LUND UNIVERSITY

Simuleringar och analys av V. Cholerae odling där feeden styrs genom återkoppling från ättiksyramätningar

de Maré, Lena; Hagander, Per

2002

Document Version:
Förlagets slutgiltiga version

Link to publication

Citation for published version (APA):
de Maré, L., & Hagander, P. (2002). *Simuleringar och analys av V. Cholerae odling där feeden styrs genom återkoppling från ättiksyramätningar*. (Technical Reports TFRT-7600). Department of Automatic Control, Lund Institute of Technology (LTH).

Total number of authors:
2

General rights
Unless other specific re-use rights are stated the following general rights apply:
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.
• Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
• You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
• You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Read more about Creative commons licenses: https://creativecommons.org/licenses/

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

LUND UNIVERSITY

PO Box 117
221 00 Lund
+46 46-222 00 00

Simuleringar och analys av *V. cholerae* odling där feeden styrs genom återkoppling från ättiksyramätningar

Lena de Maré

26 mars 2002

Bakgrund

På Linköpings tekniska högskola har man tillgång till många olika sätt att mäta ättiksyra i en bioreaktor. Utrustningen för att mäta ättiksyra består av en NIR (near infrared spectroscopy) som mäter online och en samplingstid på sekund nivå kan uppnås. HPLC (high-performance liquid chromatography) finns det också tillgång till. Där räknar man med att ta prover var 15 min och att själva analysen tar ca 15 min. Näsan kan också användas och där räknar man med en samplingshastighet på 15 min men med att själva analysen sedan tar någon minut. Målet med denna rapport är att undersöka genom simuleringar hur det skulle fungera att styra feeden in till reaktorn med återkoppling från ättiksyra genom mätningar på de tre ovan nämda sätten. Robusthet mot störningar och även systemets stabilitet har undersökts. Det verkar som att det går bra att använda ättiksyramätningarna för att reglera feeden. Enligt simuleringar fungerar en enkel P regulator väl i fallet med NIR om inte mätbruset är stort. I så fall krävs en PI regulator. Då HPLC eller näsan används ser det ut att räcka med en PI regulator, troligen behövs även reglering med en profil.

Resultat

Simuleringar i Simulink med återkoppling från styrning av feeden från ättiksyra mätningar visas nedan. Modellen över bioreaktorn som använts består av ekvationerna nedan. Massbalanser över reaktorn ger

$$\frac{dV}{dt} = F$$

$$\frac{d(VG)}{dt} = FG_{in} - q_g(G)VX$$

$$\frac{d(VA)}{dt} = q_a(G,A)VX$$
$$\frac{d(VX)}{dt} = \mu(G,A)VX$$
$$\frac{dVC_o}{dt} = K_l a(N)V(C_o^* - C_o) - q_o(G,A)VX$$

Henrys lag ger

$$O = HC_o$$

Upptagsmekanismen för acetat modelleras med Monod kinetik och det potentiella upptaget beskrivs med

$$q_a^{c,pot} = q_a^{c,max}\frac{A}{k_a + A}$$

Det specifika glukosupptaget modelleras också med Monod kinetik

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

En del av glukosupptaget behövs för maintenance:

$$q_m = min(q_g, q_{mc})$$

Acetatproduktionen beskrivs med

$$q_a = q_a^p - q_a^c$$

där q_a^p är ättiksyraproduktionen och q_a^c är ättiksyrakonsumtionen. Om $q_g < q_g^{crit}$ gäller att

$$q_a^p = 0$$
$$q_a^c = min(q_a^{c,pot}, (q_o^{max} - (q_g - q_m)Y_{og} - q_m Y_{om})/Y_{oa})$$
$$q_o = (q_g - q_m)Y_{og} + q_m Y_{om} + q_a^c Y_{oa}$$
$$\mu = (q_g - q_m)Y_{xg}^{ox} + q_a^c Y_{xa}$$

Motsvarande ekvationer då $q_g > q_g^{crit}$ är

$$q_a^p = (q_g - q_g^{crit})Y_{ag}$$
$$q_a^c = 0$$
$$q_o = q_o^{max} = (q_g^{crit} - q_m)Y_{og} + q_m Y_{om}$$
$$\mu = (q_g^{crit} - q_m)Y_{xg}^{ox} + (q_g - q_g^{crit})Y_{xg}^{fe}$$

Ekvationerna är tagna ur [1]. Värdena på konstanterna under simuleringarna finns i tabell 1 och kommer från [1] och [2]. Det lösta syret antas regleras med omröraren med hjälp av en PI regulator och börvärdet på löst syre i reaktorn är satt till 30 %. Referensvärdet i ättiksyra A_r är satt till 0.2 g/l.

Initialvärdet för ättiksyra koncentrationen är satt till 1.5 g/l i simuleringarna, vilket ska motsvara någon mängd som produceras under batchfasen. Initialvärdet för feeden är satt till 0.016 l/h, omrörarens startvärde är satt till 300 RPM och bioreaktorns volym till 4 l och den initiala cellmassan efter batchfasen antas vara 4 g/l. Konstant acetatkonsumtion leder till att $q_g = q_g^{crit}$, vilket med konstanterna i tabell 1 motsvarar en glukoskoncentration $G = G^{crit} = 0.017 g/l$.

Near Infrared Spectroscopy

Här antas en samplingstid på 5 s och att ingen tidsfördröjning sker. En P regulator används och i det här fallet är K = 1 $\frac{liter_{feed}\ liter_{reaktormedie}}{timme\ gram_{acetat}}$. Simulering av systemet visas i figur 1.

