



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

DISEÑO DE OBSERVADORES DE ESTADO PARA LA ESTIMACIÓN DE BIOMASA EN BIORREACTORES A PARTIR DE MODELOS CIBERNÉTICOS

State observer design for biomass estimation in bioreactors
based on cybernetic models

Pablo Andrés De Villeros Arias

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía
Medellín, Colombia
2015

DISEÑO DE OBSERVADORES DE ESTADO PARA LA ESTIMACIÓN DE BIOMASA EN BIORREACTORES A PARTIR DE MODELOS CIBERNÉTICOS

State observer design for biomass estimation in bioreactors
based on cybernetic models

Pablo Andrés De Villeros Arias

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería - Ingeniería Química

Director:

Ph.D. Héctor Antonio Botero Castro

Codirector:

Ph.D. Hernán Darío Álvarez Zapata

Grupo de investigación en procesos dinámicos KALMAN

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía
Medellín, Colombia
2015

A mis amados padres, que siempre creyeron en mí.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres Juan y Gilda que siempre tuvieron una voz de aliento en los momentos difíciles. Este logro es también su logro.

Agradezco también a Hernán y Héctor por su paciencia y cariño infinitos. Sus vidas, a las que he tenido el placer de ingresar, son ejemplo vivo que han moldeado mi carrera profesional y mi forma de ver el mundo. Nunca podré agradecerles lo suficiente.

Finalmente, agradezco a todos aquellos profesores, colegas, familiares y amigos que estuvieron presentes en todos los momentos en que necesité su ayuda. Sus consejos y atención fueron claves para desarrollar y llevar a feliz término esta investigación.

Resumen

En los últimos años, el modelado del crecimiento microbiano en múltiples sustratos ha recibido especial atención, sin embargo, no hay evidencia en la literatura acerca de la aplicación de observadores de estado en sistemas de crecimiento microbiano descritos por modelos cibernéticos. Este trabajo se enfoca en el diseño de observadores para la estimación del estado completo en un proceso de crecimiento anóxico de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de dos sustratos y con producción de etanol, bajo una perspectiva cibernética. A través de simulaciones y con parámetros cinéticos obtenidos de la literatura, se encontró que un observador interconectado de tipo *asintótico – exponencial* tiene un buen desempeño en la estimación de todas las variables en regímenes continuo, *fedbatch* y *batch*. Como medida del índice de desempeño del observador se empleó la integral del valor absoluto del error (IAE).

Palabras clave: Observador de estado, modelo cibernético, observador asintótico, observador por modos deslizantes, filtro de Kalman, crecimiento microbiano.

Abstract

In recent years, the problem of multi-substrate microbial-growth modeling has received more and more attention, however, there is no evidence in the literature referring to state observer design applied to microbial growth described by cybernetic models. This work focuses on the design of full-order observers in a two-substrate anoxic-fermentation process of *Saccharomyces cerevisiae* with ethanol production, described by cybernetic modeling. Through simulations and based on kinetic parameters obtained from the literature, it was found that an interconnected *asymptotic - exponential* observer has a good performance in estimating all variables in continuous, *fedbatch* and *batch* regimes. As a performance index, the integral of the absolute value of the error (IAE) was used.

Keywords: State observer, cybernetic model, asymptotic observer, sliding mode observer, Kalman filter, microbial growth.

Índice general

RESUMEN.....	IX
ÍNDICE GENERAL.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABLAS	XIV
INTRODUCCIÓN.....	1
1 CRECIMIENTO MICROBIANO.....	5
1.1 Descripción del crecimiento microbiano	5
1.2 Factores que afectan el crecimiento microbiano	8
1.2.1 Temperatura	8
1.2.2 pH.....	8
1.2.3 Saturación de oxígeno.....	9
1.3 Resumen.....	10
2 MODELOS DE CRECIMIENTO	11
2.1 Crecimiento microbiano en medios con un sustrato	11
2.1.1 Cinética.....	11
2.1.2 Balances dinámicos de masa	13
2.2 Crecimiento microbiano en medios con múltiples sustratos	14
2.2.1 Cinética de crecimiento.....	15
2.2.2 Balances dinámicos de masa para el modelo cibernético	18
2.3 Simulación de una fermentación anóxica empleando el enfoque cibernético	19
2.4 Resumen.....	22

3	ESTIMADORES DE ESTADO EN BIOPROCESOS	23
3.1	Criterios de observabilidad no lineal.....	23
3.1.1	Aproximación lineal	24
3.1.2	Aproximación geométrica	24
3.1.3	Aproximación algebraica	25
3.2	Estimadores de estado convencionales	25
3.2.1	Filtro de Kalman Extendido (EKF)	26
3.2.2	Observador asintótico (AO)	29
3.2.3	Observador por modos deslizantes (SMO).....	30
3.3	Resumen	32
4	METODOLOGÍA PARA EL DISEÑO DE OBSERVADORES EN MODELOS CIBERNÉTICOS.....	33
4.1	Propuesta para la aproximación de la función <i>max</i>	33
4.2	Análisis de observabilidad local	34
4.3	Propuesta de diseño de observadores para estimación de biomasa y producto	37
4.4	Propuesta de diseño de observadores para estimación del estado completo	41
4.4.1	Diseño del Filtro de Kalman extendido.....	42
4.4.2	Diseño del Observador por modos deslizantes	43
4.5	Análisis	43
4.5.1	Régimen continuo	44
4.5.2	Régimen <i>fedbatch</i>	46
4.5.3	Régimen batch.....	49
4.6	Resumen	51
5	CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS.....	53
5.1	Conclusiones	53
5.2	Trabajos futuros.....	54
	BIBLIOGRAFÍA.....	55

Lista de figuras

Figura 1-1	Curva de crecimiento típica para una población microbiana	6
Figura 1-2	Diferencias entre metabolismo primario y secundario	8
Figura 1-3	Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento microbiano	9
Figura 2-1	Ejemplos de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en mezclas de azúcares	15
Figura 2-2	Dinámica de biomasa, sustratos y producto en régimen <i>batch</i>	21
Figura 2-3	Dinámica de enzimas y variable cibernética de síntesis en régimen <i>batch</i>	21
Figura 2-4	Dinámica de CO ₂ y Biomasa en régimen <i>batch</i>	21
Figura 2-5	Dinámica de biomasa, sustratos y producto (a) Continuo (b) <i>Fedbatch</i>	22
Figura 3-1	Esquema básico de un observador de estado	26
Figura 3-2	Algoritmo del Filtro de Kalman discreto	27
Figura 3-3	Algoritmo del Filtro de Kalman extendido discreto	28
Figura 4-1	Comportamiento de v en términos de p	34
Figura 4-2	Rango de Ω usando la concentración de CO ₂ como variable medida	36
Figura 4-3	Medición de CO ₂ disuelto en régimen continuo	39
Figura 4-4	Estimación de biomasa con un AO en régimen continuo	39
Figura 4-5	Estimación de biomasa con un AO en régimen <i>fedbatch</i>	40
Figura 4-6	Estimación de biomasa con un AO en régimen <i>batch</i>	40
Figura 4-7	Estimación de etanol en régimen continuo	41
Figura 4-8	Diseño interconectado propuesto	41
Figura 4-9	Rango de la matriz de observabilidad lineal usando X	42
Figura 4-10	Estimación de biomasa en régimen continuo	44
Figura 4-11	Estimación de enzima 1 en régimen continuo	44
Figura 4-12	Estimación de enzima 2 en régimen continuo	45
Figura 4-13	Estimación de Glucosa en régimen continuo	45
Figura 4-14	Estimación de Galactosa en régimen continuo	45
Figura 4-15	Estimación de biomasa en régimen <i>fedbatch</i>	47
Figura 4-16	Estimación de Enzima 1 en régimen <i>fedbatch</i>	47
Figura 4-17	Estimación de Enzima 2 en régimen <i>fedbatch</i>	47
Figura 4-18	Estimación de Glucosa en régimen <i>fedbatch</i>	48
Figura 4-19	Estimación de Galactosa en régimen <i>fedbatch</i>	48
Figura 4-20	Estimación de biomasa en régimen <i>batch</i>	49
Figura 4-21	Estimación de Enzima 1 en régimen <i>batch</i>	49
Figura 4-22	Estimación de Enzima 2 en régimen <i>batch</i>	50
Figura 4-23	Estimación de Glucosa en régimen <i>batch</i>	50
Figura 4-24	Estimación de Galactosa en régimen <i>batch</i>	50

Lista de tablas

Tabla 1-1	Posibles estados de la fermentación según el valor de RQ.....	10
Tabla 2-1	Clasificación de los modelos cinéticos	12
Tabla 2-2	Otras expresiones para μ en un único sustrato limitante.....	13
Tabla 2-3	Expresiones para μ en múltiples sustratos limitantes	16
Tabla 2-4	Variables y parámetros del modelo cibernético.....	20
Tabla 4-1	IAE del error de estimación en régimen continuo	46
Tabla 4-2	IAE del error de estimación en régimen <i>fedbatch</i>	48
Tabla 4-3	IAE del error de estimación en régimen <i>batch</i>	51

Introducción

La medición de variables en los procesos es una tarea necesaria para implementar lazos de control, realizar el diagnóstico de fallas y monitorear variables críticas del proceso. En muchos casos esta medición es ardua, costosa y difícil de realizar debido a la no disponibilidad de dispositivos confiables, los retardos de tiempo, los errores en el sistema de medición y los altos costos de los dispositivos (De Assis and Maciel, 2000). Adicionalmente, la medición de algunas variables se complica debido al medio en el cual debe convivir el elemento primario de medición, que puede llegar a ser corrosivo o con temperaturas extremas, lo cual imposibilita una medición directa. En otros casos, los sensores no han sido diseñados para los intervalos que se requieren o su disponibilidad en el mercado es muy baja (Wallas, 1988). En el caso de los biorreactores la complejidad aumenta, pues cualquier leve cambio en una variable puede generar destrucción de las células y/o degradación del producto.

Con el fin de realizar la medición de variables difíciles en forma indirecta, se han utilizado los estimadores de estado, agrupados en observadores de estado, filtros, sensores por software y más genéricamente en Sensores Virtuales Basados en Modelo (SVBM). Estos estimadores utilizan la medición de algunas variables del proceso que son de fácil obtención, conjuntamente con un modelo del mismo, para estimar las variables complicadas de medir o, incluso, estimar el estado completo.

Dentro de los estimadores más utilizados en bioprocesos pueden mencionarse: *Filtro de Kalman Extendido* (Grewal and Andrews, 2001), *Observadores Asintóticos* (Dochain, 2003) y *Observadores de Alta Ganancia* (Biagiola and Figueroa, 2004), entre otros. Estos estimadores se han aplicado tanto en procesos continuos como en procesos por lotes, siendo en estos últimos mucho más complicada la estimación del estado, ya que al no existir flujos de entrada y/o salida, no se excitan dinámicas que pueden ser determinantes para el observador.

Por su parte, los modelos en los cuales se basan los observadores para sistemas biológicos son muy diversos, sobre todo para el cálculo de la velocidad de crecimiento de microorganismos. En los años 80's aparecen los modelos cibernéticos, que consideran la represión/inducción de una enzima específica y la activación/inhibición de las enzimas existentes en la célula. Dicha aproximación agrega robustez al modelado del crecimiento microbiano y permite visualizar los diferentes comportamientos que se presentan cuando la toma de sustratos por parte del microorganismo es simultánea o secuencial.

Actualmente los modelos cibernéticos tienen un marco teórico muy bien fundamentado tanto a nivel biológico como matemático. Estos modelos han demostrado ser muy precisos en la predicción del crecimiento de varios microorganismos en dos sustratos (crecimiento diáuxico) y en tres sustratos (crecimiento triáuxico) (Kompala et al., 1984; Kompala et al., 1986; Jones and Kompala, 1999). Además, exhiben grandes ventajas frente a otros modelos multisustrato:

- No necesitan la especificación *a priori* del orden en que son consumidos los sustratos.
- Describen el uso secuencial o simultáneo de sustratos dependiendo de las condiciones de cultivo.
- Son aplicables tanto a cultivos *batch* como continuos.
- Sus datos de entrada son los valores de los parámetros obtenidos a partir de experimentos sobre los sustratos individuales.
- Son relativamente fáciles de tratar desde el punto de vista matemático (ecuaciones diferenciales ordinarias).

Aunque tanto los observadores para bioprocesos como los modelos cibernéticos han sido estudiados con profundidad en forma individual, en la literatura consultada no hay ninguna evidencia de alguna teoría que posibilite su uso en conjunto. Con base en esta premisa, se presentan los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Proponer observadores de estado para la estimación de biomasa, a partir de modelos cibernéticos validados en laboratorio, probando su desempeño mediante simulación sobre el modelo de un fermentador de glucosa y galactosa, para obtener Etanol a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos específicos:

- Interpretar el concepto de variables cibernéticas aplicado al modelado de bioprocesos.
- Identificar las ventajas que ofrecen los modelos cibernéticos frente a otros modelos propuestos en la literatura para el cálculo de la velocidad de crecimiento de microorganismos en procesos fermentativos.
- Obtener un modelo cibernético de un fermentador de glucosa para producir Etanol a partir de *Saccharomyces cerevisiae* y validar el modelo con datos experimentales obtenidos de la literatura.

- Generar un marco conceptual válido que reúna la teoría de observadores y la de modelos cibernéticos, con el fin de evaluar observadores de estado para bioprocesos.
- Analizar el desempeño de varios observadores de biomasa a partir de modelos cibernéticos.

El trabajo está organizado de la siguiente manera: En el Capítulo 1 se presentan algunas de las definiciones fundamentales del crecimiento microbiano desde el punto de vista biológico. En el Capítulo 2 se hace un recuento de las aproximaciones matemáticas al crecimiento microbiano y se describe detalladamente el modelo cibernético para crecimiento en múltiples sustratos. En el Capítulo 3 se define la observabilidad no lineal y se explican tres tipos de observadores no lineales ampliamente utilizados en la literatura. En el Capítulo 4 se propone una metodología para estimar todos los estados del modelo cibernético explicado en el Capítulo 2. Finalmente, en el Capítulo 5 se dan las conclusiones, comentarios finales y recomendaciones emanadas del análisis efectuado en el Capítulo 4.

1 Crecimiento microbiano

"In the field of observation chance favors only the prepared mind."

Louis Pasteur (1822 - 1895)

Cuando un microorganismo se encuentra ante condiciones favorables de sustrato, temperatura, pH, etc. no sólo comienza a crecer en tamaño sino que se multiplica continuamente a una velocidad que depende tanto del tipo de microorganismo como de las condiciones ambientales. El incremento del tamaño no es tan representativo comparado con el aumento en el número de células (a cuyo conjunto se denomina *biomasa*), por lo que en adelante se asociará el término *crecimiento* únicamente al aumento en el número de células.

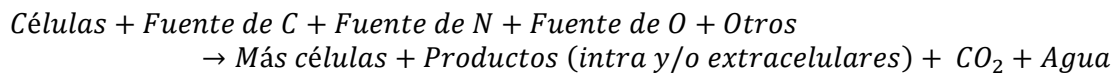
Este capítulo pretende que el lector se familiarice con la terminología microbiológica más elemental y que comprenda las fases del crecimiento microbiano; además, se revisarán brevemente tres de los factores más relevantes que afectan dicho crecimiento: la temperatura, el pH y la saturación de oxígeno.

1.1 Descripción del crecimiento microbiano

Todo microorganismo requiere para sus procesos metabólicos una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno como elementos básicos (el carbono puede representar el 50% del peso seco de la célula, mientras que el nitrógeno un 12%), así como otros elementos en menor proporción (H, S, P, Fe, Cu, etc.) (Madigan et al., 1998). Por lo general, cuando se conducen experimentos a nivel de laboratorio, se utiliza como fuente de carbono un azúcar simple como glucosa, fructosa o lactosa, que puede ser degradado fácilmente por las enzimas microbianas. Sin embargo, cualquier compuesto orgánico puede convertirse eventualmente en fuente de carbono; de tal suerte que, con microorganismos y condiciones particulares, pueden degradarse ácidos, compuestos aromáticos, alcoholes, hidrocarburos y una gran gama de compuestos de tipo orgánico (Okpokwasili and Nweke, 2005). Esta gran versatilidad de los microorganismos dio origen en la década del 60 del siglo XX a lo que hoy se conoce como *biorremediación* de suelos y afluentes (Vidali, 2001). El nitrógeno (segundo elemento en importancia dentro de los microorganismos) puede obtenerse vía orgánica (úrea, amoníaco, aminoácidos, etc.) o vía inorgánica (nitratos, nitritos o nitrógeno diatómico). Tanto el carbono como el nitrógeno son utilizados por la

célula para generar estructuras, enzimas y proteínas diversas, indispensables para su supervivencia y replicación.

Una vez estén presentes los nutrientes necesarios y las condiciones sean óptimas, el microorganismo puede iniciar su crecimiento que, en términos generales, puede expresarse como si fuera una reacción autocatalítica:



O en forma resumida:



En un cultivo no renovado, el crecimiento de un microorganismo exhibe el comportamiento típico ilustrado por la Figura 1-1. Esta curva de crecimiento puede dividirse en cuatro fases principales: fase de latencia (*lag phase*), fase de crecimiento acelerado (*exponential phase*), fase estacionaria (*stationary phase*) y fase de muerte (*death phase*).

