Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Facultad de Ingeniería Eléctrica

Departamento de Automática y Sistemas Computacionales

TRABAJO DE DIPLOMA

Modelado y control de la concentración de metanol en la producción de una proteína recombinante por la levadura Pichia pastoris

Autor: Deiner Oscar Más López

Tutor: M.Sc., Ing. Boris Luis Martínez Jiménez

Santa Clara

2007

"Año 49 de la Revolución"

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

Facultad de Ingeniería Eléctrica

Departamento de Automática y Sistemas Computacionales

TRABAJO DE DIPLOMA

Modelado y control de la concentración de metanol en la producción de una proteína recombinante por la levadura Pichia pastoris

Autor: Deiner Oscar Más López

E-mail: deinermas@yahoo.es

Tutor: M.Sc., Ing. Boris Luis Martínez Jiménez

Prof. Auxiliar, Dpto. de Automática y Sist. Computacionales

Facultad de Ingeniería Eléctrica. UCLV.

E-mail: boris@uclv.edu.cu

Consultante: M.Sc., Ing. Noel Jesús Reyes Fleitas

Santa Clara

2007

"Año 49 de la Revolución"

Hago constar que el presente trabajo de diploma fue realizado en la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas como parte de la culminación de estudios de la especialidad de Ingeniería en Automática, autorizando a que el mismo sea utilizado por la Institución, para los fines que estime conveniente, tanto de forma parcial como total y que además no podrá ser presentado en eventos, ni publicados sin autorización de la Universidad.

Firma del Autor

Los abajo firmantes certificamos que el presente trabajo ha sido realizado según acuerdo de la dirección de nuestro centro y el mismo cumple con los requisitos que debe tener un trabajo de esta envergadura referido a la temática señalada.

Firma del Autor

Firma del Jefe de Departamento donde se defiende el trabajo

Firma del Responsable de Información Científico-Técnica

PENSAMIENTO

Todos los triunfos cuestan sangre

de las venas, o del alma.

José Martí

DEDICATORIA

A mis padres quienes me han servido de guía y apoyo en muchas de mis decisiones y han contribuido en mi formación. A todos mis familiares y a todas aquellas personas que se han encargado de transmitir los conocimientos necesarios en el transcurso de mi vida. Con todo el corazón a la memoria de mi abuelo.

AGRADECIMIENTOS

- *A mi tutor, el profesor Boris Luis Martínez Jiménez, por su atención y ayuda durante todo el tiempo y la proporción de todos los medios necesarios para la realización de este trabajo.*
- *A mi consultante, Noel Jesús Reyes Fleitas, por confiar en mí y darme este proyecto.*
- *A Miriam Cruz y a Margarita por todo el esfuerzo que realizaron en su momento.*
- *A todos mis compañeros que de una u otra forma han ayudado en el desarrollo del trabajo.*
- *En especial a mi novia Mayuly Morales Moya por su entrega y dedicación para conmigo.*
- *A todos los que me han ayudado y brindando su apoyo durante este trabajo de diploma.*

TAREA TÉCNICA

Para el desarrollo de este trabajo se realizaron las siguientes tareas:

1. Revisión bibliográfica de modelado y control de procesos biotecnológicos, en particular, de los que emplean como fuente de carbono y energía al metanol.
2. Implementación de modelos matemáticos que permitan la simulación del comportamiento de las principales variables del proceso.
3. Análisis, desarrollo, programación e implementación de técnicas tradicionales de control.
4. Simulación del algoritmo propuesto. Ajuste y evaluación del algoritmo desarrollado sobre el sistema.
5. Análisis de los resultados obtenidos.
6. Elaboración del informe final.

Firma del Autor

Firma del Tutor

RESUMEN

Actualmente, se trabaja con intensidad en la aplicación de diferentes técnicas de control en sistemas complejos como los procesos biotecnológicos. En esta tesis, se aborda el modelado y control de un biorreactor (sistemas complejo, no lineal y variante con el tiempo) donde ocurre el proceso de fermentación de la levadura Pichia pastoris, el cual forma parte de la producción de la vacuna antihepatitis B en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Específicamente, se trabaja en el lazo de control de la concentración de metanol, la cual es una variable vital en dicho proceso.

Para llevar a cabo el trabajo, se determinan los modelos de los elementos del lazo de control del metanol y se identifica el modelo PORT (Primer Orden con Retardo de Transporte) que describe el comportamiento de dicha variable. A partir de estos resultados se determinan diferentes ajustes del regulador PID y se aplican varias estrategias para el control del lazo. En los resultados se aprecian mejoras en la respuesta temporal del sistema y se logra mantener la concentración de metanol dentro de los valores establecidos.

TABLA DE CONTENIDOS

PENSAMIENTO ..... **i**

DEDICATORIA ..... **ii**

AGRADECIMIENTOS ..... **iii**

TAREA TÉCNICA ..... **iv**

RESUMEN ..... **v**

INTRODUCCIÓN **1**

Organización del informe 3

CAPÍTULO 1. MODELADO Y CONTROL DE BIOPROCESOS **5**

1.1 Modelado de sistemas 5

1.2 Biorreactores 7

1.2.1 Descripción del proceso fermentativo 8

1.3 Historia y actualidad 11

1.4 Conclusiones 16

CAPÍTULO 2. MODELADO DEL SISTEMA **17**

2.1 Descripción del lazo de control 17

2.2 Modelo matemático del proceso 19

2.3 Modelo matemático de la bomba de alimentación de metanol 20

2.4 Modelo matemático del sensor de metanol (TGS-822) 21

2.5 Controlador lógico programable (PLC) 23

2.6 Lazo de control.....24

2.7 Conclusiones 25

CAPÍTULO 3. SINTONÍA Y CONTROL DEL PROCESO..... 26

3.1 Datos del proceso 26

3.2 Identificación del modelo PORT y sintonía de los reguladores.....28

3.3 Análisis de respuesta del lazo de control.....29

3.4 Programación de ganancia (*gain schedule*).....33

3.5 Análisis económico y medio ambiental.....35

3.6 Conclusiones 36

CONCLUSIONES 38

RECOMENDACIONES 39

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 40

ANEXOS 43

Anexo I Fórmulas de sintonía para cambios en el punto de consigna a partir del modelo PORT.....43

INTRODUCCIÓN

A finales de los años sesenta se descubre la existencia de algunas levaduras metilotrópicas tales como Pichia, Hansenula, Turolopsis y Candida. Pero no es hasta fines de la década de los noventa donde existe una explosión por el interés de estas levaduras, dado por su utilización para la expresión de proteínas heterólogas, de amplios usos en la industria bio-farmacéutica.

Son los investigadores de SIBA (*Salk Institute of Biotechnology/Industrial Associates, Inc.*) los que hallan los genes y los promotores de estas levaduras útiles para la expresión de proteínas foráneas. Ellos mismos estandarizan los pasos y compuestos necesarios para conseguir optimizar la metodología de integración de una proteína en la cepa de Pichia pastoris.

Recientemente, se determina por primera vez el modelo matemático que caracteriza el crecimiento de la levadura Pichia pastoris (Zhang, 2000). En Cuba la Pichia pastoris se utiliza para la expresión de enzimas de la Hepatitis B en los laboratorios del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Específicamente este trabajo se centra en los fermentadores Marubishi, en el lazo de control de la concentración de metanol en la fermentación de la levadura Pichia pastoris.

Anteriormente no existía el control automático de esta variable en los fermentadores del CIGB, por lo que se nos dio la tarea de automatizar el control de dicha variable. En esta fermentación se consume o libera metanol en dependencia del crecimiento acelerado o desacelerado de los microorganismos. Al ser necesario que estos crezcan a ritmo constante, es preciso controlar la concentración de metanol durante toda la fermentación.

Construir modelos para sistemas desconocidos es un objetivo importante de la Ingeniería de Control. Estos modelos se utilizan para simular el comportamiento real en los casos en que existe un conocimiento previo limitado de la estructura del sistema, en algoritmos de control, entre otras.

Muchas han sido las técnicas de control que se han aplicado a los procesos biotecnológicos, las cuales van desde el simple control *on-off*, pasando por las técnicas de control tradicional tales como el popular regulador proporcional integral derivativo (PID) hasta las técnicas de control borroso y todo para un mismo fin: mantener un control adecuado de las principales variables del proceso.

El desarrollo del control moderno en el campo de la biotecnología ha sido limitado por dos importantes obstáculos: uno de ellos es la ausencia, en la mayoría de los casos, de instrumentación barata y confiable dedicadas al monitoreo en tiempo real pues en el mercado existen muy pocos sensores capaces de proveer medidas en línea confiables de variables biológicas como la concentración de biomasa y el otro es que debido a que los bioprocesos envuelven organismos vivos, sus dinámicas son pobremente entendibles y presentan fuertes alinealidades, además la reproducibilidad de los experimentos es incierta; sin dejar de mencionar que los parámetros del proceso no permanecen constantes por largos períodos debido a variaciones metabólicas y modificaciones fisiológicas.

Por estas razones, estos procesos constituyen un reto al investigador ya que se hace necesaria la aplicación de técnicas modernas en sistemas con dichas características y precisamente es la razón de ser de este trabajo.

A partir de la premisa anterior, el problema científico relacionado con el tema quedaría expresado de la siguiente forma:

¿Cómo diseñar un sistema de control capaz de mantener la concentración de metanol en los límites establecidos para diferentes condiciones de operación, en aras de lograr el crecimiento óptimo de los microorganismos que expresan las enzimas de la Hepatitis B?

