

Sistema de control de alimentación para cultivo lote alimentado exponencial en procesos de fermentación

Hernández D. A.⁽¹⁾, Ramírez C. M. L.⁽¹⁾, Sánchez S. J. P.⁽¹⁾, Guerrero C. J. F.⁽²⁾, Cuervo P. V. D.⁽³⁾

⁽¹⁾Universidad Politécnica de Puebla

⁽²⁾Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

⁽³⁾Unidad Profesional Interdisciplinaria en Ingeniería y Tecnologías Avanzadas

Resumen—El presente trabajo propone la aplicación de una ley de control Proporcional Integral Derivativo (PID) aplicadas en una bomba peristáltica como actuador de alimentación de sustrato de forma exponencial, permitiendo incrementar en el volumen de operación del biorreactor y en consecuencia un aumento en la concentración celular del medio de cultivo. Tomando como base los balances de masa y el modelo de crecimiento de Monod, se predice la cédula de alimentación o flujo de la bomba peristáltica que permitirá el control de la velocidad específica de crecimiento. Simulaciones y resultados experimentales dan cuenta de la efectividad del sistema en lazo cerrado de un cultivo lote alimentado exponencial de *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* K63.

Palabras Claves — Lote alimentado, velocidad específica de crecimiento, Flujo volumétrico.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de microorganismos en biorreactores para la obtención de productos de interés industrial, se inicia en la segunda guerra mundial con los antibióticos [1]. Desde entonces hasta la fecha se han obtenido una gran cantidad de productos utilizando no solo microorganismos sino también células vegetales y animales, entre otros. En la Tabla 1 se observan los productos principales obtenidos por fermentación que van desde biomasa hasta diversos metabolitos [2].

Una de las tareas más importantes en los bioprocesos actuales es el sensado de los distintos parámetros de operación como son: pH, temperatura y oxígeno disuelto. Estos parámetros son esenciales para el crecimiento celular y la producción de un determinado metabolito como consecuencia del metabolismo propio de la célula. Además de los parámetros de operación, también se requiere monitorear el comportamiento del crecimiento y la producción, ésta es una de las tareas más complicadas a realizar, dado que cada metabolito y célula son distintos y es necesario contar con un sensor específico para cada uno de éstos [3].

La mejora del proceso se ha llevado a cabo estudiando las condiciones de operación y nutrición, los tipos de reactores y sobre todo los sistemas de cultivo. La elección de un sistema de cultivo depende del metabolismo de crecimiento y producción del microorganismo, por ejemplo muchos metabolitos se producen en condiciones de limitación o de exceso de nutrientes. Tal es el caso de biopolímeros, alcoholes y ácidos orgánicos. Por ejemplo, estudios en bacterias productoras de polisacáridos como *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* mostraron que la producción del

biopolímero se ve favorecida por la limitación de elementos nutritivos como nitrógeno, fósforo o azufre [4,5]. Parece haber un metabolismo similar en las bacterias para la producción de polisacárido. Las condiciones de limitación o exceso de sustrato pueden imponerse utilizando diferentes tipos de cultivo, de esta manera se tiene la alternativa de manipular el comportamiento del microorganismo mediante la adición adecuada de sustratos limitantes.

Tabla 1. Principales productos de fermentación.

Tipo	Producto de fermentación
Ácidos orgánicos	Acético, cítrico, fumárico, glucónico, láctico
Aminoácidos	Glutamato de sodio, L-lisina, DL-metionina, L-triptofano, L-valina
Antibióticos	Estreptomina, penicilina, tetraciclina, neomicina, bacitracina
Esteroides	Cortisona, hidrocortisona, prednisolona, testosterona, triamcinolona
Alcoholes y solventes	Butanodiol-2,3, Acetona, butanol, etanol, glicerol
Proteína unicelular	Algas, bacterias, levaduras, hongos
Vitaminas	Ácido ascórbico, cianocobalamina, B-caroteno, rivo flavina
Otros	Alcaloides, enzimas, insecticidas biológicos, metano, nucleótidos (saborizantes), polisacáridos, promotores de crecimiento, recuperación de minerales (Fe, Cu, Pb, Zn, etc.)

