

ESTIMACION DE TASA DE CRECIMIENTO EN UN PROCESO DE PRODUCCION DE PHB

Jamilis, Martín; Garelli, Fabricio; De Battista, Hernán ; Mozumder, Md Salatul Islam

Grupo de Control Aplicado - Instituto LEICI, Dto. de Electrotecnia, Facultad de Ingeniería, UNLP.
Calle 48 y 116 s/n, La Plata, Buenos Aires.
martin.jamilis@ing.unlp.edu.ar

Palabras clave: bioprocesos, control, bioplásticos, observadores, PHB

INTRODUCCIÓN

Nuevas alternativas a los plásticos sintéticos han sido materia de investigación reciente como es el caso de los biopolímeros [1]. Una de estas líneas apunta al uso de microorganismos para producir materiales de fácil degradación a partir de residuos industriales como glicerol y bagazo de caña de azúcar. En particular es de interés la producción de polyhydroxyalkanoatos (PHA), poliésteres que pueden ser obtenidos e fermentaciones industriales [2, 3]. El Polyhydroxybutyrato (PHB) es un PHA que puede ser producido por la bacteria *Cupriavidus necator* como producto intracelular, siendo totalmente biodegradable y biocompatible. La producción de PHB mediante *C. necator* se puede realizar en procesos fed-batch de dos etapas [4, 5]. La primer etapa del proceso, o fase de crecimiento, consiste en producir la mayor cantidad de células posible. Debido a que el nitrógeno inhibe la producción de PHB, poco producto es obtenido en esta etapa. La segunda etapa, o fase de producción, consiste en producir la mayor cantidad de PHB posible mientras se mantiene constante la masa celular (biomasa residual). Para alentar la producción se somete a las bacterias a una hambruna de nitrógeno, es decir, se quita la alimentación de nitrógeno y se permite que este se agote. Cabe aclarar que la producción en esta etapa es no asociada al crecimiento. El objetivo de cada etapa es maximizar la productividad de crecimiento y de producción de PHB.

A pesar de que a escala de laboratorio es posible identificar las concentraciones de sustrato óptimas, las incertidumbres en modelos y variabilidad en los metabolismos de los microorganismos hace que muchas veces se operen los procesos en regimenes subóptimos o el proceso se inestabilice [6]. Una solución a estos problemas es operar al sistema mediante control de lazo cerrado, lo que implica tener información on-line de las variables del proceso, en particular de las tasas específicas de crecimiento y producción, que son las que se interesan controlar y optimizar. Como estas variables no se pueden medir con ningún sensor, es necesario estimarlas en base a la información disponible del proceso, por ejemplo mediante observadores de estados.

En estudios previos sobre procesos de PHB se han propuesto observadores para estimar concentraciones del proceso en base a mediciones de sustrato [7, 8, 9]. En [10] también se estiman tasas de crecimiento a partir de mediciones de biomasa. En [11] se utiliza un filtro de Kalman extendido para estimar varias concentraciones del proceso usando análisis de gases de entrada, salida y disueltos. El inconveniente es que muchas veces se asume que se dispone de sensores que no siempre están disponibles en un laboratorio típico. La medición de sustrato no siempre está disponible, además se dificulta en procesos que usan desechos como fuente de carbono. Por otra parte las mediciones on-line de biomasa se dificultan al trabajar con

alta concentración celular como en este caso, ya que no se puede medir densidad óptica. Se pueden usar sensores capacitivos pero su costo es elevado, así como el de los equipos de análisis de gases.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de observadores de estados para estimar las tasas de crecimiento en procesos de producción de PHB utilizando la instrumentación disponible en un laboratorio standard. Se propone un esquema conmutado de dos observadores específicamente diseñados para procesos de producción de PHB de alta densidad celular. Durante las primeras horas del proceso, cuando la densidad celular es baja, se utiliza un observador exponencial basado la medida de densidad óptica. Una vez que esa medida deja de ser viable por la alta densidad de células se cambia a un observador asintótico que se basa en la medida de concentración de fuente de nitrógeno obtenida a partir del lazo de control de pH. Se debe recordar que estos observadores se utilizan solo en la fase de crecimiento del proceso.

