



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

Ibarra Bello Omar

Ingeniero Bioquímico Industrial

**SISTEMA NEURO-DIFUSO PARA ESTIMACIÓN DE VARIABLES
EN UN PROCESO DE FERMENTACIÓN**

Dirigida por

Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo

Dr. Agustín Ignacio Cabrera Llanos

México, Distrito Federal

Junio de 2012

Declaración de originalidad

“Yo Ibarra Bello Omar declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”



Ibarra Bello Omar

Vo. Bo. De los directores de tesis.



Dra. Ma. Guadalupe Ramírez Sotelo



Dr. Agustín Ignacio Cabrera Llanos



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 10:00 horas del día 14 del mes de junio del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:

Sistema neuro-difuso para estimación de variables en un proceso de fermentación

Presentada por el alumno:

Ibarra

Apellido paterno

Bello

Apellido materno

Omar

Nombre(s)

Con registro:

B	1	0	1	4	9	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

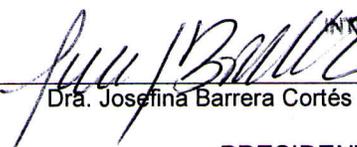
Directores de tesis


Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo


Dr. Agustín Ignacio Cabrera Llanos


Dr. Edgar Salgado Manjarrez


Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas


Dra. Josefina Barrera Cortés

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 22 del mes de Junio del año 2012, el que suscribe Ibarra Bello Omar alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B101495, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Ma. Guadalupe Ramírez Sotelo y Dr. Agustín Ignacio Cabrera Llanos y cede los derechos del trabajo intitulado "Sistema neuro-difuso para estimación de variables en un proceso de fermentación" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección oibarra84@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Ing. Ibarra Bello Omar

Índice general

0.1. Simbología	XVI
0.2. Dedicatorias	XIX
0.3. Agradecimientos	XX
0.4. Resumen	XXI
0.5. Abstract	XXII
0.6. Estructura de la Tesis	XXIII
1. Panorama General	1
1.1. Introducción	1
1.2. Sistema de estudio, Biorreactor de tanque agitado	3
1.3. Reactor lote o Batch	4
1.4. Sistema de interés, reactor lote alimentado	6
1.5. Reactor Continuo	8
1.6. Proceso de Fermentación	10
1.6.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
1.6.2. Fermentación alcohólica con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.7. Variables de la fermentación	14
2. Teoría de RND y Lógica difusa	19
2.1. Introducción	19
2.2. Sensores virtuales u observadores	20
2.3. Redes Neuronales Artificiales (RNA)	21
2.3.1. Estructura de las Redes Neuronales	23
2.3.2. Funciones de Activación	23
2.4. Redes Neuronales Diferenciales (RND)	25
2.4.1. Sistema no lineal y algoritmo de la RND	26
2.5. Neuro observador tipo Luenberger	29
2.6. Teoría de Lógica difusa	31

2.6.1. Centroide de área	34
2.6.2. Procedimiento máximo	35
2.6.3. Reglas difusas si-entonces	35
2.6.4. Desarrollo y Aplicaciones, Sistemas de control	36
3. De los antecedentes	39
3.1. Fundamento Teórico	39
3.2. Justificación	43
3.3. Objetivo General	45
3.4. Objetivos Particulares	45
4. De la metodología	47
4.1. Introducción	47
4.2. Modelos dinámicos de cultivo Lote Alimentado	48
4.3. Desarrollo de la RND de Cuarto Orden	49
4.4. Desarrollo del Neuro Observador tipo Luenberger	52
4.5. Construcción del controlador difuso	54
4.6. Sistema híbrido Neuro-Difuso	56
4.7. Desarrollo experimental, de los cultivos en lote	57
4.7.1. Preparación de inóculos	57
4.7.2. Caracterización de los inóculos	58
4.7.3. Fermentación en el Biorreactor	59
4.7.4. Análisis de muestras	59
5. Resultados y discusión	63
5.1. Introducción	63
5.2. Datos Experimentales, Fermentación alcohólica en lote	63
5.3. Caracterización de inóculos	65
5.4. Fermentación 1	66
5.5. Fermentación 2	68
5.6. Procesamiento numérico	71
5.6.1. Sistema Híbrido Neuro-Difuso	75
5.7. Control Difuso	77
6. Conclusiones	83
7. Apéndices	93

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	VII
A. Demostración de estabilidad	95
B. Modelos dinámicos en función de CO₂	99
C. Medio de Cultivo	101
D. Tablas de muestreo inóculos	103
E. Análisis de biomasa, Espectrofotometría	105
F. Muestreo de Fermentaciones	107
G. Azúcares Reductores y DNS	109
H. Buffer y calibración, analizador bioquímico	111
I. Código de programación para el NO	113

Índice de figuras

1.1. Esquema de un biorreactor de tanque agitado y de sus accesorios principales. (Tomado de [59]).	5
1.2. Dinámica de un proceso lote alimentado siguiendo una estrategia de alimentación por pulsos. (Tomado de [59]).	7
1.3. Dependencia de X , S y $D \cdot X$ frente a D para un quimiostato, empleando la ecuación cinética de Monod. (Tomado de [59]).	9
1.4. Influencia de los factores internos como la expresión genética celular y su regulación, y factores externos como físicos, nutrimentales y químicos, sobre la expresión y el crecimiento celular.	10
1.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con forma globosa a elipsoidal y formación de gemas o blastoconidios multilaterales. Microfotografía electrónica de barrido. (Fuente BA1945, [RM]-www.visualphotos.com).	11
1.6. Ruta metabólica de la glucólisis. Los gastos y formaciones de ATP aparecen en color verde, y la formación de poder reductor en color rojo. La ruta de la Glucosa-6-fosfato es idéntica en presencia y ausencia de oxígeno. Aunque el término glucólisis se refería inicialmente a la degradación de la glucosa a lactato; se usa más libremente para referirse a la ruta hasta la formación de piruvato. (Modificado de [42]).	15
1.7. Las dos reacciones de la fermentación alcohólica son (1) la descarboxilación del piruvato para formar acetaldehído, seguida de (2) su reducción a etanol. (Tomado de [58]).	16

2.1.	Modelo básico no lineal para la neurona como unidad de la Red Neuronal Artificial. Las variables de entrada X_{ij} son ponderadas por los pesos W_{ij} , y son sumadas en el cuerpo S donde dependiendo del umbral se dispara o no la evolución del sistema a través de la función f , esto genera un vector de estados de salida y_i . (Modificado de [56]).	22
2.2.	Estructura jerárquica de un sistema basado en RNA. a) representa la estructura unitaria de la neurona de la figura 2.1, b) Capa unitaria de neuronas o perceptrón, c) Red neuronal con varias capas de neuronas, y d) Sistema neuronal adaptable a con entradas y salidas de estados. (Adaptado de [10]).	22
2.3.	Estructura de la RN de base radial. Donde xi representa los estados de entrada, G son las neuronas de la capa oculta, y W_i representan los pesos sinápticos, $F(x)$ es el vector de salida (Tomado de [56]).	24
2.4.	Red Neuronal Diferencial, también conocida como tipo Hopfield con lazos de retroalimentación para ajuste de los pesos durante el proceso de aprendizaje. (Tomado [56]).	24
2.5.	Representación típica de las funciones sigmoidales. (Tomado de [56]).	26
2.6.	Estructura general de la Red Neuronal Diferencial con capas ocultas (V) y capas externas (W). (Modificado de [56]).	30
2.7.	Funciones de pertenencia más comúnmente utilizadas en lógica difusa. 2.9a función trapezoidal, 2.9b función triangular, 2.9c función de campana y 2.9d función tipo S . (Tomado de [61]).	33
2.8.	Esquema general del control difuso que muestra el flujo de información sobre un sistema en proceso. (Modificado de [51]).	34
4.1.	Estructura de la RND de cuarto orden en la plataforma de Matlab-simulink. Cada bloque enumerado representa un subsistema, 1) es la RND, 2) las leyes de aprendizaje, 3) funciones de activación, 4) la planta, y 5) es el sistema de control difuso.	50
4.2.	Estructura a bloques del Neuro observador de estados de tipo Luenberger.	52
4.3.	Algoritmo computacional en la plataforma de Simulink para el NO de cuarto orden.	53

4.4. Estructura del sistema de control difuso. Variables de entrada en color negro y variables de salida en color naranja.	55
4.5. Estructura a bloques del sistema Híbrido Neuro-Difuso de estimación y regulación de variables en el proceso de fermentación.	56
4.6. Diagrama a bloques de operación del SHND en función de la concentración de CO ₂ , el pH y la temperatura sensados directamente del biorreactor.	57
4.7. Elaboración de inóculos y fermentación en el biorreactor con muestreo para cuantificación de biomasa y azúcares residuales durante el proceso.	60
5.1. Curvas de calibración para la caracterización del reactivo de DNS, a) regresión lineal utilizada para realizar los cálculos de consumo de sustrato en la fermentación 1. La curva b) se utilizó para realizar los cálculos correspondientes de la fermentación 2.	65
5.2. Curvas de crecimiento de <i>Saccharomyces c.</i> en tubos de ensaye (azul) con una $\mu_{max} = 0,19 \text{ h}^{-1}$ y una concentración de dextrosa de 32 gL^{-1} . También se muestra el crecimiento en matraces Erlenmeyer de 250 mL (rojo), presentaron una $\mu_{max} = 0,26 \text{ h}^{-1}$	66
5.3. Dinámica de la fermentación 1 en el biorreactor de 5 litros. La velocidad de consumo de sustrato fue de $rs = -3,68 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$. La velocidad específica de crecimiento máxima alcanzada fue de 0.30 h^{-1}	67
5.4. Comportamiento de la temperatura (línea azul) y pH (línea roja) durante la fermentación 1. La temperatura fue auto regulada por el sistema con una precisión cercana a los 30°C . El pH se reguló manualmente.	68
5.5. Dinámica de la fermentación 2 en el biorreactor de 5 litros. La velocidad de consumo de sustrato fue de $rs = -3,54 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$. La velocidad específica de crecimiento máxima alcanzada fue de 0.29 h^{-1}	69

5.6. Comparación entre la fermentación 1 y 2. X1 y X2 representan la biomasa de ambas fermentaciones y muestran comportamientos semejantes y en algunos puntos significativos entre sí mismos. S1 y S2 son los consumos de sustrato y P2 es la concentración de etanol.	69
5.7. Comportamiento de la temperatura (línea azul) y pH (línea roja) durante el lote de fermentación 2. La temperatura fue auto regulada por el PLC y el pH fue regulado manualmente, cada pico arriba de la línea roja muestra el ajuste del mismo.	70
5.8. Simulación del cultivo tipo lote alimentado con señal de control por pulsos y con parámetros cinéticos tomados de Shekar & Leland, 2006.	71
5.9. Convergencia de la RND con el modelo del cultivo tipo lote alimentado, el error disminuye rápidamente y la estabilidad de la estimación se alcanza a la media hora del proceso, aproximadamente.	72
5.10. Seguimiento de la RND durante la evolución de la biomasa (S -estimado y S -exp), el producto (P -estimado y P -exp) y de la biomasa (X -estimada y X -exp). La notación “exp” hace referencia a los estados proporcionados por los modelos dinámicos del RLA.	72
5.11. Estimación de estados de la fermentación por el sistema RND-difuso. Las líneas punteadas muestran la identificación que realiza la RND de los estados fermentativos mientras que las líneas continuas representan la dinámica de los modelos matemáticos.	73
5.12. Errores relativos respecto a la estimación de estados durante la fermentación por la RND.	74
5.13. Evolución de los pesos $W1$ en la RND.	75
5.14. Evolución de los pesos $W2$ en la RND.	76

5.15. Dinámica de los modelos matemáticos del cultivo lote alimentado que evolucionan a partir de las concentraciones de CO₂ sensado durante la fermentación alcohólica. En rojo se representa el consumo de sustrato, en magenta el crecimiento celular, en negro el incremento de etanol, en azul marino el incremento en la concentración de dióxido de carbono y en color azul turquesa el incremento de volumen hasta los 5 L de operación. 76

5.16. Estimación de estados de la fermentación por el SHND. Los parámetros cinéticos utilizados aplicados son los obtenidos de la fermentación 2. Las líneas punteadas representan la estimación de los estados por el NO. 77

5.17. Acercamiento que deja ver la estimación robusta que ejerce el SHND, alcanza mayor estabilidad y disminuye el error considerablemente. En negro la concentración de sustrato en la planta y en rojo la concentración de sustrato estimado. 78

5.18. Errores de estimación de las variables de la fermentación por el SHND. 78

5.19. Evolución de los pesos sinápticos $W1$ y $W2$ durante la estimación de variables de la fermentación con el NO. 79

5.20. Señal de respuesta que generó el sistema de control difuso respecto al consumo de sustrato. En línea negra punteada se muestra la evolución del sustrato durante la fermentación y en color azul se tiene la señal de respuesta de control de la alimentación al biorreactor. 80

5.21. Señal de respuesta que generó el sistema de control difuso respecto al cambio de temperatura. En línea negra punteada se muestra la evolución de la temperatura fermentación y en color azul se tiene la señal de respuesta de control para la activación del sistema de enfriamiento o calefacción sobre el biorreactor. 80

5.22. Señal de respuesta que generó el sistema de control difuso respecto al cambio de pH. En línea negra punteada se muestra la evolución del pH durante la fermentación y en color azul se tiene la señal de respuesta de control para la activación del sistema de adición de solución ácida o alcalina al biorreactor. 81

I.1. Código de programación para el NO en la plataforma de Mat-
Lab. 114

Índice de cuadros

2.1. Principales funciones de activación para las RND.	25
4.1. Diseño de las funciones de membresía para las variables de entrada y sus intervalos operacionales.	55
4.2. Diseño de las funciones de membresía para las variables de salida y sus intervalos operacionales.	56
5.1. Rendimientos totales de las dos fermentaciones con sus parámetros cinéticos y velocidades específicas de crecimiento máximas para los inóculos en tubos de ensaye y matraces Erlenmeyer. La K_s fue tomada de la bibliografía. Concentración inicial de 32 g de dextrosa/L.	64

0.1. Simbología

$SHND$	Sistema Híbrido Neuro-Difuso
RND	Red Neurona Diferencial
NO	Neuro Observador
RNA	Redes Neuronales Artificiales
PLC	Controlador Lógico Programable
X	Biomasa en el tiempo t [gL^{-1}]
S	Sustrato en el tiempo t [gL^{-1}]
P	Producto en el tiempo t [gL^{-1}]
CO_2	Dióxido de carbono en el tiempo t [gL^{-1}]
t	tiempo [h, min, seg]
S_e	Sustrato inicial en el tiempo t_0 [gL^{-1}]
r_{SX}	Tasa de consumo de sustrato por la biomasa
r_{SP}	Tasa de consumo de S por formación de P
r_X	Tasa de incremento de biomasa
μ	Velocidad específica de crecimiento celular [h^{-1}]
Y_{XS}	Rendimiento de S consumido por X
V_t	Volumen [L]
$\mu_{máx}$	Velocidad máxima de crecimiento celular [h^{-1}]
K_S	Constante de saturación de sustrato para $S.c.$ [gL^{-1}]
F_{in}	Flujo de alimentación [$L h^{-1}$]
Y_{XP}	Rendimiento de producto generado por biomasa
θ	Tiempo de residencia del medio en el bioreactor [h]
X_e	Biomasa inicial en el tiempo t_0 [gL^{-1}]
D	Tasa de dilución en el biorreactor [h^{-1}]
r_P	Tasa de formación de producto [$gL^{-1}h^{-1}$]
r_S	Tasa de consumo de sustrato [$gL^{-1}h^{-1}$]
LSA	Levadura Seca Activa
$C_6H_{12}O_6$	Glucosa
ADP, ATP	Adenosina de Difosfato, Adenosina de Trifosfato
$CH_3 CH_2OH$	Alcohol etílico

O_2	Oxígeno disuelto [$mg L^{-1}$]
θ_i	Umbral de disparo en la neurona i
y_i	Salida de la neurona i
w_{ij}	Peso sinápticos de la entrada $ij - esíma$
x_{ij}	Variable $ij - esíma$ de entrada
\dot{x}_t	Vector de estados diferenciales de la RND
x_t	Vector de estados de la RND
u_t	Función escalar del tiempo o señal de control
\mathfrak{R}^n	Espacio vectorial generado de dimensiones n
\mathfrak{R}^q	Espacio vectorial generado de dimensiones q
\hat{x}_t	Vector de estados estimados por la RND
$W_{1,t}$	Matriz de pesos de retroalimentación de estados
$W_{2,t}$	Matriz de pesos para la entrada de estados
A	Matriz de estabilidad de Hurwitz
$\gamma(u_t)$	Función vectorial de control
$\sigma(\hat{x}_t)$	Función sigmoideal de activación para la RND
$\phi(\hat{x}_t)$	Matriz sigmoideal de activación para la RND
a_i, b_i, c_i	Constantes de la función de activación σ
$\bar{a}_{ij}, \bar{b}_{ij}, \bar{c}_{ij}$	Constantes de la función de activación ϕ
e	exponencial
Δ_t	Error de estimación por la RND
X^T	Matriz transpuesta
$\Lambda_\sigma, \Lambda_\phi, D_\phi,$	Matrices de constantes positivas conocidas
$D_\sigma, Z_\sigma, Z_\phi,$	Matrices de constantes positivas conocidas
C_σ, C_ϕ	Matrices de constantes positivas conocidas
$\dot{W}_{1,t}$	Ley diferencial de aprendizaje de la RND
$W_{2,t}$	Ley diferencial de aprendizaje de la RND
K_1, K_2	Matrices de constantes definidas positivas
P	Matriz solución de la Ecuación de Riccati
R, Q	Matrices factores de la matriz I de identidad

C_0	Matriz de controlabilidad
$\dot{\hat{x}}_t$	Vector diferencial de estimación de estados por el NO
K_t	Matriz de ganacia del NO
y_t	Vector de estados a la salida de la planta
\hat{y}_t	Vector de estados estimados por el NO
C_0^+	Pseudo inversa de Penrose de C_0
N	Función matricial definida positiva para el NO
$\Gamma_{i,t}$	Función matricial para las leyes de aprendizaje del NO
$M_{i,t}$	Función matricial para las leyes de aprendizaje del NO
A, B	Conjunto difuso
μ_A	Función de pertenencia al conjunto difuso A'
$F(u_i)$	Operador de fuzzificación F
A_i^{Fuz}	Conjunto difso después de la fuzzificación
$\mu_{A_i^{Fuz}}$	Función de pertenencia de fuzzificación
X_M	Valor de defuzzificación por centroide de área
$y_0(B)$	Punto máximo del conjunto difuso B
B_{max}	Conjunto de puntos máximos en B
Y	Conjunto difuso
Y_{CO_2}	Rendimiento de dióxido de carbono
\dot{C}_{CO_2}	Dinámica de la concentración de dióxido de carbono
\hat{X}	Concentración de Biomasa estimada
\hat{S}	Concentración de Sustrato estimado
\hat{P}	Concentración de Producto estimado
\hat{V}	Volumen estimado
$\tilde{Y}t$	Error de estimación por el NO
rpm	revoluciones por minuto
v/v	relación volumen-volumen
m/v	relación masa-volumen
μm	micrómetros
nm	nanómetros

0.2. Dedicatorias

A mis padres, Primitivo Ibarra y Florencia Bello por estar conmigo en los momentos difíciles, por su apoyo incondicional y por darme la oportunidad de alcanzar mis metas, pero sobre todo, gracias por su amor.

A mi hermano Hugo y su esposa Sandy, porque él es mi mejor ejemplo de solidaridad y cariño incondicional, por sus desvelos y por confiar en mí.

A mi hermano Jorge Luis, por su apoyo y cariño, pero sobre todo por dejarme ser su guía en su toma de decisiones académicas, gracias por su confianza.

A mis ahijados y sobrinos Erick Yair e Iker, por mostrarme la inocencia y dulzura de los pensamientos de un niño.

A mis directores de tesis, Dr. Agustín Cabrera y Dra. Guadalupe Ramírez porque dedicaron parte de su tiempo a transmitirme sus conocimientos y porque me han enseñado a percibir algunas cosas de distinto modo.

A mi querido amigo Oscar Malagón y sus padres, el Sr. Fernando y la Sra. Margarita por brindarme su confianza y hospitalidad en su casa, por su apoyo y sobre todo por su amistad.

A Gibran, Luis, Yorch, Juan Pablo, y demás amigos que han depositado en mí su amistad, compañía y confianza.

A mis amigos de la UPIBI:

Abraham, Omar tocayo y Nayeli por su trabajo y apoyo en los proyectos.

A Alma por su compañía, amistad y confianza; a mi compadre Josué por su sensatez; a Azael y a Magos por sus consejos. A Ruben, Richar, Monic, Laura y Max, por su ayuda y por permitirme trabajar en su espacio en el Laboratorio de Bioingeniería.

0.3. Agradecimientos

A Dios, por darme sensatez y permitirme agradecer a mis seres queridos.

A mi asesora la Dra. Ma. Guadalupe Ramírez Sotelo por todo el apoyo brindado, por sus conocimientos, consejos, tiempo y dedicación a esta tesis, gracias por su amistad y comprensión.

A mi asesor el Dr. Agustín Ignacio Cabrera Llanos por darme la oportunidad de continuar mi formación profesional a través de sus conocimientos, enseñanzas y consejos. Gracias por brindarme su amistad, confianza y por permitirme ver un amigo en él.

A mis revisores de tesis, el Dr. Juan S. Aranda, el Dr. Edgar Salgado y la Dra. Josefina Barrera, por dedicar su tiempo y por sus observaciones para contribuir a mejorar este trabajo.

Al Dr. Sergio Salas por la disposición del equipo del laboratorio de Biorreactores.

*A la UPIBI y al IPN por haber contribuido en mi formación profesional.
A la CONACyT y a PIFI por la beca proporcionada durante los dos años.
A COFAA por el financiamiento para mi asistencia a los congresos.*

0.4. Resumen

El presente trabajo es el desarrollo y diseño de un Sistema Híbrido Neuro-Difuso (SHND) para la estimación de variables en un proceso de fermentación, en este caso, alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae*. La construcción del SHND surge de la necesidad de generar nuevas herramientas para la estimación de variables en línea durante un bioproceso, pero sobre todo, para generar una estimación con mejor precisión y en tiempo real. Este sistema permite estimar y controlar algunas de las variables más importantes del proceso de fermentación, como son biomasa (X), sustrato (S) y producto (P), y pH y temperatura, respectivamente. El sistema del Neuro observador permite estimar otras variables a partir de una señal de entrada y una señal de salida en la planta. La biomasa (X), el sustrato (S) y el producto (P) pueden ser estimados a partir de la concentración de CO_2 liberado durante la producción de etanol; además la concentración de CO_2 refleja directamente la producción de etanol. Por eso, la concentración de CO_2 requiere ser monitoreada por sensor físico que es relativamente aconómico y sin la necesidad de más sensores para el monitoreo de las demás variables.

El diseño del SHND tuvo lugar en la plataforma de *Matlab-Siulink 2009a*. Las técnicas aplicadas para su construcción provienen de la teoría de Redes Neuronales Diferenciales (RND) y Control por Lógica Difusa. La primera como base de desarrollo de los llamados sistemas de inteligencia artificial y la segunda como sistema inteligente de control. El SHND consta de un Neuro observador de estados tipo Luenberger y un sistema de control difuso para estimar y regular las variables en la planta en tiempo real, al grado de que se requieren únicamente sensores físicos para CO_2 , temperatura y pH.

El desarrollo de 2 fermentaciones alcohólicas anóxicas en un biorreactor de tanque agitado de 5 litros fue necesario para la obtención de los parámetros cinéticos para el proceso de entrenamiento y aprendizaje del Neuro observador. También se obtuvieron bases de datos correspondientes a pH y temperatura de las fermentaciones. Estas dos variables y la concentración de sustrato estimada por el NO formaron parte de las variables de entrada al sistema difuso, la señal de respuesta en volts funciona como un activador de los sistemas de regulación para cada uno de estos estados.

Los resultados obtenidos de las estimaciones de variables por la RND y el NO difieren en el grado de robustez y por lo tanto en la convergencia del error hacia cero.

0.5. Abstract

The Neuro-Fuzzy Hybrid System (SHND) was designed and built for the variables estimation in a fermentation process, in this case, alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. The need to develop new monitoring systems on-line for bioprocess variables in real time and are more efficient, causes the SHND construction. This system (SHND) allows estimate and control some of the most important variables of the fermentation process, such as, celular concentration (X), substrate (S) and product (P), and pH and temperature, respectively. The Neuro observer (NO) system allows estimate other variables as from an input signal and output signal in the bioprocess. The celular concentration (X), substrate (S) and product (P) can be estimated as from CO_2 synthesized during the ethanol production; also the CO_2 concentration reflects the ethanol production directly. Therefore, the CO_2 concentration measurement requires a comparatively inexpensive physical sensor without need of measure the other variables using more expensive physical sensors.

The SHND design carried out in the Matlab-Simulink 2009a platform. The algorithms used for its construction come from the Differential Neural Networks (RND) theory and Fuzzy Logic Control. The RND theory is applied for the design and development of so-called artificial intelligence systems; meanwhile, the Fuzzy Logic is considered as intelligent control systems. The SHND was built by a Luenberger state observer and a fuzzy control system to estimate and control the variables on plant in real time, only physical sensors for CO_2 , temperature and pH are required.

Two anoxic alcoholic fermentations were carried out into a stirred tank bioreactor of five liters to obtain the kinetic parameters of *Saccharomyces cerevisiae*. These were applied for the NO learning process. Furthermore, were obtained databases corresponding to pH and temperature of the fermentations processes. These two variables and estimated substrate concentration by the NO were defined as input variables to the fuzzy control system, the response signal has volts units as an activator of regulation systems for each of these variables.

The results obtained from the estimated variables by RND and NO differ in the error according the robustness degree and thus its convergence toward zero.

0.6. Estructura de la Tesis

La presente tesis muestra una perspectiva general sobre la aplicación y desarrollo de sensores virtuales para el monitoreo de bioprocesos en tiempo real y en línea. Se describe el sistema de estudio tomado como base para el desarrollo del SHND, éste es el cultivo en lote alimentado en un biorreactor de tanque agitado (Capítulo 1) y los modelos matemáticos dinámicos que lo rigen. Además, en este capítulo se hace una descripción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y sus distintas fases de crecimiento así como la ruta metabólica que adapta durante el proceso de la fermentación.

La teoría de RND y Lógica difusa que explican el fundamento teórico-matemático y razonamiento lógico requeridos para el desarrollo del SHND se describe en el capítulo 2. El algoritmo aplicado para los neuro observadores también es abordado en este capítulo junto con los esquemas fundamentales de adaptación y operación cuando son aplicados a sistemas físicos como el biorreactor.

El capítulo tercero describe brevemente los antecedentes relacionados con este trabajo, en él se hace mención de los trabajos semejantes más sobresalientes que se pueden tomar como ejemplo y como base para la justificación de este trabajo.