El objetivo de este trabajo es generar una estrategia de alimentación de entrada de sustrato mediante una estrategia de control PID, con el fin de implementar cultivos lote alimentados de manera exponencial, de acuerdo a como el operador quiera manipular la fermentación. Así se puede garantizar un comportamiento deseado en cuanto a crecimiento celular y producción de algún metabolito de interés.

El artículo se organiza de la siguiente manera. En la sección II se hace una descripción del sistema. La sección III expone el problema a ser resuelto y la técnica de control que se aplicará. La sección IV desarrolla la técnica de control y estudia los parámetros necesarios para la sintonización e

implementación de la misma. La sección V presenta los resultados en simulación y experimentales, mostrando la efectividad de la técnica propuesta. Finalmente el artículo termina con unas conclusiones y trabajos futuros en la sección VI.

II. ANTECEDENTES

Para mejorar la producción de bienes o servicios con microorganismos, células o sus partes, es necesario el diseño y operación de bioprocesos eficientes y reproducibles mediante la integración de las ciencias biológicas con diversas ingenierías como la mecánica, eléctrica, y técnicas de control. Es importante proporcionarle un entorno adecuado al material biológico y ésto se logra con el diseño de reactores y sus estrategias para controlarlos y operarlos. El término biorreactor o fermentador se refiere al equipo donde se efectúa la transformación biológica, particularmente el crecimiento celular y aunque generalmente los términos de biorreactor y fermentador se usan de forma indistinta, en general el segundo se aplica sólo para el caso de cultivos microbianos [6]. Los sistemas de cultivo se clasifican en: i) sistemas cerrados, cultivos lote; ii) sistemas abiertos, cultivos continuos y iii) sistemas semicerrados, cultivos alimentados. Los cultivos alimentados combinan las bondades de los primeros dos tipos de cultivo eliminando sus desventajas. Por ejemplo son cultivos altamente productivos, su instalación no es muy costosa, evitan la degeneración del microorganismo y bajo ciertas condiciones se puede controlar la velocidad específica de crecimiento para mejorar la producción. De acuerdo a la forma de alimentación a su vez se clasifican en los cultivos alimentado exponencialmente, linealmente y por pulsos. Estos cultivos han sido muy exitosos para la producción de polisacáridos, alcoholes y metabolitos de reserva. En la Figura 1, de manera esquemática, se muestra el funcionamiento de este modo de operación en un biorreactor. En este cultivo se se suministran uno o varios nutrimentos limitantes a lo largo del cultivo.

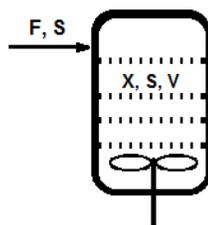


Figura 1. Funcionamiento esquemático del cultivo lote alimentado.

Las maneras de representar la dinámica de crecimiento celular, consumo de sustrato, producción de producto y aumento de volumen se pueden describir mediante balances de masa, siendo específicos por la ecuación general de balance de masa en 1[6,7].

$$\frac{dM}{dt} = M_i - M_o + R_G - R_C \quad (1)$$

Tomando en cuenta la ecuación 1, se obtienen las ecuaciones que describen el crecimiento celular por medio de

la ecuación 2, y el consumo de sustrato por medio de la ecuación 3 [8,9].