En particular el sistema bajo estudio es un proceso biotecnológico de fermentación, tipo semi-continuo (*feed-batch*), destinado a obtener productos para la medicina.

Por consiguiente, el objetivo fundamental de este trabajo es:

- Obtener un modelo dinámico para este proceso para la aplicación de varias técnicas de control e implementar una estrategia de control avanzada para este proceso en específico.

Para lograr este objetivo se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Utilizar herramientas de infotecnología en la búsqueda y organización de la información.
- Alcanzar dominio del lenguaje de programación de alto nivel (Matlab) para implementar los modelos y controles a nivel de simulación.
- Obtener modelos y realizar el control a partir de los mismos.

Para lograr estos objetivos se realizaron las siguientes tareas de investigación:

1. La revisión bibliográfica del modelado y control de procesos biotecnológicos, en particular, de los que empleen como fuente de carbono y energía al metanol.
2. La implementación de modelos matemáticos que permitan la simulación del comportamiento de las principales variables del proceso.
3. El análisis, desarrollo, programación e implementación de técnicas de control.

Organización del informe

Este informe está conformado por tres capítulos. En el Capítulo 1 se abordan aspectos relacionados con el modelado y control de procesos biotecnológicos. Para ello se exponen aspectos básicos del modelado de sistemas, una breve explicación y descripción del proceso objeto de estudio, así como aspectos relacionados con la historia y actualidad del modelado y control de procesos biológicos que envuelven a la levadura Pichia pastoris.

En el Capítulo 2 se describe el lazo de control de la concentración de metanol, se explican las características de cada uno de los elementos que conforman el lazo a controlar, así como su función y se obtienen cada uno de los modelos matemáticos que los representan respectivamente.

En el Capítulo 3 se exponen los resultados de la sintonía y control del proceso. Para ello se aproxima el modelo del proceso a un modelo PORT (primer orden con retardo de transporte), se determinan los parámetros óptimos del regulador PID para mínimo IAE y mínimo ITAE, se comparan las respuestas obtenidas con resultados obtenidos de la literatura científica y se implementa en Matlab la estrategia de control del programador de ganancia (*gain schedule*). En cada caso se analizan los resultados obtenidos.

Finalmente, se expresan las conclusiones a que se arriban en este trabajo y se dan recomendaciones para trabajos futuros.

CAPÍTULO 1. MODELADO Y CONTROL DE BIOPROCESOS

El área de los sistemas de control ha penetrado prácticamente en todas las áreas de la tecnología, ya que permite abordar y manejar sistemáticamente aspectos de optimización y logro de comportamientos deseados. Sin embargo, el impacto de los métodos basados en el modelo matemático en los procesos industriales es aún limitado, por ejemplo: un sistema de control por computador moderno es una combinación de la última tecnología en computadores y el clásico PID.

Existen varias razones para ello, una de las cuales es la necesidad de modelos dinámicos exactos de los procesos industriales, ya que los métodos modernos de control son basados en el modelo y necesitan una exactitud razonable de este.

En este capítulo se abordarán aspectos relacionados con la historia y actualidad de la modelación en los biorreactores, la descripción del proceso, las condiciones de operación y las fases de una fermentación.

1.1 Modelado de sistemas

Disponer de un modelo del sistema preciso es fundamental tanto para el desarrollo científico como para el tecnológico moderno. Sin embargo, los modelos no siempre tienen que ser matemáticos.

El concepto es más amplio y pueden ser físicos o de otro tipo. En la vida diaria tratamos con muchos problemas mentales y de otros tipos que no requieren de modelos matemáticos. Sin embargo, para la gran mayoría de los problemas físicos e ingenieriles los modelos matemáticos, y sobre todo los basados en ecuaciones diferenciales son muy frecuentes. En el caso de los sistemas lineales estos son

generalmente caracterizados por su respuesta al impulso, al paso, o por sus funciones transferenciales.

Además, los modelos se clasifican en:

- Analíticos o matemáticos:
  - continuos o discretos
  - parámetros concentrados o parámetros distribuidos
  - lineales o no lineales
  - estocásticos o determinísticos
- Experimentales

Para los modelos matemáticos se siguen dos procedimientos generales:

1. Se divide el sistema en subsistemas cuyas propiedades físicas son bien conocidas. Ello básicamente significa que conocemos las leyes de la naturaleza que rigen los fenómenos que actúan sobre ese sistema., después todos los subsistemas son unidos y se obtiene el modelo definitivo. Por ejemplo: cuando tenemos el accionamiento eléctrico de un motor eléctrico regulado, separamos al sistema integral en sus componentes: el motor con su carga, el sistema de regulación del accionamiento en sus partes y el sistema de medición. A este procedimiento se le conoce como MODELADO (*o modelo de caja-blanca*).
2. El modelo matemático es obtenido mediante experimentación. Se registran simultáneamente los datos de entrada y salida y se analizan apropiadamente para que resulte un modelo. El procedimiento para determinar un modelo matemático de un sistema dinámico desconocido (*sistema objetivo*) a partir de datos medidos de entrada-salida, es generalmente referido como IDENTIFICACIÓN (*o modelado de caja negra*) (Eykhoff, 1981; Ljung, 1999).

Entre ambos límites se encuentran los *modelos de caja gris* en los que se utiliza cierto conocimiento previo del proceso y el resto del conocimiento se extrae de los datos de entrada-salida del mismo.

Los propósitos del modelado y la identificación de sistemas son múltiples: predecir el comportamiento del sistema, explicar las interacciones y relaciones entre entradas y salidas del sistema, diseñar un regulador basado en el modelo del sistema, etc. En la actualidad, la gran mayoría de los procedimientos de análisis y diseño de sistemas de control se basan en la existencia de un modelo para el proceso. Además, en los últimos años ha tomado gran auge la simulación de sistemas en computadora, para lo que se necesita un modelo del proceso a simular.

Un modelo satisfactorio debe cumplir dos requerimientos contradictorios: debe ser lo suficientemente detallado como para representar al sistema real con exactitud y a su vez, lo suficientemente sencillo como para permitir un análisis matemático práctico. Por tanto, una vez que se tiene la representación matemática del proceso, se compara el comportamiento del sistema físico con el del modelo matemático. Si el comportamiento del sistema objetivo y el modelo matemático son similares se tiene un modelo del proceso. Si el modelo falla al pasar esta prueba se deberá repetir el proceso de modelado.

1.2 Biorreactores

Los procesos de fermentación envuelven complejas interacciones de factores biológicos, químicos y físicos. Para investigar apropiadamente una fermentación y para ser capaces de predecir los efectos de los diferentes factores, generalmente se describe al sistema en términos de modelos matemáticos.

A pesar del desarrollo alcanzado en el estudio y comprensión de los procesos fermentativos, la identificación y el control de este tipo de procesos no lineales es una tarea desafiante debido a que:

1. Es difícil obtener modelos que tomen en cuenta los numerosos factores que influyen en el crecimiento microbiano.
2. Los modelos son altamente no lineales y variantes en el tiempo.

3. Los parámetros cambian debido a variaciones metabólicas y fisiológicas.
4. Son procesos con dinámicas lentas, del orden de las horas.
5. Existe carencia de instrumentos confiables para medir las variables en tiempo real.

1.2.1 Descripción del proceso fermentativo

En esencia, un biorreactor es un tanque en el cual se producen simultáneamente varias reacciones bioquímicas mientras ocurre el crecimiento de la masa de microorganismos o células vivas (biomasa) dado por el consumo de nutrientes apropiados (sustratos) en condiciones ambientales favorables. En la Figura 1.1 se muestra un diagrama de un biorreactor de mezclado completo y con agitación continua.

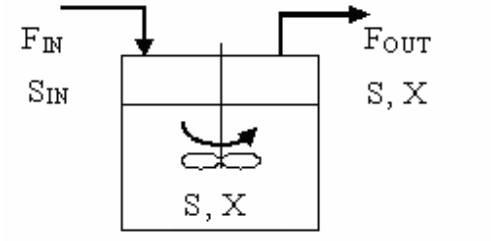

Figura 1.1. Diagrama de un biorreactor

Los fermentadores utilizados a nivel industrial están provistos de mecanismos de agitación, dispersión y aireación así como de sistemas para el control de la temperatura, control de la concentración de oxígeno, pH, formación de espuma, etc.

Las tres condiciones de operación de un fermentador son:

a) **Discontinuo (*batch*)**: un reactor discontinuo no tiene flujo de entrada ni de salida. (*Fin = Fout = 0*).

Una fermentación discontinua (*batch*) puede ser considerada como un sistema cerrado. A lo largo de toda la fermentación no se añade nada, excepto oxígeno (en

forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte.

En el proceso de reproducción y diferenciación celular se comienza con la inoculación del reactor con organismos vivos en un sustrato previamente preparado, que garantice un ambiente favorable para el desarrollo del proceso.

A partir de aquí comienza la fase de latencia o de adaptación de los microorganismos al medio. Luego comienza la fase de reproducción o logarítmica donde se produce la multiplicación celular y finaliza con la fase de crecimiento, donde se desarrollan los nuevos embriones hasta alcanzar el tamaño necesario.

Cuando finaliza esta última fase se considera que el proceso ha llegado a término.

