



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA**

**MAXIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE POLÍMEROS  
BIODEGRADABLES DURANTE EL TRATAMIENTO DE  
AGUAS RESIDUALES**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN INGENIERÍA**

**INGENIERÍA AMBIENTAL**

P R E S E N T A:

**RODOLFO ESAÚ AMAYA VIGIL**

TUTOR:

**DR. ALEJANDRO VARGAS CASILLAS**

2011

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: Dr. Daniel Genaro Segura Gonzalez

SECRETARIO: Dr. Jorge Luis de Victorica Almeida

VOCAL: Dr. Alejandro Vargas Casillas

1ER. SUPLENTE: Dr. Germán Cuevas Rodríguez

2DO. SUPLENTE: Dr. Oscar González Barceló

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas en la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México. Algunos recursos para su realización fueron otorgados por el proyecto SEP-CONACYT 82974 de Ciencia Básica.



**TUTOR DE TESIS:**

DR. ALEJANDRO VARGAS CASILLAS

---

## Resumen

En este trabajo se reporta la producción de un tipo de polímeros biodegradables –los polihidroxicanoatos (PHAs)- a partir de sustratos orgánicos presentes en aguas residuales empleando cultivos mixtos de microorganismos presentes en lodos activados de plantas de tratamiento de aguas. Para la producción de PHAs se utilizó un sistema de dos biorreactores. El primero de ellos fue un reactor SBR en el cual se realizó la selección de la biomasa capaz de almacenar PHAs y el segundo fue un reactor operado en lote, inoculado con lodos del primero, para la producción del polímero. Se utilizó una estrategia de alimentación por pulsos con control de oxígeno disuelto (OD). El OD se reguló a 3 mg/L midiéndolo en línea y manipulando el flujo de aire que entra al reactor a través de un controlador de flujo másico. La relación C/N fue de 50 en la alimentación del reactor de producción de PHAs. Tres estrategias de control automático en la alimentación por pulsos de sustrato fueron probadas en este trabajo, todas ellas encaminadas a maximizar la tasa de producción de PHAs. La estrategia de control con retroalimentación basada en un modelo matemático resultó ser la mejor de las tres estrategias probadas, obteniéndose una productividad de 1.7 mgPHA/mgDQO·d y una acumulación intracelular de PHA del 80% en peso celular seco a las 6 horas del experimento.

## Abstract

Production of biodegradable polymers -polyhydroxyalkanoates (PHA)- from organic substrates present in wastewaters using mixed cultures of microorganisms present in activated sludge wastewater treatment plants was reported in this study. For PHA production, a system consisting of two bioreactors was used. The first one was a SBR reactor, where the biomass selection was realized, and the second was a batch reactor. This reactor was inoculated with sludge from the SBR for the polymer production. A feed-pulse strategy with dissolved oxygen control (DO) was used. The DO was regulated at 3 mg/L; it was measured on-line and the airflow rate into the reactor was manipulated using a mass flow controller. The C/N relation was 50 in the feed to the PHA production reactor. Three strategies of automatic control on the feed-pulses were tested in this study, all of them to improve the PHA production rate. A feed-back control strategy based on a mathematical model was the best of the three. A productivity of 1.7 mgPHA/mgDQO·d was obtained and the PHA accumulation per dry cell weight was 80% at 6 hours of the experiment.

## ÍNDICE GENERAL

|   | <b>Contenido</b> |
|---|------------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS.....  | 6                |
| ÍNDICE DE TABLAS.....   | 6                |
| Capítulo 1 Introducción .....   | 7                |
| 1.1 Introducción.....   | 7                |
| 1.2 Hipótesis .....   | 8                |
| 1.3 Objetivo general .....  | 8                |
| 1.4 Objetivos específicos .....   | 8                |
| Capítulo 2 Antecedentes.....  | 10               |
| 2.1 Propiedades y estructura de los polihidroxicanoatos (PHAs) .....        | 10               |
| 2.2 Tecnologías para la producción de PHAs.....                             | 11               |
| 2.3 Almacenamiento de PHAs en cultivos mixtos .....                         | 12               |
| 2.4 Reacciones bioquímicas en la producción de PHAs .....                   | 12               |
| 2.5 Estrategias de control en reactores SBR para la producción de PHAs..... | 14               |
| 2.6 Optimización del proceso .....  | 16               |
| 2.7 Modelado matemático en la acumulación de PHAs .....                     | 17               |
| Capítulo 3 Desarrollo Experimental.....                                     | 20               |
| 3.1 Estrategia experimental .....   | 20               |
| 3.1.1 Reactor de enriquecimiento selectivo .....                            | 20               |
| 3.1.2 Reactor de producción de PHA .....                                    | 22               |
| 3.2 Estrategias de alimentación .....                                       | 22               |
| 3.3 Modelo matemático y estructura del controlador.....                     | 24               |
| 3.3.1 Modelo matemático para el proceso de acumulación de PHA .....         | 24               |
| 3.3.2 Modelo matemático para el reactor en lote.....                        | 25               |
| 3.3.3 Algoritmo de control de alimentación por pulsos .....                 | 27               |
| 3.4 Diseño de experimentos.....   | 29               |
| 3.5 Técnicas analíticas .....   | 30               |
| 3.5.1 Sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos .....                  | 30               |
| 3.5.2 Determinación de PHAs por cromatografía de gases .....                | 32               |
| Capítulo 4 Resultados y Discusión .....                                     | 33               |

|   |    |
|---|----|
| 4.1 Representación gráfica de la adición de los pulsos .....                            | 33 |
| 4.1.1 Estrategia de control 1 .....   | 33 |
| 4.1.2 Estrategia de control 2 .....   | 34 |
| 4.1.3 Estrategia de control 3 .....   | 35 |
| 4.2 Parámetros evaluados .....  | 36 |
| 4.2.1 Productividad de PHA .....  | 36 |
| 4.2.2 Contenido intracelular de PHA.....  | 37 |
| 4.3 Resultados de los parámetros evaluados con la estrategia de control 1.....          | 37 |
| 4.4 Resultados de los parámetros evaluados con la estrategia de control 2.....          | 38 |
| 4.5 Resultados de los parámetros evaluados con la estrategia de control 3.....          | 39 |
| 4.5 Comparación de los resultados obtenidos entre las tres estrategias de control ..... | 40 |
| 4.6 Efecto de la relación entre el tiempo de reacción y la acumulación de PHA.....      | 43 |
| Capítulo 5 Conclusiones.....  | 45 |
| Capítulo 6 Referencias .....  | 47 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Estructura general de los polihidroxicanoatos.....   | 11 |
| Figura 2. Representación esquemática del sistema de producción de PHA.....   | 20 |
| Figura 3. Reactor de enriquecimiento selectivo.....  | 21 |
| Figura 4. Reactor de producción de PHA.....  | 22 |
| Figura 5a. Representación gráfica de la adición de los pulsos empleando la estrategia de control 1.....  | 33 |
| Figura 5b. Programa de alimentación automática por pulsos usando la estrategia de control 1.....   | 33 |
| Figura 6. Esquematización de la adición de los pulsos utilizando la estrategia de control 1.....   | 34 |
| Figura 7. Representación gráfica de la adición de los pulsos empleando la estrategia de control 2.....   | 35 |
| Figura 8. Representación gráfica de la adición de los pulsos empleando la estrategia de control 3.....   | 36 |
| Figura 9. Productividad y contenido intracelular de PHA a distintas concentraciones de sustrato empleando la estrategia de control 1.....              | 38 |
| Figura 10. Productividad y contenido intracelular de PHA a distintas concentraciones de sustrato empleando la estrategia de control 2.....             | 39 |
| Figura 11. Productividad y contenido intracelular de PHA empleando la estrategia de control 3.....   | 40 |
| Figura 12. Productividad y contenido intracelular de PHA de las tres estrategias de control a 200 mgDQO/L.....   | 41 |
| Figura 13. Efecto del tiempo de reacción de cada pulso de alimentación en la acumulación intracelular de PHA empleando la estrategia de control 3..... | 44 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Modelo metabólico de producción de PHA de mezclas de acetato y propionato en cultivos mixtos .....           | 14 |
| Tabla 2. Composición química del medio mineral.....   | 21 |
| Tabla 3. Pruebas realizadas para cada estrategia de control.....  | 30 |
| Tabla 4. Comparación de las medias de los parámetros del modelo por medio de una prueba t de Student de una cola..... | 42 |

## Capítulo 1 Introducción

### 1.1 Introducción

Los materiales plásticos están presentes en cada día de nuestra vida en forma de envases y utensilios desechables, muebles, empaques y en muchos otros objetos, haciendo más cómoda nuestra vida y nuestro confort (Khanna y Srivastava, 2009). El uso de los plásticos se ha incrementado rápidamente en las últimas décadas; aproximadamente 150 millones de toneladas de materiales plásticos son consumidas anualmente alrededor del mundo (London Metal Exchange, 2009). El crecimiento en el consumo de plástico experimentado en los últimos años se espera que continúe hasta 2020 (Crank et al., 2004). Al menos la mitad de los plásticos consumidos anualmente es empleada principalmente en materiales de empaque, así como en envases y utensilios que son desechados después de un par de semanas de uso (Cachum, 2006). Como resultado de las grandes cantidades de plástico usado en aplicaciones a corto plazo, la proporción de plásticos en residuos domésticos, comerciales e industriales puede ser tan alta como el 15% (Law et al., 2003). La baja tasa de degradación de estos plásticos, los cuales persisten en el ambiente un promedio de 100 años, tiene como resultado un serio problema de contaminación.

En rellenos y tiraderos la tasa de degradación puede llegar a ser extremadamente baja. La incineración es cara y puede generar subproductos tóxicos. El reciclaje tiene algunas dificultades debido a la gran variedad de plásticos que se producen, así como las alteraciones que el mismo proceso causa en las propiedades de los polímeros que los componen. Por consiguiente, una alternativa interesante para reducir los impactos ambientales de los plásticos es reemplazar los polímeros convencionales derivados del petróleo con otros biodegradables. En este contexto, polímeros de origen biológico como los derivados de almidón, ácido poliláctico, polímeros de la celulosa y polihidroxicanoatos juegan un papel importante. Además de ser biodegradables, tienen la gran ventaja de que pueden ser producidos a partir de recursos renovables (Nath et al., 2008; Flieger et al., 2003). No obstante, el mercado potencial de los biopolímeros dependerá fuertemente de su precio y del desarrollo de tecnologías eficientes para la producción de estos polímeros.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son plásticos biodegradables con propiedades similares a las del polipropileno. Sin embargo, uno de los problemas para el desarrollo de estos polímeros biodegradables como sustitutos de los plásticos convencionales es su alto

precio, comparado con los plásticos derivados de petroquímicos. Muchos procesos para la producción de PHA son basados en cultivos puros desarrollados sobre medios sintéticos con nutrientes bien definidos y sustratos simples. El alto costo del sustrato y el equipo requerido para la operación aséptica del proceso son los principales factores que hacen que el precio de venta de los PHA sea elevado. El uso de cultivos mixtos y recursos renovables pueden disminuir sustancialmente el costo de los PHAs e incrementar su mercado potencial (Dias et al., 2005). La utilización de agua residual con alto contenido de ácidos grasos volátiles como fuente de carbono, representa una reducción del 30 al 50% en el costo total de producción de PHAs. Otra alternativa para reducir el costo de producción es el uso de consorcios microbianos desarrollados sobre materiales sintéticos (Kourmentza et al., 2009).

Aguas residuales agroindustriales y lodos activados pueden ser una alternativa viable, como un sustrato de bajo costo y la biomasa respectivamente, para la producción de PHA (Beun et al., 2000). La producción de PHAs en lodos activados, usando aguas residuales ha sido probada a nivel laboratorio en procesos en lote por varios investigadores (Koutinas et al., 2007); obteniéndose resultados de 40 al 67% en peso celular seco de PHA (Khardenavis et al., 2007).

## **1.2 Hipótesis**

La estrategia de alimentación con control retroalimentado (3), basada en el modelo matemático, mejora la tasa de producción de PHAs con respecto a otras estrategias.

## **1.3 Objetivo general**

Desarrollar una estrategia de control automático para maximizar la tasa de producción de PHAs a partir de sustratos orgánicos presentes en aguas residuales.

## **1.4 Objetivos específicos**

- Confirmar las condiciones óptimas de operación de un biorreactor SBR de enriquecimiento selectivo para la producción de PHA.
- Evaluar la operación del reactor de producción de PHA bajo distintos regímenes de alimentación de sustrato.



- Probar tres estrategias de control automático para la alimentación de los pulsos en el reactor de producción de PHA:
  - Estrategia de control 1: Se suministran los pulsos de alimentación cuando el flujo de aire llega a un valor de referencia.
  - Estrategia de control 2: Se suministran los pulsos de alimentación cuando el flujo de aire llega a un valor de referencia o se alcanza un límite de tiempo establecido.
  - Estrategia con control 3: Se suministran los pulsos de alimentación con base en el modelo matemático que se actualiza con datos del pulso anterior y que predice la duración de la reacción para adicionar el siguiente pulso.

## Capítulo 2 Antecedentes

### 2.1 Propiedades y estructura de los polihidroxicanoatos (PHAs)

Uno de los materiales biodegradables más prometedores que ha emergido en los últimos años es la familia de polihidroxicanoatos (PHAs), polímeros sintetizados por bacterias (Lee et al., 1999; Luengo et al., 2003; Reddy et al., 2003). Los PHAs tienen propiedades similares a las del polietileno y polipropileno (Holmes y Lim, 1990; Lee 1996a) y la gran cantidad de combinaciones posibles de copolímeros hacen posible crear polímeros con las propiedades mecánicas y termoelásticas deseadas para una amplia variedad de aplicaciones.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres biodegradables producidos por un gran número de bacterias y también por muchas plantas y animales. Sin embargo, sólo las bacterias pueden sintetizar PHAs con altos pesos moleculares (Berlanga et al., 2006). Estos biopolímeros pueden ser acumulados intracelularmente como reserva de energía y carbono en forma de gránulos de inclusión, bajo condiciones de estrés, con un diámetro de 0.2 – 1.0  $\mu\text{m}$  en alrededor de 300 especies de bacterias (Sudesh et al., 2000; Luengo et al., 2003; Reddy et al., 2003). Los PHAs son sintetizados cuando hay exceso de carbono, pero también cuando la presencia de otro nutriente esencial, como nitrógeno o fósforo, es limitada (Koller et al., 2008; Anderson y Dawes, 1990).