Posteriormente en el Capítulo 4, se describe toda la metodología que se llevó a cabo para el diseño, la construcción y programación del SHND. También, se explica como se llevaron a cabo las cinéticas fermentativas para la obtención de los parámetros cinéticos de la levadura en cultivo en batch en el biorreactor de 5 litros. En la parte final de este capítulo se retoman las técnicas aplicadas para el análisis de las muestras extraídas del fermentador durante las cinéticas para el monitoreo fuera de línea del proceso y para la obtención de las bases de datos.

Finalmente, en el Capítulo 5 se exponen los resultados obtenidos de las cinéticas fermentativas con *Saccharomyces cerevisiae* así como los parámetros cinéticos característicos de la cepa utilizada. Los resultados del monitoreo de la temperatura y el pH durante las fermentaciones realizadas en lote son descritas. Las simulaciones toman lugar y se presentan las gráficas correspondientes a la RND y el SHND, ambos con sus respectivos errores de estimación. Por último, se hace referencia a la parte de control difuso para la regulación de las variables de interés, pH, temperatura y concentración de sustrato dentro del biorreactor en tiempo real durante la fermentación

alcohólica. Las conclusiones finales de esta tesis se hacen evidentes en el Capítulo 6 y las referencias y los apéndices correspondientes se enumeran después.

Capítulo 1

Panorama General

1.1. Introducción

La Biotecnología puede definirse como la integración de las ciencias de la vida y las ciencias de la ingeniería para conseguir el uso de los microorganismos, las células y moléculas en la producción de bienes y servicios. La Biotecnología representa una combinación de diferentes conocimientos y disciplinas científicas que van desde la Bioquímica, la Microbiología, la Biología Molecular, las ciencias exactas, hasta otras ramas ingenieriles como Control, Electrónica, Informática, etc., que en conjunto cumplen propósitos relacionados con el desarrollo del conocimiento y avances científicos. No obstante dada la complejidad de los procesos biotecnológicos aún existen importantes retos a los ingenieros y tecnólogos.

Los procesos biotecnológicos se ven afectados por infinidad de variables que requieren de un control u optimización que permita alcanzar la producción de altas concentraciones de biomasa y/o producto. La optimización del proceso requiere del control de las principales variables que influyen directamente en el metabolismo celular [1], tal como la temperatura, pH, oxígeno disuelto, potencial redox, dióxido de carbono disuelto, etc., algunas de estas variables pueden ser medidas en línea (*on-line*) [2], [43] pero algunas otras igual de influyentes no lo son, por ejemplo, la concentración de biomasa, sustrato y producto (o algún metabolito de interés) no son fácilmente medibles en línea y de forma física [1],[2],[7].

La biomasa (X) y el producto (P) en un proceso biotecnológico son dos de los estados que caracterizan un bioproceso, además son generalmente los principales productos. Es bien conocido que las concentraciones de bio-

masa y producto no son normalmente medidas en línea (*on-line*) porque su medición no es posible o no es económicamente rentable [22], [2], [36]. Dado que el objetivo fundamental de la fermentación es la producción de biomasa y producto es necesario conocer la concentración de estos estados para controlar el desempeño del proceso. Esta necesidad viene dada porque si fuese deficiente el comportamiento de la fermentación, la acción correctiva podría resultar tardía y desastrosa al utilizar los métodos tradicionales de monitoreo fuera de línea [1]. Entre los métodos más comunes para determinar la concentración de biomasa están la extracción de muestras para gravimetría o densidad óptica, dichos métodos no permiten acciones de control oportunas [37]. Por esta razón la determinación de la concentración de biomasa en línea es uno de los principales retos de la biotecnología, y de ahí que estimar estados de variables biológicas a partir de mediciones en línea, usualmente de variables fisicoquímicas, sea un tema de interés y un reto para la industria biotecnológica. En muchos casos, la información sobre estas variables existe pero en forma de relaciones desconocidas, complejas y altamente no lineales. Una posibilidad de dar solución a este problema consiste en inferir estas concentraciones (biomasa $[X]$ y producto $[P]$) a partir de variables medidas empleando los llamados “sensores virtuales” o “sensores por software” (*softsensors*) [38], [1], [2].

Los sensores virtuales, también conocidos como “observadores” o “estimadores de estado” en la ingeniería de control, surgen basados en la idea de la inferencia. Dichos sistemas se centran en el proceso de estimación de alguna variable empleando modelos matemáticos que sustituyen a algunos sensores físicos y que emplean datos adquiridos por otros sensores disponibles, cuando no se tiene un modelo adecuado o cuando tal modelo es imposible de formular [17]. Estos sensores consideran que la evolución dinámica de todas las variables guarda una estrecha relación con respecto a cada una de las variables y con la evolución total del proceso, así que al conocer alguna de ellas se puede estimar el valor de cualquier otra [22].

El diseño y aplicación de los observadores de estados en bioprocesos ha tomado lugar desde algunas décadas pasadas. Una de las dificultades importantes que se han encontrado al momento de desarrollar y aplicar observadores de estados para los procesos químicos y bioquímicos es la incertidumbre de algunos de los términos en los modelos utilizados para describir su dinámica [33]. Los principales observadores clásicos descritos en la lit-

1.2. SISTEMA DE ESTUDIO, BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO 3

eratura son el de Luenberger y el Filtro de Kalman [34], aunque también pueden utilizarse observadores basados en herramientas de inteligencia artificial como las redes neuronales artificiales (RNA) y lógica difusa [7].

Las Redes Neuronales Artificiales (RNA) permiten la estimación de estados sin la necesidad del conocimiento de un modelo matemático representativo del proceso a comparación de los observadores clásicos de Luenberger y Kalman, además de que permite trabajar con procesos no lineales de caja negra en su totalidad [35], [33], [22]. En años recientes, las RNA han sido aplicadas extensamente para modelar sistemas no lineales ya que son herramientas poderosas para el manejo de sistemas de grandes dimensiones [60].

Otra de las técnicas de inteligencia artificial aplicadas en la estimación de parámetros en el área de control y automatización para los controladores lógicos programables (PLCs) es la Lógica Difusa o borrosa. Esta es una herramienta que ha sido una de las tecnologías más sofisticadas para el desarrollo de estrategias de control. La ventaja más importante del control borroso es que no requiere de modelo matemático alguno para su estructuración, sino que en su lugar se aplica la experiencia y el razonamiento humano expresados a través de un conjunto de reglas heurísticas (información lingüística). Las principales cualidades de este tipo de sistemas son su robustez, simplicidad y que no es necesario encontrar las funciones de transferencia ni adaptar modelos no lineales para hacerlos estables y entendibles para sistemas multivariable [48], [49], [50].

1.2. Sistema de estudio, Biorreactor de tanque agitado

Los biorreactores son el espacio fundamental del proceso de fermentación. Estos, son usados para el crecimiento de las células y conversión de la materia prima a metabolito de interés. Están diseñados de manera que proporcionen las condiciones específicas necesarias y óptimas que garanticen crecimiento celular y la maximización en la conversión. El medio ambiente adecuado que proporciona el biorreactor, tiene que proveer niveles óptimos de nutrientes (sustrato, sales, etc.), oxígeno, temperatura y pH, para así convertir las materias primas en los productos de interés [1], [46], [43], [39].

El diseño general de un biorreactor de tanque agitado se muestra en la

figura 1.1, este sistema es el más utilizado a escala industrial y su modo de operación puede ser de tres formas distintas: discontinuo o *batch*, discontinuo alimentado o *fed-batch* y continuo, transcurriendo los dos primeros procesos en estado no estacionario. Por su parte la operación en continuo no significa necesariamente operación en estado estacionario, ya que en periodos de arranque y parada, y en ciertas desestabilizaciones, tiene gran interés el estudio de la dinámica del biorreactor con propósitos de control del proceso [59]. En los apartados siguientes se hace referencia a cada uno de ellos tratando de resaltar los aspectos más importantes en cuanto a su comportamiento, caracterización y aplicación.

1.3. Reactor lote o Batch

Entre los diferentes esquemas operativos de un biorreactor, el más tradicional y, todavía el más ampliamente aplicado a escala industrial, está basado en el uso de cultivos de células microbianas o enzimas en disolución, en operación discontinua. Los reactores discontinuos, lote o batch son empleados mayoritariamente en las industrias alimentarias, farmacéuticas y biotecnológicas, esto se debe a que con ellos se pueden alcanzar y mantener condiciones asépticas durante la operación en periodos cortos durante los cuales se emplean medios muy ricos en nutrientes. Sin embargo, presenta una serie de problemas de entre los cuales se puede destacar la pérdida de eficacia debido a los periodos de arranque y parada, la falta de homogeneidad del producto obtenido en operaciones en cargas consecutivas y dificultad de implementación de esquemas de integración energética [59].

En un biorreactor batch tanto el medio de fermentación como el inóculo se introducen en el sistema al comienzo de la operación. Excepto la entrada/salida de gases y la adición de antiespumante o reguladores de pH, no se prevé la incorporación de materiales al equipo durante el proceso. El proceso se lleva a cabo hasta que se alcanza una conversión determinada. La ecuación 1.1 representa la modificación de la concentración de los distintos componentes en el reactor a lo largo del tiempo.

$$t = - \int_{S_e}^S \frac{ds}{r_{SX} + r_{SP}} \quad (1.1)$$

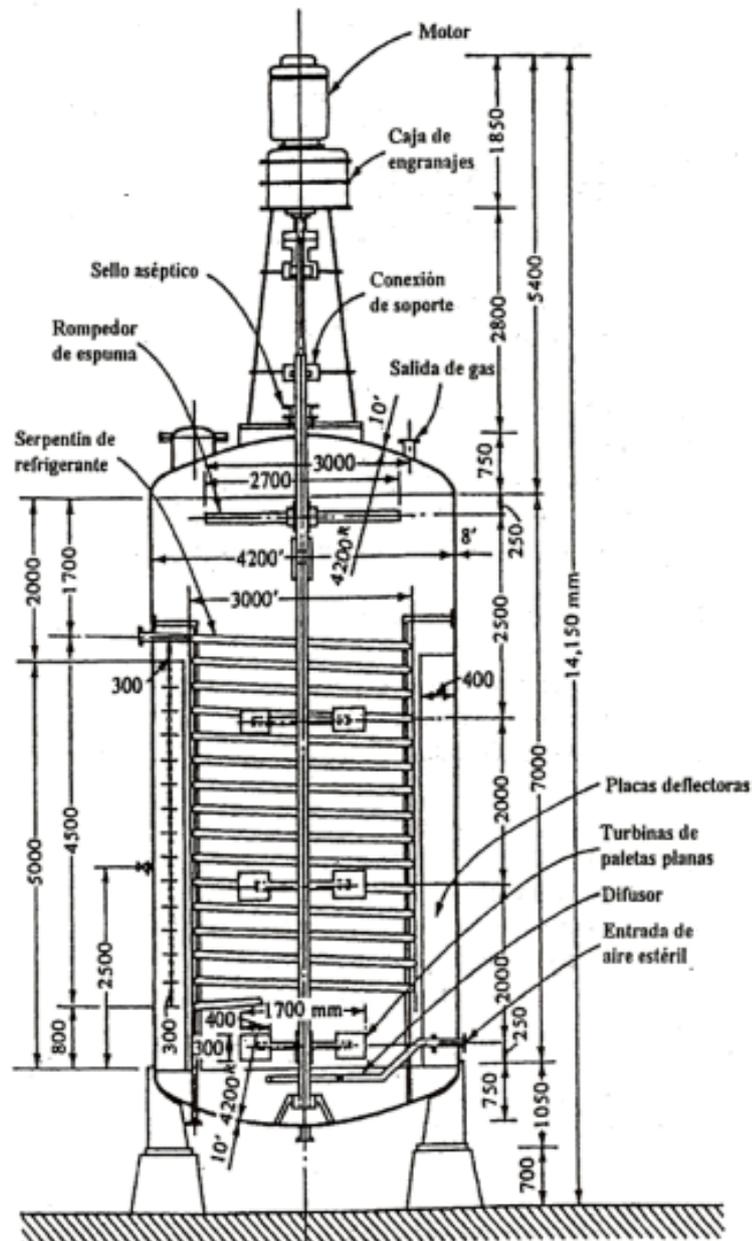


Figura 1.1: Esquema de un biorreactor de tanque agitado y de sus accesorios principales. (Tomado de [59]).

En la cual el signo negativo indica que el sustrato (S) desaparece con el tiempo, r_{SX} y r_{SP} son la velocidad global de consumo de sustrato por las células y la velocidad global de transformación de sustrato a producto, respectivamente. Por otro lado, si la cinética siguiera un comportamiento según el modelo de Monod, se toma $r_X = \mu X$ de la ecuación de balance de biomasa (Ec. 1.2) y considerando la definición del rendimiento de sustrato en biomasa, $Y_{XS} = -dX/dS$, se obtiene el balance de sustrato señalado en la ecuación 1.3.

$$\frac{d(V \cdot X)}{dt} = V \cdot r_X \quad (1.2)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot X}{K_S + S} \quad (1.3)$$

Esta ecuación permite evaluar el crecimiento celular en función del consumo de sustrato.

1.4. Sistema de interés, reactor lote alimentado

En este tipo de configuración, el sustrato se alimenta en cargas sucesivas y no se retira producto alguno, variando así el volumen del medio de reacción durante el proceso. La metodología de alimentación por cargas sucesivas (*fed-batch*) permite solucionar algunos problemas que presenta la operación del reactor discontinuo. Este procedimiento implica que se puede manipular, externamente, la concentración del sustrato o de los nutrientes en el equipo, modificando la velocidad de adición y/o la concentración de la alimentación. La principal ventaja que presenta el lote alimentado frente al lote es que permite controlar o alterar la concentración de uno o más nutrientes o sustrato en el medio de cultivo resultando favorable en el caso de que el crecimiento celular o la obtención de un producto sea sensible a una determinada sustancia o sustrato limitante. El sustrato se añade a medida que se va consumiendo, manteniendo su concentración en unos valores que permitan alcanzar velocidades de reacción aceptables, buscando un equilibrio entre el aumento de velocidad por incremento de sustrato y producto. La adición de sustrato puede efectuarse en forma cíclica o bien en continuo, dependiendo del caso. En la figura 1.2 se presenta la evolución de las concentraciones de sustrato (S), concentración celular (X) y producto (P) para un proceso lote alimentado mediante una estrategia por ciclos.

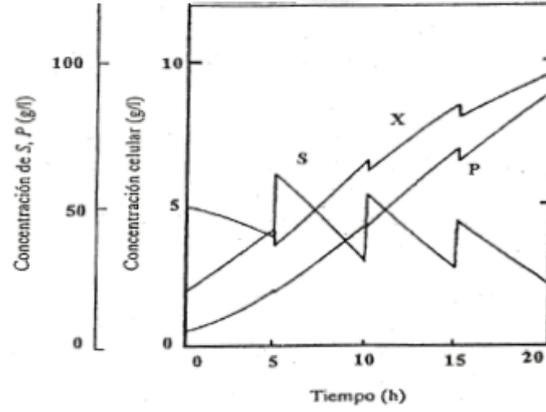


Figura 1.2: Dinámica de un proceso lote alimentado siguiendo una estrategia de alimentación por pulsos. (Tomado de [59]).

Esta estrategia de alimentación se aplica en muchos procesos de fermentación industrial, tales como la producción de levadura o de antibióticos. El balance de materia aplicado a este proceso resulta:

$$\frac{d}{dt}(V \cdot S) = F_{in} \cdot S_e + V \cdot r_S \quad (1.4)$$

Considerando que la densidad del fluido en el reactor y en la corriente de entrada es igual, se puede establecer que en sistemas con alimentación continua, la variación de volumen con el tiempo es igual al caudal alimentado, y por lo tanto, reordenando la ecuación 1.4 se obtiene:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_{in}}{V}(S_e - S) + r_S \quad (1.5)$$

Aplicando esta ecuación a los casos particulares de concentración celular y substrato, se obtiene las ecuaciones 1.6 y 1.7 que, son similares a las de un reactor continuo operado en estado no estacionario [59]. La diferencia estriba en que en este caso el término F_{in}/V varía con el tiempo debido a que el volumen aumenta durante el proceso.

La dinámica del proceso de fermentación, entonces, está dada por las siguientes ecuaciones de balance de masa para reactor tipo lote alimentado:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F_{in}}{V} X \quad (1.6)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{XS}} X + \frac{F_{in}}{V} (S_e - S) \quad (1.7)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu}{Y_{XP}} X - \frac{F_{in}}{V} P \quad (1.8)$$

$$\frac{dV}{dt} = F_{in} \quad (1.9)$$

donde X , S y P son las concentraciones de biomasa, de sustrato y de producto (kg/m^3 , o g/L); V es el volumen del medio de cultivo (m^3); F_{in} es el flujo de alimentación (m^3/h); S_e es la concentración de sustrato en el flujo de entrada (kg/m^3); μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) definida por la ecuación de Monod; Y_{XS} es el rendimiento celular y Y_{XP} es la productividad de etanol. Estos últimos parámetros son de difícil obtención ya que varían con cada fermentación (Peralta 2000, citado en [1]).

1.5. Reactor Continuo

En la mayoría de los casos, los reactores continuos de tanque agitado son equipos cilíndricos con un sistema de homogenización, generalmente mecánico, que garantiza que la composición es la misma en cualquier punto del reactor. Son también conocidos como quimiostatos.

En los procesos continuos tiene lugar una entrada (F_{in}) y una salida de medio líquido, de tal modo que el volumen (V) operativo permanece constante. Las ventajas del proceso continuo incluyen, por lo tanto, la reducción de los costos de capital (debido a que se alcanza una productividad mayor y disminuyen los costos de operación), además de que se logra un mejor control del proceso. Estas ventajas se hacen más evidentes en procesos de producción a gran escala.

Considerando que el sustrato (S) es el componente limitante del crecimiento, se puede suponer que la velocidad volumétrica de crecimiento será $\mu \cdot X$ y que si la operación se lleva a cabo en estado estacionario, el término de acumulación es nulo y, dado que los caudales de alimentación y de salida son iguales, el balance de materia aplicado a la biomasa (X) resulta:

$$V \cdot r_X + F_{in} \cdot (X_e - X) = 0 \quad (1.10)$$

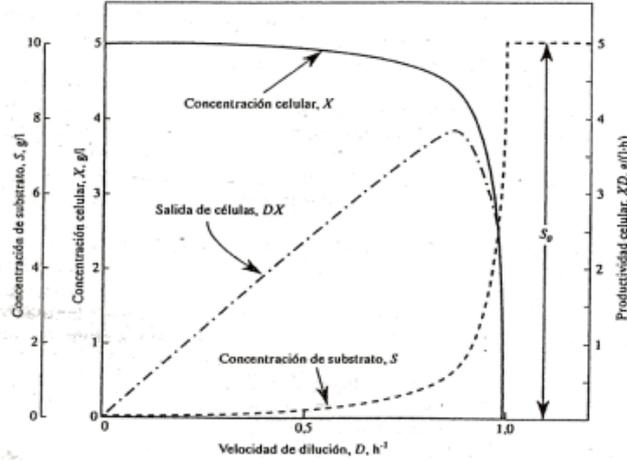


Figura 1.3: Dependencia de X , S y $D \cdot X$ frente a D para un quimiostato, empleando la ecuación cinética de Monod. (Tomado de [59]).

Y teniendo en cuenta que $r_x = \mu \cdot X$, y los conceptos de tiempo de residencia (θ) y velocidad de dilución (D), y considerando que normalmente $X_e = 0$, se obtiene:

$$\mu \cdot X = \frac{1}{\theta} \cdot (X_e - X) = D \cdot (X - X_e) \quad (1.11)$$

$$\mu = D \quad (1.12)$$

Esto indica que la velocidad específica de crecimiento coincide con la velocidad de dilución (Figura 1.3) Análogamente, el valor de la productividad global, r_p , se obtiene en función del caudal de operación y del producto obtenido:

$$r_P = D \cdot P = Y_{XP} \cdot \mu \cdot X \quad (1.13)$$

Finalmente, para el sustrato, considerando la velocidad de consumo de sustrato como la suma de los términos correspondientes al crecimiento microbiano y producto (Figura 1.3), $r_S = r_{XS} + r_{SP}$ e introduciendo los rendimientos Y_{XS} e Y_{PS} , se obtiene:

$$-r_S = \frac{r_X}{Y_{XS}} + \frac{r_P}{Y_{PS}} = D \cdot (S - S_e) \quad (1.14)$$

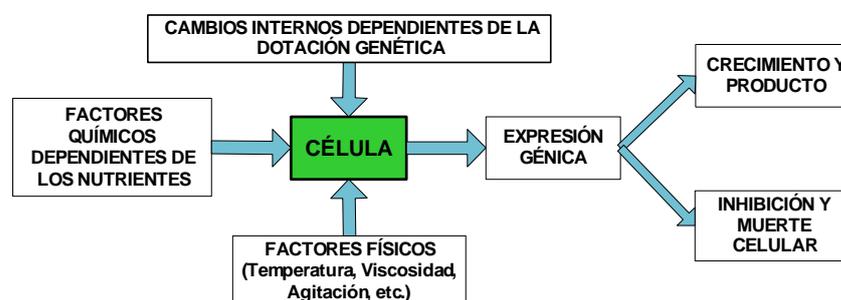


Figura 1.4: Influencia de los factores internos como la expresión genética celular y su regulación, y factores externos como físicos, nutrimentales y químicos, sobre la expresión y el crecimiento celular.

1.6. Proceso de Fermentación

Un proceso de fermentación es un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado biorreactor o fermentador [5]. El microorganismo va incrementando la concentración de su biomasa en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio de cultivo se va modificando y se van formando productos nuevos como consecuencia de la actividad catabólica y anabólica celular [18].

El comportamiento de un microorganismo en crecimiento es el resultado de la interacción que se produce entre la célula y el medio ambiente dentro del biorreactor. La respuesta del microorganismo a las condiciones de operación en el fermentador es el resultado de la influencia de las variables de naturaleza física y química que afectan directamente el proceso [18].

Los factores físicos que pueden afectar la operabilidad del proceso están vinculados con las condiciones de operación que se utilizan en los biorreactores, un ejemplo de estos son, la temperatura, la velocidad de agitación, la concentración de oxígeno disuelto, y todos aquellos que están directamente relacionados con la operación del fermentador, es decir, están constituidos por las variables de manipulación física que se fijan o se programan durante el proceso de la fermentación.

Otros factores que pueden modificar el metabolismo celular y la evolución del proceso de fermentación son aquellos de naturaleza química, estos inhiben la biosíntesis de algunos productos. El pH, la concentración de sales

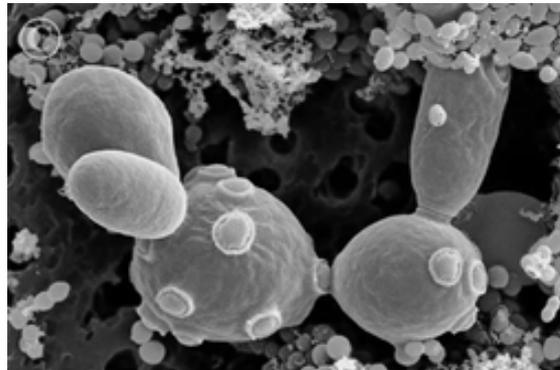


Figura 1.5: *Saccharomyces cerevisiae* con forma globosa a elipsoidal y formación de gemas o blastoconidios multilaterales. Microfotografía electrónica de barrido. (Fuente BA1945, [RM]-www.visualphotos.com).

(iones), la concentración y biodisponibilidad de sustrato, el dióxido de carbono, y hasta la concentración del producto principal o productos secundarios, son ejemplos de este tipo de factores [6].

Para el proceso de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* la concentración de sustrato, o azúcares asimilables, superior a 0.16 g L^{-1} induce invariablemente la formación de etanol aún en presencia de exceso de oxígeno. Este, es el denominado efecto Crabtree [18].

Entonces, la influencia de los factores, internos como externos, sobre el crecimiento de una célula microbiana se puede representar esquemáticamente como lo muestra la Figura 1.4.

1.6.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Del griego *sákchar* (latín *saccharum*, azúcar) y *mykes* (hongo) y del latín *cerevisia* (cerveza). *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto unicelular levaduriforme que presenta células alargadas (de 5-10 *micras*), globosas a elipsoidales con gemaciones o blastoconidios multilaterales (Figura 1.5). Las colonias en agar glucosado de Sabouraud son cremosas, blancas y glabras como las formadas por *Candida*. [45]. Todas la levaduras metabolizan azúcares como la dextrosa, fructosa y manosa, pero algunas son capaces de hacerlo en condiciones anaerobias, con la producción de alcohol y anhídrido carbónico, en el proceso conocido como fermentación [47].

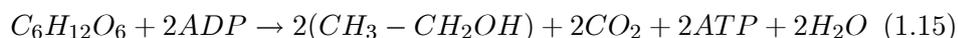
La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido ampliamente estudiada dada su importancia en la industria de la cerveza, panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol. Este microorganismo muestra cinco fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivado en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase *lag*, la fase logarítmica, el cambio diáuxico, la fase postdiáuxica y la fase estacionaria. La fase *lag* es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente, en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por litícase [16], [40], [47].

1.6.2. Fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae*

La fermentación alcohólica es el proceso a través del cual los azúcares contenidos en el mosto o medio de cultivo se convierten en alcohol etílico. El proceso se lleva a cabo a una temperatura de 30 °C y un pH de 5 [24], [47], [46], aunque también se reportan condiciones de 25°C y pH de 4.5 [44]. Para llevar a cabo la fermentación es necesaria la presencia de levaduras. En la actualidad, el uso de levaduras comerciales en forma de Levadura Seca Activa (LSA) es una práctica habitual cada vez más utilizada en la elaboración de algunos productos alcohólicos [65]. El proceso simplificado de la fermentación alcohólica es el siguiente:

Azúcares+levaduras \implies *Alcohol etílico+CO₂+Calor+Otras sustancias*

Los rendimientos moleculares de la reacción son:



Donde un gramo de glucosa genera 0.51 gramos de etanol y 0.49 gramos de anhídrido carbónico, esto considerando únicamente la reacción de formación de sustrato-producto y sin tomar en cuenta la formación de biomasa. De manera generalizada en [65] se reporta que a parte del etanol y el anhídrido carbónico, también se forman otras sustancias generadas en la fermentación alcohólica, como son: glicerol, ácidos orgánicos (acético, láctico, pirúvico, succínico, etc), acetaldehído, acetoina, diacetilo, 2-3 butanodiol (butilenglicol), alcoholes superiores, ésteres, acetatos, vinil-fenoles y etil-fenoles principalmente.

