

Application of the Luedeking and Piret with Delay Time Model in Bioproductions with Non-Zero Kinetic Parameters

C. Groff, B. Kuchen., R. Gil, C. Fernandez and G. Scaglia

Abstract— In this work, we were able to generalize the applicability of the Luedeking and Piret with delay time model previously proposed by our team. To demonstrate this, experimental data and kinetic parameters were collected from four different bioproduction. To these experimental data, the first order plus dead time (FOPDT) model was fitted for biomass production kinetics, while the Luedeking and Piret with delay time model was for different metabolites production kinetics. The use of the Luedeking and Piret with delay time model proves the delay that exists between the production time of microbial biomass and metabolites or products. The use of the FOPDT model allowed this delay to be determined in a simple and fast way. This model's combination shows an increase in R^2 in all cases, demonstrating the quality of the fit and the simplicity of the proposed method. The use of delay times for bioproduction with non-zero kinetic parameters has not been previously reported. Application of this model would improve the accuracy of scaling bioprocesses to enable industrial-scale production. This delay time is an essential property of the bio-process, and its determination is crucial for control and optimization.

Index Terms— Mathematical modeling, Bioproductions kinetics, Luedeking and Piret, Delay time.

I. INTRODUCCIÓN

Los impactos medio ambientales generados por la actividad humana están siendo cada vez más visibles e impactantes. El aumento de las concentraciones de gases de efecto invernadero están generando un incremento de la temperatura media global, habiendo sido el periodo entre 2016 y 2020 el más cálido registrado desde el periodo preindustrial [1]. Sabiendo que la agricultura y la actividad industrial representan alrededor del 45% del total de emisiones de gases de efecto invernadero del mundo [2], uno de los frentes con que se puede mitigar estos efectos ambientales, es transformando la producción industrial tradicional en alternativas verdes y sustentables.

La Bioeconomía es una tendencia productiva sustentable, que propone dejar de utilizar derivados petroquímicos en las síntesis químicas, y que tiene como objetivo utilizar y revalorizar los residuos (subproductos) generados por la agroindustria, a través de la implementación de bioprocesos [3].

La industria farmacéutica y alimenticia ya están aplicando procesos biotecnológicos a nivel industrial, por ejemplo, la obtención de ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos, alcoholes y enzimas, entre otros [4]. Para que las producciones biotecnológicas sustentables a escala industrial sean una realidad económica viable, es necesario lograr un escalado del bioproceso desde el ámbito del laboratorio hacia la escala industrial. Uno de los desafíos más importantes es lograr describir el bioproceso con un modelo matemático que represente adecuadamente el comportamiento del sistema, y de esta manera poder aplicar algoritmos de control que mantengan las condiciones de operación del proceso en los valores óptimos. En este sentido cobra relevancia el modelado matemático y la ingeniería de control de los bioprocesos. Estos aspectos suelen ser complejos de llevar a cabo, debido a la dinámica poco conocida de los microorganismos (multivariable y altamente no lineal), las variables de proceso que se encuentran altamente acopladas entre sí y las perturbaciones externas que suelen estar presentes. Estos factores conllevan a la generación de incertidumbres en el modelado de los bioprocesos [5].

Para poder diseñar controladores simples, se prefiere el uso de modelos lineales, como ser el modelo FOPDT, ya que son sencillos de determinar el valor de los parámetros y son capaces de describir la dinámica específica de los procesos industriales, por lo que son ampliamente utilizados por los ingenieros de procesos [25]. Por lo que su implementación en los bioprocesos sería de gran utilidad.

En estudios de bioprocesos recientes, se observó que se sigue utilizando la metodología tradicional para definir las cinéticas microbianas. Primero se ajusta el modelo Logístico al crecimiento microbiano, para luego acoplarlo con el modelo de Luedeking y Piret a la producción de metabolitos, obteniendo así los parámetros del sistema [6]–[8]. Otras investigaciones, muestran la misma metodología, pero usando diferentes modelos cinéticos de crecimiento celular, como ser modelo de Monod [9]–[11], o también un modelo híbrido Logístico-Monod [12]. Al observar las gráficas de estos trabajos, se evidencia claramente un tiempo de retardo entre el tiempo en que la concentración de producto empieza a aumentar y el tiempo en que la concentración de biomasa empieza a crecer. Este retardo no está descripto en los modelos que ellos utilizaron.

C. Groff, CONICET e IBT, UNSJ. Av. Lib. San Martín Oeste 1109, San Juan J5400ARL, Argentina. (e-mail: mgroff@unsj.edu.ar).

B. Kuchen, CONICET e IBT, UNSJ. Av. Lib. San Martín Oeste 1109, San Juan J5400ARL, Argentina. (e-mail: benjaminkuchen@gmail.com).

R. Gil, IBT, UNSJ. Av. Lib. San Martín Oeste 1109, San Juan J5400ARL, Argentina (e-mail: rocio.mariel.gil@gmail.com).

C. Fernández P., CONICET e IIQ, UNSJ. Av. Lib. San Martín Oeste 1109, San Juan J5400ARL, Argentina (e-mail: mcfernandez@unsj.edu.ar).

G. Scaglia, CONICET e IIQ, UNSJ. Av. Lib. San Martín Oeste 1109, San Juan J5400ARL, Argentina (e-mail: gscaglia@unsj.edu.ar).

