

OPTIMIZACIÓN HEURÍSTICA DE LA ALIMENTACIÓN DE UN PROCESO DE CULTIVO SÓLIDO FED-BATCH

Claudio Gelmi, Ricardo Pérez-Correa, Iván Solar.

*Depto. Ingeniería Química y Bioprocesos,
Pontificia Universidad Católica de Chile,
Casilla 306, Correo 22, Santiago, CHILE.
E-mail: perez@ing.puc.cl*

Resumen: Utilizando un modelo calibrado mediante experiencias de laboratorio, se comparó dos políticas óptimas de alimentación programada para el cultivo del hongo filamentoso *Gibberella fujikuroi* sobre sustrato sólido (CSS). La primera política consistió en una carga inicial óptima del sustrato limitante (urea) y la segunda, en una adición óptima controlada de urea. Se obtuvo diferencias de un 17% entre ambas políticas y una producción de metabolito superior al 100% con respecto a experiencias de laboratorio, las cuales utilizan una carga de urea menor.

Abstract: The productivities obtained by two urea feed policies in a simulated solid substrate fermentation (SSF) process were compared. The model used was calibrated with laboratory data obtained during the cultivation of the filamentous fungi *Gibberella fujikuroi*. The first policy considers an optimal single initial load of the limiting substrate (urea), while the second comprises a heuristically optimised continuous addition of urea. Both policies, which used a higher level of urea than the nominal case, increased the production of the metabolite of interest (GA_3) over 100%. In addition, the second policy was 17% more effective than the first one

Keywords: Automatic Control, Heuristic, Modelling, Optimisation, SSC process.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de Giberelinas, hormonas naturales encargadas de promover el crecimiento y división celular en plantas, encuentran hoy múltiples aplicaciones en el campo agrícola, especialmente en ciertas variedades de uva de mesa. Dentro del grupo de las Giberelinas, la más conocida por su amplio uso industrial es el GA_3 o Ácido Giberélico. Por otro lado, estas hormonas se producen comercialmente, mediante el cultivo sumergido del hongo filamentoso *Gibberella fujikuroi*. El presente trabajo centra su estudio en el cultivo óptimo de este hongo en bioreactores fed-batch de sustrato sólido.

El cultivo en sustrato sólido (CSS) se refiere al crecimiento microbiano y a la formación de productos sobre y en el interior de una matriz sólida, bajo condiciones de humedad restringida. Presenta una serie de ventajas con respecto a las fermentaciones en medio líquido, tales como: mayor productividad, menores costos de inversión y operación, obtención de productos nuevos o con atributos especiales y generación limitada de efluentes (Ryoo, 1990). Sin embargo, ha habido escasa aplicación industrial de esta tecnología debido a la dificultad en modelar este tipo de procesos, lo cual retarda y complica las aplicaciones y desarrollos en control automático y

optimización, alejando con ello el escalamiento del proceso.

Estudios experimentales recientes, de alimentación fed-batch en reactores CSS de laboratorio, han mostrado resultados muy alentadores en cuanto a maximizar la producción de metabolitos (Bandelier *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 1997).

Con el fin de mejorar la productividad de GA₃, en este trabajo se comparan dos políticas optimizantes de alimentación para el nutriente limitante urea; utilizando el paquete MATLAB®.

2. MODELACIÓN DEL PROCESO

Se utilizó un modelo constituido por cinco ecuaciones diferenciales no lineales. El modelo es capaz de reproducir la evolución del crecimiento del hongo y la degradación de los nutrientes glucosa y urea, siendo este último limitante. Además, el modelo simula la evolución de la concentración del Ácido Giberélico, metabolito secundario que sólo se manifiesta cuando la concentración del nutriente nitrogenado es baja (Muñoz y Agosin, 1993).