Los PHAs tienen la fórmula general mostrada en la figura 1. En que, comúnmente una molécula de PHA contiene  $x = 1,000-30,000$  unidades repetidas y  $n = 1$  para la mayoría de los PHAs. Cuando  $R = \text{CH}_3$  se tiene el poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y cuando  $R = \text{CH}_2\text{-CH}_3$  se tiene el poli- $\beta$ -hidroxivalerato (PHV). El compuesto más abundante de la familia de los PHAs es el homopolímero P(3HB), para el cual  $n$  es igual a 1 y  $R$  es un grupo metilo. El PHB es altamente cristalino, rígido y frágil, con una temperatura de transición vítrea y un punto de fusión de 5 y 175°C, respectivamente. Muchos otros homopolímeros y copolímeros han sido identificados, presentando una gran variedad en términos de tipo y proporción de monómeros. El copolímero poli(3-hidroxibutirato/3-hidroxivalerato) P(HB/HV) tiene mejores propiedades físicas y térmicas que el P(3HB), lo cual depende de la cantidad de hidroxivalerato contenido en la molécula. La temperatura de fusión decrece significativamente cuando la fracción de HV incrementa, pero sin afectar la temperatura de degradación, lo que da como resultado un polímero con propiedades estructurales y capacidades de transformación similares a las del polipropileno. Unidades de

hidroxivalerato en las cadenas del polímero incrementan la elasticidad y la flexibilidad (Villano et al., 2010). Los PHAs son poliésteres de alto peso molecular y su producción depende de la especie microbiana y las condiciones de cultivo, como son el pH, así como el tipo y la concentración de la fuente de carbono (Anderson et al., 1992).

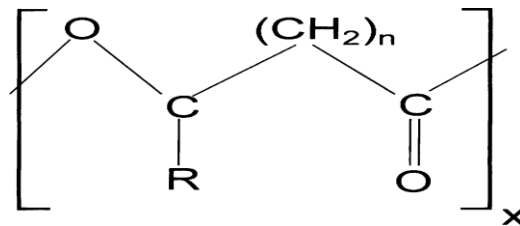


Figura 1. Estructura general de los polihidroxicanoatos (Patnaik, 2005)

## 2.2 Tecnologías para la producción de PHAs

La tecnología que prevalece para la producción de PHA es a través de la utilización de cultivos puros de bacterias utilizando un sustrato concentrado puro como la glucosa. Aunque recientemente están siendo producidos comercialmente, el producto es más caro que los polímeros derivados del petróleo. Cultivos mixtos de bacterias han empezado a llamar la atención. Tienen el potencial de producir grandes cantidades de PHAs con aparentemente costos más bajos debidos a los requerimientos de control y equipos y la alternativa de utilizar un amplio rango de sustratos más baratos como son los residuos agrícolas e industriales (Reis et al., 2003; Rhu et al., 2003). Ácidos orgánicos de materiales de desecho así como residuos de comida después de una digestión anaerobia puede ser una buena opción (Argelier et al., 1998). Los cultivos mixtos de microorganismos no pueden metabolizar directamente azúcares en PHAs. Un paso de pre-fermentación es requerido para convertir los azúcares en ácidos grasos volátiles (AGV) como son los ácidos acético, propiónico, valérico y butírico. Este paso de pre-fermentación puede ser logrado con un alto rendimiento (Albuquerque et al., 2007; Temudo et al., 2007). La estructura molecular final de PHA depende de la composición de AGV usado como fuente de carbono. El caso más estudiado es la producción de polihidroxibutirato (PHB), un homopolímero que puede ser obtenido a partir de ácido acético como única fuente de carbono.

### **2.3 Almacenamiento de PHAs en cultivos mixtos**

El almacenamiento de PHAs en cultivos mixtos ocurre cuando los microorganismos son sujetos a un suministro intermitente de carbono (Beccari et al., 1998; Beun et al., 2002) en el cual un largo periodo de falta de sustrato (ayuno) es alternado con un tiempo corto de exceso de sustrato (abundancia). Durante el periodo siguiente, el sustrato tomado es principalmente dirigido al almacenamiento de PHA y, en menor grado, para crecimiento celular. Una vez agotado el sustrato, el polímero almacenado (PHA) es usado como fuente de energía y de carbono. En la mayoría de los cultivos puros, la acumulación de PHA ocurre como consecuencia de una limitación externa de nutrientes, mientras que en el caso de cultivos mixtos la producción de PHA ocurre debido a la limitación de algún componente intracelular, tal como una cantidad insuficiente de ARN o enzimas requeridas para el crecimiento, cuando el sustrato está disponible intermitentemente a los microorganismos. En este caso, la limitante de carbono por un largo periodo causa un cambio en la composición macromolecular de las células, requiriendo una adaptación fisiológica de los microorganismos cuando son expuestos a altas concentraciones de sustrato. Como la síntesis de polímeros requiere menos adaptación fisiológica que para el crecimiento celular, el almacenamiento es la respuesta más rápida para un suministro intermitente de sustrato (Daigger y Graddy, 1982).

### **2.4 Reacciones bioquímicas en la producción de PHAs**

Las reacciones bioquímicas condensadas involucradas en el proceso de producción de PHA usando acetato y propionato como fuentes de carbono bajo condiciones aerobias son mostradas en la tabla 1. Todas las reacciones son expresadas con base en moles de carbono. En la fase de abundancia, el acetato y el propionato son llevados hacia dentro de la célula por medio de transporte activo, requiriendo un mol de ATP por cada mol de carbono. Después son convertidos en acetil-CoA y propionil-CoA, respectivamente, con el costo de otro mol de ATP por mol de acetato o propionato. Las reacciones netas son mostradas en  $R_1$  y  $R_2$  (Gottschalk, 1986). Cuando el acetato es convertido a acetil-CoA y el propionil-CoA es producido a partir de propionato, se ha observado que una parte del propionil-CoA producido a partir de propionato es convertido a acetil-CoA (Lemos et al., 2006). La reacción neta es descrita en  $R_3$ .

En la producción de PHA, acetil-CoA y propionil-CoA son reducidos y condensados para producir un polímero compuesto de varios monómeros 3-hidroxiacanoatos (3HAs). El 3HB es formado a partir de 2 monómeros de acetil-CoA y un acetil-CoA y un propionil-CoA se combinan para formar 3HV o 3-hidroxi-2-metilbutirato (3H2MB) mientras que 2

monómeros de propionil-CoA forman 3H2MV. La fracción de cada monómero de PHA producido por las células depende del flujo de acetil-CoA y propionil-CoA disponible para la producción del polímero. Para propósitos de desarrollo de un modelo metabólico es necesario expresar cada reacción en relación a la masa, la energía y las transformaciones de óxido-reducción globales. Es más conveniente expresar el potencial de producción de PHA por las células en términos de los monómeros reducidos y condensados producidos a partir de acetil-CoA o propionil-CoA como se expresa en  $R_9$  y  $R_{10}$ .

La energía requerida para la producción de 1 mol de carbono de biomasa es representado como  $K_1$ , el cual ha sido estimado como 1.7 mol de ATP (Gommers et al., 1988). La reacción de crecimiento de biomasa partiendo de acetil-CoA fue determinado a través de un balance estequiométrico y de oxido-reducción y es mostrado en  $R_4$ . La cantidad de energía requerida para la síntesis de biomasa a partir de propionil-CoA es representada por  $K_2$ , la cual ha sido estimada como 1.38 moles de ATP por mol de carbono de biomasa producida. La reacción global se muestra en  $R_5$ . La fórmula de la biomasa se tomó como  $CH_{1.4}O_{0.4}N_{0.2}$  (Henze, et al., 1995).

El catabolismo de acetil-CoA y propionil-CoA también ocurre en las células microbianas. Acetil-CoA es convertido a  $CO_2$  a través de ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) como se describe en  $R_6$  (Gottschalk, 1986). El catabolismo de propionil-CoA se asume que ocurre vía acetil-CoA, donde  $R_3$  es seguida por  $R_6$ .

Energía en forma de ATP es producida a partir de  $NADH_2$  en la fosforilación oxidativa. La cantidad de ATP generado por mol de  $NADH_2$  oxidado es expresado por la relación P:O,  $\delta$ , que representa la eficiencia de la fosforilación oxidativa (Roels, 1983). Esta reacción es expresada en  $R_8$ .

Adicionalmente a las transformaciones energéticas descritas anteriormente, la energía es también requerida para el mantenimiento celular. La tasa de consumo de ATP con fines de mantenimiento es descrita en  $R_7$  como  $m_{ATP}$ .

Tabla 1. Modelo metabólico de producción de PHA de mezclas de acetato y propionato en cultivos mixtos (tomado de Dias et al., 2008)

| Reacción  | Estequiometría   |
|---|--|
| R <sub>1</sub> :Consumo de ácido acético              | $\text{CH}_2\text{O} + \text{ATP} \rightarrow \text{CHO}_{0.5} + 0.5\text{H}_2\text{O}$  |
| R <sub>2</sub> :Consumo de ácido propiónico           | $\text{CH}_2\text{O}_{2/3} + 0.67\text{ATP} \rightarrow \text{CH}_{4/3}\text{O}_{1/3} + 0.33\text{H}_2\text{O}$  |
| R <sub>3</sub> :Propionil-CoA convertido a Acetil-CoA | $1.5\text{CH}_{4/3}\text{O}_{1/3} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CHO}_{0.5} + 1.5\text{NADH}_2 + 0.5\text{CO}_2$   |
| R <sub>4</sub> :Crecimiento con Acetil-CoA            | $1.27\text{CHO}_{0.5} + 0.2\text{NH}_3 + \text{K}_1\text{ATP} + 0.3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_{1.4}\text{N}_{0.2}\text{O}_{0.4} + 0.53\text{NADH}_2 + 0.27\text{CO}_2$               |
| R <sub>5</sub> :Crecimiento con Propionil-CoA         | $1.06\text{CH}_{4/3}\text{O}_{1/3} + 0.2\text{NH}_3 + \text{K}_2\text{ATP} + 0.17\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_{1.4}\text{N}_{0.2}\text{O}_{0.4} + 0.47\text{NADH}_2 + 0.06\text{CO}_2$ |
| R <sub>6</sub> :Catabolismo                           | $\text{CHO}_{0.5} + 1.5\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NADH}_2 + 0.5\text{ATP}$  |
| R <sub>7</sub> :Mantenimiento                         | $\text{ATP} \rightarrow m_{\text{ATP}}$  |
| R <sub>8</sub> :Fosforilación oxidativa               | $\text{NADH}_2 + 0.5\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \delta\text{ATP}$  |
| R <sub>9</sub> :Producción de Acetil-CoA              | $\text{CHO}_{0.5} + 0.25\text{NADH}_2 \rightarrow \text{CH}_{1.5}\text{O}_{0.5}$   |
| R <sub>10</sub> :Producción de Propionil-CoA          | $\text{CH}_{4/3}\text{O}_{1/3} + 0.17\text{NADH}_2 \rightarrow \text{CH}_{5/3}\text{O}_{1/3}$  |

En resumen, el modelo define las siguientes tasas cinéticas:

- El crecimiento en acetil-CoA (R<sub>4</sub>) es limitado por la concentración de amoníaco y acetato.
- El crecimiento en propionil-CoA (R<sub>5</sub>) es limitado por la concentración de propionato y amoníaco.
- El catabolismo (R<sub>6</sub>) es limitado por la concentración total de AGV.
- El mantenimiento (R<sub>7</sub>) es limitado por la concentración total de AGV.
- La síntesis de acetil-CoA (R<sub>9</sub>) es limitada por la concentración total de AGV e inhibido por el contenido de PHA intracelular. La inhibición intracelular por PHA ha sido validada experimentalmente por muchos autores (Lee et al., 1997)
- La síntesis de propionil-CoA (R<sub>10</sub>) es limitada por la concentración de propionato e inhibida por el contenido intracelular de PHA.

## 2.5 Estrategias de control en reactores SBR para la producción de PHAs

El proceso de selección de abundancia-ayuno es llevado a cabo usualmente en reactores discontinuos (SBR: *sequencing batch reactor*), donde un pulso de sustrato es adicionado seguido de un periodo de reacción, establecimiento, y remoción de efluente y exceso de lodos. La relación de tiempo entre abundancia y ayuno es un parámetro importante de selección. El rendimiento en el almacenamiento y la tasa específica de consumo de sustrato son reducidas por una alta tasa de carga orgánica y un periodo corto de ayuno.

Otros parámetros importantes son la disponibilidad de nitrógeno y el pH, donde el pH debe ser mantenido entre 8 y 9 o no debe ser controlado (Serafim et al., 2004). La disponibilidad de nitrógeno incrementa el rendimiento de la biomasa, lo cual puede permitir un incremento en la producción de polímero si la biomasa está cerca de la saturación de polímero, pero también reduce el rendimiento de polímero del sustrato (Dias et al., 2006). El sustrato comúnmente usado para cultivos mixtos son ácidos grasos volátiles. El contenido de polímero en la biomasa puede ser incrementado por una etapa post-proceso en lote después de un reactor discontinuo (Serafim et al., 2004). Este post-proceso permite la más alta acumulación de polímero reportada en un proceso de abundancia-ayuno del 65% en peso celular seco. La alimentación por pulsos con variación de las cargas orgánicas así como una alimentación continua fueron probadas y el mejor resultado fue alcanzado con tres pulsos de 1.9 g DQO/L (Westerberg, 2007).

Estrategias de control con retroalimentación (*feed-back*) han sido estudiadas previamente para sistemas alimentados por lotes (*fed-batch*), incluyendo un control de oxígeno disuelto (OD) (Montaño, 2011). En un biorreactor, el oxígeno disuelto está estrechamente relacionado con la concentración de sustrato, así que cuando el sustrato se ha agotado y el consumo de oxígeno decrece, el nivel de OD incrementa rápidamente. Esto es cierto tanto para cultivos puros (Lee et al., 2000) como para cultivos mixtos, en cultivos productores de PHA (Serafim et al., 2004).

La alimentación por pulsos es un método sencillo de control basado en el OD; el cultivo es alimentado con una alícuota de sustrato cada vez que se observa un aumento en el OD. Esto fue investigado en cultivos de *E. coli* a altas densidades celulares (Cutayar y Poillon, 1989) y para la acumulación de PHA en cultivos mixtos (Serafim, 2004). El inicio del pico en el OD puede ser localizado detectando cuándo la señal de OD alcanza un punto de referencia (absoluto o relativo al OD del exceso de sustrato) (Whiffin et al., 2004) o calculando la pendiente de la señal de OD (Serafim, 2004). La alimentación continua es también posible con un control de OD pero es usado más exitosamente con sustratos simples y altas densidades celulares. La alimentación por pulsos ha sido sugerida como la más apropiada para medios complejos porque la respuesta en OD es mejor (Whiffin et al., 2004).

