värdet på konstanter

Beteckning	Värde	Enhet
Y_{og}^{ox}	1.067	[g/g].
Y_{oa}	1.067	[g/g].
Y_{xg}^{ox}	0.49	[g/g].
Y_{xg}^{fe}	0.15	[g/g].
Y_{xa}^{ox}	0.4	[g/g].
C_x	1/30	[molC/g].
C_g	1/30	[molC/g].
C_a	0.04	[molC/g].
K_g	0.01	[g/l].
K_a	0.05	[g/l].
q_m	0.04	[g/(gh)].
H	14000	[1%/g].

	Beteckning	figur 33	övriga	enhet
I figur 33 skiljer följande värden.	q_g^{max}	1.34	1.40	[g/(gh)].
	q_a^{max}	0.17	0.14	[g/(gh)].
	q_o^{max}	0.57	0.77	[g/(gh)].

γ_{xg}^{ox} , γ_{xg}^{fe} och γ_{xa}^{ox} ges av.

$$\gamma_{xg}^{ox} = Y_{xg}^{ox} \frac{C_x}{C_g}$$

$$\gamma_{xg}^{fe} = Y_{xg}^{fe} \frac{C_x}{C_g}$$

$$\gamma_{xa}^{ox} = Y_{xa}^{ox} \frac{C_x}{C_a}$$

B. Modell med begränsning

Här presenteras en algoritm för bestämning av μ , q_o , q_a^c och q_a^p . Inparametrarna är q_g , q_a^{pot} och B . Här är hjälpparametrarna $\Theta = \frac{C_g}{C_x}$, $\Delta = \frac{C_a}{C_x}$, $\alpha = \frac{\gamma_{xg}^{ox}}{1-\gamma_{xg}^{ox}}$, $\beta = \frac{\gamma_{xg}^{fe}}{1-\gamma_{xg}^{fe}}$ och $\gamma = \frac{\gamma_{xa}^{ox}}{1-\gamma_{xa}^{ox}}$. Se figur 19

Observera att acetatproduktion kan ske då $q_g \leq q_g^{crit}$ i nedanstående modell. Ytterligare två hjälpparametrar:

$$\begin{aligned}\mu_g^{pot} &= \Theta (\alpha \min(q_g^{crit} - q_m, q_g - q_m) (1 - \gamma_{xg}^{ox}) + \beta \max(0, q_g - q_g^{crit}) (1 - \gamma_{xg}^{fe})) \\ \mu_a^{pot} &= \Delta \gamma \min(q_a^{pot} (1 - \gamma_{xa}^{ox}), \max(0, \frac{q_o^{max} - Y_{og} ((q_g - q_m) (1 - \gamma_{xg}^{ox}) + q_m)}{Y_{oa}}))\end{aligned}$$

Endast ett av följande kommer inträffa **A1**, **A2**, **A3**, **B1**, **C1**, **C2**, **D1** eller **E1**, där dessa beskriver olika utfall av q_g^{an} , $q_a^{c,an}$, q_g^{fe} , $q_g^{ox,en}$ och $q_a^{c,en}$.
IF $B \leq \mu_g^{pot}$

Här testas om tillväxten på glukos är begränsad. Om så är fallet kan vi hamna i **A1**, **A2** eller **A3** och q_g^{an} samt $q_a^{c,an}$ är givet. I **A1** är vi i fall **IV** med acetatproduktion. **A2** är fall **IV** med viss acetatkonsumtion och i **A3** är vi i fall **III** med acetatkonsumtion ($q_a^c = q_a^{pot}$).

$$\begin{aligned}q_g^{an} &= \frac{B}{\Theta} \\ q_a^{c,an} &= 0\end{aligned}$$

$$\mathbf{IF} \ q_o^{max} \leq q_m Y_{og} + (q_g - q_m - q_g^{an}) Y_{og}$$

A1

$$\begin{aligned}q_g^{ox,en} &= (q_g^{crit} - q_m) (1 - \gamma_{xg}^{ox}) \\ q_g^{fe} &= q_g - q_m - q_g^{ox,en} - q_g^{an} \\ q_a^{c,en} &= 0\end{aligned}$$

$$\mathbf{ELSEIF} \ q_o^{max} \leq q_m Y_{og} + (q_g - q_m - q_g^{an}) Y_{og} + q_a^{pot} Y_{oa}$$

A2

$$\begin{aligned}q_g^{ox,en} &= q_g - q_g^{an} - q_m \\ q_g^{fe} &= 0 \\ q_a^{c,en} &= \frac{(q_o^{max} - Y_{og} (q_m + q_g^{ox,en}))}{Y_{oa}}\end{aligned}$$

ELSE

A3

$$q_g^{ox,en} = q_g - q_g^{an} - q_m$$

$$q_g^{fe} = 0$$

$$q_a^{c,en} = q_a^{pot}$$

END

ELSEIF $q_g > q_g^{crit}$

Här är $B > \mu_g^{pot}$ men glukosen kan ensam mätta andningen och fall **II** kan inträffa, då ger olikheten $q_g > q_g^{crit}$ svaret.