- **Etanol:** El alcohol etílico representa el producto principal de la fermentación alcohólica. Un grado de etanol (1% *v/v*) representa un consumo comprendido entre 16.5 y 17 gramos por litro de azúcares reductores (glucosa o fructosa) dependiendo de las condiciones de operación.
- **Anhídrido Carbónico:** representa el segundo producto principal de la fermentación alcohólica. Según las cepas utilizadas en condiciones enológicas, se puede considerar un rendimiento medio de 0.4 a 0.5 gramos de CO₂ por gramo de azúcares fermentados.
- **Glicerol:** Las concentraciones finales en condiciones enológicas de glicerol, varían de 5 a 11 g L⁻¹ según la cepa de levadura. La producción de glicerol sirve a *Saccharomyces cerevisiae* para hacer frente a las fuertes presiones osmóticas, abandonando la célula posteriormente por difusión pasiva a través de la membrana.
- **Ácidos orgánicos:** desde la fermentación alcohólica se forman ácidos orgánicos que pueden ser liberados al medio. Una gran parte de ellos derivan por un funcionamiento limitado del ciclo de los ácidos tricarbónicos. El ácido succínico representa, como el glicerol, uno de los subproductos mayoritarios de la fermentación alcohólica.
- **Alcoholes superiores y ácidos cetónicos:** La mayor parte de estos compuestos derivan de los aminoácidos asimilados durante la fermentación alcohólica. El grupo amino es eliminado por transaminación y el ácido cetónico es enseguida descarboxilado para convertirse en un aldehído, conduciendo a la formación de un alcohol superior que posee un carbono menos que el aminoácido de origen.

- **Ésteres:** son producidos por reacciones enzimáticas donde entran en juego los derivados acil grasos del Coenzima A y los alcoholes libres.
- **Acetoína:** 2,3-butanodiol y diacetilo, la acetoína es un compuesto originado durante la fermentación alcohólica y se forma en condiciones muy reductoras, transformándose finalmente en butanodiol.

Adicionalmente, durante el proceso de la fermentación se incrementa la concentración de biomasa:

- **Biomasa:** durante la fase de crecimiento exponencial, las levaduras se multiplican durante 6 ó 7 generaciones, generando una población máxima de $120 - 130 \times 10^6$ células por mililitro. Esta biomasa solo representa 3 gramos de peso seco por litro [65].

La glucosa ya contiene oxígeno en su estructura molecular, éste participa en el proceso de oxidación. En el caso de la fermentación alcohólica, el oxígeno necesario para oxidar el carbono y obtener dióxido de carbono junto con etanol está contenido en la propia molécula de glucosa, por lo que esta conversión no requiere el consumo de oxígeno atmosférico [24].

En las figuras 1.6 y 1.7 se describe la ruta metabólica que se desencadena durante el proceso de la fermentación alcohólica en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en ausencia de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Además, se muestra la conversión que realizan las enzimas citoplasmáticas de la levadura desde la entrada de la glucosa hasta la obtención del piruvato como precursor del etanol. Cabe mencionar que la ruta de degradación de la glucosa-6-fosfato es un proceso universal y que en este trabajo se retoma para hacer referencia únicamente a *Saccharomyces cerevisiae* con el objetivo de hacer más entendibles las etapas de conversión que desencadena la levadura en un medio limitado en oxígeno que induce a la síntesis de etanol como producto principal.

1.7. Variables de la fermentación

El proceso de la fermentación alcohólica puede verse afectado por una gran cantidad de variables, estas tienen influencia directa en el metabolismo de las levaduras; la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, la concentración de sustrato, velocidad de agitación, etc., son las principales variables de

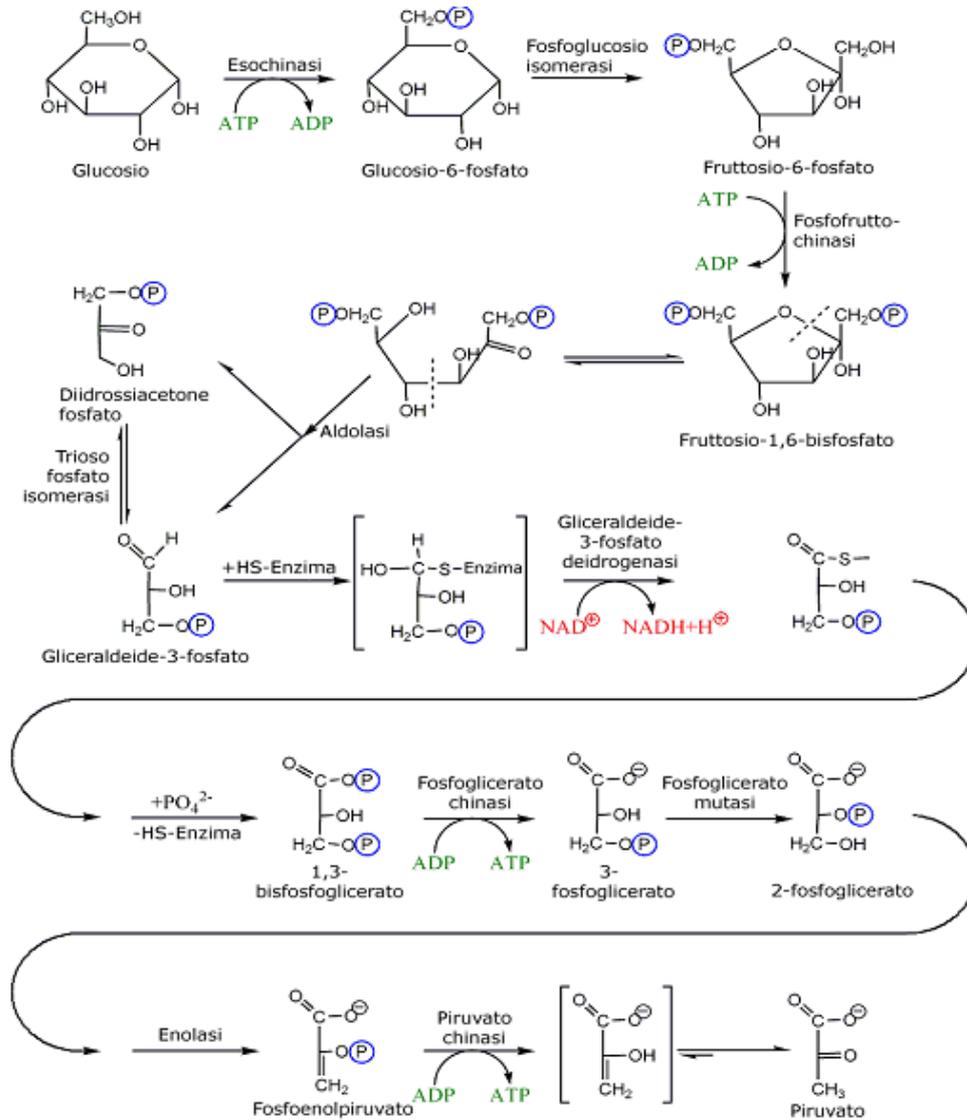


Figura 1.6: Ruta metabólica de la glucólisis. Los gastos y formaciones de ATP aparecen en color verde, y la formación de poder reductor en color rojo. La ruta de la Glucosa-6-fosfato es idéntica en presencia y ausencia de oxígeno. Aunque el término glucólisis se refería inicialmente a la degradación de la glucosa a lactato; se usa más libremente para referirse a la ruta hasta la formación de piruvato. (Modificado de [42]).

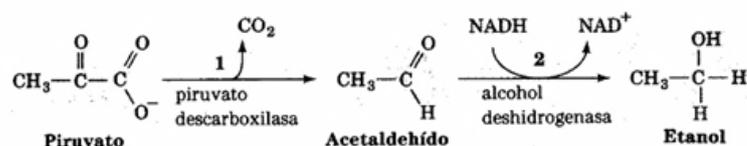


Figura 1.7: Las dos reacciones de la fermentación alcohólica son (1) la descarboxilación del piruvato para formar acetaldehído, seguida de (2) su reducción a etanol. (Tomado de [58]).

operación en el fermentador que deben ser monitoreadas y controladas para lograr un crecimiento celular adecuado y una buena producción de etanol.

La precisión en el conocimiento de estas variables durante la fermentación facilita la toma de correctas decisiones para la operación y control de la planta, y se ve reflejada en los rendimientos de producción. Por ejemplo, la variación del pH respecto a la variación de la temperatura es inminente [8]; además es una variable que afecta también directamente a la tasa de crecimiento celular [19], y su descenso puede incrementar la producción de compuestos volátiles durante la fermentación alcohólica, e incluso, puede afectar directamente la producción de compuestos aromáticos característicos de algunas bebidas alcohólicas [15].

El pH es un factor importante para la supervivencia y el crecimiento microbiológico, en algunos procesos, la variación del pH durante las diversas etapas del crecimiento celular favorece el incremento de biomasa, acelera la producción de metabolitos secundarios [4], e incrementa su resistencia a cambios inesperados de pH, todo esto facilita la supervivencia y la propagación celular [16]. Con esto se confirma que todas las reacciones bioquímicas dependen en gran medida del pH y es importante poder medirlo con gran precisión.

La concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo es función de la temperatura, la presión atmosférica, el flujo volumétrico de aireación, y del coeficiente de transferencia, k_{La} que depende directamente del área de transferencia del O_2 [43]. La concentración de oxígeno disuelto es frecuentemente monitoreada con sensores especiales electroquímicos. En el caso de la velocidad de agitación se cuenta en general con un control directo sobre el motor, con ello se regulan las revoluciones por minuto (rpm) y complementadas con el tipo de impulsor se alcanza la concentración requerida, aunque

cabe mencionar que existe un límite reportado de saturación para oxígeno disuelto de $0.8 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1}$ [46].

Las variables internas del proceso como la concentración de biomasa (X), sustrato (S), producto (P), concentración de CO_2 disuelto, el potencial redox, etc., raramente son medidas en línea durante el proceso, esto se debe a que no existen los dispositivos adecuados para hacerlo o a que estos son muy caros [2], y que además tienen tiempos de respuesta relativamente largos de 30 segundos hasta 1 o 2 minutos.

La biomasa es comúnmente definida como el total de masa microbiana y a pesar de que la cantidad exacta de interés varía con la aplicación la determinación exacta, continua y en línea (*on-line*) es uno de los principales “retos” en biotecnología. El método más común para determinar la concentración de la biomasa es extraer muestras para gravimetría (peso seco de células), espectrofotometría (densidad óptica) y/o número de células (poco frecuente) durante una fermentación [66]. Dado que el objetivo de la fermentación es la producción de biomasa o producto es necesario monitorearlos para conocer el desempeño de éstos. Si el desempeño de la fermentación fuese incorrecto, la acción correctiva para la fermentación pudiera resultar tardía y desastrosa en un monitoreo de biomasa y producto tradicional [1].

Existen algunos métodos para la medición de sustrato o azúcares en la fermentación, el uso de refractómetros para la medición de los grados Brix, HPLC, Analizadores bioquímicos con medios enzimáticos empacados, DNS, etc., son algunos ejemplos de monitoreo que requieren de extracción de muestras fuera de la línea de producción.

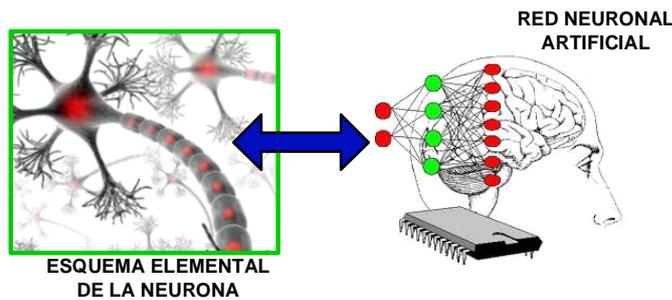
El conocimiento de la concentración química del medio ambiente es de gran valor en el entendimiento del rumbo de la fermentación y sus controles podrían ser necesarios para operaciones de reproducibilidad. Evidentemente, instrumentos que pueden continuamente monitorear las características químicas del caldo de la fermentación son deseables [1]. Por ejemplo, el monitoreo y control por medio del potencial redox ofrece una respuesta a estas necesidades, considerando que es una medición económica y de fácil obtención por algunos electrodos, pero aún no se tiene bien establecida la relación entre el potencial redox, las fases de crecimiento microbiano y la producción de etanol [38].

Finalmente, para dar paso a nuevas estrategias de monitoreo y control se han venido desarrollando sistemas computacionales para observación de

los bioprocesos, los llamados “*sensores virtuales*”, sensores por software o “*Soft – sensors*” son algoritmos matemáticos que permiten establecer relaciones complejas no lineales, y en ocasiones desconocidas, de las variables existentes en el proceso, así se pretende cubrir la necesidad del monitoreo on-line y dar paso al control y automatización de la industria biotecnológica [20], [2]. El crecimiento de la computación como herramienta fundamental industrial permite el procesamiento de cualquier tipo de información, en este caso para la adquisición de los estados de algunas variables de la fermentación a partir de las cuales se pueda conocer la evolución de otras. Las principales ventajas de estos “sensores virtuales” es que son económicos (en comparación a los equipos y dispositivos electrónicos), pueden alcanzar una mejor precisión de estimación, y físicamente hablando, no interfieren como barreras que impidan el funcionamiento hidrodinámico del biorreactor y no requieren ser esterilizados para su aplicación.

Capítulo 2

Teoría de RND y Lógica difusa



Las Redes Neuronales Artificiales surgen como una representación artificial de las neuronas biológicas, de ahí el nombre de sistemas de inteligencia artificial.

2.1. Introducción

En este capítulo se intenta ilustrar la teoría del Neuro Observador de tipo Luenberger (NOL) desde el punto de vista matemático como principal herramienta de estimación de variables en este trabajo. La existencia de otros observadores se hace manifiesta para la estimación de estados y parámetros de bioprocesos pero no se abordan detalles, el objetivo es meramente comparativo.

La teoría de Redes Neuronales Diferenciales como la base del desarrollo del NOL es detallada aunque no a un grado demostrativo y fundamental por obvias razones, no obstante se proporcionan las referencias para su consulta. Las RND a través del análisis de estabilidad de Lyapunov se manifiestan

como la herramienta adecuada para el desarrollo y estudio de sistemas no lineales o bases de datos estocásticos con comportamientos desconocidos o difícilmente modelables.

Finalmente, se hace descripción de la teoría de control por Lógica Difusa y su fundamento teórico como una nueva aplicación robusta de control sin la necesidad de modelos matemáticos complejos o modelo alguno, simplemente como un sistema heurístico que depende de la experiencia y criterios del experto, y que para la obtención de los resultados esperados se requieren en la medida posible conocimientos globales del sistema a controlar.

2.2. Sensores virtuales u observadores

Un sensor por software, emplea mediciones en línea (en forma continua) a través de sensores físicos y un algoritmo de estimación [21], [23]. El algoritmo es llamado “observador de estado” cuyo acierto es proporcionar una estimación de estado incluyendo el valor real del estado del proceso. Este algoritmo requiere conocer el modelo matemático del proceso, así como un modelo de medición que relacione la variable medida con las variables del proceso.

Las variables físicas, químicas y biológicas constituyen los estados de los bioprocesos, la elección del observador o estimador para su monitoreo depende de las especificaciones particulares del problema. En la práctica tiene gran influencia la disponibilidad de un modelo que sea representativo de la dinámica del proceso, así como la fidelidad de los datos experimentales. Cuando el modelo no es lo suficientemente representativo, pueden emplearse observadores asintóticos cuya dependencia con el modelo no es tan estricta, pero su convergencia depende de las condiciones de operación [33], [22]. También pueden utilizarse observadores basados en herramientas de inteligencia artificial como las Redes Neuronales Artificiales y lógica difusa. En general cuando el conocimiento a priori sobre el modelo o sobre la planta es incompleto, pueden emplearse técnicas de aproximación para la estimación de estados a partir de la información entrada/salida [22], [7].

Para procesos bioquímicos, por ejemplo, se encuentran dos tipos de observadores en la literatura. La primera clase comprende los observadores clásicos como Luenberger, Kalman y observadores no lineales. Un problema sobre estos observadores es que dependen directamente del conocimiento de

los parámetros cinéticos del sistema. La segunda clase de observadores comprende los llamados “observadores asintóticos” basados en la idea de que los parámetros cinéticos tiene alto grado de incertidumbre y se fundamentan en el desarrollo de balances de masa y energía pero sin requerir del conocimiento de la cinética del proceso [33].

2.3. Redes Neuronales Artificiales (RNA)

Una Red Neuronal Artificial (RNA) es un procesador distribuido paralelo inspirado de las redes neuronales biológicas [14], la cual puede almacenar conocimiento experimental y hacer disponible su aplicación. Además, posee al igual que el cerebro, conectividad interneuronal conocida como “pesos sinápticos”, estos son usados para almacenar el conocimiento. El proceso de aprendizaje se da a través de un algoritmo de aprendizaje, su función es la de modificar los pesos sinápticos de las redes hasta obtener una buena aproximación. En la figura 2.1 se esquematiza la neurona como unidad operacional de una Red Neuronal, se señalan sus tres elementos principales: los enlaces sinápticos con cada elemento caracterizado por su propio peso; un sumador para sumar los componentes de las señales de entrada, multiplicados por el respectivo peso sináptico y una función de activación no lineal que transforma la salida del sumador en la salida de la neurona [43].

Donde la suma de las n -simas entradas x_{ij} de la neurona i , ponderadas con los pesos sinápticos w_{ij} , genera la entrada ponderada total o "potencial postsináptico" de la neurona i . Los pesos sinápticos w_{ij} miden la intensidad de la interacción entre las dos neuronas que están conectadas por el enlace. Posteriormente, se aplica una función de activación no lineal o transferencia $f(\cdot)$ a la diferencia entre el "potencial postsináptico" y el umbral θ_i , obteniéndose la salida de la neurona y_i [56]. Por esta parte, $y_i(t) = f\left(\sum_{j=1}^n w_{ij}x_{ij} - \theta_i\right)$ es el modelo matemático más elemental. La función de activación $f(\cdot)$ se suele considerar determinista, y en la mayor parte de los modelos es monótona creciente y continua [9].

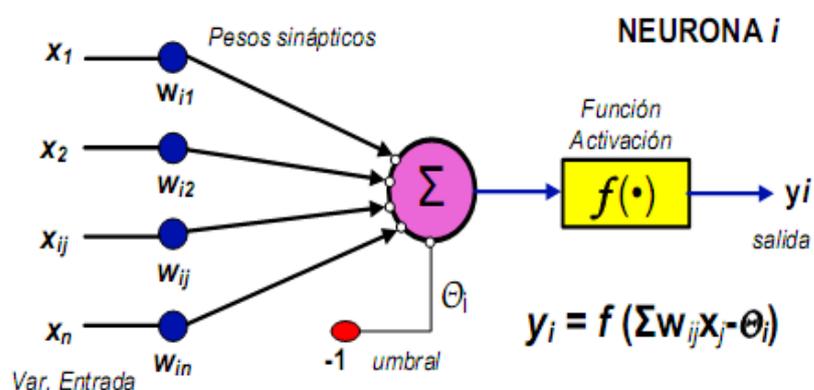


Figura 2.1: Modelo básico no lineal para la neurona como unidad de la Red Neuronal Artificial. Las variables de entrada X_{ij} son ponderadas por los pesos W_{ij} , y son sumadas en el cuerpo S donde dependiendo del umbral se dispara o no la evolución del sistema a través de la función f , esto genera un vector de estados de salida y_i . (Modificado de [56]).

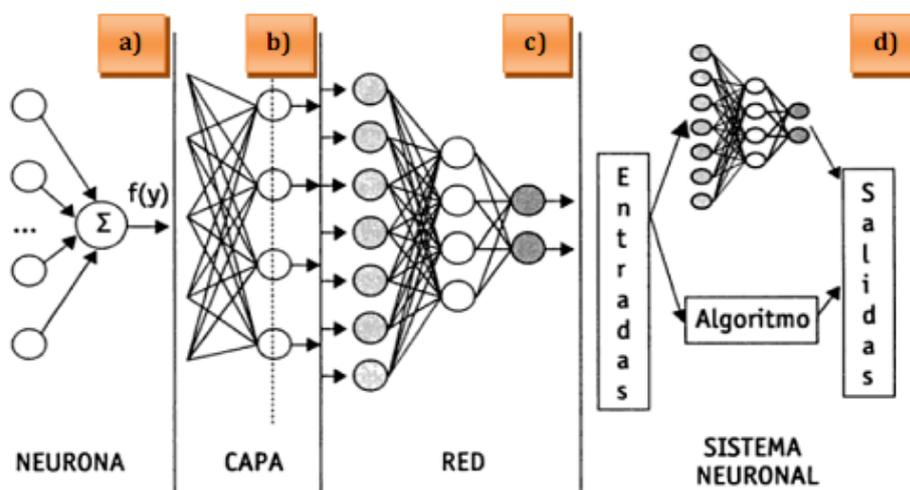


Figura 2.2: Estructura jerárquica de un sistema basado en RNA. a) representa la estructura unitaria de la neurona de la figura 2.1, b) Capa unitaria de neuronas o perceptrón, c) Red neuronal con varias capas de neuronas, y d) Sistema neuronal adaptable a con entradas y salidas de estados. (Adaptado de [10]).

2.3.1. Estructura de las Redes Neuronales

La forma en la cual las neuronas o las redes neuronales están interconectadas determina su estructura, pueden agruparse en capas con conexiones *excitatorias* o *inhibitorias* según sea el peso sináptico positivo o negativo, respectivamente. También pueden ser *intra-capa* o *inter-capa*, según se conecten neuronas de una misma capa o de capas diferentes. Según el flujo de datos, las redes pueden ser unidireccionales “*feedforward*” o recurrentes “*feedback*”. Para las propuestas de identificación y control, las estructuras más usadas son:

- **Red Feedforward Monocapa.** Es la forma simple de una red feedforward, tiene solo una capa de neuronas como se muestra en la figura 2.2b. El más conocido es el llamado Perceptrón.
- **Red Feedforward multicapa.** Son distintivas por la presencia de una o más capas ocultas (figura 2.2c). Teóricamente las neuronas de cada capa tienen su propia entrada la cual proviene de la salida de la capa antecesora. Usualmente su función de activación es una sigmoideal. El algoritmo de aprendizaje utilizado para ajustar los pesos sinápticos de un perceptrón multicapa se conoce como *back-propagation*.
- **Redes Neuronales de función de base radial (RBF).** Estas redes poseen tres distintas capas, la capa de entrada construida con nodos de entrada, la capa oculta contiene una gran cantidad de nodos (neuronas) y cada uno de ellos ejecuta una transformación no lineal de la entrada. Finalmente la capa de salida es una combinación lineal de las neuronas de la capa oculta (figura 2.3).
- **Redes Neuronales diferenciales.** Este tipo de red se distingue propiamente de las anteriores por la existencia de lazos de retroalimentación. Estos lazos pueden ser entre neuronas de diferentes capas, neuronas de la misma capa o, entre una misma neurona (figura 2.4). Esta estructura la hace especialmente adecuada para estudiar la dinámica de los sistemas no lineales biológicos [56].

2.3.2. Funciones de Activación

Las funciones de activación pueden ser de varios tipos, las más utilizadas son tres: función de activación lineal por partes, función de activación tipo

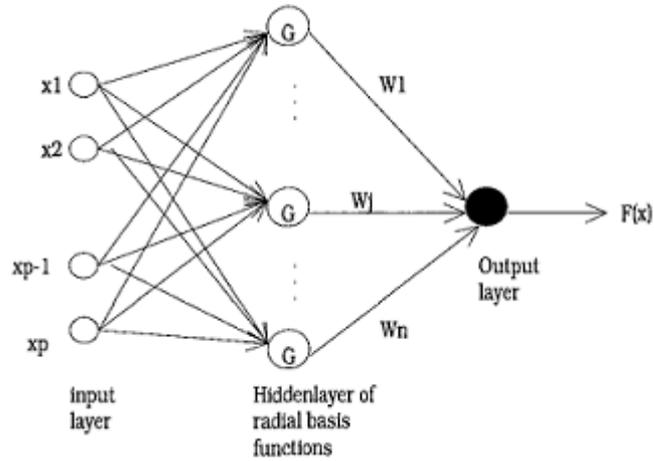


Figura 2.3: Estructura de la RN de base radial. Donde x_i representa los estados de entrada, G son las neuronas de la capa oculta, y W_i representan los pesos sinápticos, $F(x)$ es el vector de salida (Tomado de [56]).

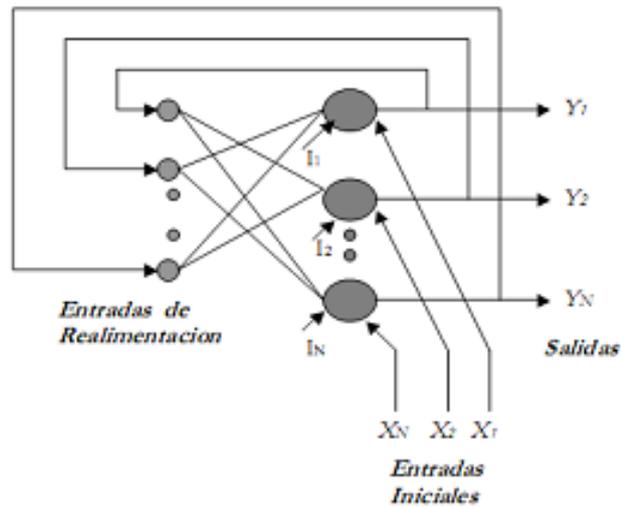


Figura 2.4: Red Neuronal Diferencial, también conocida como tipo Hopfield con lazos de retroalimentación para ajuste de los pesos durante el proceso de aprendizaje. (Tomado [56]).

Cuadro 2.1: Principales funciones de activación para las RND.

Función	Descripción	Rango
Identidad	$y = x$	$[-\infty, +\infty]$
Escalón	$y = \text{sign}(x)$ $y = H(x)$	$\{-1, +1\}$ $\{0, +1\}$
Lineal a tramos	$y = \begin{bmatrix} -1, \text{ si } x < -1 \\ x, \text{ si } -1 \leq x \leq +1 \\ +1, \text{ si } x > +1 \end{bmatrix}$	$[-1, +1]$
Sigmoidea	$y = \frac{1}{1+e^{-x}}$	$[0, +1]$
Gausiana	$y = Ae^{-Bx^2}$	$[0, +1]$
Sinusoidal	$y = A \sin(\omega x + \phi)$	$[-1, +1]$

sigmoideal y función de activación tipo umbral.

Dependiendo de la naturaleza de la función de activación es su comportamiento, puede además estar determinada por un dominio acotado o no, y puede por lo tanto mantener su dinámica dentro de un rango preestablecido. Ejemplos de las funciones de activación más comunes se muestran a continuación (Tabla 2.1).

Las funciones sigmoideas suaves (figura 2.5) son las más utilizadas para las aplicaciones basadas en RNA ya que presentan un mejor balance entre desempeño lineal y no lineal, además, son diferenciables y continuas [43].

2.4. Redes Neuronales Diferenciales (RND)

La red neuronal recurrente de tiempo continuo tipo Hopfield, o también llamada Red Neuronal Diferencial, ha encontrado una reciente aplicación para la identificación y control de sistemas no lineales. La identificación de los sistemas no lineales puede interpretarse como la aproximación al sistema disponible por la red neuronal dinámica. La RND minimiza el error de aproximación al sistema no lineal, esto no determina el número de neuronas o del valor de sus pesos para obtener el error mínimo [56].