Hasta ahora, los estudios se han concentrado en los procesos para seleccionar lodos con una alta capacidad de almacenaje de PHAs. Los experimentos en lote (*batch*) han sido usados como un modo de evaluar la máxima capacidad de almacenaje, pero no se han concentrado en la optimización. Es sabido que sustratos complejos representan un gran reto para sistemas de control basados en el OD. Por ello es necesario investigar los requerimientos para un sistema de producción de PHA *fed-batch* controlado

automáticamente a partir de sustratos residuales reales y para tener un conocimiento más detallado de los procesos a través del modelado por computadora. Es importante mencionar que el tamaño de los pulsos es constante. La concentración inicial de sustrato es siempre la misma (dentro de un rango) para todos los pulsos, pero la producción de PHA no es la misma en cada pulso. En los estudios realizados por Westerberg (2007) se obtuvieron algunos resultados importantes:

- El oxígeno disuelto puede ser usado como una señal de control en un sistema *fed-batch* para la producción de PHA.
- Un pequeño incremento del oxígeno disuelto no significa necesariamente un agotamiento de sustrato cuando son usados sustratos complejos.
- Una estrategia de control flexible funciona mejor para sustratos complejos y alto contenido del polímero en la biomasa.
- La inhibición del producto es importante para entender las tendencias del oxígeno disuelto durante la acumulación de polímero.

## 2.6 Optimización del proceso

Existen dos parámetros clave para ser considerados en el proceso de optimización para la producción de biopolímeros: la productividad volumétrica y el contenido celular de PHA. Empleando cultivos mixtos con una alimentación intermitente de carbono, Serafim et al. (2004) mostraron que el contenido celular de polihidroxibutirato (PHB) puede alcanzar el 78.5% usando acetato como sustrato.

En procesos de fermentación donde el crecimiento celular y la formación de productos son inhibidos por las altas concentraciones de sustrato, una fermentación con alimentación discontinua es de gran ayuda para reducir la inhibición del sustrato e incrementar la productividad. La concentración de sustrato es mantenida por debajo del nivel crítico y la relación C/N juega un papel muy importante en la acumulación de PHAs. Usando acetato como fuente de carbono, se ha demostrado que en cultivos mixtos se puede acumular hasta el 89% de PHA en peso celular seco en experimentos *fed-batch* bajo condiciones de ausencia de amonio. La ausencia de amonio fue usada para evitar el crecimiento de biomasa y obtener un alto rendimiento de PHA. Con el uso de cultivos mixtos para la producción de PHA y la utilización de agua residual como sustrato, resulta difícil lograr la ausencia de amonio durante la producción de PHA. Estudios previos indican que la presencia de un exceso de nutrientes pueden tener efectos perjudiciales sobre el contenido celular de PHA (Johnson et al., 2010). El nitrógeno parece ser importante para el crecimiento normal de la biomasa en lodos activados pero desfavorable para la acumulación de polímero (Wang et al., 2006). Aunque faltan estudios detallados sobre la



evaluación de estos efectos perjudiciales y sus posibles causas, es importante tomar en cuenta la presencia o ausencia de nutrientes esenciales como en el nitrógeno para el diseño del proceso y su optimización.

Mediciones en línea de las variables del proceso y un control automático en retroalimentación son deseables para la obtención de mejores resultados en la optimización de los procesos. La investigación de la estrategia de operación óptima del proceso puede ser desarrollada efectivamente usando una metodología basada en un modelo. Algunos modelos matemáticos han sido propuestos en la literatura para describir los mecanismos de acumulación de PHB y su degradación por cultivos mixtos (Tohyama et al., 2002; Patnaik, 2005; Dias et al., 2005). Muchos de estos estudios han sido conducidos inicialmente con la perspectiva de entender los mecanismos que intervienen en el proceso, en vez de concentrarse en los estudios de optimización basados en los modelos.

## **2.7 Modelado matemático en la acumulación de PHAs**

Estudios previos realizados en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) del Instituto de Ingeniería de la UNAM sobre el modelado matemático de la acumulación de polihidroxialcanoatos (PHA) en cultivos mixtos durante el tratamiento de aguas residuales han establecido las bases para la cual se ha desarrollado una estrategia de control con el objetivo de maximizar la producción del polímero (Montaño, 2011)

De acuerdo a las observaciones experimentales y la experiencia del grupo de investigación se ha encontrado que:

- Las mejores condiciones de cultivo para aumentar la producción de PHA se obtuvieron para una concentración de 3 mg/L de oxígeno disuelto con pulsos de sustrato de 100 mg DQO/L, llegando a alcanzar fracciones máximas de 0.79 de PHA en peso celular seco.
- La tasa de consumo de sustrato con concentraciones en los pulsos de 500 y 1000 mg DQO/L es mayor que para pulsos de 100 mg DQO/L, aunque resultó en una fracción de PHA menor.
- La fracción máxima de acumulación se alcanza a las 22 horas del cultivo en lote.
- La presencia o ausencia de nitrógeno no tiene un efecto aparente en la acumulación de PHA en cultivos mixtos abiertos.

La operación de dicho proceso indica que es posible mejorar su desempeño empleando un control adecuado del suministro de los pulsos de sustrato durante la etapa de producción, por lo que se pretende probar una estrategia de alimentación con control retroalimentado, basada en el modelo matemático desarrollado por el grupo de investigación del LIPATA, para determinar el tiempo en el cual la productividad es máxima con la mejor acumulación intracelular de PHA.

Dicho modelo involucra principalmente tres tasas que determinan el consumo de sustrato ( $q_s$ ): la tasa de producción de PHA ( $q_p$ ), la tasa de generación de biomasa ( $q_x$ ) y la tasa de mantenimiento ( $q_m$ ):

$$q_s = q_p + q_x + q_m$$

Para efectos de simplificar el modelo y con base en los estudios realizados por Montaña (2011), se considera que la tasa de consumo de sustrato para la producción de PHA depende únicamente de la tasa máxima de consumo de sustrato ( $q_s^*$ ), la concentración de sustrato ( $S$ ), la concentración de oxígeno disuelto ( $O$ ) y la fracción de la tasa de consumo de sustrato destinada para la producción de PHA ( $r_p$ ) como se muestra en la siguiente expresión:

$$q_p = q_s^* \left( \frac{S}{k_s + S} \right) \left( \frac{O}{k_o + O} \right) r_p$$

Se ha observado que la tasa máxima de consumo de sustrato cambia a lo largo de la producción de PHA, de su valor máximo a un valor mínimo conforme la fracción intracelular de PHA va incrementando, es decir, el aumento en la fracción intracelular de PHA inhibe su propia tasa de producción.

Por otro lado, se ha comprobado que cuando la concentración de sustrato es baja, la producción de PHA se ve limitada, del mismo modo que un exceso en la concentración de sustrato resulta inhibitorio para el sistema, lo que se traduce en la disminución de la tasa de producción de PHA (Serafim et al., 2004).

Considerando un sistema de alimentación por pulsos, el modelo se puede simplificar con expresiones muy simples para explicar la dinámica del proceso durante el periodo entre la en la adición de un solo pulso y el agotamiento del sustrato agregado en este mismo pulso. Durante este periodo se debe incrementar la fracción de PHA y es conveniente agregar el siguiente pulso tan pronto se agote el sustrato, debido a lo siguiente:

- Si un pulso dura más del tiempo necesario para degradar el sustrato, resulta perjudicial para el sistema ya que la productividad se ve disminuida.

- En caso contrario, si el pulso dura menos del tiempo necesario para degradar el sustrato, se tendría acumulación de sustrato, lo que resulta inhibitorio para el sistema, como se mencionó anteriormente.

Por otra parte, si se determinara la tasa de consumo de sustrato en cada pulso o la concentración de sustrato a lo largo de un pulso se podría definir:

- El tiempo de duración de cada pulso, por consiguiente, el momento en que se adiciona el siguiente pulso de sustrato.
- La duración total del proceso de producción de PHA.

En el capítulo 3 de este trabajo (Desarrollo Experimental) se presenta con mayor detalle el modelo matemático empleado propuesto por Montaña (2011), así como la simplificación que se hace para emplearlo en el controlador automático que se propone en esta tesis.

## Capítulo 3 Desarrollo Experimental

### 3.1 Estrategia experimental

Para la producción de PHAs se utilizó un sistema de dos biorreactores como se muestra en la Figura 2. En el primero de ellos, denominado reactor de enriquecimiento selectivo, se realizó la selección de la biomasa capaz de almacenar PHA bajo condiciones dinámicas y se obtuvo el lodo para inocular el segundo reactor, que se denominó reactor de producción de PHA.

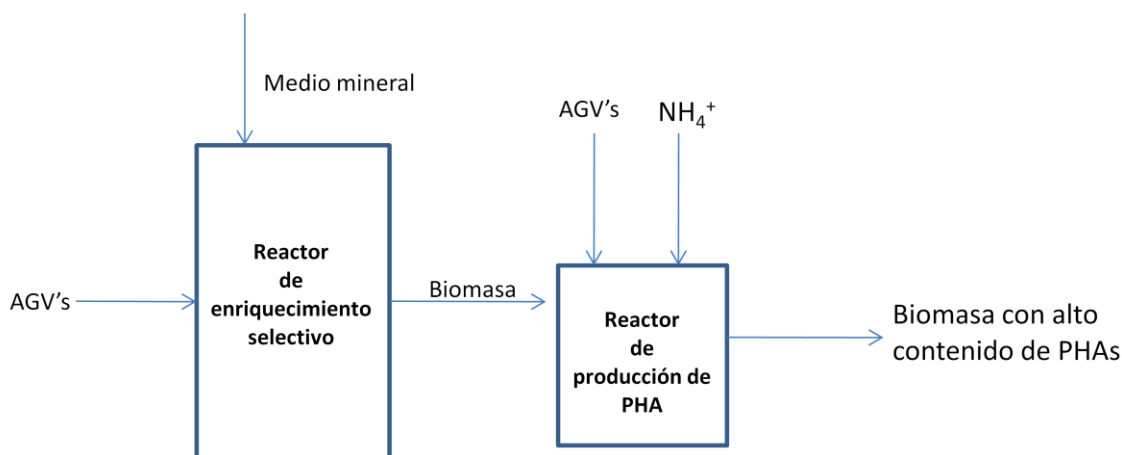


Figura 2. Representación esquemática del sistema de producción de PHA

#### 3.1.1 Reactor de enriquecimiento selectivo

Se utilizó un reactor SBR (Figura 3) de 9 litros de capacidad con un volumen útil de 6 litros y un volumen de intercambio de 1.5 litros dentro del cual se contó con un sensor óptico de oxígeno disuelto (Endress+Hauser mod. WCOS61 acoplado a un transmisor LIQUISYS-M mod. COM223) y un controlador de flujo másico (Aalborg mod. GFC17). La alimentación estuvo compuesta por ácidos grasos volátiles: (AGV) ácido acético y ácido propiónico en relación 70:30 y medio mineral (ver Tabla 2) y fue suministrada a través de dos bombas peristálticas (Cole-Parmer Masterflex mod. 7523-60). El reactor contó además con una bomba de vaciado (Cole-Parmer Masterflex mod. 7553-70) y el proceso se controló de manera automática a través de una computadora personal bajo el ambiente LabVIEW

(National Instruments) que recibe las señales por medio de una tarjeta de adquisición de datos (National Instruments USB6009).



Figura 3. Reactor de enriquecimiento selectivo

Tabla 2. Composición química del medio mineral

| Compuesto   | Nombre                                   | Concentración en la solución de alimentación (mg/L) |
|---|--|---|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                            | Fosfato monobásico de potasio            | 191.2500  |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                            | Fosfato dibásico de potasio              | 244.6875  |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Fosfato dibásico de sodio heptahidratado | 565.3125  |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | Sulfato de magnesio heptahidratado       | 104.0400  |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$           | Cloruro de calcio dihidratado            | 54.6000   |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | Cloruro férrico hexahidratado            | 1.7500  |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$           | Cloruro de manganeso tetrahidratado      | 0.2471  |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                             | Ácido bórico                             | 0.4004  |
| $\text{ZnCl}_2$                                     | Cloruro de zinc                          | 0.1421  |
| $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$           | Molibdato de amonio                      | 0.2429  |
| EDTA  | Ácido etilendiaminotetraacético          | 0.3885  |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | Cloruro férrico hexahidratado            | 0.3780  |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                        | Sulfato de amonio                        | 474.1000  |
| $\text{NH}_2\text{CSNH}_2$                          | Tiourea                                  | 20.0000   |

### 3.1.2 Reactor de producción de PHA

Se utilizó un reactor operado en lote de 2 litros de capacidad con volumen útil de 1.2 litros, agitado mecánicamente con control de temperatura y un medidor de oxígeno disuelto. El reactor contó con un sistema automático de alimentación por pulsos mediante una bomba peristáltica de baja velocidad (Cole-Parmer Masterflex mod. 7523-60). El oxígeno disuelto se controló a 3 mg/L; fue regulado con un controlador PID (Proporcional Integral Derivativo) manipulando el flujo de aire que entra al reactor a través de un controlador de flujo másico (Aalborg mod. GFC17), la relación C/N fue de 50 y la temperatura de 24°C. El oxígeno disuelto se midió con un electrodo (Mettler Toledo InPro6050) conectado a un transmisor (O2-4050). El control del proceso se llevó a cabo a través de una computadora personal bajo el ambiente LabVIEW (National Instruments) que recibe las señales por medio de una tarjeta de adquisición de datos (National Instruments USB6009). El reactor de producción fue inoculado con biomasa proveniente del reactor de enriquecimiento selectivo y alimentado con una mezcla de ácido acético y ácido propiónico en relación 70:30 medido como DQO.



Figura 4. Reactor de producción de PHA

### 3.2 Estrategias de alimentación

El reactor de producción fue alimentado por medio de una estrategia de alimentación por pulsos, con el fin de evitar la ausencia de sustrato en el medio y favorecer la acumulación intracelular de PHA.