High Performance Liquid Chromatography

Här antas en samplingstid på 15 min och en tidsfördröjning på 15 min. En stor sänkning i regulatorns förstärkning var tvungen för att behålla stabiliteten. Detta medförde ett stort stationärt fel och då detta inte är acceptabelt infördes en I del i regulatorn. Följande parameterar användes: K = 0.06 $\frac{liter_{feed}\ liter_{reaktormedie}}{timme\ gram_{acetat}}$ och $I = Kh/T_i = 0.013$. Simuleringen av systemet visas i figur 2.

Näsan

Här antas en samplingstid på 15 min, men utan någon tidsfördröjning. Parametrarna i PI regulatorn är de samma som i fallet ovan. Simulering visas i figur 3.

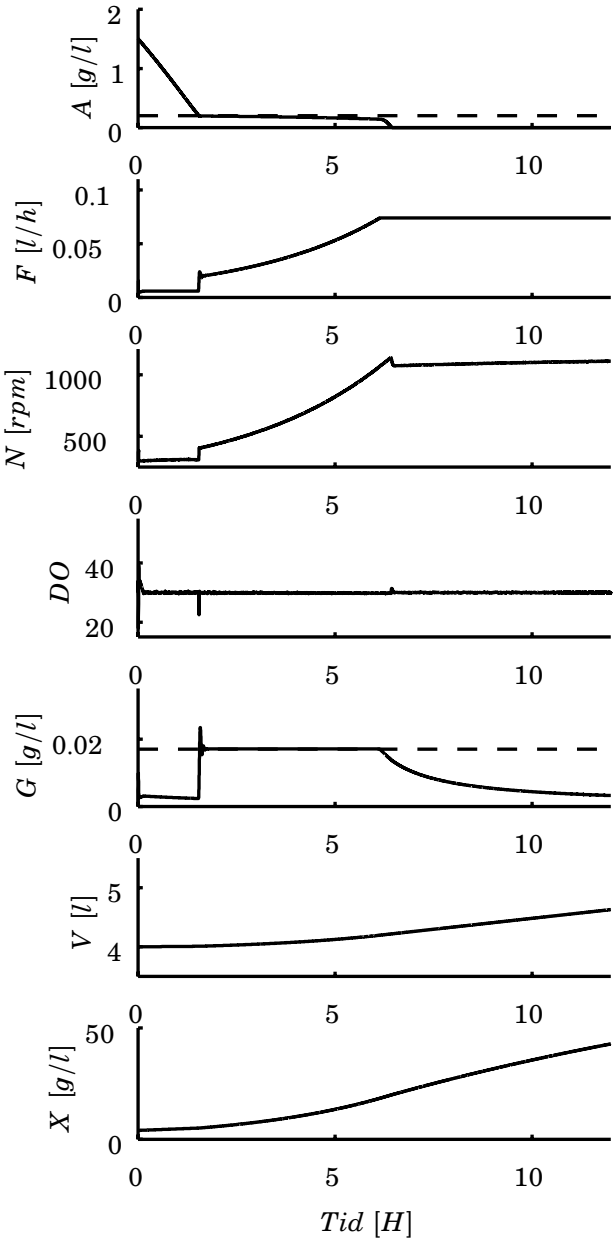
Säkerhetsnät

I simuleringarna finns det säkerhetsnät inlagda för att undvika anaeroba betingelser genom att feeden ändras. Det finns också säkerhetsnät för att undvika att feeden blir alltför låg.

