

University of Tunis El Manar, National Engineering School of Tunis, LAMSIN, Tunisia

University of Mons, Faculty of Engineering, Automatic Control Laboratory, Belgium

Identification des paramètres de la production fermentative de Fructooligosaccharides par *Aureobasidium Pullulans*

R. Fekih Salem, A. Vande Wouwer, C. De Castro,
C. Nobre, A.-L. Hantson

Montpellier, France, 15 Octobre 2015

- 1 Introduction
- 2 Modèle mathématique
- 3 Identification des paramètres
- 4 Résultats numériques
 - Étude de simulation
 - Etude expérimentale
- 5 Discussion et conclusion

Introduction

Contexte

- Fructo-oligosaccharides (FOS) ont gagné un grand intérêt commercial dans les dernières années.
- Les prébiotiques (des oligosaccharides à courte chaîne) sont bénéfiques à l'activité métabolique de la communauté bactérienne présente dans le tractus gastro-intestinal.
- Attractivent pour les applications alimentaires et pharmaceutiques.
- 1-kestose (GF_2), nystose (GF_3) et fructofuranosylnystose (GF_4) peuvent être trouvés naturellement à l'état de traces dans les fruits, les légumes et le miel.
- Industriellement, FOS peuvent être produits à partir de saccharose (GF) par des réactions enzymatiques

Nouveau processus

- La production de FOS par la fermentation de champignons, tels que *Aureobasidium pullulans*.
- La maximisation de la productivité de FOS, ainsi que la minimisation des monosaccharides (non désirés et effet d'inhibition) dans le milieu
- Purification à l'intermédiaire de la séparation SMB (Simulated Moving Bed)

Introduction

Objectifs

- ① Développer un modèle dynamique de production de FOS à partir de la culture des champignons *Aureobasidium pullulans*.
- ② Étudier l'identifiabilité structurelle et pratique du modèle dynamique.
- ③ Développer une procédure d'estimation des paramètres basée sur de multiples expériences.
- ④ Explorez la conception d'expériences pour
 - Améliorer le contenu de l'information de données.
 - Améliorer l'incertitude et la précision des paramètres.

- 1 Introduction
- 2 Modèle mathématique**
- 3 Identification des paramètres
- 4 Résultats numériques
 - Étude de simulation
 - Etude expérimentale
- 5 Discussion et conclusion

Réactions d'hydrolyse

Saccharose	$GF \xrightarrow{r_1} k_1 G + k_2 F$
1-Kestose	$GF_2 \xrightarrow{r_2} k_3 GF + k_4 F$
Nystose	$GF_3 \xrightarrow{r_3} k_5 GF_2 + k_6 F$
1-fructofuranosyl nystose	$GF_4 \xrightarrow{r_4} k_7 GF_3 + k_8 F$

- Loi de Michaelis-Menten :

$$r_1 = \frac{Vmh_{GF} \times GF}{Kmh_{GF} + GF}$$

- Loi de Michaelis-Menten Modifiée : inhibition du substrat

$$r_i = \frac{Vmh_{GF_i} \times GF_i}{GF_i \left(1 + \frac{GF_i}{Kih_{GF_i}}\right) + Kmh_{GF_i}}, \quad i = 2, 3, 4,$$

$$k_1 = \frac{180}{342} = \frac{\text{La masse moléculaire du glucose}}{\text{La masse moléculaire du saccharose.}}$$

K. J. Duan, J.S. Chen and D. C. Sheu, Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose, *enzyme Microb. Technol.* (1994).

O. Rocha, C. Nobre, A. Dominguez, D.Torres, N. Faria, L. Rodrigues, J.A.Teixeira, E.C. Ferreira and I. Rocha, A dynamical model for the fermentative production of fructooligosaccharides, *10th International Symposium on process systems engineering* (2009).