2.1 Ecuaciones de Balance

a) La evolución de la biomasa viva queda definida por un balance de masa dinámico en el reactor, considerando una tasa de crecimiento específica y un término de muerte del hongo.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - k_d \cdot X \quad (1)$$

b) El modelo supone que el nutriente nitrogenado limitante, urea, se descompone a un derivado de ésta (*Nitrógeno Intermediario, ejemplo; amonio*) el cual posteriormente se incorpora a la biosíntesis de compuestos nitrogenados (Griffin, 1981; Lehninger *et al.*, 1993), siguiendo una cinética de primer orden.

$$\frac{dU}{dt} = F_U - k \cdot U \quad (2)$$

$$\frac{dN_I}{dt} = k \cdot U - \mu \cdot \frac{X}{Y_{X/N_I}} \quad (3)$$

En la ecuación (2) el término F_U representa la alimentación fed-batch de urea.

c) La cinética de degradación de glucosa está dada por la siguiente expresión, que incluye el consumo por crecimiento y mantención.

$$\frac{dG}{dt} = -\mu \cdot \frac{X}{Y_{X/G}} - m_G \cdot X \quad (4)$$

d) La tasa neta de producción de Ácido Giberélico está representada por un término de producción específica, el cual sigue una forma típica de inhibición por sustrato (Pastrana *et al.*, 1995) y un término de degradación en medio acuoso (Pérez *et al.*, 1996), ya que se supone que el GA₃ es continuamente excretado por el hongo.

$$\frac{dP}{dt} = \beta \cdot X - k_P \cdot P \quad (5)$$

La integración de las ecuaciones diferenciales fue realizada mediante un algoritmo corrector/predicor Runge-Kutta de 4º/5º orden (función ODE45 de MATLAB®).

2.2 Ecuaciones constitutivas.

a) *Velocidad Específica de Crecimiento* μ [1/hr]:

En general en fermentación sólida se modela el crecimiento de biomasa con una curva logística. Ésta es más apropiada para describir la evolución de biomasa en la etapa de crecimiento. Sin embargo, la producción de Ácido Giberélico comienza en la fase estacionaria. Luego es necesario modelar la evolución de la biomasa en condiciones de limitación de nutrientes, carbono y nitrógeno, en el medio. El término $k_N \cdot X$ utilizado en el modelo de Contois representa las limitaciones de transferencia de masa del nitrógeno intermediario que afectan el crecimiento (Menezes *et al.*, 1994). La dependencia de μ con la glucosa, se ajusta con una típica relación de Monod.

$$\mu = \mu_m \cdot \left(\frac{N_I}{k_N \cdot X + N_I} \cdot \frac{G}{K_G + G} \right) \quad (6)$$

b) *Producción Específica de GA₃* β [1/hr]:

Esta tasa es inhibida por el nitrógeno intermediario.

$$\beta = \frac{N_I \cdot \beta_{etam}}{\gamma + N_I + K_i \cdot N_I^2} \quad (7)$$

2.3 Calibración.

Mediante experiencias en columnas de laboratorio (31°C, en soporte inerte) y utilizando datos registrados en la literatura (Saucedo *et al.*, 1994; Menezes *et al.*, 1994), se ajustaron los parámetros más importantes del modelo. El modelo reproduce razonablemente bien la evolución de las variables principales.

3. ESTRATEGIAS DE OPTIMIZACIÓN

3.1 Descripción del Problema

La producción neta de Ácido Giberélico depende de la concentración de biomasa, la tasa específica de producción de GA_3 y de su cinética de degradación. Si el Ácido Giberélico no se descompusiera y el sustrato fuera inerte, la técnica obvia para maximizar la producción sería lograr la mayor concentración posible de biomasa y luego mantener el cultivo en el nivel óptimo de Nitrógeno. Sin embargo, existe una serie de factores que impone un límite al tiempo total del cultivo. Estos son la descomposición del GA_3 en el medio, la degradación del sustrato, que hace de soporte del hongo, y la facilidad con que este cultivo se contamina con bacterias y levaduras. Estudios de laboratorio y planta piloto, recomiendan un tiempo máximo de cultivo de 150 hrs.