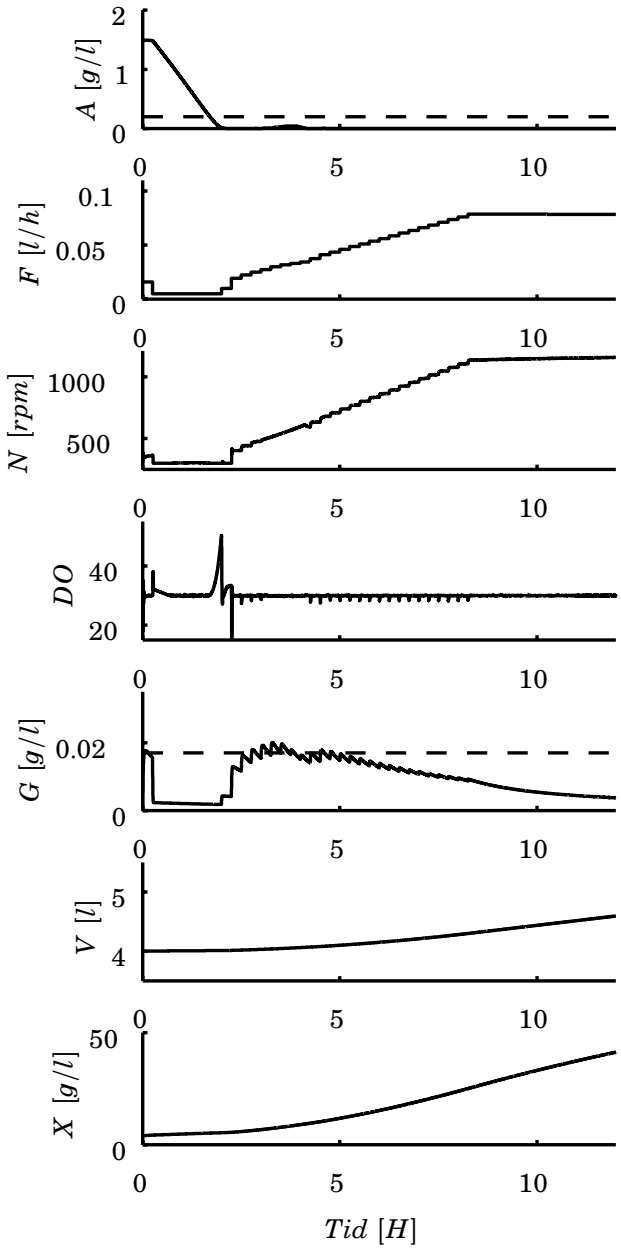
Stabilitetsanalys

Systemets ekvationer linjäriserades runt en arbetspunkt som betecknas med ^{o} för en inledande stabilitetsanalys. Värdena på V^o och X^o som använts finns i tabell 1 och $q_g^o = q_g^{crit}$. Bioreaktornsvolym och antalet celler antogs vara konstanta i förhållande till resterande dynamik. Överföringsfunktionen från F till A fås ur:

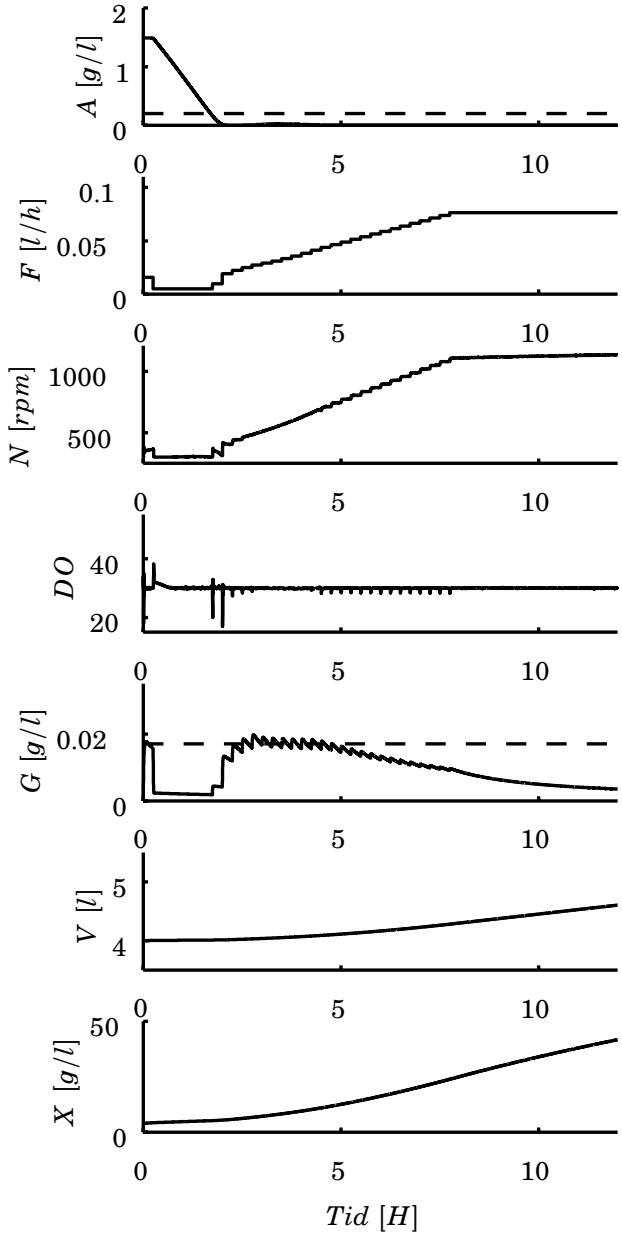
$$\Delta q_g(s) = \frac{K_g}{T_g s + 1} \Delta F(s)$$



Figur 1: Simulering med samplingstiden h = 5 s och en P regulator med förstärkningen 1 $\frac{liter_{feed}\ liter_{reaktormedie}}{timme\ gram_{acetat}}$ användes för återkoppling av flödet och ättiksyran mätningarna. A är ättiksyra koncentrationen, F är feeden, N är omrörarhastigheten, DO är löst syre, G är glukoskoncentrationen i reaktorn, V är volymen i bioreaktorn, X är cellkoncentrationen. Referensvärdet för ättiksyran och G^{crit} är utsatta streckade.



Figur 2: Simulering av systemet med samplingstiden h = 15 min och en 15 min fördröjning. En PI regulator användes där K var 0.06 $\frac{liter_{feed}\ liter_{reaktormedie}}{timme\ gram_{acetat}}$ och $Kh/T_i = 0.013$. A är ättiksyra koncentrationen, F är feeden, N är omrörarhastigheten, DO är löst syre, G är glukoskoncentrationen i reaktorn, V är volymen i bioreaktorn, X är cellkoncentrationen. Referensvärdet för ättiksyran och G^{crit} är utsatta streckade.