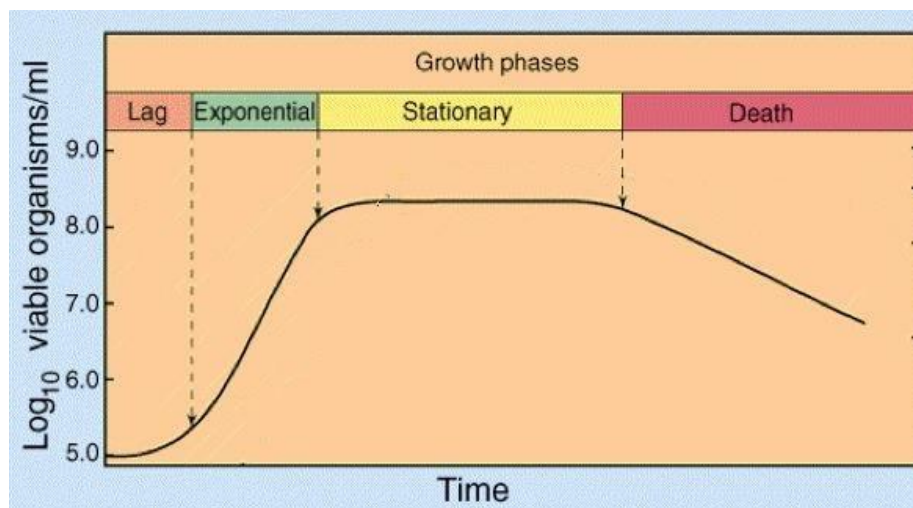


Figura 1-1 Curva de crecimiento típica para una población microbiana (Madigan et al., 1998)

- Fase de latencia: cuando una población microbiana se inocula en medio fresco no ocurre crecimiento inmediatamente, sino después de cierto tiempo denominado *fase de latencia*, que puede ser más largo o más corto dependiendo de diversos factores (Madigan et al., 1998). En esta fase el microorganismo sintetiza las enzimas necesarias para degradar el medio y/o reparar daños celulares que se hayan presentado en procesos anteriores.
- Fase de crecimiento acelerado: una vez la maquinaria enzimática está lista, el crecimiento se da en forma exponencial, consumiendo de igual forma los nutrientes presentes en el medio de cultivo. El tiempo de duplicación depende tanto del microorganismo como de las condiciones del medio, pudiendo ir desde minutos hasta días.
- Fase estacionaria o de crecimiento crítico: si el cultivo no se renueva, los nutrientes empiezan a escasear y, en muchos casos, empiezan a acumularse metabolitos tóxicos en el medio que empiezan a inhibir el crecimiento de la población microbiana. En este punto, la velocidad de crecimiento y la velocidad de muerte celular se hacen iguales, por lo que no hay cambio aparente en el número de células. Sin embargo, aunque en esta fase no tiene lugar crecimiento, todavía ocurren muchas funciones celulares que incluyen el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos (Madigan et al., 1998).
- Fase de muerte: una vez los nutrientes se agotan o la concentración de tóxicos es más alta de la tolerable, cesa completamente el crecimiento y ocurre la muerte celular, a menudo acompañada de lisis de la membrana celular. Esta fase puede ser igualmente exponencial como la de crecimiento.

Los productos microbianos incluyen las propias células (biomasa) y las sustancias producidas por ellas, a las cuales se les da el nombre de metabolitos. Los metabolitos primarios son compuestos de relativo bajo peso molecular que se generan durante la fase exponencial, es decir, están asociados directamente al crecimiento. Ácidos orgánicos, alcoholes, vitaminas y nucleótidos son ejemplos. Los metabolitos secundarios se producen durante la fase estacionaria, por lo que no están asociados al crecimiento y, a diferencia de los metabolitos primarios, presentan claras diferencias de un microorganismo a otro; adicionalmente, su formación es extremadamente dependiente de la composición del medio. Los antibióticos, toxinas y alcaloides son ejemplos de este grupo de metabolitos. El dióxido de carbono, el agua y otros compuestos también son producidos durante la reacción y pueden ser catalogados como subproductos. En la Figura 1-2 se muestra el comportamiento de ambas clases de metabolitos con respecto al crecimiento celular:

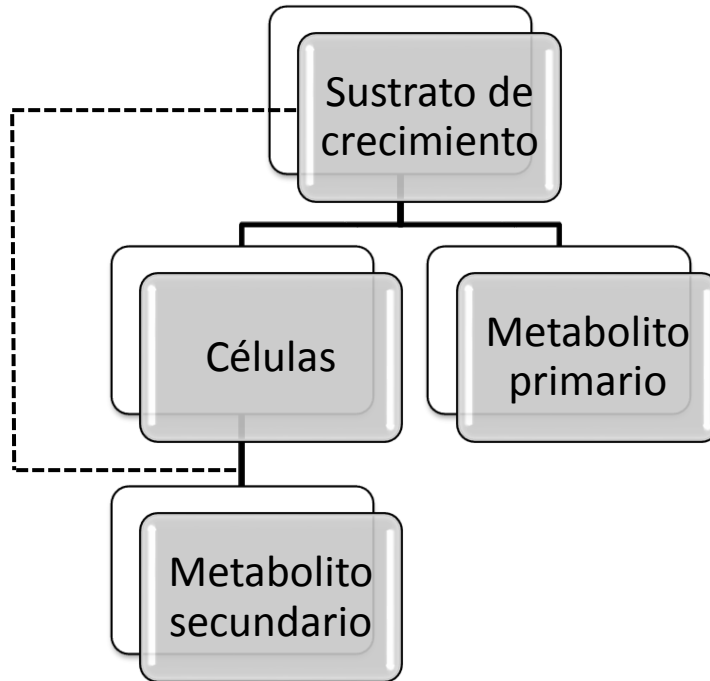


Figura 1-2 Diferencias entre metabolismo primario y secundario

1.2 Factores que afectan el crecimiento microbiano

1.2.1 Temperatura

La temperatura juega un rol principal en todas las reacciones biológicas, de ahí que sea considerada como una variable crítica de control en este tipo de procesos. La maquinaria enzimática se ve catalizada con el aumento en la temperatura, pero por encima de cierto valor las proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos se desnaturalizan y dañan irreversiblemente, dando lugar al cese de la actividad enzimática y a la eventual muerte celular. Por tanto, para cada microorganismo existe una *temperatura mínima* por debajo de la cual no existe crecimiento, una *temperatura óptima* a la cual el crecimiento es el más rápido posible y una *temperatura máxima*, por encima de la cual tampoco hay crecimiento. Estas tres temperaturas se conocen en conjunto como *temperaturas cardinales* y su efecto puede apreciarse en la Figura 1-3.

1.2.2 pH

Al igual que la temperatura, el potencial de hidrógeno es una variable que debe controlarse continuamente durante el crecimiento celular, pues de ella depende la eficiencia en el intercambio protónico de la membrana celular. La mayoría de microorganismos requieren de un pH medianamente ácido (alrededor de 5.0), pero hay muchas excepciones como el *Sulfolobus* que crece a pH 2 o algunos *Bacillus* que crecen a

pH por encima de 10; tales microorganismos reciben el nombre de *acidófilos* y *alcalófilos*, respectivamente.

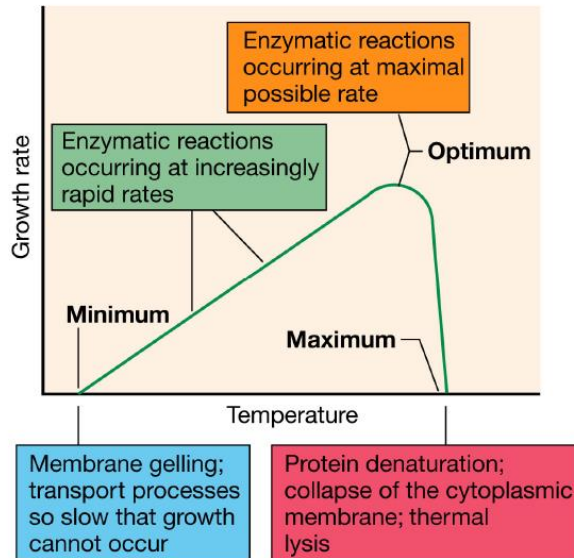
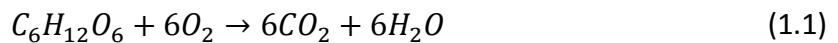


Figura 1-3 Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento microbiano (Madigan et al, 1998)

1.2.3 Saturación de oxígeno

Los microorganismos varían en sus necesidades o tolerancia al oxígeno, de hecho, pueden ser divididos en diversos grupos dependiendo del efecto que tenga el oxígeno sobre ellos. Sin embargo, por simplicidad, los dos grupos mayoritarios son los que requieren oxígeno para crecer (aerobios) y los que no lo necesitan (anaerobios).

Independientemente de si el microorganismo es aerobio o anaerobio, el dióxido de carbono CO_2 siempre está presente como subproducto del proceso metabólico. Por ejemplo, la fermentación aeróbica de la glucosa produce CO_2 y agua (ecuación 1.1); mientras que en la fermentación anaeróbica, produce CO_2 y etanol (ecuación 1.2):



Esto hace que el monitoreo del consumo de O_2 (en inglés *Oxygen Uptake Rate – OUR*) y de la producción del CO_2 (en inglés *Carbon Dioxide Evolution Rate – CER*) revele de manera confiable la actividad biológica de un cultivo (Bendtsen, 2000). Ambos valores suelen relacionarse a través del coeficiente respiratorio RQ (*Respiration quotient*, definido como el cociente entre el CER y el OUR). La Tabla 1-1 muestra cómo se relacionan los valores numéricos de RQ con el estado de la fermentación:

Tabla 1-1 Posibles estados de la fermentación según el valor de RQ

Reacción	Medición de gases	Coefficiente respiratorio	Descripción
Ec. 1 y 2	CER > OUR	RQ > 1	Producción aeróbica de etanol
Ec. 1	CER = OUR	RQ ~ 1	Proceso aeróbico ideal
Ec. 2	OUR = 0	RQ ~ ∞	Fermentación anaeróbica

1.3 Resumen

A lo largo de este capítulo se examinaron algunos conceptos básicos y consideraciones del crecimiento microbiano. Se explicaron las cuatro fases del crecimiento (latencia o preparación enzimática, crecimiento acelerado, crecimiento crítico y muerte celular), así como el hecho de que estas son susceptibles de ser modificadas según las condiciones ambientales y del medio de cultivo. El siguiente capítulo tratará el crecimiento microbiano desde el punto de vista matemático, además, se tratará detenidamente el tema de modelado cibernético para crecimiento en múltiples sustratos en ausencia de oxígeno.

2 Modelos de crecimiento

“Mathematics is entirely free in its development, and its concepts are only linked by the necessity of being consistent, and are co-ordinated with concepts introduced previously by means of precise definitions.”

Georg Cantor (1845 - 1918)

En la sección anterior se dio una mirada puramente biológica al fenómeno de crecimiento microbiano. El presente capítulo profundiza el concepto introduciendo el modelado matemático a través de balances dinámicos. El capítulo ofrece dos enfoques bien diferenciados: el de crecimiento en un único sustrato y el de crecimiento multisustrato, haciendo especial énfasis en el modelo cibernético.

2.1 Crecimiento microbiano en medios con un sustrato

La ley del mínimo (Ley de Liebig) establece que el crecimiento de plantas y cultivos no es controlado por la cantidad total de recursos, sino por el recurso más escaso (Van den Berg, 1998). Esta regla general ha sido aplicada en el crecimiento de microorganismos modificando la composición del medio de cultivo, de tal forma que uno de los nutrientes (usualmente una fuente de carbono) determina la densidad máxima de biomasa que puede obtenerse (Egli and Zinn, 2003). Esta ley del mínimo ha sido tan preponderante en biotecnología que la gran mayoría de las ecuaciones cinéticas existentes para describir el crecimiento microbiano ha sido desarrollada a partir de ella.

2.1.1 Cinética

La complejidad de los modelos cinéticos para describir el cambio producido dentro de la célula durante una transformación microbiana puede ser muy amplia. Los modelos más simples son los de tipo *no estructurado – no segregado*, que consideran al microorganismo como un único componente (biomasa). Estos son los más utilizados en aplicaciones de ingeniería debido a su simplicidad matemática y a su capacidad de representar adecuadamente un vasto conjunto de reacciones biológicas de interés (Conicet, 2014). Otros modelos son los *metabólicos*, los *estructurados* y los *segregados*. La Tabla 2-1 muestra las características principales de cada uno:

Tabla 2-1 Clasificación de los modelos cinéticos
(Alcón, 1999)

Modelo cinético	Concepto
No estructurado – no segregado	La biomasa se considera como un único componente. Se considera una célula media como representativa del cultivo.
Metabólico	Normalmente no estructurado – no segregado. Se describen las rutas metabólicas como una red de reacciones empleando un esquema simplificado de reacción, con relaciones estequiométricas definidas.
Estructurado (o de célula)	La descripción de la biomasa se realiza considerándola formada por varias especies. Se tienen en cuenta los componentes intracelulares.
Químicamente estructurado	Se considera la biomasa formada por varias especies y también un metabolismo simplificado (una red de reacciones).
Segregado	En la descripción del microorganismo se considera la distribución de alguna propiedad. No se considera un microorganismo medio.

El crecimiento microbiano tiene como parámetro principal la velocidad específica de crecimiento (μ) que se ve altamente influenciada por las condiciones del medio (temperatura, pH, presión osmótica, etc.). Existen muchas expresiones para μ pero la más utilizada es, sin lugar a dudas, la propuesta por Monod (1949):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \quad (2.1)$$

donde μ es la velocidad específica de crecimiento [h^{-1}], μ_{\max} es la velocidad específica máxima [h^{-1}], S es la concentración de sustrato [g/l] y K_S es la constante de saturación [g/l].

Otras aproximaciones comunes en la literatura para la cinética pueden encontrarse en la Tabla 2-2:

Tabla 2-2 Otras expresiones para μ en un único sustrato limitante (Fogler, 1999; Nielsen et al., 2003)

Autor	Expresión
Teissier	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - e^{-\frac{S}{K_S}} \right)$
Mosser	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{S^n}{S^n + K_S^n} \right)$
Contois	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{S}{S + K_S X} \right)$
Haldane	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{S}{K_t + S + \frac{S^2}{K_I}} \right)$

2.1.2 Balances dinámicos de masa

Los balances de masa para reacciones biológicas siguen el mismo patrón que los balances de masa para reacciones químicas convencionales: *Entrada + Generación – Salida – Consumo = Acumulación*. Por lo general, en los biorreactores no hay entrada de biomasa (X), producto (P) (en este caso etanol) o CO₂ (C), pero sí de sustrato (S); teniendo esto en cuenta, los balances correspondientes en una fermentación anóxica (anaerobia) tienen la forma (Fogler, 1999; Nielsen et al., 2003):

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d)X - \frac{F}{V}X - \frac{X}{V} \frac{dV}{dt} \quad (2.2)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \mu X - m_S X + \frac{F_{in}}{V} S_{in} - \frac{F}{V} S - \frac{S}{V} \frac{dV}{dt} \quad (2.3)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\phi_1}{Y_{X/S}} \mu X - \frac{F}{V} P - \frac{P}{V} \frac{dV}{dt} \quad (2.4)$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{\phi_2}{Y_{X/S}} \mu X - \frac{F}{V} C - k_l a_c (C - C^*) - \frac{C}{V} \frac{dV}{dt} \quad (2.5)$$

$$\frac{dV}{dt} = F_{in} - F \quad (2.6)$$

donde k_d y m_s son las constantes de muerte y de mantenimiento celular, respectivamente (ambos en h^{-1}). Por lo general estas constantes tienen valores pequeños y no se considerarán dentro de los balances. $Y_{x/s}$ representa el coeficiente de producción de biomasa con respecto al sustrato S . En el balance dióxido aparecen dos términos distintivos: $klac$ [h^{-1}], que es el coeficiente de transferencia de masa y C^* , que es la concentración de saturación de CO_2 en el agua [g/l]. ϕ_1 y ϕ_2 son los coeficientes estequiométricos para el etanol y el dióxido de carbono, respectivamente. Finalmente, F_{in} y F corresponden al flujo volumétrico de entrada y salida del reactor [l/h], mientras que V es el volumen del reactor [l].

2.2 Crecimiento microbiano en medios con múltiples sustratos

La suposición de que la mecánica interna de los microorganismos está condicionada por un único nutriente es válida para casos muy particulares en donde el medio de cultivo es preparado en laboratorio (medio de cultivo definido), actividad que se realiza con el propósito de disminuir el grado de incertidumbre en el experimento y asegurar un crecimiento y/o producción de metabolitos específicos. Dicha restricción nutricional contrasta con los ecosistemas naturales, donde existe un enorme espectro de sustratos potenciales que están disponibles para satisfacer un requerimiento fisiológico particular (Egli et al., 1993). En tal caso, la simplificación sugerida por un único sustrato limitante es inadecuada y se hace necesario adoptar otro enfoque.

El primer científico que exploró esta problemática fue el mismo Jacques Monod en 1941. Durante un experimento con *Bacillus subtilis*, observó dos fases de crecimiento claramente diferenciables al hacer un cultivo *batch* con una mezcla de dos azúcares. Tal fenómeno recibió el nombre de *crecimiento diáuxico* y dio origen al estudio sistemático del crecimiento multisustrato. La Figura 2-1 muestra el comportamiento diáuxico del *Escherichia coli* en diferentes medios de cultivo.

En ella, se observa una segunda fase exponencial en (c), (d), (e) y (f) que evidencia el uso secuencial de los azúcares, con una fase intermedia en donde el microorganismo cambia su maquinaria enzimática para degradar el segundo sustrato. El orden en el cual los sustratos son consumidos depende del grado de afinidad que tenga el microorganismo. En otras palabras, el primer sustrato en ser degradado será aquel que brinde la mayor velocidad de crecimiento (Kompala et al., 1986). En (a) y (b) no se aprecia una segunda fase exponencial, lo que indica que el microorganismo presenta una afinidad similar por ambos azúcares y los consume simultáneamente.

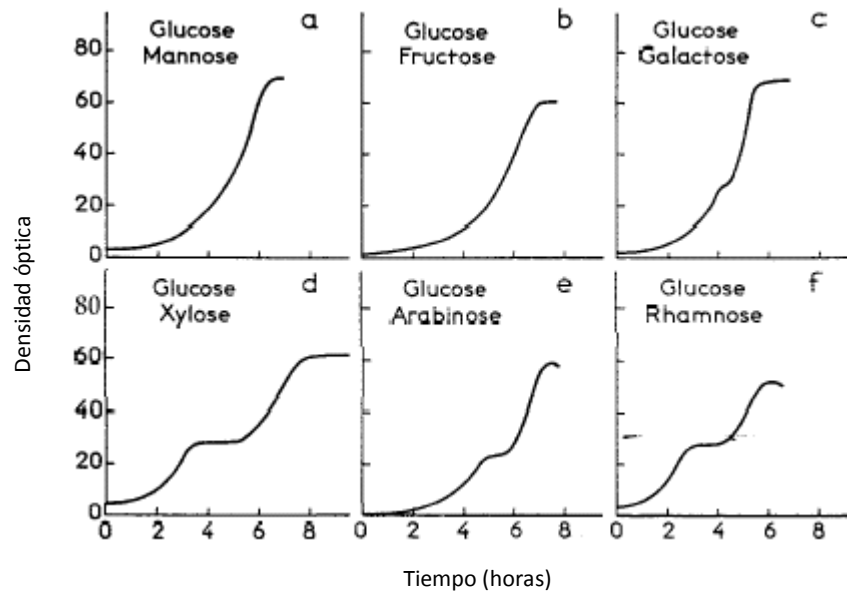


Figura 2-1 Ejemplos de crecimiento de *Escherichia coli* en mezclas de azúcares (Monod, 1949).

2.2.1 Cinética de crecimiento

Como se mencionó en la sección 2.1.1, los modelos no estructurados – no segregados consideran las células vivas como biocatalizadores sin profundizar en los subprocesos de regulación intracelular. El objetivo principal de estos modelos es el comportamiento del proceso general. Por tal motivo usualmente involucran únicamente los datos más relevantes (concentraciones de sustrato, producto y biomasa). Debido a que sólo se usan pocas variables de estado, estos modelos son los más estudiados en procesos de control y estimación. Para abordar el crecimiento en múltiples sustratos se han desarrollado diferentes modelos basados en la ecuación típica de Monod, como puede verse en la Tabla 2-3.