Dada esta limitante, la estrategia mencionada anteriormente, no es aplicable, pues el cultivo tomaría mucho tiempo en llegar al nivel máximo de biomasa. Luego, se debe diseñar una estrategia que logre un nivel de biomasa óptimo; lo suficientemente alto para lograr una producción razonable de Ácido Giberélico, pero en que el cultivo no tome mucho tiempo en llegar a ese nivel. De lo anterior se desprende que el nivel máximo de biomasa y el instante de tiempo en que se obtiene, son críticos. La carga inicial de urea determina ambos.

En resumen, podemos decir que el problema de optimización consiste en llegar al máximo nivel de GA_3 al cabo de 150 hrs. de cultivo, definiendo el nivel inicial de urea y su evolución en el medio durante el cultivo. Para lograr este objetivo, en este trabajo se proponen y evalúan dos políticas de alimentación para el nutriente urea.

3.2 Carga Inicial Fija

La política de alimentación N°1, consistió en determinar una carga inicial de urea que maximiza el contenido de Ácido Giberélico al cabo de 150 hrs de cultivo. El problema se resuelve numéricamente utilizando la rutina FMINU de MATLAB®, la cual requiere de un punto inicial para realizar las iteraciones. Se probó con diferentes valores iniciales, para evitar óptimos locales.

3.3 Carga Inicial y Alimentación Continua

La política de alimentación N°2, de origen heurístico, comprende dos etapas. Primero se carga el reactor con un nivel dado de urea, y luego, cuando se alcanza la tasa de producción máxima, se comienza a agrega

urea en forma continua para mantener esta tasa lo más parecida al nivel máximo.

En la primera etapa, para calcular el nivel inicial en forma óptima, se define la productividad como la tasa neta de producción dividida por el tiempo. Así, se encuentra por prueba y error, aquel nivel inicial de urea que genera el nivel máximo de productividad. De esta manera se evita que la optimización genere tiempos de cultivo muy grandes.

En la segunda etapa, una vez alcanzada la tasa de producción máxima, el flujo de urea se determina a través de un algoritmo de control proporcional que tiende a mantener el proceso en un nivel de producción neta constante. El control, así como el error del controlador proporcional se describen en las siguientes ecuaciones:

$$e = \left| \left(\frac{dP}{dt} \right)^* - \frac{dP}{dt} \right| \quad (8)$$

$$u = k_c \cdot e \quad (9)$$

Mediante el optimizador FMINU de MATLAB®, se encuentra el valor de k_c (ec. 9) que maximiza la concentración de Ácido Giberélico al cabo de 150 hrs. de cultivo. Estos pasos se repitieron varias veces, para asegurar una solución óptima global del problema. No se resolvió el problema de optimización en forma simultánea, pues la solución numérica converge muy lentamente.

En el cálculo del flujo de urea, se toma el error absoluto para evitar flujos negativos y simplificar la solución numérica. Así, se alimenta urea en forma continua sólo si el error es distinto de cero. Además, una definición tradicional del error, inestabiliza el sistema controlado, generando flujos crecientes de urea.

Para evitar que la concentración de biomasa se vea afectada por niveles bajos de glucosa, éstos se consideraron constantes a partir de las 50 horas de cultivo. En la práctica, se puede implementar un control automático de adición de glucosa para lograr este nivel constante.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las experiencias de laboratorio se utiliza normalmente niveles de urea inicial iguales a $5,5 \cdot 10^{-3}$ [gr/gr s.i.] (que corresponde a una relación C/N = 40), logrando con ello concentraciones de Ácido Giberélico cercanas a $4,5 \cdot 10^{-3}$ [gr/gr s.i.], al

cabo de 150 hrs; este se considera el caso nominal en este trabajo.

Utilizando la política N°1, se logra una concentración máxima de Ácido Giberélico de $8,1 \cdot 10^{-3}$ [gr/gr s.i.], con una carga inicial de urea igual a $9,6 \cdot 10^{-3}$ [gr/gr s.i.] ($C/N = 23$). Es decir, se aumentó la producción de hormona en un 79 % con respecto al caso nominal. La política N°2 arrojó resultados aún mejores, alcanzando una concentración final de $9,4 \cdot 10^{-3}$ [gr GA₃/gr s.i.]; un 17% más alto que la política N°1 y un 110% mayor que el caso nominal. En este caso, la carga inicial óptima de urea fue de $7,9 \cdot 10^{-3}$ [gr/gr s.i.] ($C/N = 28$) y el valor óptimo para k_c fue de 0,337 [gr U/gr GA₃].