Figur 3: Simulering av systemet med samplingstiden h = 15 min, men utan fördröjning. En PI regulator användes där K var 0.06 $\frac{liter_{feed}\ liter_{reaktormedie}}{timme\ gram_{acetat}}$ och $Kh/T_i = 0.013$. A är ättiksyra koncentrationen, F är feeden, N är omrörarhastigheten, DO är löst syre, G är glukoskoncentrationen i reaktorn, V är volymen i bioreaktorn, X är cellkoncentrationen. Referensvärdet för ättiksyran och G^{crit} är utsatta streckade.

$$\Delta A(s) = \frac{K_a}{s}\Delta q_g(s)$$

Där

$$K_g = \frac{G_{in}}{V^o X^o} \approx 17 \ \frac{g_{glukos}}{l_{feed} \ g_{celler}}$$

$$T_g = (\frac{\delta q_g}{\delta G} X)^{-1} = \frac{k_s}{X^o(q_g^{max} - q_g^o)}(1 + \frac{q_g^o}{q_g^{max} - q_g^o}) \approx 26 \ s$$

$$K_a = \frac{Y_{og} X^o}{Y_{oa}} \approx 9 \ \frac{g_{acetat} \ g_{celler}}{g_{glukos} \ l_{reaktormedie}}$$

Detta gäller om $q_{mc} < q_g < q_g^{crit}$ och om $q_a^{pot} > \frac{q_o^{max} - (q_g - q_m)Y_{og} - q_m Y_{om}}{Y_{oa}}$.

Om vi antar att vi befinner oss i detta område och att glukos dynamiken är försumbar dvs att $T_g = 0$, blir det samplade systemet med zero - order - hold:

$$\Delta A(q) = \frac{hK_aK_g}{q-1}\Delta F(q)$$

Med en proportionell återkoppling

$$\Delta F(k) = K(A_r - \Delta A(k))$$

blir stabilitetskravet att $K < \frac{2}{hK_aK_g}$. Alltså ska K väljas mindre än 10 då samplingstiden är 5 s och K ska väljas mindre än 0.05 då samplingstiden är 15 min. Om glukosdynamiken inte försummas ges överföringsfunktionen av

$$\Delta A(q) = \frac{(q - \phi_{22})\gamma_1 + \phi_{12}\gamma_2}{(q-1)(q-\phi_{22})}\Delta F(q)$$

där

$$\phi_{22} = e^{-h/T_g}$$

$$\phi_{12} = K_a T_g (1 - e^{-h/T_g})$$

$$\gamma_1 = K_a K_g (h + T_g e^{-h/Tg} - T_g)$$

$$\gamma_2 = K_g (1 - e^{-h/T_g})$$

Med dessa beräkningar ska K väljas till mindre än 10 då h = 5 s och K ska väljas till mindre än 0.06 då h = 15 min.

Med PI reglering ändras förhållandena något och

$$\Delta F(q) = K(1 + \frac{h}{T_i(q-1)})\Delta A(q)$$

Om vi också denna gång börjar med fallet att vi approximerar bort glukosdynamiken ska K < 0.05 för att systemet fortfarande ska vara stabilt då $T_i > 0.13$ timmar och samplingstiden är 15 min. Om istället glukosdynamiken tas med i beräkningarna blir motsvarande resultat att K < 0.06 då $T_i > 0.15$ timmar. Vi ser alltså att det går bra att approximera bort glukosdynamiken för att få en uppskattning av valet på parametrar. Observera att dessa värden bara säger något om när systemet är stabilt, för en bra reglering ligger gränserna snävare.

Om $q_g > q_g^{crit}$ gäller istället att $K_a = Y_{ag}X^o \approx 5.5 \frac{g_{acetat}\ g_{celler}}{g_{glukos}\ l_{reaktormedie}}$. Att förstärkningen i systemet nästan halveras då $q_g > q_g^{crit}$ gör att det valda värdet på K = 0.06 i simuleringarna i figurerna 2 och 3 fungerar bra även om systemet ligger nära stabilitetsgränsen enligt analysen ovan.
Om $q_a^{pot} < \frac{q_{omax}-(q_g-q_m)Y_{og}-q_mY_{om}}{Y_{oa}}$ ändras den närvarande ättiksyra koncentrationen genom konsumtion enligt

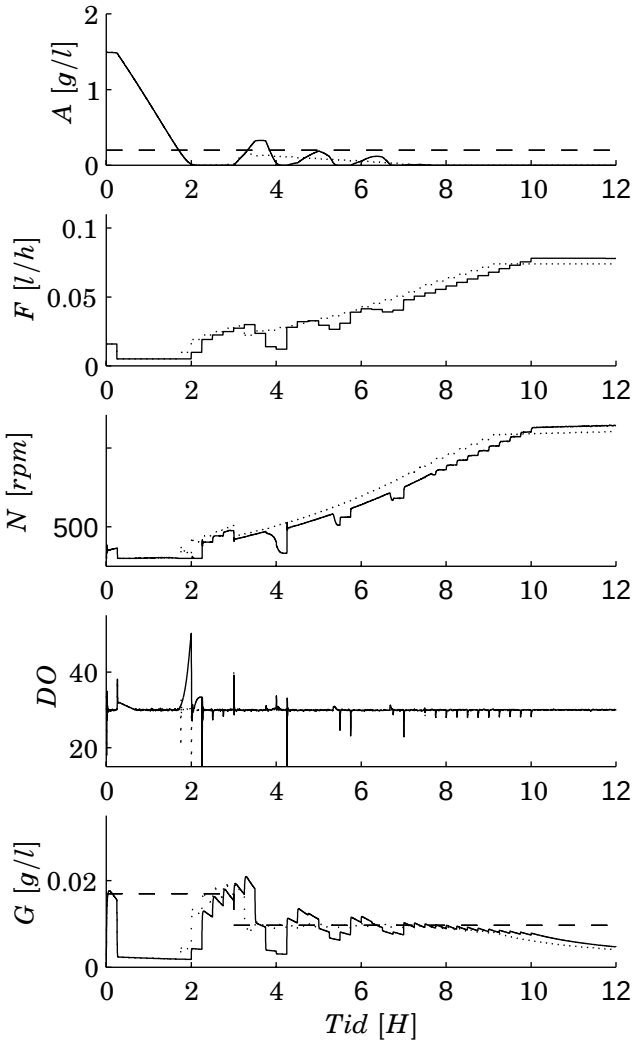
$$\frac{dA}{dt} = -q_{acmax}\frac{A}{k_a + A}$$