1. MODELO DEL PROCESO

El modelo dinámico que describe el proceso fed-batch de producción de PHB mediante *C. Necator* es el descrito por las ecuaciones (1) a (4) [12]. La nomenclatura del modelo se describe en la tabla 1. El PHB es un producto intracelular y forma parte de la biomasa total. En este trabajo se llama biomasa residual a la porción de biomasa que no constituye producto (membrana celular, organelas, citoplasma) y es tenida como una variable independiente y separada del producto.

$$\dot{X} = (\mu_{xs} + \mu_{xp} - D)X \quad (1)$$

$$\dot{S} = -\left(\frac{\mu_{xs}}{y_{xs}} + \frac{\mu_{ps}}{y_{ps}}\right)X - DS + D_s S_{in} \quad (2)$$

$$\dot{N} = -\frac{\mu_{xs} + \mu_{xp}}{y_{xn}}X - DN + \eta D_n N_{in} \quad (3)$$

$$\dot{P} = \left(\mu_{ps} - \frac{\mu_{xp}}{y_{xp}}\right)X - DP \quad (4)$$

Las variables de estado del proceso son las concentraciones de biomasa residual, fuente de carbono, fuente de nitrógeno y PHB, X , S , N y P respectivamente. Y las entradas de control del sistema son las diluciones de carbono y nitrógeno definidas como $D_s = F_s/V$ y $D_n = F_n/V$. Las tasas específicas de crecimiento μ_{xs} y μ_{xp} representan crecimiento en base a consumo de fuente de carbono y PHB respectivamente. La tasa μ_{ps} es la correspondiente a la producción del PHB en base a la fuente de carbono. Estas tasas dependen de las concentraciones de los sustratos, biomasa residual y contenido intracelular de PHB [13, 14, 15, 16, 5]. El factor η tiene en cuenta las pérdidas de fuente de nitrógeno en estado gaseoso. Este parámetro es conocido pero con cierta incertidumbre.

2. MATERIALES Y MEDIDAS DISPONIBLES

Los experimentos mostrados en este trabajo se realizaron en el *Flemish Institute for Technological Research (VITO)*, Bélgica. Se dispuso de un bioreactor de 3 litros (Applikon Biotechnology, the Netherlands), y un sistema de control EZ-control (Applikon Biotechnology, the Netherlands) para adquisición de datos, monitoreo y control. Las variables medidas on-line son el pH (AppliSens, The Netherlands, modelo Z001023551) y densidad óptica (OD) (Optek-Danulat GmbH, Germany, modelo ASD19-N-EB-01). La medida de biomasa dada por la OD es solamente válida hasta que se alcanza un valor de aproximadamente $OD = 0,6AU$, ya que en ese momento la medida satura por la opacidad del medio.

| Nombre | Descripción | Unidades |
|------------|--|--------------------|
| X | Concentración de biomasa residual | [g/l] |
| S | Concentración de fuente de carbono | [g/l] |
| N | Concentración de fuente de nitrógeno | [g/l] |
| P | Concentración de PHB | [g/l] |
| μ_{xs} | Tasa específica de crecimiento sobre fuente de carbono | [h ⁻¹] |
| μ_{xp} | Tasa específica de crecimiento sobre PHB | [h ⁻¹] |
| μ_{ps} | Tasa específica de producción de PHB | [h ⁻¹] |
| y_{xs} | Rendimiento de fuente de carbono a biomasa residual | [g/g] |
| y_{xp} | Rendimiento de PHB a biomasa | [g/g] |
| y_{ps} | Rendimiento de fuente de carbono a PHB | [g/g] |
| y_{xn} | Rendimiento de fuente de nitrógeno a biomasa residual | [g/g] |
| F_s | Caudal de fuente de carbono | [l/h] |
| F_n | Caudal de fuente de nitrógeno | [l/h] |
| V | Volumen de medio líquido en el bioreactor | [l] |
| D_s | Dilución debido a la fuente de carbono | [h ⁻¹] |
| D_n | Dilución debido a la fuente de nitrógeno | [h ⁻¹] |
| D | Dilución total ($D_s + D_n$) | [h ⁻¹] |
| S_{in} | Concentración de la fuente de carbono alimentada | [g/l] |
| N_{in} | Concentración de la fuente de nitrógeno alimentada | [g/l] |
| η | Factor de corrección para la alimentación de nitrógeno | |