B1

$$q_g^{ox,en} = (q_g^{crit} - q_m) (1 - \Upsilon_{xg}^{ox})$$

$$q_g^{fe} = (q_g - q_g^{crit}) (1 - \Upsilon_{xg}^{fe})$$

$$q_g^{an} = q_g - q_m - q_g^{ox,en} - q_g^{fe}$$

$$q_a^{c,an} = 0$$

$$q_a^{c,en} = 0$$

ELSEIF $B \leq \mu_g^{pot} + \mu_a^{pot}$

Glukos och acetat kan göra så att fall **IV** eller **III** uppkommer. Villkoret i nedanstående **IF**-sats ger om andningen är mättad eller ej, vilket leder till **C1** respektive **C2** tillsammans med villkoret $B < \mu_g^{pot} + \mu_a^{pot}$.

$$q_g^{ox,en} = (q_g - q_m) (1 - \Upsilon_{xg}^{ox})$$

$$q_g^{an} = q_g - q_m - q_g^{ox,en}$$

$$q_g^{fe} = 0$$

$$q_a^{c,an} = \frac{B - \mu_g^{pot}}{\Delta}$$

$$\mathbf{IF} \ q_o^{max} \leq (q_g^{ox,en} + q_m) Y_{og} + Y_{oa} \max(q_a^{pot} (1 - \Upsilon_{xa}^{ox}), (q_a^{pot} - \frac{B - \mu_g^{pot}}{\Delta}))$$

C1

$$q_a^{c,en} = \frac{q_o^{max} - q_g^{ox,en} Y_{og} - q_m Y_{og}}{Y_{oa}}$$

ELSE

C2

$$q_a^{c,en} = q_a^{pot} - q_a^{c,an}$$

END

Här är $B > \mu^{pot}$ samt $q_g \leq q_g^{crit}$ och endast fallen **I** och **II** kan tänkas.

ELSEIF $q_o^{max} \leq (q_m + (q_g - q_m)(1 - \Upsilon_{xg}^{ox})) Y_{og} + q_a^{pot} (1 - \Upsilon_{xa}^{ox}) Y_{oa}$
Om glukos och acetat mättar andningen gäller **D1**.

D1

$$\begin{aligned} q_g^{ox,en} &= (q_g - q_m)(1 - \Upsilon_{xg}^{ox}) \\ q_g^{an} &= q_g - q_m - q_g^{ox,en} \\ q_g^{fe} &= 0 \\ q_a^{c,en} &= \frac{q_o^{max} - (q_g^{ox,en} + q_m) Y_{og}}{Y_{oa}} \\ q_a^{c,an} &= \gamma q_a^{c,en} \end{aligned}$$

ELSE

I övrigt så måste **E1** inträffa då det varken finns någon begränsning i tillväxten eller den respiratoriska kapaciteten.

E1

$$\begin{aligned} q_g^{ox,en} &= (q_g - q_m)(1 - \Upsilon_{xg}^{ox}) \\ q_g^{an} &= q_g - q_m - q_g^{ox,en} \\ q_g^{fe} &= 0 \\ q_a^{c,en} &= q_a^{pot} (1 - \Upsilon_{xa}^{ox}) \\ q_a^{c,an} &= q_a^{pot} - q_a^{c,en} \end{aligned}$$

END

Nu kan parametrarna μ , q_a^p , q_a^c och q_o bestämmas.

$$\begin{aligned} \mu &= q_g^{an} \Theta + q_a^{c,an} \Delta \\ q_a^p &= q_g^{fe} Y_{ag} \\ q_o &= q_g^{ox,en} Y_{og} + q_a^{c,en} Y_{oa} + q_m Y_{og} \\ q_a^c &= q_a^{c,an} + q_a^{c,en} \end{aligned}$$

- [1] Bo Xu, Mehmedalija Jahic, Sven-Olof Enfors (1999): *Modeling of Over-Flow Metabolism in Batch and Fed-Batch Cultures of Escherichia coli*. **Biotechnology Progress**, **15** sid 81-90
- [2] Mats Åkesson (March 1998): *A Probing Strategy for Substrate Feeding in Escherichia coli Cultivations*. **Licentiate Thesis ISRN LUTFD2/TFRT-3220-SE, Department of Automatic Control, Lund Institute of Technology, Lund, Sweden.**
- [3] T. Paalme and R. Elken and A. Kahru and K. Vanatalu and R. Vilu (1997) : *The growth rate control in Escherichia coli at near to maximum growth rates: the A-stat approach*" **Antonie van Leeuwenhoek**, **71** sid 217-230
- [4] Reiling, H. E., H. Laurila, and A. Fiechter (1985): "Mass culture of *Escherichia coli*: medium development for low and high density cultivation of *Escherichia coli* B/r in minimal and complex media" **Journal of Biotechnology**, **2** sid 191-206
- [5] Mateles R. I., D. Y. Ryu, T. Yasuda (1965): *Measurement of unsteady state growth rates of micro-organisms*" **Nature**, **208** sid 263-265
- [6] Andersen, K. and K. von Meyenburg (1980): "Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration?", **Journal of Bacteriology**, **144** sid 114-123.