Réactions de transfructosylation

Saccharose	$2GF$	$\xrightarrow{r_5}$	$k_9 GF_2 + k_{10} G$
1-Kestose	$2GF_2$	$\xrightarrow{r_6}$	$k_{11} GF_3 + k_{12} GF$
Nystose	$2GF_3$	$\xrightarrow{r_7}$	$k_{13} GF_4 + k_{14} GF_2$

- Loi de Michaelis-Menten Modifiée : inhibition du substrat et inhibition compétitive du glucose.

$$r_5 = \frac{V_m T_{GF} \times GF}{GF \left(1 + \frac{GF}{K_{sts}}\right) + K_{mst} \left(1 + \frac{G}{K_{gst}}\right)}$$

- Loi de Michaelis-Menten Modifiée : inhibition compétitive du glucose.

$$r_j = \frac{V_m T_{GF_i} \times GF_i}{GF_i + K_{mt_{GF_i}} \left(1 + \frac{G}{K_{it_{GF_i}}}\right)}, \quad j = 6, 7; \quad i = 2, 3.$$

Les réactions de croissance

Glucose	$Y_G G$	$\xrightarrow{r_8}$	X
Fructose	$Y_F F$	$\xrightarrow{r_9}$	X

- Loi de Monod :

$$r_j = \frac{\mu_{mj} S_j X}{S_j + K_{S_j}} \quad j = 8, 9.$$

- Y_G (Y_F) : Coefficient de rendement en biomasse lorsque le glucose (ou fructose) est utilisé pour la croissance de la biomasse.

$$Y_G = \frac{180}{?} = \frac{\text{La masse moléculaire du glucose}}{\text{La masse moléculaire de } X}.$$

Modèle Mathématique : 7 variables d'état et 27 paramètres

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{GF} = D(GF_{in} - GF) - r_1 + k_3 r_2 - r_5 + \frac{k_{12}}{2} r_6 \\ \dot{GF}_2 = -r_2 + k_5 r_3 + \frac{k_9}{2} r_5 - r_6 + \frac{k_{14}}{2} r_7 - D.GF_2 \\ \dot{GF}_3 = -r_3 + k_7 r_4 + \frac{k_{11}}{2} r_6 - r_7 - D.GF_3 \\ \dot{GF}_4 = -r_4 + \frac{k_{13}}{2} r_7 - D.GF_4 \\ \dot{G} = k_1 r_1 + \frac{k_{10}}{2} r_5 - Y_G r_8 - D.G \\ \dot{F} = k_2 r_1 + k_4 r_2 + k_6 r_3 + k_8 r_4 - Y_F r_9 - D.F \\ \dot{X} = r_8 + r_9 - D.X \end{array} \right. \quad (1)$$

- GF_{in} : concentration initiale de saccharose (g/L).
- D : taux de dilution :

$$D = \frac{Q_{in}}{V} = \frac{\text{Le débit d'alimentation de saccharose}}{\text{Le volume total de liquide à l'intérieur du réacteur}}$$

- 1 Introduction
- 2 Modèle mathématique
- 3 Identification des paramètres**
- 4 Résultats numériques
 - Étude de simulation
 - Etude expérimentale
- 5 Discussion et conclusion

Identification des paramètres

- Modèle espace d'états :

$$\dot{x} = f(x, \theta, t), \quad x(0) = x_0(\theta)$$

$x(t, \theta)$: vecteur d'états, θ : vecteur de paramètre.

- Vecteur de mesure :

$$y_m(t, \theta) = h(x, \theta, t)$$

- Vecteur de données collectées à l'instant t_i :

$$y(t_i) = y_m(t_i, \theta^*) + \eta_i, \quad i = 1, \dots, n_t$$

θ^* : vraie valeur du vecteur de paramètres; n_t : nombre de temps d'observation.