Para la representación de las cinéticas de producción de metabolitos microbianos, se suele utilizar la ecuación de Luedeking y Piret [13] (ver (3)), que relaciona la velocidad de producción del metabolito (dP/dt) con la tasa de crecimiento microbiano (dX/dt) y la concentración celular (X). En nuestro trabajo anterior [14], se propuso una modificación al modelo de Luedeking y Piret [13], incorporando un tiempo de retardo (T_d) entre la producción de biomasa y la producción de ácido láctico. Esta aplicación constituyó un caso particular de estudio, ya que al ser el ácido láctico un metabolito primario, el término de X está anulado por ser el coeficiente que lo acompaña igual a cero ($m_p = 0$). En el presente trabajo, se pretende ampliar la aplicabilidad del modelo de Luedeking y Piret con retardo [14] a bioprocesos más genéricos. En los cuales, la velocidad de producción del metabolito (dP/dt) se relacione directamente con dX/dt y con X , al tener coeficientes diferentes de cero en ambos términos de la ecuación. La incorporación de un tiempo de retardo (T_d) permitiría llegar a una descripción matemática más detallada de los bioprocesos. Esto podría disminuir la aparición de incertidumbres al momento de modelar las cinéticas microbianas, disminuyendo la influencia negativa que tienen sobre la estabilidad del sistema. De esta manera, sería más sencilla la implementación de controladores en los bioprocesos [15], [16].

En este artículo, se recopilaron datos experimentales y parámetros cinéticos de biotransformaciones de otros autores, y se aplicó el procedimiento descrito en [14] para ajustar el modelo FOPDT al crecimiento de biomasa, y el modelo de Luedeking y Piret con retardo a la producción del metabolito en cuestión. Se pretende identificar tiempos de retardo en el crecimiento de biomasa, en la producción del metabolito, y un tiempo de retardo específico entre estas dos cinéticas. La identificación de estos tiempos de retardo, permitirá estudiar los tiempos de retardo existentes en los bioprocesos, y utilizar el modelo de Luedeking y Piret con retardo en las etapas posteriores de optimización y control de los bioprocesos.

El aporte novedoso del presente trabajo, se basa en el desarrollo de un modelo matemático sencillo de implementar en las cinéticas microbianas de bioprocesos, y de esta manera se posibilitará el estudio de los fenómenos que influyen los tiempos de retardo en diferentes bioprocesos.

El documento está organizado de la siguiente manera: en la Sección II se detallan los cuatro bioprocesos de los que se recopilaron los datos cinéticos, se explica la metodología tradicional y los modelos utilizados para llevar a cabo el modelado de bioprocesos, para luego mostrar la propuesta del uso del modelo FOPDT y de Luedeking y Piret con retardo. En la Sección III se muestran las gráficas y los parámetros obtenidos, además de realizar un análisis comparativo de la metodología tradicional y la propuesta para ajustar los modelos cinéticos. La conclusión general del trabajo se muestra en la Sección IV.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Búsqueda Bibliográfica y Recopilación de Datos de Diferentes Biotransformaciones.

Para evidenciar que la presente propuesta tiene un alcance general a diversos bioprocesos, se buscaron trabajos de bioproducciones que usen diferentes tipos de microorganismos,

como ser hongos y bacterias, y se obtengan diferentes metabolitos (como enzimas, un biopolímero y un potencial anticancerígeno). Se recopilaron los datos experimentales cinéticos de biomasa y producto y los parámetros cinéticos del modelo Logístico (para biomasa microbiana) y del modelo de Luedeking y Piret (para el producto). Se trabajó con los siguientes bioprocesos:

- Producción de la enzima Inulinasa usando *Aspergillus niger* (*A. niger*) como inóculo, utilizando un medio líquido de crecimiento optimizado con melaza de remolacha, en frascos de 250ml, manteniendo la temperatura a 30°C con una agitación de 200 rpm [17].

- Producción de la enzima Lacasa con el hongo *Pycnoporus sanguineus* (*P. sanguineus*), en un medio de cultivo líquido con glucosa y micronutrientes a 25°C. Se utilizaron los datos de la fermentación en reactor con baffles a 170 rpm [18].

- Producción del biopolímero Goma gellan usando *Sphingomonas paucimobilis* (*S. paucimobilis*) a partir de un medio de cultivo líquido con glucosa como sustrato carbonado y formulado con nutrientes, en un fermentador batch de 30l con agitación de 200 rpm y aireación (2vol/vol/min) a una temperatura de 30°C, con un pH inicial de 7 [19].

- Producción de Tailandepsina A, un producto natural con potenciales propiedades anticancerígenas, utilizando la bacteria *Burkholderia thailandensis* E264 (*B. thailandensis*) empleando un medio fermentativo con glucosa como fuente carbonada. Los parámetros fermentativos fueron: 28°C, pH=7, relación de inóculo 1% (v/v), tiempo de 60h y velocidad de agitación 170rpm [20].

La elección de cada uno de los casos de estudio se basó en la importancia que tendría la aplicación de los metabolitos producidos en diferentes ramas de la industria: las enzimas inulinasas son ampliamente utilizadas para la obtención del prebiótico inulina a partir de plantas en la industria de alimentos; las enzimas lacasas se utilizan principalmente en la industria textil y papelera; la goma gellan es un biopolisacárido con gran potencial para sustituir a los polisacáridos utilizados en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica; la tailandepsina A es una alternativa a los fármacos tradicionalmente utilizados para la cura del cáncer.

B. Metodología Usada Tradicionalmente sin tener en Cuenta el Retardo.

Los pasos que suelen implementarse para definir las ecuaciones cinéticas de la producción de biomasa microbiana y de metabolitos son los siguientes:

Primero: ajustar el modelo matemático del crecimiento de biomasa microbiana: el modelo matemático tradicionalmente más usado en los bioprocesos es el modelo Logístico desarrollado por Verhulst [21]:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) X \quad ; \quad X(0) = X_0 \quad (1)$$

$$X(t) = \frac{X_{\max}}{1 + \left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \exp^{-\mu_{\max} \cdot t}} \quad (2)$$

Donde dX/dt : Velocidad de crecimiento de biomasa [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]; $X(t)$: Concentración de biomasa microbiana en un determinado instante de tiempo [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]; X_{\max} : Concentración máxima de biomasa microbiana [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]; X_0 : Concentración inicial de inóculo utilizado en el experimento [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]; t : Tiempo

[h] o [d] y $\mu_{m\acute{a}x}$: Velocidad de crecimiento microbiano máxima [h⁻¹] o [d⁻¹]. Los parámetros $X_{m\acute{a}x}$, X_0 y $\mu_{m\acute{a}x}$ suelen determinarse mediante el ajuste del modelo Logastico a los datos experimentales con el mejor valor del coeficiente de determinación (R^2).