En este trabajo se probaron tres estrategias de control para la alimentación de los pulsos en el reactor de producción con el fin de maximizar la producción de PHA:

**Estrategia de control 1.** Se suministra el siguiente pulso de alimentación cuando el flujo de aire disminuye significativamente con respecto a su máximo nivel durante la reacción: Se utilizó una estrategia de alimentación automática programada en LabVIEW 7.1 (National Instruments) usando el flujo de aire como variable de control, la concentración de oxígeno disuelto (OD) se midió en línea y se mantuvo en 3 mg/L. Esto se logró mediante la manipulación del flujo de aire de entrada al reactor por medio de un controlador PID (Proporcional Integral Derivativo). Una vez estabilizada la concentración de OD en 3 mg/L se adiciona un pulso de sustrato por medio de una bomba peristáltica (Cole-Parmer Masterflex mod. 7523-60) y es en ese momento cuando inicia la reacción. Inmediatamente después de la adición del pulso se observa una disminución en la concentración de OD en el reactor y por consiguiente se da un aumento en el flujo de aire, necesario para compensar la tasa de respiración de los microorganismos y mantener el OD en el nivel establecido. La reacción termina cuando el valor del flujo de aire es menor o igual al 10% del valor máximo registrado del flujo de aire (valor de referencia) desde la adición del pulso. Una vez finalizada la reacción, el controlador adiciona el siguiente pulso de sustrato y vuelve a iniciar la reacción.

**Estrategia de control 2.** Se suministra el pulso cuando se alcanza un límite de tiempo establecido, o bien cuando el flujo de aire disminuye significativamente con respecto a su valor máximo: la estrategia de alimentación sigue el mismo principio que la estrategia de control 1, pero la diferencia está en que al controlador se le agregó un limitador de tiempo. Es decir, los pulsos de alimentación son adicionados, ya sea cuando se alcanza un valor de referencia respecto al flujo de aire o cuando se alcanza el límite de tiempo previamente establecido. Esto se hizo porque la estrategia de control 1 no siempre detecta correctamente que se ha agotado el sustrato, principalmente debido a que el controlador de oxígeno disuelto no funciona adecuadamente cuando las bacterias empiezan a saturarse de PHA.

**Estrategia de control 3.** Esta estrategia de control se basa en el modelado matemático y en el desarrollo de un algoritmo de control para la alimentación de los pulsos, los cuales se describen en la sección siguiente.

### 3.3 Modelo matemático y estructura del controlador

#### 3.3.1 Modelo matemático para el proceso de acumulación de PHA

El modelo desarrollado en la tesis de Montaña (2011) también considera una alimentación por pulsos de sustrato para acumular PHA en cultivos mixtos que han sido previamente enriquecidos. Bajo condiciones batch, el consumo de sustrato es limitado por sí mismo, sigue una cinética de Monod y considera un factor adicional referente a la limitación del oxígeno disuelto (OD):

$$\frac{dS}{dt} = -q_S X = -q_S^* \left( \frac{S}{K_S + S} \right) \left( \frac{O}{K_O + O} \right) X, \quad S(0) = S_0, \quad (1)$$

donde  $q_S$  es la tasa específica de consumo de sustrato,  $X$  es la concentración de biomasa y  $S_0$  es la concentración inicial de sustrato, con una tasa máxima de consumo de sustrato  $q_S^*$ . La limitación de OD es expresada por una función tipo Monod, donde  $O$  representa la concentración de OD y  $K_O$  es la constante de saturación media para oxígeno. Por otro lado, se asume que no todo el sustrato es utilizado para la producción de PHA; una parte es usada para el mantenimiento celular y otra fracción es usada para el crecimiento de la biomasa. Por ello, es posible decir que la biomasa y el PHA están determinados por las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dP}{dt} = Y_P q_P X = Y_P r_P q_S X, \quad P(0) = P_0 \quad (2)$$

$$\frac{dX}{dt} = Y_X q_X X = Y_X r_X q_S X, \quad X(0) = X_0 \quad (3)$$

donde  $P$  es la concentración total de PHA en el reactor (en el interior de las células),  $X$  es la concentración de biomasa,  $Y_P$  es el coeficiente de rendimiento de PHA a partir del sustrato y  $Y_X$  es el coeficiente de rendimiento de biomasa a partir del sustrato; las cantidades  $r_P$  y  $r_X$  representan las fracciones (con valores entre 0 y 1) de la tasa específica de consumo de sustrato  $q_S$  que son destinadas a la producción de PHA y al crecimiento de biomasa respectivamente, es decir,  $r_P + r_X \leq 1$  no necesariamente suman 1 debido a que parte del sustrato puede ser usado para mantenimiento celular o simplemente biodegradado a  $\text{CO}_2$  u otros productos. Estos dos factores dependen de las condiciones de operación, del sustrato, de la cantidad de PHA y de la concentración de OD; sin embargo, el modelo puede ser simplificado sustancialmente para fines de diseño de un controlador con retroalimentación.

Cuando se produce el PHA, el crecimiento de la biomasa es casi despreciable (esto implica que  $r_X$  es cercano a cero). En un reactor alimentado por pulsos el volumen que aumenta con la adición de cada pulso no representa un incremento sustancial en el volumen total,



por lo que  $X$  puede ser considerado casi constante. Se ha observado experimentalmente que la concentración de oxígeno disuelto es un factor importante para aumentar la producción de PHA (Third et al., 2003; Montañó y Vargas, 2010). Por un lado, el OD es limitante para las funciones metabólicas aerobias esenciales y por otro lado, un exceso en la disponibilidad de OD parece favorecer el crecimiento de la biomasa en lugar de la producción de PHA. Esto ha sido observado indirectamente también con respecto a la tasa de aireación (Kourmentza et al., 2009). En este sentido, el factor  $r_p$  parece depender de la concentración de OD, tal que existe un valor óptimo donde  $r_p$  es máximo. Por lo tanto, es conveniente el uso de un controlador para mantener el nivel de OD relativamente constante durante toda la fase de producción.

Experimentalmente, se ha observado que una vez que el PHA es acumulado en un reactor alimentado por pulsos, tanto la producción de PHA como la tasa de consumo de sustrato disminuyen. Esto implica que el factor  $r_p$  también depende de la fracción de PHA  $f_p$ , disminuyendo cuando  $f_p$  incrementa. De hecho, se ha observado que esta relación no es lineal, sino más bien sigmoideal, con un valor crítico  $f_p^*$  después del cual  $r_p$  tiende a cero rápidamente.

La influencia de  $f_p$  en la tasa de consumo de sustrato se manifiesta con un decremento en el valor de  $q_p^*$  cuando  $f_p$  incrementa. El sustrato siempre es consumido, pero no a la misma tasa; como el PHA es acumulado intracelularmente, otro proceso metabólico compite por el carbono disponible en el sustrato (por ejemplo, crecimiento, mantenimiento y generación de productos de degradación) pero su tasa de consumo es más lenta que para la producción de PHA. Por lo tanto,  $q_p^*$  puede ser modelado como dependiente de  $f_p$  con  $q_p^* = q_p^{max}$  cuando  $f_p = 0$  y  $q_p^* = q_p^{min}$  cuando  $f_p = 100\%$ . El modelo parece ser sigmoideal con el cambio de un valor a otro cuando  $f_p = f_p^*$ .

### 3.3.2 Modelo matemático para el reactor en lote

La estrategia de alimentación para la producción de PHA implica que con cada adición de un pulso, inicia una reacción donde ni el volumen ni la concentración de biomasa cambian significativamente. Durante el  $i$ -ésimo lote, la concentración de PHA incrementa de un valor  $P_i$  a un valor  $P_{i+1}$ , pero  $P_{i+1} - P_i$  es pequeña en comparación con  $P_i$ ; es la suma de todos estos incrementos la que después de  $N$  pulsos adicionados genera una cantidad significativa de PHA. Entonces, para un solo lote conviene asumir que  $P$  es constante, lo cual lleva a suponer que  $f_p$  permanece constante durante el lote. Si la concentración de OD es regulada a un nivel constante (óptimo), entonces para cada reacción el modelo es:

$$\frac{dS}{dt} = -q_{S,i}^* \left( \frac{S}{K_S+S} \right) X_i, \quad S(0) = S_{0,i} \quad (4)$$

$$\frac{dP}{dt} = q_{P,i}^* \left( \frac{S}{K_S+S} \right) X_i, \quad P(0) = P_i \quad (5)$$

donde  $q_{S,i}^*$  y  $q_{P,i}^* = Y_{P,i} r_{P,i} q_{S,i}^*$  son determinados por las condiciones de operación (concentración de OD, valor de  $f_P$ , etc.), y  $X_i$  es considerado constante.

El tiempo necesario para alcanzar una eficiencia determinada en la degradación del sustrato  $\eta = (S_0 - S_f)/S_0$ , dados los parámetros  $q_{S,i}$ ,  $X_i$  y  $K_S$  puede ser encontrado resolviendo la ecuación diferencial (4):

$$T_{\eta,i} = \frac{S_{0,i}}{q_{S,i}^* X_i} \left( \eta - \frac{K_S}{S_{0,i}} \ln(1 - \eta) \right) \quad (6)$$

Con el fin de mejorar la producción de PHA, es deseable hacer que cada reacción en lote después de la adición de un pulso dure exactamente el tiempo requerido para la degradación del sustrato; es decir, si  $T_i$  representa la duración del  $i$ -ésimo lote, lo que se busca es hacer que  $T_i = T_{\eta,i}$ , bajo el supuesto de que para un consorcio enriquecido productor de PHA y que proviene directamente de un reactor SBR operado bajo una alimentación dinámica aerobia, el sustrato favorecerá la producción de PHA. Si la reacción dura más del tiempo necesario y el cultivo mixto entra a una fase de ayuno, entonces el PHA será consumido; si dura menos, no todo el sustrato será convertido a PHA y cuando la adición del siguiente pulso de sustrato ocurra, este se irá acumulando en el reactor.

Si el sustrato pudiera ser medido en línea, sería más fácil implementar un controlador con retroalimentación que lleve a cabo lo que se necesita, pero esto no es posible. Sin embargo, el proceso es aerobio y la dinámica del OD puede ser modelada por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dO}{dt} = -(q_{O,i} + b)X_i + (O_{sat} - O)k_L a, \quad (7)$$

$$q_{O,i} = q_{O,i}^* \left( \frac{S}{K_S+S} \right), \quad q_{O,i}^* = Y_O q_{S,i}^*, \quad (8)$$

donde  $(q_{O,i} + b)$  es la tasa específica de consumo de oxígeno, la cual está compuesta por dos términos: la tasa específica de respiración endógena  $b$  (se asume constante) y la tasa específica de respiración metabólica  $q_{O,i}$ , la cual es proporcional a  $q_{S,i}$ . Por lo tanto, la dinámica de degradación de sustrato puede ser evaluada indirectamente analizando la dinámica del OD. En la ecuación anterior  $O_{sat}$  es la constante de saturación de OD y  $k_L a$  es el coeficiente de transferencia de masa de gas a líquido.

La estrategia propuesta de producción de PHA requiere que el OD sea mantenido constante. Si bien es técnicamente imposible, el nivel de OD puede ser regulado alrededor de un valor de referencia dado usando un controlador simple con retroalimentación. Aquí se usa un controlador PID, que regula el flujo de aire  $Q_{air}$  de entrada al reactor, que a su vez se relaciona con  $k_L a$  como sigue:

$$k_L a = K_{air} Q_{air} \quad (9)$$

donde  $K_{air}$  es una constante de proporcionalidad. Se puede ver en la ecuación (7) que si todos los demás parámetros son constantes, una vez que el OD está en el valor de referencia, el flujo de aire será un indicador directo del valor de  $q_O$  y por consiguiente también de  $q_S$ . De este modo,  $Q_{air}(t)$  deberá decrecer gradualmente durante la reacción y alcanzará un valor bajo y constante cuando el sustrato sea agotado (apenas lo suficiente para compensar  $-bX_i$ ).

A pesar de que en principio sería posible determinar en línea cuándo termina la reacción y así adicionar el siguiente pulso de sustrato observando sólo la señal de flujo de aire  $Q_{air}(t)$ , dos problemas surgen cuando se implementa esta estrategia. El primer problema es que el controlador PID no logra la perfecta regulación del OD a un valor de referencia, principalmente debido al segundo problema, el cual es que el tiempo de respuesta del sensor es del mismo orden de magnitud que la duración de la reacción (la tasa de consumo de sustrato para la producción de PHA es alta) además de que se requieren filtros numéricos para rechazar parte del ruido de medición. De hecho, se ha verificado experimentalmente que este efecto se puede modelar mediante el siguiente sistema dinámico:

$$\tau^2 \frac{d^2 y(t)}{dt^2} + 2\tau \frac{dy(t)}{dt} + y(t) = O(t) \quad (10)$$

donde  $y(t)$  es la concentración medida de OD, es decir, la que se tiene para implementar el controlador, y  $\tau$  es un parámetro cuyo valor está en el orden de decenas de segundos;  $O(t)$  es la concentración real de OD en el biorreactor.

### 3.3.3 Algoritmo de control de alimentación por pulsos

En el modelo matemático anterior hay muchos parámetros que necesitan ser conocidos para determinar la duración de la  $i$ -ésima reacción. Algunos de ellos pueden ser calculados experimentalmente antes de empezar la fase de producción de PHA. En particular, el valor de  $\tau$  puede ser estimado realizando una prueba simple sobre el sensor, cambiando abruptamente el sensor entre dos ambientes con concentraciones de OD

significativamente diferentes. El valor de  $K_{air}$  puede ser determinado realizando una prueba estándar para calcular los valores de  $k_L a$  para diferentes valores de  $Q_{air}$  y luego una regresión de mínimos cuadrados. El valor de  $bX_i$  puede ser estimado como la pendiente de la curva de OD sin flujo de aire ( $k_L a = 0$ ) y sin sustrato en el reactor ( $q_{O,i} = 0$ ), mientras que el valor de  $O_{sat}$  puede ser estimado cuando no hay sustrato presente y  $Q_{air}$  es constante, pues entonces la ecuación (7) puede ser resuelta como:

$$O(t) = O_{0,i} + (O_{final} - O_{0,i})(1 - e^{-k_L a t}), \quad O_{final} = O_{sat} - \frac{bX_i}{k_L a}, \quad (11)$$

donde  $O_{final}$  es el valor de  $O(t)$  cuando  $t \rightarrow \infty$ . Un procedimiento en Matlab fue implementado para efectuar la estimación de  $bX_i$ ,  $O_{sat}$  y  $K_{air}$ , dados vectores con datos para  $t$  y  $y$  colectados en LabVIEW.