- Les **erreurs de mesure** sont supposées indépendantes, d'espérance nulle et Gaussienne :

$$\eta_i \hookrightarrow N(0, \Sigma), \quad i = 1, \dots, n_t$$

Critère des Moindres Carrés Pondérées (MCP)

- La fonction coût :

$$J(\theta) = \sum_{i=1}^{n_t} [y(t_i) - y_m(t_i, \theta)]^T W^{-1} [y(t_i) - y_m(t_i, \theta)]$$

$$W = \begin{bmatrix} \max(y_m^1)^2 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \max(y_m^2)^2 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & \max(y_m^{n_y})^2 \end{bmatrix}.$$

- Matrice de covariance du bruit de mesure pourrait être estimée par

$$\hat{\Sigma} = \hat{\epsilon}^2 W; \quad \hat{\epsilon}^2 = \frac{J(\hat{\theta})}{n_y n_t - n_p}$$

- Estimateur MCP

$$\hat{\theta} = \arg \min_{\theta} J(\theta).$$

Matrice de covariance des paramètres

- Matrice d'Information de Fisher :

$$FIM = \sum_{i=1}^{n_t} \left[\frac{\partial y_m}{\partial \theta} \right]_{(t_i, \theta)}^T \hat{\Sigma}^{-1} \left[\frac{\partial y_m}{\partial \theta} \right]_{(t_i, \theta)}$$

- En supposant que l'estimateur est sans biais :

$$C_\theta \approx FIM^{-1}(\hat{\theta}, \hat{\Sigma})$$

- L'écart type σ_j du paramètre estimé $\hat{\theta}_j$: peut être obtenu à partir de la racine carrée du j^{eme} élément de la diagonal de C_θ .

$$\sigma_j = \sqrt{C_{\theta_{jj}}}.$$

- Il est possible d'estimer les intervalles de confiance pour un niveau de confiance donné.

Dans ce travail, nous considérons un niveau de confiance de 95 % avec une distribution gaussienne :

$$[\hat{\theta}_j - 2\sigma_j, \hat{\theta}_j + 2\sigma_j].$$

- 1 Introduction
- 2 Modèle mathématique
- 3 Identification des paramètres
- 4 Résultats numériques**
 - Étude de simulation
 - Etude expérimentale
- 5 Discussion et conclusion

- Comme les champignons croissent sous une forme hétérogène, il est difficile de mesurer la biomasse.

⇒ Cette information n'est pas disponible.
- Les divers ensembles d'expériences :
 - ① Trois expériences en "batch" (3B)
 - ② Trois expériences en "fed-batch" (3FB)
 - ③ Combinaison de deux expériences en "batch" et une en "fed-batch" (2B-FB)
 - ④ Combinaison de deux expériences en "batch" et deux en "fed-batch" (2B-2FB)
- La donnée de mesure est corrompue par un bruit additif Gaussien avec 5 % erreur relative.
- Afin de minimiser le critère MCP, une combinaison d'algorithmes sont utilisés, par exemple,
 - ① **Méthode de Nelder-Mead** (fminsearch) est d'abord utilisé pour approcher l'optimum,
 - ② **Algorithme de Quasi-Newton** (fminunc) est utilisé pour raffiner le résultat.

Validation directe

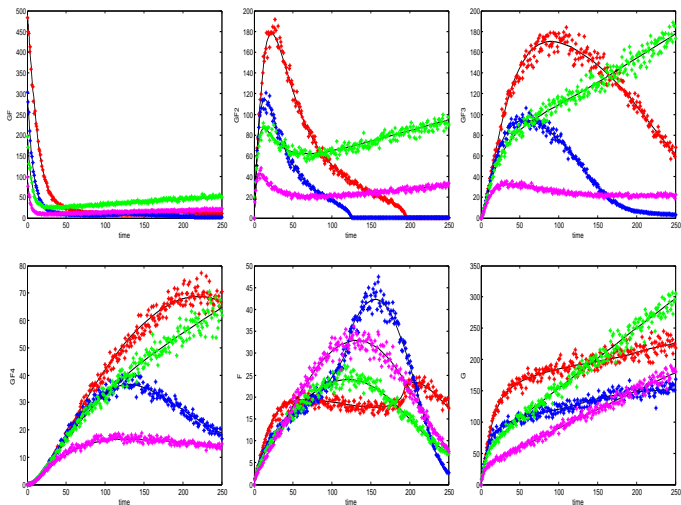


FIGURE : Données de simulation et la prédiction mathématique en mode de culture deux "batch" et deux "fed-batch" (2B-2FB).