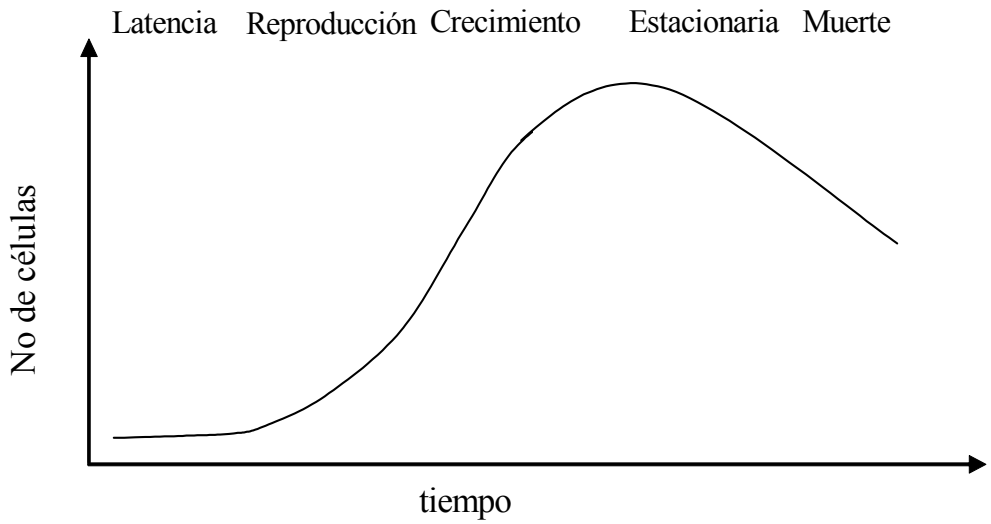

Figura 1.2. Fases de una fermentación

En los procesos comerciales la fermentación frecuentemente se interrumpe al final de la fase logarítmica (metabolitos primarios) o antes de que comience la fase de muerte (metabolitos secundarios).

b) **Semi-continuo (*feed-batch*)**: un reactor semi-continuo es un reactor sin flujo de salida (*Fout = 0*).

Una mejora del proceso cerrado discontinuo es la fermentación semi-continua (*o feed-batch*) que se utiliza en la mayoría de los procesos biotecnológicos industriales. En los procesos alimentados, los sustratos se añaden escalonadamente a medida que progresa la fermentación. La formación de muchos metabolitos secundarios está sometida a represión catabólica.

Por esta razón en el método alimentado los elementos críticos de la solución de nutrientes se añaden en pequeñas concentraciones al principio de la fermentación y continúa añadiéndose en pequeñas dosis durante la fase logarítmica. En este método se alcanza alta productividad optimizando la razón de crecimiento.

c) **Operación Continua**: es continua la alimentación de sustrato y la extracción de biomasa y productos.

Para el proceso fermentativo que se desarrolla en el biorreactor, se considera la siguiente estructura de modelo para el caso de proceso semi-continuo (*feed-batch*), perfectamente agitado (Hernández, 1999; Zhang, 2000):

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - \frac{F}{V}) \cdot X \tag{1.1}$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{F}{V} - X \cdot (\alpha_1 \cdot \mu + \alpha_2) \tag{1.2}$$

$$\frac{dV}{dt} = F \tag{1.3}$$

donde:

X: Concentración de biomasa

C: Concentración de metanol

V: Volumen del caldo de cultivo

F: Flujo de alimentación (flujo de entrada)

μ: Razón de crecimiento de los microorganismos

α_1 y α_2: Coeficientes establecidos en el modelo de crecimiento de levadura Pichia pastoris

En el modelo anterior se aprecia la característica no lineal del proceso, respondiendo a un sistema dinámico de la forma general:

$$\frac{dx}{dt} = f(\bar{x}) + g(\bar{x}) \cdot u \tag{1.4}$$

donde $\bar{x}$ es el vector de las variables de estado $(\bar{x} = [X, S, V])$, **u** es la variable de entrada (F).

1.3 Historia y actualidad

Los primeros trabajos en modelado de biorreactores se limitaron a obtener fórmulas para la razón de crecimiento específica (μ) mediante estudios estadísticos en la mayoría de los casos, ejemplo de esto lo encontramos en Contois (1959), Haldane (1930), Michaelis y Menten (1918), Monod (1942), Tessier (1942).

Paralelamente a estos trabajos se desarrollaron modelos matemáticos basados en las ecuaciones de balance del sistema, análisis que se han mantenido hasta nuestros días (Monod, 1942; Zarnea, 1980; Naranjo et al., 1997; Romero, 1995; Franco, 2002). También se obtienen modelos de estado que incorporan esquemas de reacciones químicas (Bastin y Dochain, 1990).

A finales de los años sesenta se descubre la existencia de algunas levaduras metilotrópicas (Ogata et al., 1969), es decir, microorganismos con la capacidad de utilizar el metanol como fuente de carbono. Las levaduras que tienen esta característica se limitan a cuatro géneros: Pichia, Hansenula, Turolopsis y Candida (Tani et al., 1978).

Inicialmente, el interés por estas levaduras estaba limitado a utilizarlas como alimento para animales a partir de excedentes de metanol de la industria petroquímica. Durante este período se obtienen muchos avances en la optimización del medio de cultivo, la configuración del biorreactor y las condiciones de operación. Pero el precio de los

derivados del petróleo en la década de los setenta disminuye fuertemente y con ello las investigaciones en este sentido.

Años después, se descubre que este tipo de levaduras es capaz de expresar proteínas heterólogas. Con esto se inician las investigaciones en este campo, en 1993, *Invitrogen Corporation* obtiene la licencia para explotar comercialmente este sistema de expresión (Lin Cereghino, 2000). Pero no es hasta fines de la década de los noventa donde hay una explosión por el interés en estas levaduras.

En el caso de la Pichia pastoris, son los investigadores de SIBA (*Salk Institute of Biotechnology/Industrial Associates, Inc.*) de EUA quienes hallan a los genes y a los promotores de estas levaduras útiles para la expresión de proteínas foráneas. Ellos mismos estandarizan todos los pasos y compuestos necesarios para conseguir optimizar la metodología de integración de una proteína en dicha cepa.

A partir de la obtención de proteínas heterólogas, las levaduras metilotrópicas se han utilizado para otras aplicaciones derivadas a partir de las características particulares de las cepas. Una de ellas ha consistido en utilizarla como una fuente para la obtención de aminoácidos como la L-Valina, L-Treonina o L-Lisina (Okumura et al., 1970).

También han sido empleadas para la producción de algunas enzimas y metabolitos asociados al proceso de asimilación del metanol. Por ejemplo: en el caso de Pichia pastoris, la enzima de óxido de alcohol que cataliza el primer paso de la reacción de la oxidación de metanol puede llegar a más del 30% de la proteína total soluble cuando se utiliza el metanol como única fuente de carbono (Cregg et al., 1987).

Para el cultivo de microorganismos en condiciones óptimas, así como para la producción por parte de los microorganismos de los metabolitos o las enzimas deseadas, deben ser desarrollados procedimientos de fermentación. Ejemplos de ellos son: el desarrollo de cepas mediante manipulación genética y/o la regulación del metabolismo mediante la optimización del medio de cultivo, así como el control adecuado de los factores físico-químicos que afectan el rendimiento de las fermentaciones industriales (concentración de oxígeno, temperatura, pH, concentración de sustrato (metanol), etc.).

Con el desarrollo de las técnicas de control, la aplicación de estas en los biorreactores era esperada. En años recientes se ha trabajado intensamente en la aplicación de técnicas de control en los procesos biotecnológicos. A continuación se analizan algunos de los trabajos más recientes en este tema.

El trabajo de Zhang (2000) se centra en la modelación y determinación experimental de los parámetros del modelo matemático que caracteriza el crecimiento de la levadura Pichia pastoris. El modelo describe la relación entre la razón de crecimiento específico (μ) y la concentración de metanol así como el comportamiento de la razón de crecimiento específico bajo condiciones de crecimiento de metanol limitado.

En este trabajo se halla la razón de crecimiento máxima ($\mu_{máx}$), se determinó cual es el valor de concentración de metanol que marca la frontera entre las zonas de inhibición y la limitada, se pudo apreciar como en la primera el rendimiento sustrato-biomasa (Yx/s) es bajo, mientras que en el caso de la constante de mantenimiento su valor es alto comparado con el de la segunda zona, en cambio el rendimiento sustrato-biomasa en la zona limitada aumenta.

En otro trabajo, Zhang (2002) emplea un regulador PID para el control de la concentración de metanol, calculando los parámetros del regulador a través del modelo de crecimiento de la levadura Pichia pastoris.

Con el modelo del proceso y las funciones de transferencia de cada uno de los elementos que constituye el lazo, siguiendo un análisis de respuesta de frecuencia y un método práctico para el cálculo de los parámetros óptimos del PID se obtienen los parámetros del regulador.

El criterio de estabilidad de Bode fue usado para desarrollar un diagrama de estabilidad para observar el comportamiento completo durante toda la fase semi-continua (*feed-batch*). Varios experimentos fueron llevados a cabo para comprobar la validez de los parámetros optimizados del regulador obteniendo muy buenos resultados.

En la investigación de Busquets (2005) se realiza un análisis de varias técnicas de control para lograr el mantenimiento de la concentración de metanol en los límites establecidos.

En este trabajo se aplicaron cuatro técnicas para controlar la concentración de metanol. La primera de estas técnicas, la más sencilla, es el conocido control *on-off*. Esta es una configuración poco utilizada, solo se usa cuando se va a controlar con poca exactitud o simplemente la dinámica de la variable no requiere un control muy complejo. Esto se debe a que no es lo suficientemente preciso para controlar variables que se desean mantener estables dentro de un rango relativamente estrecho. Este tipo de control no depende de la magnitud del error, es sencillo de implementar y barato pero presenta varios inconvenientes.