Las RND poseen la ventaja sobre las Redes Neuronales Estáticas de que pueden actualizar sus pesos sinápticos por si mismas por medio de la

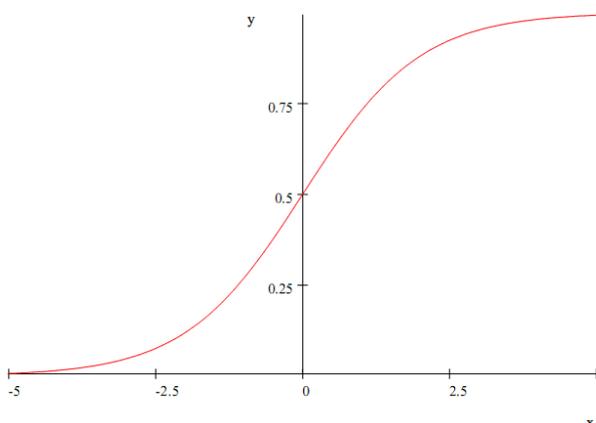


Figura 2.5: Representación típica de las funciones sigmoidales. (Tomado de [56]).

retroalimentación. Uno de los mayores conocimientos acerca de la red neuronal dinámica fue introducido por Hopfield. El modelo más estudiado de la red neuronal dinámica no tiene capas ocultas, en consecuencia, la capacidad de aproximación de esta red puede verse limitada. Para resolver estas deficiencias, existen estas recomendaciones:

1. Usar redes neuronales de orden elevado que contengan múltiples funciones no lineales ordenadas para aproximar comportamientos no lineales; la ley de aprendizaje para redes de orden elevado son similares a las usadas en casos de redes monocapa.
2. Emplear redes neuronales multicapa con capas adicionales internas combinadas con las respectivas modificaciones de las leyes de aprendizaje, hacen un un algoritmo de robustéz razonable.

A continuación se presentan los parámetros para aprendizaje en línea y la identificación de estabilidad del error de la RND sin capa oculta.

2.4.1. Sistema no lineal y algoritmo de la RND

Un sistema no lineal puede ser definido de la siguiente manera:

$$\dot{x}_t = f(x_t, u_t, t) \quad (2.1)$$

$$x_t \in \mathfrak{R}^n, u_t \in \mathfrak{R}^q, n \geq q$$

Donde x_t es una función vectorial del tiempo la cual toma valores en el espacio de n -dimensiones y representa el estado del sistema, $x_t \in \mathfrak{R}^n$, u_t es una función escalar del tiempo y puede tomar el comportamiento de alguna de las funciones de la Tabla 2.1, a esta función también se le conoce como la señal de control que hace evolucionar el sistema de la RND.

La siguiente ecuación 2.2 es el modelo matemático de la Red Neuronal Diferencial que funciona como estimador de estados en forma paralela al modelo base, en este caso simula al modelo matemático característico del Reactor tipo Lote Alimentado.

$$\dot{\hat{x}}_t = A\hat{x}_t + W_{1,t}\sigma(\hat{x}_t) + W_{2,t}\phi(\hat{x}_t)\gamma(u_t) \quad (2.2)$$

$\hat{x}_t \in \mathfrak{R}^n$ es el vector de estados estimados.

$u_t \in \mathfrak{R}^q$ es la función escalar de control aplicada al sistema.

$W_{1,t} \in \mathfrak{R}^{n \times k}$ es la matriz para la retroalimentación de estados no lineal.

$W_{2,t} \in \mathfrak{R}^{n \times r}$ es la matriz de entrada.

$A \in \mathfrak{R}^{n \times n}$ es la matriz de estabilidad de Hurwitz.

La no linealidad $\gamma(u_t)$ define el campo vectorial para \mathfrak{R}^q y \mathfrak{R}^s . La función $\phi(\cdot)$ es la transformación de \mathfrak{R}^n a $\mathfrak{R}^{r \times s}$. La presentación típica de los elementos $\sigma_i(\cdot)$ y $\phi(\cdot)_{ij}$ son las funciones sigmoideas de activación para el sistema. Están representadas de la siguiente manera:

$$\sigma_i(x) = a_i(1 + e^{-b_i x_i})^{-1} - c_i \quad (2.3)$$

$$\phi(x)_{ij} = \bar{a}_{ij}(1 + e^{-\sum_p b_{ij}^- x_p})^{-1} - \bar{c}_{ij} \quad (2.4)$$

La Red Neuronal puede ser entonces, clasificada como de tipo Hopfield. Porque $\sigma(\cdot)$ y $\phi(\cdot)$ se eligen como funciones sigmoideas. Para ello se asume lo siguiente.

A2.7. Las funciones $\sigma(\cdot)$ y $\phi(\cdot)$ satisfacen las siguientes condiciones:

$$\tilde{\sigma}_t^T \Lambda_\sigma \tilde{\sigma}_t \leq \Delta_t^T D_\sigma \Delta_t, \quad \sigma_t^T(x) Z_\sigma \sigma_t(x) \leq x_t^T C_\sigma x_t \quad (2.5)$$

$$\gamma^T(u_t) \tilde{\phi}_t^T \Lambda_\phi \tilde{\phi}_t \gamma(u_t) \leq \Delta_t^T D_\phi \Delta_t \|\gamma(u_t)\|^2 \quad (2.6)$$

$$\gamma^T(u_t) \phi_t^T(x) Z_\phi \phi_t(x) \gamma(u_t) \leq x_t^T C_\phi x_t \quad (2.7)$$

$$\Delta_t := \hat{x}_t - x_t \quad (2.8)$$

donde:

$$\tilde{\sigma}_t : = \sigma(\hat{x}_t) - \sigma(x_t) \quad (2.9)$$

$$\tilde{\phi}_t : = \phi(\hat{x}_t) - \phi(x_t) \quad (2.10)$$

$\Lambda_\sigma, \Lambda_\phi, D_\phi, D_\sigma, Z_\sigma, Z_\phi, C_\sigma, C_\phi$ son constantes positivas conocidas.

A2.8. Asumiendo que la función no lineal $\gamma(\cdot)$ es continua, se encuentra acotada como

$$\|\gamma(u_t)\|^2 \leq \bar{u} \quad (2.11)$$

Esta función debe estar acotada o debe cumplir ciertas acciones de control y que su no linealidad es continua para que pueda ser realizada.

Las leyes de aprendizaje que garantizan la estabilidad de la Red Neuronal así como su estabilidad asintótica para la identificación del vector de error, hacen rigor al siguiente Teorema, este representa el algoritmo y sus propiedades asintóticas.

Teorema 1 *Considerando el sistema de la ecuación 2.1 y el modelo relacionado con la Red Neuronal Diferencial (ecuación 2.2), cuyos pesos son ajustados por:*

$$\dot{W}_{1,t} = -K_1 P \Delta_t \sigma(\hat{x}_t)^T \quad (2.12)$$

$$\dot{W}_{2,t} = -K_2 P \Delta_t \gamma(u_t)^T \phi(\hat{x}_t)^T \quad (2.13)$$

$W_{1,0}, W_{2,0}$ son las matrices iniciales

A estas ecuaciones también se les conoce como *Leyes de Aprendizaje*, donde K_1 y K_2 son matrices definidas positivas, P es la solución matricial de la ecuación de Riccati dada por la ecuación 2.14.

$$A^T P + PA + PRP + Q = 0 \quad (2.14)$$

A es la matriz de estabilidad de Hurwitz, R y Q pueden considerarse como $n \cdot I$, donde I es la matriz de identidad y n es una constante.

La figura 2.6 es un esquema general que ejemplifica el proceso de retroalimentación para el ajuste de los pesos sinápticos de la RND y la acción de las funciones de activación.

2.5. Neuro observador tipo Luenberger

La técnica de Redes Neuronales Diferenciales permite desarrollar procedimientos para la identificación de un proceso, así como el desarrollo de estimadores en línea. Esta técnica se basa en el supuesto de que un sistema de tipo no lineal como el mostrado por las ecuaciones de lote alimentado, en forma general puede escribirse por medio de la expresión:

$$\begin{aligned} \dot{x}_t &= f(x_t, u_t, t) \\ y_t &= C_0 x_t \end{aligned} \quad (2.15)$$

donde $x_t \in \mathfrak{R}^n$ es el vector de estados, y_t es la salida del sistema la cual se considera una combinación lineal del vector de estados dado por $C_0 \in \mathfrak{R}^{p \times n}$, $u_t \in \mathfrak{R}^q$ es la señal de control que se aplica al sistema. Suponemos que para este sistema existe un sistema estimador basado en las RND pero ahora con el término del observador de Luenberger, de la forma:

$$\dot{\hat{x}}_t = A\hat{x}_t + W_{1,t}\sigma(\hat{x}_t) + W_{2,t}\phi(\hat{x}_t)\gamma(u_t) + \mathbf{K}_t(\mathbf{y}_t - \hat{\mathbf{y}}_t) \quad (2.16)$$

donde:

$\hat{x}_t \in \mathfrak{R}^n$ es el vector de estimación de estados por el Neuro observador.

$u_t \in \mathfrak{R}^q$ es la señal de control aplicada al Neuro observador.

$W_{1,t} \in \mathfrak{R}^{n \times k}$ es la matriz de pesos para la retroalimentación de estados.

$W_{2,t} \in \mathfrak{R}^{n \times r}$ es la matriz de pesos para la señal de control.

$A \in \mathfrak{R}^{n \times n}$ es la matriz de estabilidad de Hurwitz.

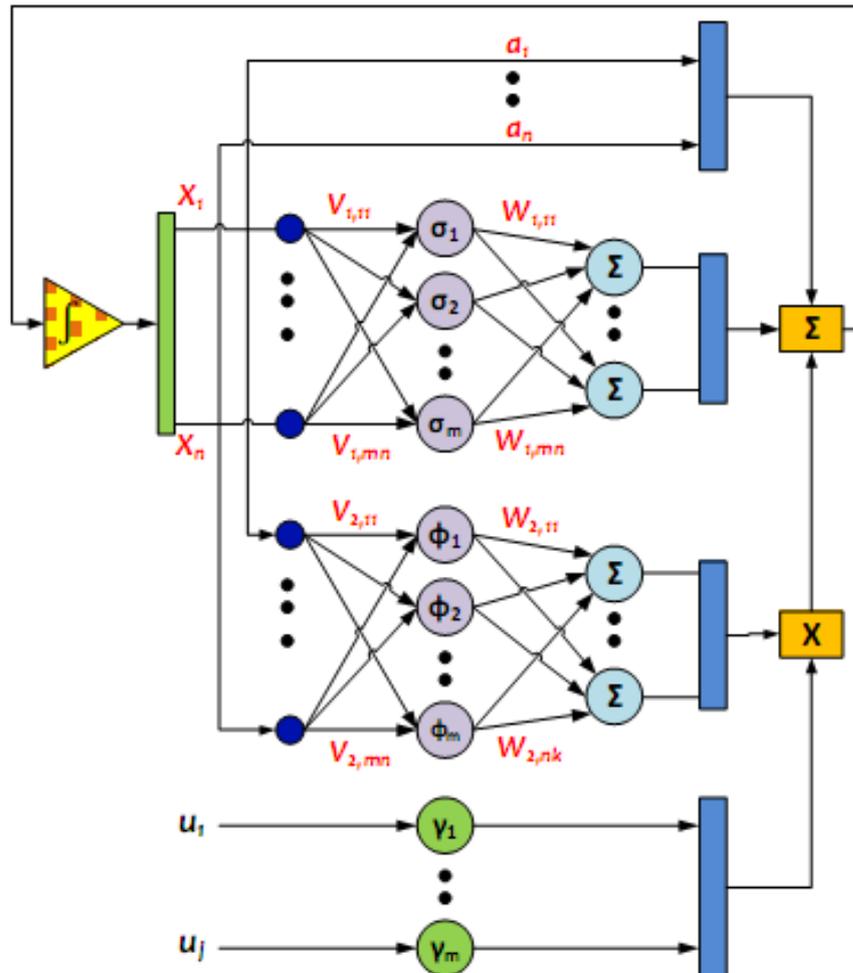


Figura 2.6: Estructura general de la Red Neuronal Diferencial con capas ocultas (V) y capas externas (W). (Modificado de [56]).

Las funciones de activación $\sigma(\cdot)$ y $\phi(\cdot)$ son consideradas campos vectoriales de tipo sigmoidal que evolucionan a partir de los estados estimados de x . Estas funciones están representadas por las ecuaciones 2.3 y 2.4.

La condición en la señal de entrada u_t se asume que se encuentra acotada como en la ecuación 2.11.

Considerando la descripción del algoritmo de la expresión 2.16 se puede enunciar una ley de aprendizaje [56],[64] o actualización para las matrices de pesos dada por:

$$\dot{W}_{1,t} = -(\Gamma_{1,t} + \delta\Gamma_{2,t}) [W_{1,t} - W_1^*] \sigma(\hat{x}_t) \sigma(\hat{x}_t)^T - M_{1,t} \quad (2.17)$$

$$\dot{W}_{2,t} = -\|\gamma(u_t)\|^2 (\Gamma_{1,t} + \delta\Gamma_{2,t}) [W_{2,t} - W_2^*] \phi(\hat{x}_t) \phi(\hat{x}_t)^T - M_{2,t} \quad (2.18)$$

donde:

$$\Gamma_{1,t} = (PN^{-T}C_0^+)(\Lambda_{\Delta C}^{-1})(C_0^+N^{-1}P) \quad (2.19)$$

$$\Gamma_{2,t} = (PN^{-T}N^{-1}P) \quad (2.20)$$

$$M_{1,t} = 2PN^{-T}\sigma(\hat{x}_t)(C_0\hat{x}_t - y_t)^T C_0^+ \quad (2.21)$$

$$M_{2,t} = 2PN^{-T}\phi(\hat{x}_t)\gamma(u_t)(C_0\hat{x}_t - y_t)^T C_0^+ \quad (2.22)$$

donde $N = C_0^T(C_0^T)^+$ y la notación del signo $+$, refiera la pseudo-inversa de Penrose, P es la solución matricial de la ecuación de Riccati (Ec. 2.14). La elección de la matriz C_0 depende de los estados que quieren ser estimados a partir de los que sí pueden ser medidos. Por otro lado, el ajuste de la matriz de ganancia K_t se lleva a cabo mediante el proceso de ensayo y error.

2.6. Teoría de Lógica difusa

La lógica difusa o lógica borrosa, trabaja con conjuntos que no tienen límites perfectamente definidos, es decir, la transición entre la pertenencia y no pertenencia de una variable en un conjunto es gradual. Se caracteriza por las funciones de pertenencia, que dan flexibilidad a la modelación utilizando expresiones lingüísticas, tales como mucho, *poco*, *leve*, *severo*, *caliente*, *frío*, etc., y reglas de tipo *si-entonces*. Surgió de la necesidad de solucionar problemas complejos con información imprecisa, para los cuales la matemática y lógica tradicionales no son suficientes. La lógica difusa es un lenguaje que

permite trasladar sentencias sofisticadas del lenguaje natural a un formalismo matemático [51]. Los sistemas de inferencia difusa tienen diversas aplicaciones dentro de una gran variedad de áreas y a causa de su naturaleza multidisciplinaria son conocidos como sistemas expertos, modelos difusos, controladores lógicos difusos o simplemente como sistemas difusos [51].

Los sistemas difusos desarrollados a partir de 1960 por Lotfi Zadeh (posteriormente validados por Mandani), se basan en el principio de que las matemáticas pueden ser usadas para encadenar el lenguaje con la inteligencia humana. Algunos conceptos pueden ser mejor definidos con palabras, los conjuntos difusos ayudan a construir mejores modelos de la realidad [13], [12].

- **Conjunto Difuso.** Un conjunto difuso expresa el grado de pertenencia al conjunto que tiene cada uno de los elementos. El conjunto difuso A en X puede definirse como el conjunto de los pares ordenados:

$$A' = \{(x, \mu_A(x)) \mid x \in X\} \quad (2.23)$$

Donde $\mu_A(x)$ es la función de pertenencia al conjunto difuso.

- **Función de pertenencia.** Esta función da para cada elemento de X un grado de membresía al conjunto A' . El valor de esta función está en el intervalo entre 0 y 1, siendo 1 el valor para máxima pertenencia. Si el valor de esta función se restringiera solamente a 0 y 1, se tendría un conjunto clásico, o no-difuso. Esta función no es la única, las funciones utilizadas más frecuentemente son las de tipo *trapezoidal*, *singleton*, *triangular*, *S*, *exponencial*, *tipo II* (forma de campana). En la figura 2.7 se presentan algunas de los diferentes tipos de funciones de pertenencia.
- **Centro.** El centro de un conjunto difuso A' es el conjunto de todos los puntos para los cuales la función de pertenencia $\mu_A(x)$ es igual a 1.
- **Normalidad.** Un conjunto difuso es normal si siempre existe un punto para el cual la función de pertenencia es 1, es decir el *centro* no está vacío.

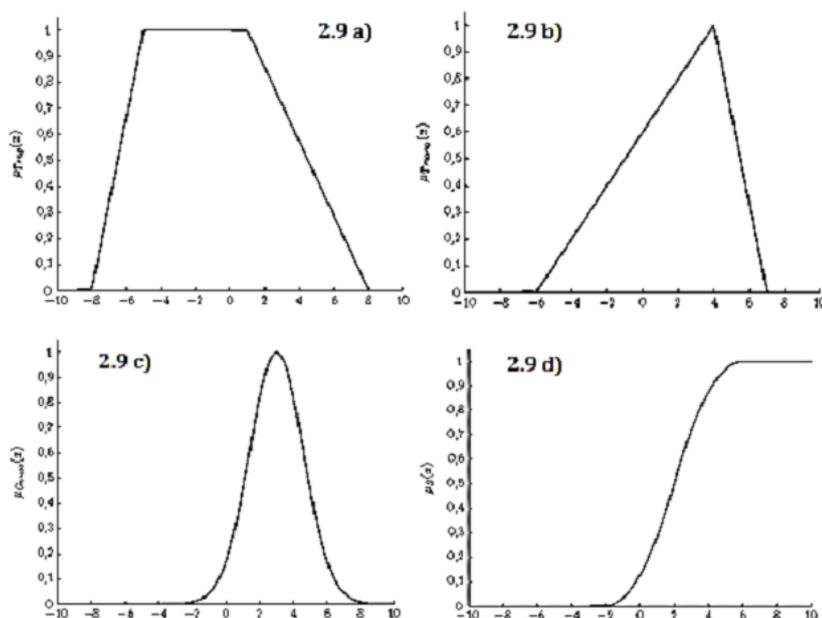


Figura 2.7: Funciones de pertenencia más comúnmente utilizadas en lógica difusa. 2.9a función trapezoidal, 2.9b función triangular, 2.9c función de campana y 2.9d función tipo S . (Tomado de [61]).

Los problemas basados en conjuntos difusos se originan de la utilización de calificaciones lingüísticas. Luego de formar los conjuntos difusos correspondientes a un determinado problema, es necesario obtener una respuesta de estos. El proceso de *fuzzificación* consiste en una transformación de un dato o de un conjunto clásico a su correspondiente conjunto difuso a la entrada del sistema difuso. La transformación de un conjunto clásico a un conjunto difuso se produce mediante el uso del operador de *fuzzificación* F , definido por $F : U_i \rightarrow U_i^*$ en donde $F(u_i) = A_i^{fuz}$. Regularmente el uso del fuzzificador tipo *singleton* es el más utilizado para las aplicaciones en área de control automático y este es definido como un conjunto difuso $A_i^{fuz} \in U_i^*$ con función de membresía:

$$\mu_{A_i^{fuz}}(x) = \begin{cases} 1 & \text{si } x = u_i \\ 0 & \text{en otro caso} \end{cases} \quad (2.24)$$

Cualquier conjunto difuso con la forma 2.24 en su función de membresía es llamado “*singleton*” [51].

Por su parte, la señal de salida del sistema difuso, en muchos casos requiere que sea una respuesta no difusa y se debe pasar de una respuesta

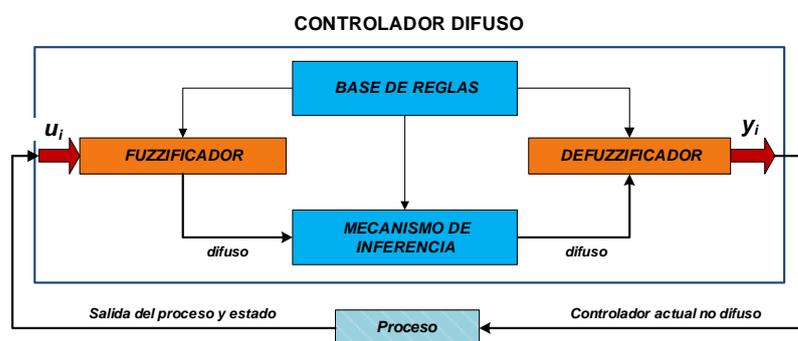


Figura 2.8: Esquema general del control difuso que muestra el flujo de información sobre un sistema en proceso. (Modificado de [51]).

difusa a una que no lo es. Para lograr esto se ha desarrollado el concepto contrario al de *fuzzificación*, el de *defuzzificación*. Se han propuesto varios métodos para lograr esta transformación; algunos de ellos se explican a continuación. El método de *defuzzificación* debe ser escogido de acuerdo con la aplicación que se desea hacer [3],[14]. Este mecanismo de conversión y la inferencia que ejerce la base de reglas se muestra a grandes rasgos en el diagrama a bloques de la figura 2.8.

La figura 2.8 ilustra el diagrama a bloques y los componentes básicos de un sistema de control difuso en donde los conjuntos clásicos U_i y Y_i son llamados el universo del discurso para u_i y y_i respectivamente. En particular, $u_i \in U_i$ con $i = 1, 2, 3, \dots, n$ y $y_i \in Y_i$ con $i = 1, 2, \dots, m$ definen las entradas y salidas correspondientes del sistema difuso [51]. En los siguientes apartados se hace una breve descripción de los métodos más comunes de defuzzificación.

2.6.1. Centroide de área

Este método consiste en hallar para cada conjunto difuso su área y la ubicación del centroide. Luego se hace producto entre ellos y se suman, para posteriormente dividir este resultado por la sumatoria total de las áreas, como se muestran en la ecuación 2.25.

$$\text{Valor de fuzzificado} = X_M = \frac{\sum A_i x_i}{\sum A_j} \quad (2.25)$$

2.6.2. Procedimiento máximo

Aquí se supone que la función de pertenencia tiene solamente un punto máximo simple, se toma el valor de defuzzificación en este punto máximo, como se expresa en la ecuación 2.26.

$$y_0(B) = \operatorname{argmax}\{\mu_B(y) \mid y \in Y\} \quad (2.26)$$

En caso de que la función de pertenencia de la salida tenga varios puntos máximo, se crea un grupo (B_{max}) con estos puntos (soluciones óptimas), ecuación 2.27.

$$B_{max} = \{y \in Y \mid \mu(y) = \max \mu_B(z)\}; z \in Y \quad (2.27)$$

De este grupo de puntos máximos se debe obtener un único punto. Esto se puede hacer de varias formas. Un método es escoger aleatoriamente un punto óptimo (supone que todas las soluciones son igualmente buenas), pero preferiblemente que sea un punto en la mitad del conjunto de soluciones. La solución puede escogerse también hallando el valor medio del conjunto, si este es un conjunto finito, ecuación 2.28.

$$y_0(B) = \frac{1}{N} \sum_{y \in B_{m\acute{a}x}} y \quad (2.28)$$

Donde N es el número de elementos en el conjunto.

2.6.3. Reglas difusas si-entonces

En una regla difusa se asume como: *Si x es A entonces y es B* , donde A y B son valores lingüísticos definidos por conjuntos difusos dentro de los universos X y Y . Como en la lógica clásica a menudo “ x es A ” es llamada premisa y “ y es B ” es llamada la conclusión o consecuencia. Este tipo de reglas puede ser utilizado para modelar y analizar un sistema. Varios métodos para calcular la relación $R = A \rightarrow B$ han sido propuestos. R puede ser visto como un conjunto difuso con una función de pertenencia en dos dimensiones, ecuación 2.29.

$$\mu_R(x, y) = f(\mu_A(x), \mu_B(y)) = f(a, b) \quad (2.29)$$

2.6.4. Desarrollo y Aplicaciones, Sistemas de control

A continuación se enumeran los pasos más importantes para el desarrollo de un sistema de control por lógica difusa:

1. El primer paso para construir un sistema de control difuso consiste en definir las variables de entrada y salida X y Y . Suponemos que en este caso la variable de entrada X es la temperatura y X' es el pH, ambos de un proceso de fermentación. Las variables de salida Y y Y' son los conjuntos de activación del sistema regulador de temperatura y pH, respectivamente.
2. El segundo paso consiste en definir subconjuntos difusos de todas estas variables. Como se mencionó en la sección de *Teoría de Lógica difusa* existen varios tipos de funciones, en este caso se aplican funciones triangulares ya que se requieren conjuntos difusos *normales* y bien delimitados. La parte *si* está compuesta por subconjuntos triangulares etiquetados cada uno con una intensidad de temperatura: *elevada*, *requerida* y *baja*, por dar algunos ejemplos; y para el pH: *ácido*, *requerido* y *básico*, también como etiquetas de subconjuntos triangulares. La parte *entonces* son subconjuntos etiquetados con una acción de respuesta, para la temperatura son: *enfriar*, *no activar* y *calentar*, para el caso del biorreactor con serpentín de enfriamiento y chaqueta de calefacción; y *alimenta álcali*, *no activar* y *alimenta ácido*, para la regulación del pH.
3. El tercer y último paso, es el diseño de las reglas de inferencia que relacionan los subconjuntos de entrada con los subconjuntos de salida para generar una respuesta lógica, nótese que no todas las órdenes existentes conducen a señales de respuesta lógicamente aplicables, por ejemplo, si la temperatura es elevada no es lógico establecer una orden que active el sistema de calefacción del biorreactor ya que esto sería devastador para el proceso [13], [12], [11], [10]. A continuación se enlistan algunos ejemplos de reglas de inferencia difusa que pudieran ser aplicadas para la regulación de la temperatura y el pH en un biorreactor:
 - *Si* la temperatura es **elevada**, *entonces* **activar** sistema de enfriamiento.

- *Si* la temperatura es **baja**, *entonces* **activar** sistema de calefacción.
- *Si* el pH es **ácido**, *entonces* **alimentar álcali**.
- *Si* el pH es **básico**, *entonces* **alimentar ácido**.

La teoría de conjuntos difusos ha sido aplicada ampliamente en áreas Medicina, Economía, Ecología, Biología, en control automático, procesamiento digital de señales, comunicaciones, sistemas expertos, etc. No obstante, las aplicaciones más significativas de los sistemas difusos se han concentrado específicamente en el área del control automático [61].

Capítulo 3

De los antecedentes

3.1. Fundamento Teórico

Las Redes Neuronales Artificiales son algoritmos matemáticos representados en un lenguaje computacional que surgieron como un intento de conseguir una formalización matemática de la estructura del cerebro. Los elementos básicos de un sistema neuronal biológico son las neuronas, agrupadas en redes compuestas por millones de ellas y organizadas a través de una estructura de capas, que constituyen un sistema con funcionalidad propia. En un sistema neuronal artificial puede establecerse una estructura jerárquica similar, de forma que una RNA puede concebirse como una colección de procesadores elementales (neuronas artificiales), conectadas a otras neuronas o bien a entradas externas y con una salida que permite propagar las señales por múltiples caminos. Un conjunto de neuronas artificiales cuyas entradas provienen de la misma fuente y cuyas salidas se dirigen al mismo destino constituyen lo que se denomina una capa o nivel, cuya agrupación conforma el sistema neuronal completo [29], [56].