Para el diseño del controlador es conveniente expresar la concentración de sustrato en unidades equivalentes de OD. Dado  $s = Y_O S$ ,  $k_s = Y_O K_S$ ,  $s_{0,i} = Y_O S_{0,i}$  y  $\rho_i^* = Y_O q_{S,i}^* X_i$  (tasa de consumo de oxígeno); entonces el sistema de las ecuaciones (4) y (7) puede ser escrito de la siguiente manera:

$$\frac{ds}{dt} = \rho_i^* \left( \frac{s}{k_s + s} \right), \quad s(0) = s_{0,i} \quad (12)$$

$$\frac{dO}{dt} = \left( \frac{ds}{dt} \right) - bX_i + (O_{sat} - O)k_L a, \quad O(0) = O_{0,i} \quad (13)$$

Como se muestra en la ecuación (6), para establecer el tiempo de degradación óptima  $T_{n,i}$ , los parámetros

$$\frac{s_{0,i}}{q_{S,i}^* X_i} = \frac{s_{0,i}}{\rho_i^*} \quad \text{y} \quad \frac{K_S}{s_{0,i}} = \frac{k_s}{s_{0,i}} \quad (14)$$

son necesarios pero desconocidos. El diseño del controlador considera que el valor de  $\rho_i^*$  es similar al valor de  $\rho_{i-1}^*$ , porque en dos lotes consecutivos los parámetros del modelo no cambian sus valores significativamente, ya que la concentración de PHA cambia muy poco y la biomasa se considera constante. Como los pulsos son similares y la concentración en el influente no cambia significativamente en dos lotes consecutivos, entonces también son similares  $s_{0,i-1}$  y  $s_{0,i}$ , mientras que  $k_s$  puede ser asumida como conocida (un valor pequeño). Usando el modelo dado por la ecuaciones (12), (13) y (10), se puede emplear un software de simulación y optimización para estimar los parámetros desconocidos encontrando los minimizadores al problema de los mínimos cuadrados no lineales para la diferencia entre  $y(t)$  y su estimación  $\hat{y}(t)$ . El algoritmo implementado por el controlador es por lo tanto el siguiente:

1. Comienza con  $i=1$ , adiciona el primer pulso y da un tiempo suficientemente largo para la reacción  $T_1$  (es determinado a partir de pruebas realizadas anteriormente o puede ser determinado manualmente por el operador).
2. Colecta los datos generados en vectores  $t^{(i)}, y^{(i)}$  y  $Q_{air}^{(i)}$ .
3. Usa estos vectores en el software estimador de parámetros para obtener valores estimados de  $\rho_i^*$  y  $s_{0,i}$ .
4. Usa el modelo ajustado en simulación para establecer el tiempo de reacción y entonces fija  $T_{i+1} = T_{i,\eta}$ .
5. Usa el modelo ajustado también para simular un controlador PID para el oxígeno disuelto y genera una trayectoria nominal para  $Q_{air}^{(i+1)}(t)$ .
6. Adiciona un nuevo pulso e implementa el controlador PID con la señal nominal  $Q_{air}^{(i+1)}(t)$  en pre-alimentación (*feedforward*).
7. Espera hasta que  $t = T_{i+1}$  y repite desde 2.

El algoritmo debe ser detenido cuando  $f_p$  alcanza un valor crítico, después del cual ocurre la saturación y  $f_p$  no se incrementa significativamente con la adición de pulsos. En el desarrollo experimental reportado en este trabajo, no fue posible determinarlo en línea. Por lo tanto, las cinéticas fueron todas a 24 horas. El número total de pulsos  $N$  fue, por ello, diferente para cada experimento. Sin embargo, se muestreó para determinar  $X$  y  $P$  a ciertos valores de  $i$ .

### 3.4 Diseño de experimentos

Inicialmente, se probó la **estrategia de control 1** utilizando pulsos de alimentación de sustrato de tamaño tal que se obtuviera una concentración en el reactor de producción de PHA de 100, 200 y 300 mg DQO/L. Se probaron estas tres concentraciones diferentes con el fin de determinar el efecto que tenía el tamaño de los pulsos en relación con la productividad y acumulación intracelular de PHA. Cada experimento se realizó por duplicado. Una vez obtenidos los resultados de las pruebas con la estrategia de control 1, se determinó probar las concentraciones de 200 y 300 mg DQO/L empleando la **estrategia de control 2**; se descartó utilizar la concentración de 100 mg DQO/L debido a que los resultados obtenidos con la estrategia de control 1 en cuanto a productividad y a la fracción acumulada de PHA fueron mucho menores que para las concentraciones de 200 y 300 mg DQO/L. En esta ocasión sólo se realizaron 2 experimentos, uno con cada concentración. Finalmente, se probó la **estrategia de control 3** utilizando pulsos de alimentación que tuvieran un efecto en la concentración en el reactor de producción de PHA de 200 mg DQO/L. Esta prueba fue realizada en 4 ocasiones y fue seleccionada la

concentración de 200 mg DQO/L debido a que no se encontraron diferencias significativas aparentes al emplear las concentraciones de 200 y 300 mg DQO/L; es decir, el sistema era lo suficientemente robusto como para aceptar concentraciones tanto de 200 como de 300 mg DQO/L en el reactor. En la tabla 3 se resumen los experimentos realizados.

Tabla 3. Pruebas realizadas para cada estrategia de control

| Concentración en el reactor de producción de PHA (mg DQO/L) por pulso adicionado | Estrategia de control (réplicas) |       |       |
|--|----------------------------------|-------|-------|
|  | 1                                | 2     | 3     |
| 100  | X (2)                            |       |       |
| 200  | X (2)                            | X (1) | X (4) |
| 300  | X (2)                            | X (1) |       |

Para los experimentos realizados con las estrategias de control 1 y 2 fueron tomadas tres muestras para el análisis de PHAs y sólidos suspendidos volátiles a lo largo de cada prueba:

- La primera muestra fue tomada al inicio de la prueba (t=0 h).
- La segunda muestra fue tomada entre las 5 y 7 horas de la prueba.
- La tercer muestra fue tomada al final de la prueba (t=22 h).

En el caso de las pruebas realizadas con la estrategia de control 3, además de las muestras mencionadas anteriormente se tomaron 3 muestras más durante las primeras 5 horas de la prueba, esto con el fin de de analizar la productividad y la acumulación intracelular de PHA durante las primeras horas de la prueba.

### 3.5 Técnicas analíticas

#### 3.5.1 Sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos

Para la determinación de los sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos (APHA & AWWA & WPCF, 2005) se preparó el filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A), enjuagándolo con agua destilada y aplicando vacío en el embudo de filtración, hasta eliminar totalmente el agua en exceso. Se dejó secar en la estufa a 103-105°C por 1 hora, se dejó enfriar en el desecador por 15 min y luego se pesó en la balanza analítica.

Una vez obtenido el peso constante del filtro, se colocó en el embudo de filtración y se agregó una muestra homogenizada de 10 mL aplicando vacío para eliminar el exceso de agua. Usando un soporte de aluminio se llevó a la estufa para secar la muestra a 105°C por 1 hora, se dejó enfriar en el desecador por 15 min y se registró su peso. De esta manera se obtuvieron los datos para el cálculo de los sólidos suspendidos totales.

Para el cálculo de los sólidos suspendidos fijos se colocó el filtro anterior en la mufla a 550°C durante 15 min, se dejó enfriar en el desecador por 15 min y se registró su peso. Los sólidos suspendidos volátiles se determinan por la diferencia entre los sólidos suspendidos totales y fijos.

Cálculos:

$$SSV, mg/L = \frac{(P_e - P_c) * 1000}{V}$$

$$SSF, mg/L = \frac{(P_m - P_c) * 1000}{V}$$

$$SSV, mg/L = SST - SSF$$

donde:

SST = sólidos suspendidos totales; en mg/L

SSF = sólidos suspendidos fijos; en mg/L

SSV = sólidos suspendidos volátiles; en mg/L

P<sub>c</sub> = peso constante del filtro; en mg

P<sub>e</sub> = peso del filtro con el sólido seco a 105°C; en mg

P<sub>m</sub> = peso del filtro con el residuo calcinado a 550°C; en mg

V = volumen de la muestra; en mL

### 3.5.2 Determinación de PHAs por cromatografía de gases

La cuantificación de PHA se realizó por la técnica propuesta por Braunegg *et al.* (1979) con las modificaciones propuestas por Oehmen *et al.* (2004) y por Gurieff (2007). Se toma una muestra de 10 mL del reactor y se le agregan 5 gotas de formaldehído al 7% v/v para inhibir inmediatamente cualquier actividad de degradación de PHA; se centrifuga durante 5 min a 4000 rpm y se retira el sobrenadante. La muestra se deja secar una noche en el horno a 120°C para evaporar toda el agua (Gurieff, 2007). Cuando se seca, se deja enfriar y se agregan 2 mL de metanol acidificado y 2 mL de cloroformo por muestra. Las muestras se digieren a 100°C durante 20 horas. El metanol acidificado se prepara con 3% de ácido sulfúrico y una concentración de 100 mg/L de benzoato de sodio como estándar interno, para evitar errores de inyección (Comeau *et al.*, 1988). Al terminar la digestión, las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente y se les agrega 1 mL de agua destilada para lograr la separación de fases y se agitan en vórtex durante 1 min cada una. Las muestras se dejan sedimentar por una hora y se toma la fase orgánica de la muestra, que se encuentra en la parte baja del vial. Esto último se hace con pipetas Pasteur de vidrio para evitar que el cloroformo arrastre polímero de pipetas de plástico e interfiera con el resultado. Se toman 2 µL de la muestra y se analiza por cromatografía de gases (Varian 3300) equipado con un detector de ionización de flama FID y una columna capilar HP-FFPA de 15 m longitud, 0.53 mm de diámetro interno y 1 µm de espesor de película, usando nitrógeno como gas acarreador a 40 psi. La unidad de detección de ionización con flama (FID) fue operada a 210°C con una temperatura del puerto de inyección de 190°C. La temperatura inicial del horno fue de 55°C durante 1 min, se incrementó a razón de 10°C/min hasta llegar a 135°C, y después hasta 180°C a razón de 45°C/min, donde al final se mantiene por 3 minutos. Se realizó una curva de calibración con los siguientes estándares: 2, 4, 8, 20, 50, 100, 200, 300 y 500 mg. Se utilizó un copolímero de ácido R-3-hidroxi-butírico (3HB) y ácido R-3-hidroxi-valérico (3HV) en proporción 8:2 (Sigma Aldrich).



## Capítulo 4 Resultados y Discusión

### 4.1 Representación gráfica de la adición de los pulsos

#### 4.1.1 Estrategia de control 1

La Figura 5a muestra una representación gráfica de la adición de los pulsos en el reactor de producción con la estrategia de control 1, en la cual se suministran los pulsos de sustrato cuando el flujo de aire disminuye al 10% de su valor máximo. La línea azul representa la medición en línea del oxígeno disuelto, la línea verde el flujo de aire suministrado en cada pulso y los puntos rojos representan los momentos en los que se adicionaron los pulsos. La Figura 5b, del lado derecho, muestra el programa de alimentación automática programada en LabVIEW 7.1 (National Instruments) donde el oxígeno disuelto medido en el reactor de producción es representado con la línea de color verde y el flujo de aire suministrado con la línea roja, con este programa se recopilan los datos que son analizados posteriormente y que nos permiten realizar representaciones como la correspondiente del lado izquierdo.

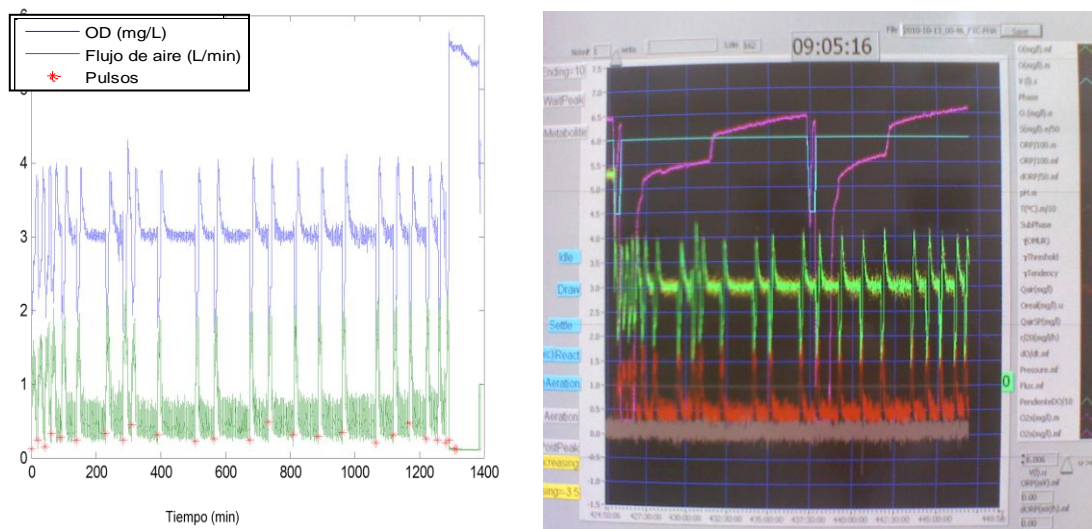


Figura 5. (a) Representación gráfica de la adición de los pulsos empleando la estrategia de control 1 (lado izquierdo). (b) Programa de alimentación automática por pulsos usando la estrategia de control 1 (lado derecho).

En esta estrategia de control se observa una irregularidad en el tiempo que tarda en adicionar el siguiente pulso de sustrato una vez terminada la reacción como se puede observar en la Figura 6, que es un acercamiento entre los 450 y 710 minutos de iniciado el

proceso de producción de PHA. Se observa cuándo ocurre la adición de pulsos (\*) marcados con los números **1** **2** y **3** y se nota la diferencia entre los tiempos de reacción de cada pulso. Se puede ver que cuando se adiciona el segundo pulso, el controlador tarda aproximadamente 50 minutos más para adicionar el pulso número **3**. Tanto en la adición del pulso 1 como del pulso 2 se hace evidente que la reacción ha terminado (indicado con la flecha roja) y que probablemente en el tiempo restante el PHA puede ser consumido. Frecuentemente el controlador tarda demasiado tiempo en agregar el siguiente pulso de alimentación debido a que el controlador no detecta con precisión el final de la reacción.