Buscando mejorías en la respuesta del sistema, Busquets propone, como segunda técnica de control, al regulador proporcional integral y derivativo (PID) implementado en tres de sus variantes más conocidas obteniendo resultados positivos y negativos en cada uno. En el caso del proporcional (P), la aparición de un parámetro de control que relaciona al error con la actuación sobre el sistema implica encontrar el valor óptimo de este. El principal problema de este tipo de control es el error que presenta en estado estable, el cual se pudiera minimizar aumentando la ganancia, pero valores elevados de la ganancia podrían traer oscilación y la desestabilización del sistema.

En el caso del proporcional integral (PI), se elimina el error en estado estable, pero tiene como desventaja que aumenta la lentitud de respuesta del regulador y afecta el comportamiento dinámico del sistema. En el caso del proporcional integral derivativo (PID) se obtiene una mejor respuesta con resultados relevantes, que se muestran en su trabajo.

Debido a que las técnicas de control mencionadas anteriormente no resolvieron disminuir la máxima sobrecresta, Busquets aplica el control adaptativo, el cual consiste básicamente en un estimador de parámetros del algoritmo de control que permite la sintonía continua a lo largo del proceso.

La última técnica aplicada en su trabajo fue la mezcla de un control predictivo, (producto a que este puede gestionar situaciones difíciles y complejas) con un regulador PI sintonizado con los parámetros óptimos, obteniendo resultados alentadores.

En cambio Lim (2003) propuso el control de dos variables de forma simultánea, la concentración de metanol y el oxígeno disuelto en el medio, ya que si no se mantiene el oxígeno en los límites establecidos en todo el proceso entonces se pudiera correr el riesgo de caer en la fase de toxicidad producto a la acumulación del metanol. Para ello, el autor propone varias estrategias para lograr mantener un equilibrio entre ambas variables y conseguir su objetivo final: obtener las proteínas requeridas.

En el caso de la publicación de Lim (2005), este expone una estrategia de control predictivo, además de una variedad de resultados experimentales que muestran la validez de esta técnica de control. Todo esto lo obtuvo en varios ensayos realizados de forma experimental en fermentaciones semi-continuas (*feed-batch*).

En otros trabajos similares se han investigado otras variables de interés, por su influencia en la expresión de proteínas usando como levadura la Pichia pastoris. Estos son:

El trabajo de Johannisson (1999) que expone una detallada caracterización de las ventajas y desventajas de las fermentaciones discontinuas (*batch*) y semi-continuas (*feed-batch*) en la producción de una proteína recombinante por la levadura Pichia pastoris, además de todo un análisis de por qué esta levadura usa como fuente de carbono y energía al metanol y de los perjuicios que pueden ocasionar las altas concentraciones de metanol en el medio de cultivo.

Por último Jahic (2003) plantea que una de las variables más importantes para el éxito de una fermentación es la temperatura. Su influencia es notable si se tiene en cuenta que una temperatura demasiado alta en la mezcla puede terminar eliminando todos los metabolitos que se desean desarrollar, de ser alta pero no letal se puede obtener una respuesta de estrés al choque térmico conllevando esto a una producción de proteasas celulares que ocasionan una disminución en la obtención de los productos proteicos.

Si se desea una fermentación de calidad, esta debe ser realizada dentro de un margen estrecho de temperatura, pues téngase en cuenta que no solo puede afectar un valor alto de temperatura, también uno bajo puede ser perjudicial pues provoca un

retardado crecimiento de los microorganismos que se cultivan, lo que implica una reducida productividad.

1.4 Conclusiones

Se llega a la conclusión que en las fermentaciones que usan la levadura Pichia pastoris se consume o libera metanol en dependencia del crecimiento acelerado o desacelerado de los microorganismos, al ser necesario que estos crezcan a ritmo constante es preciso controlar la concentración de metanol, puesto que este es el sustrato del sistema. De ahí la necesidad de un modelo matemático del proceso, que describa su dinámica con precisión.

Se analiza el regulador PID, pero existen sus limitaciones, mejorar estrategias de ajuste en dependencia de los valores de concentración es la tarea a seguir en los venideros capítulos. A partir de esto se propone un modelo y una estrategia de control PID para mejorar la respuesta del sistema.

CAPÍTULO 2. MODELADO DEL SISTEMA

El primer paso en el análisis de un sistema dinámico, es elaborar su modelo. Hay que tener presente que el desarrollo de un modelo matemático del proceso es la parte más importante de todo el análisis. Los modelos, aunque pueden tomar muchas formas distintas según el sistema particular de que se trate y las circunstancias. Una representación matemática generalmente es la más adecuada en el campo de la ingeniería del control.

A continuación se describen las características de cada uno de los elementos que constituyen el lazo de control (fermentador Marubishi 5L, bomba peristáltica Pump P-1 Pharmacia, sensor TGS-822 y controlador PLC de Moeller modelo PS4-201-MM1), así como sus modelos matemáticos y el modelo del proceso.

2.1 Descripción del lazo de control

A continuación se muestra el lazo de control del proceso bajo análisis. La figura 2.1 muestra el diagrama en bloques en lazo cerrado del sistema de control de la concentración de metanol. La figura 2.2 muestra esquemáticamente el funcionamiento del proceso.

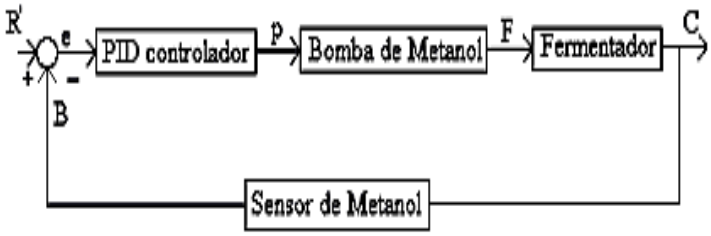

Figura 2.1. Diagrama en bloque del lazo de control de la concentración de metanol

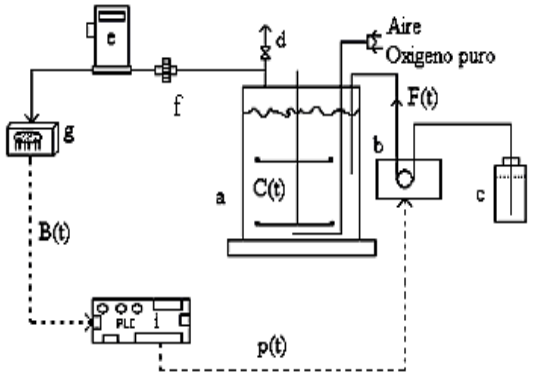

Figura 2.2. Esquema del proceso (→) dirección del flujo másico, (⇢) dirección del flujo de la señal de control. (a) fermentador 5L Marubishi, (b) bomba de alimentación de metanol, (c) recipiente de reserva de metanol, (d) válvula de escape de los gases, (e) controlador de flujo de gases, (f) filtro protector de contaminantes, (g) sensor de alcohol de Figaro TGS-822, (i) PID regulador (PLC)

El lazo de control funciona de la siguiente forma:

Primeramente con el sensor de alcohol TGS-822 (g) se mide la concentración de metanol a la salida de los gases del fermentador (a). Esta medición no es realizada de forma directa pues hay que acondicionar el flujo de los gases que salen del fermentador antes de que lleguen al sensor debido a que este presenta partículas de espuma. Para eliminar estas impurezas y facilitar un flujo de gases constante a través del sensor, es necesario colocar previo al mismo, un filtro antiespumante (f) y un controlador de flujo de gases (e).

El sensor contiene un transductor que convierte la señal física sensada en una señal eléctrica normalizada de corriente de 4-20 mA (analógica), la cual es introducida al PLC (i) el cual contiene un software que se encarga de comparar las señales medidas con la deseada y dar una señal de corrección que va hacia el (*driver*) del motor de la bomba de alimentación de metanol (b) la cual se encarga de suministrar mayor o menor cantidad de metanol.

2.2 Modelo matemático del proceso

Para un proceso de fermentación semi-continuo (*feed-batch*)

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - \frac{F}{V}) \cdot X \tag{2.1}$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{F}{V} - X \cdot (\alpha_1 \cdot \mu + \alpha_2) \tag{2.2}$$

$$\frac{dV}{dt} = F \tag{2.3}$$

donde X es la densidad de los microorganismos, C es la concentración de metanol y V es el volumen de caldo.

Estas variables no son constantes, por lo tanto no hay estado estable en el proceso entero. Para obtener la función transferencial del proceso, se demuestra que se puede asumir que en el tiempo $\underline{t}$ existe un estado seudo-estable (Zhang 2000).

En el punto $\underline{t}$, denotamos F = $\underline{F}$ (flujo de alimentación), μ = $\underline{\mu}$ (crecimiento específico), $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (coeficientes establecidos en el modelo de crecimiento de los microorganismos en la levadura P. pastoris), X = $\underline{X}$, C = $\underline{C}$ y V = $\underline{V}$. El consumo específico de metanol (v) se puede expresar mediante la ecuación.

$$v = \alpha 1 \cdot \mu + \alpha 2 \tag{2.4}$$

Considerando la masa de metanol balanceada, el modelo del proceso es expresado en la siguiente ecuación de balance.

$$\underline{V}\frac{dC}{dt} = F - \underline{X}\underline{V}(\alpha 1 \cdot \mu + \alpha 2) \tag{2.5}$$

La ecuación que establece el modelo de la razón de crecimiento de la levadura Pichia pastoris está dada por la ley de Haldane o la ley de Monod. En el caso del proceso bajo estudio, la mejor aproximación se obtiene por el modelo de Haldane (Zhang, 2000):

$$\mu = \frac{\beta 1 \cdot C}{C^2 + \beta 2 \cdot C + \beta 3} \tag{2.6}$$

donde $\beta 1, \beta 2$ y $\beta 3$ son coeficientes establecidos en el modelo de crecimiento de los microorganismos de la levadura Pichia pastoris.