Segundo: el ajuste del modelo de Luedeking y Piret [13] a la producción del metabolito: en este caso pueden darse diferentes situaciones según si se obtiene un metabolito primario, secundario o terciario [22]. Esto está definido en base a los valores de los parámetros $Y_{p/x}$ (rendimiento del metabolito con respecto a la biomasa, [mg.g⁻¹] o [U.g⁻¹]) y m_p (coeficiente de producción del metabolito relacionado al mantenimiento metabólico, [mg.g⁻¹.h⁻¹], [U.g⁻¹.h⁻¹], [mg.g⁻¹.d⁻¹] o [U.g⁻¹.d⁻¹]). La ecuación es:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/x} \frac{dX}{dt} + m_p X ; P(0) = P_0 \quad (3)$$

Donde dP/dt : Velocidad de producción del metabolito [g.l⁻¹.h⁻¹]; X : Concentración de biomasa microbiana en un determinado instante de tiempo [g.l⁻¹]. Los parámetros $Y_{p/x}$ y m_p suelen determinarse mediante el ajuste del modelo de Luedeking y Piret a los datos experimentales con el mejor valor de R^2 . La expresión final se obtiene reemplazando (1) y (2) en (3), resultando (4):

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/x} \left(\mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}} \right) X \right) + m_p \left(\frac{X_{m\acute{a}x}}{1 + \left(\frac{X_{m\acute{a}x}}{X_0} - 1 \right) \exp^{-\mu_{m\acute{a}x} t}} \right); P(0) = P_0 \quad (4)$$

En la Tabla I se muestran los parámetros recopilados de los trabajos utilizados en el análisis.

C. Metodología Propuesta en el Presente Trabajo teniendo en Cuenta el Retardo.

En nuestro trabajo previo se describió con detalle la ventaja de trabajar con el Modelo FOPDT para la generación de biomasa microbiana [14], siendo la ecuación diferencial como se muestra en (5):

$$\frac{dX}{dt} + \frac{X}{T_p} = \frac{1}{T_p} \cdot X_{m\acute{a}x} (t - T_0) , X(0) = X_0 \quad (5)$$

Donde $X_{m\acute{a}x}$ es el valor máximo alcanzado por X y la función $X_{m\acute{a}x}(t - T_0)$ se define por:

$$X_{m\acute{a}x}(t - T_0) = \begin{cases} X_{m\acute{a}x} & \text{para } t \geq T_0 \\ 0 & \text{para } t < T_0 \end{cases} \quad (6)$$

Quedando la expresión final como se muestra en (7):

$$X(t) = \begin{cases} X_0 \cdot \exp^{-\frac{(t-T_0)}{T_p}} + X_{m\acute{a}x} \left(1 - \exp^{-\frac{(t-T_0)}{T_p}} \right) & \text{para } t \geq T_0 \\ X = X_0 & \text{para } t < T_0 \end{cases} \quad (7)$$

La identificación paramétrica óptima de T_0 (parámetro temporal de retardo, [h] o [d]) y T_p (parámetro temporal de crecimiento, [h] o [d]) se realizó utilizando las fórmulas tradicionales de cálculo ampliamente utilizada por ingenieros de procesos. Luego se aplicó el método de Montecarlo, en un entorno del $\pm 50\%$ respecto de los valores de los parámetros calculados, de manera de maximizar el valor de R^2 , al aplicar un número de simulaciones (N) igual a 2000 [23],[24]. La secuencia del algoritmo matemático de Montecarlo se puede

ver en el trabajo de [24]. Se calculó el valor del R^2 aplicando el modelo FOPDT para el crecimiento celular, para poder compararlo al R^2 obtenido cuando se utiliza el modelo Logastico.

En cuanto a la producción de metabolitos, se introduce el modelo FOPDT de biomasa en la ecuación de Luedeking y Piret con retardo. Aquí se debe hacer una salvedad, ya que en este caso se trabajará con el parámetro $m_p \neq 0$, lo que es una situación más general que el trabajo anterior donde se consideraron fermentaciones lácticas con $m_p = 0$. Por lo tanto, la ecuación de Luedeking y Piret con retardo para $m_p \neq 0$ quedara de la siguiente forma:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/x} \frac{dX(t-T_d)}{dt} + m_p X(t - T_d) ; P(0) = P_0 \quad (8)$$

Donde la función $\frac{dX(t-T_d)}{dt}$ está definida por:

$$\frac{dX(t-T_d)}{dt} = \begin{cases} \frac{dX(t-T_d)}{dt} & \text{para } t \geq T_d \\ 0 & \text{para } t < T_d \end{cases} \quad (9)$$

Y la función $X(t - T_d)$ está definida por:

$$X(t - T_d) = \begin{cases} X(t - T_d) & \text{para } t \geq T_d \\ 0 & \text{para } t < T_d \end{cases} \quad (10)$$

Donde P_0 [g.l⁻¹] es la concentración inicial del metabolito (que en la mayoría de los casos es igual a cero), T_d [h] o [d] es la diferencia de tiempo (retardo) entre el momento en que comienza la producción del metabolito con respecto al tiempo en que inicia la generación de biomasa.

En el caso de la identificación paramétrica del modelo de Luedeking y Piret con retardo, se aplicó el método de Montecarlo, siguiendo un procedimiento similar al que se describió para biomasa. Los valores de los parámetros se pueden ver en la Tabla I.

