

## REGULACION DEL CRECIMIENTO EN BIOPROCESOS CON TASA DE CRECIMIENTO ADITIVA E INHIBICION COMPETITIVA ENTRE SUSTRATOS

Nuñez, Sebastián; De Battista, Hernán; Garelli, Fabricio

CONICET y Grupo de Control Aplicado, Instituto LEICI, Dto. de Electrotecnia, Fac. de Ing., UNLP,  
Calle 48 esq. 116 s/n, La Plata, Buenos Aires.  
sebastian.nuniez@ing.unlp.edu.ar

**Palabras clave:** proceso biotecnológico, control, regulación

### INTRODUCCIÓN

La necesidad de obtener nuevos productos, reducir los costos de los procesos fermentativos, reutilizar ciertas sustancias orgánicas que surgen como desechos industriales y buscar formas alternativas de tratar compuestos tóxicos son algunas de las motivaciones para el desarrollo de los llamados procesos multi-sustrato. El concepto de proceso multi-sustrato se refiere a crecimiento microbiano en el que dos o más nutrientes afectan notablemente la tasa de crecimiento. Esos nutrientes pueden cumplir la misma función en el metabolismo celular, por ejemplo fuentes de carbono, o diferentes funciones, como es el caso de una fuente de carbono, una de nitrógeno, etc. [1].

En el caso de los procesos semi-continuos debe definirse un perfil temporal adecuado para el flujo de alimentación ya que debe evitarse la sobre-alimentación del cultivo. Para esto, se han desarrollado propuestas que incluyen realimentación de variables fisicoquímicas, leyes precalculadas en base a un modelo, y leyes con realimentación de variables no medibles mediante el uso de observadores [2]. En el caso de alimentarse dos nutrientes, estos suelen ser incorporados al medio de cultivo ya sea en una única solución [3] o mediante flujos separados [4]. Cuando se aplican flujos por separado, se encuentran estrategias que son adaptaciones de las utilizadas con un único sustrato limitante [4, 5, 6] y también leyes de realimentación proporcionales a la biomasa total [7].

En un trabajo previo, se estudió la posibilidad de incorporar, en una ley de alimentación proporcional a la cantidad de biomasa, una estimación de la tasa de crecimiento total en procesos con cinética aditiva [8]. En el presente trabajo, se pretende evaluar esas leyes de alimentación en procesos donde existe un efecto de inhibición en la tasa de crecimiento debido a la posible competitividad entre los sustratos.

### MODELO DEL PROCESO

A partir del balance de masas en el biorreactor puede encontrarse el modelo de estados que describe la evolución temporal de las principales variables [9]. Para el caso del cultivo semi-continuo alimentado mediante dos entradas individuales (por ejemplo dos fuentes de carbono),

se tienen las siguientes expresiones

$$\dot{x} = \mu x - \frac{x}{v} F_1 - \frac{x}{v} F_2, \quad (1a)$$

$$\dot{s}_1 = -\sigma_1 x + \frac{(S_{1in} - s_1)}{v} F_1 - \frac{s_1}{v} F_2, \quad (1b)$$

$$\dot{s}_2 = -\sigma_2 x - \frac{s_2}{v} F_1 + \frac{(S_{2in} - s_2)}{v} F_2, \quad (1c)$$

$$\dot{v} = F_1 + F_2, \quad (1d)$$

donde  $x$ ,  $s_1$  y  $s_2$  son concentraciones de biomasa y sustratos (g/L),  $v$  el volumen de trabajo y  $F_i$  (L/h) las entradas de los sustratos  $s_i$  en concentración  $S_{(i)in}$ . La tasa de crecimiento es  $\mu$  y  $\sigma_i$  representa la tasa de consumo del sustrato  $i$ . En este trabajo se estudia el problema de alimentar dos nutrientes en procesos con crecimiento aditivo donde la tasa de crecimiento total es

$$\mu = \mu_1 + \mu_2, \quad (2)$$

y la tasa de consumo específica de cada sustrato resulta  $\sigma_i = \mu_i/y_i$ , con  $y_i$  el rendimiento sustrato a biomasa correspondiente [10].