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D)x \quad (2)$$

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{\mu x}{Y_{xs}} - D(s - s_i) \quad (3)$$

Además del cambio a lo largo de la fermentación de la biomasa y el sustrato, el volumen de operación en el biorreactor está definido por la ecuación 4.

$$\frac{dV}{dt} = F(t) \quad (4)$$

La ecuación 4 representa el aumento en el volumen de operación en el biorreactor a lo largo del tiempo de fermentación.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El problema consiste en suministrar una entrada de sustrato exponencialmente por medio de una bomba peristáltica que funciona con un motor de corriente directa, esto es, adicionar al biorreactor un flujo de entrada de sustrato de manera exponencial. Para resolver este problema es necesario generar una estrategia de control que realice la tarea de aumentar las revoluciones del motor de corriente directa de la bomba peristáltica de forma exponencial para realizar la alimentación de manera exponencial. Además, hay que tener en cuenta el diámetro de la manguera con el que se realizará la alimentación. Una de las estrategias de control más utilizadas para el control de motores eléctricos de corriente directa es el PID [10]. La ecuación que representa esta ley de control está dada en la ecuación 5.

$$u(t) = K \left(e(t) + \frac{1}{T_i} \int_0^t e(\tau) d\tau + T_d \frac{de(t)}{dt} \right) \quad (5)$$

Donde $u(t)$ es la variable de control al proceso, y y_{ref} es la velocidad de referencia. Una representación de esto ley de control se encuentra en la figura 2, en el diagrama de bloques de la planta y la estrategia de control.

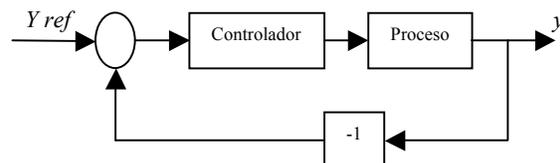


Figura 2. Estructura general de un controlador PID.

Representando las ecuaciones 2, 3 y 4 en espacio de estados y utilizando el modelo de Monod en la ecuación 6 [6,7,11] denotado por la ecuación 6 se obtienen las ecuaciones 7,8 y 9.

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{k_s + S} \quad (6)$$

$$\dot{x}_1 = \frac{\mu x_1 x_2}{k_s + x_2} - \frac{x_1}{x_3} u_1 \quad (7)$$

$$\dot{x}_2 = -\frac{1}{Y_{xs}} \frac{\mu x_1 x_2}{k_s + x_2} - \frac{x_2 - s_i}{x_3} u_1 \quad (8)$$

$$\dot{x}_3 = F(t) = u_1 \quad (9)$$

x_1 , x_2 y x_3 son biomasa, sustrato y volumen respectivamente; y u es el flujo de entrada de sustrato. Dado que la entrada u puede ser de flujo constante y de flujo en incremento exponencial es necesario relacionarla con la velocidad específica de crecimiento μ , la concentración celular inicial x_0 , el volumen de operación inicial en el biorreactor v_0 , el rendimiento de biomasa sobre sustrato y la concentración de sustrato de entrada s_i , mostrado en la ecuación 10.

$$F(t) = \frac{\mu x_0}{Y_{xs} s_i} \exp(\mu t) \quad (10)$$

Esta deducción es posible si se considera que la fermentación se realiza inicialmente en cultivo lote hasta alcanzar una concentración celular alta, y posteriormente comenzar una fermentación en cultivo lote alimentado con entrada exponencial, considerando una velocidad específica de crecimiento constante.

IV. METODOLOGÍA

Control de motor de bomba peristáltica

Una de las maneras de controlar el flujo de una bomba peristáltica es controlar la velocidad del motor dado que el motor a utilizar es de corriente directa, la estrategia de control que se utiliza convencionalmente es un PID [12]. El diagrama de bloques que ilustra esta estrategia de control se encuentra en la figura 3. Se observa la estructura general de un controlador PID aplicado a un motor eléctrico. Así también en la Figura 3 se muestra una referencia de tipo exponencial, que lleva a cabo el modo de operación cultivo lote alimentado exponencialmente.

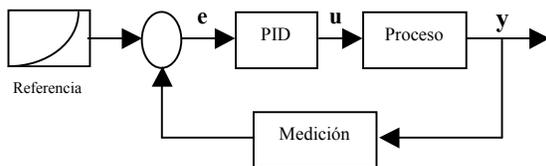


Figura 3. Estructura del controlador PID y la planta a controlar.