Robusthet mot störningar

För att simulera störningar i processen ansattes en stegstörning i q_g^{crit} som minskades med 22 %. Resultaten visas i figur 4. Samplingstiden för de två systemen som visas i figuren är 15 min. Det ena systemet har 15 min tidsfördröjning för att simulera HPLC mätningar medan det andra systemet simulerar näsan utan tidsfördröjningar. Samma PI regulator som tidigare har använts d.v.s. K = 0.06 och $Kh/T_i = 0.013$. Som synes inträffar störningen vid t = 3 H och ger upphov till lite oscilleringar som dör ut. Systemet utan tidsfördröjning klarar störningen bättre.

Effekter av mätbrus

I simuleringar är det tydligt att det är NIR som är mest känslig för mätbrus. Ett exempel där mätbruset simulerades med standardavikelsen $\sigma = 0.003$ g/l visas i figur 5. Styrsignalen, feeden, blir för brusig och därmed påverkas glukoskoncentrationen. I figur 6 visas en förstoring av de brusiga acetatmätningarna och den resulterande feeden. För att minska känsligheten för mätbrus kan P regulatorn bytas ut till en PI regulator med samma K som i fallen med HPLC och näsan. Däremot fick I delen ändras till $Kh/T_i = 0.0002$ för att behålla stabiliteten. Systemet är nu mycket mindre bruskänsligt då dess förstärkning har sänkts rejält. Systemet klarar nu av mätbrus med standardavikelse $\sigma = 0.03$ g/l, se figur 7 och förstoringen i figur 8. Vid jämförelse mellan figur 6 med figur 8 ser man att feeden är mindre påverkad av mätbruset med standardavikelse på 0.03 g/l då PI reglering används än av mätbruset med standardavikelse 0.003 g/l då P reglering sker. (Notera skillnaden i skalan mellan de brusiga ättiksyramätningarna). Fortfarande



Figur 4: Simulering av systemet med en minskning av q_g^{crit} med 22 % vid t = 3H. Motsvarande kritiska glukoskoncentration visas streckad i grafen längst ner. Heldraget visar systemet med tidsfördröjning och den streckade linjen visar systemet utan tidsfördröjning. I båda fallen är samplingstiden 15 min. En PI regulator användes där K var 0.06 och $Kh/T_i = 0.013$ i båda fallen. Referensvärdet för ättiksyran är utsatt streckad i grafen längst upp.

är dock NIR mest känslig för mätbrus då de tätare mätningarna resulterar i en brusigare styrsignal, jämför figur 7 med figur 9, där en simulering av HPLC visas med samma mätbrus. Om det visar sig att mätbruset är mycket störande i praktiken kan exempelvis mätsignalen filtreras.

Diskussion

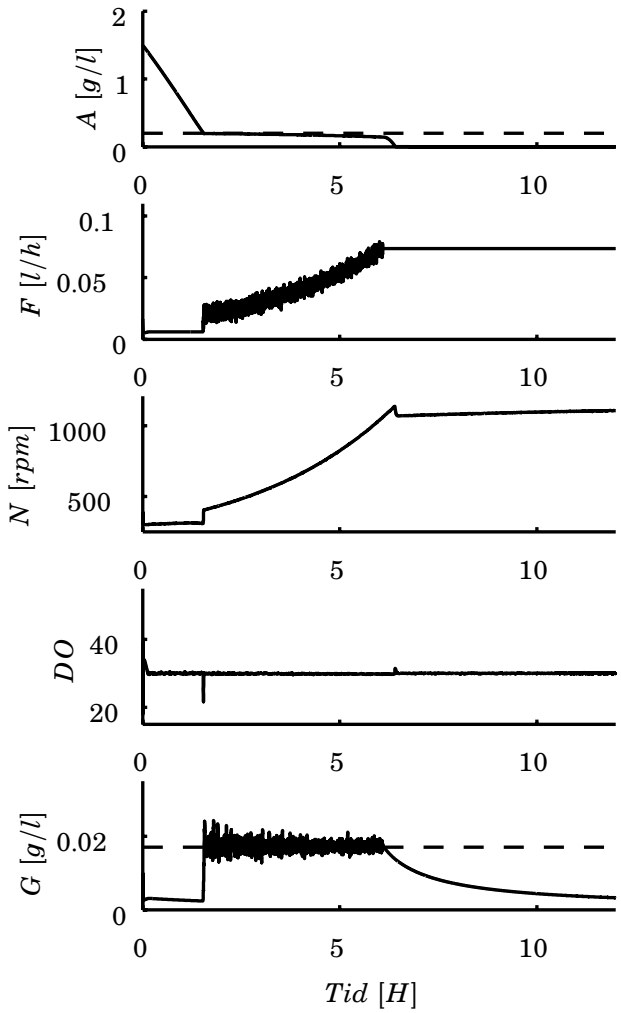
Det verkar som att det går bra att använda ättiksyramätningarna för att reglera feeden. Om NIR används fungerar en enkel P regulator med hög förstärkning bra om mätbruset inte är för stort. I så fall får en PI regulator användas istället. Då mätningarna sker glesare som ifallet vid användning av HPLC och näsan verkar en PI regulator fungera tillfredställande, jämför i figur 10. Systemets förmåga att klara av störningar och mätbrus verkar också vara inom rimliga gränser. Om en PI reglering inte visar sig tillräcklig i praktiken finns det många sätt att förfina regleringen på t. ex. genom att mellan mätningarna skatta en feedprofil med hjälp av en modell. En nackdel med regleringen i de här fallen som syns i figur 1, 2 och 3 är att ättiksyrakoncentrationen A inte kan hållas på referensvärdet 0.2 g/l i stationäritet. Detta är tydligt om man tittar på sambandet