Estos modelos presentan dos serios inconvenientes:

- Solo conciben el consumo de nutrientes heterólogos (que no cumplen la misma función fisiológica en la célula). En otras palabras, solo sirven para evaluar el consumo simultáneo de sustratos; ninguno de los modelos explica el consumo secuencial debido a la presencia de sustratos que cumplen con la misma función fisiológica, llamados también homólogos o sustitutos (Zinn et al., 2004).

- Brindan una muy pobre descripción del proceso cuando este es dinámico. Como regla general, los modelos no estructurados tiene la función principal de interpolar datos restringidos y rara vez se utilizan cuando las condiciones experimentales varían constantemente (Nielsen et al., 2003).

Tabla 2-3 Expresiones para μ en múltiples sustratos limitantes
(Okpokwasili y Nweke, 2005)

Autor	Expresión
McGee et al (1972)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S_1}{K_1 + S_1} \frac{S_2}{K_2 + S_2}$
Tsao y Hansen (1975)	$\mu = \left(1 + \sum_i \frac{S_{e,i}}{K_{e,i} + S_{e,i}} \right) \prod_j \frac{\mu_{m\acute{a}x,j} S_j}{K_{s,j} + S_j}$
Yoon et al (1977)	$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x,1} S_1}{K_1 + S_1 \left(1 + \frac{S_2}{K_2} \right)} + \frac{\mu_{m\acute{a}x,2} S_2}{K_2 + S_2 \left(1 + \frac{S_1}{K_1} \right)}$
Roels (1983)	$\frac{\mu}{\mu_{m\acute{a}x}} = \min \left(\frac{S_1}{K_1 + S_1}, \frac{S_2}{K_2 + S_2} \right)$
Mankad y Bungay (1988)	$\frac{\mu}{\mu_{m\acute{a}x}} = W_1 \frac{S_1}{K_1 + S_1} + W_2 \frac{S_2}{K_2 + S_2}$

El crecimiento microbiano en múltiples sustratos exhibe diferentes comportamientos, desde el uso secuencial hasta el simultáneo de todos los sustratos, dando origen a fases de crecimiento multiexponencial (Kompala et al., 1984). Esto indica que las células tienen una gran capacidad de regular su metabolismo y optimizar el consumo de sustratos, dependiendo de la afinidad sobre cada uno. Este esquema sugiere que las células primero crecen en el sustrato que les ofrece más velocidad de crecimiento; cuando este sustrato alcanza una baja concentración o se acaba por completo, las células producen nuevas enzimas y continúan con el segundo sustrato preferido.

Kompala y colaboradores concibieron un ingenioso concepto de modelado especialmente aplicable a fermentaciones en las cuales intervienen varias fuentes de carbono y energía (Nielsen et al., 2003). Su aproximación cibernética se basa en la hipótesis de que mientras el modelado detallado de procesos intracelulares de regulación es muy complejo, es posible interpretar el funcionamiento de la célula como un proceso guiado por una estrategia de localización óptima de recursos (Kompala et al., 1984). Este

comportamiento regulatorio es abordado por medio de la introducción de dos variables: una considera la represión o inducción de una enzima específica (u_i), mientras que la otra considera la activación o inhibición de las enzimas preexistentes en la célula (v_i). Ambas pueden tener valores entre 0 y 1.

La variable u_i puede verse como una representación del proceso de transcripción del ADN celular mediante la ARN polimerasa. Físicamente, si $u_i = 0$ la ARN polimerasa no transcribe el gen para la síntesis de las enzimas encargadas de degradar el i -ésimo sustrato, mientras que si su valor es cercano a 1, la ARN polimerasa dedica la mayor parte del tiempo en la transcripción de las enzimas para dicho sustrato.

Por otra parte, la variable v_i incorpora acciones de regulación sobre las enzimas que ya están presentes en la célula. Si v_i es cercano a cero entonces la reacción de degradación del i -ésimo sustrato no procede, aun cuando estén presentes dicho sustrato y las enzimas para actuar sobre él; si el valor se acerca a uno, la i -ésima reacción se activa, con el subsecuente catabolismo del i -ésimo sustrato.

Se han propuesto diferentes modelos para las variables cibernéticas (Kompala et al., 1984; Kompala et al., 1986); actualmente se utilizan las siguientes relaciones que han probado ser las más consistentes:

$$u_i = \frac{\mu_i}{\sum_j \mu_j} \quad (2.7)$$

$$v_i = \frac{\mu_i}{\max_j \mu_j} \quad (2.8)$$

donde μ_i es la velocidad específica de crecimiento en el i -ésimo sustrato, dada por la relación:

$$\mu_i = \frac{\mu_{m\acute{a}x,i} E_{R,i} S_i}{K_i + S_i} \quad (2.9)$$

Como puede apreciarse en la ecuación 2.9, la velocidad específica presenta una forma similar a la ecuación típica de Monod, pero se introduce la variable E_R que es el nivel relativo de enzima presente para degradar el sustrato i . Este nivel toma valores entre 0 y 1 y se calcula mediante las ecuaciones 2.10 y 2.11, donde α_i y β_i son las constantes de síntesis y degradación enzimática, respectivamente. La variable de estado e_i corresponde a la concentración actual de enzima en la célula (g/g), mientras que $e_{m\acute{a}x,i}$ corresponde a la concentración máxima:

$$E_{R,i} = \frac{e_i}{e_{m\acute{a}x,i}} \quad (2.10)$$

$$e_{m\acute{a}x,i} = \frac{\alpha_i}{\mu_{m\acute{a}x,i} + \beta_i} \quad (2.11)$$

2.2.2 Balances dinámicos de masa para el modelo cibernético

Con base en los balances dinámicos de la sección 2.1.2 e introduciendo los lineamientos cibernéticos, se obtienen las siguientes ecuaciones diferenciales ordinarias:

- Biomasa:

$$\frac{dX}{dt} = \left(\sum \mu_i v_i \right) X - \frac{F}{V} X - \frac{X}{V} \frac{dV}{dt} \quad (2.12)$$

- Enzima:

$$\frac{de_i}{dt} = \frac{\alpha_i S_i}{K_i + S_i} u_i - \beta_i e_i - \left(\sum \mu_i v_i \right) e_i + \alpha^* \quad (2.13)$$

- Sustrato:

$$\frac{dS_i}{dt} = \frac{F_{in}}{V} S_{i,0} - \frac{F}{V} S_i - \frac{S_i}{V} \frac{dV}{dt} - \frac{1}{Y_{X/S,i}} \mu_i v_i X \quad (2.14)$$

- Producto (etanol):

$$\frac{dP}{dt} = \left(\sum \frac{\phi_i \mu_i v_i}{Y_{X/S,i}} \right) X - \frac{F}{V} P - \frac{P}{V} \frac{dV}{dt} \quad (2.15)$$

- Dióxido de carbono:

$$\frac{dC}{dt} = \left(\sum \frac{\phi_i \mu_i v_i}{Y_{X/S,i}} \right) X - k l a_c (C - C^*) - \frac{F}{V} C - \frac{C}{V} \frac{dV}{dt} \quad (2.16)$$

La ecuación 2.13 ilustra la dinámica de la i -ésima enzima que limita la velocidad de consumo del sustrato correspondiente. El primer término a la derecha es el término de síntesis de enzima, el siguiente término representa la degradación de la enzima; el tercer término representa la dilución de la concentración de la enzima debida al crecimiento celular; finalmente, el término α_i^* se incluye para asegurar un bajo nivel de cada enzima aun en total ausencia de su sustrato. Jones y Kompala en su trabajo de 1999 introducen una dinámica adicional de almacenamiento intracelular de carbohidratos en su modelo aerobio. Sin embargo, para el presente trabajo no se tendrá en cuenta, ya que en cultivos anóxicos la velocidad de almacenamiento es significativamente baja comparada con la velocidad de crecimiento. Dentro del desarrollo del modelo matemático, Kompala y colaboradores presentan cuatro postulados básicos que debe seguir cualquier modelo que aborde el crecimiento multisustrato (Kompala et al., 1986):

- Dados varios sustratos, en los cuales la velocidad de crecimiento es diferente, los microorganismos prefieren crecer en el sustrato de rápido consumo, generándose un comportamiento multiáuxico.

- De forma más general, el comportamiento del crecimiento varía entre la utilización simultánea de sustratos (que ocurre cuando las velocidades de crecimiento son cercanas) y la utilización secuencial con periodos de latencia intermedios.
- La velocidad de crecimiento en una mezcla de sustratos nunca es superior a la máxima de las velocidades individuales.
- Si en el momento de crecimiento en el sustrato de consumo lento se adiciona un sustrato más favorable, el microorganismo inhibe la actividad de las enzimas presentes para la degradación del primero.

2.3 Simulación de una fermentación anóxica empleando el enfoque cibernético

En la sección anterior se ilustraron las ventajas que tiene el modelado cibernético frente a los modelos convencionales. En esta última sección del capítulo, a manera de ejemplo, se muestra la dinámica de un proceso de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en glucosa y galactosa a través de simulación. Los datos experimentales utilizados fueron adaptados del trabajo Kompala et al. (1984) y Kompala (2013). Todos los parámetros utilizados se muestran en la Tabla 2-4.

En la Figura 2-2 se muestra que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene preferencia por la glucosa y por eso la degrada rápidamente, aun cuando la concentración inicial de galactosa es la misma. A pesar de que ambas son aldohexosas, la glucosa y la galactosa difieren en su constante de saturación (0,05 g/l y 0,1 g/l, respectivamente). Este hecho hace que no se comporten como sustratos homólogos y el consumo sea secuencial. Obsérvese que una vez la glucosa es totalmente consumida se presenta una pequeña etapa de latencia en la que el microorganismo sintetiza las enzimas necesarias para degradar la galactosa; cerca de las 4,5 horas de fermentación inicia una segunda fase exponencial, con la consecuente disminución acelerada de galactosa.

El etanol es un metabolito primario y por eso sigue la misma dinámica de la biomasa. Es importante tener en cuenta que para esta investigación no se considerarán efectos inhibitorios del etanol sobre el crecimiento microbiano.

Tabla 2-4 Variables y parámetros del modelo cibernético
(Di Serio et al., 2001; Kompala et al., 1984; Kompala, 2013)

Parámetro	Unidades	Definición	Valor
$\mu_{\max,1}$	h^{-1}	Velocidad máxima para la fermentación de glucosa	0.44
$\mu_{\max,2}$	h^{-1}	Velocidad máxima para la fermentación de galactosa	0.40
k_1	g/l	Constante de saturación para la glucosa	0.05
k_2	g/l	Constante de saturación para la galactosa	0.10
$Y_{x/s,1}$	g/g	Rendimiento de biomasa con respecto a glucosa	0.16
$Y_{x/s,2}$	g/g	Rendimiento de biomasa con respecto a galactosa	0.15
α_1 / α_2	h^{-1}	Constante de velocidad de síntesis enzimática	0.0010
$\alpha^*_{1} / \alpha^*_{2}$	h^{-1}	Constante constitutiva de síntesis enzimática	1E-5
β_1 / β_2	h^{-1}	Constante de velocidad de degradación enzimática	0.050
ϕ_1 / ϕ_2	g/g	Coefficiente estequiométrico para producción de etanol a partir de glucosa / galactosa	0.49
ϕ_3 / ϕ_4	g/g	Coefficiente estequiométrico para el CO ₂ a partir de glucosa / galactosa	0.49
$S_{1,0} / S_{2,0}$	g/l	Concentración inicial de glucosa / galactosa	4,0
X_0	g/l	Biomasa inicial	0.40
P_0 / C_0	g/l	Concentración inicial de etanol / CO ₂	0,0
V_0	l	Volumen inicial	6,0
$e_{1,0} / e_{2,0}$	g/g	Concentración inicial de enzima intracelular para glucosa / galactosa	1E-4
kla_c	h^{-1}	Coefficiente de transferencia de masa para el CO ₂	1000
C^*	g/l	Concentración de saturación de CO ₂	0.0053
F_{in} / F	l/h	Flujo de entrada / salida	1.1

El comportamiento regulatorio de las células se evidencia claramente en la Figura 2-3. Nótese que mientras exista glucosa en el medio, la señal de síntesis u_1 es elevada y, en consecuencia, la enzima 1 está en su máximo nivel. Cuando la glucosa se agota, se dispara la señal de síntesis u_2 y la de enzima 2, que permanecía inhibida, comienza a producirse para degradar el segundo sustrato.

Finalmente, la Figura 2-4 muestra la dinámica del CO₂ disuelto comparada con la biomasa. Se aprecian dos descensos en la concentración del dióxido, que corresponden a los puntos en donde hay cese de crecimiento celular por agotamiento de los sustratos.

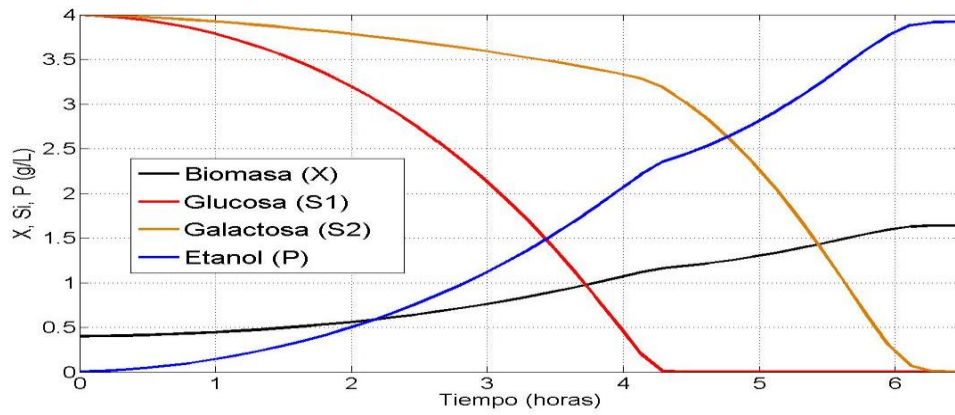


Figura 2-2 Dinámica de biomasa, sustratos y producto en régimen *batch*

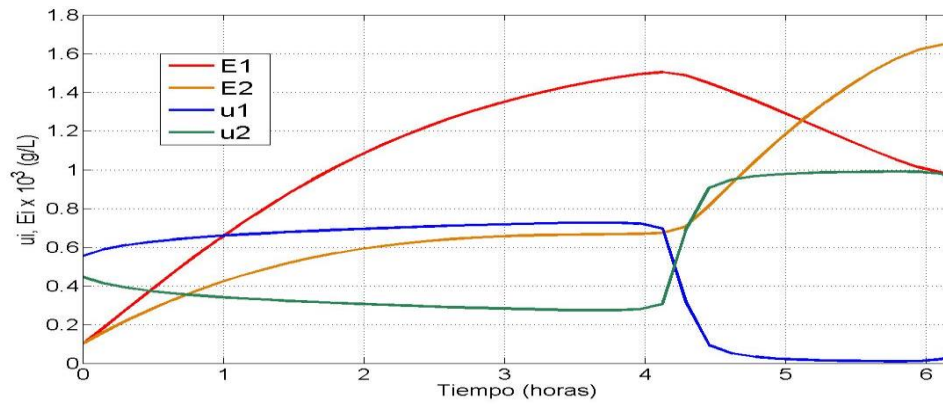


Figura 2-3 Dinámica de enzimas y variable cibernética de síntesis en régimen *batch*

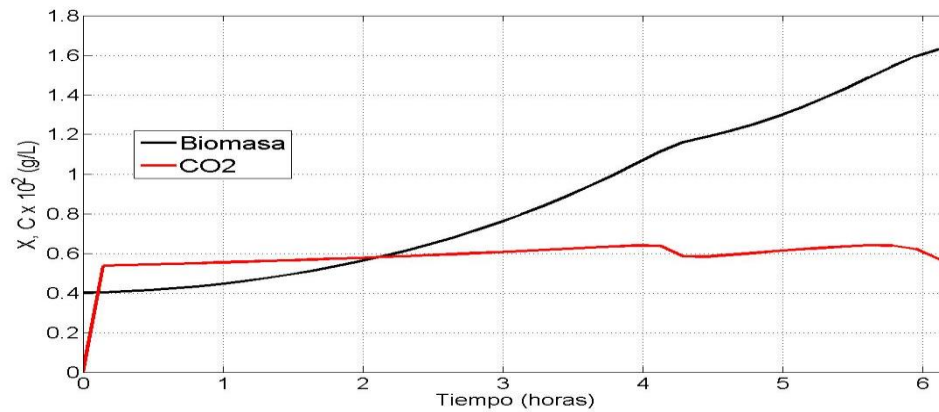


Figura 2-4 Dinámica de CO₂ y Biomasa en régimen *batch*

El comportamiento de las variables es muy similar en régimen continuo y *fedbatch*, como lo muestra la Figura 2-5:

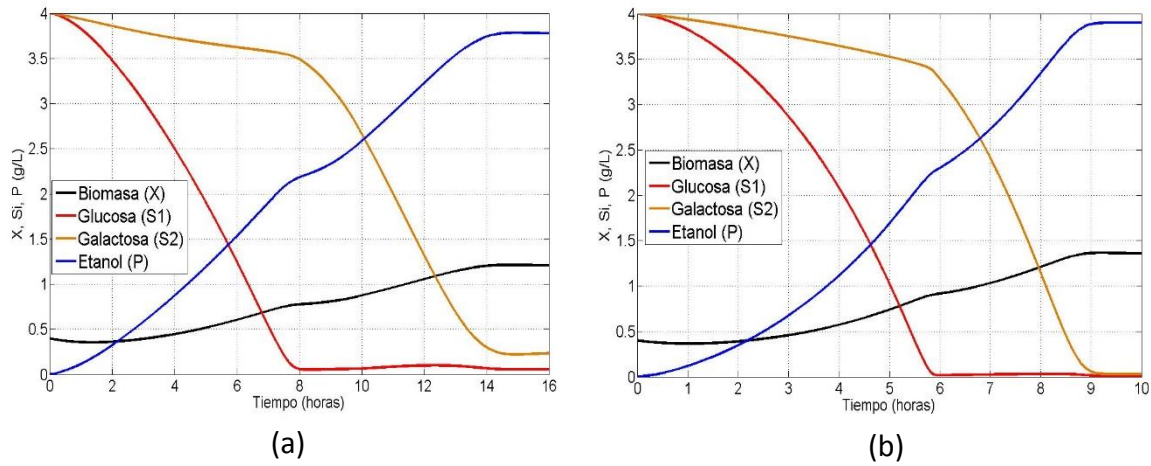


Figura 2-5 Dinámica de biomasa, sustratos y producto (a) Continuo (b) *Fedbatch*

2.4 Resumen

En este capítulo se describió matemáticamente el modelo cibernético y se explicaron sus consideraciones más relevantes. Paralelamente, se revisaron algunos modelos no estructurados para la evaluación del crecimiento multisustrato, haciendo especial hincapié en que dichos modelos no explican totalmente el fenómeno de crecimiento en múltiples sustratos, particularmente cuando su toma es secuencial. Como solución a este inconveniente, se explicó el surgimiento de los modelos cibernéticos y cómo la adición de dos variables al modelamiento puede predecir de forma acertada el crecimiento en múltiples sustratos limitantes. Al final del capítulo, a manera de ejemplo, se presentó la simulación del crecimiento anóxico de *Saccharomyces cerevisiae* en glucosa y galactosa, de tal forma que el lector se familiarice con la dinámica de las nuevas variables que introduce el modelo cibernético.