El efecto de inhibición competitiva puede explicarse si se considera que los caminos metabólicos por los cuales se consumen los sustratos pueden competir por cierta enzima intermedia y de este modo es posible que ocurra un efecto de inhibición. Un modelo muy aceptado para describir este fenómeno es el modelo generalizado de Monod [10]. En este modelo, las tasas individuales están descriptas por

$$\mu_1(s_1, s_2) = \frac{\mu_{max1} s_1}{s_1 + k_{s1} + \Lambda_1 s_2}, \quad \mu_2(s_1, s_2) = \frac{\mu_{max2} s_2}{s_2 + k_{s2} + \Lambda_2 s_1}, \quad (3)$$

donde  $\Lambda_i$  es un parámetro que mide el efecto competitivo sobre la tasa de crecimiento  $i$ . Cuando  $s_1$  y  $s_2$  son nutrientes perfectamente sustituibles, los  $\Lambda_i$  toman los valores particulares  $\Lambda_1 = k_{s1}/k_{s2}$  y  $\Lambda_2 = \Lambda_1^{-1}$  [10]. El principal efecto de los parámetros  $\Lambda_i$  es que la tasa de crecimiento  $i$ -ésima en la mezcla de sustratos sea menor que la que se observaría en los sustratos por separado. Si bien esto reduce el valor de las tasas individuales, la tasa de crecimiento neta es la suma de los términos individuales y de esta manera es posible obtener una tasa de crecimiento mayor. El modelo (3) es utilizado, entre otras aplicaciones, para representar procesos de biodegradación de sustancias tóxicas [11].

## DISEÑO DE LA LEY DE CONTROL

Al igual que en los procesos alimentados con una sola fuente de carbono, ciertos objetivos biotecnológicos pueden expresarse en términos de regulación de variables y/o seguimiento de perfiles temporales. Para procesos multi-sustrato se han identificado los siguientes objetivos:

- la regulación de la tasa de crecimiento total en un valor predefinido  $\mu = \mu_{ref}$ , el cual es compatible con el estado metabólico deseado o bien es óptimo para el proceso de producción. Este objetivo se traduce en el seguimiento de un perfil exponencial de la forma  $X^*(t) = x_0 v_0 e^{\mu_{ref} t}$ , siendo el producto  $X(t) = xv$  la cantidad de biomasa en el medio de cultivo [5].
- la regulación de la tasa de crecimiento manteniendo una determinada relación de sustratos  $s_1/s_2$  o de las tasas de crecimiento individuales  $\mu_1/\mu_2$ . Este objetivo se debe a que las propiedades de ciertos productos están fuertemente relacionadas con alguno de estos cocientes. Un ejemplo se da en procesos de producción de biopolímeros, donde la composición de los monómeros se relaciona con el cociente de las fuentes de carbono [12].

Los objetivos descriptos guardan una estrecha relación entre sí y podrían resolverse manipulando adecuadamente los flujos de alimentación del biorreactor. Por esta razón se considera que el objetivo de la alimentación aplicada al proceso semi-continuo (1) es regular la tasa de crecimiento en un valor  $\mu_{ref} = \mu_{1r} + \mu_{2r}$ . De esta manera, la trayectoria nominal deseada es la de crecimiento exponencial, donde la cantidad de biomasa total evoluciona según

$$X^*(t) = x_0 v_0 e^{\mu_{ref} t}. \quad (4)$$

Si se dispone de medición en línea de biomasa y volumen puede aplicarse flujos de la forma

$$F_i = \lambda_{ir} x v, \quad (5)$$

donde  $\lambda_{ir} > 0$  es un coeficiente de proporcionalidad que depende del modelo del proceso [7]. También puede incorporarse realimentación proporcional no lineal de la forma

$$F_i = \lambda_{ir} (1 + ke) x v, \quad (6)$$

con  $e = \mu_{ref} - \mu$ . Esta expresión agrega una corrección sobre el parámetro  $\lambda_{ir}$  con el objetivo de aumentar la velocidad de convergencia y reducir el error de regulación ante incertidumbre en los parámetros del proceso. La estimación de  $\mu$  requerida en la expresión (6) puede obtenerse a partir de las mediciones de biomasa y volumen utilizando un observador. El objetivo de aplicar la ley de alimentación es que la concentración de sustrato  $s_i$  evolucione hacia un valor de referencia  $s_{ir}$  tal que  $\mu_i(s_{ir}) = \mu_{ir}$ .