Para determinar el ajuste de los modelos matemáticos con los datos experimentales recabados, tanto para los usos tradicionalmente como para los propuestos en el presente trabajo, se utilizó el coeficiente de determinación (R^2):

$$R^2 = \left(1 - \frac{SC_{RES}}{SC_{TOT}} \right) 100 = \left(1 - \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2} \right) 100 \quad (11)$$

Donde SC_{RES} es la suma del cuadrado de la distancia entre el punto real (y_i) y el punto previsto en el modelo (\hat{y}_i) y SC_{TOT} es la suma del cuadrado de la distancia entre el punto real (y_i) y la media de todos los puntos de la línea media (\bar{y}).

Se utilizó el software Matlab R2015a para calcular, ajustar y graficar los modelos matemáticos.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Cinéticas de Crecimiento Celular

En la Fig. 1 se muestran las cinéticas de crecimiento microbiano, $X(t)$, de las cuatro fermentaciones relevadas. En la misma se grafican los puntos experimentales, además de los ajustes del modelo Logastico y FOPDT. Para ajustar el modelo logastico reportado por los autores, se utilizaron los valores de los parámetros X_0 , $X_{m\acute{a}x}$ y $\mu_{m\acute{a}x}$ obtenidos por ellos, y se calculó el valor del R^2 en cada caso. En el caso del modelo FOPDT se utilizó el valor de X_0 experimental de cada fermentación, y se calcularon los valores de los parámetros T_0 y T_p . Los valores de

los parámetros de los modelos y los ajustes se muestran en la Tabla I.

Tanto en la fermentación reportada por [17] como en la desarrollada por [18] se obtuvo un mejor R^2 con el modelo FOPDT que con el modelo Logístico (ver Tabla I). En cambio, en [19] y en [20] el mejor valor de R^2 se obtuvo con el modelo Logístico, aunque con una diferencia mínima. Esto evidencia que para las cinéticas microbianas tanto el modelo logístico

como el modelo FOPDT podrían usarse indistintamente. Además, el cálculo sencillo del parámetro T_0 (que permite encontrar rápidamente el tiempo de letargo del microorganismo en el bioproceso) y del parámetro T_p (parámetro temporal directo de crecimiento microbiano), demuestra la conveniencia matemática del modelo FOPDT, como así también su amplio uso entre los ingenieros de procesos en las plantas industriales.

TABLA I
COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y AJUSTES DE LOS BIOPROCESOS ESTUDIADOS

Parámetros	[17]		[18]		[19]		[20]
Biomasa							
	1	2	1	2	1	2	1
X_0	1.79	0.086	0.299	0.303	0.43	0.432	0.00112
$X_{m\acute{a}x}$	16.25	16.78	1.454	1.522	4.71	4.72	1.92
$\mu_{m\acute{a}x}$	0.829	-	0.722	-	0.203	-	0.382
T_0	-	0.30	-	0.40	-	2.50	-
T_p	-	3.40	-	3.00	-	9.90	-
R^2	94.75 ^(*)	99.77	99.53 ^(*)	99.86	97.12 ^(*)	95.93	99.74 ^(*)
Producto							
$Y_{p/x}$	0.273	13.30	-9.133	89.00	2.067	2.20	0.542
m_p	5.748	5.50	12.817	15.00	0.022	0.024	1.64
T_d	-	1.40	-	2.60	-	0.05	-
R^2	98.89 ^(*)	99.06	93.67 ^(*)	96.76	96.89 ^(*)	98.12	97.61 ^(*)