La necesidad de conocer la evolución de los bioprocesos en línea ha permitido el desarrollo de varios modelos matemáticos con la finalidad de estimar las variables difíciles de medir durante el proceso. Denis Dochain en 1986 reportó la construcción de observadores de estimadores de estados y parámetros cinéticos a partir de un estado medible en línea; después describió la construcción de estimadores de estados y parámetros cinéticos a partir de los observadores clásicos tipo Luenberger y Kalman extendidos, y observadores asintóticos los cuales convergen según la dinámica del error, además, hace mención de que es posible estimar variables independiente-

mente del comportamiento cinético que se tenga de dicha variable [33].

Empleando esta teoría se han propuesto muchos modelos matemáticos para describir la producción de etanol. La dinámica de los biorreactores generalmente se describe por modelos cinéticos en los cuales las variables de estado son las concentraciones de biomasa (X), de sustrato (S) y del producto (P) y el modelado de la velocidad específica de crecimiento de la biomasa y de la velocidad de producción de etanol son los pasos más importantes. A pesar de que se han obtenido varios modelos, aún no existe una solución aceptada por todos [2].

El monitoreo en línea de incertidumbres no estructuradas o dinámicas no modeladas en procesos con comportamiento no lineal ha sido ampliamente estudiado en los últimos años [27]. Es evidente el progreso alcanzado en la tecnología empleada para el desarrollo de los sensores en línea, a pesar de ello, en el área de los bioprocesos, es frecuente la falta de información real de variables químicas y biológicas, como la concentración de biomasa, la actividad bacteriana específica, la concentración de productos intermedios, entre otras [7]. Desde la metodología propuesta por Sthepanopoulos en 1984 (citado en [26]) en donde se estiman términos cinéticos a partir de las ecuaciones de balances de masa en estado estacionario, pasando por la versión dinámica de la anterior metodología, desarrollada por Shuler y Schmith en 1995 (citados en [26]) y posteriores esquemas de observación, se ha intentado diseñar metodologías más robustas en el sentido de lograr un adecuado desempeño en la estimación correspondiente, bajo la presencia de perturbaciones en el sistema, ruido en las mediciones y no linealidades más severas [26]. Considerando lo anterior, se ha incrementado el empleo de herramientas de estimación basadas en redes neuronales, observadores no lineales, etc. [27].

Varias técnicas para la estimación de variables importantes de los procesos biotecnológicos han sido sugeridas para el desarrollo de observadores en línea así como el de controladores de bioprocesos [31]. Estas se basan en combinar la estructura del modelo obtenido con ecuaciones de balance que no necesariamente involucren modelos cinéticos [33], con la estimación de parámetros de dicho modelo a partir de una base de datos, a este sistema se le conoce como modelado de caja gris o modelado híbrido. Sin embargo, no todas estas técnicas han sido aplicables industrialmente ni han sido ampliamente aceptadas en la comunidad industrial [2].

Por otro lado el modelado difuso (borroso) ofrece una forma muy estructurada de formulación del conocimiento, capaz de proporcionarlo a partir de datos y de incorporarlo a partir de expertos. Otra propiedad importante de los modelos borrosos es su capacidad de representar sistemas no lineales continuos [2].

En los últimos años, se ha visto un gran impulso a los métodos de construcción de modelos borrosos (de Lógica difusa) a partir de datos. Muchos de estos se caracterizan por emplear técnicas de agrupamiento para dividir los datos analizados en subconjuntos y por construir modelos de tipo Takagi-Sugeno (TS) [55] a partir de dichas particiones, lo cual ha sido establecido como una de las tendencias actuales en la literatura de identificación y control inteligente. Dicha técnica se ha convertido en una herramienta práctica para el modelado de sistemas complejos debido a sus buenos resultados y a que puede describir sistemas altamente no lineales [2].

Como resultado del desarrollo de algoritmos en línea prácticos que trabajan en tiempo real, recientemente han surgido los llamados sistemas inteligentes evolutivos (*evolving Intelligent Systems-eIS*), y dentro de esa clasificación, los sistemas borrosos evolutivos (*evolving Fuzzy Systems-eFS*) [54], [53]. Estos sistemas poseen una adaptación de alto nivel que se refiere tanto a la estructura del mismo, como a sus parámetros, lo cual forma la base conceptual para el desarrollo de sistemas verdaderamente inteligentes. Si se compara con los algoritmos evolutivos convencionales (como los genéticos) que imitan el proceso evolutivo de una población de individuos (filogénesis), este nuevo paradigma evolutivo imita el desarrollo de los individuos en la naturaleza (ontogénesis) [54]. Los sensores virtuales determinan la variación de variables a partir de un algoritmo computacional y mediante el uso de una base de datos tomados de un proceso en particular. Estos sensores consideran que la evolución dinámica de todas las variables guarda una estrecha relación con respecto a cada una de las variables y con la evolución total del proceso, así que al conocer alguna de ellas se puede estimar el valor de cualquier otra [43],[22]. Por otra parte, el proceso de identificación y estimación permiten reducir ruido y algunos efectos no deseables en las mediciones del proceso. La razón fundamental por la cual se utilizan métodos basados en redes neuronales, es debido a que estas técnicas pueden utilizarse sin la necesidad del conocimiento de un modelo del proceso, a este tipo de métodos se les denomina caja negra cuando no es posible acceder al conocimiento del mod-

elo, de otra manera recibirán el nombre de caja gris y caja blanca cuando se tiene conocimiento parcial y total del modelo respectivamente, las redes neuronales permiten obtener un aproximado de una proceso cuando es considerado como caja negra, por lo cual no dependen de la modelación que se realice del proceso [56], [64],[22].

En este trabajo se analizan las variables del proceso fermentativo de producción de etanol realizado en un biorreactor alimentado mediante un sistema híbrido Neuro-difuso aplicado en línea en tiempo real, bajo la metodología descrita en el capítulo 4.

3.2. Justificación

La medición de las variables de estado de un bioproceso, en específico, la biomasa (X), el sustrato (S) y el producto (P), ha sido uno de los grandes retos de la biotecnología industrial, las técnicas de medición existentes no cubren en su totalidad las necesidades del monitoreo en tiempo real, en línea y con buena precisión. Es cierto que las políticas de control de bioprocesos en la industria se basan mayoritariamente en el empleo de técnicas para mediciones fuera de línea a través de análisis costosos y lentos en un laboratorio, ocasionando se reduzca al máximo posible su frecuencia; por eso, el SHND está diseñado para estimar la evolución de los estados de la fermentación con una precisión y eficiencia demostrable al mismo tiempo que permite controlar el proceso tras la regulación de las variables en tiempo real y en línea. No obstante, este proyecto también es un indicio de automatización para el monitoreo y control de bioprocesos, que implica menos mano de obra, confiabilidad, definir estándares de operación que se verían reflejados en la optimización de la producción, y finalmente, en la remuneración.

La teoría de Redes Neuronales Artificiales y la teoría de Control por Lógica Difusa son herramientas que han ganado espacio en el área de la biotecnología, específicamente hablando, en la parte de bioprocesos. La necesidad de aplicar nuevas técnicas para el monitoreo en línea de los procesos biotecnológicos, así como su control, ha estimulado el desarrollo de los llamados sensores virtuales computacionales o “soft-sensors” y los controladores lógicos. Esta es la razón por la que en este trabajo se ha desarrollado un Sistema Híbrido Neuro-Difuso (SHND) que es capaz de hacer estimación de los estados de mayor relevancia, como la biomasa (X), el sustrato (S) y el producto (P), a partir del CO_2 producido durante un proceso fermentativo, el SHND también induce el control de la temperatura, el pH y concentración de sustrato partir de su propia evolución, esto se logra a través del sistema de control por lógica difusa. Así, en conjunto funciona como un sistema autónomo estable que garantiza un adecuado crecimiento celular y producción de metabolitos secundarios dentro del biorreactor.

Finalmente se puede hablar de que la principal ventaja de utilizar un sistema propiamente computacional como el SHND sobre un sistema lógico de control (PLC) acoplado con sensores de monitoreo y sistemas de captura y procesamiento de datos, es sin duda, la inversión. Propiamente se demuestra

la eficacia del sensor virtual con un error de estimación inferior al de un sensor físico, con valores de 0.5% y 10, 3, 2, 1%, relativamente.

3.3. Objetivo General

Diseñar y desarrollar un sistema híbrido Neuro-Difuso para la estimación de variables en tiempo real en un proceso de fermentación tipo lote alimentado.

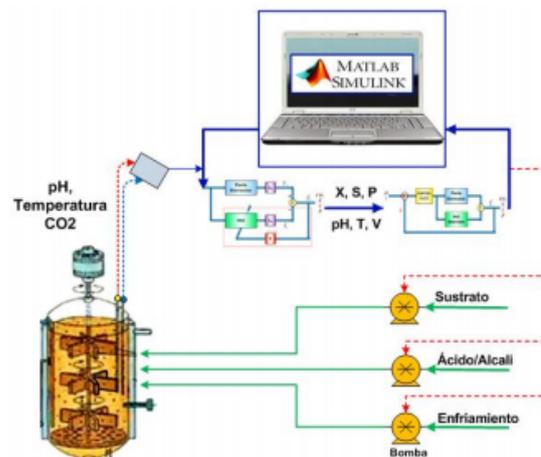
3.4. Objetivos Particulares

1. Crear el modelo para la estimación de variables en sistemas dinámicos de Bioprocesos en la plataforma de MatLab-Simulink.
2. Estudiar las variables dinámicas en el proceso de fermentación.
3. Aplicar las técnicas de Redes Neuronales Diferenciales y Lógica Difusa para el desarrollo del estimador virtual en la plataforma de MatLab-Simulink.
4. Comparar el algoritmo mediante una base de parámetros cinéticos en el biorreactor tipo batch.
5. Incrementar la eficiencia de estimación de las variables mediante el uso del sensor virtual.

Descrita la justificación de la sección 3.2 y los objetivos que se pretenden cumplir en esta tesis, se describen en el capítulo siguiente la metodología desarrollada para tales fines.

Capítulo 4

De la metodología



El Sistema Neuro-Difuso para la estimación y regulación de variables en un proceso de fermentación.

4.1. Introducción

En esta sección se describe el diseño y desarrollo del SHND a partir de la técnica de RND. En un principio se desarrolló una RND de cuarto orden para estimación de estados de la fermentación, para ello se aplicó la técnica de programación matricial en la plataforma de MatLab-Simulink. La RND funcionó como base para la construcción del NO, éste fue programado con la herramienta de Matlab-Function en la misma plataforma. La descripción

que se hace más adelante de la construcción de la RND y el NO, así como las consideraciones para lograr establecer sistemas de estimación estables y robustos se describen en este capítulo.

Después, se hace una descripción detallada acerca del desarrollo del sistema de control por Lógica Difusa, se menciona paso a paso su diseño y construcción, así como su modo de operación, con el fin de aclarar la aplicación de esta herramienta. El sistema difuso de control fue construido en la plataforma de Matlab-Simulink utilizando la librería de Fuzzy Logic, el apartado culmina con el acoplamiento al NO hasta la obtención del SHND.

Finalmente, se describe la metodología cumplida para el desarrollo de las fermentaciones alcohólicas en el biorreactor de tanque agitado de 5 L para la obtención de una base de datos y el cálculo de parámetros cinéticos característicos de la cepa. Estos datos funcionaron como un punto de arranque para el entrenamiento de la RND y el NO y finalmente como un punto comparativo entre la estimación de los estados por el NO y el monitoreo por muestreo del sistema fermentativo real.

4.2. Modelos dinámicos de cultivo Lote Alimentado

Los siguientes modelos son una modificación de los presentados en la sección 1.4 (ver apéndice B), ahora evolucionan a partir de las concentraciones de dióxido de carbono para cada tiempo, el CO_2 es el subproducto que se puede medir durante el proceso de la fermentación alcohólica en línea. Este sistema funciona como la planta de la estructura del Neuro observador tipo Luenberger.

$$\dot{C}_{CO_2} = \frac{\mu_{\text{máx}} \cdot S}{Ks + S} \cdot \frac{X}{Y_{CO_2}} \quad (4.1)$$

$$\dot{X} = \frac{\mu_{\text{máx}} \cdot S}{Ks + S} \cdot X - \frac{F_{in}}{V_t} \cdot X \quad (4.2)$$

$$\dot{S} = -\frac{\mu_{\text{máx}} \cdot S}{Ks + S} \cdot \frac{X}{Y_{XS}} - \frac{F_{in}}{V_t} \cdot [S_{in} - (\alpha_1 C_{CO_2})] \quad (4.3)$$

$$\dot{P} = \frac{\mu_{\text{máx}} \cdot S}{Ks + S} \cdot \frac{X}{Y_{XP}} - \frac{F_{in}}{V_t} \cdot [\alpha_2 C_{CO_2}] \quad (4.4)$$

$$\dot{V} = F_{in} \quad (4.5)$$

Donde, C_{CO_2} , X , S , P son las concentraciones de Dióxido de Carbono,

Biomasa, Sustrato y Etanol en $[gL^{-1}]$ respectivamente; V_t es el volumen de operación en el biorreactor en $[L]$; μ_{max} es la velocidad máxima específica de crecimiento celular en $[h^{-1}]$; K_s es la constante de saturación de *Saccharomyces cerevisiae* en $[gL^{-1}]$; F_{in} y S_{in} son el flujo de alimentación en $[gL^{-1}]$ y la concentración de sustrato en F_{in} en $[gL^{-1}]$; $\alpha_1 = 90/17,6$, $\alpha_2 = 46/44$ por la relación estequiométrica.

4.3. Desarrollo de la RND de Cuarto Orden

En un principio se programaron algunos sistemas no lineales en la plataforma de *Matlab-Simulink*, tales como los distintos tipos de cultivos en tanque agitado, con el objetivo de familiarizarse con el lenguaje de programación de este paquete y los sistemas dinámicos en estudio. El grado de complejidad de los sistemas fue incrementándose mientras se iban logrando los objetivos, es decir, se desarrolló un proceso de aprendizaje gradual, sistemas de primero, segundo, tercer y cuarto orden. Estos últimos son los sistemas de cultivo tipo lote alimentado con la RND y el NO.

La plataforma de *Matlab-Simulink* proporciona dos modos principales de programación, matricial y *Matlab function*. Con las dos se logran resultados semejantes, aunque la principal variación es la complejidad de la estructura de la RND y el NO. Con el método matricial se desarrolla paso a paso cada operación entre términos y variables a través de bloques, y el algoritmo es mucho más extenso (Eje. Figura 4.1). Con la herramienta de *Matlab function* se requiere de un programa en código el cual se carga en el bloque llamado así (*Matlab function*). Notablemente el esfuerzo requerido para cada modo de programación es distinto. Lo más importante en ambos casos es el cuidado que se tenga durante la construcción del sistema, ya que a medida que se incrementa el orden del sistema se tiene mayor probabilidad de hacer una mala conexión entre bloques y señales que pueden causar que el programa no funcione, sea inestable, se indetermine, sea lento, etc.

La figura 4.1 muestra la estructura del sistema *RND-difuso* de cuarto orden desarrollado para la estimación de los estados del proceso de fermentación. El bloque 1 corresponde al subsistema de operaciones matriciales del algoritmo de la RND (Ec.2.2), las salidas en color negro son los estados estimados \hat{X} , \hat{S} , \hat{P} , y \hat{V} , estos estados son retroalimentados al bloque de la RND, son enviados al cálculo del error (en líneas azul cielo) y finalmente

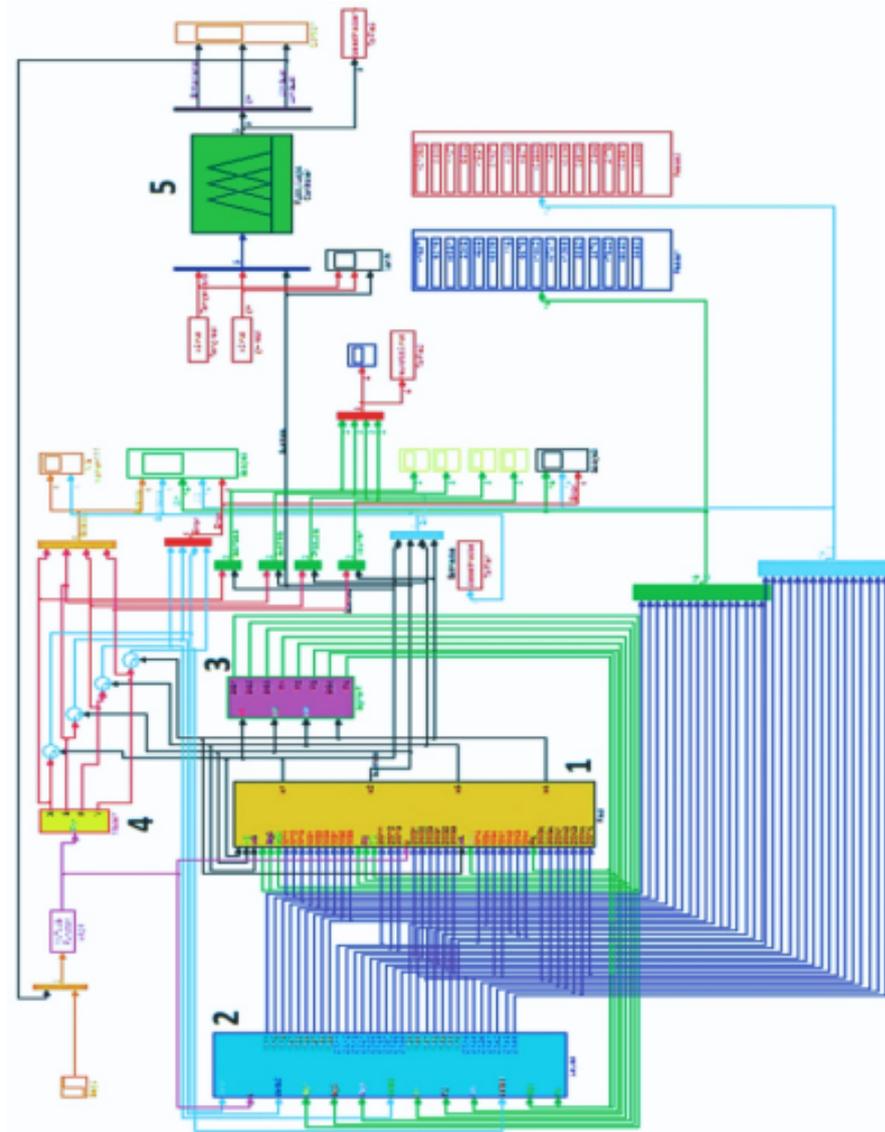


Figura 4.1: Estructura de la RND de cuarto orden en la plataforma de Matlab-simulink. Cada bloque enumerado representa un subsistema, 1) es la RND, 2) las leyes de aprendizaje, 3) funciones de activación, 4) la planta, y 5) es el sistema de control difuso.

son enviados al subsistema de las funciones de activación (3) para permitir la evolución de la RND. El bloque 2 es el subsistema que corresponde a las leyes de aprendizaje descritas por las ecuaciones 2.12 y 2.13 en el capítulo anterior, todas sus entradas corresponden a los errores obtenidos entre los estados estimados los estados de la planta (1) y los valores de salida de las funciones de activación provenientes de 3; las salidas de este subsistema (2) representan los pesos sinápticos W_1 y W_2 y son direccionados a la RND para su evolución. Finalmente el bloque 5 representa el sistema de control difuso, el cual a partir del sustrato estimado (\hat{S}) y de las bases de datos de pH y temperatura genera una señal de control para cada una de estas variables, más adelante se hará descripción precisa del funcionamiento de este sistema.

El proceso de entrenamiento de la RND se fue dando en función de la estabilización de los pesos sinápticos $W_{11}, W_{12}, \dots, W_{1n}$, y $W_{21}, W_{22}, \dots, W_{2n}$, y la convergencia del error de manera asintótica hacia cero, esto representa una mejor aproximación de estimación por parte de la RND hacia los modelos dinámicos del cultivo en lote alimentado. La “entonación” de la red depende de las matrices de estabilidad de Hurwitz (matriz A) y de las matrices de ganancia K_1 y K_2 de las leyes de aprendizaje. La matriz de estabilidad A permite seleccionar la posición de los polos del sistema no lineal en el semiplano izquierdo de coordenadas cartesianas, además, tanto la matriz A como K_1 y K_2 deben de ser matrices definidas positivas, es decir, el determinante (de cada menor) de cada matriz debe ser positivo. La elección de los polos de A y entradas de las matrices K se hizo heurísticamente debido a que cada pequeña variación modificaba significativamente la evolución de la Red.

Los parámetros cinéticos requeridos por los modelos matemáticos dinámicos del cultivo lote alimentado fueron tomados de la bibliografía, Shekar & Leland, 2006, reportaron los siguientes $\mu_{max} = 0,291h^{-1}$, $Y_{XS} = 0,49$ y $Y_{PS} = 0,51$ y Cougnon et. al., 2011 reportan una $Ks = 1,2$.

Los datos de pH y temperatura utilizados para las variables de entrada del sistema difuso fueron adquiridos de los procesos de fermentación realizados, se generó una base de datos con valores de estas variables cada 6 minutos y después se convirtieron a formato .mat para que la plataforma de Matlab pudiera reconocerlos, de esta manera pudieron ser reconocidos por el sistema difuso como variables de entrada.

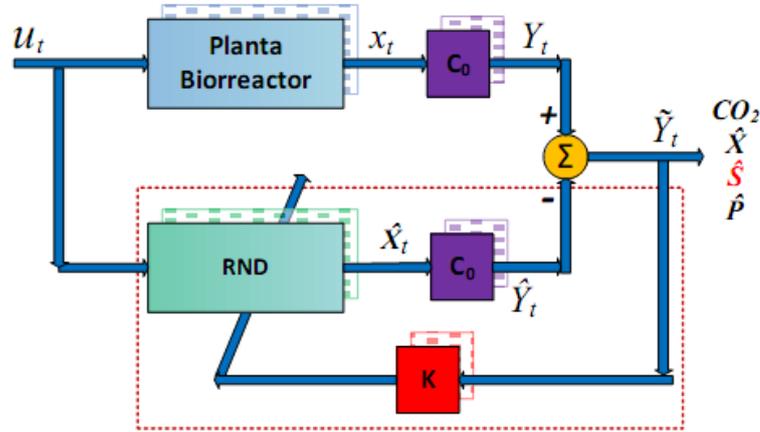


Figura 4.2: Estructura a bloques del Neuro observador de estados de tipo Luenberger.

4.4. Desarrollo del Neuro Observador tipo Luenberger

Con la experiencia adquirida en el diseño y construcción de la RND se diseñó y construyó el NO de tipo Luenberger. Para su desarrollo se aplicó el algoritmo matemático descrito en la sección 2.5 de esta tesis. En este caso se aplicó la herramienta de *Matlab-function* debido a que la complejidad del algoritmo es mucho mayor que la de la RND, las leyes de aprendizaje se modifican y se introducen nuevos términos. La estructura a bloques del NO está representada en la figura 4.2, el arreglo muestra la acción de NO al estimar los estados requeridos a partir de la entrada u_t y la salida Y_t , el recuadro verde representa la RND y los términos de C_0 y K corresponden al término característico de Luenberger. K_t es la matriz de ganancia del neuro observador la cual se obtiene por prueba y error según el comportamiento del sistema. C_0 es la matriz de controlabilidad que permite establecer las variables a estimar, en este caso x_t representa el vector de estados provenientes de la planta cuyos componentes con X , S , P y V , en ese orden, y es el vector de estados estimados por el NO cuyos componentes son \hat{X} , \hat{S} , \hat{P} y \hat{V} , en este caso C_0 está definida como una matriz cuadrada de 4×4 en la que todas sus entradas con 0 excepto la entrada $C_{0,44}$ cuyo valor es 1, este arreglo indica que solo X , S , P serán estimadas.

La figura 4.3 muestra el esquema general del NO en la plataforma de

4.4. DESARROLLO DEL NEURO OBSERVADOR TIPO LUENBERGER53

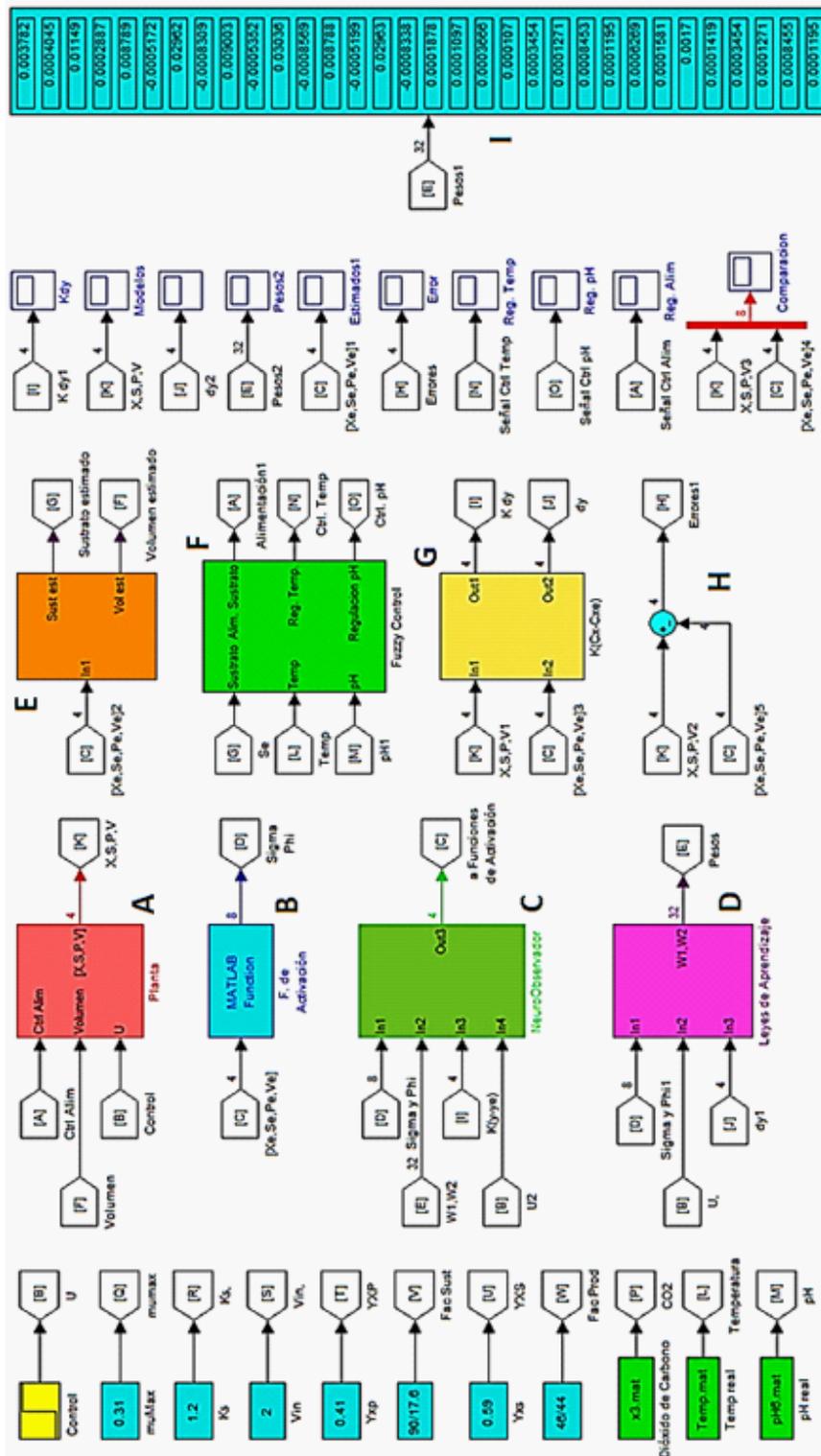


Figura 4.3: Algoritmo computacional en la plataforma de Simulink para el NO de cuarto orden.