Ahora, con el objetivo de analizar las propiedades de convergencia se realiza el cambio de variables  $d\tau/dt = x(t)$ . Luego, dada la ley de alimentación  $F_i = \lambda_{ir} x v$  aplicada al modelo (1), la linealización de las expresiones  $s'_i = \frac{ds_i}{d\tau} = f_i$  alrededor de  $s_i = s_{ir}$  resulta en

$$\left. \frac{\partial f}{\partial s} \right|_{s=s_r} = \begin{pmatrix} -j_{11} & -j_{12} \\ -j_{21} & -j_{22} \end{pmatrix} \Big|_{s=s_r} \quad (7)$$

con  $s = [s_1 \ s_2]^T$  y

$$j_{11} = \frac{1}{y_1} \frac{\partial \mu_1}{\partial s_1} + \lambda_r, \quad j_{12} = \frac{1}{y_1} \frac{\partial \mu_1}{\partial s_2}, \quad j_{21} = \frac{1}{y_2} \frac{\partial \mu_2}{\partial s_1}, \quad j_{22} = \frac{1}{y_2} \frac{\partial \mu_2}{\partial s_2} + \lambda_r. \quad (8)$$

Las derivadas parciales de (3) involucradas en la expresión anterior resultan

$$\left. \frac{\partial \mu_i}{\partial s_i} \right|_{s=s_r} = \frac{\mu_{max(i)}(k_{si} + \Lambda_i s_{jr})}{(s_{ir} + k_{si} + \Lambda_i s_{jr})^2} > 0, \quad (9)$$

$$\left. \frac{\partial \mu_i}{\partial s_j} \right|_{s=s_r} = \frac{-\mu_{max(i)} s_{ir} \Lambda_i}{(s_{ir} + k_{si} + \Lambda_i s_{jr})^2} < 0, \quad (10)$$

con  $i, j \in \{1, 2\}, i \neq j$ . Luego, en función de los parámetros del proceso y el punto de operación requerido, los autovalores de la matriz (7) se obtienen a partir del polinomio característico  $p(\xi) = \xi^2 + a_1 \xi + a_2$ , donde los coeficientes resultan  $a_1 = j_{11} + j_{22}$ ,  $a_2 = j_{11} j_{22} - j_{12} j_{21}$ . Por inspección de (8) y (9) puede determinarse que  $a_1 > 0$  mientras que la positividad de  $a_2$  puede corroborarse realizando el cálculo correspondiente. Luego, por el criterio de Routh, el polinomio característico es estable. Este análisis permite concluir que localmente el flujo de alimentación  $F_i = \lambda_{ir} x v$  hace que  $(s_{1r}, s_{2r})$  sea un punto de equilibrio estable. Para esta ley de alimentación también puede realizarse un análisis global en el plano  $s_1 - s_2$  analizando la evolución de las trayectorias [13]. En caso de utilizarse la ley de alimentación (6) con  $k > 0$ , los coeficientes de la matriz (7) resultan

$$j_{11} = \frac{1}{y_1} \frac{\partial \mu_1}{\partial s_1} + \lambda_r + k \frac{\partial \mu}{\partial s_1} (S_{1in} \lambda_{1r} - \lambda_r s_{1r}), \quad j_{12} = \frac{1}{y_1} \frac{\partial \mu_1}{\partial s_2} + k \frac{\partial \mu}{\partial s_2} (S_{1in} \lambda_{1r} - \lambda_r s_{1r}), \quad (11a)$$

$$j_{21} = \frac{1}{y_2} \frac{\partial \mu_2}{\partial s_1} + k \frac{\partial \mu}{\partial s_1} (S_{2in} \lambda_{2r} - \lambda_r s_{2r}), \quad j_{22} = \frac{1}{y_2} \frac{\partial \mu_2}{\partial s_2} + \lambda_r + k \frac{\partial \mu}{\partial s_2} (S_{2in} \lambda_{2r} - \lambda_r s_{2r}). \quad (11b)$$