1 Valores recopilados del trabajo original; 2 Valores obtenidos en el presente trabajo; ^(*) Calculado con Matlab.

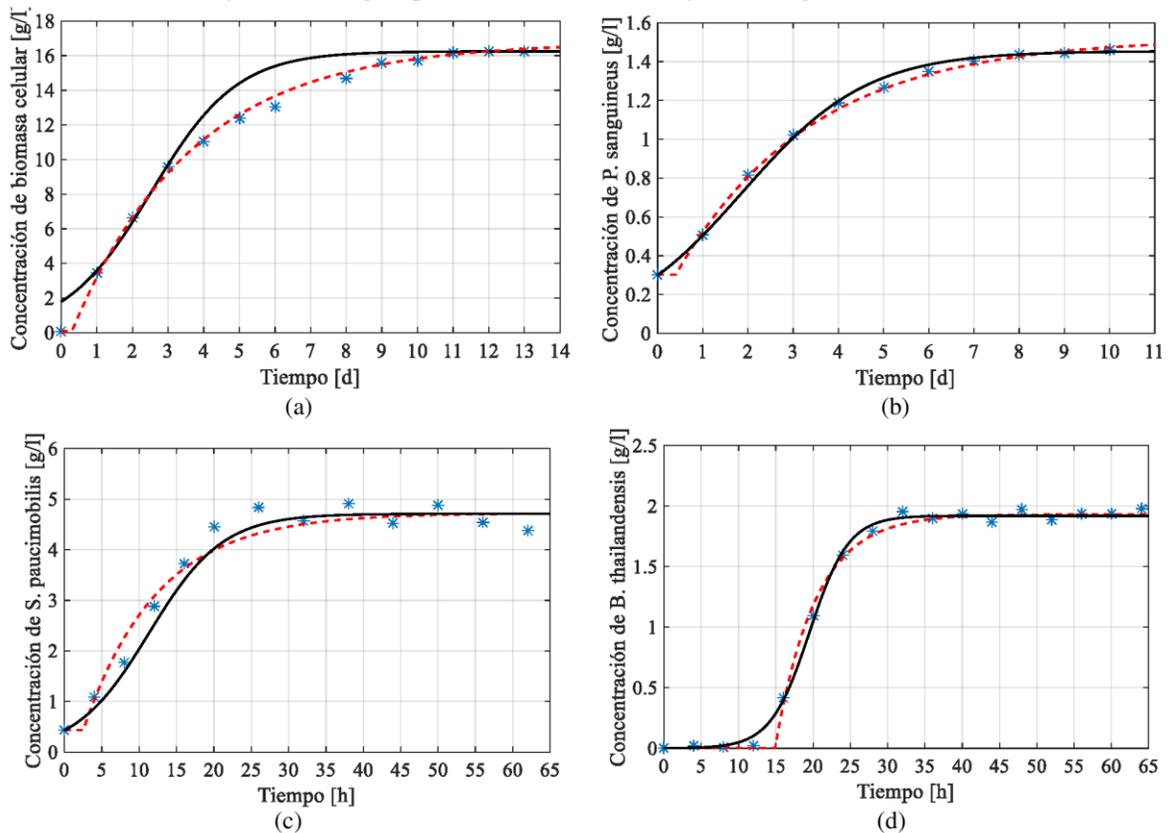


Fig. 1. Ajuste matemático comparativo del crecimiento de biomasa celular (*) usando el Modelo FOPDT (línea de guiones rojos) y el Modelo Logístico (línea continua negra). (a) Trabajo de Germec et al [17]; (b) Trabajo de Saat et al [18]; (c) Trabajo de Wang et al [19] y (d) Trabajo de Liu et al [20].

Un aporte adicional respecto a la relación del inóculo microbiano y los parámetros del modelo FOPDT se desarrollará a cuenta con células en diferentes estadios: células fermentativas (X_{ferm}), células en fase de latencia (X_{lat}) y células muertas (X_{mue}), pudiéndose representar como:

$$X_0 = X_{ferm} + X_{lat} + X_{mue} \quad (9)$$

La proporción en las que ellas se encuentren en el inóculo, influiría en el desempeño de la fermentación y específicamente en la duración de la fase de adaptación del microorganismo, lo que podría verse reflejado en el valor del parámetro T_0 del modelo FOPDT. Por lo que, una mayor proporción de X_{ferm} haría que el T_0 sea menor, mientras que, si hubiera una mayor

proporción de células X_{lat} , el T_0 sería mayor, ya que el microorganismo necesitaría de un mayor tiempo de adaptación en el medio de cultivo en el que se está desarrollando. Esta proporción, estaría definida por la edad del inóculo, ya que en un inóculo nuevo se tiene $X_{ferm} \gg X_{lat}$. Por lo que se concluye que T_0 es función de X_{ferm} y X_{lat} . En tanto, la proporción de X_{mue} influiría en el rendimiento final del metabolito en estudio y en el tiempo en el que se alcanzaría el $X_{máx}$, es decir, en el parámetro T_p .

Continuando con el análisis, podemos establecer que en un proceso fermentativo se busca tener la mayor cantidad posible de X_{ferm} al inicio de la fermentación, ya que este tipo de células son quienes producirían nueva biomasa celular en la fase de crecimiento exponencial. Esto influiría directamente en la cantidad de biomasa final que se obtendría, es decir, a mayor cantidad de X_{ferm} mayor cantidad de $X_{máx}$, pero no tendría efecto alguno en el T_p , ya que este parámetro sería característico de cada microorganismo, de forma análoga al $\mu_{máx}$ del modelo Logístico.

En los bioprocesos, la velocidad de agitación es un parámetro importante ya que, aumenta la transferencia de gas en el líquido y favorece la homogeneización de los nutrientes, lo que mejora la productividad y el rendimiento de los metabolitos [8]. El uso de agitación convierte un sistema heterogéneo en un sistema homogéneo, lo que conlleva a una simplificación matemática, ya que se evita el uso de ecuaciones diferenciales parciales y se favorece el uso de ecuaciones diferenciales ordinarias. En relación a los parámetros de retardo, T_0 y T_d , el aumento de la agitación disminuiría el valor de los parámetros, hasta alcanzar

un máximo de velocidad, en el que las células podrían dañarse, y por ende los valores de T_0 y T_d aumentarían.

Finalmente se evidencia que el parámetro T_p se comporta de forma inversa al parámetro $\mu_{máx}$, ya que es un parámetro temporal y no una velocidad. En este sentido se observó que las fermentaciones con valores bajos de $\mu_{máx}$ presentaron valores altos de T_p , y los experimentos que tuvieron valores altos de $\mu_{máx}$ presentaron valores bajos de T_p .

B. Cinéticas de Producción de Metabolitos

En la Fig. 2 se muestran las cinéticas de producción de metabolitos, $P(t)$, de las cuatro fermentaciones relevadas. En la misma se grafican los puntos experimentales, además de los ajustes del modelo de Luedeking y Piret sin retardo y de Luedeking y Piret con retardo propuesto por este trabajo (ver Tabla I). En el primer caso se utilizaron los valores de los parámetros X_0 , $X_{máx}$, $\mu_{máx}$, $Y_{p/x}$ y m_p obtenidos por los autores, y se calculó el valor del R^2 en cada caso. En el caso del modelo de Luedeking y Piret con retardo se utilizaron los mismos valores de X_0 , $X_{máx}$, T_0 y T_p obtenidos en la cinética microbiana con el modelo FOPDT. El parámetro T_d se estimó teniendo en cuenta el tiempo en el que se observó un aumento en la concentración del metabolito en cada caso. Además, también se ajustaron los valores de $Y_{p/x}$ y m_p y T_d con el objetivo de maximizar el valor de R^2 en cada caso, y finalmente se calculó el valor del R^2 . En la Tabla I se muestran los valores de los parámetros.