El siguiente capítulo tendrá como centro la descripción teórica y matemática de algunos de los observadores de estado no lineales más utilizados en bioprocesos.

3 Estimadores de estado en bioprocesos

"You cannot travel the path until you have become the path itself."
Siddharta Gautama (563 - 483 AC)

Una vez definido el modelo cibernético para crecimiento celular en cultivo anóxico, el siguiente paso es revisar los conceptos de observabilidad y observadores de estado y así tener las herramientas necesarias para establecer una metodología consistente que relacione el modelado cibernético y el diseño de observadores de estado.

La literatura actual sobre el tema de observadores es increíblemente extensa, particularmente para estimadores lineales, por tal motivo, se deja este tema al lector como consulta personal; el presente capítulo se centrará sólo en observabilidad y estimadores de tipo no lineal.

3.1 Criterios de observabilidad no lineal

La observabilidad es una propiedad importante que se debe considerar en el momento de diseñar un observador. Esta propiedad permite conocer si existen suficientes canales de información entre las salidas y el estado, tal que el estado pueda ser estimado a partir de las entradas y las salidas del sistema.

Considere el siguiente sistema dinámico:

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{x}}(t) = f(\mathbf{x}(t), \mathbf{u}(t)) \\ \mathbf{y}(t) = h(\mathbf{x}(t)) \end{cases} \quad (3.1)$$

donde $\mathbf{u}(t)$ denota las entradas, $\mathbf{x}(t)$ las variables de estado y $\mathbf{y}(t)$ las salidas (medidas). Asuma también que $\mathbf{x} \in R^n$, $\mathbf{u} \in R^m$, $\mathbf{y} \in R^p$.

En términos generales, un sistema no lineal es localmente observable si los estados iniciales \mathbf{x}_0 y \mathbf{x}'_0 son distinguibles para toda entrada $\mathbf{u}(t)$ en un tiempo $t \geq 0$, es decir,

$$h(\mathbf{x}(t, \mathbf{x}_0)) \neq h(\mathbf{x}(t, \mathbf{x}'_0)) \quad (3.2)$$

Este criterio puede verificarse desde tres perspectivas: La primera consiste en la aplicación de algoritmos lineales para el sistema previamente linealizado. En la segunda, se hace un cambio de coordenadas del sistema no lineal, se realiza el análisis correspondiente y se recuperan las coordenadas originales a través de una transformación inversa; a esta aproximación se le conoce en la literatura como *condición geométrica*. La tercera perspectiva es relativamente nueva y está contenida en el marco del álgebra diferencial, la cual recientemente ha demostrado ser una herramienta muy eficaz para el análisis de inversiones entrada-salida y realizaciones de observadores (Aguilar et al., 2010). A continuación se amplían estos conceptos:

3.1.1 Aproximación lineal

Considere el siguiente sistema linealizado:

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{x}}_L = \mathbf{A}(\mathbf{x}, \mathbf{u})\mathbf{x}_L \\ \mathbf{y}_L = \mathbf{H}(\mathbf{x})\mathbf{x}_L \end{cases} \quad (3.3)$$

Donde $\mathbf{A}(\mathbf{x}, \mathbf{u})$ y $\mathbf{H}(\mathbf{x})$ son los jacobianos de $f(\mathbf{x}(t), \mathbf{u}(t))$ y $h(\mathbf{x}(t))$ respectivamente. A partir de esta definición es posible generar una matriz de observabilidad $\mathbf{\Omega}$ de la forma:

$$\mathbf{\Omega} = [\mathbf{H}, \mathbf{H}\mathbf{A}, \mathbf{H}\mathbf{A}^2, \dots, \mathbf{H}\mathbf{A}^{n-1}]^T \quad (3.4)$$

El sistema será observable si la matriz $\mathbf{\Omega}$ es de rango completo (Bastin y Dochain, 1990).

3.1.2 Aproximación geométrica

Esta aproximación involucra una transformación difeomórfica del sistema no lineal en un sistema lineal equivalente mediante el uso de derivadas de Lie:

$$\boldsymbol{\varphi} = T(\mathbf{x}) = \begin{bmatrix} \mathbf{y} \\ \dot{\mathbf{y}} \\ \vdots \\ \mathbf{y}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} h(\mathbf{x}) \\ L_f h(\mathbf{x}) \\ \vdots \\ L_f^{n-1} h(\mathbf{x}) \end{bmatrix} \quad (3.5)$$

donde $L_f h(\mathbf{x})$ representa la derivada de Lie de $h(\mathbf{x})$ a lo largo del campo vectorial f , cuya expresión y sus derivadas sucesivas se expresan como:

$$L_f h(\mathbf{x}) = \frac{\partial \mathbf{y}}{\partial \mathbf{x}} f(\mathbf{x}) = \sum_{i=1}^n \frac{\partial \mathbf{y}}{\partial x_i} f_i(\mathbf{x}) \quad (3.6)$$

$$L_f^k h(\mathbf{x}) = \frac{\partial}{\partial \mathbf{x}} \left(L_f^{k-1} h(\mathbf{x}) \right) f(\mathbf{x})$$

Un sistema será localmente observable bajo la perspectiva geométrica si (Besançon, 2007):

$$\forall \mathbf{x}, \quad \dim \left. \frac{\partial}{\partial \mathbf{x}} \boldsymbol{\varphi} \right|_{\mathbf{x}} = n \quad (3.7)$$

3.1.3 Aproximación algebraica

Un estado \mathbf{x} es algebraicamente observable si satisface un polinomio diferencial en términos de \mathbf{u} , \mathbf{y} y algunas de sus derivadas, es decir:

$$P(\mathbf{x}, \mathbf{u}, \dot{\mathbf{u}}, \dots, \mathbf{y}, \dot{\mathbf{y}}, \dots) = 0 \quad (3.8)$$

Dicho de otra manera, un sistema es algebraicamente observable cuando cualquier variable del sistema (una variable de estado por ejemplo) puede ser expresada como función de las variables de entrada y salida y sus derivadas de orden finito (Aguilar et al., 2010).

3.2 Estimadores de estado convencionales

Una vez se ha probado la observabilidad del sistema, el siguiente paso es diseñar un observador de estado que estime el estado $\hat{\mathbf{x}}$ a partir de la medición de las entradas, las salidas y un modelo del proceso, tal cual lo ilustra la Figura 3-1.

En la literatura existe un número considerable de estimadores usados en múltiples aplicaciones, que van desde sistemas electromecánicos hasta biotecnológicos. A continuación, se describirán dos de los más utilizados a nivel biotecnológico que han probado ser efectivos: Filtro de Kalman extendido y observador asintótico. También se describirá un tipo de observador que, si bien no es nuevo, recién en los últimos años ha tenido gran despliegue y se ha hecho popular en sistemas químicos y biológicos: el observador por modos deslizantes.

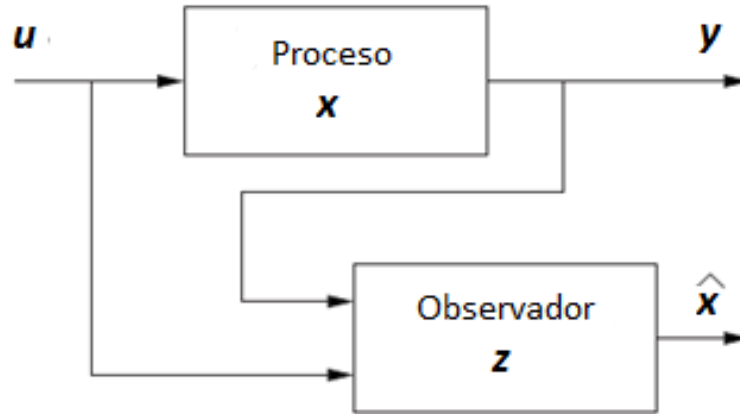


Figura 3-1 Esquema básico de un observador de estado

3.2.1 Filtro de Kalman Extendido (EKF)

El Filtro de Kalman es un estimador de estado que permite calcular el estado de un sistema dinámico lineal mediante mediciones que se relacionan linealmente con el estado, pero que están contaminadas con señales ruidosas. Este estimador es óptimo desde el punto de vista estocástico, ya que el estado estimado se obtiene de la solución de un problema cuadrático lineal (Grewal and Andrews, 2001). Las ecuaciones que rigen la dinámica del modelo de la planta para un Filtro de Kalman discreto son:

$$\begin{aligned} \mathbf{x}_k &= \mathbf{\Phi}_{k-1} \mathbf{x}_{k-1} + \mathbf{w}_{k-1} \\ \mathbf{z}_k &= \mathbf{H}_k \mathbf{x}_k + \mathbf{v}_k \end{aligned} \quad (3.9)$$

donde $\mathbf{x}_k \in R^n$ es el estado discreto; $\mathbf{\Phi}_k$ es la matriz de transición; $\mathbf{w}_k \in R^n$ es la incertidumbre de la planta; $\mathbf{z}_k \in R^p$ representa las mediciones de la planta; \mathbf{H}_k es la matriz de salida y $\mathbf{v}_k \in R^p$ es el ruido en la medición, con las propiedades $E[\mathbf{w}_k] = E[\mathbf{v}_k] = 0$, $E[\mathbf{w}_k \mathbf{w}_i^T] = \Delta_{k-1} \mathbf{Q}_k$, $E[\mathbf{v}_k \mathbf{v}_i^T] = \Delta_{k-1} \mathbf{R}_k$, $E[\mathbf{w}_k \mathbf{v}_k] = 0$; donde $E[\cdot]$ es el operador esperanza matemática; Δ_{k-1} es la función delta de Kroenecker y las matrices $\mathbf{Q}_k \in R^n$, $\mathbf{R}_k \in R^p$ son las matrices de covarianza del ruido de la planta y del ruido de la medición. El objetivo del Filtro de Kalman es estimar el vector de estado que minimice el error medio cuadrático con \mathbf{M} como matriz de ponderación:

$$E[\mathbf{x}_k - \hat{\mathbf{x}}_k]^T \mathbf{M} [\mathbf{x}_k - \hat{\mathbf{x}}_k] \quad (3.10)$$

La solución a este problema está dada por el algoritmo de la Figura 3-2:

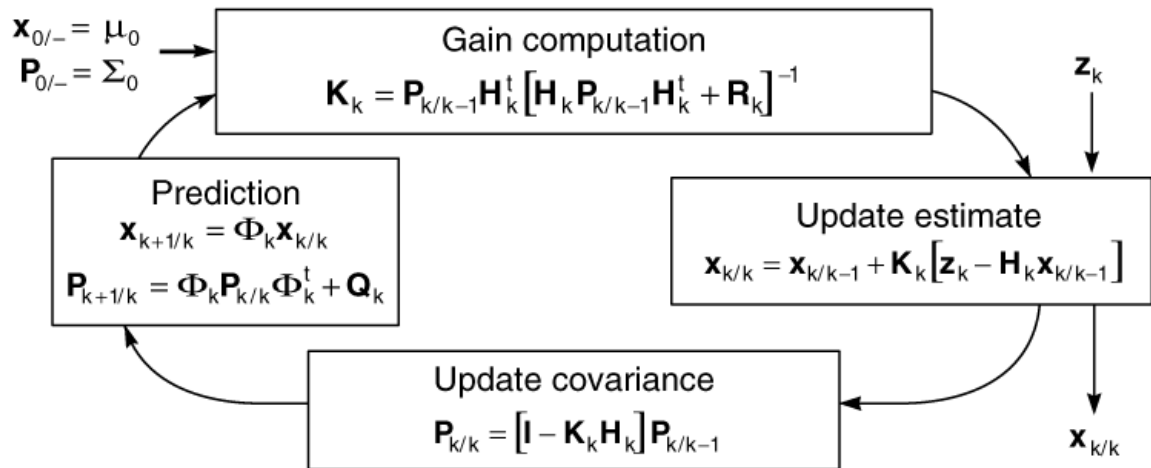


Figura 3-2 Algoritmo del Filtro de Kalman discreto

donde \mathbf{I} es la matriz identidad, \mathbf{P}_k es la matriz de covarianzas del error de estimación y \mathbf{K}_k es la matriz de ganancias del filtro.

Si bien este estimador ha mostrado ser efectivo en múltiples aplicaciones, existen dos inconvenientes comunes que deben ser tenidos en cuenta:

- Para algunos sistemas es posible conocer una trayectoria nominal con antelación (como por ejemplo, un vuelo con un plan predeterminado o un brazo robótico en una planta manufacturera). Pero para otros sistemas, no es posible saber de antemano la trayectoria (Simon, 2006).
- En sistemas no lineales, los términos de alto orden que se desprecian en la aproximación lineal tienen más peso. Al no tenerlos en cuenta, se producen errores de cálculo que, en últimas, generan una desviación entre la trayectoria real y la trayectoria nominal (Simon, 2006).

Por este motivo, para mejorar la estimación de $\hat{\mathbf{x}}$, se realiza la linealización alrededor de la trayectoria estimada y no de una trayectoria nominal; a esta aproximación se le conoce como Filtro de Kalman Extendido (EKF). El algoritmo para este filtro se muestra en la Figura 3-3:

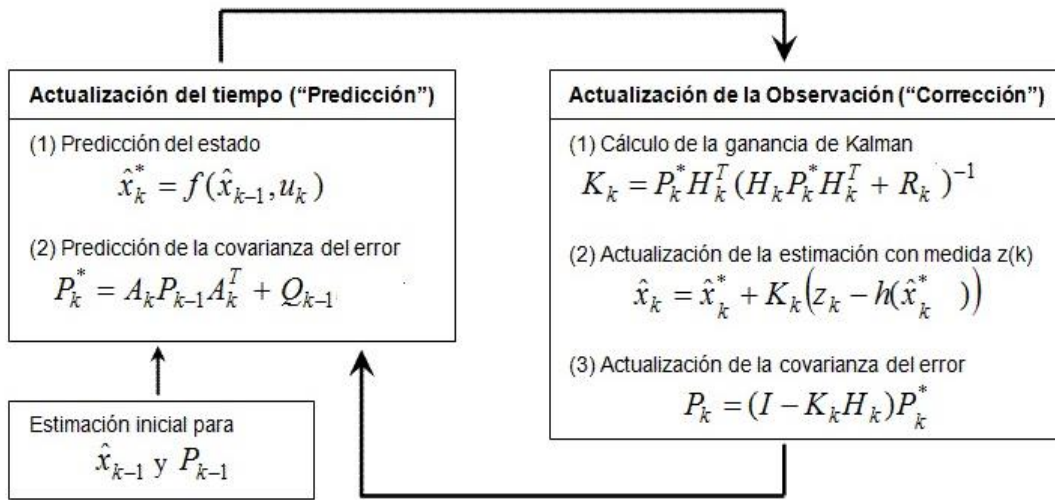


Figura 3-3 Algoritmo del Filtro de Kalman extendido discreto

donde \mathbf{A}_k es el jacobiano del sistema evaluado en $\hat{\mathbf{x}}$.

El EKF en tiempo continuo (en el cual se basará este trabajo) tiene como propósito encontrar la matriz de ganancias (\mathbf{K}) que minimice un índice de error de la forma:

$$\int_0^{\infty} \mathbf{e}(t)^T \mathbf{e}(t) dt \quad (3.11)$$

Y la solución a este problema viene dada por:

$$\begin{aligned} \dot{\hat{\mathbf{x}}} &= \mathbf{f}(\hat{\mathbf{x}}, u) + \mathbf{K}(\hat{\mathbf{x}})(\mathbf{y} - \mathbf{h}(\hat{\mathbf{x}})) \\ \dot{\mathbf{P}} &= \mathbf{A}(\hat{\mathbf{x}})\mathbf{P}(\hat{\mathbf{x}}) + \mathbf{P}(\hat{\mathbf{x}})\mathbf{A}(\hat{\mathbf{x}})^T - \mathbf{K}(\hat{\mathbf{x}})\mathbf{H}(\hat{\mathbf{x}})\mathbf{P}(\hat{\mathbf{x}}) + \mathbf{Q} \\ \mathbf{K} &= \mathbf{P}(\hat{\mathbf{x}})\mathbf{H}(\hat{\mathbf{x}})^T / (\mathbf{H}(\hat{\mathbf{x}})\mathbf{P}(\hat{\mathbf{x}})\mathbf{H}(\hat{\mathbf{x}})^T + \mathbf{R}) \end{aligned} \quad (3.12)$$

Donde $\mathbf{A}(\hat{\mathbf{x}})$ y $\mathbf{H}(\hat{\mathbf{x}})$ son los jacobianos del sistema expresado en la ecuación 3.1 evaluados en el estado estimado y $\mathbf{P}(\hat{\mathbf{x}})$ es una matriz simétrica que se obtiene en cada periodo de muestreo. A esta forma de solución también se le llama en la literatura Filtro de Kalman – Bucy.

3.2.2 Observador asintótico (AO)

Para el diseño de este observador se parte de la estructura de modelo en espacio de estados propuesta por Bastin y Dochain (1990):

$$\frac{d\xi}{dt} = \mathbf{K}\boldsymbol{\varphi}(\xi) - D\xi + \mathbf{F} - \mathbf{Q} \quad (3.13)$$

Donde ξ representa el vector de variables de estado; $\boldsymbol{\varphi}(\xi)$ el vector de cinéticas de reacción; \mathbf{K} es una matriz que contiene los coeficientes de producción; \mathbf{F} es el vector de entradas y \mathbf{Q} el de salidas gaseosas. Finalmente D [h^{-1}] es el factor de dilución calculado como el cociente entre el caudal de entrada y el volumen del reactor.

La idea del AO es utilizar la estructura del modelo bioquímico dinámico para generar un observador que sea independiente de la cinética, ya que en esta se encuentra la incertidumbre del modelo (Dochain, 2008). La estructura del observador se halla mediante balances de masa y energía, sin términos de retroalimentación del error; además, deben tenerse dos consideraciones en su diseño: Los coeficientes de producción (*yield coefficients*) deben ser conocidos y el número de variables de estado medidas debe ser igual o mayor al rango de la matriz de esos coeficientes (Dochain, 2008). En otras palabras, debe tenerse al menos un valor de salida por cada reacción involucrada en el modelo original.