Estimation des paramètres à partir des données de simulation

θ	$VmhGF$	$KmhGF$	$VmhGF_2$	$KihGF_2$	$KmhGF_2$	$VmhGF_3$	$KihGF_3$
$\hat{\theta}$	1.43	111.57	7.58	2.72	0.61	7.97	10.52
3B	1.73±0.4	164.9 ± 79	6.3 ± 2.8	3.5 ± 1.9	0.68 ± 1.5	6.9 ± 4.4	12 ± 8.9
3FB	1.72±1.1	173.6 ± 168	7.2 ± 2.1	3 ± 1	0.7 ± 0.9	9 ± 10	10.2 ± 13
2B-FB	1.79±0.27	171 ± 49	7.4 ± 4.3	3 ± 2	0.7 ± 2.4	8.6 ± 8.6	9.3 ± 10.2
2B-2FB	1.52±0.1	121.5 ± 13.6	7.58 ± 4.1	2.8 ± 1.7	0.63 ± 2.2	8.7 ± 7.9	9 ± 8.8
θ	$KmhGF_3$	$VmhGF_4$	$KihGF_4$	$KmhGF_4$	$VmtGF$	$Ksts$	$Kmst$
$\hat{\theta}$	177.41	7.35	6.21	724.07	49.99	911.16	70.22
3B	147.4 ± 108	8.8 ± 54	6.1 ± 40	899 ± 5637	59 ± 14	593 ± 372	110 ± 48
3FB	211.5 ± 263	9 ± 79	6.3 ± 59	898 ± 7875	55 ± 16	537 ± 682	84 ± 32
2B-FB	203 ± 226	8.4 ± 53	6.5 ± 44	870 ± 5688	52 ± 6.4	891 ± 359	86 ± 19
2B-2FB	206.9 ± 205	9.4 ± 43.7	5.6 ± 28	982 ± 4625	64.7 ± 9	482 ± 150	118 ± 27

TABLE : Mode de culture "batch" et "fed-batch" avec erreur relative de 5 %.

Estimation des paramètres à partir des données de simulation

θ	K_{gst}	V_{mtGF_2}	K_{mtGF_2}	$KitGF_2$	V_{mtGF_3}	K_{mtGF_3}	$KitGF_3$
$\hat{\theta}$	24.57	41.63	239.88	49.96	11.53	333.07	49.95
3B	35 ± 9	50.7 ± 13.8	307 ± 96	52 ± 3	13.8 ± 24	450 ± 746	59 ± 23
3FB	28 ± 3.1	62.8 ± 29	397.8 ± 200	58 ± 5.2	14 ± 22	439 ± 667	56 ± 20
2B-FB	30.6 ± 4.2	58 ± 13	359 ± 91	51.5 ± 2	12.7 ± 16	442 ± 565	64.8 ± 16
2B-2FB	33.1 ± 3.7	69.2 ± 12.4	455 ± 90	55.8 ± 2.1	16 ± 13	536 ± 444	58 ± 8.5