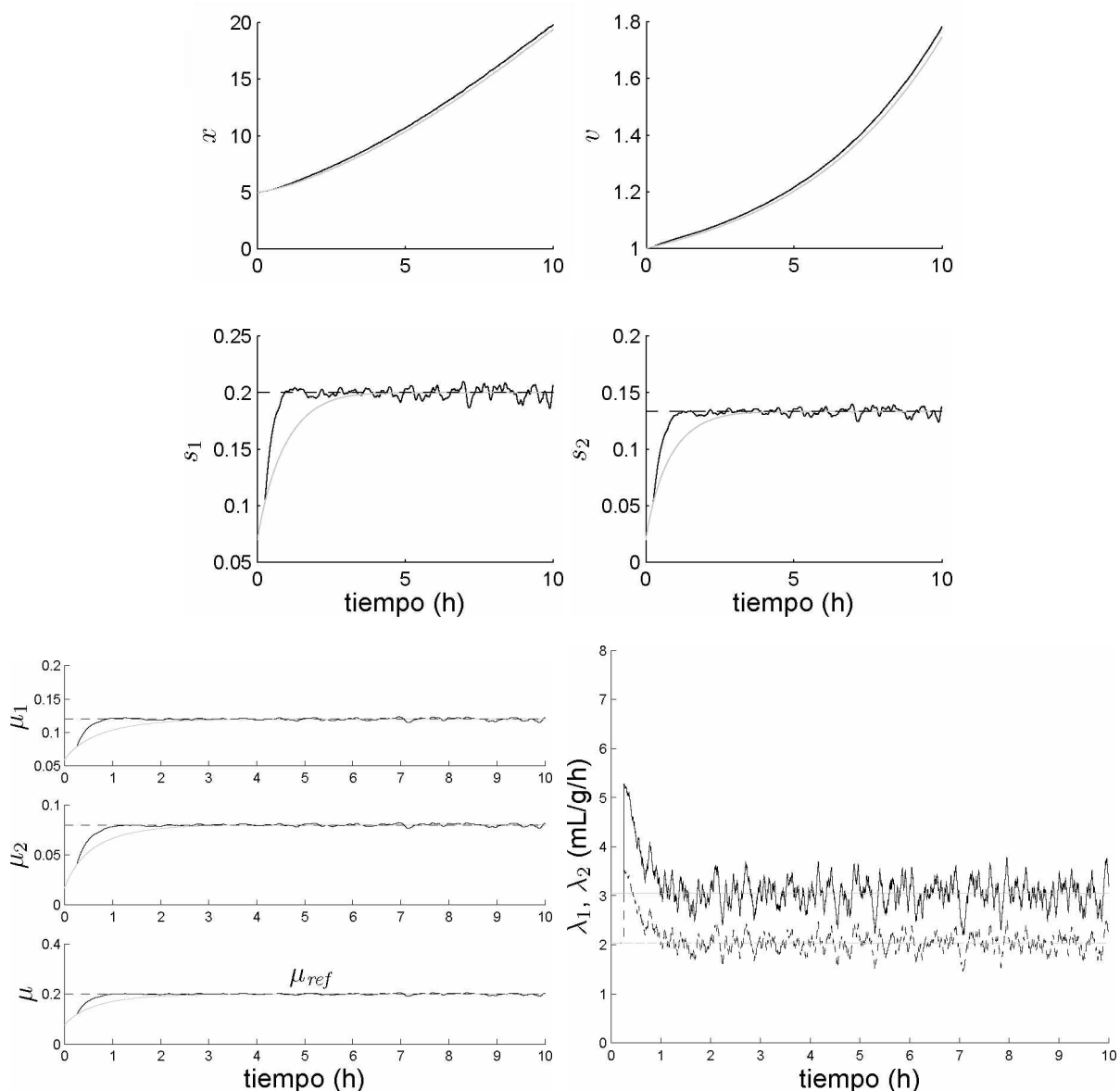


Figura 1: Evolución temporal de las variables con  $k = 10$  (línea negra),  $k = 0$  (línea gris). Arriba: estados del proceso. Abajo-Izq: Tasas de crecimiento  $\mu_1$ ,  $\mu_2$  y  $\mu = \mu_1 + \mu_2$ . Abajo-Der: Ganancias aplicadas en  $\lambda_i$ .