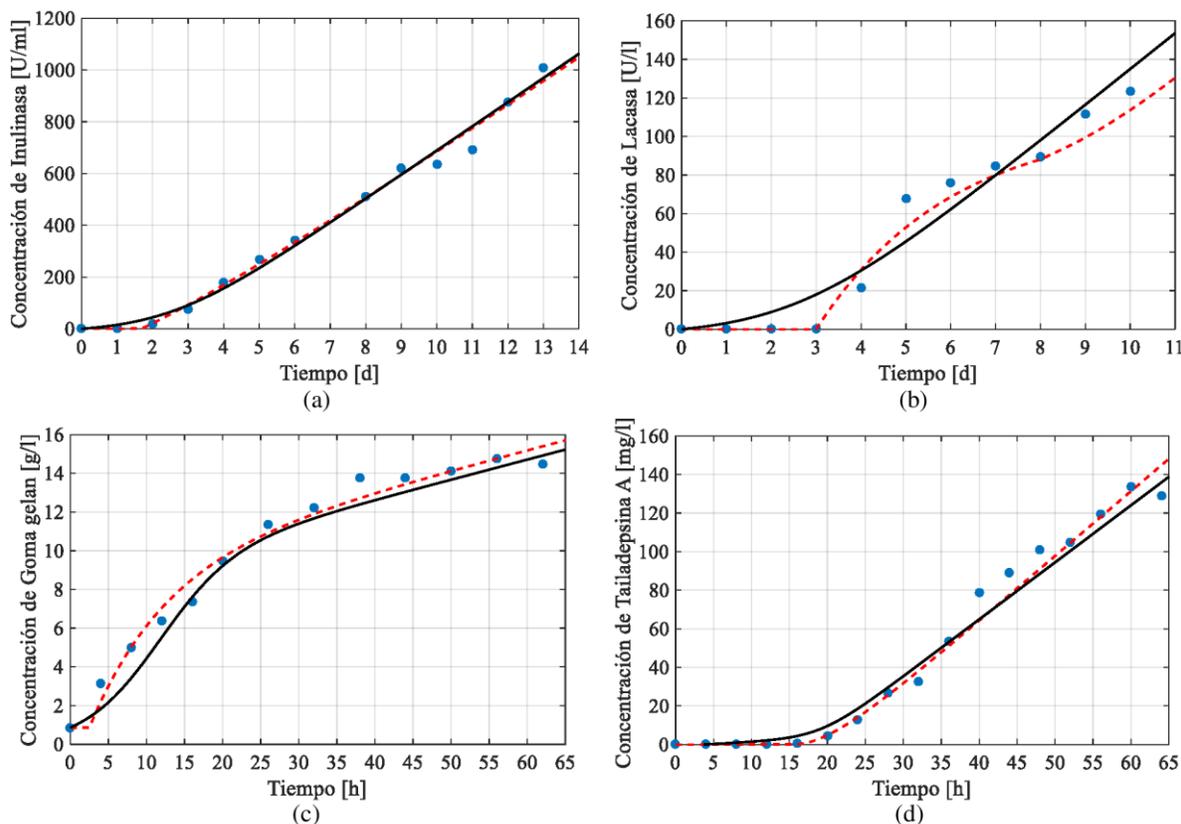


Fig. 2. Ajuste matemático comparativo de la producción de metabolitos (●) usando el Modelo de Luedeking y Piret con retardo (línea de guiones rojos) y sin retardo (línea continua negra). (a) Trabajo de Germec et al [17]; (b) Trabajo de Saat et al [18]; (c) Trabajo de Wang et al [19] y (d) Trabajo de Liu et al [20].

Respecto a los parámetros cinéticos $Y_{p/x}$ y m_p , en [17] y en [18] se observa una gran diferencia en el parámetro $Y_{p/x}$ reportado por los autores con respecto al obtenido en el presente trabajo, mientras que los parámetros m_p son similares. En el caso de lo reportado en [17] un valor tan bajo de $Y_{p/x}$ no tiene concordancia con los valores de biomasa microbiana del estado estacionario con respecto a la cantidad creciente del metabolito, por lo que el valor más alto de $Y_{p/x}$ obtenido en el presente trabajo, tiene una relación directa con la tasa de crecimiento microbiano. En [18], un valor negativo del parámetro $Y_{p/x}$ no sería una expresión adecuada, ya que los rendimientos celulares se reportan positivamente debido a que son una relación de dos valores positivos. Se puede afirmar que la incorporación del parámetro de retardo T_d en el modelo de Luedeking y Piret con retardo, corrige el error físico y biológico observado en el parámetro $Y_{p/x}$ negativo, ya que se obtiene un valor positivo del $Y_{p/x}$, teniendo mayor concordancia con los valores de rendimientos de metabolitos obtenidos usualmente. Además, el uso del parámetro T_d mejoró el valor del R^2 . En cambio en [19] y [20] los parámetros $Y_{p/x}$ y m_p obtenidos por los otros autores son similares a los reportados en el presente trabajo, pero nuestra propuesta mejora el R^2 en ambos casos. Por último, cuando el valor del parámetro T_d sea cero, el modelo de Luedeking y Piret no se ve afectado por el retardo.

En todas las fermentaciones se obtuvieron valores de T_0 diferentes de cero, evidenciando un fenómeno de retardo entre el momento en que la biomasa microbiana empieza a crecer y el inicio de la producción de los diferentes metabolitos. Este fenómeno que puede cuantificarse sencillamente a través del parámetro T_d , no ha sido reportado previamente. El uso del parámetro T_d lograría identificar y explicar tiempos de retardo en varias bioproducciones, lo que tendría amplia utilidad al momento del escalado del bioproceso a nivel industrial. Esto es fundamental para la etapa de optimización y control, ya que no considerar un retardo del bioproceso puede producir inestabilidades en el sistema.

En todos los casos se observó que el ajuste de R^2 fue superior al utilizar el modelo de Luedeking y Piret con retardo, como así también la conveniencia de usar el parámetro T_d , ya que supone una mejora en el ajuste del modelo, además de brindar la posibilidad de estudiar de manera sencilla el fenómeno de retardo observado en todos los casos.