Estableciendo las variables medidas como ξ_1 y las no medidas como ξ_2 , se realiza la siguiente partición del sistema:

$$\begin{aligned} \frac{d\xi_1}{dt} &= \mathbf{K}_1\boldsymbol{\varphi}(\xi) - D(\xi_1) + \mathbf{F}_1 - \mathbf{Q}_1 \\ \frac{d\xi_2}{dt} &= \mathbf{K}_2\boldsymbol{\varphi}(\xi) - D(\xi_2) + \mathbf{F}_2 - \mathbf{Q}_2 \end{aligned} \quad (3.14)$$

Además, tomando una transformación lineal $\mathbf{Z} = \xi_2 + \mathbf{K}_2\mathbf{K}_1^{-1}\xi_1$, tal que \mathbf{Z} que sea independiente de las cinéticas $\mathbf{r}(\xi)$, se obtiene la siguiente dinámica:

$$\frac{d\mathbf{Z}}{dt} = -D\mathbf{Z} - \mathbf{K}_2\mathbf{K}_1^{-1}(\mathbf{F}_1 - \mathbf{Q}_1) + \mathbf{F}_2 - \mathbf{Q}_2 \quad (3.15)$$

Con la cual se puede proponer un observador de la forma:

$$\frac{d\hat{\mathbf{Z}}}{dt} = -D\hat{\mathbf{Z}} - \mathbf{K}_2\mathbf{K}_1^{-1}(\mathbf{F}_1 - \mathbf{Q}_1) + \mathbf{F}_2 - \mathbf{Q}_2 \quad (3.16)$$

$$\hat{\xi}_2 = \hat{\mathbf{Z}} - \mathbf{K}_2\mathbf{K}_1^{-1}\xi_1$$

donde K_1 , F_1 , Q_1 , K_2 , F_2 y Q_2 corresponden a la partición que se mostró en la ecuación 3.14.

La dinámica del error $e = \hat{\xi}_2 - \xi_2$ converge asintóticamente según la ecuación $\frac{de}{dt} = -De$, la cual muestra que mientras mayor sea la tasa de dilución, mayor será la velocidad de convergencia del estimador (en términos de tiempo de establecimiento).

3.2.3 Observador por modos deslizantes (SMO)

En el primer observador, atribuido a Luenberger, la diferencia entre la salida de la planta y el observador se realimenta linealmente en el observador. Sin embargo, con la presencia de señales desconocidas o incertidumbres, un observador Luenberger suele ser: (a) incapaz de llevar el error de estimación de salida a cero y (b) los estados estimados no convergen a los estados del sistema. Un observador por modos deslizantes realiza la realimentación a través de un término de conmutación (*switching*) no lineal, lo cual ofrece una solución atractiva para este problema. Esta aproximación hace posible que el observador fuerce el error de estimación a cero en un tiempo finito, mientras que los estados estimados convergen asintóticamente a los estados del sistema (Shtessel et al., 2014).

Suponga un observador de la forma:

$$\begin{aligned}\dot{\hat{x}} &= f(\hat{x}, u) + \Phi(y - \hat{y}) \\ \hat{y} &= h(\hat{x})\end{aligned}\tag{3.17}$$

Asumiendo que el jacobiano de la matriz $h(\hat{x})$ existe y es de rango completo, el sistema de la ecuación 3.1 puede transformarse de la siguiente manera (Wang et al., 1997):

$$\begin{aligned}\dot{z} &= f^*(z, u) \\ y &= Cz\end{aligned}\tag{3.18}$$

donde $C = [I_p \ 0_{p \times (n-p)}]$, siendo I_p una matriz identidad de dimensiones $p \times p$, y 0 una matriz nula de dimensiones $p \times (n-p)$.

Usando la ecuación 3.18, se realiza la partición z^a para la(s) variable(s) medida(s) y z^b para la(s) variable(s) no medida(s):

$$\begin{aligned}z &= \begin{bmatrix} z^a \\ z^b \end{bmatrix} \\ z^a &= y\end{aligned}\tag{3.19}$$

Así, el observador de la ecuación 3.17 adquiere la forma:

$$\dot{\hat{\mathbf{z}}} = \mathbf{f}^*(\hat{\mathbf{z}}, \mathbf{u}) + \mathbf{K}(t)\boldsymbol{\sigma} \quad (3.20)$$

Donde \mathbf{K} es una matriz de ganancias variable en el tiempo y $\boldsymbol{\sigma}$ está dada por:

$$\boldsymbol{\sigma} = \begin{bmatrix} \text{sign}(y_1 - \hat{z}_1) \\ \text{sign}(y_2 - \hat{z}_2) \\ \vdots \\ \text{sign}(y_p - \hat{z}_p) \end{bmatrix} \quad (3.21)$$

Ahora, considere un sistema SISO de la forma:

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{x}} = \mathbf{f}(\mathbf{x}, \mathbf{u}) \\ \mathbf{y} = \mathbf{x}_1 \end{cases} \quad (3.22)$$

Puede obtenerse un observador deslizante como el descrito en la ecuación 3.17 usando \mathbf{x} en lugar de \mathbf{z} :

$$\begin{aligned} \dot{\hat{\mathbf{x}}}_1 &= f_1(\hat{\mathbf{x}}, \mathbf{u}) + k_1 \text{sign}(x_1 - \hat{x}_1) \\ \dot{\hat{\mathbf{x}}}_2 &= f_2(\hat{\mathbf{x}}, \mathbf{u}) + k_2 \text{sign}(x_1 - \hat{x}_1) \\ &\vdots \\ \dot{\hat{\mathbf{x}}}_n &= f_n(\hat{\mathbf{x}}, \mathbf{u}) + k_n \text{sign}(x_1 - \hat{x}_1) \end{aligned} \quad (3.23)$$

Sea $\tilde{x}_i = x_i - \hat{x}_i$, $i = 1, 2, \dots, n$. Así, la ecuación dinámica del error de estimación que se obtiene es:

$$\begin{aligned} \dot{\tilde{x}}_1 &= \Delta f_1 + \delta f_1 - k_1 \text{sign}(\tilde{x}_1) \\ \dot{\tilde{x}}_2 &= \Delta f_2 + \delta f_2 - k_2 \text{sign}(\tilde{x}_1) \\ &\vdots \\ \dot{\tilde{x}}_n &= \Delta f_n + \delta f_n - k_n \text{sign}(\tilde{x}_1) \end{aligned} \quad (3.24)$$

Donde $\Delta f_i = f_i(\mathbf{x}, \mathbf{u}) - f_i(\hat{\mathbf{x}}, \mathbf{u})$ y δf_i es el error de modelamiento debido a la desviación estructural.

Como puede apreciarse, esta dinámica es no lineal. Sin embargo, siguiendo el procedimiento descrito en Wang et al. (1997), es posible obtener una dinámica linealizada alrededor del estado estimado, mediante la cual se pueden encontrar las ganancias k_i del observador, de tal forma que el error de estimación en la variable medida tienda a cero en tiempo finito y que el error de estimación en las demás variables de estado sea asintóticamente estable.

3.3 Resumen

En este capítulo se hizo una breve revisión de los criterios de observabilidad no lineal y de tres tipos de observadores frecuentemente utilizados en la literatura. Una descripción más detallada de los diseños se puede consultar en las respectivas referencias citadas. Se destaca que los tres estimadores explicados son candidatos para modelos cibernéticos de bioprocesos descritos en el Capítulo 2, ya que consideran la incertidumbre (Filtro de Kalman), la estructura del modelo del bioproceso (Asintótico), o muestran robustez y convergencia en tiempo finito (Deslizante). Por lo tanto, en el capítulo siguiente se diseñarán este tipo de observadores y se compararán sus resultados.

4 Metodología para el diseño de observadores en modelos cibernéticos

“The art of discovering the causes of phenomena, or true hypothesis, is like the art of decyphering, in which an ingenious conjecture greatly shortens the road.”

Gottfried Wilhelm Leibniz (1646-1716)

En los Capítulos 1 a 3 se ha mostrado la forma de modelar bioprocesos con base en el enfoque cibernético y se han mostrado los principales estimadores que pueden servir en este tipo de aplicaciones. El presente capítulo retoma todo lo visto anteriormente y desarrolla los pilares fundamentales de esta investigación: el análisis de observabilidad del sistema cibernético y el diseño de observadores para estimar, no solo la biomasa, sino el estado completo (enzimas, sustratos y producto).

4.1 Propuesta para la aproximación de la función *max*

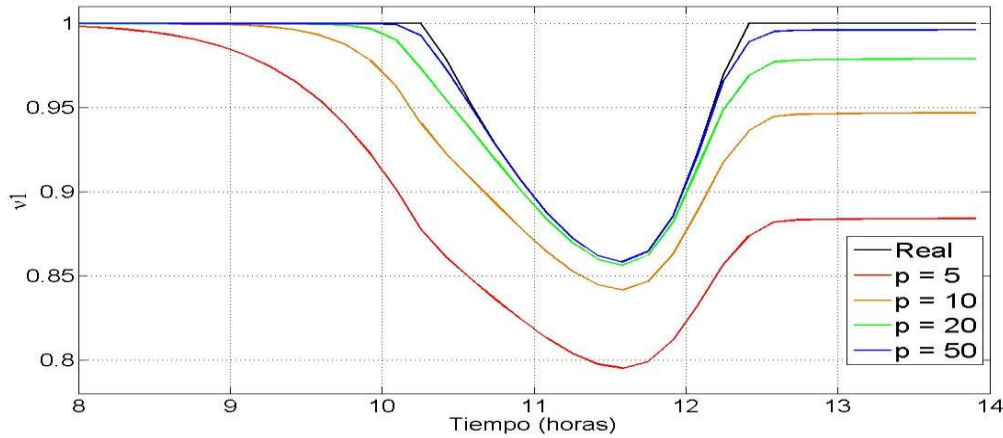
Para analizar la observabilidad de un sistema y diseñar observadores que involucren el jacobiano se requiere que el sistema sea diferenciable. Como se aprecia en el modelo cibernético expuesto en el Capítulo 2 (ecuaciones 2.12 a 2.16), la variable cibernética v_i contiene la función *max*. En tal caso, es necesario convertir dicha función en otra que haga al sistema continuamente diferenciable sin modificar sensiblemente la dinámica intrínseca del proceso. Una aproximación razonable consiste en cambiar la función *max* por la función vectorial p , definida como:

$$\|\vec{x}\|_p = \sqrt[p]{|x_1|^p + |x_2|^p + \dots + |x_n|^p} \quad (4.1)$$

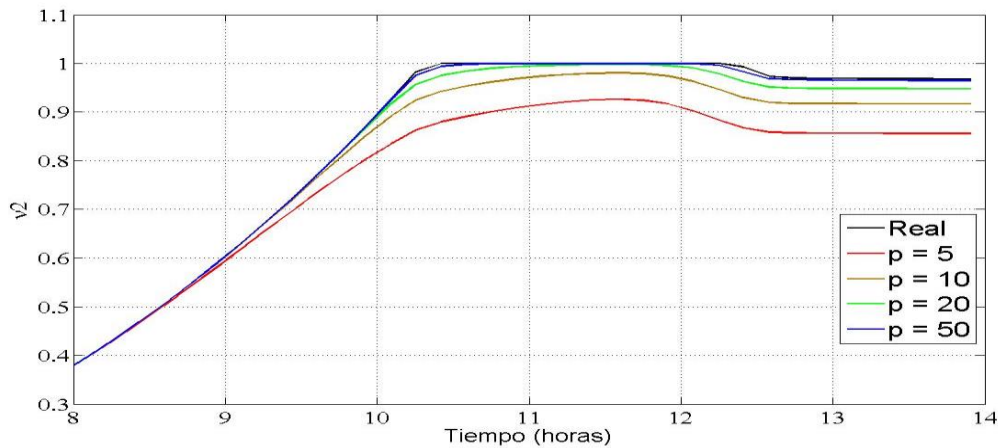
Aplicando esta aproximación, la variable cibernética v_i toma la forma:

$$v_i = \frac{\mu_i}{\sqrt[p]{|\mu_1|^p + |\mu_2|^p}} \quad (4.2)$$

Para probar esta aproximación, se simulan v_1 y v_2 para varios valores de p , obteniéndose el resultado de las Figuras 4-1 a y b:



(a)



(b)

Figura 4-1 Comportamiento de v en términos de p
 (a) Comportamiento de v_1 (b) Comportamiento de v_2

Como puede apreciarse, a medida que el valor de p aumenta, los valores de v_i convergen a los establecidos por el modelo cibernético original, por lo cual la aproximación propuesta es válida para el caso de aplicación.

4.2 Análisis de observabilidad local

Debido a la complejidad del sistema cibernético en términos de cantidad de dinámicas y a la alta no linealidad, los criterios geométrico y algebraico de la observabilidad no pueden ser aplicados (revisar Capítulo 3). El primero de ellos requiere el uso de derivadas de Lie, pero la evaluación de la matriz resultante tiene un gran costo computacional en cuanto a

tiempo de cálculo. El criterio algebraico tampoco puede aplicarse debido al entrecruzamiento de variables de grados múltiples. En vista de esto, en este trabajo se utilizó el criterio de aproximación lineal, también llamado “criterio de observabilidad exponencial” (Bastin y Dochain, 1990). Para ello, se considera la dinámica de error de observación típica:

$$\frac{de}{dt} = [A - KH]e \quad (4.3)$$

Esta forma particular indica que es posible asignar una velocidad de convergencia arbitraria siempre y cuando la matriz $[A - KH]$ sea Hurwitz. Si esta posibilidad existe, el sistema en cuestión se denomina “exponencialmente observable” (Bastin y Dochain, 1990) y eso puede evidenciarse si la matriz de la ecuación 3.4 es de rango completo. Es importante recalcar que esta es una condición necesaria mas no suficiente; aun así, es una herramienta de fácil aplicación que permite analizar sistemas con múltiples estados y alta no linealidad.

Para sistemas pequeños (dos o tres variables de estado), el análisis de observabilidad exponencial puede hacerse por inspección visual, pero en el caso del modelo cibernético expuesto, esta inspección no es posible, debido a la extensión del jacobiano. Por tal motivo, se propone evaluar el rango de la matriz de observabilidad lineal en el tiempo. Para este trabajo se asumirá como variable medida la concentración de CO₂ disuelto, sin tener en cuenta las demás especies acuosas que pueden presentarse en el equilibrio (H₂CO₃, HCO₃⁻).

Los resultados de observabilidad se ilustran en las Figuras 4-2 para el régimen continuo (a), régimen *fedbatch* (b) y régimen *batch* (c). Téngase presente que son seis variables de estado por estimar (X , e_1 , e_2 , S_1 , S_2 y P) y una única variable medida (C); por tanto, el rango esperado para la matriz de observabilidad es siete.

La Figura 4-2 muestra que el sistema cibernético no es exponencialmente observable cuando se toma el CO₂ como variable medida, ya que la matriz de observabilidad no es de rango completo (menor a siete) en ningún punto del proceso y bajo ningún régimen. La conclusión preliminar frente a este análisis es que la variable CO₂, a pesar de ser de fácil medición, no ofrece condiciones ideales para la observabilidad del sistema cibernético completo y, por tanto, es inadecuada su aplicación en un observador de tipo exponencial.

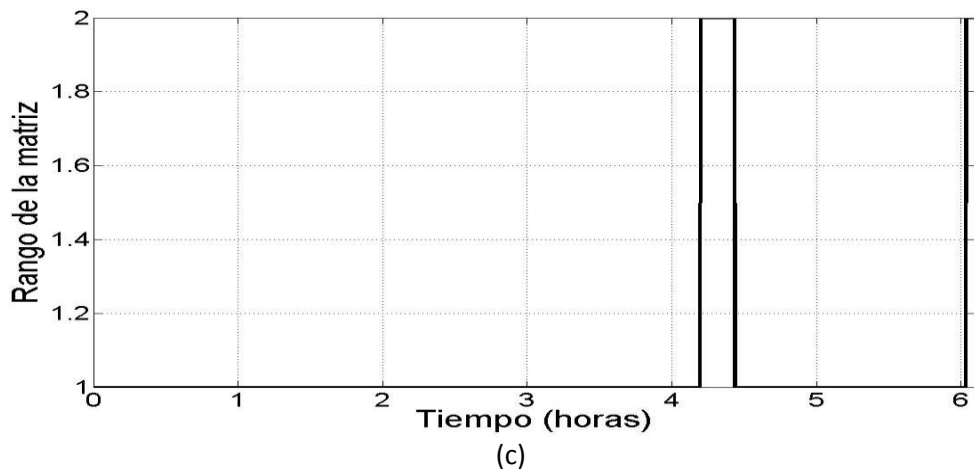
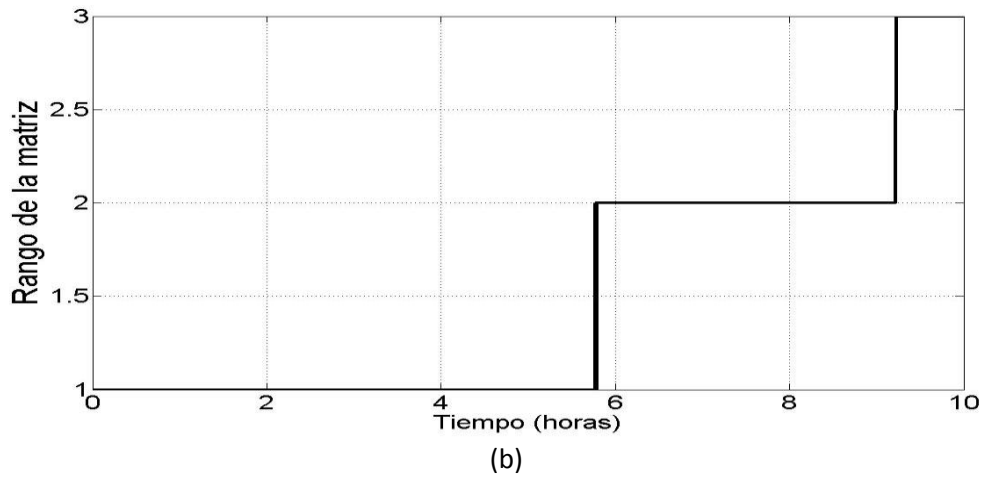
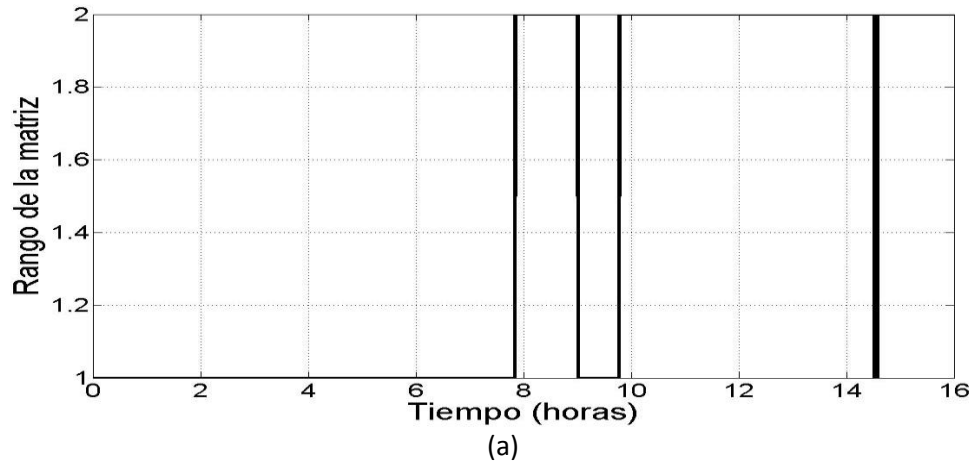