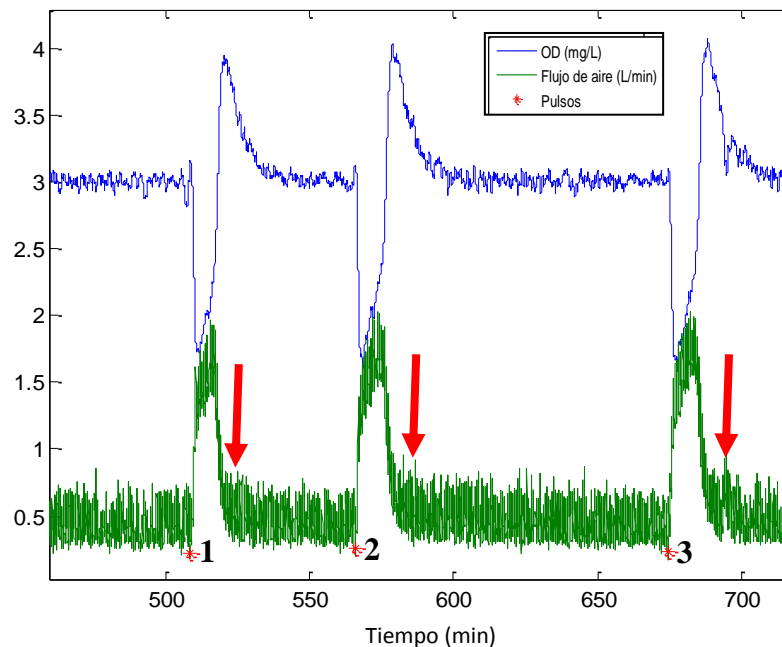


Figura 6. Esquematización de la adición de los pulsos utilizando la estrategia de control 1.

#### 4.1.2 Estrategia de control 2

La estrategia de control 2 se presenta en la Figura 7, en la cual los pulsos de sustrato son suministrados de forma automática cuando el flujo de aire disminuye significativamente, o bien cuando se alcanza un límite de tiempo previamente establecido. Con esta estrategia de control se pretendió eliminar el tiempo extra que tarda el controlador en la adición del siguiente pulso que se observó en la estrategia de control 1. Es importante resaltar que al final del experimento se observa una mayor cantidad de pulsos adicionados. Más adelante se muestran y analizan los resultados comparativos en cuanto a fracción intracelular de PHA y productividad.

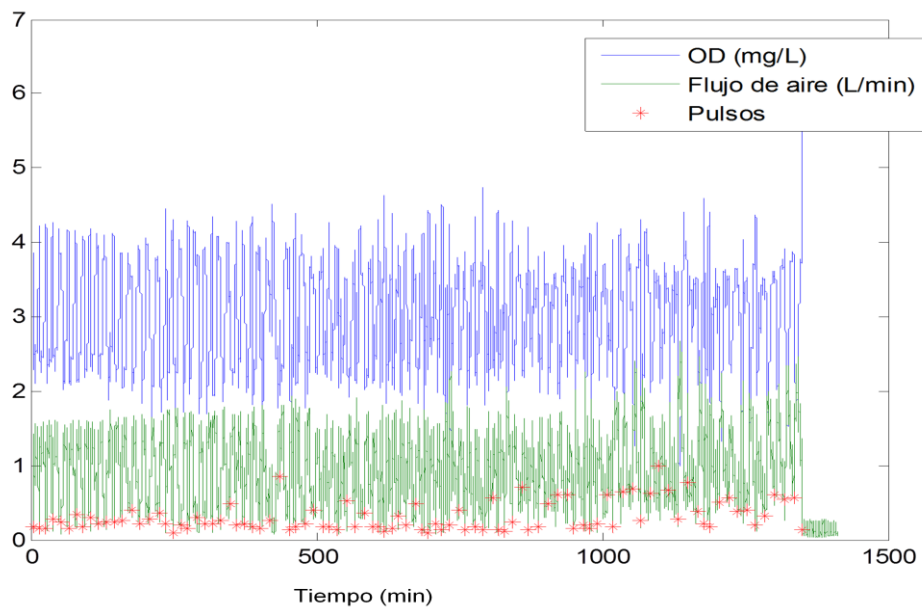


Figura 7. Representación gráfica de la adición de los pulsos empleando la estrategia de control 2.

#### 4.1.3 Estrategia de control 3

Las Figura 8 representa la adición de los pulsos de sustrato utilizando la estrategia de control automático 3, en la cual se adicionan los pulsos de alimentación con base en el modelo matemático que se actualiza con datos del pulso anterior y que predice la duración de la reacción para adicionar el siguiente pulso. Se puede observar que existe un mejor control en el suministro del flujo de aire alimentado y por consiguiente en el oxígeno disuelto que oscila, en general, en el rango de valores de 2.5 a 3.5 mg/L en comparación con las estrategias de control anteriores en la cual se maneja un rango de 2 a 4 mg/L de oxígeno disuelto medido en el reactor de producción.

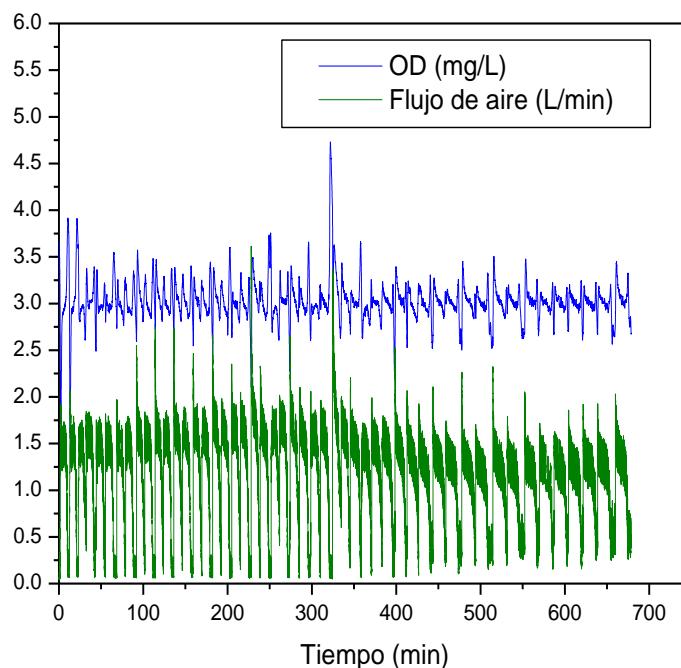


Figura 8. Representación gráfica de la adición de los pulsos empleando la estrategia de control 3.

## 4.2 Parámetros evaluados

### 4.2.1 Productividad de PHA

El parámetro más importante a cuantificar es la productividad de PHA de la biomasa enriquecida, que indica cuánto PHA puede producirse por unidad de tiempo, por sustrato consumido. No sólo es importante producir el PHA, sino también que se haga con poco sustrato (para economizar recursos), y que se haga tan rápido como sea posible (para economizar en tiempo). Su definición está dada por:

$$productividad = \frac{P \left( \frac{mgPHA}{L} \right)}{n_{pulsos} S_0 \left( \frac{mgDQO}{L} \right) (\sum_{i=1}^n T_i)(d)}$$

donde:

*productividad* = productividad de PHA: cantidad de PHA producido por cantidad de sustrato suministrado por tiempo transcurrido (mg PHA/mgS.d)

$P$  = concentración de polihidroxialcanoatos producidos (mg/L)

$n_{pulsos}$  = número de pulsos adicionados

$S_0$  = concentración de sustrato en el reactor después de cada pulso (mg DQO/L)

$\sum_{i=1}^n T_i$  = tiempo transcurrido desde la adición del primer pulso, donde  $T_i$  es la duración del  $i$ -ésimo pulso (d)

#### 4.2.2 Contenido intracelular de PHA

Por otro lado es importante cuantificar el contenido intracelular de PHA en peso celular seco, ya que la extracción del polímero es más eficiente cuanto mayor sea esta fracción:

$$f_P = \frac{P \left( mg \frac{PHA}{L} \right)}{SSV \left( \frac{mg}{L} \right) + P \left( mg \frac{PHA}{L} \right)}$$

donde:

$f_P$  = fracción intracelular de PHA

$SSV$  = sólidos suspendidos volátiles al inicio de la cinética (mg/L)

$P$  = contenido intracelular de PHA (mg/L)

#### 4.3 Resultados de los parámetros evaluados con la estrategia de control 1

Los resultados obtenidos en cuanto a productividad y fracción intracelular de PHA utilizando la estrategia de control 1 se muestran en la Figura 9, en la cual se probaron las concentraciones de los pulsos de alimentación de 100, 200 y 300 mg DQO/L y que son indicados con las leyendas de productividad y  $f$  PHA respectivamente para cada concentración. En esta figura se puede observar que se obtuvieron resultados similares en cuanto a la fracción intracelular de PHA para las tres concentraciones, los resultados muestran valores cercanos a 0.6 al final del experimento (23 h), alcanzándose una productividad en ese momento de 0.16 a 0.3 mgPHA/mgDQO·d. Sin embargo, a las 5.5

horas se obtienen fracciones de PHA cercanas a los valores finales, pero la productividad es mucho mayor, con valores entre 1.15 y 1.45 mgPHA/mgDQO·d . Esto se debe a que en ese momento las células están ya prácticamente saturadas de PHA y la DQO consumida en el resto de la reacción no se emplea para producir significativamente más PHA; sólo se degrada.

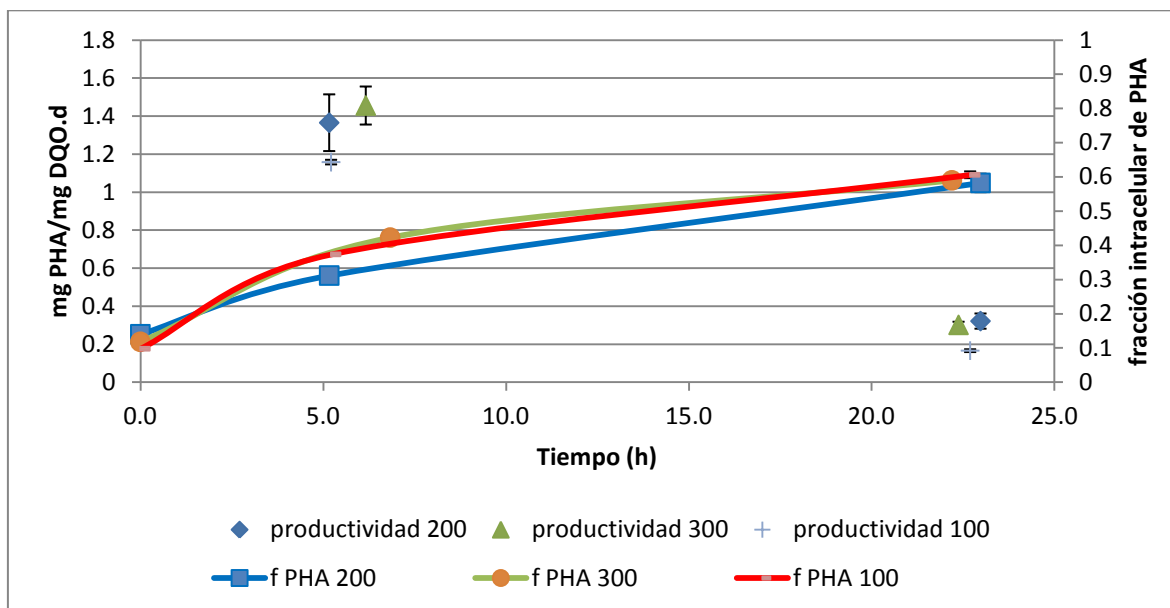


Figura 9. Productividad y contenido intracelular de PHA a distintas concentraciones de sustrato empleando la estrategia de control 1; las barras de error indican una desviación estándar de las réplicas.

#### 4.4 Resultados de los parámetros evaluados con la estrategia de control 2

Con la estrategia de control 2, donde se utilizó el limitador de tiempo, se determinó utilizar una concentración en los pulsos de alimentación de 200 mgDQO/L y 300 mgDQO/L, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10. La curva de color azul representa la fracción intracelular de PHA con una alimentación en los pulsos de 200 mgDQO/L (f PHA 200 con rt), obteniéndose una fracción de 0.8 al final de la prueba, mientras que la productividad (productividad 200 con rt) alcanzó valores de 0.6 y 0.14 mgPHA/mgDQO·d a las 5.7 y 22.8 horas, respectivamente. Nuevamente, como en el caso anterior, la saturación de PHA se alcanza aproximadamente a las 6 horas, y el resto del tiempo sólo se consume DQO sin producir PHA, lo cual disminuye la productividad. La curva de color verde muestra los resultados correspondientes a la productividad (productividad 300 con rt) utilizando la concentración de 300 mgDQO/L, con la que se obtuvieron valores de 1 mgPHA/mgDQO·d a las 6 horas y de 0.14 a las 23 horas de la

prueba. La fracción intracelular de PHA fue de 0.7 a las 6 horas y de 0.8 a las 23 horas del experimento.

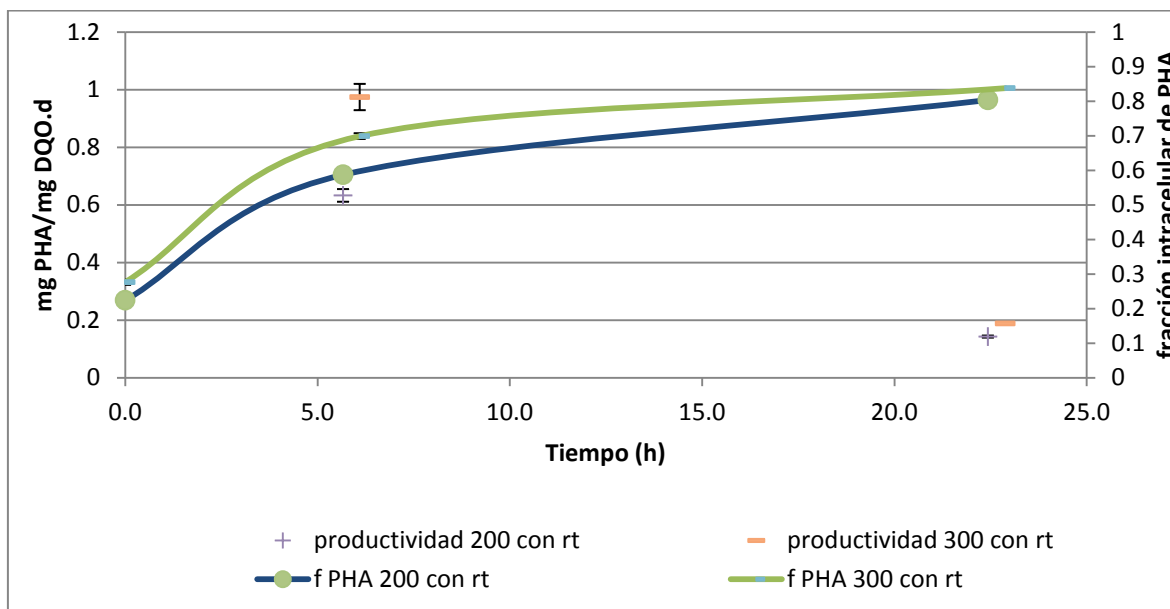


Figura 10. Productividad y contenido intracelular de PHA a distintas concentraciones de sustrato empleando la estrategia de control 2; las barras de error indican una desviación estándar de las réplicas.