De igual manera que los modelos usados hasta ahora, los modelos cinéticos propuestos, podrían acoplarse a los modelos de transporte fenomenológicos que describen la transferencia de masa y calor en los sistemas en estudio.

IV. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se obtuvo una mejora en el valor del R^2 en dos de los bioprocursos estudiados usando el modelo FOPDT, mientras que en los otros dos trabajos ajustó mejor el modelo Logístico. Esto implicaría que ambos modelos podrían utilizarse indistintamente para ajustar la cinética microbiana, aunque el modelo FOPDT es más sencillo de desarrollar a nivel matemático y más difundido entre los ingenieros de procesos. Además, se observó una mejora en los valores de R^2 de las cuatro fermentaciones con $m_p \neq 0$ al utilizar el parámetro T_d en el modelo de Luedeking y Piret con retardo, lo que permite asegurar que la propuesta puede aplicarse a diferentes tipos de

bioprocursos. El principal aporte de este trabajo fue modelar y cuantificar el retardo que existe entre la generación de biomasa y metabolitos en diferentes bioprocursos, pudiendo ampliar la aplicabilidad del modelo de Luedeking y Piret con retardo. A pesar de que el modelo de Luedeking y Piret sin retardo se viene estudiando desde los años 50, el fenómeno de retardo no había sido modelado ni propuesto anteriormente, siendo de crucial importancia para la dinámica del proceso y para el diseño de controladores en aplicaciones industriales. Esto es un aporte novedoso para la rama del control de bioprocursos, los cuales necesitan de aportes prácticos y escalables para que puedan ser una realidad industrial. En futuros trabajos se estudiará la influencia de los parámetros fisicoquímicos de los bioprocursos sobre el valor de T_d . También se pretende aplicar el modelo de Luedeking y Piret con retardo en estudios de optimización y control de bioprocursos.

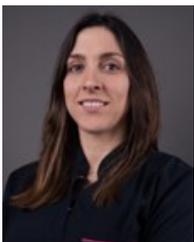
AGRADECIMIENTO

Se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), del Instituto de Biotecnología (IBT) y del Instituto de Ingeniería Química (IIQ) de la Universidad Nacional de San Juan (UNSJ).

REFERENCIAS

- [1] W. World Meteorological Organization, "United in Science 2020," 2020. [Online]. Available: https://public.wmo.int/en/resources/unity_in_science
- [2] U. EPA, "Global Greenhouse Gas Emissions Data | US EPA," 2022. <https://www.epa.gov/ghgemissions/global-greenhouse-gas-emissions-data#Sector> (accessed Apr. 07, 2022).
- [3] M. M. Bugge, T. Hansen, and A. Klitkou, "What Is the Bioeconomy? A Review of the Literature," *Sustainability*, vol. 8, no. 7, p. 691, 2016, doi: 10.3390/su8070691.
- [4] A. L. Demain, "The business of biotechnology," *Ind. Biotechnol.*, vol. 3, no. 3, pp. 269–283, 2007, doi: 10.1089/ind.2007.3.269.
- [5] C. Fernandez, N. Pantano, L. Rodriguez, and G. Scaglia, "Additive Uncertainty Consideration for Nonlinear and Multivariable Bioprocess Control," *IEEE Lat. Am. Trans.*, vol. 19, no. 5, pp. 798–806, 2021, doi: 10.1109/TLA.2021.9448314.
- [6] R. Rao and N. Basak, "Sequential Dark-Photo Batch Fermentation and Kinetic Modelling for Biohydrogen Production Using Cheese Whey as a Feedstock," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 194, no. 9, pp. 3930–3960, 2022, doi: 10.1007/s12010-022-03958-w.
- [7] E. Chavarria-Quicaño, F. De la Torre-González, M. González-Riojas, J. Rodríguez-González, and A. Asaff-Torres, "Nematicidal lipopeptides from *Bacillus paralicheniformis* and *Bacillus subtilis*: A comparative study," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 1537–1549, 2023, doi: 10.1007/s00253-023-12391-w.
- [8] I. A. Escanciano, M. Ladero, V. E. Santos, and Á. Blanco, "Development of a Simple and Robust Kinetic Model for the Production of Succinic Acid from Glucose Depending on Different Operating Conditions," *Fermentation*, vol. 9, no. 222, 2023, doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation9030222>.
- [9] S. Anand, K. Mukherjee, and P. Padmanabhan, "Pollution to Product— a Novel Two-Stage Single-Pot Fermentative Production of 1,3-Propanediol," *Bioenergy Res.*, no. 0123456789, 2023, doi: 10.1007/s12155-023-10570-1.
- [10] R. Czinkóczy and A. Németh, "Modeling the Biosurfactant Fermentation by *Geobacillus stearothermophilus* DSM2313," *Period. Polytech. Chem. Eng.*, vol. 67, no. 1, pp. 104–115, 2023, doi: 10.3311/ppch.20797.
- [11] G. Policastro, V. Luongo, L. Frunzo, N. Cogan, and M. Fabbicino, "A mechanistic mathematical model for photo fermentative hydrogen and polyhydroxybutyrate production," *Math. Biosci. Eng.*, vol. 20, no. 4, pp. 7407–7428, 2023, doi: 10.3934/mbe.2023321.
- [12] S. D. Bharathi and S. Jacob, "Comprehensive treatment strategy for banana inflorescence bract to synthesize biodiesel and bioethanol through fungal biorefinery," pp. 1–21, 2023.