Figura 4-2 Rango de Ω usando la concentración de CO₂ como variable medida
(a) Continuo (b) Fedbatch (c) Batch

4.3 Propuesta de diseño de observadores para estimación de biomasa y producto

La conclusión derivada del análisis en la sección 4.2 conduce a pensar que la mejor opción para estimar el estado completo es emplear un observador que no considere la cinética del proceso, de tal forma que pueda usarse directamente la medición de CO_2 . El observador que cumple con esta condición es el asintótico, explicado en la sección 3.2.2. Llevando el sistema cibernético a la forma en espacio de estados de la ecuación 3.13 se obtiene:

$$\xi = \begin{bmatrix} X \\ e_1 \\ e_2 \\ S_1 \\ S_2 \\ P \\ C \end{bmatrix}; \quad \mathbf{F} = \begin{bmatrix} 0 \\ \alpha_1^* \\ \alpha_2^* \\ DS_{in1} \\ DS_{in2} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}; \quad \mathbf{Q} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ CTR \end{bmatrix}; \quad \boldsymbol{\varphi}(\xi) = \begin{bmatrix} v_1\mu_1 X \\ v_2\mu_2 X \\ (v_1\mu_1 + v_2\mu_2)e_1 \\ (v_1\mu_1 + v_2\mu_2)e_2 \\ \frac{\alpha_1 S_1}{K_1 + S_1} u_1 - \beta_1 e_1 \\ \frac{\alpha_2 S_2}{K_2 + S_2} u_2 - \beta_2 e_2 \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{K} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 1 \\ -\frac{1}{Y_{X/S1}} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -\frac{1}{Y_{X/S2}} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{\phi_1}{Y_{X/S1}} & \frac{\phi_2}{Y_{X/S2}} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{\phi_3}{Y_{X/S1}} & \frac{\phi_4}{Y_{X/S2}} & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}; \quad CTR = kla_c(C - C^*) \quad (4.4)$$

La variable \mathbf{C} (concentración de CO_2) no está presente en ninguna otra de las dinámicas del sistema (revisar ecuaciones 2.12 a 2.16), lo que la convierte en una variable inadecuada para la estimación de los estados del sistema, tal cual fue demostrado en la sección 4.2. Sin embargo, su dinámica es muy similar a las dinámicas de la biomasa y el etanol, de hecho, las tres comparten la sumatoria $\sum v_i \mu_i$. Este punto en común da lugar a un sistema reducido, según las consideraciones de la ecuación 3.14:

$$\xi_1 = [C] ; \xi_2 = \begin{bmatrix} X \\ P \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{K}_r = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ \frac{\phi_1}{Y_{X/S1}} & \frac{\phi_2}{Y_{X/S2}} \\ \frac{\phi_3}{Y_{X/S1}} & \frac{\phi_4}{Y_{X/S2}} \end{bmatrix} ; \mathbf{K}_{r1} = \begin{bmatrix} \phi_3 & \phi_4 \\ Y_{X/S1} & Y_{X/S2} \end{bmatrix} ; \mathbf{K}_{r2} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ \frac{\phi_1}{Y_{X/S1}} & \frac{\phi_2}{Y_{X/S2}} \end{bmatrix} \quad (4.5)$$

Como se puntualizó en la 3.2.2, una de las restricciones del diseño de observadores asintóticos es que la cantidad de estados medibles debe ser igual o mayor a la dimensión de la matriz de coeficientes \mathbf{K} . Para solucionar este inconveniente, se propone realizar el siguiente promedio de coeficientes en el sistema reducido:

$$\mathbf{K}_r = \begin{bmatrix} 1 \\ k_p \\ k_c \end{bmatrix} ; \mathbf{K}_{r1} = [k_c] ; \mathbf{K}_{r2} = \begin{bmatrix} 1 \\ k_p \end{bmatrix} \quad (4.6)$$

$$\text{donde: } k_c = \frac{\phi_3 + \phi_4}{Y_{X/S,1} + Y_{X/S,2}} ; k_p = \frac{\phi_1 + \phi_2}{Y_{X/S,1} + Y_{X/S,2}}$$

De esta manera, las ecuaciones que gobiernan el comportamiento del observador asintótico toman la forma:

$$\frac{d\hat{\mathbf{Z}}}{dt} = -D\hat{\mathbf{Z}} + \mathbf{K}_{r2}\mathbf{K}_{r1}^{-1}CTR ; \begin{bmatrix} \hat{X} \\ \hat{P} \end{bmatrix} = \hat{\mathbf{Z}} + \mathbf{K}_{r2}\mathbf{K}_{r1}^{-1}C \quad (4.7)$$

$$\hat{\mathbf{Z}} = [\hat{Z}_1, \hat{Z}_2]^T$$

Por lo tanto, es posible estimar \hat{X} y \hat{P} con la medición de C sin considerar la cinética.

Para realizar la simulación del AO en los tres regímenes y verificar su desempeño frente a señales ruidosas, se agregó ruido blanco a la señal de entrada, con una potencia de $2.0E-4$ y un tiempo de muestreo de 0.01. La Figura 4-3 ilustra la evolución de la señal de entrada con y sin ruido para el caso continuo:

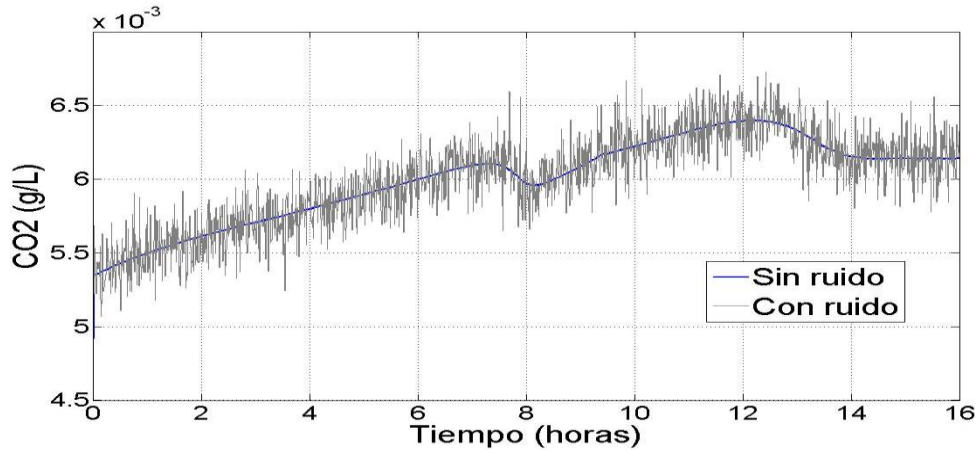


Figura 4-3 Medición de CO2 disuelto en régimen continuo

Los resultados de las simulaciones del observador asintótico se muestran en las Figuras 4-4 para el régimen continuo, 4-5 para el régimen *fedbatch* y 4-6 para el régimen *batch*. Para todas las simulaciones se tomó como condición inicial del observador un 10% por encima de la condición inicial del proceso ($\hat{X}_0 = 1.1X_0$).

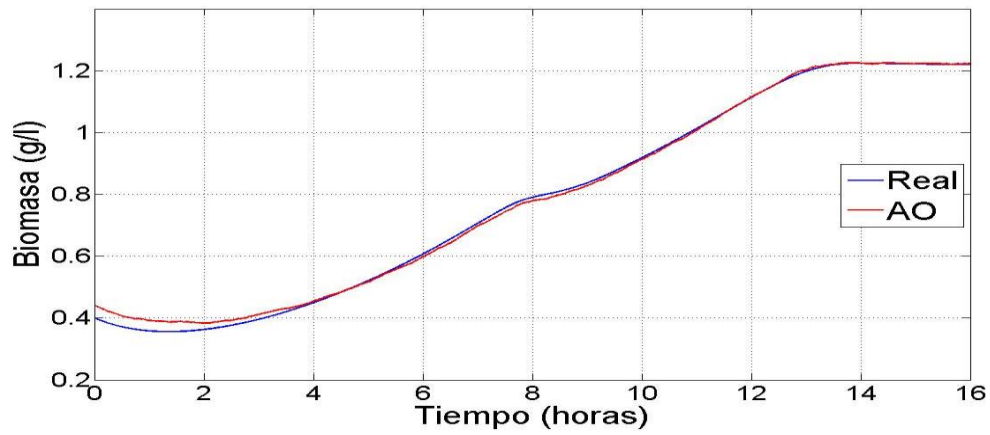


Figura 4-4 Estimación de biomasa con un AO en régimen continuo

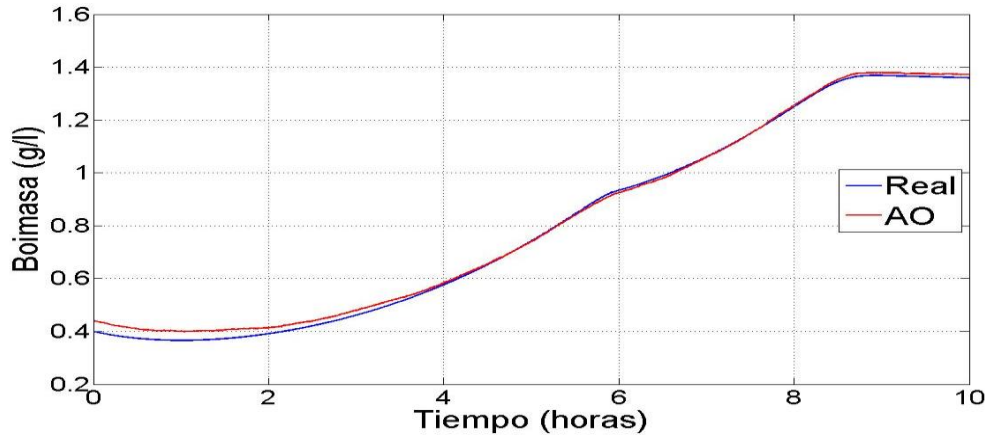


Figura 4-5 Estimación de biomasa con un AO en régimen *fedbatch*

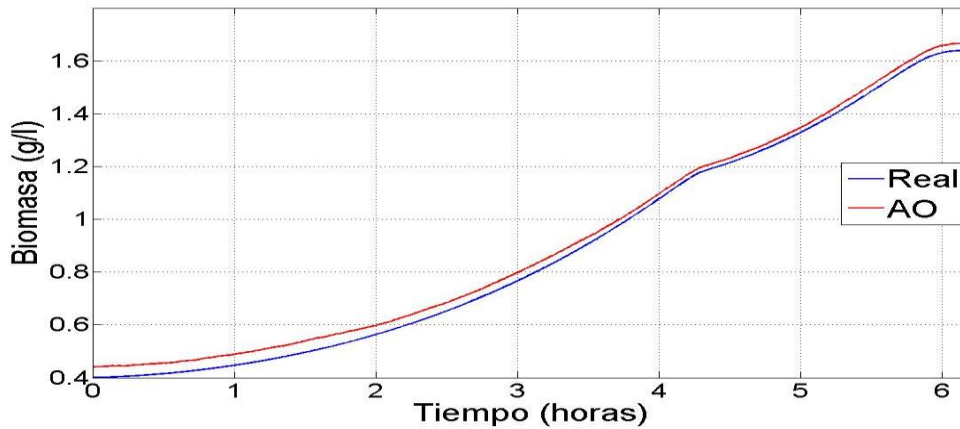


Figura 4-6 Estimación de biomasa con un AO en régimen *batch*

Como se aprecia en las Figuras 4-4 a 4-6, el observador asintótico sigue fielmente la trayectoria de la biomasa real, pero debe tenerse en cuenta que la velocidad de convergencia está dada por el valor de la tasa de dilución (ver sección 3.2.2); por tal motivo, en el régimen *batch*, donde la tasa de dilución es cero, el observador presenta error de estado estacionario y no converge al valor real de la biomasa. En continuo y *fedbatch* el observador converge aproximadamente a las cuatro horas después de iniciado el proceso. En vista de esto, para los análisis posteriores, el estado inicial del AO en régimen *batch* será idéntico al estado inicial del proceso. Aunque el AO no es un filtro, puede apreciarse también que filtra de buena manera el ruido de medición.

En cuanto a la estimación de producto (etanol), el desempeño es similar al mostrado por la biomasa estimada en todos los regímenes. A manera de ejemplo, la Figura 4-7 ilustra el comportamiento en régimen continuo:

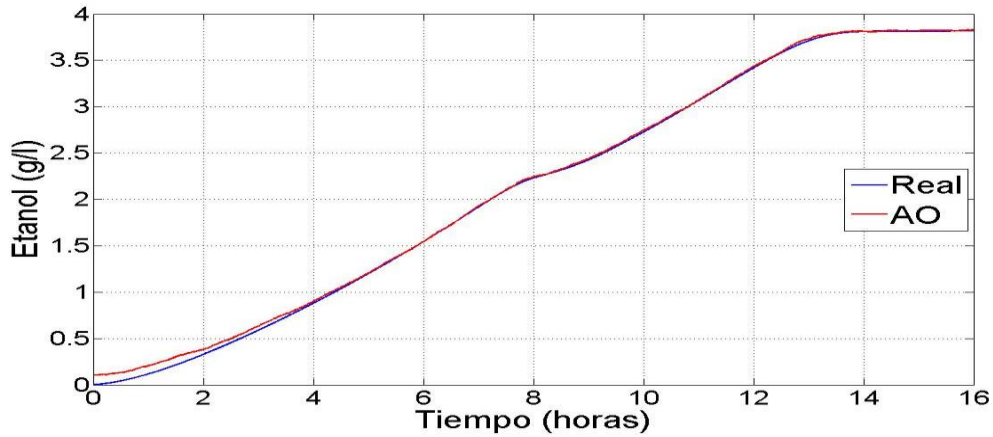


Figura 4-7 Estimación de etanol en régimen continuo

4.4 Propuesta de diseño de observadores para estimación del estado completo

Conociendo el buen desempeño del observador asintótico, la biomasa estimada puede ser utilizada como señal para alimentar otros observadores que permitan estimar las variables restantes que no pueden ser obtenidas directamente por el observador asintótico. La Figura 4-8 muestra el esquema propuesto, basado en la investigación de Botero (2010):

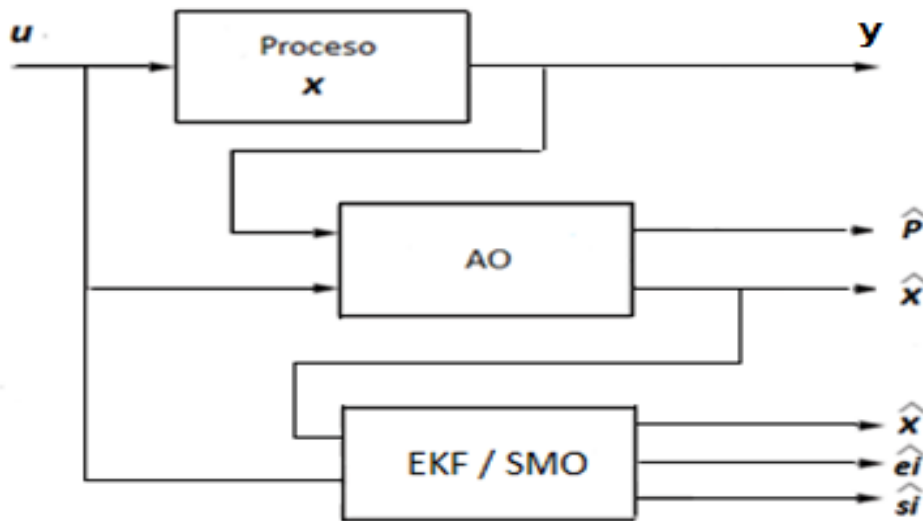


Figura 4-8 Diseño interconectado propuesto

Para comprobar la validez del esquema propuesto y esbozado en la Figura 4-8, se realiza el mismo análisis de observabilidad explicado en la sección 4.2, tomando la variable biomasa como variable medida. Excluyendo las dinámicas de CO₂ y etanol, la matriz de observabilidad debe ser de rango cinco (biomasa, dos enzimas y dos sustratos) para que el sistema sea completamente observable. Al graficar el rango de la matriz de observabilidad lineal a través del tiempo, se obtiene efectivamente un valor constante de cinco, sin importar el régimen en el que se realice el proceso. La Figura 4-9 evidencia este resultado en régimen continuo:

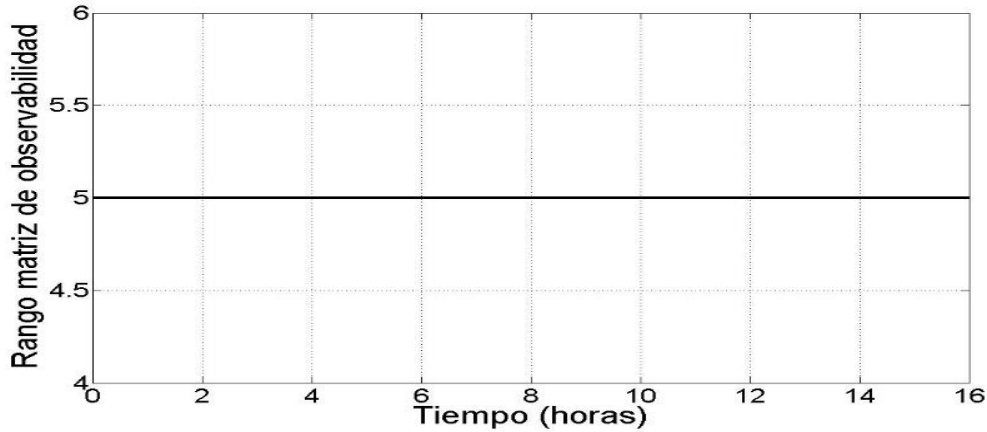


Figura 4-9 Rango de la matriz de observabilidad lineal usando \hat{X}

Una vez se ha comprobado la observabilidad del sistema usando la biomasa estimada, se procede al diseño de los observadores bajo el esquema interconectado. Los detalles se muestran a continuación:

4.4.1 Diseño del Filtro de Kalman extendido

Para aplicar la versión continua del EKF (ecuación 3.12), el jacobiano $\mathbf{A}(\hat{x})$ se evaluará con la aproximación de la función *max* propuesta en la sección 4.1, con $p = 50$. El jacobiano $\mathbf{H}(\hat{x})$ está dado por:

$$\mathbf{H}(\hat{x}) = \frac{\partial h}{\partial x} = [1 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0] \quad (4.8)$$

Generalmente, la ganancia del EKF se ajusta por medio de la información de las incertidumbres (matrices de covarianza); sin embargo, en este caso no es posible, debido a que las incertidumbres son desconocidas. Por tal motivo, se harán las siguientes consideraciones:

- El error de medición de la señal de biomasa ($v(t)$) será considerado igual al error de la señal de CO₂, aunque este valor puede ser menor, debido a que parte del ruido original es filtrado por el AO, como se dijo anteriormente. Esto asegura que el EKF tenga una velocidad de convergencia razonable.
- La incertidumbre de la planta ($w(t)$) se da en las entradas de sustrato en los regímenes continuo y *fedbatch*, por tal motivo, solo se sumará ruido a las dinámicas de la glucosa y de la galactosa en ambos casos; dicho ruido se considerará blanco con potencia 0.1 y periodo de muestreo de 0.01.
- Las matrices de covarianza R y Q tendrán la forma:

$$R = v^2(t) \ ; \ Q = \text{diag}(0, 0, 0, w^2(t), w^2(t)) \quad (4.9)$$

4.4.2 Diseño del Observador por modos deslizantes

Puesto que solo se tiene una única salida medible, es posible aplicar el modelo descrito por las ecuaciones 3.22 a 3.24, haciendo $x_1 = \hat{X}$. La obtención de las ganancias del observador deslizante se realizó según el procedimiento descrito en Wang et al. (1997), en el cual se asigna una dinámica deseada a las $n-1$ variables de estado no medidas.