A lo largo de una fermentación es poco probable aplicar una ley de control al sistema, que en este caso es el medio de cultivo, dado que los parámetros son diversos y distintos de microorganismo a microorganismo (como la velocidad específica de crecimiento, el rendimiento de sustrato sobre biomasa, constante de saturación, etc.) sin contar que los

sistemas biológicos son un tanto impredecibles [13,14,15]. Aún con las diversas limitaciones que se tiene al manejar sistemas biológicos, se pueden dar las condiciones adecuadas al medio de cultivo para dar una respuesta acorde a los modelos establecidos por las ecuaciones 1 y 3, si se mantienen los parámetros de crecimiento celular y manejando la fermentación en el biorreactor como cultivo lote alimentado exponencial. El esquema del sistema de control aplicado a la bomba peristáltica, que ofrece como entrada un flujo volumétrico de entrada de sustrato al medio de cultivo se muestra en la figura 4.

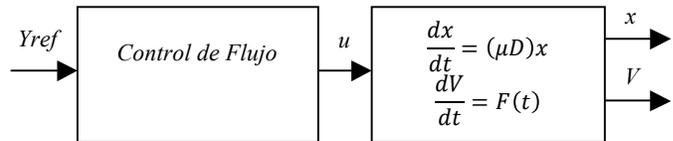


Figura 4. Esquema del sistema de control como entrada al biorreactor de una bomba peristáltica.

Bomba peristáltica

Se utilizó una bomba peristáltica Masterflex® con cabezal easy-load® y manguera de neopreno de diferentes diámetros, en la Tabla 2 se presenta un ejemplo de cómo se caracteriza la bomba peristáltica en función del voltaje para obtener un flujo con un diámetro dado de manguera de neopreno. De acuerdo al tipo de manguera se debe usar un cabezal, aunque actualmente existen cabezales universales para varios diámetros de mangueras.

Tabla 2. Ejemplo de la caracterización de la bomba peristáltica.

Voltaje (V)	Manguera Masterflex® de neopreno (calibre)	Diámetro interior (mm)	Diámetro exterior (mm)	Flujo (l/h)
3.6	25	4.5	8	1.612
2.5	25	4.5	8	0.502
1.7	14	5	1.5	0.021

Cultivo en lote alimentado exponencial

Los parámetros utilizados en las simulaciones se obtuvieron de un cultivo alimentado exponencial de *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* K63, bacteria productora de un polisacárido de uso alimenticio [16]. Los parámetros cinéticos se observan en la Tabla 3 y las condiciones de operación se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 3. Parámetros de simulación.

Parámetros	Valor
Velocidad específica de crecimiento $\mu(h^{-1})$	0.05
Rendimiento celular $Y_{xs} (gS/gX)$	0.5
Constante de saturación $K_s (gS/l)$	0.37

Tabla 4. Condiciones de operación.

Condiciones de operación	Valor
Concentración de sustrato de entrada S_i (gS/l)	250
Biomasa inicial X_0 (gX/l)	4.5
Volumen inicial V_0 (l)	13.9

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

La Figura 5 muestra la cédula de alimentación que debe ser alimentada con la bomba peristáltica para mantener una velocidad específica de crecimiento constante de $\mu=0.05 \text{ h}^{-1}$. Para garantizar el incremento en el flujo la bomba, se debe utilizar la manguera y el cabezal adecuados que cubran todo el rango de flujo requerido hasta el volumen final del proceso.

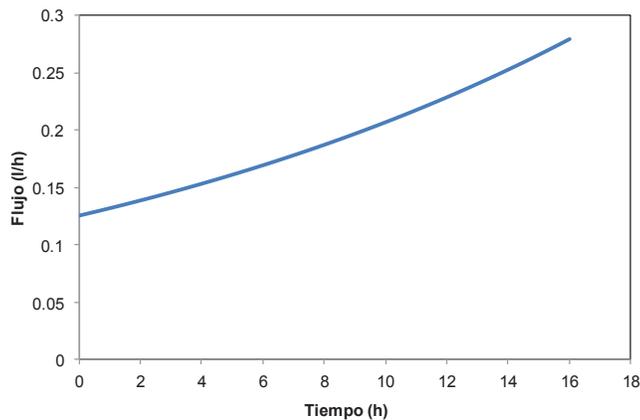


Figura 5. El cultivo alimentado exponencialmente de *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* K63, $\mu=0.05 \text{ h}^{-1}$.