Mediante una linealización y tomando la transformada de Laplace de la ecuación (2.6), se obtiene que:

$$\mu(s) = K\mu \cdot C(s) \tag{2.7}$$

$$K\mu = \frac{\beta 1 \cdot \beta 3 - \beta 1 \cdot \underline{C}^2}{\left(\underline{C}^2 + \beta 2 \cdot \underline{C} + \beta 3\right)^2} \tag{2.8}$$

Tomando la transformada de Laplace de la ecuación (2.5) y combinándola con la ecuación (2.7), obtenemos la función transferencial del proceso como:

$$Gp(s) = \frac{C(s)}{F(s)} = \frac{Kp}{\tau p \cdot s + 1} \tag{2.9}$$

donde los parámetros del proceso vienen dados por las relaciones:

$$Kp = \frac{1}{\underline{X} \cdot \underline{V} \cdot \alpha 1 \cdot K\mu} \tag{2.10}$$

$$\tau p = \frac{1}{\underline{X} \cdot \alpha 1 \cdot K\mu} \tag{2.11}$$

2.3 Modelo matemático de la bomba de alimentación de metanol

La bomba peristáltica constituye el elemento de control final dentro de este lazo. Sus características son sencillas pues ésta tiene una respuesta lineal y su función es alimentar al fermentador con un flujo de entrada en forma de pulsos con la concentración necesaria que se requiere. A continuación se muestra una imagen de la misma.

Figura 2.3. Bomba peristáltica P-1 Pharmacia

El modelo matemático que caracteriza a la misma es:

$$F(t) = Kf \cdot p(t) + \lambda \tag{2.12}$$

donde p es la variable de entrada, F es la variable de salida, Kf es la ganancia en estado estable de la bomba y λ es un coeficiente. Los parámetros Kf y λ pueden ser obtenidos de la curva entrada-salida de calibración de la bomba.

De la ecuación (2.12), se obtiene la función transferencial de la bomba $Gf(s)$:

$$\mathrm{Gf(s)} = \frac{\mathrm{F(s)}}{\mathrm{P(s)}} = \mathrm{Kf} \tag{2.13}$$

2.4 Modelo matemático del sensor de metanol (TGS-822)

Los sensores que en su tecnología usan semiconductores basan su funcionamiento en la variación de la resistencia que presenta su capa activa ante diferentes compuestos volátiles. En la literatura, por lo tanto, están catalogados como sensores resistivos.

Cuando el sensor se calienta a una temperatura cercana a 400 ^{0}C, en ausencia de oxígeno, los electrones libres fluyen fácilmente entre las fronteras granuladas de dióxido de estaño. En aire puro, el oxígeno, que atrapa electrones debido a su afinidad electrónica, queda absorbido en la superficie de dióxido de estaño creando una barrera de potencial en las fronteras granulares. Esta barrera dificulta la libre circulación de electrones aumentado la resistencia eléctrica de la capa activa.

Ante una atmósfera rica en gases reductores (como pueden ser los gases combustibles), la superficie de dióxido de estaño absorbe estas moléculas gaseosas provocando su oxidación. Este proceso disminuye la barrera de potencial facilitando

la circulación de electrones libres, lo que reduce la resistencia del sensor. La reacción entre los gases y el oxígeno de la superficie varía según la temperatura y composición de la capa activa.

La sensibilidad de este tipo de sensor se suele definir por la relación entre el incremento de la concentración de un determinado gas y el incremento de la resistencia que se produce. A continuación se muestra una imagen del mismo.

Figura 2.4. Esquema comercial del sensor TGS-822

La respuesta del sensor se ajusta a un modelo dinámico de primer orden con retardo de transporte θ:

$$\mathrm{tm} \cdot \frac{\mathrm{dB}}{\mathrm{dt}} + \mathrm{B} = \mathrm{Km} \cdot \mathrm{C}(\mathrm{t} - \theta) \cdot \mathrm{U}(\mathrm{t} - \theta) \tag{2.14}$$

donde t_m y K_m son la constante de tiempo y la ganancia en estado estable del sensor respectivamente. *U (t-θ)* es una función paso unitario, tal que:

$$U(t-\theta) = \begin{cases} 0 & t < \theta \\ 1 & t \geq 1 \end{cases} \tag{2.15}$$

Lo anterior denota explícitamente que B = 0 para todos los valores de t < θ. La calibración entrada-salida del sensor puede ser expresada:

$$\underline{\mathrm{B}} = \delta_1 \cdot \ln(\underline{\mathrm{C}}) + \delta_2 \tag{2.16}$$

donde δ_1 y δ_2 son los coeficientes obtenidos por la calibración. De la ecuación (2.16), derivando con respecto a $\underline{C}$, se llega a que $K_m = d\underline{B}/d\underline{C} = \delta_1/\underline{C}$. La ecuación (2.14) con $U = 1$ puede ser expresada como:

$$B = K_m \cdot \underline{C} \cdot (1 - e^{t/tm}) \text{ para } t > \theta \tag{2.17}$$

Con K_m conocida, t_m es calculada por regresión de la ecuación (2.16) basado en la medición de la respuesta al paso de B vs t y θ puede ser medida directamente. Hallando la trasformada de Laplace de la ecuación (2.14), determinamos la función transferencial del sensor Gm(s):

$$Gm(s) = \frac{B(s)}{C(s)} = \frac{Km \cdot e^{-\theta \cdot s}}{tm \cdot s + 1} \tag{2.18}$$

2.5 Controlador lógico programable (PLC)

El regulador (PID) de este lazo se implementa en un controlador lógico programable (PLC). De la firma Moeller y de modelo PS4-201-MM1. Algunas características del mismo se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2.1. Datos generales del PLC de Moeller (PS4-201-MM1)

Voltaje y/o corriente de alimentación	Tipos de entradas y cantidad de canales	Tipos de salidas y cantidad de canales
24V (d.c)	8 digitales 24V(d.c)	6 digitales 24V(d.c) a 0.5A
0.8A	2 analógicas 0-10V (10bit)	1 analógica 0-10V (12bit)

Este PLC presenta un bloque de funciones (*function block)* que nos permite la programación e implementación del regulador PID optimizado

Figura 2.5. Esquema comercial del PLC Moeller serie PS4-201-MM1

En la figura 2.1, en el bloque que se presenta al regulador PID la variable de entrada es *e* y la variable de salida es *p*. La función transferencial es:

$$Gc(s) = \frac{P(s)}{E(s)} = Kc \cdot \left(1 + \frac{1}{\tau i \cdot s} + \tau d \cdot s \right) \tag{2.19}$$

Kc, τi y τd son las variables que determinan el comportamiento del sistema de control.

2.6 Lazo de control

Como resultado de los análisis anteriores, la figura 2.1 puede redibujarse de la siguiente forma:

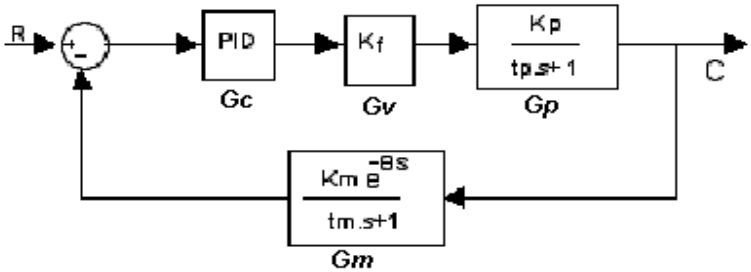

Figura 2.6. Diagrama de control de lazo cerrado

Unas vez conocidas las funciones transferenciales de cada uno de los elementos que constituyen el lazo de control de la concentración de metanol, se sintonizarán en el próximo capítulo los reguladores empleando técnicas prácticas para lograr un ajuste óptimo de los parámetros del mismo.

2.7 Conclusiones

En este capítulo se explicó el principio de funcionamiento del lazo a controlar y se hallaron los modelos matemáticos que representan a cada uno de los elementos que conforman al lazo de control.

A pesar de que el proceso es altamente no lineal se pueden considerar estadios seudo-estables, a partir de esto se obtienen los modelos lineales que nos permitirán en el próximo capítulo hallar la sintonía de los reguladores.

CAPÍTULO 3. SINTONÍA Y CONTROL DEL PROCESO

El ajuste o sintonía de parámetros es frecuente en procesos industriales, no solo en los trabajos de puesta en marcha, sino también cuando se detectan cambios sustanciales del comportamiento del proceso. Muchos han sido los esfuerzos realizados por investigadores para desarrollar procedimientos o técnicas que nos permitan encontrar de forma práctica y sencilla los parámetros óptimos de un regulador.

En este capítulo se plantean las condiciones de operación del proceso, se expone la identificación del modelo PORT, la sintonía de los reguladores para mínimo IAE e ITAE, la implementación del programador de ganancia (*gain schedule*) y se muestran las respuestas obtenidas. Por último, se realiza un análisis económico y medio ambiental del trabajo realizado.