4.5 Análisis

A continuación se muestran los resultados obtenidos de las simulaciones utilizando el esquema interconectado presentado en la Figura 4-8, discriminados para cada régimen. Adicionalmente, se calculó la Integral del valor Absoluto del Error (IAE) como índice de desempeño para el AO-EKF y el AO-SMO.

$$IAE = \int_0^{\infty} |e(t)| dt \quad (4.10)$$

El horizonte de tiempo del IAE se tomó como el tiempo de estabilización de la producción de biomasa: 16 horas en continuo, 9 horas en *fedbatch* y 6 horas en *batch*. Para la estimación de las enzimas y sustratos, se tomó como condición inicial del EKF y el SMO la misma del proceso, con el fin de disminuir la acumulación del error de estimación desde el observador asintótico.

4.5.1 Régimen continuo

La Figura 4-10 muestra el comportamiento de los tres estimadores en la estimación de la biomasa. La condición inicial del AO se mantuvo en un 10% por encima del valor inicial del proceso.

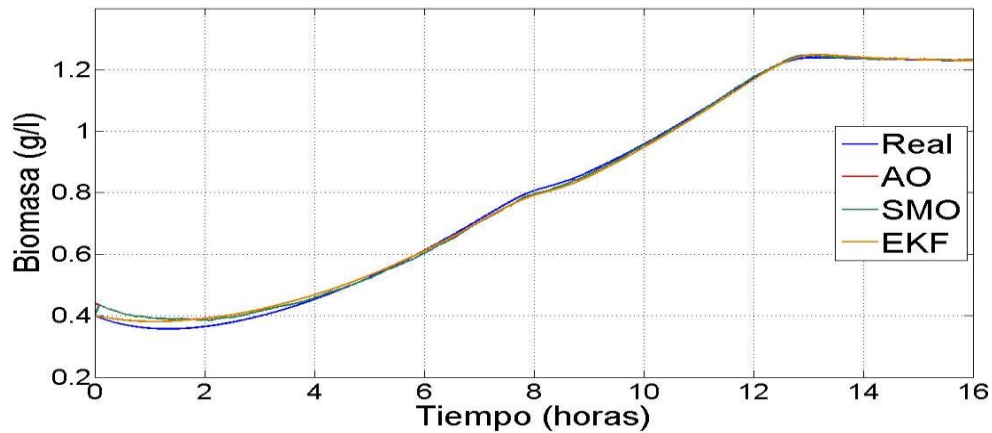


Figura 4-10 Estimación de biomasa en régimen continuo

En las Figuras 4-11 a 4-14 se evidencia el desempeño del AO-EKF y el AO-SMO en la estimación de las enzimas y los sustratos.

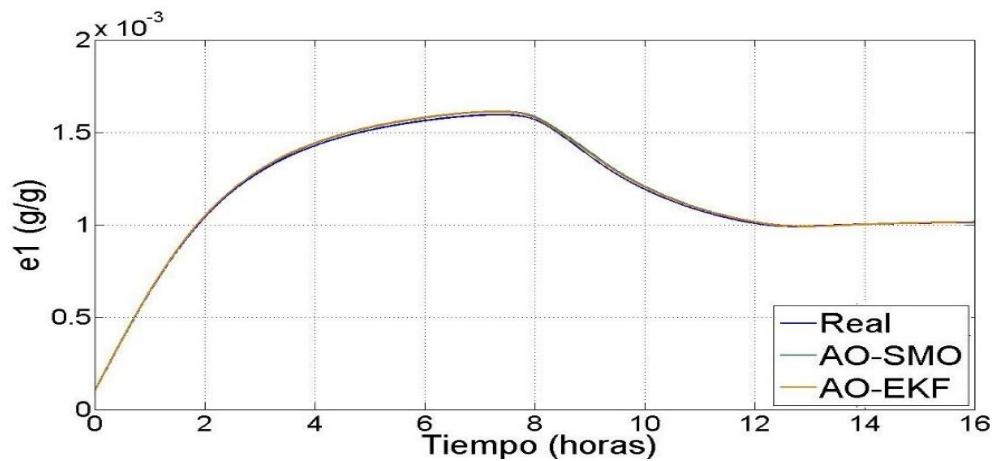


Figura 4-11 Estimación de enzima 1 en régimen continuo

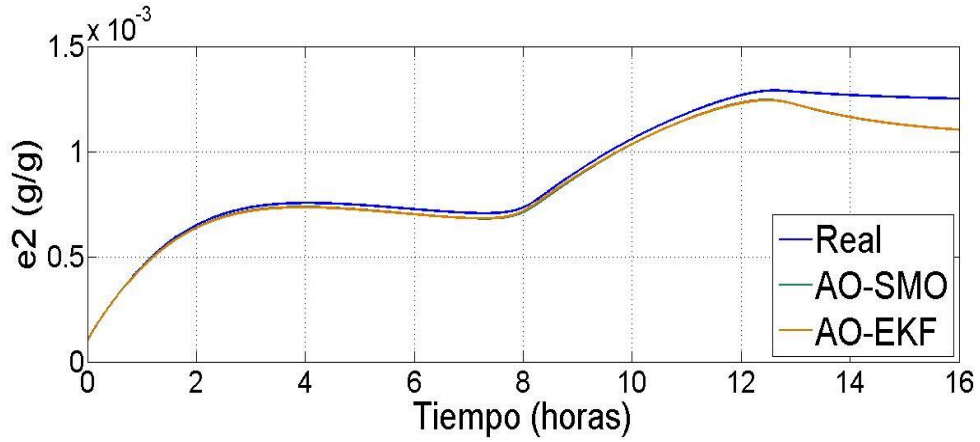


Figura 4-12 Estimación de enzima 2 en régimen continuo

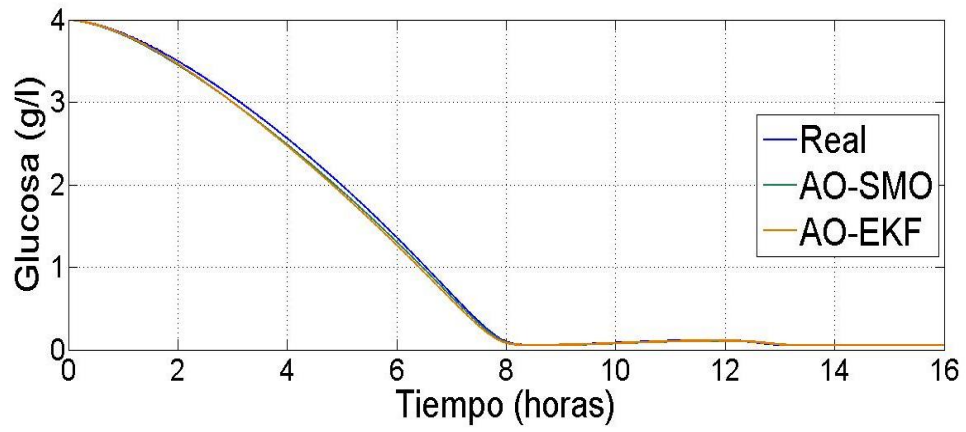


Figura 4-13 Estimación de Glucosa en régimen continuo

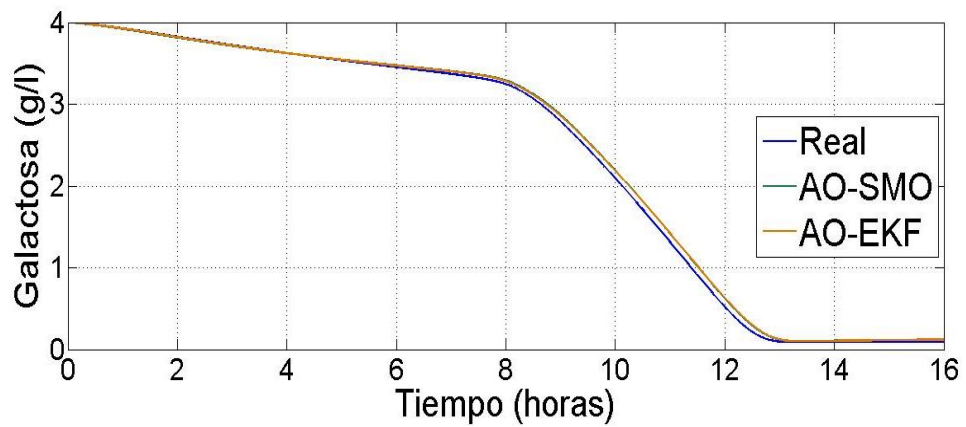


Figura 4-14 Estimación de Galactosa en régimen continuo

Como se aprecia en las figuras, el desempeño del AO-EKF y del AO-SMO es casi idéntico y la estimación es en general satisfactoria. Al analizar la estimación de biomasa, se evidencia una pequeña desviación en la zona de conmutación donde se agota el primer sustrato (Glucosa) e inicia el consumo acelerado del segundo (Galactosa); esta desviación se hace notoria en la evolución de la estimación de la Enzima 2 y la Galactosa. Recuérdese que es en esta zona donde la variable cibernética v_i cambia drásticamente de valor y, aunque la aproximación de la función *max* ha probado ser válida, hay un pequeño desfase que induce un error en la estimación posterior a esa zona. Finalmente, se aprecia una desviación considerable en la estimación de la Enzima 2 (Figura 4-12) cerca de la doceava hora; nuevamente esto es debido al cambio súbito de la variable v_i cuando se agota el segundo sustrato.

La Tabla 4-1 compara los valores del IAE para el AO-EKF y el AO-SMO. En ella se evidencia la gran similitud en el comportamiento de ambos estimadores:

Tabla 4-1 IAE del error de estimación en régimen continuo

Variable estimada	AO-EKF	AO-SMO
Enzima 1 ($e_1 - \hat{e}_1$)	1,433e-4	1,583e-4
Enzima 2 ($e_2 - \hat{e}_2$)	6,306e-4	6,292e-4
Glucosa ($S_1 - \hat{S}_1$)	0,5031	0,3903
Galactosa ($S_2 - \hat{S}_2$)	0,5530	0,5935

4.5.2 Régimen *fedbatch*

La Figura 4-15 muestra el comportamiento de los tres estimadores en la estimación de la biomasa, mientras que la estimación de las enzimas y los sustratos se ilustra en las Figuras 4-16 a 4-19.

El comportamiento de los estimadores en este régimen es muy similar al mostrado en el régimen continuo. Se evidencian igualmente desviaciones de los estimadores en la zona de conmutación, pero en términos generales, la estimación es satisfactoria.

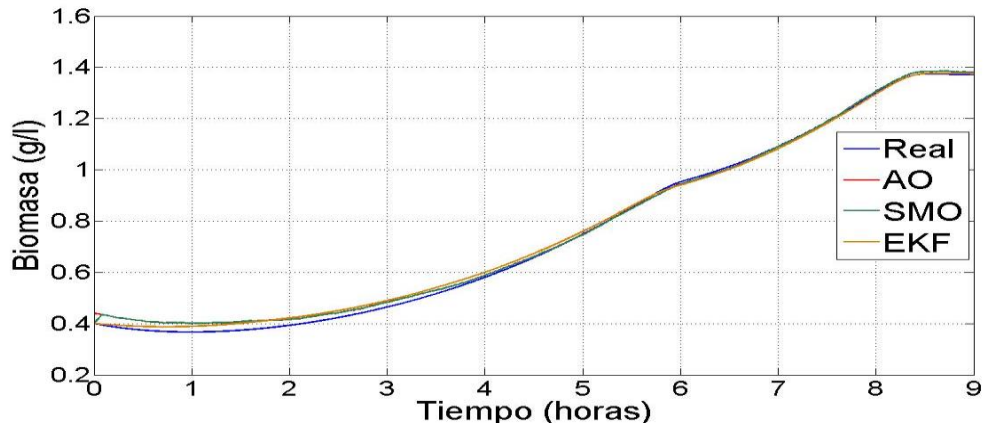


Figura 4-15 Estimación de biomasa en régimen *fedbatch*

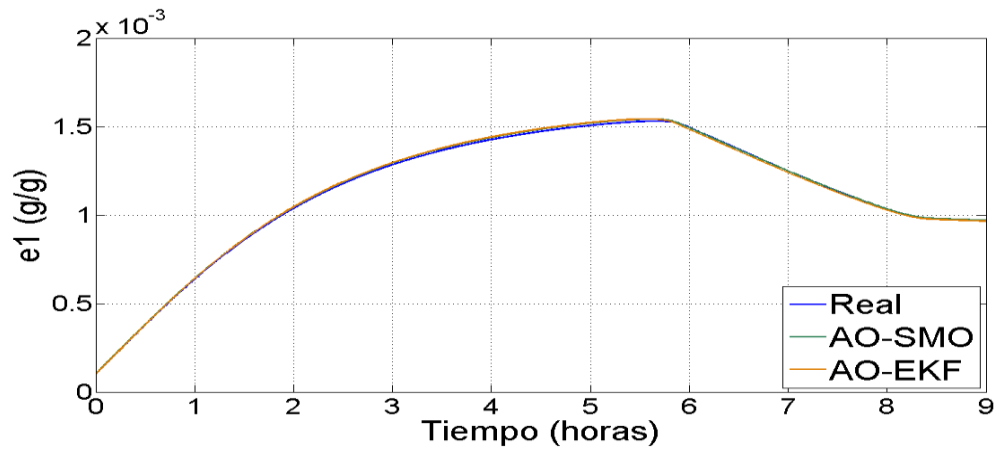


Figura 4-16 Estimación de Enzima 1 en régimen *fedbatch*

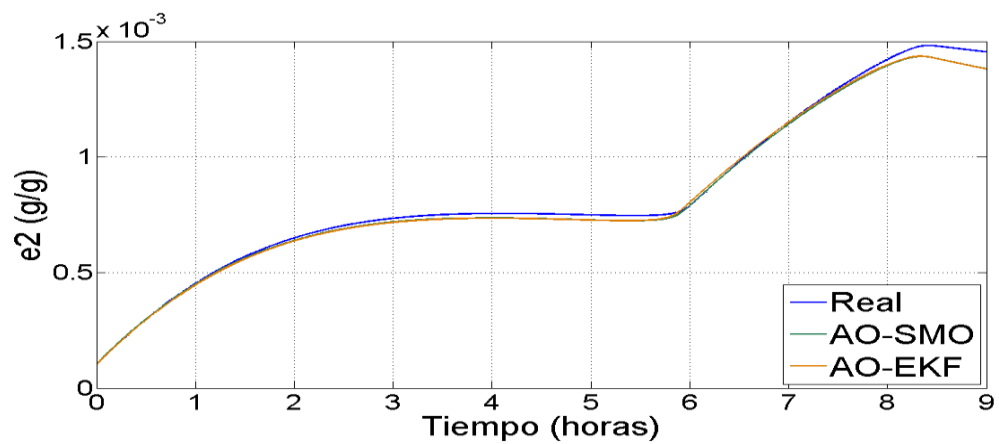


Figura 4-17 Estimación de Enzima 2 en régimen *fedbatch*

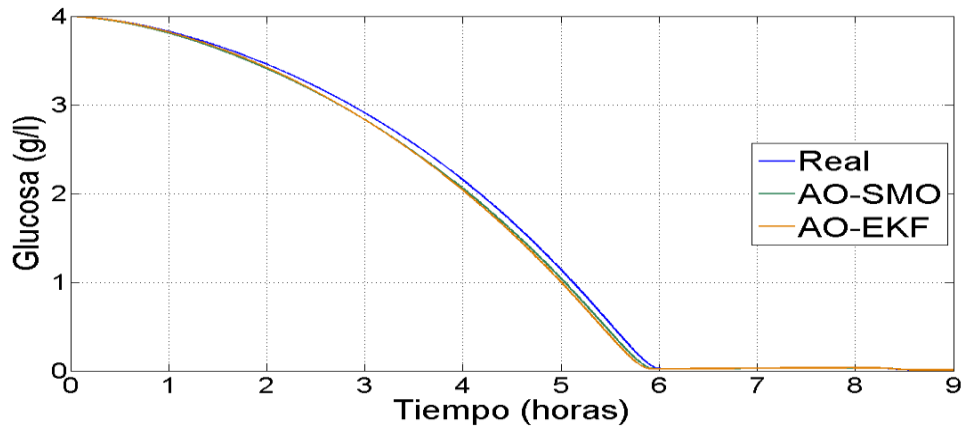


Figura 4-18 Estimación de Glucosa en régimen *fedbatch*

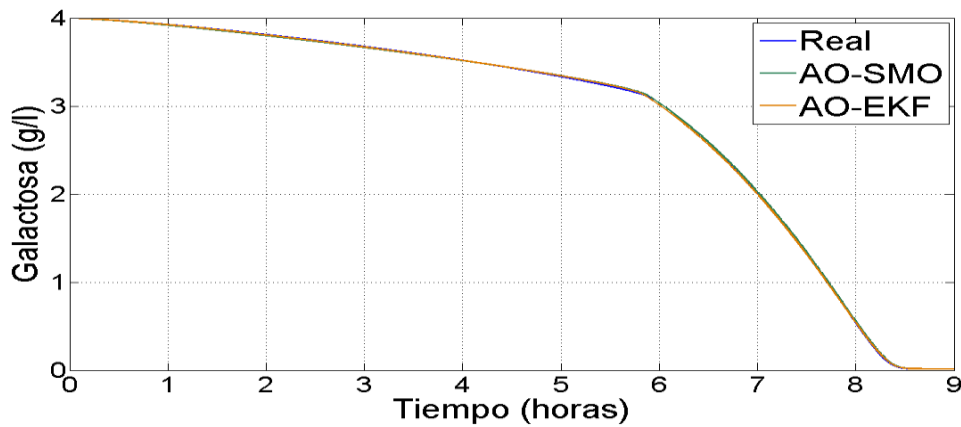


Figura 4-19 Estimación de Galactosa en régimen *fedbatch*

Comparado con el régimen continuo, en el régimen *fedbatch* se nota una mejoría significativa en la estimación de la Galactosa, como lo demuestra los resultados de la Tabla 4-2:

Tabla 4-2 IAE del error de estimación en régimen *fedbatch*.