Simulink, está representado en bloques con las salidas de las variables y señales direccionadas en modo flotante. Cada bloque desempeña una función igual de importante que los demás. El primero en color amarillo representa la señal de control, en este caso se usó un escalón ya que físicamente se puede interpretar como el flujo volumétrico de alimentación al biorreactor. Los bloques intermedios izquierdos en color azul son constantes y parámetros cinéticos que permiten la evolución de los modelos de la planta. Los tres bloques inferiores izquierdos de color verde son las bases de datos para el pH, la temperatura y el CO₂.

En la columna siguiente, el bloque **A)** es la planta y contiene los modelos cinéticos presentados en la sección 4.2 de este capítulo. El bloque **B)** contiene las funciones de activación y genera las salidas sigma y fi, las cuales son vinculadas hacia el bloque del NO (**C)** y el de leyes de aprendizaje (**D)**. El apartado **E)** separa las variables estimadas en señales independientes para que el sustrato pueda ser direccionado a la entrada del sistema de control difuso (**F)**, además se extrae el volumen ya que su dinámica depende del volumen operacional sumado al volumen por la alimentación.

4.5. Construcción del controlador difuso

El sistema de control por lógica difusa también fue desarrollado en la plataforma de *MatLab-simulink* utilizando la librería de *Fuzzy Logic*. Los pasos principales a seguir para la construcción del sistema fueron descritos en la sección 2.6.4.

Las variables de entrada para el sistema difuso fueron el pH, la temperatura y la concentración de sustrato estimado (\hat{S}) por el NO. El siguiente paso fue establecer las funciones de membresía y sus intervalos para cada una de estas variables, para ello se tomaron en cuenta intervalos como los que se muestran en la tabla 4.1. Además, resume el diseño de las funciones de membresía y sus intervalos de operación. La temperatura óptima para la fermentación alcohólica con *Saccharomyces c.* es de 30°C por ello se propuso únicamente un margen de variación de 30°C ± 10°C. El pH ideal para la Fermentación es de 5.0 pero se consideró la escala de 0 a 14 para establecer las funciones de membresía. Finalmente, la concentración de sustrato establecida como mínima para este trabajo fue de 12,5 gL⁻¹ y se manejó un intervalo de 0 gL⁻¹ a 50 gL⁻¹, donde 50 gL⁻¹ representa la concentración ideal. Cabe señalar que las concentraciones aquí establecidas son meramente

Cuadro 4.1: Diseño de las funciones de membresía para las variables de entrada y sus intervalos operacionales.

Variable de entrada	Universo de Discurso	Funciones de membresía	Intervalos funciones de membresía	Etiqueta lingüística
Temperatura [°C]	20-40	3 Triangulares	20,20,29.9	Baja
			29.5,30,30.5	Requerida
			30.1,40,40	Elevada
pH	0-14	3 Triangulares	0,0,4.9	Ácido
			4.8,5,5.2	Requerido
			5.1,14,14	Básico
Sustrato [g/L]	0-50	3 Triangulares	0,0,10	Concentración Baja
			5,12.5,20	Concentración Mínima
			15,50,50	Concentración Requerida

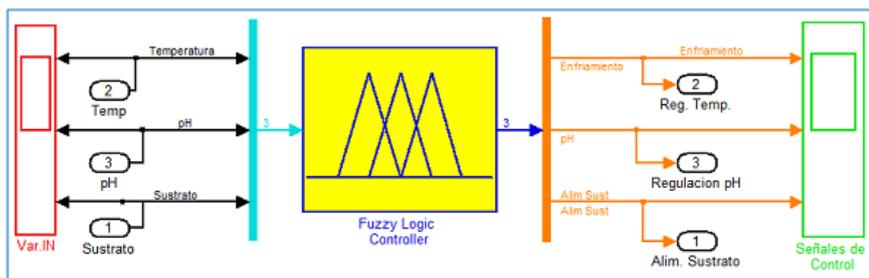


Figura 4.4: Estructura del sistema de control difuso. Variables de entrada en color negro y variables de salida en color naranja.

heurísticas ya que las concentraciones mínima e ideal pueden tomar otros valores según convenga.

El universo discurso es el conjunto U dentro del cual se encuentran las funciones de pertenencia, en otras palabras es el margen de operación dentro del cual tiene posibilidades de moverse la variable.

En la figura 4.4 se muestra la estructura de operación del sistema difuso, la entrada 1 corresponde a la concentración de sustrato estimadas por el NO, la entrada 2 y 3 corresponden a los datos de temperatura y pH provenientes de las bases de datos, respectivamente. El recuadro *Fuzzy Logic Controller* contiene vinculado el programa difuso desarrollado según las tablas 1 y 2. Las salidas contiene la señal de respuesta para la regulación de cada variable.

Cuadro 4.2: Diseño de las funciones de membresía para las variables de salida y sus intervalos operacionales.

Variable de salida	Universo de Discurso	Funciones de membresía	Intervalos funciones de membresía	Etiqueta lingüística
Regulación Térmica	0-5	3 Triangulares	0,0,2,4	Activar enfriamiento
			2,2,5,3	No activar
			2,6,5,5	Activar calefacción
Regulación pH	0-5	3 Triangulares	0,0,2,4	Alimentar ácido
			2,25,2,5,2,75	No regular
			2,6,5,5	Alimentar álcali
Alimentación Sustrato	0-5	2 Triangulares	0,0,2,6	Alimentar
			2,4,5,5	No alimentar

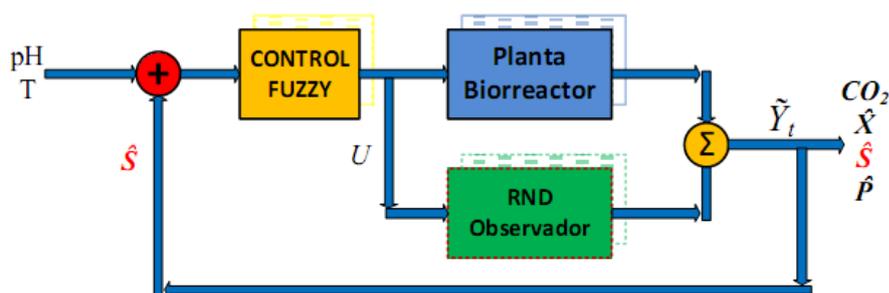


Figura 4.5: Estructura a bloques del sistema Híbrido Neuro-Difuso de estimación y regulación de variables en el proceso de fermentación.

4.6. Sistema híbrido Neuro-Difuso

Una vez construidos el NO y el sistema difuso se construyó el SHND, en la figura 4.5 se muestra la estructura a bloques del sistema. El pH, la temperatura y el sustrato estimado por el NO son las variables de entrada al sistema difuso. Las señales de control obtenidas se aplican directamente sobre la planta para su regulación, U es la señal de control que activa la alimentación de sustrato al biorreactor y a partir de la cual evoluciona el Neuro observador.

En la figura 4.6 se muestra el modo de operación del SHND, la estimación de estados de las variables de la fermentación, biomasa, sustrato y producto,

4.7. DESARROLLO EXPERIMENTAL, DE LOS CULTIVOS EN LOTE57

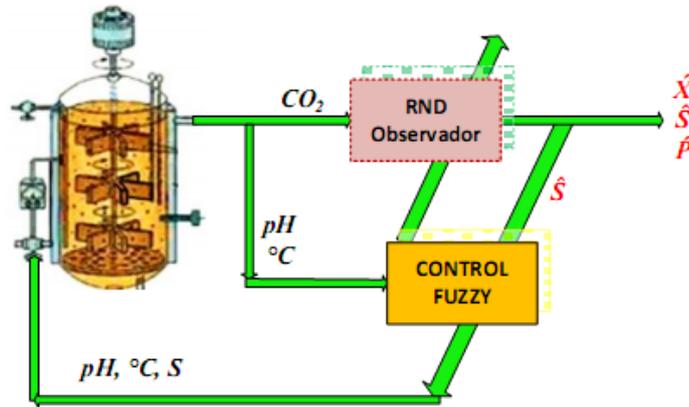


Figura 4.6: Diagrama a bloques de operación del SHND en función de la concentración de CO_2 , el pH y la temperatura sensados directamente del biorreactor.

a partir de la dinámica de CO_2 producido durante la fermentación alcohólica en el biorreactor.

4.7. Desarrollo experimental, de los cultivos en lote

El desarrollo de la fermentación alcohólica consta de varias etapas, a continuación se describe cada una de ellas así como los pasos principales para su realización.

4.7.1. Preparación de inóculos

La elaboración de los inóculos fue realizada por etapas, el medio de cultivo utilizado se describe en el apéndice C. Una vez preparado el medio se ajustó el pH a 5.0, hay que recordar que el pH puede descender con el proceso de esterilización por el incremento de temperatura. Con el pH listo se vertieron 100 mL de medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de gasa y algodón, se prepararon cinco matraces. Por otra parte, se adicionaron 10 mL de medio de cultivo en tubos de ensaye con taparroscas, se prepararon cinco tubos. Se llevó a cabo el proceso de esterilización a $120^{\circ}C$ y 15 lb in^{-2} durante 15 minutos.

Una vez esterilizados los tubos y los matraces se dejaron enfriar hasta aproximadamente los $30^{\circ}C$ y se etiquetaron del 1 al 4, el quinto fue marcado como control.

El proceso de inoculación se realizó con *Saccharomyces cerevisiae* cepa *ATCC – 9763* (CINVESTAV) crecida en medio Sabouraud (descrito en el apéndice C) en placas de Petri. En condiciones asépticas se tomó una azada de *Saccharomyces* y se vertió en un tubo de ensaye, se agitó suavemente y se sometió a incubación a $30^{\circ}C$ y 200 rpm. Este procedimiento se repitió con los tres tubos restantes dejando el control para comparación de crecimiento. El tiempo de incubación para los tubos fue de 0-24 horas.

Los matraces Erlenmeyer fueron inoculados en condiciones asépticas con los cultivos ya crecidos en tubos con taparrosca. Se sometieron a las mismas condiciones y tiempo de incubación. Nótese que cada volumen corresponde al 10 % *v/v* de la siguiente escala de cultivo.

Para la propagación y mantenimiento de la cepa se utilizó el medio Sabouraud. El cultivo se realizó en placas de Petri cada 20 días, aproximadamente. La incubación fue a $30^{\circ}C$ durante 24 horas [57].

4.7.2. Caracterización de los inóculos

Se prepararon 3 matraces Erlenmeyer y tres tubos con taparrosca tal y como se describió en el apartado anterior, se dejó un matraz y un tubo como controles, los demás fueron inoculados cada uno con una “azada” de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones asépticas. Los cuatro cultivos se sometieron a incubación a $30^{\circ}C$ y 200 rpm.

Cada uno de los cuatro cultivos fue muestreado cada determinado número de horas (Apéndice D). Las muestras tomadas fueron de 1 *mL* en tubos Eppendorf de 1.5 *mL*. Se analizaron por espectrofotometría, según la técnica desarrollada por [52] para determinar la concentración de biomasa, ver apéndice E.

Se obtuvieron las concentraciones de biomasa correspondientes a cada tiempo de muestreo. Se determinó la fase de crecimiento exponencial de la levadura y su velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}). Esta operación fue fundamental porque en el momento en que los inóculos alcanzaron la máxima velocidad de crecimiento fue inoculado el biorreactor.

4.7.3. Fermentación en el Biorreactor

En esta sección se describen las cinéticas de fermentación en lote realizadas para la obtención de la base de datos de biomasa, dextrosa y etanol a determinados tiempos de muestreo, además se explican las técnicas desarrolladas para el análisis de las muestras. Se calcularon también los parámetros cinéticos, velocidades de crecimiento celular y rendimientos, a partir de los cuales se entrenó la RND y NO.

El acondicionamiento del fermentador se llevó a cabo antes de ser esterilizado, y el montaje para la conexión de los sensores y sistema de agitación se llevó a cabo después de realizar dicho proceso.

Las cinéticas realizadas en *lote*, para la obtención de la base de datos y para la obtención de los parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae*, se trabajaron a un volumen de operación de 5 L en un Biorreactor Modelo Bioflo-110-Fermentor/Biorreactor de 5 L con PLC-New Brunswick Scientific y controlado por el software NBS-Biocomand Plus 3.30.

Para las dos fermentaciones desarrolladas se usó el medio de cultivo descrito en el apéndice C tomado de [30]. El pH inicial fue de 5.0. Posteriormente, se vertió en el Biorreactor y se esterilizó a 120°C y 15 lb in^{-2} durante 15 minutos, el sensor de pH se introdujo también para su esterilización. Una vez estéril, se dejó el biorreactor a temperatura ambiente hasta que alcanzó los 30°C para ser inoculado con el 10 % (*v/v*) utilizando los cultivos crecidos en matraces Erlenmeyer. Las condiciones de operación para el biorreactor fueron de $30^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, y pH de $5,0 \pm 0,5$ a una velocidad de agitación de 200 rpm y en condiciones anaeróbicas. Para regular el pH se utilizó NaOH como álcali al 10 % (*m/v*) y HCl como ácido al 10 % (*m/v*), estas soluciones también fueron esterilizadas. La figura 22 describe el proceso de elaboración de inóculos, fermentación y análisis de las muestras.

La fermentación en lote fue muestreada cada determinado tiempo con la finalidad de obtener una distribución adecuada de datos que mostraran la evolución de las variables del sistema durante el proceso de fermentación.

4.7.4. Análisis de muestras

Las muestras fueron tomadas de acuerdo a la tabla del apéndice F, se etiquetaron indicando la hora y fecha del muestreo y se metieron a congelación para su posterior análisis al término de la fermentación.

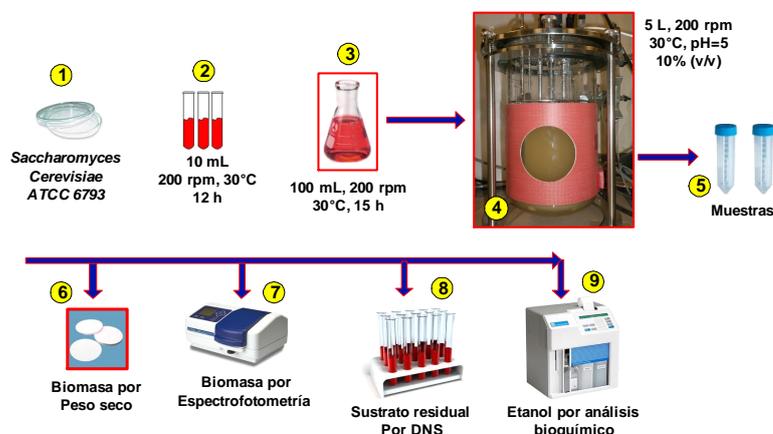


Figura 4.7: Elaboración de inóculos y fermentación en el biorreactor con muestreo para cuantificación de biomasa y azúcares residuales durante el proceso.

El tratamiento de las muestras se llevó a cabo de la siguiente manera;

Cuantificación de Biomasa

El crecimiento de la biomasa para los cultivos realizados en el fermentador fue cuantificado por la técnica de peso seco y por espectrofotometría. Para peso seco, se puso a peso constante papel filtro de Nitrato de celulosa con poro de $0,45 \mu\text{m}$ en una estufa (Modelo 05015-51 de Cole Parmer) a 70°C durante 24 horas, posteriormente se dejó enfriar en un desecador y se tomó el peso del papel ($Peso1$). Las muestras tomadas de las cinéticas se filtraron a vacío, se midió el volumen del filtrado y se volvió a colocar el papel filtro con la biomasa a peso constante a 70°C durante 24 horas. Finalmente, se dejaron enfriar los papeles en un desecador y se tomó su peso ($Peso2$). La diferencia de pesos ($Peso2 - Peso1$) es la biomasa seca contenida en el volumen de la muestra. De esta relación se calcula la concentración de células en gramos por litro de medio para cada tiempo en que fue muestreado el biorreactor.

El crecimiento de la biomasa fue también determinado por la técnica de densidad óptica, en la cual se utiliza un espectrofotómetro de UV-V (Espectrofotómetro UV-visible de mono haz 320-1000 nm, 6320D, Jenway) a 540 nm . Para ello fue necesario establecer una correlación entre el peso seco y la densidad óptica tal y como se muestra en el apéndice E.

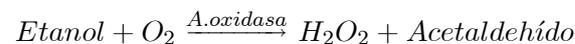
4.7. DESARROLLO EXPERIMENTAL, DE LOS CULTIVOS EN LOTE61

Cuantificación de Dextrosa Residual

Los azúcares reductores se cuantifican por medio de la técnica de DNS, según el apéndice G. En este caso, en lugar de poner un mililitro de la solución estándar se puso un mililitro de la solución problema (el filtrado de las muestras) y se realizó el mismo procedimiento empleado en la obtención de la curva patrón. Para las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro mayor de 0.6 de absorbancia, durante el análisis de las muestras, se realizaron diluciones repitiendo la técnica. Para el cálculo del total de azúcares reductores se utilizó la ecuación correspondiente a la curva patrón y se consideró el factor de dilución realizado para las muestras que lo requirieron.

Cuantificación de Etanol

El etanol fue cuantificado con ayuda de un analizador bioquímico, YSI 2700 SELECT por reacción enzimática. La reacción es directa sobre el etanol que se encuentre disponible en la muestra, y se da a través de la enzima Alcohol Oxidasa inmovilizada en la membrana. La reacción es la siguiente:



El rango de medición de etanol en el equipo es de $0 - 2 \text{ gL}^{-1}$, por lo que las muestras requirieron de diluciones 1 : 10 con agua destilada para poder ser cuantificables. El equipo de análisis requirió ser calibrado según el Apéndice H.

Comportamiento de pH y Temperatura en la Fermentación

El comportamiento de la temperatura durante el proceso de la fermentación fue monitoreado en línea, cada 6 minutos. El biorreactor contó con un sensor de vidrio para el monitoreo del pH y con un termopar metálico para el monitoreo de la temperatura. Los datos de dichas variables iban siendo guardados por el equipo de computación conectado al PLC del biorreactor a través del programa Biocomand Plus 3.30.

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1. Introducción

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en la fermentación alcohólica en lote y los parámetros cinéticos, como son velocidad específica máxima de crecimiento celular (μ_{max}), tasa de consumo de sustrato ($-r_s$), rendimiento global de producción de biomasa a partir de sustrato (Y_{XS}), y rendimiento global de producción de etanol a partir de sustrato (Y_{PS}).

Finalmente, se dan a conocer los resultados de las simulaciones del proceso de fermentación, primero a partir de los modelos dinámicos del reactor tipo lote alimentado, y después la simulación a partir de los modelos con los parámetros cinéticos reales con retroalimentación que induce la alimentación al biorreactor controlada por el algoritmo híbrido RND-difuso y SHND.

5.2. Datos Experimentales, Fermentación alcohólica en lote

La tabla 5.1 muestra los parámetros cinéticos obtenidos de las dos fermentaciones realizadas en lote, de la caracterización de los inóculos en los tubos de ensaye y los matraces Erlenmeyer. Contiene los rendimientos de crecimiento de biomasa respecto al consumo total de sustrato, y rendimientos de producción de etanol respecto a el consumo de sustrato vía glucólisis.

La μ_{max} [h^{-1}] corresponde a la velocidad específica de crecimiento celular en la fase exponencial de los cultivos y las fermentaciones. Los rendimientos fueron calculados de acuerdo a los consumos totales de sustrato entre el

Cuadro 5.1: Rendimientos totales de las dos fermentaciones con sus parámetros cinéticos y velocidades específicas de crecimiento máximas para los inóculos en tubos de ensaye y matraces Erlenmeyer. La K_s fue tomada de la bibliografía. Concentración inicial de 32 g de dextrosa/L.

Fermentación	μ_{max} [h ⁻¹]	S consumido [gL ⁻¹]	Y_{XS}	Y_{PS}	K_s [gL ⁻¹]
Tubos	0.19				
Matraces	0.26				
Fermentación 1 [5 L]	0.30	31.0	0.7	0.3	1.2*
Fermentación 2 [5 L]	0.29	30.5	0.7	0.43	

tiempo 0 y final.

En [30] se reportan velocidades específicas de crecimiento entre 0.262 y 0.085 h⁻¹, 0.137 y 0.153 h⁻¹ y velocidades máximas de crecimiento de entre 0.297 y 0.354 h⁻¹ utilizando el mismo medio de cultivo. En este estudio las velocidades máximas de crecimiento fueron de 0.30 y 0.29 h⁻¹ para las fermentaciones 1 y 2 por lo que se puede decir que se obtuvieron velocidades de crecimiento semejantes a las reportadas en la literatura. Por otra parte, se tiene el conocimiento de que la misma cepa alcanzó una μ_{max} de 0.19 y 0.13 h⁻¹ en fermentaciones desarrolladas por [63], del CINVESTAV, pero en condiciones de aireación y en lote alimentado a un volumen de operación de 30 L.

Con respecto a la producción de etanol, en [25] se reporta que 17 gramos de dextrosa son necesarios para la producción de 1° de etanol, que es igual a 16% v/v, entonces, considerando una concentración inicial de 32 gL⁻¹ de dextrosa se pueden establecer las siguientes correlaciones para el cálculo de la concentración de etanol alcanzada para cada fermentación.

$$\begin{aligned} & \frac{1 \text{ mol de Dextrosa}}{180 \text{ g Dextrosa}} \times \frac{31 \text{ g Dextrosa consumidos}}{L \text{ Fermento}} \times 0,3 \\ = & \frac{0,0516 \text{ mol de Dextrosa se convirtieron a etanol}}{L} \end{aligned}$$

Y además:

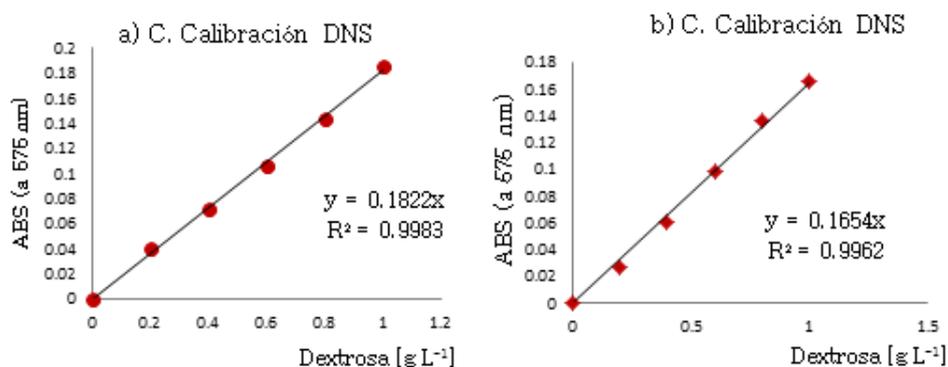


Figura 5.1: Curvas de calibración para la caracterización del reactivo de DNS, a) regresión lineal utilizada para realizar los cálculos de consumo de sustrato en la fermentación 1. La curva b) se utilizó para realizar los cálculos correspondientes de la fermentación 2.

$$\frac{0,46 \text{ g Etanol}}{1 \text{ mol de etanol}} \times \frac{2 \times 0,0516 \text{ mol de Etanol roducidos}}{L}$$

$$= 0,47 \frac{\text{g Etanol producidos}}{L}$$

Además considerando que la densidad del etanol es de 0.789 g cm^{-3} , el volumen de etanol producido para la cinética 1 es de 6.05 mL de etanol por litro de medio exhausto.

Realizando los mismos cálculos para la fermentación 2, se produjeron 8.48 mL de etanol por litro de medio.

Para la cuantificación de la dextrosa residual de las muestras tomadas en las fermentaciones 1 y 2 se utilizaron las curvas patrón a) y b) de la figura 5.1, respectivamente. La curva a) se obtuvo con un coeficiente de correlación de 0,9983 y la b) de 0,9962, esto indica una buena linealización de los datos y quiere decir que la ecuación obtenida es representativa del proceso ya que R^2 es mayor a 0,98 [57].

5.3. Caracterización de inóculos

La figura 5.2 muestra el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en tubos de ensaye y matraces Erlenmeyer. De esta manera se hizo la identificación de las etapas de su crecimiento, siendo las más importante, la fase

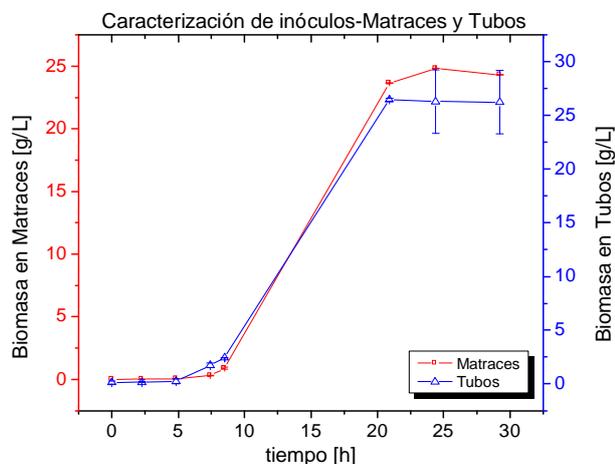


Figura 5.2: Curvas de crecimiento de *Saccharomyces c.* en tubos de ensayo (azul) con una $\mu_{max} = 0,19 \text{ h}^{-1}$ y una concentración de dextrosa de 32 gL^{-1} . También se muestra el crecimiento en matraces Erlenmeyer de 250 mL (rojo), presentaron una $\mu_{max} = 0,26 \text{ h}^{-1}$.

exponencial. Se ha demostrado que la fase *lag* de adaptación celular dura las primeras nueve horas del cultivo aproximadamente; es importante considerar que la fase exponencial de crecimiento se lleva a cabo entre las 9 y 22 horas en ambos sistemas, tubos y matraces, por lo que el biorreactor debe ser inoculado durante este periodo para garantizar la máxima velocidad de crecimiento celular y por lo tanto la máxima tasa de producción.

5.4. Fermentación 1

El consumo de sustrato así como el crecimiento de biomasa se esquematizan en la gráfica de la figura 5.3, el consumo de dextrosa se dio a una tasa de $rs = -3,68 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$. La eficiencia de esta fermentación es del 96.84 % respecto al total de dextrosa consumida y la concentración inicial. El rendimiento es mayor respecto a otros valores reportados de 86.19 % en cultivos tipo batch, y semejante a 96.22 % en fed batch [28].