$$q_g = \frac{FG_{in}}{VX}$$

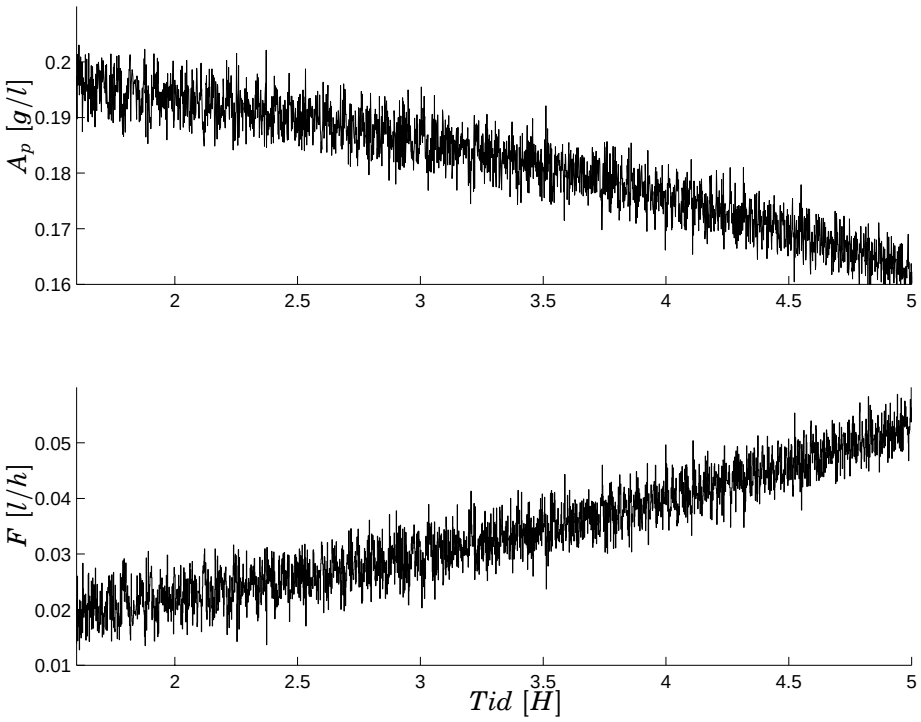
som gäller vid stationäritet. Om F regleras med en P regulator, $F = K(A_r - A)$, som i figur 1 och därmed är proportionell mot ättiksyrakoncentrationen betyder detta att A måste minska för att hålla q_g konstant då volymen V och cellmassan X ökar. I fallet med PI regleringen i figur 2 och 3 gör den låga förstärkningen att F inte ökar tillräckligt snabbt för att hålla glukoskoncentrationen G nära G^{crit}. Efter 5 H odling visas det i simuleringarna att G börjar minska och därmed börjar också q_g minska från q_g^{crit}. Om förstärkningen ökas i systemet blir det mindre stabilt. En förbättring vore att istället reglera runt en feedprofil.

Sammanfattning

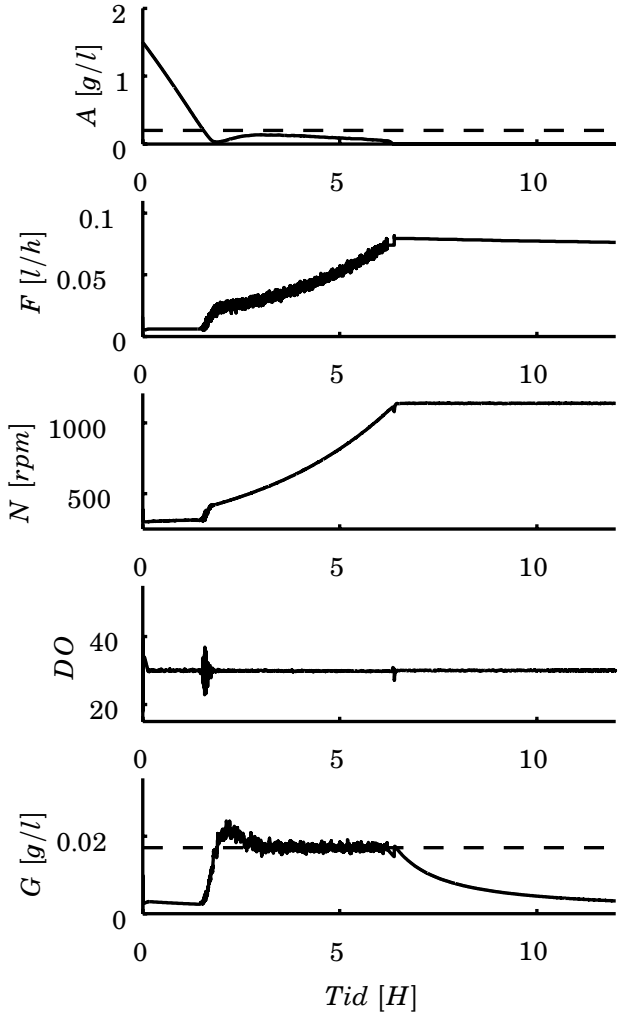
Det verkar fungera bra att styra feeden från ättiksyra mätningar även i fallet med glesa mätningar. Med en samplingstid på 5 s fungerar en P regulator bra om inte mätbruset är förstort, men då samplingstiden ökar till 15 min behövs en PI regulator, troligen även reglering med en profil.