Cuadro 1: Nomenclatura de constantes y variables usadas en el modelo

Se dispone en el bioreactor de un lazo de control de pH que regula el mismo en un valor de 6.8 [4], para ello se dosifica una solución de 20 % NH_4OH para incrementarlo. La misma solución sirve de fuente de nitrógeno para el microorganismo. Se ha encontrado una fuerte corrección entre la cantidad de solución usada para regular el pH y la estequiométricamente necesaria para producir el acumulado de células [4]. Esto quiere decir que mientras se mantiene el pH constante también lo hace la concentración de nitrógeno.

3. OBSERVADORES DE TASA DE CRECIMIENTO

En esta sección se presentan las ecuaciones finales de los observadores propuestos, para un análisis detallado referirse a [17].

Se propone un esquema conmutado de dos observadores para estimar la tasa específica de crecimiento. La primer hipótesis es que, dadas las condiciones de medio rico en nitrógeno de la etapa de crecimiento, la generación de producto es prácticamente nula, por lo tanto $\mu_{ps} = \mu_{xp}$. Cada observador entra en funcionamiento dependiendo de la concentración de biomasa residual que en ese momento haya en el bioreactor. Primero se plantea un observador exponencial que hace uso de la medida on-line de biomasa residual y es usado cuando la concentración de la misma es baja. Una vez que la concentración crece y la medida deja de ser viable, se hace uso de un observador asintótico hasta que termina la etapa de crecimiento. Para el planteo del observador asintótico se usa la medida de concentración de nitrógeno que se obtiene del lazo de control de pH. Dicha medida da un valor constante cuando el lazo de pH funciona correctamente.

Las ecuaciones del observador exponencial son

$$\dot{\hat{X}} = \hat{\mu}_x X - DX - k_1(X - \hat{X})X \quad (5)$$

$$\dot{\hat{\mu}}_x = k_2(X - \hat{X})X \quad (6)$$

Donde \hat{X} es la estimación de la concentración de biomasa residual y $\hat{\mu}_x$ es la estimación de la tasa de crecimiento total. k_1 and k_2 son las ganancias del observador, que deben ser ajustadas de manera que se garantice estabilidad y una convergencia rápida. El propósito del observador exponencial es hacer converger rápidamente la estimación y dar una mejor condición inicial al observador asintótico, cuya convergencia es más lenta.

Las ecuaciones del observador asintótico son

$$\dot{\hat{z}} = -D\hat{z} + D_n N_{in} \hat{\eta} \quad (7)$$

$$\hat{\mu}_x = \frac{D_n N_{in} \hat{\eta} - DN}{\hat{z} - N} \quad (8)$$

donde $\hat{\eta}$ es el valor esperado de η y z es un cambio de variables dado por:

$$z = \frac{X}{y_{xn}} + N \quad (9)$$

Este observador tiene una convergencia más lenta que el asintótico, que no se puede ajustar por diseño. Sin embargo, dada una condición inicial, el error de estimación queda acotado al error de la condición inicial. Detalles del diseño de observadores asintóticos como el cambio de variables anterior pueden consultarse en [18].

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

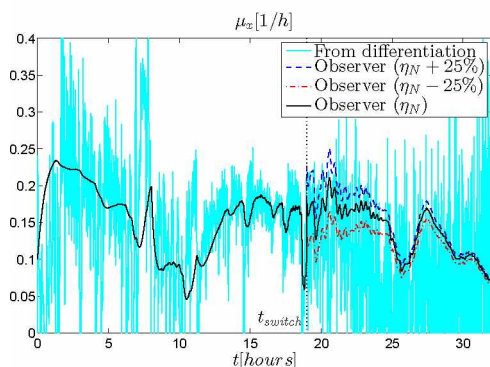
En esta sección se realiza la validación experimental de los observadores. Se muestran resultados para dos experimentos distintos. El cambio de un observador al otro se realiza cuando la concentración de biomasa residual alcanza los 7,67g/l (0.6 AU). Las Figuras 1a y 1b muestran las tasas de crecimiento estimadas en cada experimento (experimentos 1 y 2 respectivamente). Para mostrar la robustez del observador asintótico se utilizaron varios valores para el parámetro η , el nominal mas variaciones del 25%. La curva negra de cada gráfico corresponde a la estimación de μ_x cuando η está en su valor nominal, las curvas roja y azul corresponden a las estimaciones con variaciones de -25% y +25% en el coeficiente η , respectivamente. Se incluye para comparar una referencia ruidosa para la tasa de crecimiento en color cian, obtenida al derivar la medida de OD y reemplazar en la Ecuación (1). La discrepancia entre la referencia y las estimaciones en las últimas horas de la etapa de crecimiento se debe a que el sensor de OD satura y esa referencia deja de ser valida. Se puede observar en las figuras que la estimación dada por el observador exponencial converge rápidamente y no presenta variaciones con el valor de η . En el instante de cambio, marcado como t_{switch} , aparecen diferencias en la estimación dada por el observador asintótico, sin embargo se puede ver que a medida que pasa el tiempo las estimaciones se empiezan a acercar y converger al mismo valor.