θ	muG_{max}	KmG	muF_{max}	KmF	Y_G	Y_F	
$\hat{\theta}$	$2.9e^{-5}$	397.98	0.0097	11.45	29.23	79.34	
3B	$3e^{-7} \pm 126$	$4e^4 \pm 22e^{12}$	0.01 ± 0.001	12.5 ± 1.7	$5.6 \pm 6e^6$	78.9 ± 9.8	
3FB	$4e^{-6} \pm 7e^{-3}$	$1368 \pm 2e^6$	$0.01 \pm 4e^{-4}$	14.3 ± 1	$104 \pm 5e^4$	79.7 ± 3.8	
2B-FB	$6e^{-11} \pm 4e^{-3}$	$258 \pm 4e^{10}$	$0.01 \pm e^{-3}$	12.3 ± 1.6	$4.3 \pm 2e^8$	76.7 ± 8.6	
2B-2FB	$4e^{-8} \pm 0.3$	$3e^3 \pm 3e^{10}$	$0.001 \pm 5e^{-4}$	11.4 ± 1.3	$11 \pm 2e^6$	77.4 ± 4.7	

TABLE : Mode de culture "batch" et "fed-batch" avec erreur relative de 5 %.

Validation croisée avec une expérience indépendante en batch

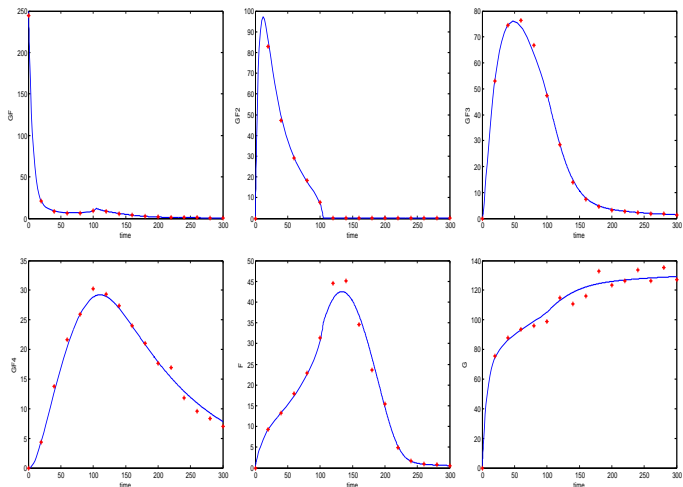


FIGURE : Une concentration initiale en saccharose de 250 g/l peut être utilisée pour la validation croisée montrant des résultats satisfaisants.

- Dans la pratique, non seulement les 27 paramètres cinétiques doivent être considérés, mais aussi les concentrations initiales, qui sont mesurées et sont donc incertaines.

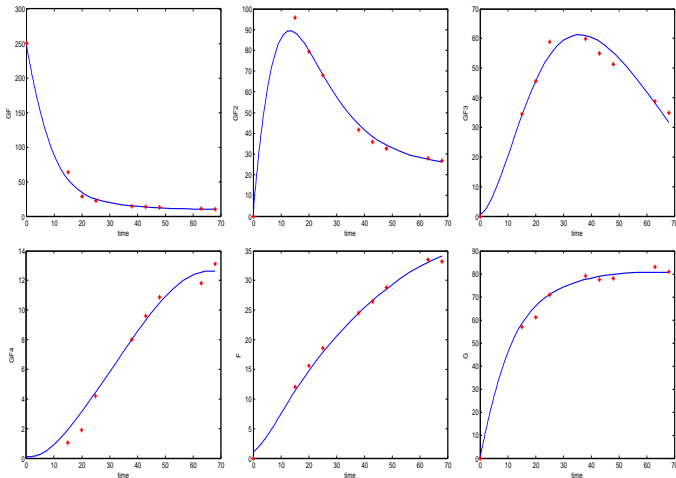


FIGURE : Méthode MCP : Données expérimentales de la fermentation 1 et la prédiction mathématique.

- Les résultats de la validation direct sont assez satisfaisants. Cependant, la confiance associée aux paramètres est assez faible.