3.1 Datos del proceso

En general el proceso fue descrito en el capítulo uno. En particular se trata de un proceso fermentativo para la producción de la vacuna antihepatitis B.

Este proceso fermentativo es efectuado en un biorreactor B. E. Marubishi de 5L con agitación mecánica, siendo la velocidad de agitación de 120 rpm. El flujo de aire es de 0.5 fracción del volumen en fermentación por minuto. La temperatura es regulada a 27° C durante las primeras 40 horas, luego disminuyéndose a 25 ° C. El pH se deja libre durante las primeras 20 horas, seguidamente se mantiene en 5. La presión dentro del fermentador se regula durante todo el proceso alrededor de los 1.2 bar.

En cuanto a la variable de interés concentración de metanol, el proceso de producción requiere que esta se encuentre entre cero y 3g/L para obtener los mejores resultados.

En la tabla 3.1 se dan una serie de datos que se emplearon en el proceso y otros que fueron hallados experimentalmente y que son específicos de esta levadura con esas condiciones de operación.

Tabla 3.1. Parámetros empleados en el experimento.

Variable	Valor	Fuente
Kf	0.0121	medición
λ	-0.0628	medición
α 1	0.84	experimental
$\alpha 2$	0.0071	experimental
$\beta 1$	0.0216	experimental
$\beta 2$	8.86	experimental
$\beta 3$	13.29	experimental
X	150	valor requerido
$\delta 1$	20.14	medición
$\delta 2$	13.96	medición
Km	10.14	cálculo
θ	1.6	medición
tm	6.78	medición
V	2	valor requerido

3.2 Identificación del modelo PORT y sintonía de los reguladores

Una vez conocidas las funciones transferenciales de cada uno de los elementos que conforman el lazo de control, se determinan los parámetros del modelo PORT (Primer Orden con Retardo de Transporte), cuyos parámetros nos servirán para determinar el ajuste del regulador.

Multiplicando las funciones transferenciales de cada uno de los elementos que constituyen el lazo en la figura 2.6, llegamos a que la función de transferencia de lazo abierto del sistema es:

$$GH(s) = \frac{K_f \cdot K_p \cdot K_m \cdot e^{-\theta \cdot S}}{(\tau_p \cdot s + 1) \cdot (\tau_m \cdot s + 1)} \tag{3.1}$$

recordando que Kp y τ_p dependen del punto de operación del sistema.

Para obtener los modelos PORT en varios puntos de operación entre los cuales las variaciones de la concentración de metanol son considerables, se utiliza el método de identificación propuesto por Smith y Corripio (1997).

Con el apoyo del software Matlab, se obtienen los valores de los parámetros del modelo PORT.

$$GH(s) = \frac{K \cdot e^{-to \cdot s}}{(\tau \cdot s + 1)} \tag{3.2}$$

En la tabla 3.2 se muestran los modelos PORT hallados alrededor de cada punto de operación, así como los parámetros de los reguladores obtenidos para los dos métodos empleados para sintonizar los reguladores: mínimo IAE y mínimo ITAE (ver estas fórmulas de sintonía de reguladores en Anexo I).

Tabla 3.2 Modelos del proceso y ajuste de reguladores

Punto de consigna	Modelo del proceso PORT	PID - IAE	PID - ITAE
1.0g/L	$GH(s)=\frac{1.9568\cdot e^{-6.6425\cdot S}}{18.9375\cdot s+1}$	$Kc=1.3793$ $\tau_i=27.2701$ $\tau_d=2.5295$	$Kc=1.2078$ $\tau_i=25.4386$ $\tau_d=2.2034$
1.3g/L	$GH(s)=\frac{2.7123\cdot e^{-8.1\cdot S}}{22.56\cdot s+1}$	$Kc=0.9751$ $\tau_i=32.5389$ $\tau_d=3.0783$	$Kc=0.8541$ $\tau_i=30.3543$ $\tau_d=2.6824$
1.6g/L	$GH(s)=\frac{3.777\cdot e^{-8.3502\cdot S}}{31.1019\cdot s+1}$	$Kc=0.7643$ $\tau_i=44.11$ $\tau_d=3.2537$	$Kc=0.7864$ $\tau_i=41.11$ $\tau_d=2.8228$

3.3 Análisis de respuesta del lazo de control

En la figura 3.1 se muestran las salidas de la variable controlada empleando reguladores PID optimizados. Además, se incluye la respuesta del proceso empleando un ajuste obtenido mediante un método propuesto por Zhang (2002) para optimizar los parámetros del regulador PID. Las simulaciones se realizan con concentración inicial de 0.7 g/L y valor final deseado de 1.7g/L.

Varios parámetros temporales de cada respuesta se tabulan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Parámetros temporales de las respuestas obtenidas para variación de 1.0g/L

Método de ajuste	Máxima sobrecresta (M_p)	Tiempo de establecimiento (t_s)
IAE	16.12%	28.7min
ITAE	14.46%	30.89min
Zhang	16.00%	55.5min

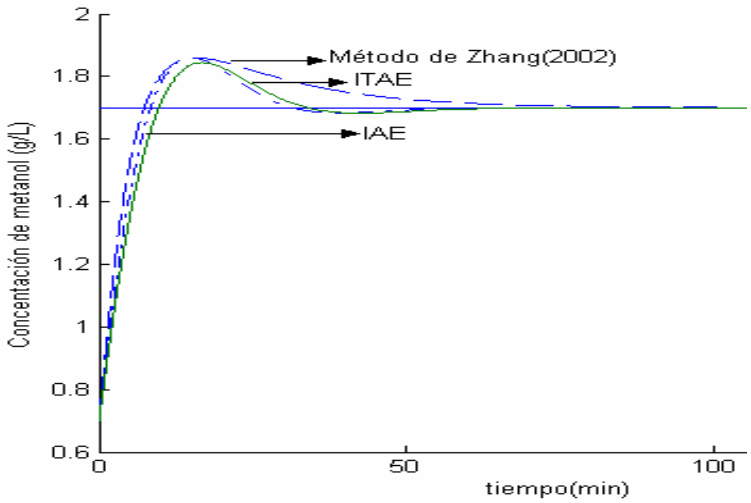

Figura 3.1. Respuestas para una variación de 1.0g/L utilizando PID optimizados por IAE (línea discontinua por puntos), ITAE (línea continua) y método de Zhang (2002) (línea discontinua).

Como se aprecia en este ejemplo: no existen muchas diferencias entre los tres métodos de ajuste en cuanto a máxima sobrecresta, aunque con ITAE se obtiene el valor mínimo. En cuanto al tiempo de establecimiento sí existe una diferencia apreciable entre los valores de IAE e ITAE y el valor del método de Zhang (2002), ya que los primeros obtienen una reducción de aproximadamente el 50% de este parámetro.

En la figura 3.2, al igual que en la figura anterior, son mostrados los dos métodos empleados aquí, IAE e ITAE, además del usado por Zhang (2002).

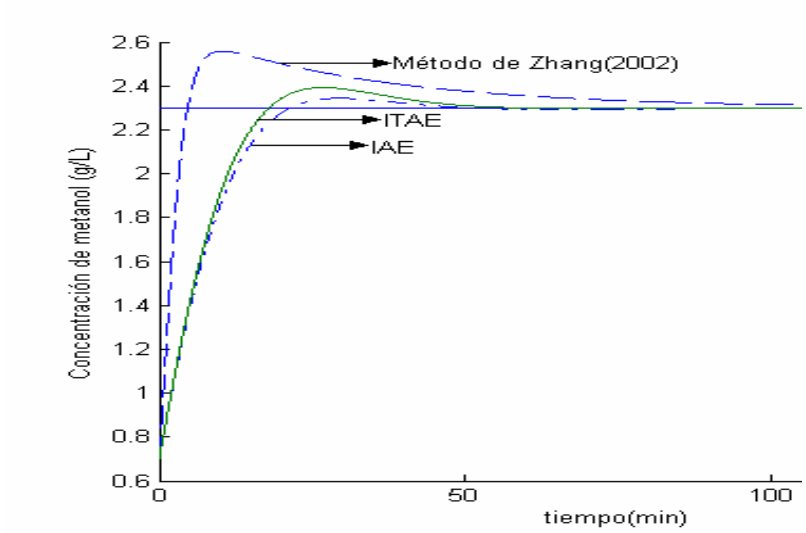

Figura 3.2. Respuestas para una variación de 1.6g/L utilizando PID optimizados por IAE (línea discontinua por puntos), ITAE (línea continua) y método de Zhang (2002) (línea discontinua).

De la figura 3.2 se obtienen los parámetros temporales de cada respuesta, los que se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Parámetros temporales de las respuestas obtenidas para variación de 1.6g/L

Métodos de ajustes	Máxima sobrecresta (M_p)	Tiempo de establecimiento (t_s)
IAE	2.725%	36.36min
ITAE	5.743%	42.55min
Zhang	16.18%	76.88min

Alrededor de este punto de operación sí existen diferencias notables entre los tres métodos de ajuste en cuanto a máxima sobrecresta, en el caso de IAE e ITAE este valor es significativamente inferior en comparación con el que obtiene Zhang (2002). Específicamente, el valor de IAE obtiene la mayor reducción de este parámetro. En cuanto al tiempo de establecimiento, se mantiene la tendencia del ejemplo anterior consistente en que en el método de Zhang (2002) este parámetro es mucho mayor que en los dos restantes métodos.

A continuación se compara el comportamiento de los reguladores optimizados para diferentes puntos de operación en distintas condiciones de funcionamiento.