En la Fig. 1 se puede apreciar como evoluciona la concentración de biomasa en los tres casos mencionados. La política N°2 logró mantener la concentración de biomasa aproximadamente constante en su nivel máximo, gran parte del cultivo, a diferencia de la política N°1 y del caso nominal. Aunque el nivel de biomasa máximo alcanzado por la política N°2 es menor que el alcanzado con la política N°1, esta última logró menores niveles de GA₃ al final del cultivo. Esto se debe a que con la política N°1 no se mantiene el nivel de biomasa en valores altos. Para el caso nominal, el resultado es aún peor, pues no se alcanza un nivel alto de biomasa y además este decae rápidamente una vez alcanzado el máximo. El descenso de las curvas de biomasa para la política N°1 y el caso nominal se deben a la falta de nitrógeno intermediario.

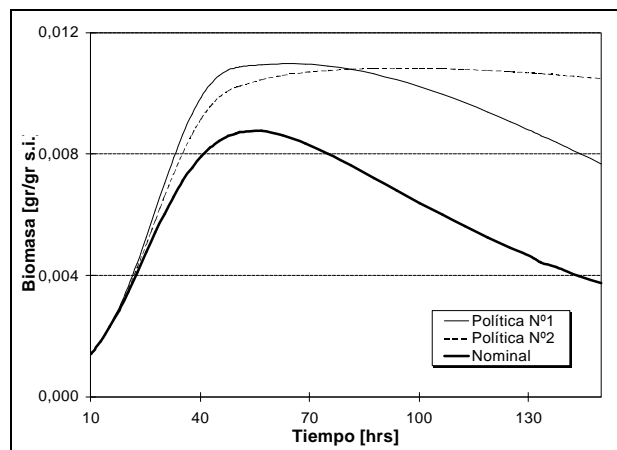


Fig. 1: Evolución de la biomasa en el tiempo para políticas N°1, N°2 y caso nominal.

La Fig. 2 muestra el perfil de la concentración de urea para las políticas 1, 2 y el caso nominal. Una alimentación continua de nutriente nitrogenado fue aplicada en la política N°2 a partir de las 49 horas. Como consecuencia de lo anterior, la concentración de urea se mantuvo relativamente constante en un

nivel muy superior a los otros casos. Para el caso nominal, los niveles de urea siempre fueron menores que el resto de las políticas.

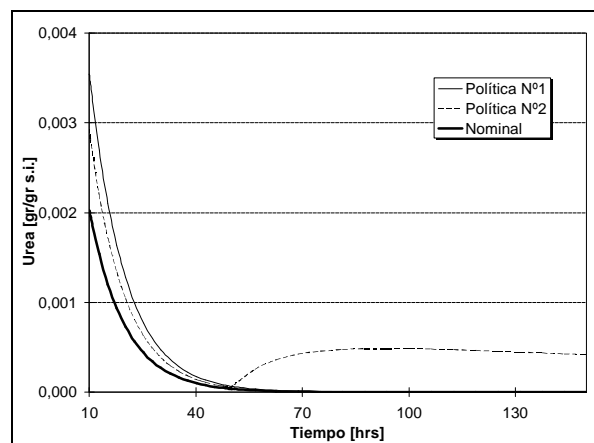


Fig. 2: Evolución de urea para políticas N°1, N°2 y caso nominal.