El consumo de dextrosa no termina cuando la concentración ha llegado a cero, se puede observar que se mantiene una pequeña concentración de sustrato desde la hora 7.5 hasta el final del proceso, este fenómeno se da

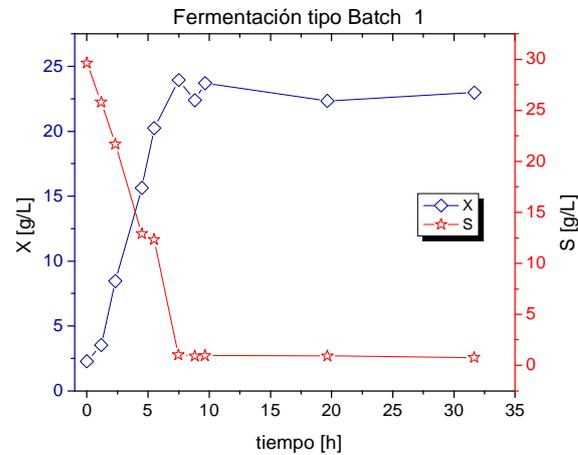


Figura 5.3: Dinámica de la fermentación 1 en el biorreactor de 5 litros. La velocidad de consumo de sustrato fue de $rs = -3,68 \text{ g L}^{-1}h^{-1}$. La velocidad específica de crecimiento máxima alcanzada fue de 0.30 h^{-1} .

porque existe un cambio metabólico en *Saccharomyces cerevisiae*, hay que recordar que cuando se agota la fuente de carbono la levadura disminuye su crecimiento exponencial entrando a una etapa diáuxica por un corto periodo de tiempo, en este momento es cuando adopta un metabolismo respiratorio y termina el fermentativo. Finalmente, las levaduras entran en la fase posdiáuxica y toman como fuente de carbono al etanol sintetizado durante la fase exponencial [16].

La figura 5.3 representa la dinámica de la fermentación 1 durante 32 horas. El consumo de sustrato y el crecimiento celular muestran un comportamiento casi lineal, y se estabilizan al momento de que se consume casi en su totalidad el sustrato. En este caso, se puede hacer referencia a que la eficiencia del proceso depende del tipo de cultivo que se lleve a cabo, lote, lote alimentado o continuo [28].

El rendimiento mostrado en la tabla 5.1 fue calculado a partir del rendimiento de crecimiento celular con la relación $Y_{XS} + Y_{PS} = 1$.

El pH y la temperatura fueron sensados durante cada fermentación. En la figura 5.4 se muestra la evolución de la temperatura y el pH durante la fermentación 1. El pH fue regulado manualmente y la temperatura se reguló automáticamente por el PLC.

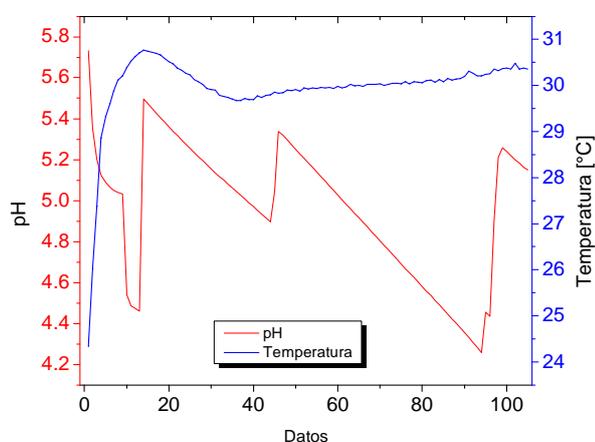


Figura 5.4: Comportamiento de la temperatura (línea azul) y pH (línea roja) durante la fermentación 1. La temperatura fue auto regulada por el sistema con una precisión cercana a los 30°C . El pH se reguló manualmente.

Los datos se guardaron cada tres y seis minutos, entonces durante las primeras seis horas (120 datos aproximadamente) de la fermentación se obtuvo un descenso significativo del pH, esto se debe al consumo de los nutrientes (iones sulfato y fosfato, y producción de ácidos orgánicos secundarios) y generación de metabolitos secundarios. Posteriormente, con el consumo de sustrato el pH comenzó a incrementar lentamente hasta alcanzar un valor de $\approx 5,45$, probablemente por la acumulación de etanol quien presenta un pH neutro en soluciones acuosas.

La temperatura tuvo un comportamiento de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fue regulada por una chaqueta de calefacción automática controlada por el PLC. Además, no fue necesario implementar el sistema de enfriamiento hidráulico ya que la temperatura ambiente permitió la pérdida de calor de manera natural y eficiente.

5.5. Fermentación 2

Los resultados obtenidos de la fermentación 2 son muy semejantes a los de la fermentación 1. Ambas fermentaciones fueron desarrolladas en condiciones estándar según la caracterización de los inóculos.

En la figura 5.5 está representada la evolución de los estados durante la

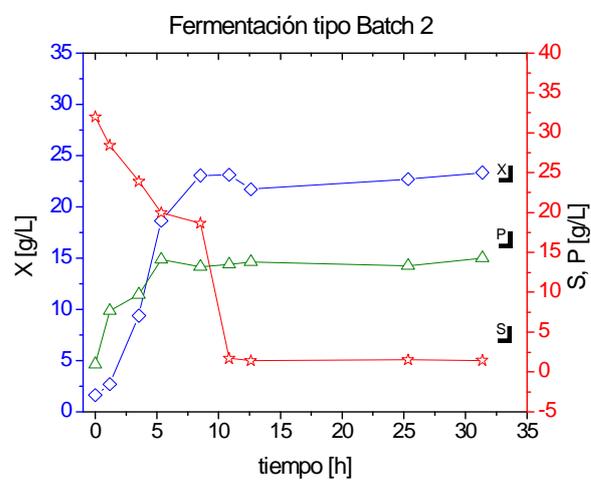


Figura 5.5: Dinámica de la fermentación 2 en el biorreactor de 5 litros. La velocidad de consumo de sustrato fue de $rs = -3,54 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$. La velocidad específica de crecimiento máxima alcanzada fue de 0.29 h^{-1} .

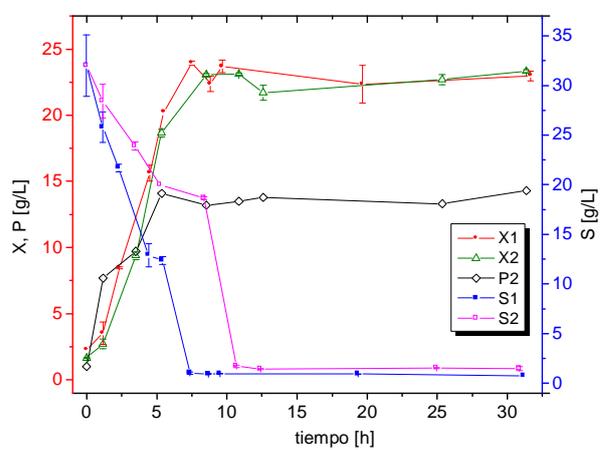


Figura 5.6: Comparación entre la fermentación 1 y 2. X1 y X2 representan la biomasa de ambas fermentaciones y muestran comportamientos semejantes y en algunos puntos significativos entre sí mismos. S1 y S2 son los consumos de sustrato y P2 es la concentración de etanol.

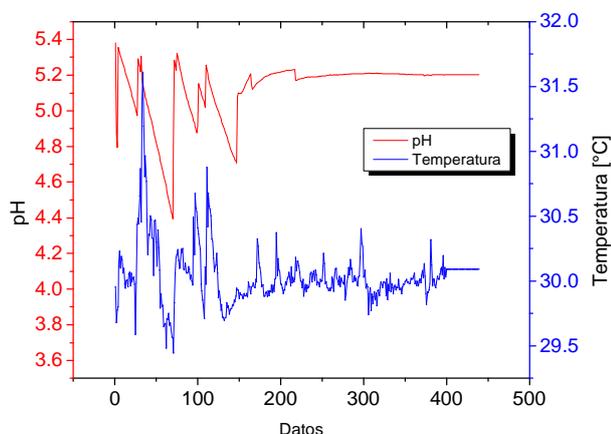


Figura 5.7: Comportamiento de la temperatura (línea azul) y pH (línea roja) durante el lote de fermentación 2. La temperatura fue auto regulada por el PLC y el pH fue regulado manualmente, cada pico arriba de la línea roja muestra el ajuste del mismo.

fermentación 2, el comportamiento de sustrato (S), biomasa (X) y producto (P) fueron obtenidos del análisis de las muestras tomadas del biorreactor. La velocidad de consumo de sustrato fue de $rs = -3,54 \text{ g L}^{-1}h^{-1}$, con un comportamiento semejante a la fermentación 1. En esta fermentación tuvo una eficiencia del 95.21 % y se alcanzó una velocidad específica máxima de crecimiento celular de 0.29 h^{-1} . Se alcanzó una concentración de aproximadamente 22.5 g L^{-1} de biomasa.

Al igual que en la fermentación 1 se obtuvieron los datos de pH y temperatura cada 3 y seis minutos. En la figura 5.7 se expresa el comportamiento de estas dos variables.

Cada pico en la gráfica del pH muestra la regulación manual realizada tras el descenso acelerado del mismo, desde 5.4 hasta 4.4 en la parte inicial de la fermentación, tal y como ocurrió en la fermentación anterior.

La temperatura muestra un comportamiento periódico con una variación de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, que para efectos de la fermentación es bueno.

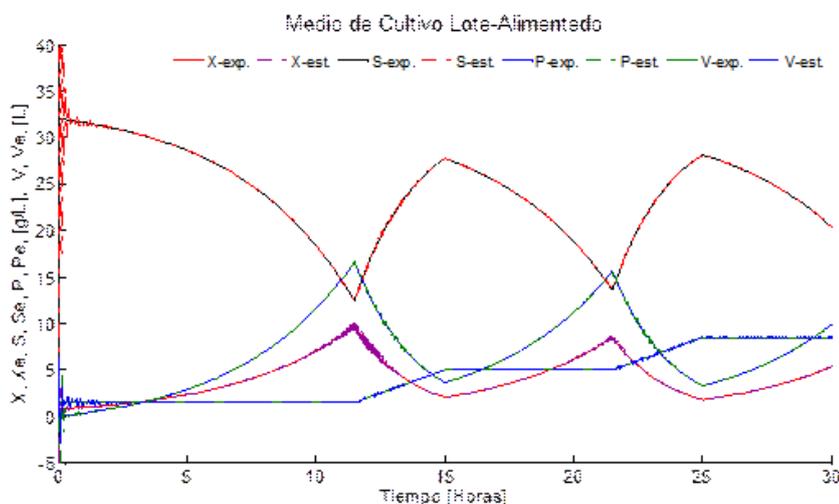


Figura 5.8: Simulación del cultivo tipo lote alimentado con señal de control por pulsos y con parámetros cinéticos tomados de Shekar & Leland, 2006.

5.6. Procesamiento numérico

En la figura 5.8 se muestra la simulación realizada a partir de los modelos dinámicos del cultivo tipo lote alimentado descritos en la sección 1.2.2. Esta simulación se realizó con los parámetros cinéticos reportados por [32]. EL comportamiento es periódico con alimentación por pulsos, en este caso el flujo de alimentación funciona como la señal de control que hace evolucionar la RND. La alimentación se ve reflejada directamente en el cambio de volumen operacional V y \hat{V} , por lo tanto incrementa la concentración de substrato S y \hat{S} , diluye la biomasa X y \hat{X} , y el producto P y \hat{P} . Esta simulación se realizó como parte del entrenamiento de la RND. *Exp* significa que es la variable calculada por el modelo matemático y *est* es la variable estimada por la RND.

De igual manera, las figuras 5.9 y 5.10 demuestran la efectividad de la RND durante la identificación de la misma hacia el proceso de fermentación. El objetivo de estas imágenes es el de esquematizar la convergencia de la RND con el modelo durante la primera media hora de simulación.

Estas son simulaciones muy eficientes comparadas con las estimaciones hechas por otros observadores como el FKE y Redes Neuro Difusas Adaptables para la estimación de estados en fermentaciones tipo lote alimentado

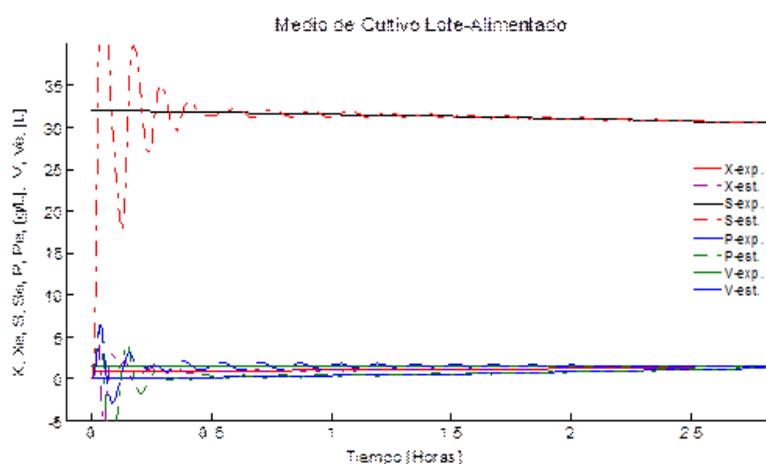


Figura 5.9: Convergencia de la RND con el modelo del cultivo tipo lote alimentado, el error disminuye rápidamente y la estabilidad de la estimación se alcanza a la media hora del proceso, aproximadamente.

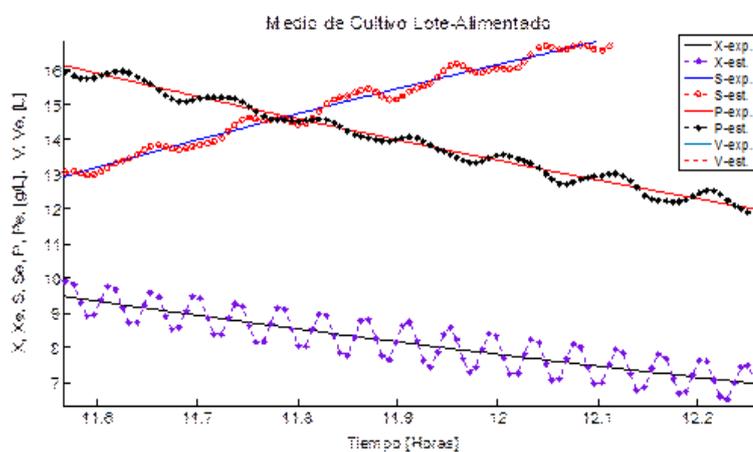


Figura 5.10: Seguimiento de la RND durante la evolución de la biomasa (S -estimado y S -exp), el producto (P -estimado y P -exp) y de la biomasa (X -estimada y X -exp). La notación “exp” hace referencia a los estados proporcionados por los modelos dinámicos del RLA.

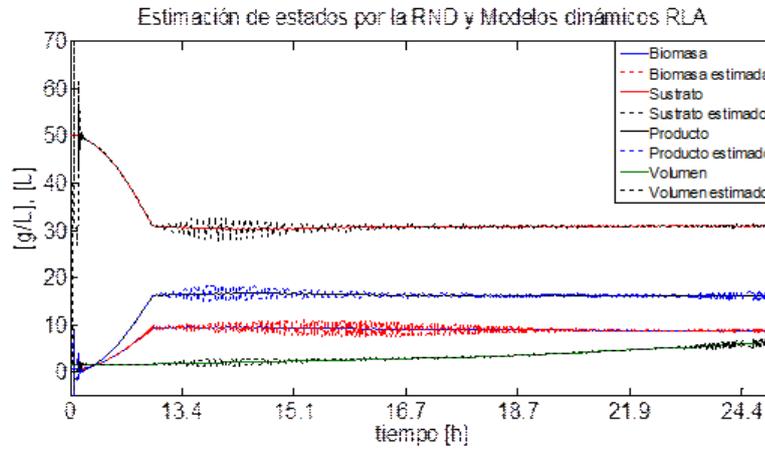


Figura 5.11: Estimación de estados de la fermentación por el sistema RND-difuso. Las líneas punteadas muestran la identificación que realiza la RND de los estados fermentativos mientras que las líneas continuas representan la dinámica de los modelos matemáticos.

reportadas en [41], [2], respectivamente.

En la figura 5.11 se muestran los resultados obtenidos al realizar la estimación de los estados de la fermentación a partir de los modelos dinámicos en lote alimentado y con los parámetros cinéticos obtenidos en la fermentación 1. Esta simulación se desarrolló sin tomar en cuenta la dinámica de los estados en función del CO_2 .

La dinámica obtenida fue estable para X , S y P ya que el control de la alimentación de sustrato se realizó con el sistema difuso. En esta ocasión se hizo la suposición de una concentración inicial de dextrosa de 50 g L^{-1} , y se consideró una concentración mínima requerida de 30 g L^{-1} . Las pequeñas oscilaciones que presenta la RND se deben a que el sistema difuso busca la estabilidad en la concentración del sustrato alimentando cada que es menor a 30 g L^{-1} (por muy pequeña que sea la diferencia) y dejándolo de hacer cuando se alcanza la misma. Es necesario mencionar que el volumen de operación del biorreactor fue de 5 L , pero no se tomó en cuenta porque se quería mostrar la estabilidad que logra el control difuso durante la alimentación de sustrato y por lo tanto el incremento de volumen que se refleja en la dilución de la biomasa y el producto.

Ya que es necesario comprobar la efectividad de la estimación realizada

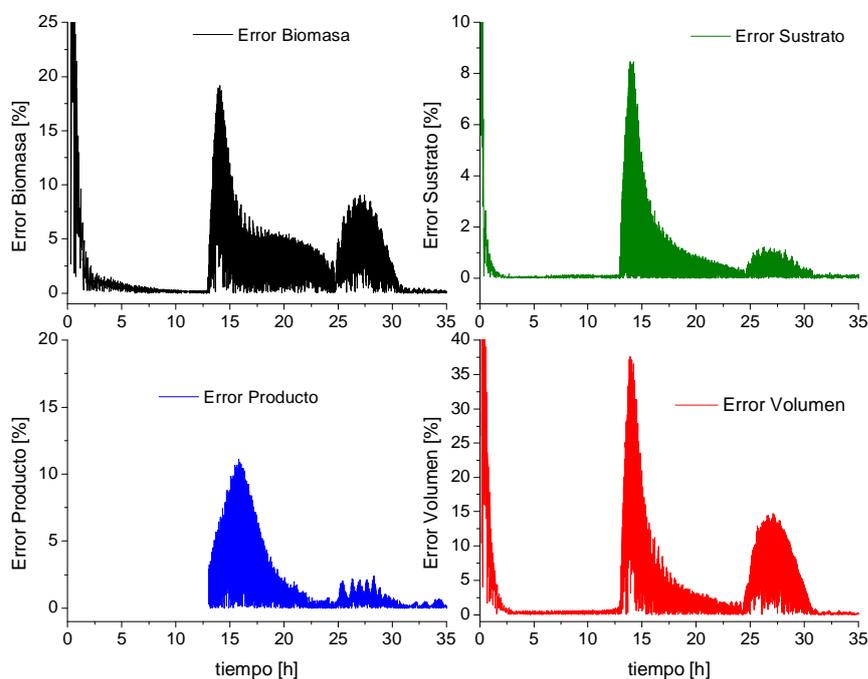


Figura 5.12: Errores relativos respecto a la estimación de estados durante la fermentación por la RND.

por la RND con alimentación de dextrosa al sistema regulada por el sistema difuso, se muestran los errores relativos calculados respecto a la dinámica seguida por los modelos matemáticos. En la figura 5.12 están representados cada uno de los errores relativos de estimación, se observa un comportamiento semejante entre los cuatro errores como si fuesen dos campanas de Gauss continuas. Los picos más grandes de error corresponden a la etapa de inicio de la alimentación de sustrato que induce el sistema difuso, esto es, entre más grandes son las oscilaciones de la RND durante la estimación, el error se incrementa. Estos errores se podrían disminuir un poco si se hace más robusto el controlador difuso. Tal y como se describen los intervalos para cada función de membresía (**Tabla 2**) pueden ser ajustados, por ejemplo, bastaría con disminuir el rango de tolerancia para la concentración requerida y la mínima requerida. No obstante, para la fermentación es un buen sistema de control, esto no garantiza que sea una muy buena estimación.

El intervalo de incertidumbre con errores elevados es de muchas horas, de las 13 h a las 25 h para la estimación de biomasa, y de las 13 h a las

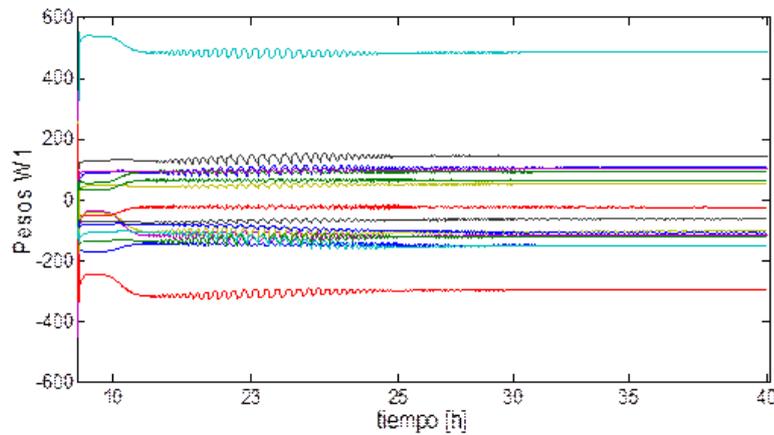


Figura 5.13: Evolución de los pesos $W1$ en la RND.

20 h para el volumen, el sustrato y la biomasa, por su parte, tienen errores más pequeños pero de igual manera se mantienen durante periodos largos de tiempo, esto no es favorable para la estimación de variables ya que se puede caer en un monitoreo erróneo del comportamiento del proceso.

A continuación se muestra la evolución de los pesos sinápticos $W1$ (Figura 5.13) y $W2$ (Figura 5.14), durante la evolución del sistema RND-difuso. La estabilidad de los pesos significa que el sistema es estable y que la RND ha aprendido la dinámica de la planta. Las pequeñas oscilaciones inician cuando inicia la intervención del sistema difuso, de igual modo, los pesos buscan su estabilidad después de las 25 horas en $W1$ y después de las 32 para $W2$. El valor que adopten no importa siempre y cuando sea constante.

5.6.1. Sistema Híbrido Neuro-Difuso

La simulación que se muestra en la figura 5.15 es el resultado de la modificación de los modelos matemáticos dinámicos del cultivo lote alimentado en función del CO_2 monitoreado en la planta (**Sección 4.2**). Los parámetros cinéticos utilizados en estos modelos son los obtenidos de la fermentación 2. Los datos de CO_2 aquí utilizados fueron calculados de los valores de etanol obtenidos en la fermentación 2 multiplicados por un factor.

A continuación se muestra la estimación de los estados de la fermentación por el SHND (Figura 5.16) a partir de una base de datos de CO_2 diseñada. En esta simulación se emplearon los parámetros cinéticos obtenidos en la

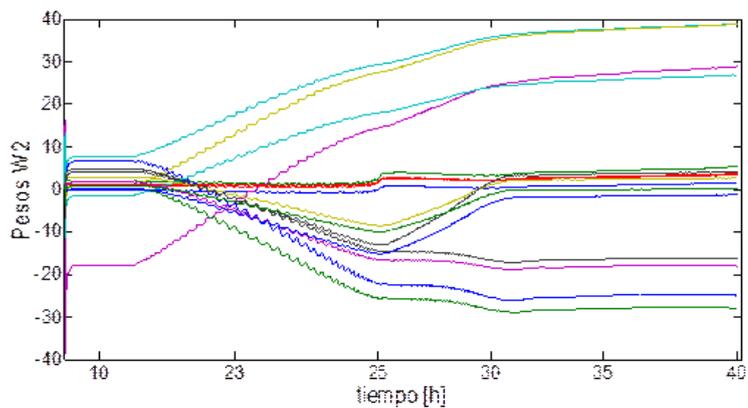


Figura 5.14: Evolución de los pesos $W2$ en la RND.

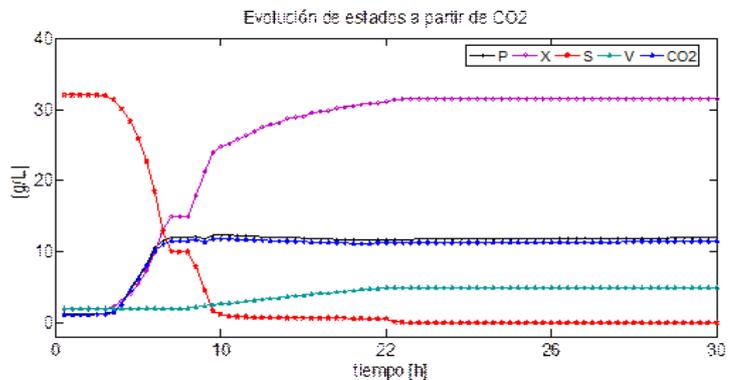


Figura 5.15: Dinámica de los modelos matemáticos del cultivo lote alimentado que evolucionan a partir de las concentraciones de CO_2 sensado durante la fermentación alcohólica. En rojo se representa el consumo de sustrato, en magenta el crecimiento celular, en negro el incremento de etanol, en azul marino el incremento en la concentración de dióxido de carbono y en color azul turquesa el incremento de volumen hasta los 5 L de operación.

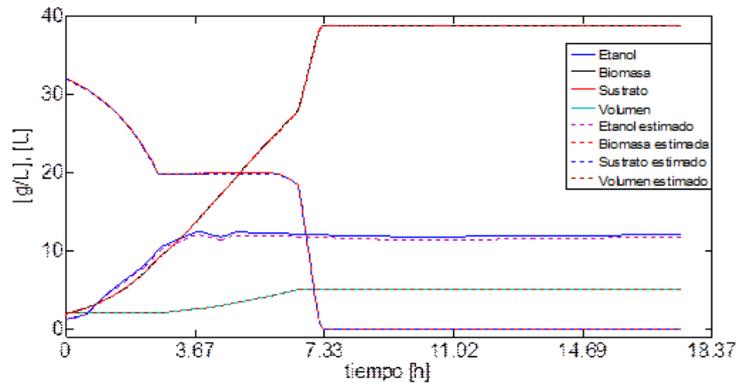


Figura 5.16: Estimación de estados de la fermentación por el SHND. Los parámetros cinéticos utilizados aplicados son los obtenidos de la fermentación 2. Las líneas punteadas representan la estimación de los estados por el NO.

fermentación 2, la concentración inicial de sustrato es de 32 g L^{-1} , y la concentración inicial de biomasa al tiempo cero fue de $1,65 \text{ g L}^{-1}$.

El SHND muestra mayor estabilidad en cuanto a la estimación de los estados en comparación a la estimación obtenida por la RND, en el primero ya no hay oscilaciones por la acción del sistema de control difuso, además la evolución de las variables depende únicamente de la concentración de CO_2 medida del biorreactor.