Producto a que el proceso es muy alineal en la figura que a continuación se muestra se evidencia que los ajustes óptimos solo son válidos alrededor del punto de operación para el cual fue sintonizado el regulador y la respuesta se deteriora en puntos alejados del punto de sintonía.

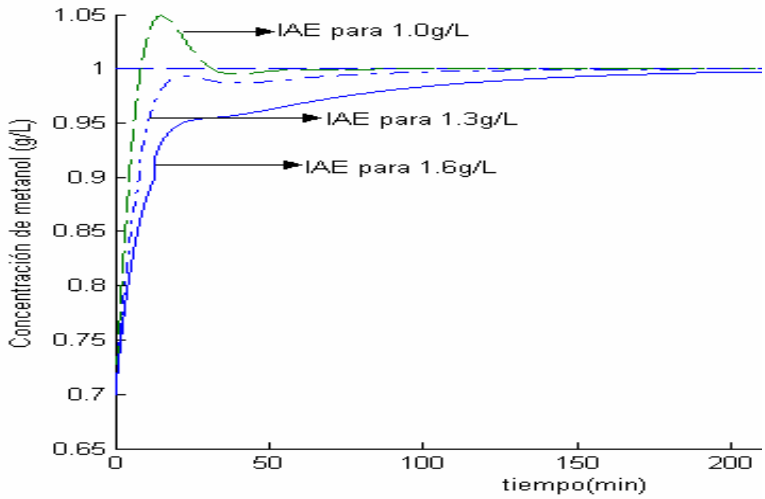

Figura 3.3. Comportamiento de las respuestas del sistema por IAE colocando como punto de consigna (1.0 g/L línea discontinua) en los reguladores sintonizados para (1.3g/L línea discontinua por puntos) y (1.6g/L línea continua)

En la figura 3.3 se muestra como se deteriora la respuesta del sistema en la medida que se aleja del punto de operación para el cual se sintonizó el regulador, en este caso la respuesta del sistema con el regulador sintonizado para 1.3g/L y 1.6g/L pasan de ser sistemas subamortiguados a casi críticamente amortiguados con una respuesta muy lenta y un tiempo de establecimiento demasiado grande como lo recoge la tabla 3.5. Esta tabla muestra similares resultados para el resto de las combinaciones.

En los tres experimentos se pueden evidenciar como el comportamiento de los reguladores cuando se cambia el valor deseado tiende a hacer al sistema en algunos casos críticamente amortiguado, haciéndolo más lento y en otros aumentándole la máxima sobrecresta.

Empleando el método ITAE se tienen comportamientos similares a los anteriores. De ahí que no se analicen estas respuestas empleando dicho método.

Tabla 3.5 Parámetros temporales de las combinaciones de reguladores

Ajuste del regulador	Para 1.0g/L		Para 1.3g/L		Para 1.6g/L	
	(M_p)	(t_s)	(M_p)	(t_s)	(M_p)	(t_s)
Sintonizado en 1.0g/L	**16.12%**	**28.7min**	32.07%	40.82min	41.57%	65.50min
Sintonizado en 1.3g/L	----	74.05min	**13.48%**	**37.98min**	24.31min	50.01min
Sintonizado en 1.6g/L	----	161.5min	----	125.5min	**2.725%**	**36.36min**

3.4 Programación de ganancia (*gain schedule*)

Como se deteriora tanto la respuesta del sistema se implementa una técnica avanzada de control conocida como: programador de ganancia (*gain schedule*). El sistema de programación de ganancia (*gain schedule*) es implementado en Matlab y excitado con pasos de forma escalonada obteniéndose resultados alentadores como los mostrados en las figuras 3.6 y 3.7.

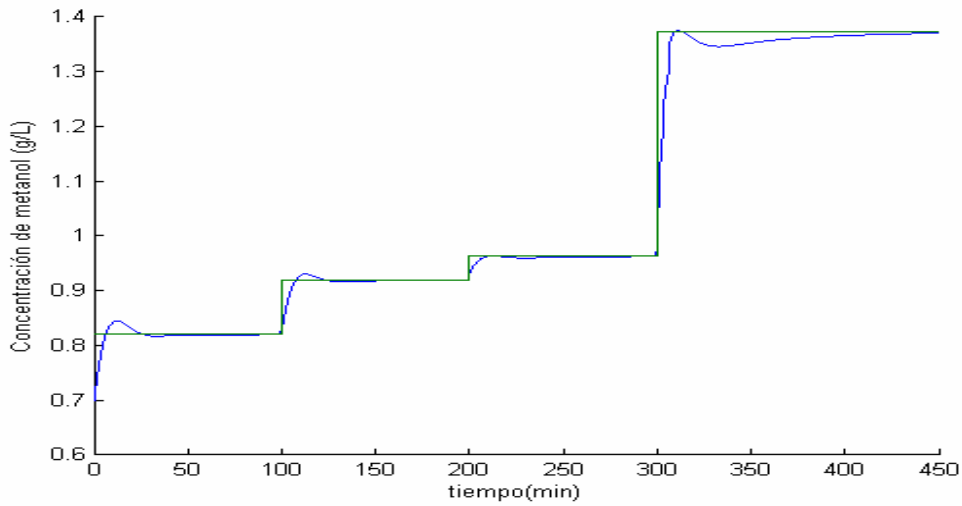

Figura 3.6. Comportamiento del sistema ante una entrada tipo escalera con variaciones en la subida de los pasos de 0.12g/L, 0.12g/L, 0.65g/L y 0.41g/L respectivamente.

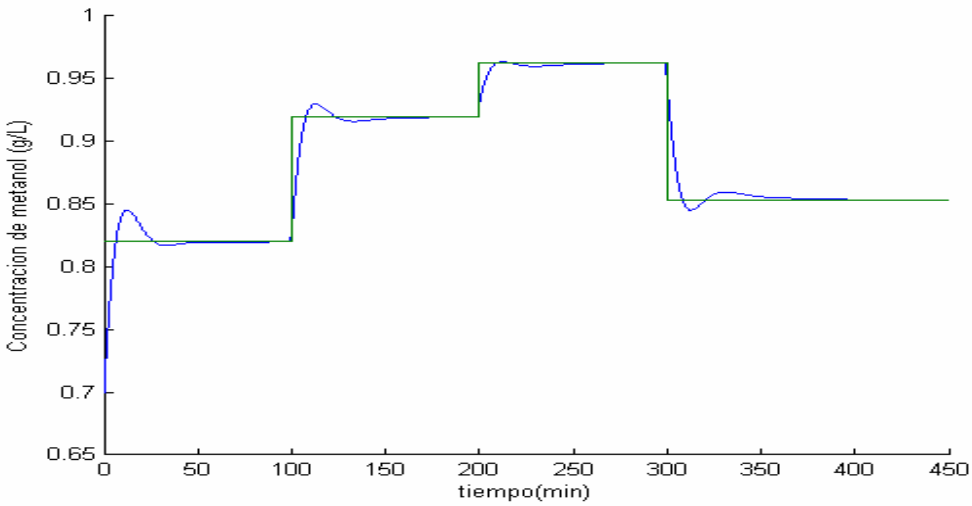

Figura 3.7. Comportamiento del sistema ante una entrada tipo escalera con variaciones de subida de los pasos de 0.12g/L, 0.12g/L, 0.03g/L y de bajada 0.11g/L respectivamente.

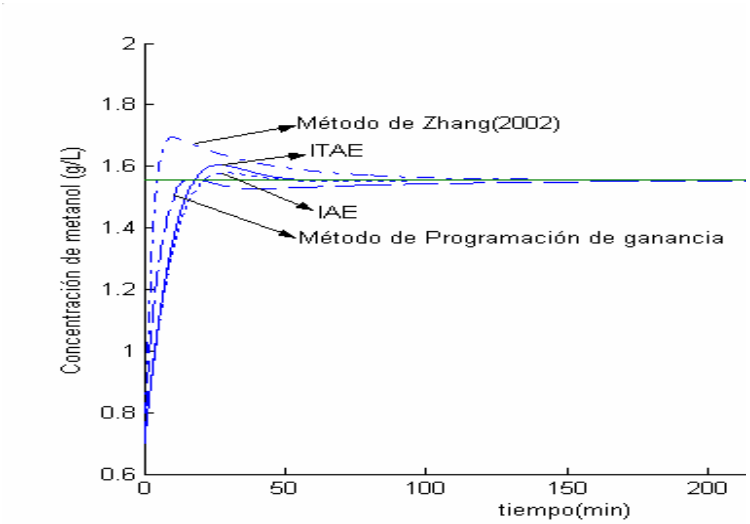

Figura 3.8. Respuestas para una variación de 0.85g/L utilizando PID optimizados por IAE (línea de puntos), ITAE (línea continua), el método de Zhang (2002) (línea discontinua por puntos) y el método de programación de ganancia (línea discontinua).

Como era de esperar el método de programación de ganancia es el de menor sobrecresta de los cuatro, debido a que el mismo logra autoajustarce con los parámetros más óptimos y dar así la mejor respuesta, sin embargo, el tiempo de establecimiento es menor en IAE e ITAE respectivamente.

3.5 Análisis económico y medio ambiental

La implementación real del proyecto en la producción, es decir, la adquisición de cada uno de los elementos que constituyen el sistema de control, así como su montaje en la práctica, no constituye una gran dificultad puesto que se pueden encontrar en el mercado a un precio asequible y con buenas prestaciones.