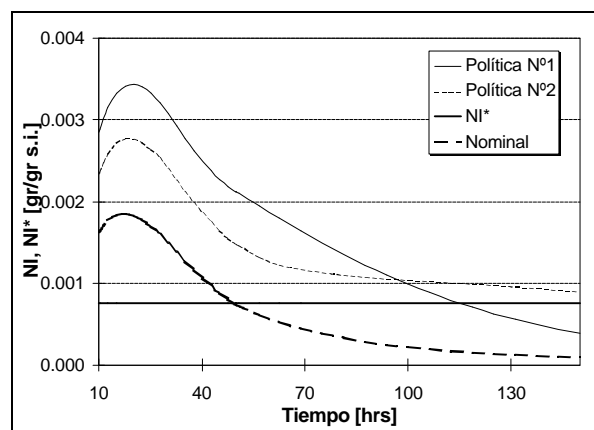


Fig. 3: Evolución de nitrógeno intermediario para políticas N°1, N°2 y caso nominal.

La línea horizontal de la Fig. 3 corresponde a la concentración de nitrógeno intermediario que maximiza la producción específica de GA₃ (Ec. 7); analíticamente posee la siguiente forma:

$$N_i^* = \sqrt{\frac{\gamma}{K_i}} \quad (10)$$

Para la política N°2 se aprecia que el nivel de nitrógeno intermediario (Fig. 3) siempre se encuentra por sobre su nivel óptimo, y a partir de las 70 hrs. se mantiene muy cercano a éste.

Por otra parte, la tasa de decaimiento del nutriente nitrogenado para la política N°1, es mayor que para el caso nominal. Esto se debe a que mientras más hongo hay en el cultivo más nitrógeno se consume. Sin embargo, como en el primer caso se parte con un nivel muy superior de nitrógeno, éste siempre se mantiene

por sobre el caso nominal.

Es importante destacar que tanto con la política N°1 como en el caso nominal, los niveles de nitrógeno bajan del nivel óptimo, aunque a tiempos diferentes.

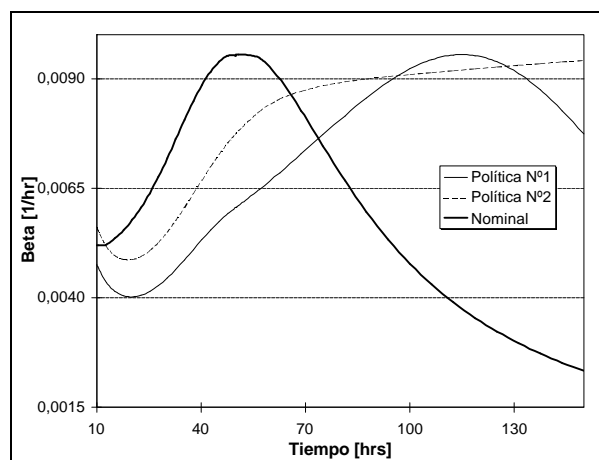


Fig. 4: Evolución de la velocidad específica de producción de Ácido Giberélico.

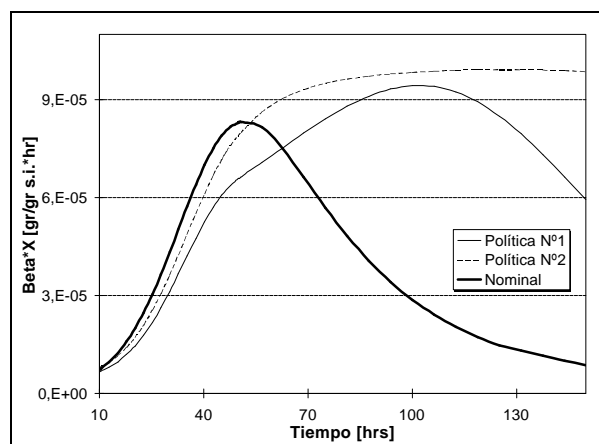


Fig. 5: Producción bruta de Ácido Giberélico.

La Fig. 4 nos permite apreciar las distintas velocidades específicas de producción de hormona (Ec. 7). Los valores máximos, para el caso nominal y la política N°1, son alcanzados cuando las curvas de nitrógeno intermediario interceptan a la curva N_I^* (Fig. 3). En cambio, en la política N°2, la velocidad específica aumenta continuamente desde las 20 hrs., debido a que los niveles de nitrógeno intermediario se van acercando al valor óptimo. El caso nominal es el primero en alcanzar el valor máximo para la velocidad específica, debido a que su concentración de nitrógeno intermediario alcanza el valor óptimo antes que las políticas N°1 y N°2.