Validation Directe

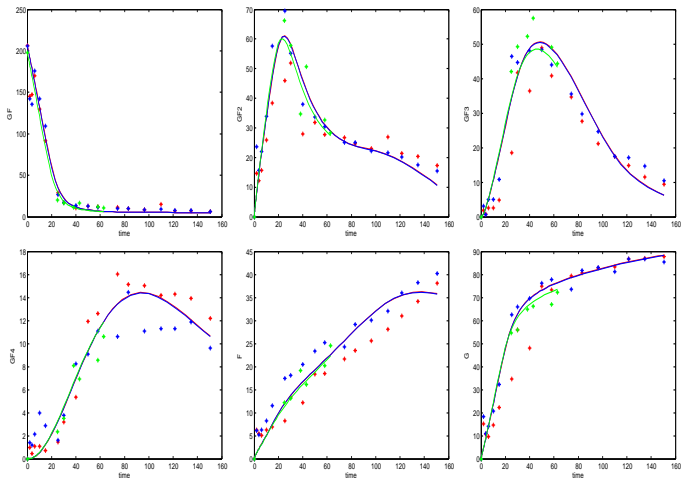


FIGURE : Données expérimentales de trois fermentations (2, 3 et 4).

Validation croisée

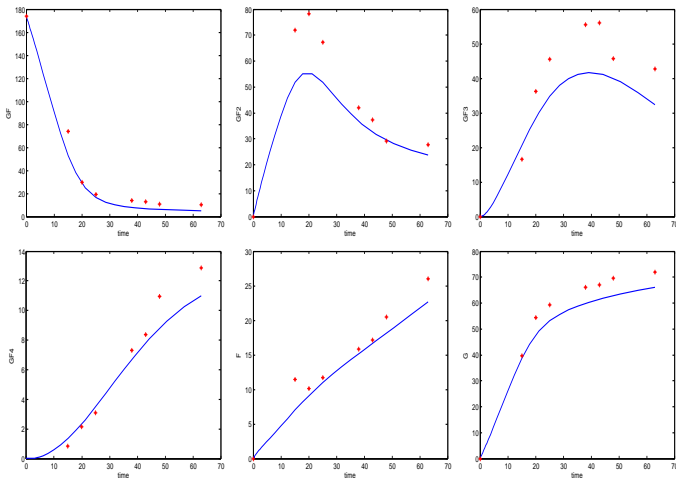


FIGURE : Données expérimentales de la fermentation 5 et prédiction mathématique.

Les résultats sont améliorés, mais les expériences fed-batch, comme c'est démontré en simulation, seraient nécessaires pour améliorer plus significativement les estimations.

- 1 Introduction
- 2 Modèle mathématique
- 3 Identification des paramètres
- 4 Résultats numériques
 - Étude de simulation
 - Etude expérimentale
- 5 Discussion et conclusion

- Le grand nombre de paramètres est un **challenge** pour l'analyse d'identifiabilité, et la conception d'expérience.
- Pour **améliorer l'identification** et **réduire l'incertitude** des paramètres, une procédure d'estimation des paramètres a été développée à partir de plusieurs expériences.
- Un logiciel pour l'identification des paramètres a été **développée** qui est basé sur **IDEAS** incluant la possibilité de traiter plusieurs expériences.
- Les données expérimentales de trois fermentations sont en bon accord avec la prédiction mathématique par une **validation directe** ainsi qu'une **validation croisée**.
 - ⇒ Modèle (1) **peut prédire** le processus de production de FOS.
- L'incertitude de certains paramètres peut être réduite par la **conception expérimentale optimale**.
- Notre étude numérique montre que la précision et l'incertitude des paramètres estimés peuvent être améliorées en considérant des données collectées dans des expériences **fed-batch**,
 - ⇒ Nous suggérons une **combinaison d'expériences** dans les modes de culture batch et fed-batch.

Merci pour votre attention

University of Tunis El Manar, National Engineering School of Tunis, LAMSIN, Tunisia

University of Mons, Faculty of Engineering, Automatic Control Laboratory, Belgium

Identification des paramètres de la production fermentative de Fructooligosaccharides par *Aureobasidium Pullulans*

R. Fekih Salem, A. Vande Wouwer, C. De Castro,
C. Nobre, A.-L. Hantson

Montpellier, France, 15 Octobre 2015