En el caso del PLC, se pueden encontrar entre los 300 o 400 dólares. Los sensores solos, es decir, sin el transductor, se encuentran en el mercado entre 50 y 100 dólares; algo más caros que otros sensores industriales por su aplicación, utilidad y fiabilidad. En el caso de las bombas peristálticas, en el mercado se encuentran con muy buenas prestaciones a precios que oscilan alrededor de los 200 dólares.

En los análisis realizados por los tecnólogos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), con la implantación del control automático aquí expuesto ha

aumentado el consumo de metanol con respecto al sistema no controlado. También se han detectado incrementos en la cantidad de biomasa que se produce de un 30 a un 40% en cada fermentación. Sin embargo, el logro más importante es que se obtiene un aumento considerable de la productividad del sistema en cuanto a la concentración de insulina. Económicamente hablando, este resultado tiene un peso más fuerte que el incremento en el costo del reactivo metanol, el cual no es de los más caros que intervienen en el proceso.

Por otro lado, con el sistema controlado se garantiza que se mantengan las expulsiones de metanol al medio ambiente dentro de las regulaciones establecidas, con lo cual se evita que el metanol se encuentre en grandes concentraciones en el aire, puesto que las concentraciones de más de 1000 ppm pueden causar irritación de las membranas mucosas e irritación de leve a moderado a los ojos, además de lágrimas y ardor.

3.6 Conclusiones

En el presente capítulo se identificó el modelo PORT y se determinó la sintonía óptima de los reguladores en los puntos de operación seleccionados a partir de dichos modelos. A continuación se muestran las respuestas del sistema con cada uno de los ajustes empleados.

Se determinaron los parámetros temporales (máxima sobrecresta y tiempo de establecimiento) para cada uno de los métodos empleados estableciendo comparaciones entre ellos. Se observa que los ajustes empleados mejoran la respuesta cuando se comparan con los resultados del método de Zhang (2002).

Posteriormente, se realizaron varias pruebas con los distintos reguladores óptimos por los métodos IAE e ITAE en diferentes puntos de operación, observándose la no linealidad del proceso y la degradación de la respuesta cuando el sistema se aleja del punto de operación para el cual se han optimizado los PID. Ante esta situación, se implementa la estrategia de programación de ganancias. En las respuestas del sistema cuando se implementó el algoritmo de programación de ganancia (*gain schedule*), se

observaron resultados alentadores que están en correspondencia con las exigencias del proceso.

CONCLUSIONES

Tomando como base el objetivo fundamental de este trabajo, se arriba a las siguientes conclusiones:

1. Es importante el modelado y control de la concentración de metanol en las fermentaciones que usan la levadura Pichia pastoris pues la misma determina el crecimiento acelerado o desacelerado de los microorganismos. Como es necesario que estos crezcan a ritmo constante y cerca del máximo posible, se necesita obtener un modelo matemático del sistema que describa su dinámica con precisión y que permita el ajuste óptimo de los reguladores.
2. Los ajustes del PID obtenidos para mínimo IAE y mínimo ITAE mejoran la respuesta del sistema en comparación con otros métodos en cada punto de operación analizado y tomando en consideración los parámetros temporales de máxima sobrecresta y tiempo de establecimiento de cada uno de los métodos.
3. Debido a la alta no linealidad del proceso, se comprobó el empeoramiento de la respuesta del sistema cuando el punto de operación está distante de las condiciones de sintonía de los reguladores.
4. Al implementarse el algoritmo de programación de ganancia (*gain schedule*), se observan buenos resultados en todas las zonas de operación del sistema, ya que con este algoritmo se logra auto-ajuste de los parámetros de los reguladores.

RECOMENDACIONES

Con vistas a trabajos de investigación futuros en esta temática, se recomienda:

- Aplicar técnicas de control inteligente al proceso estudiado, ya que resuelven muchos de los problemas existentes en la industria.
- Realizar la identificación del modelo del sistema empleando otros métodos existentes, ejemplo: la identificación borrosa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bastin, G., Dochain, D. (1990). *On-line estimation and adaptive control of biorreactors.* Elsevire, Louvain, Belgium.

2. Busquets O. (2005). *Monitorització i control del procés de producció de proteïnes heterólogues en el llevat metilotrófic Pichia pastoris.* Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona, España.

3. Contois D. (1959). *Kinetics of bacterial growth relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures.* J. Gen. Microbiol., 21, 40-50.

4. Cregg J.M., Tschoop J.F., Stillman C., Siegel R., Akong M., Criag R.G., Madden K.R., Kellaris P.A., Davis G.R., Smiley B.L., Cruze J., Torregossa R., Vilicelebi G. (1987). High level expression and efficient assembly of the Hepatitis Bsurface antigen in the methylotrophic yeast Pichia pastoris, *Bio/Technology.* 5:479-48.

5. Eykhoff P. (1981). *Trends and progress in system identification*. Pergamon Press. Oxford, UK.

6. Franco E. (2002). *Framework for online modeling, optimization and monitoring of bioprocesses.* Dr.Ing. Dissertation., Martin-Luther-Universität Halle - Wittenberg, Germany.

7. Haldane J.B.S: (1930). *Enzymes.* Longmans, London.

8. Hernández M. (1999). Identificación de parámetros en una estructura de modelo para un biorreactor con Algoritmos Genéticos. Memorias Simposio de Ingeniería Eléctrica, UCLV, Santa Clara, 1999.

9. Jahic M., Wallberg F., Bollok M., Garcia P. (2003). Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysisin *Pichia pastoris* biorreactor cultures, *Microbial Cell Factories 2003*. 2:6.

10. Johannisson R. (1999). Production of recombinant protein by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, Tesis de Maestría, Universidad de Uppsala, Suecia.

11. Lin C.J., Cregg J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris, *FEMS Microbiol Rev*.Jan:24(1):45-66.

12. Lim H.K., Choi S.J., Kim K.Y., Jung K.H. (2003). Dissolved-oxygen-stat controlling two variables for methanol induction of rGuamerin in Pichia pastoris and its application to repeated fed-batch, *Microbiol Biotechnol 2003*. 62:342–348.

13. Lim H.K., Woo S.H., Park S.H., Jung K.H. (2005). Extended operation of a pressurized 75-L biorreactor for shLkn-1production by Pichia pastoris using dissolved oxygen profile control, *Microbiol Biotechnol 2005*. 32: 474–480.

14. Ljung L. (1999). *System Identification: Theory for the User* (2nd Edition.).rentice-Hall, Inc. New Jersey, EE. UU.

15. Michaelis L., Menten M.L. (1918). *Die kinetic der invertinwirkung.* Biochemische Zeitschrift, 49, 334-369.

16. Monod J. (1942). *Researches sur la croissance des cultures bactériennes.* Hermann, Paris.

17. Naranjo F., López J. (1997). *Análisis y control de un proceso de fermentación.* Cali. Colombia.

18. Ogata K., Nishikawa H., Ohsugi M. (1969). A yeast capable of utilising methanol, *Arg.Biol.Chem.* 33:1519-1520.

19. Okumura S.A., Yamanoi R. Tsugawa T., Nakae T. (1973). UK Patent specif 1, 210,770.

20. Romero, J., Herrera, F., González, E. (1995). *Sistema de regulación para un biorreactor*. Trabajo de Diploma, Dpto. de Automática, Fac. de Ing. Eléctrica, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba.

21. Smith C.A, Corripio A.B. (1997). Principles and Practice of Automatic Process Control. John Wiley & Sons, 2nd edition.

22. Tani Y., Kato N., H.Yamada. (1978). Utilitzation of methanol by yeasts, *Adv.Appl Microbiol.* 24:165-186.

23. Tessier G. (1942). Croissance des populations bactériennes et quantités d'aliments disponibles. Rev. Sci., Paris, 180-209.

24. Zarnea G. et.al. (1980). *Microbial enzymatic products bioengineering.* Technical E. Bucuresti.

25. Zhang W., Smith L.A., Plantz B.A., Bevins M.A., Meagher M.M. (2000). Modeling Pichia pastoris growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype A, *Biotechnol. bioeng*. 70(1): 1-8.

26. Zhang W., Smith L.A., Plantz B.A., Schlegel V.L., Meagher M.M. (2002). Design of methanol feed control in Pichia pastoris fermentations based upon a growth model, *Biotechnol Prog*. 18: 1392-9.

ANEXOS

Anexo I Fórmulas de sintonía para cambios en el punto de consigna a partir del modelo PORT

A continuación se muestras las fórmulas prácticas de la sintonía de PID ante cambios en el punto de consigna, basadas en la minimización de la integral del error absoluto (IAE) y de la integral del tiempo por el error absoluto (ITAE) a partir de los parámetros del modelo PORT equivalente. En la tabla se recogen las fórmulas y los valores implícitos en dichas fórmulas. Para más detalles, ver Smith y Corripio (1997).

Error Integral	IAE	ITAE
$Kc = \frac{a_1}{K} \cdot (\frac{\tau_0}{\tau})^{b_1}$	$a_1 = 1.086$ $b_1 = -0.869$	$a_1 = 0.965$ $b_1 = -0.855$
$\tau_i = \frac{\tau}{a_2 + b_2 \cdot (\frac{\tau_0}{\tau})}$	$a_2 = 0.740$ $b_2 = -0.130$	$a_2 = 0.796$ $b_2 = -0.147$
$\tau_d = a_3 \cdot \tau \cdot (\frac{\tau_0}{\tau})^{b_3}$	$a_2 = 0.740$ $b_2 = -0.130$	$a_2 = 0.740$ $b_2 = -0.130$