#### 4.5 Resultados de los parámetros evaluados con la estrategia de control 3

La Figura 11 muestra los resultados obtenidos utilizando la estrategia de control 3, en la que se utilizó el controlador que ajusta el modelo matemático después de cada pulso y con la cual se probó una concentración en la adición de los pulsos de 200 mgDQO/L. Los resultados muestran que la máxima acumulación de PHA ocurre durante las primeras 6 horas de la prueba, alcanzando una fracción intracelular de PHA de 0.8 (control predictivo PHA), mientras que la productividad (línea roja) fue de 5.8 mgPHA/mgDQO·d a un tiempo de 1.5 horas, alcanzando un valor de 1.7 mgPHA/mgDQO·d a las 6 horas de la prueba, que es cuando se alcanza prácticamente la máxima acumulación.

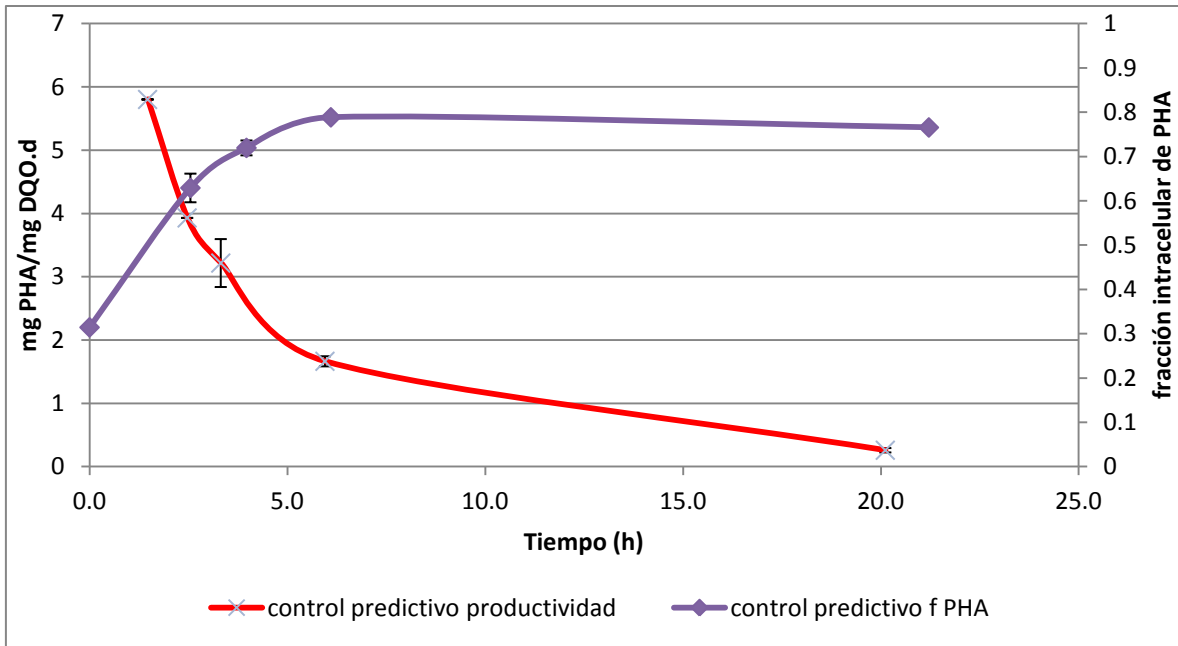


Figura 11. Productividad y contenido intracelular de PHA empleando la estrategia de control 3; las barras de error indican una desviación estándar de las réplicas.

#### 4.5 Comparación de los resultados obtenidos entre las tres estrategias de control

En la Figura 12 se presenta una comparación entre las tres estrategias de control, con una alimentación de los pulsos de 200 mg DQO/L. Se observa una mejor fracción intracelular de PHA al final de la prueba para las estrategias de control 2 y 3, alcanzando valores superiores a 0.7. Sin embargo, las fracciones iniciales fueron de 0.2 y 0.3 para las estrategia de control 2 y 3, respectivamente, que son superiores a la fracción inicial de PHA para la estrategia de control 1 que fue de 0.1 y que alcanzó un valor de 0.6 al final del experimento. La parte en la que se pondrá atención especial es en los resultados obtenidos durante las primeras 5 horas del experimento, en los que se observa una pendiente mayor respecto a la acumulación de PHA en las primeras horas de alimentación; es decir, se da una acumulación mayor de PHA en menos tiempo utilizando la estrategia de control 3 (curva de color morado con la leyenda f PHA estrategia de control 3) en comparación con las curvas correspondientes a las fracciones intracelulares de PHA para las estrategias de control 1 y 2. A las 5 horas de la prueba se tiene:

- Para la estrategia de control 1, una fracción intracelular de PHA de 0.3 que corresponde al 50% de la fracción máxima alcanzada al final de la prueba, y una productividad aproximada de 1.16 mgPHA/mgDQO·d



- Para la estrategia de control 2, una fracción intracelular de PHA de 0.6 que corresponde al 75% de la fracción máxima alcanzada al final de la prueba y una productividad aproximada hasta ese momento de 0.97 mgPHA/mgDQO·d
- Para la estrategia de control 3, una fracción intracelular de PHA de 0.7 que corresponde al 95% de la fracción máxima alcanzada al final de la prueba y una productividad aproximada de 1.67 mgPHA/mgDQO·d

Del análisis de los datos anteriores se puede entonces concluir parcialmente que la propuesta de usar un controlador automático que establece el tiempo de reacción a través de la simulación con un modelo matemático cuyos parámetros son ajustados con base en los datos del lote anterior (estrategia de control 3) resulta en una mayor acumulación de PHA en menos tiempo, lo cual impacta en una mejora significativa de la productividad de PHA para el sistema.

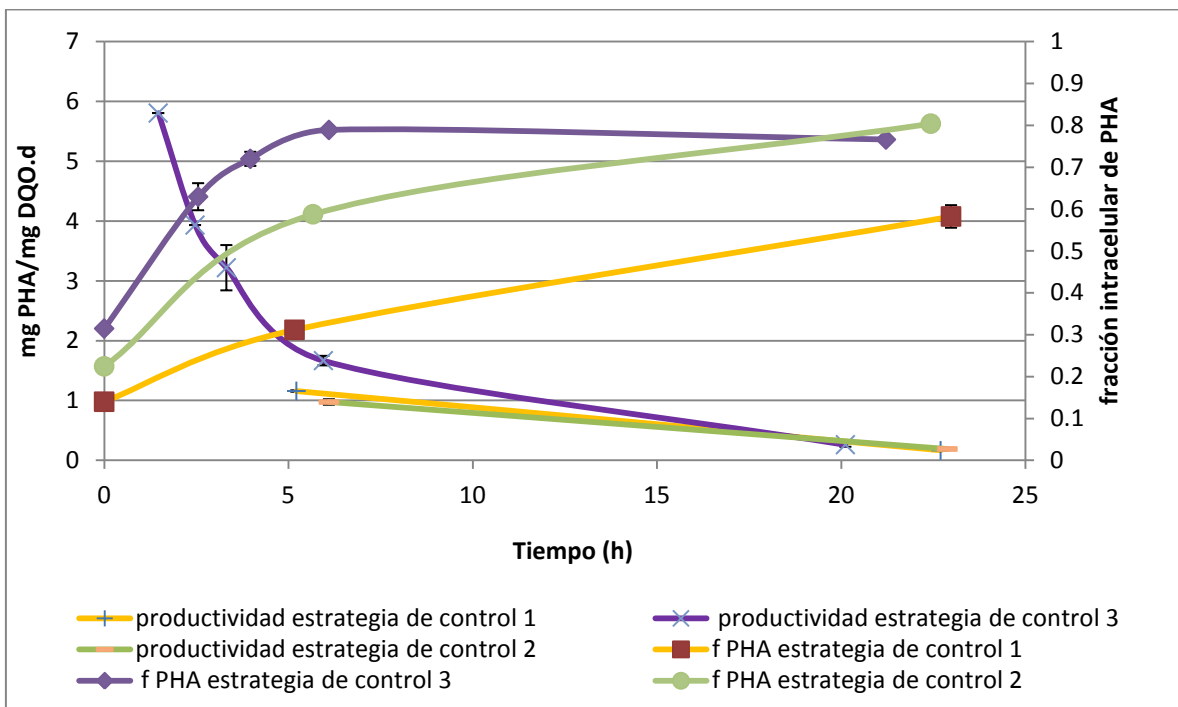


Figura 12. Productividad y contenido intracelular de PHA de las tres estrategias de control a 200 mgDQO/L; las barras de error indican una desviación estándar de las réplicas.

En la Figura 13 se muestra un modelo empírico exponencial (línea morada) ajustado usando una regresión no lineal de mínimos cuadrados. El modelo involucra dos

parámetros: la constante de tiempo  $\tau$  y el incremento de la fracción de PHA en peso celular seco  $\Delta f_P$ :

$$f_P(t) = f_{P,0} + \Delta f_P(1 - e^{-t/\tau})$$

Este modelo fue usado para comparar los resultados de la estrategia de control 3 contra la estrategia de control 1 con una alimentación de los pulsos de 200 mgDQO/L y 4 réplicas para ambas estrategias. Se realizó una prueba t de Student de una cola para comparar las medias de los parámetros  $\Delta f_P, \tau, f_{P,0}, X$  y  $\Delta P = P_{final} - P_0$ . Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Comparación de las medias de los parámetros del modelo por medio de una prueba t de Student de una cola. La A corresponde a la estrategia de control 1 y la B a la estrategia de control 3.

| Variable     | Unidades | Media A | Media B | $t_0$  | p     | Conclusión |
|--------------|----------|---------|---------|--------|-------|------------|
| $\Delta f_P$ | %        | 54.0    | 54.5    | -0.131 | 0.450 | A=B        |
| $\tau$       | h        | 8.44    | 3.26    | +2.715 | 0.017 | A>B        |
| $f_{P,0}$    | %        | 14.5    | 24.4    | -2.103 | 0.036 | A<B        |
| $X$          | gSSV/L   | 1.008   | 1.214   | -0.845 | 0.215 | A=B        |
| $\Delta P$   | gPHA/L   | 2.571   | 4.932   | -2.103 | 0.040 | A<B        |
| $P_0$        | gPHA/L   | 0.166   | 0.376   | -3.924 | 0.004 | A<B        |

La comparación muestra que la biomasa residual fue similar para ambas estrategias de control ( $p = 0.215$ ), el tiempo necesario para la saturación de PHA utilizando la estrategia de control 3 es significativamente menor ( $p = 0.017$ ). El incremento en la fracción de PHA en peso celular seco no es diferente significativamente pero el contenido total de PHA alcanzado al final de la fase de producción es significativamente mayor usando la estrategia de control 3, logrando valores de casi 5 gPHA/L. Esto se debió a que el contenido inicial de PHA fue significativamente mayor para los experimentos realizados con la estrategia de control 3 como consecuencia de no esperar que se consumiera el PHA existente en la biomasa proveniente del reactor de enriquecimiento selectivo.

#### 4.6 Efecto de la relación entre el tiempo de reacción y la acumulación de PHA

De la Figura 12 se observa que la productividad decrece conforme aumenta la acumulación y transcurre el tiempo, ya que la tasa de producción de PHA es cada vez menor (las primeras alimentaciones son más eficientes en la conversión de sustrato a PHA), pero no es conveniente terminar el lote sino hasta que se han alcanzado fracciones de PHA suficientemente altas (cercas a su valor de saturación). En este sentido, resulta importante saber cuándo parar esta fase de producción de PHA. El tiempo que tarda cada pulso de sustrato en ser consumido en relación con la acumulación intracelular de PHA puede ser un indicador de ello.

En la Figura 13 se muestra la duración de cada pulso a lo largo de un experimento (línea azul), empleando la estrategia de control 3 con una concentración en la alimentación de los pulsos de 200 mgDQO/L. Se puede apreciar que el aumento en la duración de los pulsos coincide con el cambio en la pendiente en la curva de acumulación intracelular de PHA (línea verde) en un tiempo aproximado de 6 horas y es el punto en el cual se alcanza el 80% del valor final alcanzado en cuanto a la fracción intracelular de PHA; es decir, se alcanza una fracción intracelular acumulada de PHA de 0.62 en un tiempo de 6 horas, que corresponde al 80% de 0.77 que se obtiene al final de la prueba (22 h). Es importante mencionar que la productividad (línea roja) está por encima de 1 mgPHA/mgDQO·d antes de llegar a las 6 horas de la prueba. A partir de ello se puede decir que es recomendable detener el proceso de acumulación en el momento en que se detecte un aumento en la duración de los pulsos utilizando una estrategia de control basada en un modelo matemático, pues se ha observado que la fracción intracelular de PHA aumenta en menor proporción a partir de este cambio en la duración de los pulsos. Para los experimentos realizados se observa un aumento de sólo 0.15 en un tiempo de 16 horas mientras que en las primeras 6 horas el aumento en la fracción intracelular fue de 0.47.