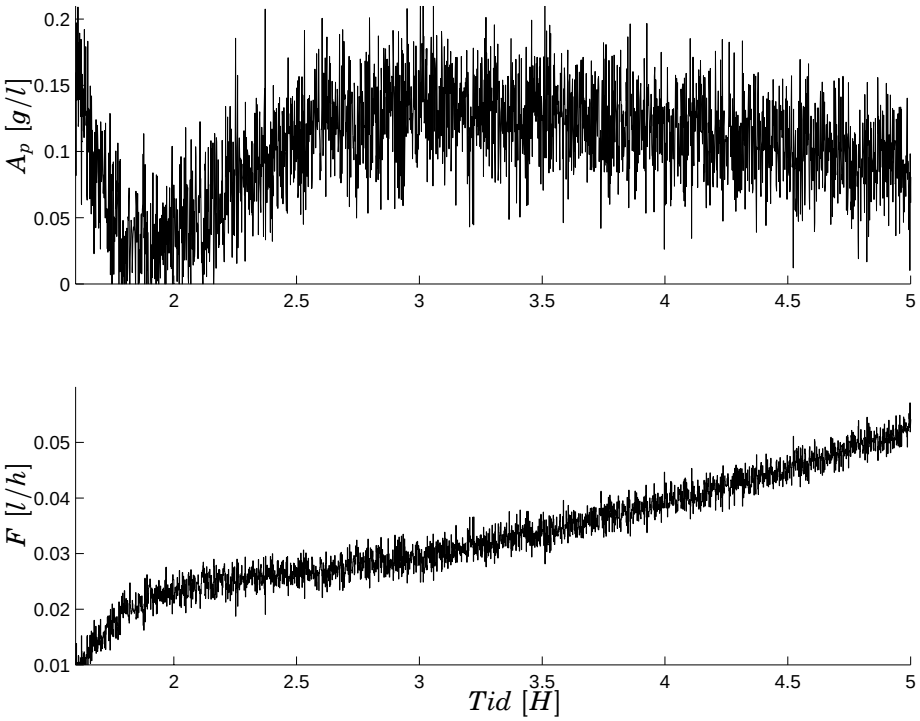
Figur 5: Simulering av systemet med brus på acetatmätningarna med en standardavikelse på 0.003 g/l. Samplingstiden h = 5 s och en P regulator med K = 1 används. Referensvärdet för ättiksyran och G^{crit} är utsatta streckade.



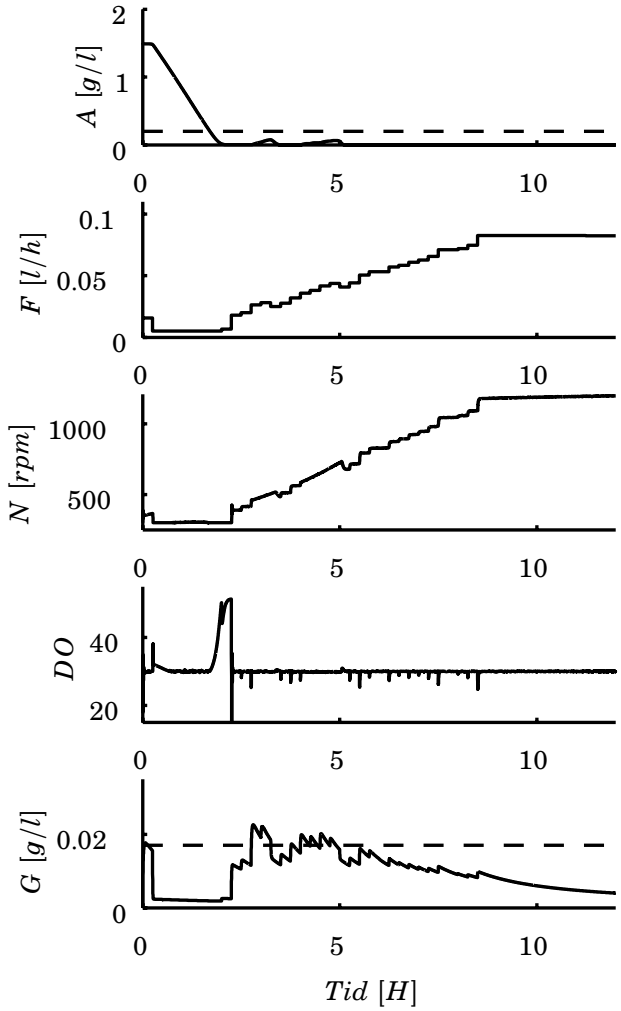
Figur 6: En förstoring av en simulering av systemet med mätbrus med en standardavikelse på 0.003 g/l. Överst visas acetatkoncentrationen adderad med mätbruset, A_p, under visas den resulterande feeden F. Samplingstiden h = 5 s och en P regulator med K = 1 används