- [13] R. Luedeking and E. L. Piret, "A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH," *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, vol. 1, no. 4, pp. 393–412, 1959, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000320)67:6<363::AID-BIT3>3.0.CO;2-U.
- [14] M. C. Groff, G. Scaglia, O. A. Ortiz, and S. E. Noriega, "Modification of the Luedeking and Piret model with a delay time parameter for biotechnological lactic acid production," *Biotechnol. Lett.*, vol. 0, 2022, doi: 10.1007/s10529-022-03227-0.
- [15] M. F. Sardella, M. E. Serrano, O. Camacho, and G. J. E. Scaglia, "Design and Application of a Linear Algebra Based Controller from a Reduced-Order Model for Regulation and Tracking of Chemical Processes under Uncertainties," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 58, pp. 15222–15231, 2019, doi: 10.1021/acs.iecr.9b01257.
- [16] G. Scaglia, P. M. Aballay, M. E. Serrano, O. A. Ortiz, M. Jordan, and M. D. Vallejo, "Linear algebra based controller design applied to a bench-scale oenological alcoholic fermentation," *Control Eng. Pract.*, vol. 25, no. 1, pp. 66–74, 2014, doi: 10.1016/j.conengprac.2014.01.002.
- [17] M. Germec and I. Turhan, "Enhanced production of *Aspergillus niger* inulinase from sugar beet molasses and its kinetic modeling," *Biotechnol. Lett.*, vol. 42, no. 10, pp. 1939–1955, 2020, doi: 10.1007/s10529-020-02913-1.
- [18] M. N. Saat, M. S. M. Annuar, Z. Alias, L. T. Chuan, and Y. Chisti, "Modeling of growth and laccase production by *Pycnoporus sanguineus*," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 37, no. 5, pp. 765–775, 2014, doi: 10.1007/s00449-013-1046-8.
- [19] X. Wang, "Modeling for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 in a simplified medium," *Appl. Env. Microbiol.*, vol. 72, no. 5, pp. 3367–3374, 2006, doi: 10.1128/AEM.72.5.3367-3374.2006.
- [20] B. Liu, J. Hui, Y. Q. Cheng, and X. Zhang, "Extractive fermentation for enhanced production of thailandepsin A from *Burkholderia thailandensis* E264 using polyaromatic adsorbent resin Diaion HP-20," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 5, pp. 767–776, May 2012, doi: 10.1007/s10295-011-1073-x.
- [21] P. F. Verhulst, "La loi d'accroissement de la population.," *Nouv. mémoires l'Académie R. des Sci. B.-lett. Bruxelles*, pp. 14–54, 1845.
- [22] E. L. Gaden, "Fermentation process kinetics," *Biotechnol Bioener.*, vol. 67, pp. 629–635, 2000, doi: 10.1016/s0734-9750(97)87650-1.
- [23] B. Kuchen, S. A. Garay, R. M. Gil, F. Vazquez, and G. J. E. Scaglia, "Optimization of batch reactors: Application to the biocontrol of spoilage yeasts in wines," *IEEE Lat. Am. Trans.*, vol. 100(XXX), 2022, [Online]. Available: <https://latamt.ieeer9.org/index.php/transactions/article/view/6934>
- [24] C. Fernández, N. Pantano, S. Godoy, E. Serrano, and G. Scaglia, "Optimización de Parámetros Utilizando los Métodos de Monte Carlo y Algoritmos Evolutivos. Aplicación a un Controlador de Seguimiento de Trayectoria en Sistemas no Lineales," *Rev. Iberoam. Automática e Informática Ind.*, vol. 00, no. 2011, pp. 1–4, 2018, doi: 10.4995/riai.2018.
- [25] M. F. Sardella, M. E. Serrano, O. Camacho, and G. J. E. Scaglia, "Improvement of linear algebra controllers using sliding surface concepts: applications to chemical processes," *IEEE Lat. Am. Trans.*, vol. 100, no. 1e, pp. 1–8, 2020, doi: 10.1109/TLA.2021.9475860.



Carla Groff has a bachelor's degree in food technology (2012) from Faculty of chemical and technological sciences of the the Cuyo Catholic University of San Juan and PhD in Chemical Engineering-Mention Clean Processes (2022) from the Faculty of Engineering of the National University of San Juan. At this time, she

works as CONICET Postdoctoral fellow and professor in food technology. Her specialty is the bioprocess mathematical modeling. Her main interests in research are the bioproduction of lactic acid using fungi and the production of microalgae.



Benjamín Kuchen is Agronomic Engineer (2015) from the Faculty of Engineering of the National University of San Juan and PhD in agronomy (2020) from the Faculty of Agronomic Sciences of the National University of Cuyo. Professor/Researcher of the Bioprocess Engineering Chair and Assistant Researcher from the National Council of Scientific Research (CONICET), Argentina. At this time is dedicated to research in modelling and optimizing microbial interactions. His main interest is in development of models and process optimization.



Gustavo Scaglia received the Ing. degree in Electronic Engineering with orientation in Control Systems from the National University of San Juan, Argentina, in 1999. Then, the PhD in Control Systems from the National University of San Juan, Argentina, in 2006. He is a Researcher of the Council for Scientific and Technological Research (CONICET), Argentina, since 2011. He leads different technological projects and his current scientific research at the Engineering Chemical Institute from National University of San Juan. His main interests include modeling, optimization, and trajectory tracking control of biochemical processes.



Rocío Gil is Chemical Engineer (2014) from the Faculty of Engineering of the National University of San Juan and PhD in Chemical Engineering (2022) in the same faculty. Professor/Researcher of the Bioprocess Engineering Cathedra. At this time, dedicated to the modelling of biogas generating processes. Her main interest in research is the optimization of process in bench bioreactors with microalgae.



Cecilia Fernández received the Food Processing Engineering degree from the National University of San Juan - Argentina, in 2014. Then the Doctorate in Chemical Engineering - Mention Clean Processes degree from the National University of San Juan - Argentina, in 2019. At this time, she works as CONICET Assistant Researcher, her specialty is process engineering, mainly optimization and control of multivariable non-linear processes. Her main research interests include modeling, state estimation, optimization, and trajectory tracking control of biochemical processes.