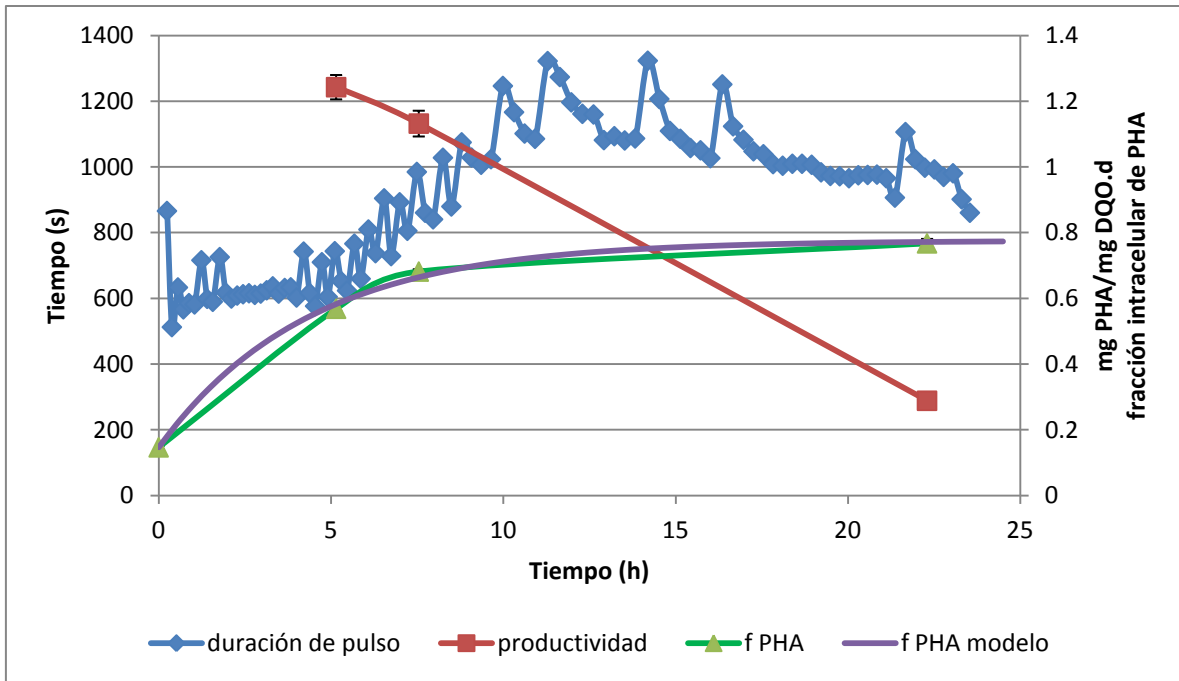


Figura 13. Efecto del tiempo de reacción de cada pulso de alimentación en la acumulación intracelular de PHA empleando la estrategia de control 3.

## Capítulo 5 Conclusiones

Del análisis de los resultados de este trabajo de investigación se plantean las siguientes conclusiones y recomendaciones:

- El reactor de enriquecimiento selectivo produce biomasa con capacidad de producción de PHA, obteniéndose fracciones de acumulación en el reactor de producción de 0.6 a 0.8.
- Ni la productividad de PHA ( $\text{mgPHA}/\text{mgDQO}\cdot\text{d}$ ) ni la acumulación intracelular de PHA se ven afectadas significativamente por la concentración inicial de sustrato después de cada pulso (100, 200 y 300  $\text{mgDQO}/\text{L}$ ) empleando la estrategia de control 1.
- Se obtiene una acumulación intracelular de PHA al final de la prueba (22 horas) similar a la reportada por Montaña (2011), alcanzando fracciones de 0.8 utilizando la estrategia de control 2 independientemente de las concentraciones de los pulsos utilizadas (200 y 300  $\text{mgDQO}/\text{L}$ )
- De las tres estrategias probadas, la estrategia de control 3 resultó ser la mejor estrategia de alimentación por pulsos, ya que se obtuvo una productividad de 1.7  $\text{mgPHA}/\text{mgDQO}\cdot\text{d}$  y una fracción intracelular de PHA de 0.8 a las 6 horas del experimento; por lo tanto, la estrategia de control 3 maximiza la tasa de producción de PHA.
- Es conveniente detener el proceso de producción de PHA en el momento en que el controlador detecte un aumento en la duración de reacción de los pulsos empleando la estrategia de control 3 ya que operar el reactor de producción por un periodo de tiempo prolongado (22 h) resulta ser contraproducente: aumenta poco la fracción intracelular de PHA y disminuye la productividad.
- Se recomienda continuar esta investigación implementando un algoritmo de detección automática de la saturación de PHA durante el proceso de producción con base en la observación anterior. Esto se podría hacer fácilmente y debería ser probado experimentalmente.
- Sería también conveniente probar la robustez del proceso propuesto ante cambios en la composición y concentración del influente; para ello, podrían variarse estos dos parámetros en el agua residual sintética que se alimenta y observar qué tanto influyen estos cambios en la productividad y en la composición del PHA producido.

- Otro aspecto interesante a desarrollar como continuación de este proyecto es la prueba del sistema de producción propuesto empelando efluente de un fermentador acidogénico que produzca agua con un alto contenido de ácidos grasos volátiles a partir de la degradación anaerobia de agua residual con alta carga orgánica.

## Capítulo 6 Referencias

- Albuquerque, M., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B., Reis, M., 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses, *J. Biotechnol.*, **130**(4):411-421.
- American Public Health Association (APHA), the American Water Association (AWWA), and the Water Environment Federation (WEF). (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21 ed., Port City Press, Baltimore, ML.
- Anderson, A. J., Dawes, E. A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Rev.*, **54**:450-472.
- Anderson A. J., Williams, D. R., Taidi, B., Dawes, E. A., Ewing, D. F., 1992. Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and factors influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*, *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**:93-102.
- Argelier, S., Delgenes, J-PH., Moletta. R., 1998. Design of acidogenic reactors for the anaerobic treatment of the organic fraction of solid food waste, *Bioprocess. Eng.*, **18**:309-315.
- Beccari, M., Majone, M., Massanisso, P., Ramadori, R., 1998. A bulking sludge with storage response selected under intermittent feeding, *Water Res.*, **32**:3403-3413.
- Beun, J. J., Dircks, K., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J., 2002. Poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures, *Water Res.*, **36**:1167-1180.
- Beun, J. J., Paletta, F., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen, J. J., 2000. Stoichiometry and kinetics of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in aerobic, slow growing, activated sludge cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, **67**(4):379-389.
- Berlanga, M., Montero M. T., Hernández, J., Guerrero, R., 2006. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats, *Int. Microbiol.*, **9**:95-102.

- Braunegg, G., Sonnleitner B., Lafferty, R., 1979. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in bacterial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**: 29-37.
- Cachum, M., 2006. [http://especiais.valoronline.com.br/seminarios/Hotsite-Industria\\_Plastico/Merheg%20Cachum.ppt](http://especiais.valoronline.com.br/seminarios/Hotsite-Industria_Plastico/Merheg%20Cachum.ppt)
- Crank, M., Patel, M., Schleich, J., Angerer, G., 2004. Techno-economic Feasibility of Large-Scale Production of Bio-Based Polymers in Europe (PRO-BIP), Report prepared for the European Commission's Institute Prospective Technological Studies (IPTS).
- Comeau, Y., Hall, K., Oldham, W., 1988. Determination of poly-3 hydroxybutyrate and poly-3-hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:2325-2327.
- Cutayar, J., Poillon, D., 1989. High cell density culture of *Escherichia coli* in a fed-batch system with dissolved oxygen as a substrate feed indicator, *Biotechnol. Lett.*, **11**(3):155-160.
- Daigger, G.T., Graddy, C.P.L., 1982. An assessment of the role of physiological adaptation in the transient response of bacterial cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, **24**:1427-1444.
- Dias, J., Oehmen, A., Serafim, L., Lemos, P., Reis, M., Oliveira, R., 2008. Metabolic modelling of polyhydroxyalkanoate copolymers production by mixed microbial cultures, *BMC Syst. Biol.*, **2**:59 doi:10.1186/1752-0509-2-59.
- Dias, J., Lemos, P., Serafim, L., Oliveira, C., Eiroa, C., Albuquerque, M., 2006. Recent advances in polyhydroxyalkanoates by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product, *Macromol. Biosci.*, **6**(11): 885-906.
- Dias, J. M., Serafim, L., Lemos, P., Reis, M., Oliveira, R., 2005. Mathematical modelling of a mixed culture cultivation process for the production of polyhydroxybutyrate, *Biotechnol. Bioeng.*, **92**(2):209-222.
- Flieger, M., Kantorova, M., Prell A., Rezanka, T., Votruba, J., 2003. Biodegradable plastics from renewable sources, *Folia Microbiol.*, **48**:27-44.
- Gommers, P., Vanschie, B., Vandijken, J., Kuenen, J., 1988. Biochemical limits to microbial-growth yields – an analysis of mixed substrate utilization, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**(1):86-94.
- Gottschalk, 1986. *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag.



- Gujer, W., Henze, M., Mino, T., van Loosdrecht M.C.M., 1999. Activated sludge Model No. 3, *Water Sci. Technol.*, **39**:183-193.
- GuriEFF, N., Lant, P., 2007. Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production, *Bioresour. Technol.*, **98**: 3393-3403.
- Henze, M., Harremoes, P., Jansen, J., Arvin, E., 1995. *Wastewater treatment: Biological and chemical processes*, Heidelberg:Springer.
- Holmes, P. A., Lim, G. B., 1990. Poly-3-hydroxy-butyrate recovery from microbial cells-by digesting non-polymer material with enzyme and/or surfactant, *Imperial Chemical Industries (ICIL)*.
- Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M., 2010. Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures, *J. Biotechnol.*, **147**:73-79.
- Khanna, S., Srivastava, A. K., 2009. On-line characterization of physiological state in poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by *Wautersia eutropha*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **10**:1007/s12010-008-8395-9.
- Khardenavis, A., Suresh, M., Mudliar, S., Chakrabarti, T., 2007. Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Bioresour. Technol.*, **98**:3579-3584.
- Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fernandes, E. G., Horvat, P., Kutschera, C., Hesse, P., Braunegg, G., 2008. Polyhydroxyalkanoates production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*, *Bioresour. Technol.*, **99**:4854-4863.
- Kourmentza, C., Ntaikou, I., Kornaros, M., Lyberatos, G., 2009. Production of phas from mixed and pure cultures of *Pseudomonas sp.* using shortchain fatty acids as carbon source under nitrogen limitation. *Desalination*, **248**:723-732.
- Koutinas, A., Xu, X., Wang, R., Webb, C., 2007. Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from wheat-based biorefinery. *Enzyme Microbial Technol.*, **40**(5):1035-1044.
- Law K. H., Cheng Y. C., Leung Y. C., Lo, W. H., Chua, H., Yu, H. F., 2003. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strain for polyhydroxyalkanoates synthesis, *Biochem. Eng. J.*, **16**:203-208.
- Lee, S. Y., 1996a. Bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnol. Bioeng.*, **49**(1):1-14.

- Lee, J. H., Lim, H. C., Hong, J., 1997. Application of nonsingular transformation to on-line optimal control of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate fermentation, *J. Biotechnol.*, **55**:135-150.
- Lee, S., Wong, H., Choi, J., Han, C., 2000. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitation, *Biotechnol. Bioeng.*, **68**(4):466-470.
- Lemos, P., Serafim, L., Reis, M., 2006. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding, *J. Biotechnol.*, **122**(2):226-238.
- London Metal Exchange, 2009. [http://www.lme.com/plastics\\_industryoverview.asp](http://www.lme.com/plastics_industryoverview.asp)
- Luengo, J. M., García, B., Sandoval A., Naharro, G., Olivera, E. R., 2003. Bioplastics from microorganisms, *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**(3):261-260.
- Montañó, L., Vargas, A., 2010. Automatic control of dissolved oxygen in a batch bioreactor for pha production by mixed cultures. In: IWA World Water Congress and Exhibition. Montreal, Canada, pp. (CD-ROM).
- Montañó, L., 2011. Modelado matemático de la acumulación de polihidroxialcanoatos (PHA) en cultivos mixtos durante el tratamiento de aguas residuales, Tesis Maestría en Ingeniería, UNAM, México.
- Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A., Desai, A., 2008. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium sp. Zp24*, *Bioresour. Technol.*, **99**:5749-5755.
- Oehmen, A., Keller-Lehman, B., Zeng, R., Yuan, Z., 2004. Optimization of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems, *J. Chromatogr.*, **1070**:131-136.
- Patnaik, P., 2005. Perspectives in the modeling and optimization of PHB production by pure and mixed cultures, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **25**:153-171.
- Reddy, C. S., Ghai, R., Rashmi, C., Kalia, V. C., 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview, *Bioresour. Technol.*, **87**:137-146.
- Reis, M. A. M., Serafim, L., Lemos, P., Ramos, A. M., Aguiar, F. R., van Loodsrecht, M. C. M., 2003. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures, *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, **25**:377-385.

- Rhu, D.H., Lee, W.H., Kim, J.Y., Choi, E. 2003. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste, *Water Sci. Technol.*, **48**(8):221-228.
- Roels, J., 1983. Macroscopic thermodynamics and the description of growth and product formation in microorganisms, *Acs Symposium Ser.*, **207**:295-322.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Oliveira, R., Reis, M.A.M., 2004. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions, *Biotechnol. Bioeng.*, **87**:145-160.
- Sudesh, K., Abe, H., Doi Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters, *Prog. Polym. Sci.*, **25**:1503-1555.
- Temudo, M., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M., 2007. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: A chemostat study, *Biotechnol. Bioeng.*, **98**(1):69-79.
- Third, K., Newland, M., Cord-Ruwisch, R., 2003. The effect of dissolved oxygen on phb accumulation in activated sludge cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **82**(2):238-250.
- Tohyama, M., Patarinska, T., Qiang, Z., Shimizu, K., 2002. Modelling of the mixed culture and periodic control for PHB production, *Biochem. Eng. J.*, **10**:157-173
- Villano, M., Beccari, M., Dionisi, D., Lampis, S., Miccheli, A., Vallini, G., Majone, M., 2010. Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding, *Process Biochem.*, **45**(5):714-723.
- Westerberg, K., 2007. Using the dissolved oxygen signal for automatic control in fed-batch production of PHA by mixed culture, Lund University, Department of Chemical Engineering.
- Whiffin, V., Cooney, M., Cord-Ruwisch, R., 2004. Online detection of feed demand in high cell density cultures of *Escherichia coli* by measurement of changes in dissolved oxygen transients in complex media, *Biotechnol. Bioeng.*, **85**(4):422-433.
- Wang, Y., Hua, F., Tsang, Y., Chan, S., Sin, S., Chua, H., Yu, P., Ren, N., 2009. Synthesis of PHAs from waster under various C:N ratios, *Bioresour. Technol.*, **98**:1690-1693.