Por otro lado, la producción bruta de Ácido Giberélico (Fig. 5), que corresponde a la multiplicación de $\beta \cdot X$, indica la cantidad total de hormona producida, pero no considera el efecto de degradación de GA_3 .

En la Fig. 5 se puede apreciar que las mayores tasas de producción se alcanzan con la política N°2. Lo anterior se debe a las altas concentraciones de biomasa y velocidad específica de producción de hormona, mantenidas (con esta política) durante la mayor parte del cultivo. Es interesante destacar como en el caso nominal la tasa de producción decae rápidamente; producto de los fuertes descensos en la concentración de biomasa (Fig. 1) y en la velocidad específica de crecimiento (Fig. 4).

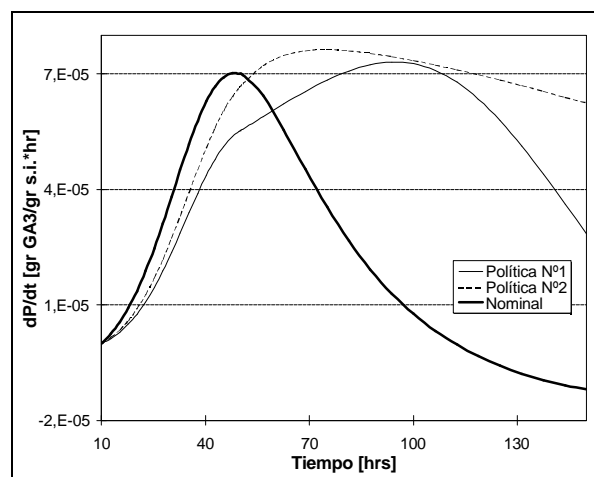


Fig. 6: Tasa neta de producción de GA_3 .

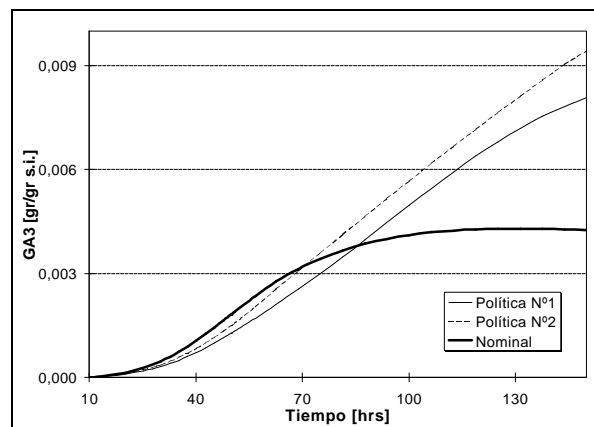


Fig. 7: Evolución de la concentración de GA_3 .

La tasa neta de producción de GA_3 (Fig. 6) incorpora la degradación de hormona. Debido a lo anterior, las gráficas poseen una forma similar a la Fig. 5, pero los valores máximos alcanzados no superan a aquellos logrados por la producción bruta de Ácido Giberélico. Además, para el caso de la política N°2, el efecto de la degradación de GA_3 se aprecia más claramente hacia el final del cultivo. No se puede contrarrestar la degradación (para mantener el alto nivel de producción neta) introduciendo más urea, puesto que el nivel de N_I está por encima del nivel óptimo. Si se pudiera mantener el nivel de N_I en su nivel óptimo, para el caso nominal y la política N°1, se alcanzarían

niveles de Ácido Giberélico significativamente mayores. De esta manera se tendría un β mayor y un más alto nivel de biomasa.

Finalmente, la Fig. 7 representa la evolución de los niveles de hormona en el tiempo. Claramente la política N°2 alcanzó niveles más altos de GA₃, seguido de la política de carga inicial óptima. Los niveles de GA₃ alcanzados por el caso nominal fueron bajos, debido a que los niveles de biomasa y velocidad específica de producción decayeron rápidamente una vez alcanzado su máximo valor.