Los resultados obtenidos a la salida del fermentador para volumen, se observan en la figura 6, en donde se comparan resultados de simulación y con los experimentales del cultivo de *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* K63. Las desviaciones con respecto al volumen experimental se deben a que durante el cultivo se adicionan además del sustrato, antiespumante (para el control de la espuma), solución ácida y solución alcalina (para control del pH) y también se deben de considerar las tomas continuas de muestra.

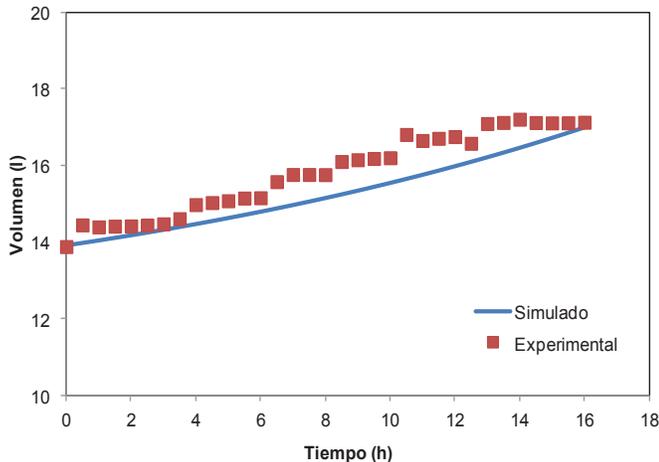


Figura 6. Evolución del volumen experimental y simulada para el cultivo alimentado exponencialmente de *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* K63, $\mu=0.05 \text{ h}^{-1}$.

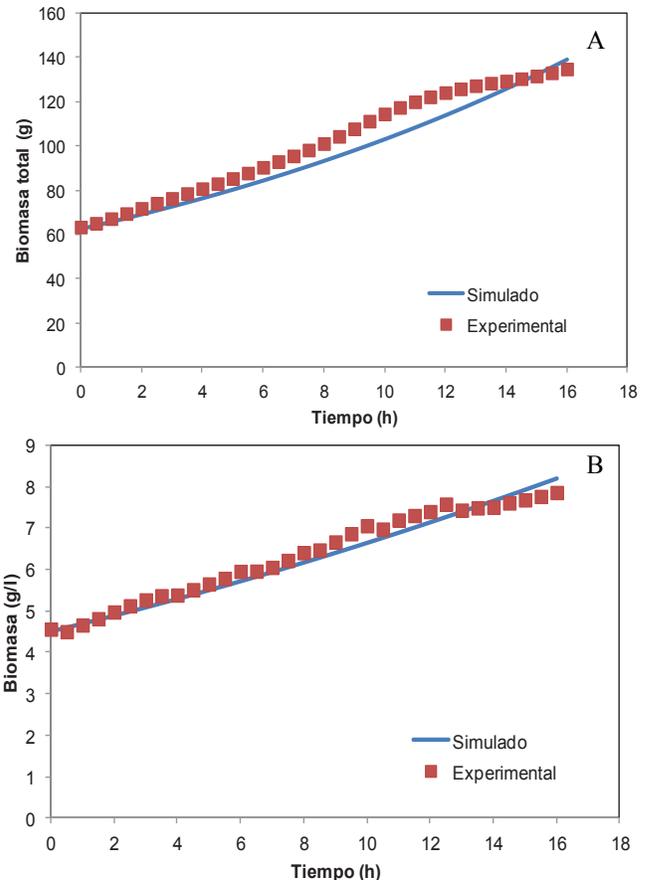
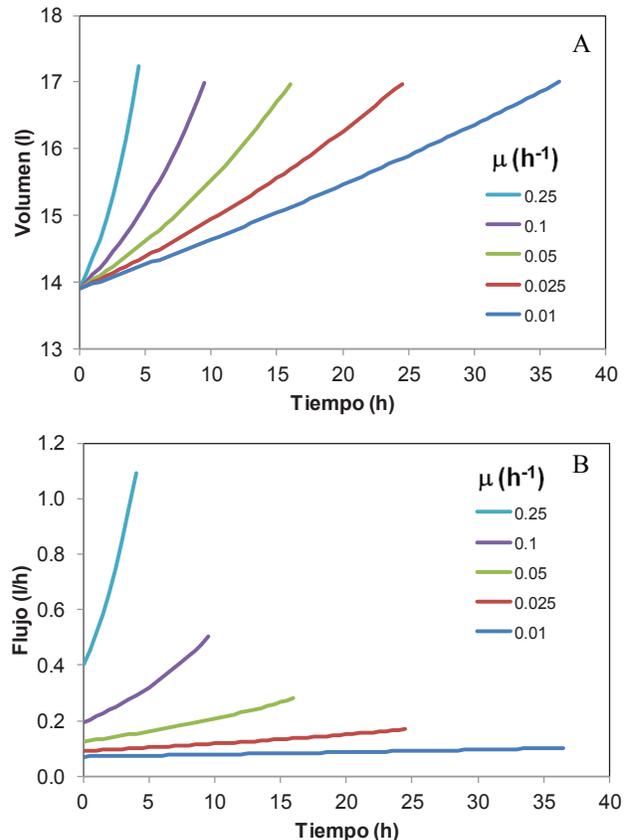