Nótese que en  $\frac{\partial \mu}{\partial s_i} = \frac{\partial \mu_1}{\partial s_i} + \frac{\partial \mu_2}{\partial s_i}$  (evaluado en  $s = (s_{1r}, s_{2r})$ ) uno de los sumandos es positivo y el otro negativo (ver (9)-(10)). Luego, si uno de los términos mencionados resultase negativo en el punto de operación seleccionado, no podría concluirse a priori que los  $a_i$  resulten positivos para cualquier valor de  $k$ . De todas maneras, dado un punto de operación definido por las concentraciones de sustrato deseadas, es factible encontrar valores de  $k > 0$  tal que localmente,  $(s_{1r}, s_{2r})$  sea un punto de equilibrio estable.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros utilizados con el modelo (1)-(3) son  $\mu_{max1} = 0,5 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_{s1} = 0,5 \text{ g/L}$ ,  $y_1 = 2,1 \text{ g/g}$ ,  $\mu_{max2} = 0,5 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_{s2} = 0,5 \text{ g/L}$ ,  $y_2 = 2 \text{ g/g}$  y  $S_{(i)in} = 20 \text{ g/L}$ . Como condición inicial del proceso semi-continuo se considera  $x_0 = 5 \text{ g/L}$ ,  $v_0 = 1 \text{ L}$ ,  $s_{10} = 0,07 \text{ g/L}$  y  $s_{20} = 0,02 \text{ g/L}$ . El objetivo es regular la tasa de crecimiento  $\mu$  en el valor  $\mu_{ref} = 0,20 \text{ h}^{-1}$  con una relación entre valores de referencia  $\mu_{1r}/\mu_{2r} = 1,5$ . Esta condición junto con los parámetros del proceso definen las

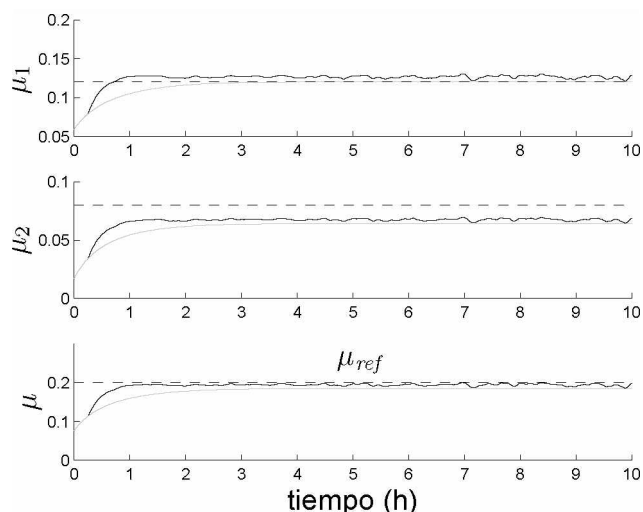


Figura 2: Evolución temporal de las tasas de crecimiento ante un error en  $\lambda_{2r}$  de -20%: con  $k = 10$  (línea negra),  $k = 0$  (línea gris).

ganancias  $\lambda_{ir}$  [7]. La estimación de la tasa de crecimiento, requerida para la implementación de (6), se realizó con un observador por modo deslizante de segundo orden basado en la medición de biomasa y volumen [14]. Ese algoritmo es capaz de alcanzar una estimación de  $\mu$  con convergencia en tiempo finito.

En la parte superior de la Figura 1 se presenta la evolución temporal de los estados, donde se aprecia la convergencia de los sustratos a los valores de referencia ( $s_{ir}$ ). En la parte inferior se exhibe la respuesta temporal de las tasas de crecimiento obtenidas con las leyes de alimentación descritas en (5) y (6). Puede apreciarse que ambos flujos permiten regular el crecimiento en el valor deseado. Comparativamente, la ley con realimentación de  $\mu$  (ec. (6)) permitió aumentar la velocidad de convergencia. De hecho, la convergencia práctica de  $\mu$  al valor de referencia  $0,2 \text{ h}^{-1}$  se redujo a la mitad de tiempo. El efecto de la realimentación propuesta consistió en modificar los flujos aplicados durante las primeras horas del proceso con el objetivo de alcanzar más rápidamente el valor de  $\mu$  deseado (ver los  $\lambda_i$  en la Figura 1).

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos ante un error en el parámetro  $\lambda_{2r}$  de -20%. Esta variación puede atribuirse a un cambio en el rendimiento  $y_2$  no considerado en el cálculo de  $\lambda_{2r}$ . Nótese en la Figura 2 que en los dos casos se modifica el valor alcanzado por  $\mu_2$  y que la regulación de la tasa total  $\mu$  presenta menor variación respecto de  $\mu_{ref}$  cuando se aplica la expresión (6). En este caso, si bien no es posible regular el valor de  $\mu_1$  y  $\mu_2$  en los valores de referencia deseados, es posible reducir el error de regulación de  $\mu$ .

## CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluaron leyes de alimentación exponencial para cultivos semi-continuos multi-sustrato con cinética de crecimiento aditiva. Se concluyó que con los flujos propuestos el punto de operación resulta localmente asintóticamente estable. La inclusión de la realimentación de  $\mu$  permitió mejorar la velocidad de convergencia y reducir los errores ante variación en los parámetros. El principal argumento para incorporar una estimación de  $\mu$  en la ley de alimentación es que en la actualidad se dispone de diversos algoritmos robustos de estimación de tasa de crecimiento. Además, la utilización de observadores con convergencia en tiempo finito no afecta el análisis de estabilidad una vez superado el modo de alcance.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por proyectos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2012-0037), CONICET (PIP 112-2011-01-00361) y la Universidad Nacional de La Plata (Proyecto 11/I164).

## REFERENCIAS

- [1] M. Zinn, B. Witholt, and T. Egli, "Dual nutrient limited growth: models, experimental observations, and applications," *Journal of Biotechnology*, vol. 113, no. 1 - 3, pp. 263 – 279, 2004.
- [2] J. Lee, S. Y. Lee, S. Park, and A. P. Middelberg, "Control of fed-batch fermentations," *Biotechnology Advances*, vol. 17, no. 1, pp. 29 – 48, 1999.
- [3] M. C. d'Anjou and A. J. Daugulis, "Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast," *Biotechnology Letters*, vol. 22, no. 5, pp. 341–346, 2000.
- [4] H. Moon, S. Kim, J. Lee, S. Rhee, E. Choi, H. Kang, I. Kim, and S. Hong, "Independent exponential feeding of glycerol and methanol for fed-batch culture of recombinant *Hansenula polymorpha* DL-1," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 111, no. 2, pp. 65–79, 2003.
- [5] B.-Y. Chen, J.-W. You, and J.-S. Chang, "Optimal exponential feeding strategy for dual-substrate biostimulation of phenol degradation using *Cupriavidus taiwanensis*," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 168, no. 1, pp. 507 – 514, 2009.
- [6] H. Huang, D. Ridgway, T. Gu, and M. Moo-Young, "Enhanced amylase production by *Bacillus subtilis* using a dual exponential feeding strategy," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 27, no. 1, pp. 63–69, 2004.
- [7] E. Picó-Marco and J. L. Navarro, "A closed-loop exponential feeding law for multi-substrate fermentation processes," in *Proceedings of the 17th IFAC World Congress*, pp. 9685–9689, 2008.
- [8] S. Nuñez, F. Garelli, H. De Battista, and J. Picó, "Diseño de control no lineal para regulación de tasa de crecimiento en cultivos multi-sustrato," in *Actas de las XXXV Jornadas de Automática, España*, 2014.
- [9] J. Nielsen, J. Villadsen, and G. Lidén, *Bioreaction Engineering Principles*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003.
- [10] H. Yoon, G. Klinzing, and H. W. Blanch, "Competition for mixed substrates by microbial populations," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 19, no. 8, pp. 1193 – 1210, 1977.
- [11] C. D. Knightes and C. A. Peters, "Multisubstrate biodegradation kinetics for binary and complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 25, no. 7, pp. 1746 – 1756, 2006.
- [12] J. Xu, B. Guo, Z. Zhang, Q. Wu, Q. Zhou, J. Chen, G. Chen, and G. Li, "A mathematical model for regulating monomer composition of the microbially synthesized polyhydroxyalkanoate copolymers," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 90, no. 7, pp. 821–829, 2005.
- [13] S. Nuñez, "Estimación y control de procesos biotecnológicos multivariables". Tesis de Doctorado, Fac. de Ing., Universidad Nacional de La Plata, 2014.
- [14] S. Nuñez, H. De Battista, F. Garelli, A. Vignoni, and J. Picó, "Second-order sliding mode observer for multiple kinetic rates estimation in bioprocesses," *Control Engineering Practice*, vol. 21, no. 9, pp. 1259 – 1265, 2013.