5. CONCLUSIONES

A través de un modelo matemático, previamente calibrado, fue posible comparar dos políticas de alimentación. La política de alimentación continua de urea permite mantener una tasa específica de producción y un alto nivel de biomasa durante gran parte del cultivo, y por ende logra los mejores resultados.

Se puede concluir que la política óptima de alimentación de urea debe tender a alcanzar en el menor tiempo posible un alto nivel de biomasa, y mantenerlo en ese nivel durante el resto del cultivo con un nivel de nitrógeno bajo.

Finalmente, es importante destacar que para que estos análisis de simulación sean confiables, el modelo debe ser validado exhaustivamente. Actualmente, en nuestros laboratorios, se está estudiando en más detalle la degradación de GA₃ en medio sólido y la muerte y autólisis de la biomasa.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto FONDECYT N° 1960360.

6. REFERENCIAS

- Bandelier, S., Renaud, R., Durand, A., (1997). Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in a aseptic pilot-scale reactor. *Process Biochemistry*. **32**, 141-145.
- Griffin, H., (1981). *Fungal Physiology*. 139-140. Wiley-Interscience Publication, New York.
- Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M., (1993). *Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega, España.
- Menezes J.C., Alves S.S., (1994). Mathematical Modelling of Industrial Pilot-Plant Penicillin-G Fed-Batch Fermentations. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **61**, 123-138.
- Muñoz, A. G., Agosin, E., (1993). Nitrogen

involvement in nitrogen control of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4317-4322.

- Pastrana, L.M., González, M.P., Torrado, A., Murado, M. A., (1995). A fed-batch culture model for improved production of gibberellic acid from a waste medium. *Biotechnol Letters*. **17**, 263-268.
- Pérez, F., Vecchiola, A., Pinto, M., Agosin, E., (1996). Gibberellic acid decomposition and its loss of biological activity in aqueous solutions. *Phytochemistry*. **41**, 675-679.
- Ryoo, D. (1990). On-line Estimation and Control in Solid Substrate Fermentation. Colorado State University.
- Tao, S., Beihui, L., Zuohu, L., (1997). Enhanced Cellulase Production in Fed-Batch Solid State Fermentation of *Trichoderma viride* SL-1. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**, 429-432.

Nomenclatura

- e: Error absoluto del controlador [gr GA₃/gr s.i.·hrs]
- F_G: Alimentación fed-batch de glucosa [gr/gr s.i.·hrs]
- F_U: Alimentación fed-batch de urea [gr/gr s.i.·hrs]
- G: Glucosa [gr/gr s.i.]
- k: Constante de desaparición de urea [1/hrs]
- k_c: Constante de proporcionalidad del controlador [gr U/gr GA₃]
- k_d: Constante de muerte [1/hrs]
- K_G: Parámetro de ajuste [gr G/gr s.i.]
- K_i: Constante de inhibición [gr s.i./gr]
- k_N: Parámetro de ajuste [gr N_i/gr X]
- k_p: Constante de degradación de GA₃ [1/hr]
- m_G: Mantención de biomasa [gr G/gr X·hrs]
- N_i: Nitrógeno intermediario [gr/gr s.i.]
- P: Ácido Giberélico [gr/gr s.i.]
- s.i.: Soporte inerte
- u: Variable de control [gr U/gr s.i.·hrs]
- U: Nutriente urea [gr/gr s.i.]
- X: Biomasa viva [gr/gr s.i.]
- Y_{X/G}: Coeficiente de rendimiento biomasa/glucosa [gr X/gr G]
- Y_{X/N_i}: Coeficiente de rendimiento biomasa/nitrógeno intermediario [gr X/gr N_i]
- β : Tasa específica de aparición de GA₃ [1/hr]
- β_{etam} : Máximo valor de β [1/hr]
- γ : Parámetro de ajuste [gr/gr s.i.]
- μ : Tasa específica crecimiento de biomasa [1/hr]
- μ_m : Máxima velocidad específica de crecimiento [1/hr]