Figura 7. Cultivo alimentado exponencialmente de *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* K63, $\mu=0.05 \text{ h}^{-1}$. A) Evolución de la biomasa total y B) Concentración de biomasa total.



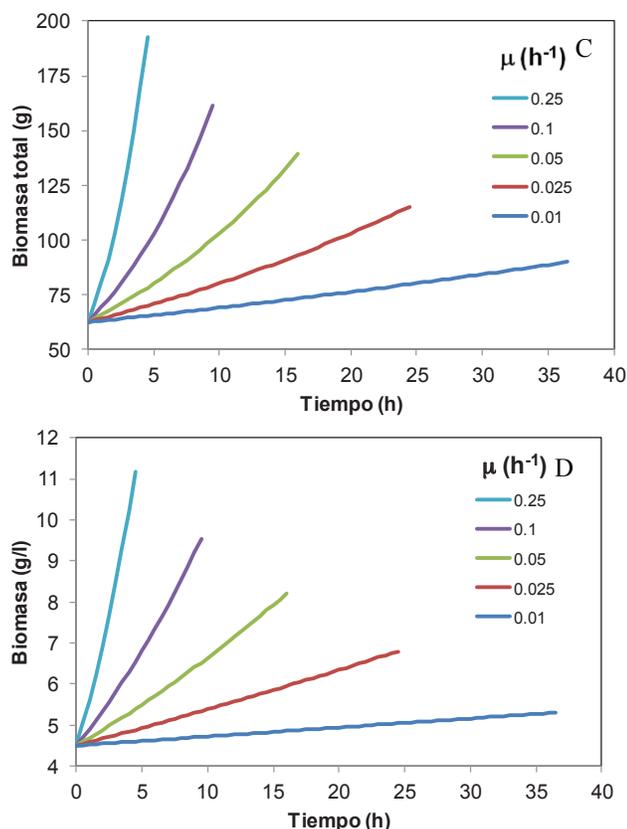


Figura 8. Cultivo alimentado exponencialmente de *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* K6. Evolución del A) Flujo, B) Volumen, C) Biomasa total y D) Concentración de biomasa.

La biomasa total se ajusta de manera adecuada pero para la concentración de biomasa de *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* K63 hay una mejor aproximación del simulado al experimental, mostrado en la Figura 7.