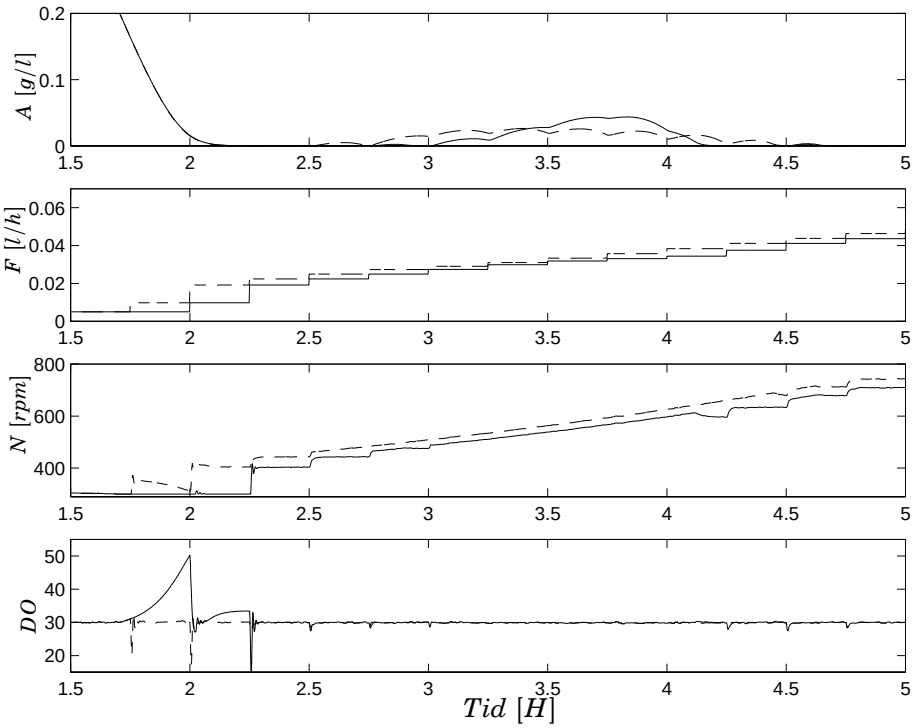
Figur 7: Simulering av systemet med brus på acetatmätningarna med en standardavikelse på 0.03 g/l. Samplingstiden h = 5 s och en PI regulator med K = 0.06 och $Kh/T_i = 0.0002$ används. Referensvärdet för ättiksyran och G^{crit} är utsatta streckade.



Figur 8: En förstoring av en simulering av systemet med mätbrus med en standardavikelse på 0.03 g/l. Överst visas acetatkoncentrationen adderad med mätbruset, A_p, under visas den resulterande feeden F. Samplingstiden h = 5 s och en PI regulator med K = 0.06 och $Kh/T_i = 0.0002$ används



Figur 9: Simulering av systemet med samplingstiden h = 15 min och en 15 min fördröjning. Bruset på acetatmätningarna simulerades med en standardavikelse på 0.03 g/l. En PI regulator med K = 0.06 och $Kh/T_i = 0.013$ används. Referensvärdet för ättiksyran och G^{crit} är utsatta streckade.



Figur 10: Jämförelse av systemen med samplingstiden 15 min. Streckad linje utan fördröjning, heldragen med fördröjning på 15 min.

Symbol	Värde	Beskrivning
G_{in}	660 g/l	glukos koncentrationen i feeden
H	$14 * 10^3$	Henrys konstant
k_s	0.01 g/l	mättningskonstanten för glukos upptaget
k_a	0.05 g/l	mättningskonstanten för acetat upptaget
O^*	100%	löst syre i jämvikt
$q_a^{c,max}$	0.2 g/gh	maximala specifika acetat konsumtionshastigheten
q_g^{max}	1 g/gh	maximala specifika glukos upptagshastigheten
q_g^{crit}	0.63 g/gh	kritiska glukos upptaget
q_{mc}	0.06 g/gh	maintenance koefficient
q_o^{max}	0.35 g/gh	maximala specifika syre upptagshastigheten
Y_{ag}	0.55 g/g	acetat/glukose utbyte
Y_{oa}	0.55 g/g	syre/acetat utbyte
Y_{og}	0.50 g/g	syre/glukos utbyte för celltillväxt
Y_{om}	1.07 g/g	syre/glukos utbyte för maintenance
Y_{xa}	0.4 g/g	biomassa/ättiksyra utbyte
Y_{xg}^{ox}	0.51 g/g	oxidativ biomassa/glukos utbyte
Y_{xg}^{fe}	0.15 g/g	fermentativ biomassa/glukos utbyte
V^o	4 l	arbetspunktensvolym (i stabilitetsanalysen)
X^o	10 g/l	arbetspunktenscellmassa (i stabilitetsanalysen)

Tabell 1: Parametrar i processmodellen och i stabilitetsanalysen

Referenser

[1] M. Åkesson. Probing control of glucose feeding in *Escherichia coli* cultivations. Phd thesis, Department of Automatic Control, Lund Institute of Technology, Sweden, December 1999.

[2] B. Xu, M. Jahec, and S-O. Enfors. Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 15:81–90, 1999.