Variable estimada	AO-EKF	AO-SMO
Enzima 1 ($e_1 - \hat{e}_1$)	7,993e-5	5,442e-5
Enzima 2 ($e_2 - \hat{e}_2$)	1,578e-4	1,497e-4
Glucosa ($S_1 - \hat{S}_1$)	0,4295	0,3753
Galactosa ($S_2 - \hat{S}_2$)	0,06429	0,0805

4.5.3 Régimen batch

Por último, se realiza la estimación en régimen *batch*. Los resultados pueden verse en las Figuras 4-20 a 4-23. Nuevamente se anota que la condición inicial del observador asintótico es la misma que la de la planta, con el propósito de disminuir el error de estado estacionario debido a la inexistencia de la tasa de dilución (ver Figura 4-6).

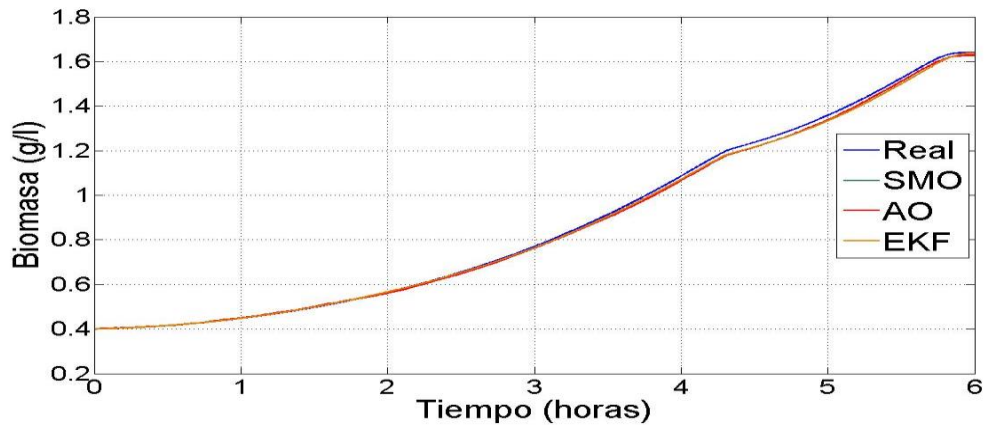


Figura 4-20 Estimación de biomasa en régimen *batch*

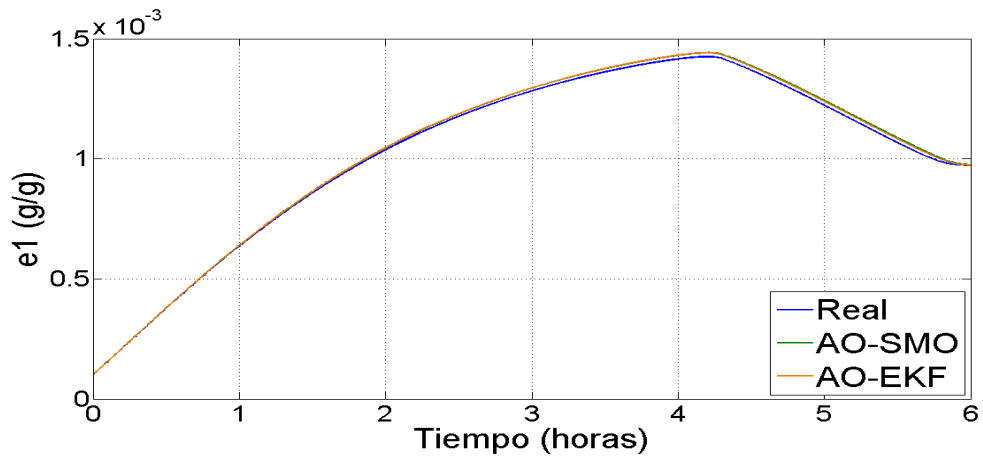
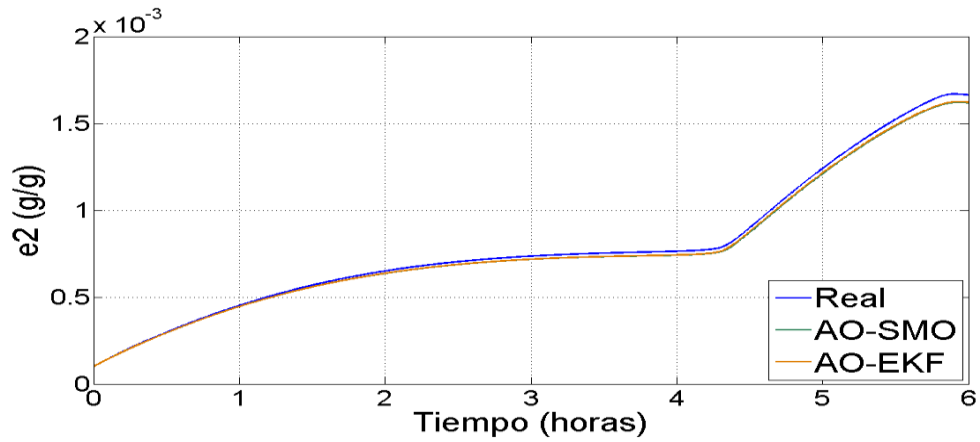
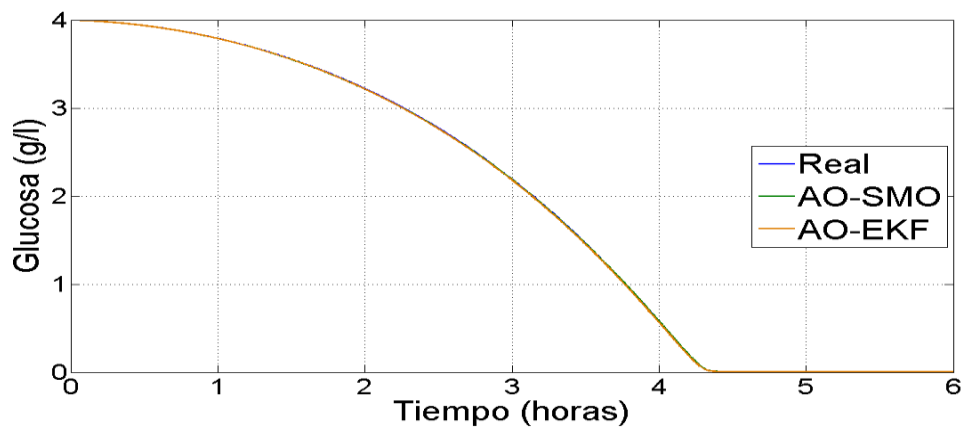
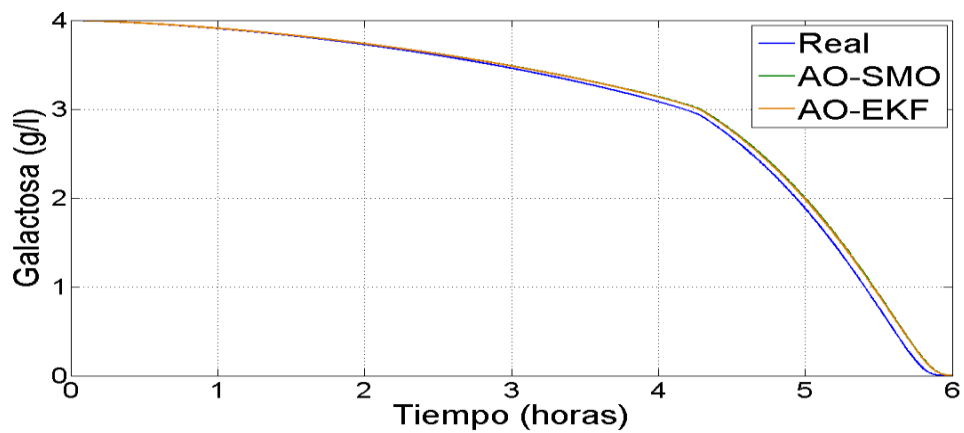


Figura 4-21 Estimación de Enzima 1 en régimen *batch*

Figura 4-22 Estimación de Enzima 2 en régimen *batch*Figura 4-23 Estimación de Glucosa en régimen *batch*Figura 4-24 Estimación de Galactosa en régimen *batch*

De nuevo se aprecia un comportamiento satisfactorio, aun cuando en este tipo de procesos *batch*, es usual encontrar baja convergencia, debido a la anulación de entradas que estimulan las dinámicas del estimador. La Tabla 4-3 contiene los cálculos de error para cada estimador en este régimen.

Tabla 4-3 IAE del error de estimación en régimen *batch*

Variable estimada	AO-EKF	AO-SMO
Enzima 1 ($e_1 - \hat{e}_1$)	5,972e-5	6,516e-5
Enzima 2 ($e_2 - \hat{e}_2$)	1,152e-4	1,249e-4
Glucosa ($S_1 - \hat{S}_1$)	0,02469	0,01336
Galactosa ($S_2 - \hat{S}_2$)	0,2415	0,2643

4.6 Resumen

En este capítulo se hizo la exposición detallada de una metodología para analizar la observabilidad del sistema cibernético, a través de la modificación matemática del parámetro ν_i y la aplicación del criterio de observabilidad exponencial. Por otro lado, se propuso un esquema interconectado de estimación, en donde un observador asintótico, que estima biomasa y producto, alimenta dos estimadores en paralelo que estiman las enzimas y sustratos. Los resultados mostraron ser satisfactorios en todos los regímenes (continuo, *fedbatch* y *batch*), aunque es notoria una pequeña desviación en la estimación en la zona de conmutación donde se agota el primera sustrato (Glucosa) y comienza el consumo acelerado del segundo (Galactosa). Como medida cuantitativa del desempeño de los estimadores se usó la Integral del valor Absoluto del Error (IAE)

5 Conclusiones y trabajos futuros

5.1 Conclusiones

- En este trabajo se realizó una revisión de los modelos cibernéticos y sus características principales frente a otros modelos propuestos en la literatura. Si bien se ha comprobado la validez experimental de estos modelos, se notó una deficiencia en la utilización de observadores de estado. Esto puede deberse a las dificultades que presenta el modelo en cuanto a la función *max* que gobierna sus dinámicas.
- En esta investigación se encontró una función matemática que permite convertir la función *max* de la variable cibernética de regulación v_i sin afectar sensiblemente la dinámica intrínseca del proceso cibernético original. Este resultado permitió, por un lado, calcular el rango de la matriz de observabilidad del sistema linealizado y, por el otro, utilizar un filtro de Kalman extendido y un observador por modos deslizantes que tienen dentro de sus algoritmos el cálculo del jacobiano del sistema.
- A partir del análisis de observabilidad, se evidenció que la variable CO_2 no es adecuada para estimar todos los estados del sistema cibernético, pero sí puede emplearse para estimar la biomasa y el etanol por medio de un observador asintótico de orden reducido. Para el diseño de este observador, se propuso una aproximación matemática para reducir el rango de la matriz de coeficientes de producción.
- El observador asintótico diseñado estima correctamente la biomasa y el etanol, pero en régimen *batch* debe iniciarse cerca a la condición inicial del sistema original, para evitar que el error de estado estacionario genere desviaciones importantes.
- Se propuso un esquema interconectado de estimación, en el cual un observador asintótico, que estima biomasa y producto, alimenta dos estimadores en paralelo, que estiman las enzimas y los sustratos. Los resultados de simulación con este esquema fueron satisfactorios en todos los regímenes (continuo, *fedbatch* y *batch*), ya que se logra la estimación de todas las variables, aunque se presenta una pequeña desviación en la estimación en la zona de conmutación donde se agota el primera sustrato (Glucosa) y comienza el consumo acelerado del segundo sustrato (Galactosa). Como medida cuantitativa del desempeño de los estimadores se usó la

Integral del valor Absoluto del Error (IAE), la cual permitió diferenciar el desempeño de los observadores de mejor manera que los resultados gráficos.

- En teoría, es posible mejorar la convergencia del observador asintótico al valor real de biomasa aumentando la tasa de dilución. Sin embargo, bajo las condiciones descritas en el presente trabajo no es posible, ya que esto llevaría al lavado (*washout*) del cultivo.
- En el diseño de observadores asintóticos es fundamental tener valores ajustados de los parámetros y coeficientes estequiométricos de producción, ya que la dinámica de dichos observadores es totalmente dependiente de ellos, al no existir términos de realimentación ni participación de la cinética.

5.2 Trabajos futuros

- Estudiar la inclusión de la dinámica de oxígeno disuelto y cómo ella afecta la observabilidad y el diseño de observadores.
- Extender el modelo del bioreactor para incluir más sustratos y evaluar el desempeño de los observadores en crecimiento poliáuxico.
- Analizar la dinámica de metabolitos secundarios como antibióticos, toxinas y alcaloides.
- Analizar la dinámica del CO₂ en solución bajo la óptica del equilibrio acuoso. Este análisis podría dar lugar a incluir el pH como variable de medición.

Bibliografía

Aguilar, R., Mata, J. and Martínez, R. (2010). On the observability for a class of nonlinear (Bio)chemical Systems. *International journal of chemical reactor engineering*, 8.

Alcón, A. (1999). *Desarrollo de Modelos Cinéticos para Bioprocesos: Aplicación a la producción de Xantano*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Ingeniería Química. Madrid.

Bastin, G. and Dochain, D. (1990). On-line estimation and adaptive control of bioreactors. *Elsevier Science Publishing*. Amsterdam.

Bendtsen, A. (2000). Exhaust gas monitoring of fermentation processes. *Innovations in pharmaceutical technology*, pp. 84-87.

Besançon, G. (2007). *Nonlinear Observers and Applications*. Springer. Berlín.

Biagiola, S. and Figueroa, J. L. (2004). A high gain nonlinear observer: Application to the control of an unstable nonlinear process. *Computers and chemical engineering*, Elsevier, ISSN 0098-1354.

Botero, H. A. (2010). Formalismo para la síntesis de sensores virtuales basados en un modelo maestro de base fenomenológica (tesis doctoral). Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia. Medellín.

Conicet (2014). Reactores químicos y biológicos (en línea). Universidad Nacional del Sur. Disponible en: <http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/>

De Assis, A. and Maciel, R. (2000). Soft sensors development for on-line bioreactor state estimation. *Computers & Chemical Engineering*, 24, pp. 1099-1103.

Di Serio, M., De Alteriis, E., Parascandola, P. and Santacesaria, E. (2001). A general kinetic and mass transfer model to simulate the baker's yeast growth in bioreactors. *Catalysis today*, 66, pp. 437 – 445.

Dochain, D. (2003) State and parameter estimation in chemical and biochemical processes: a Tutorial. *Journal of process control*, 13, pp. 801-818.

Dochain, D. (2008). *Automatic control of bioprocesses*. John Wiley & Sons, USA.

Egli, T., Lendermann, U. and Snozzi, Mario. (1993). Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63, pp. 289-298.

Egli T. and Zinn, M. (2003). The concept of multiple-nutrient-limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. *Biotechnology advances*, 22, pp. 35 – 43.

Fogler, H. (1999). *Elements of chemical reaction engineering 3rd ed.*, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Grewal, M. and Andrews, A. (2001). *Kalman Filtering: Theory and practice using Matlab*. John Wiley & Sons Inc. New York.

Jones, K. D. and Kompala, D.S. (1999). Cybernetic model of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures. *Journal of Biotechnology*, 71, pp. 105–131.

Kompala, D. (2013). Bioprocess Engineering: Fundamentals and Applications [online]. University of Colorado, [date of reference June 16 th of 2014], section 7.3, Microbial growth on multiple substrates. Available at <http://www.umich.edu/~elements/07chap/html/kompala.pdf>

Kompala, D., Ramkrishna, D. and Tsao, G. (1984). Cybernetic modeling of microbial growth on multiple substrates. *Biotechnology and bioengineering*, 26, pp. 1272-1281.

Kompala, D., Ramkrishna, D., Jensen, N. and Tsao, G. (1986). Investigation of Bacterial Growth on Mixed Substrates: Experimental Evaluation of Cybernetic Models. *Biotechnology and Bioengineering*, vol 28, pp. 1044 – 1055.

Madigan, M., Martinko, J. and Parker, J. (1998). *Brock's Biology of microorganisms 8th ed.*, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.

Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3, pp. 371 – 394.

Nielsen, J., Villadsen, J. and Lidén, G. (2003). *Bioreactor engineering principles 2nd ed.*, Kluwer academic, New York.

Okpokwasili, G. C. and Nweke, C. O (2005). Microbial growth and substrate utilization kinetics. *African journal of biotechnology*, 5, pp. 305-317.

Shtessel, Y., Edwards, C., Fridman, L. and Levant, A. (2014). Sliding mode control and observation. Birkhäuser. Springer Science + Business Media, New York.

Simon, D. (2006). *Optimal State Estimation: Kalman, H-inf Nonlinear Approaches*. John Wiley.

Van den Berg, H. A. (1998). Multiple nutrient limitation in unicellulars: reconstructing Liebig's law. *Mathematical Biosciences*, 149, pp. 1 – 22.

Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and applied chemistry*, 73(7), pp. 1163-1172.

Wallas, S. (1988). *Chemical Process equipment. Selection and design*. Butterworth's series on chemical engineering. Boston.

Wang, G., Peng, S. and Huang, H. (1997). A Sliding Observers for Nonlinear Process Control. *Chemical Engineering Sciences*, 52(5), pp. 787-805.

Zinn, M., Witholt, B and Egli, T. (2004). Dual nutrient limited growth: models, experimental observations and applications. *Journal of biotechnology*, 113, pp. 263 – 279.