Las Figuras 1c y 1d muestran las concentraciones de biomasa residual, glucosa, nitrógeno y PHB para los experimentos 1 y 2 respectivamente. Se puede notar también que la respuesta del observador es satisfactoria a pesar de las variaciones en la concentración de nitrógeno.

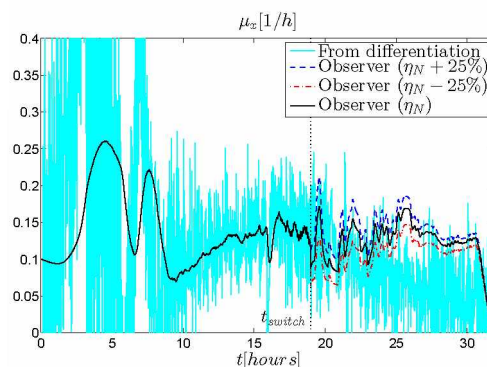
5. CONCLUSIONES

En este trabajo se propone un esquema conmutado de observadores para estimar la tasa específica de crecimiento en procesos de producción de PHB con alta concentración celular en un escenario real. Mediante resultado experimentales se validaron los observadores propuestos.

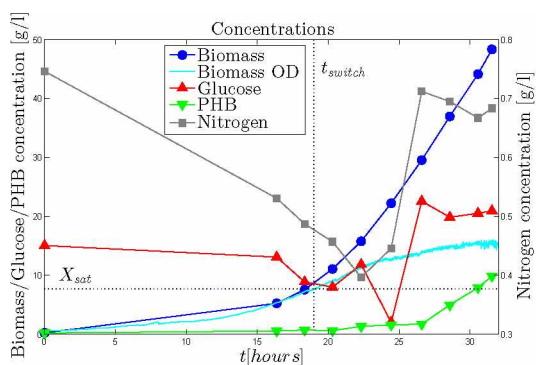
El observador exponencial, si bien no presenta novedad, es un ejemplo de como se puede conseguir rápida convergencia en las primeras horas con un diseño simple. Además permite aprovechar la medida de OD disponible mientras está es válida. El observador asintótico



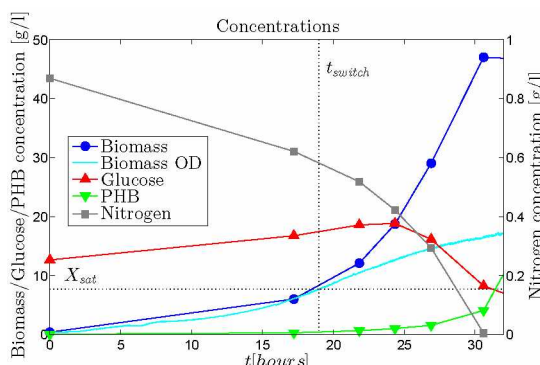
(a) Respuesta del observador para distintos valores de η . Experimento 1



(b) Respuesta del observador para distintos valores de η . Experimento 2



(c) Concentraciones del proceso para experimento 1



(d) Concentraciones del proceso para experimento 2

Figura 1: Resultados experimentales

propuesto es capaz de estimar la tasa de crecimiento sin medida de biomasa, la cual no está disponible en este caso. El mismo es robusto ante incertidumbre en el coeficiente de corrección por pérdidas gaseosas η y a variaciones en la concentración de nitrógeno. Su diseño es simple y puede ser implementado con facilidad en cualquier controlador de laboratorio o industrial.