Se realizaron simulaciones para diferentes velocidades específicas de crecimiento, Figura 8, se observó cómo se incrementa el flujo a altas velocidades específicas de crecimiento alcanzando el volumen final más rápido, lo cual implica una menor duración del proceso. Con respecto a la biomasa tanto la total como la concentración son mayores a altas velocidades específicas de crecimiento.

La dificultad de automatizar y controlar los cultivos alimentados radica en las múltiples variables que se deben considerar que van desde la velocidad de la bomba peristáltica, el cabezal, el tipo de manguera, el material de la manguera, el microorganismo utilizado (parámetros cinéticos), el volumen inicial y final de operación y la velocidad específica de crecimiento deseada.

VI. LISTA DE SÍMBOLOS

$F, F(t)$: Flujo de alimentación de entrada al biorreactor.
 S : Sustrato.
 X : Biomasa.
 V : Volumen de operación
 M : Masa acumulada en el sistema.

M_i : Masa de entrada al sistema.
 M_o : Masa de salida del sistema.
 R_G : Masa generada dentro del sistema.
 R_C : Masa consumida dentro del sistema.
 x : Biomasa.
 s : Sustrato limitante.
 D : Índice de dilución.
 μ : Velocidad específica de crecimiento.
 $Y_{X/S}$: Rendimiento de biomasa ante sustrato.
 s_i : Concentración de sustrato inicial.
 V : Volumen de operación del biorreactor
 $F(t)$: Flujo de entrada de sustrato.
 μ_{max} : Velocidad máxima de crecimiento celular.
 k_s : Constante de saturación.
 x_0 : Concentración celular inicial.
 v_0 : Volumen de operación inicial en el biorreactor.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ramírez O.T. (2004) Capítulo IX Ingeniería bioquímica (En: Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna, Bolívar Zapata F.G, ed.). El Colegio Nacional. p. 249-296.
- [2] Quintero Ramirez R. (1990) Ingeniería Bioquímica, teoría y aplicaciones. Editorial Alhambra Mexicana. Primera edición.
- [3] Nielsen J., Villadsen J., Lidén G. (1994). *Biorreaction Engineering Principles*. Second edition. Academic Plenum Publishers.
- [4] Farrés J., Carminal G., López-Santin J. (1997) Influence of phosphate on rhamnase-containing exopolysaccharide rheology and production by *Klebsiella* I-714. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 522-527.
- [5] Peiris P. S., Dlamini A. M., Bavor H. J. (1998) Optimization of bioprocess conditions for exopolysaccharide production by *Klebsiella oxytoca*. *Word J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 917-919.
- [6] Ruiz Leza H.A. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería química.* 6 (1): 33-40.
- [7] Doran P.M. (1995). *Process Engineering Principles*. Academic Press.7
- [8] Haberman R. (1998). *Mathematical models, mechanical vibrations, population dynamics, and traffic flow. Classics in applied mathematics* by the Society for Industrial and applied Mathematics.
- [9] Ingham J., Dunn I. J., Heinzle E., Pfenosil J. E. (2000). *Chemical Engineering Dynamics*. Wily-VCH. Second edition.
- [10] Astrom K., Hagglund T. (AÑO). *PID Controllers: Theory, Desing, and Tunning*. Second Edition.
- [11] Najafpour G.D. (2007). *Biochemical Engineering and Biotechnology*. First edition. Elvieser.
- [12] Bolton W. (2002). *Control Systems*. Elsevier Ltd.
- [13] Harms P., Kostov Y., Rao G. (2002). *Bioprocess monitoring*. *Current Opinion in Biotechnology.* 13:124-127.
- [14] Alford J.S. (2006). *Bioprocess control: Advances and challenges*. *Computer and chemical engineering* 30:1464-1475. ScienceDirect.
- [15] Wang Y., Chu J., Zhuang Y., Wang Y., Xia J., Zhang S. (2009). *Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology*. *Biotechnology Advances* 27: 989-995.
- [16] Ramirez Castillo M.L., Uribebarra J.L. (2006) Improved process for exopolysaccharide production by *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* by a fed-batch strategy. *Biotechnology Letters.* 26 (16): 1301-1306