Las ideas presentadas en este trabajo dieron lugar a una publicación en revista internacional [17]: *Specific growth rate observer for the growing phase of a Polyhydroxybutyrate production process*, Martín Jamilis, Fabricio Garelli, Md.Salatul Islam Mozumder, Eveline Volcke y Hernán De Battista. Springer Berlin Heidelberg. 2015

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] A. Mohanty, M. Misra, and L. Drzal, "Sustainable bio-composites from renewable resources: Opportunities and challenges in the green materials world," *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 10, no. 1-2, pp. 19–26, 2002.
- [2] S. Chanprateep, "Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 110, no. 6, pp. 621 – 632, 2010.

- [3] C. Reddy, R. Ghai, Rashmi, and V. Kalia, "Polyhydroxyalkanoates: an overview," *Biore-source Technology*, vol. 87, no. 2, pp. 137 – 146, 2003.
- [4] M. S. I. Mozumder, H. D. Wever, E. I. P. Volcke, and L. Garcia-Gonzalez, "A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production," *Process Biochemistry*, vol. 49, no. 3, pp. 365 – 373, 2014.
- [5] A. Mulchandani, J. Luong, and C. Groom, "Substrate inhibition kinetics for microbial growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid by *alcaligenes eutrophus* ATCC 17697," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 30, no. 1, pp. 11–17, 1989.
- [6] D. M. Chang, "The snowball effect in fed-batch bioreactions," *Biotechnology Progress*, vol. 19, no. 3, pp. 1064–1070, 2003.
- [7] D. Dochain, "State observers for processes with uncertain kinetics," *International Journal of Control*, vol. 76, no. 15, pp. 1483–1492, 2003.
- [8] P. Cougnon, D. Dochain, M. Guay, and M. Perrier, "On-line optimization of fedbatch bioreactors by adaptive extremum seeking control," *Journal of Process Control*, vol. 21, no. 10, pp. 1526 – 1532, 2011.
- [9] S. Popova, "On-line state and parameters estimation based measurements of the glucose in mixed culture system," *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, vol. 20, no. 3, pp. 208–214, 2006.
- [10] I. Cornet, D. Dochain, B. Ramsay, and M. Perrier, "Adaptive linearizing inferential control of a PHB producing process," in *Control Applications, 1993., Second IEEE Conference on*, pp. 481–485 vol.1, 1993.
- [11] R. Große-Uhlmann and T. Bley, "A modular approach to situation identification of the dynamics of bacterial populations synthesizing poly- β -hydroxybutyrate," *Bioprocess Engineering*, vol. 21, no. 3, pp. 191–200, 1999.
- [12] M. S. I. Mozumder, L. Goormachtigh, L. Garcia-Gonzalez, H. D. Wever, and E. I. P. Volcke, "Modeling pure culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB)," *Biore-source Technology*, vol. 155, no. 0, pp. 272 – 280, 2014.
- [13] J. Villadsen, J. Nielsen, and G. Lidén, *Bioreaction Engineering Principles*. USA: Springer US, 2011.
- [14] J. Dias, L. Serafim, P. Lemos, M. Reis, and R. Oliveira, "Mathematical modelling of a mixed culture cultivation process for the production of polyhydroxybutyrate," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 92, no. 2, pp. 209–222, 2005.
- [15] J. Lee, H. C. Lim, and J. Hong, "Application of nonsingular transformation to on-line optimal control of poly- β -hydroxybutyrate fermentation," *Journal of Biotechnology*, vol. 55, no. 3, pp. 135 – 150, 1997.
- [16] A. Mulchandani, J. Luong, and A. Leduy, "Batch kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 32, no. 5, pp. 639–646, 1988.
- [17] M. Jamillis, F. Garelli, M. Mozumder, E. Volcke, and H. De Battista, "Specific growth rate observer for the growing phase of a polyhydroxybutyrate production process," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 38, no. 3, pp. 557–567, 2015.
- [18] G. Bastin and D. Dochain, *On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*. Amsterdam: Elsevier Science, 1990.