Las gráficas de la figura 5.18 muestran los errores relativos porcentuales de la estimación de X , S , P y V en la fermentación con respecto a la evolución de los estados en la planta o biorreactor.

Finalmente, se presenta la evolución de los pesos sinápticos del NO durante la estimación de los estados de la fermentación alcohólica (figura 5.19).

5.7. Control Difuso

Como se describió en la sección de metodología para la construcción del sistema difuso, el valor del sustrato estimado por el NO fue considerado como una de las variables de entrada al sistema de control por lógica difusa. Las otras dos variables fueron el pH y la Temperatura sensadas durante las fermentaciones alcohólicas, sin embargo, solo se consideraron los datos de la fermentación 2.

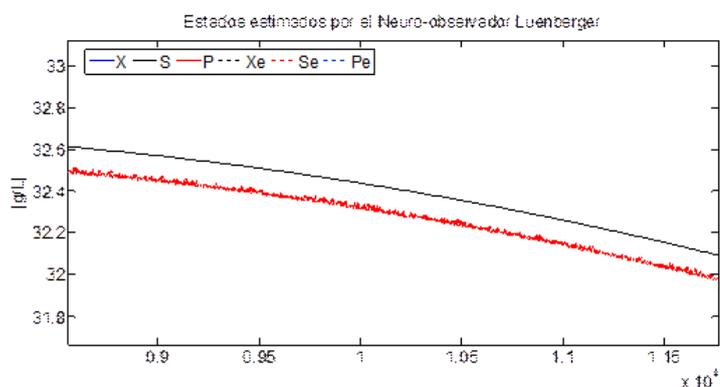


Figura 5.17: Acercamiento que deja ver la estimación robusta que ejerce el SHND, alcanza mayor estabilidad y disminuye el error considerablemente. En negro la concentración de sustrato en la planta y en rojo la concentración de sustrato estimado.

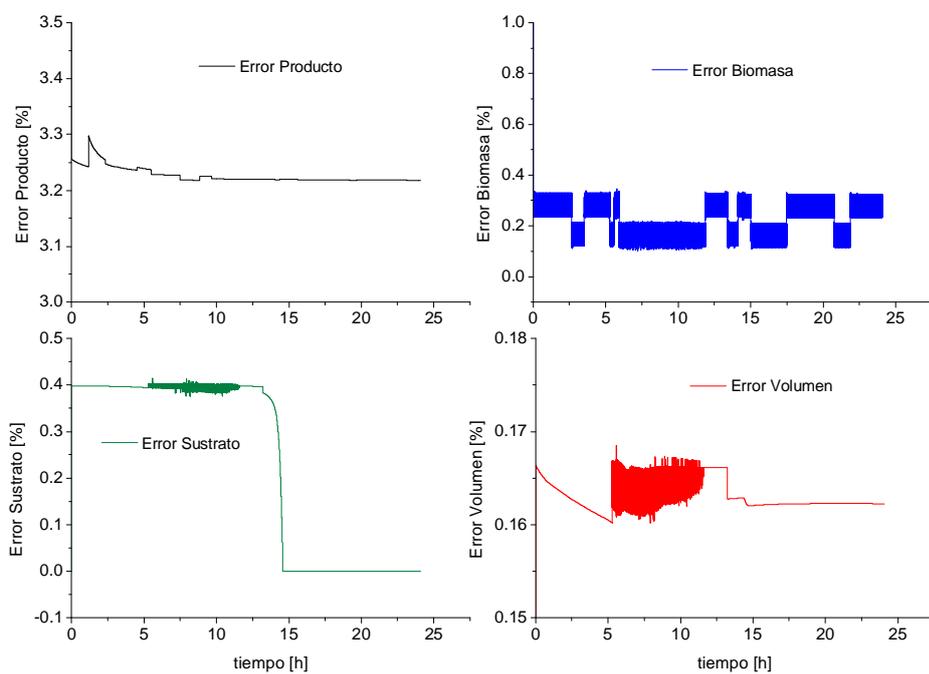


Figura 5.18: Errores de estimación de las variables de la fermentación por el SHND.

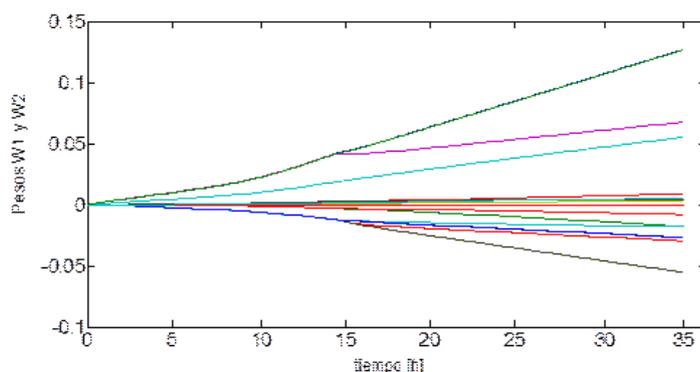


Figura 5.19: Evolución de los pesos sinápticos $W1$ y $W2$ durante la estimación de variables de la fermentación con el NO.

Las figuras 5.20, 5.21 y 5.22 contienen las señales de respuesta generadas por el sistema difuso de acuerdo a la evolución de las variables de entrada. Ya se ha explicado el modo de operar de un sistema de control de este tipo, por lo que únicamente se hará descripción de las señales obtenidas y como interpretarlas.

Como se puede ver en la figura 5.20 la señal de respuesta para la alimentación (línea azul) decrece conforme disminuye la concentración de sustrato. Ahora, hay que recordar que la concentración “requerida” (**Ver tabla 2**) de sustrato para la fermentación es de 15 g L^{-1} a 50 g L^{-1} , pero de acuerdo a la estructura de las funciones de membresía la concentración mínima va de 5 a 20 g L^{-1} , y como la base de reglas está diseñada para que mantenga siempre la concentración “requerida” entonces al llegar la concentración de sustrato a 20 g L^{-1} , como se observa en la gráfica, la señal de respuesta desciende a 2.6 volts , este es el límite superior de la función de membresía que indica se active la alimentación de sustrato. Como el SHND tiene un paro de alimentación cuando se alcancen los cinco litros de operación en el biorreactor el sustrato desciende de 20 g L^{-1} hasta casi los 0 g L^{-1} , y aunque la señal de control siga activando la alimentación esta ya no se ve reflejada en el incremento de sustrato.

La importancia de tener una señal de respuesta es saber cómo interpretarla y como va a llevar a cabo la activación de la alimentación en un sistema de fermentación. La razón por la cual se tomaron valores de 0-5 en el universo de discurso y que se pueden interpretar como voltajes es por y para que

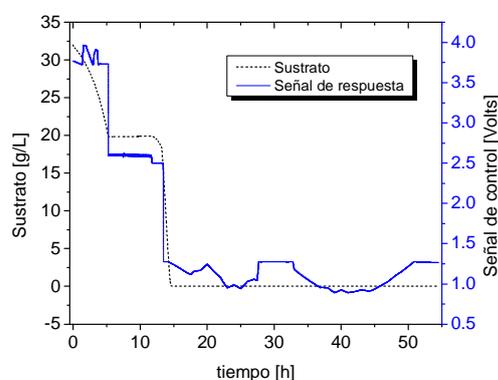


Figura 5.20: Señal de respuesta que generó el sistema de control difuso respecto al consumo de sustrato. En línea negra punteada se muestra la evolución del sustrato durante la fermentación y en color azul se tiene la señal de respuesta de control de la alimentación al biorreactor.

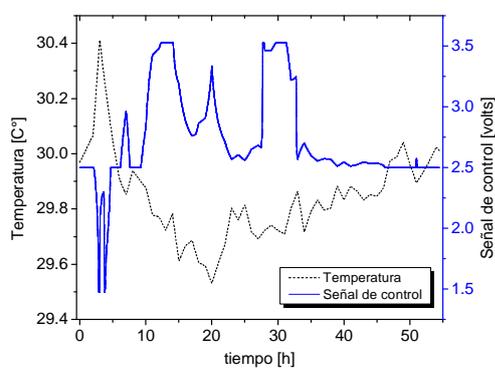


Figura 5.21: Señal de respuesta que generó el sistema de control difuso respecto al cambio de temperatura. En línea negra punteada se muestra la evolución de la temperatura fermentación y en color azul se tiene la señal de respuesta de control para la activación del sistema de enfriamiento o calefacción sobre el biorreactor.

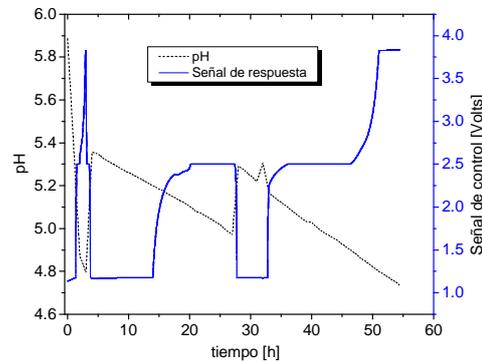


Figura 5.22: Señal de respuesta que generó el sistema de control difuso respecto al cambio de pH. En línea negra punteada se muestra la evolución del pH durante la fermentación y en color azul se tiene la señal de respuesta de control para la activación del sistema de adición de solución ácida o alcalina al biorreactor.

la señal de respuesta pueda ser aplicada como activador de un sistema de regulación de alguna variable tiene que ser convertida de digital a analógico a través de una DAQ (de National Instruments), este convertidor soporta solo de 0 volts a 5 volts a la entrada de sus puertos digitales.

La forma de interpretar la señal de salida es entonces la siguiente: una intensidad menor a 2.6 volts va a activar alguna bomba que alimente sustrato al biorreactor (esto requiere de circuitos eléctricos de acondicionamiento de señales). Y una intensidad de voltaje mayor a 2.4 no ejecuta ninguna acción de activación sobre alguna bomba, por lo tanto no hay adición de medio al biorreactor.

Para la temperatura se obtuvo la siguiente señal de control. La figura 5.21 muestra la evolución de la temperatura durante la fermentación 2 y se muestra también la señal de respuesta generada por el controlador difuso.

El modo de interpretar estas señales es muy semejante a lo descrito para la regulación de sustrato. Cuando se tienen temperaturas entre los $29.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $30.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ se considera como una temperatura requerida absoluta y no se ejecuta ninguna acción de regulación, esto pese a que la función de membresía sea de $29.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $30.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ la correspondiente a la temperatura requerida. Aquí es donde se ve reflejado el grado de pertenencia de la variable a alguna de las dos funciones de membresía traslapadas.

Entonces, un voltaje mayor a 2.6 *volts* va a activar el sistema de enfriamiento del biorreactor, posiblemente por bombeo de agua fría a través del serpentín. Y valores por debajo de los 2.4 *volts* van a activar el sistema de calefacción del biorreactor, ya sea solo prendiendo o apagando la chaqueta de calefacción.

La figura 5.22 muestra la evolución del pH durante la fermentación alcohólica y contiene también la señal de respuesta del sistema difuso para la activación o no del sistema de regulación de pH ya sea adicionando solución ácida (intensidad de control menor a 2.5 *volts*) o alimentación de solución básica (intensidad de control mayor a 2.5 *volts*).

El intervalo de tolerancia para mantener un pH ideal es de 4.9 a 5.1, tal y como se observa en la gráfica 5.1.8c cuando el pH desciende por debajo de 4.9 sobresale un pico azul por encima de 2.5 *volts* que induce la activación del sistema que adiciona álcali.

Capítulo 6

Conclusiones

El estimador de estados Neuro-difuso es mucho más robusto que el Sistema RND-difuso ya que se obtuvieron errores de estimación menores a 3.3 % para Etanol, 0.45 % para Sustrato, 0.4 % para Biomasa y 0.17 % para el Volumen con el Neuro observador. Con el sistema RND-difuso se tuvieron errores del 12 % para Etanol, 9 % para Sustrato, 19 % para Biomasa y 37 % para el Volumen en comparación con la evolución de los estados reales en la planta.

Los rendimientos alcanzados durante las fermentaciones alcohólicas estandarizadas con *Saccharomices cervisiae* expresan de 95-97 % de efectividad, además se obtuvieron parámetros cinéticos semejantes en ambas fermentaciones por lo que es factible inocular el biorreactor entre las 10 y 19 horas de crecimiento de los inóculos. Las velocidades específicas de crecimiento celular fueron $0,30 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ y $0,29 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ para la fermentación 1 y 2, respectivamente.

Es factible aplicar el SHND para la estimación de variables de la fermentación teniendo únicamente datos de CO_2 los cuales pueden ser sensados directamente del fermentador o bien, pueden ser extraídos de una base de datos. Por otra parte, se tiene la posibilidad de introducir los datos de pH, temperatura y CO_2 adquiridos por sensores físicos a través de una interfaz como lo es la tarjeta de adquisición de datos.

Las señales de respuesta pueden ser convertidas de digital a analógico por la misma tarjeta, el sistema de control difuso fue diseñado para ser soportado por la DAQ. Esto ha sido comprobado con el desarrollo de prototipos (construidos por el equipo de trabajo) reguladores de temperatura y pH aplicando control difuso.

Finalmente, el aprendizaje obtenido con este trabajo genera posibilidades de desarrollar otros sistemas de observación y control para ser aplicados a otros sistemas biológicos que no necesariamente tengan como subproducto dióxido de carbono. Y que sean cuales quiera las condiciones de operación es posible desarrollar un sistema de control difuso para la regulación de los estados.

Bibliografía

- [1] Reynaga, C. F., y Leal, R. R., (2000). *Estimación de biomasa y pigmento en línea para una fermentación tipo fed-batch utilizando redes neuronales artificiales*. Congreso Nacional de Instrumentación SOMI XV, ITESO.
- [2] Martínez, B., Herrera, F. y Peralta, L., (2009), *Sensor Virtual Adaptable de Concentración de Etanol para Fermentadores Industriales*. Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial. Vol. 6, pp. 61-67. Cuba.
- [3] Zadeh L. A. (1992). *Fuzzy logic, neural networks and soft computing. One-page course announcement of CS 294-4*, Spring, the University of California at Berkeley, USA.
- [4] Xu-Sheng Chen, Shu Li, Li-Juan Liao, Xi-Dong Ren, Feng Li, Lei Tang, Jian-Hua Zhang, and Zhong-Gui Mao, (2011). *Production of ϵ -poly-L-lysine using a novel two-stage pH control strategy by *Streptomyces sp. M-Z18* from glycerol*. Bioprocess and Biosystems Engineering, Springer-Verlag. No. 34, pp. 561-567.
- [5] Ward OP, (1991). *Biotecnología de la Fermentación*. Ed. Acribia. España.
- [6] Schügerl K. (1990). *Bioreaction Engineering*. Vol. 2. John Wiley and Sons. Great Britain.
- [7] Quintero, L., Amicarelli, A. y di Sciascio, F., (2007). *Estimador de Estados de Fermentación Alcohólica en Continuo de *Zymomonas Mobilis* mediante Filtrado Bayesiano Recursivo*. Instituto de Automática UNSJ, Argentina.

- [8] Dotro, P., Nardi, M., Rodríguez, D. and Rodríguez, V., (1994). *Estudio de la evolución del pH en función de la temperatura*, Club de Ciencias Leonardo Da Vinci, Depto. de Investigación y Desarrollo. Buenos Aires, Argentina
- [9] Nacelle, A. (2009). *Redes neuronales artificiales*. Núcleo de ingeniería biomédica, Facultades de Medicina e Ingeniería. Univ. De la Rep. Uruguay.
- [10] Martín del Brío, B. y Sanz, A. (2001). *Redes neuronales y sistemas borrosos*. Edit. Ra-Ma , Madrid, España.
- [11] Leodnes C.T., (1998), *Fuzzy logic and Expert Systems Applications*, Edit. Academic Press, San Diego, California USA.
- [12] L. A. Zadeh, (1973), *Outline of a new approach to the analysis of complex systems and decision processes*. IEEE Trans. Syst. Man. Cybernet., vol. 3, pp. 28-44.
- [13] L. A. Zadeh (1965), *Fuzzy sets*. Information and Control, vol. 8, pp. 338-352.
- [14] Jang, J., Sun, C., & Mizutani, E. (1997), *Neuro-Fuzzy and soft computing. A computational approach to learning and machine intelligence*. Edit. Prentice Hall, London, United Kingdom.
- [15] Sablayrolles, J. M. (2009), *Control of alcoholic fermentation in wine-making: Current situation and prospect in Food* Research International, Elsevier, No. 42 pp. 418–424.
- [16] Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F. and Covarrubias-Robles, A., (2004), *La respuesta a estrés en la levadura Saccharomyces cerevisiae*, Revista Latinoamericana de Microbiología ALAM, Vol. 46, No. 1-2.
- [17] Fortuna, L., Rizzo, A., Graziani, S., and Xibilia, M. G., (2007). *Soft sensors for monitoring and control of industrial processes*. Advances in Industrial Control. Springer-Verlag, London, United Kingdom.
- [18] Fiechter, A. (1984). *Physical and chemical Parameters of Microbial Growth*. Advances in Biochemical Engineering, Springer-Verlag. Vol. 30, pp. 7-60.

- [19] Arroyo-López, F. N., Orlic, S., Querol, A. and Barrio, E. (2009), *Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of Saccharomyces cerevisiae, S. kudriavzevii and their interspecific hybrid*. International Journal of Food Microbiology, Elsevier, No. 131 pp. 120–127.
- [20] Chiu, R., (2009). Tesis: *Análisis y desarrollo de observador empleando LMI aplicado a bioprocesos*. Grupo de Control de Sistemas Complejos, Universidad Politécnica de Valencia. p. 7. España.
- [21] Chérut, A. (1997). *Software sensors in bioprocess engineering*. Biotechnology Journal, No. 52, pp. 193–199.
- [22] Cabrera, A. I. & Ramírez, M.G., (2007), *Sensores suaves en procesos Biotecnológicos*. Superficies de Vacío-REDALYC, México D.F. pp. 1-5. México.
- [23] Bogaerts, P., (1999). *A hybrid asymptotic-kalman observer for bioprocesses*. Bioprocess Engineering Journal, 20:249–255.
- [24] Álvarez, S. y Zaragoza, J.L., (2006), *Química industrial orgánica*, Universidad Politécnica de Valencia, p. 70. España.
- [25] Abad, E. A., (2006), *Selección de levaduras autóctonas para la elaboración de vinos tintos para bodegas y viñedos de Trujillo S.L.*, Universidad Politécnica de Madrid, Dpto.de Tecnología de los Alimentos. Pp. 6-8. España.
- [26] Aguilar, R., Alvarez, J., Gonzalez, J. y Barrón, M. A. (1996). *A strategy to regulate continuous fermentation process with unknown reaction rates*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 37(4), 357-361.
- [27] Aguilar, R., Soto, G. y Neria, M. I., (2006). *Monitoreo en Línea de un biorreactor continuo empleando observadores de modo deslizante*. Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol. 5, pp. 1-5. México.
- [28] Belkis, C., and Fazilet, V. S. (1998), *Comparison of Different Production Process for Bioethanol*, Turk J Chem, 22, 351-359, Turkey.

- [29] Flórez R. y Fernández J.M., (2008), *Redes Neuronales Artificiales fundamentos teóricos y aplicaciones prácticas*. Edit. Netbiblo, S. L., España.
- [30] Lainioti, G. Ch., Kaposos, J., Farmakis, L., Koliadima, S., Karaiskakis, G., (2010), *Kinetic Study of the Alcoholic Fermentation Process, in the Presence of Free and Immobilized Saccharomyces Cerevisiae Cells, at Different Initial Glucose Concentrations by Reversed Flow GC*. Chromatographia Journal, 72, 1149-1156.
- [31] Rodríguez, A. C., Cabrera, A. I., Valencia, J. I. (2003). *Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo*. Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica, Vol. XXIV, Num.1, p. 55-70. México.
- [32] Shekar, G., & Leland, M.V., (2006), *Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast*, Bioresource Technology 98, Elsevier, pp. 677-685.
- [33] Dochain, D., (2002). *State Estimation in Chemical and Biochemical Processes with Uncertain Kinetics*. Université Catholique de Louvain Bâtiment Euler, 4-6 avenue Georges Lemaître, Belgium.
- [34] Doyle III, F. J., (1997). *Nonlinear inferential control for process application*. Proc. ADCHEM'97, 170-181.
- [35] Aranda, J. S., Cabrera, A. I. y Chairez J. I., (2008). *Predicción del contenido intracelular de Trehalosa en el proceso de producción de biomasa de Saccharomyces cerevisiae*. Revista Mexicana de Ingeniería Química, AMIDIQ, vol. 7. No. 1. México.
- [36] Amicarelli, A., di Sciascio, F., Quintero, O. y Ortiz, O., (2010). *Batch Bio-technological Process: Bacillus Thuringiensis δ -Endotoxins Production*, Biomass Book, Edit. Maggie Momba and Faizal Bux, pp. 79-112. Croatia.
- [37] Hernández Lozano, F. y Herrera Fernández, F., (2007). *Estimación de biomasa en una fermentación feed-batch utilizando algoritmo GMDH modificado con realimentación negativa*. Cuba.

- [38] Portillo Pérez, G., Ibarra Junquera, V., Escalante Minakata, P., y Bernal Jácome, L. A., (2010). *Diseño de un sensor computacional para el monitoreo en línea de fermentaciones alcohólicas*, XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, Acapulco, Guerrero, México.
- [39] Arévalo Rodríguez, A.C., Cabrera Llanos, A.I., y Valencia Florez, J.I., (2003). *Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo*. Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica, Vol. XXIV, Num. 1, pp. 55-70. México.
- [40] Saarela, U., Leiviskä, K., and Juuso, E., (2003). *Modeling of a Fed-Batch fermentation process*, Control Engineering Laboratory, University of OULU, No. 21. Finland.
- [41] Quintero, O. L. y di Sciascio, F., (2005). *Aplicación del filtro de Kalman extendido a un proceso de fermentación alcohólica en continuo*, XI Reunión de Trabajo en Procesamiento de la Información y Control, UNSJ, Argentina.
- [42] Molinero, A., *Metabolismo de Levaduras: Glucolisis, Fermentación alcohólica, fermentación gliceropirúvica, metabolismos secundarios*. Ciclo de Vitivinicultura Procesos Bioquímicos.
- [43] Peña Caballero, V., (2008). *Diseño de un sensor suave para estimar el k_{La} de un sistema fermentación utilizando sistemas no lineales*. UPIBI-IPN, México D. F., México.
- [44] Osborne, J.P., Edwards, C.G., (2007). *Inhibition of malolactic fermentation by a peptide produced by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation*. International Journal of Food Microbiology, Elsevier. 188, pp. 27-34. USA.
- [45] Arístegui, B., *Saccharomyces cerevisiae*. Meyen ex Hansen. <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/039.PDF>.
- [46] Barrera Martínez, M. del C., (2010). *Modelación metabólica de compuestos de reserva de *Saccharomyces cerevisiae**. UPIBI-IPN, Mexico D.F., México.

- [47] De Martín, A.M., (2005). *Control del metabolismo de Saccharomyces cerevisiae en la síntesis de glutatión*. Memoria Doctoral, U. de Granada, España.
- [48] Labiod, S., and Marie Guerra, T., (2007). *Adaptive fuzzy control of class of SISO nonaffine nonlinear systems*. Fuzzy sets and systems, Elsevier, 158, pp. 1126-1137.
- [49] Boulkroune, A., Tadjine, M., M'Saad, M., and Farza, M., (2010). *Fuzzy adaptive controller for MIMO nonlinear systems with known and unknown control direction*. Fuzzy sets and systems, Elsevier, 161, pp. 797-820.
- [50] Wakabayashi, C., Embirucu, C., Fontes, C., and Kalid, R., (2009). *Fuzzy control of a nylon polymerization semi-batch reactor*. Fuzzy sets and systems, Elsevier, 160, pp. 537-553.
- [51] Gómez Salas, F., (2005). *Sistemas difusos jerárquicos para modelado y control*. Departamento de Control Automático, CINVESTAV-IPN, México D.F. México.
- [52] Ríos Lozano, M. M., (2012). *Diseño y construcción de vectores para modificar la ruta metabólica de síntesis de alcoholes en E. coli*, UPIBI-IPN, Distrito Federal. México.
- [53] Bouchachia, A., and Mittermeir, R., (2007). *Towards incremental fuzzy classifiers*. *Soft Comput.* 11(2), pp. 194-207.
- [54] Kasabov, N. and Song, Q., (2002). DENFIS: *Dynamic evolving neural-fuzzy inference system and its application for time-series prediction*. *IEEE Trans. on Fuzzy Syst.* 10(2), pp. 144-154.
- [55] Takagi, T. and Sugeno, M. (1985). *Fuzzy identification of systems and its applications on modelling and control*. *IEEE Trans. on Syst. Man, and Cyb.* 15(1), pp. 116-132.
- [56] Poznyak, A. S., Sanchez, E. N. and Wen Yu, (2000). *Differential Neural Networks for Robust Nonlinear Control-Identification, State Estimation and Trajectory Tracking*, Edit. World Scientific, México.

- [57] Texier, A. C., (2008), *Efecto de la relación C/N en la fermentación anaerobia*, Lab. Microbiología Industrial, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, DF México.
- [58] Voet, D., Voet, Judith G., Pratt Charlotte W., (2007) *Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular*. Edit. Medica Panamericana, 2ª Edición, Buenos Aires, Argentina.
- [59] Casas Alvero, C., Gonzálea Anadón, G., Lafuente Sancho, F.J., Lema ROdicio, J.M., Montesinos Seguí, J.L., Roca Bordello, E., Sola Ferrando, C. and Valero Barranco, F., (1998), *Ingeniería Bioquímica*, Gódia Casablanca, F., López Santín, J. Editores, Edit. Síntesis, Madrid, España.
- [60] Jahangiri, F., Doustmohammadi, A. and Menhaj, M.B., (2012). *An adaptive wavelet differential neural networks based identifier and its stability analysis*. Neurocomputing journal, Elsevier, No. 77, pp. 12-19.
- [61] Barragán Piña, A. J., (2010), Síntesis de sistemas de control borroso estables por diseño, Universidad de Huelva, España.
- [62] Dochain, D., (1986), *On-line parameter estimation, adaptive state estimation and adaptive control of fermentation processes*. U. Catholique de Louvain, Belgium.
- [63] Melchy, O., Ortega, C., Martínez, A., Flores, F., Gómez, O., Sánchez, J y de la Torre, M.,. *Cultivo por lote alimentado de Saccharomyces cerevisiae a alta concentración celular*. CINVESTAV, méxico, D.F., México.
- [64] Cabrera, A., Poznyak, A., Poznyak, T. and Aranda, J., (2002). *Identificatio of a fed-batch fermentation process: comparison of computational and laboratory experiments*. Bioprocess and Biosystems Engineering journal, No. 24, pp. 319-327.
- [65] Palacios A., Charlotte, A., Soto F., Ragiél F. y Ortiz-Julien A., (2004). *¿Puede Saccharomyces cerisiae por si misma marcar diferencia en el grado alcohólico del vino según la cepa empleada?*, Universidad de la Rioja, Lallemand I&D, Toulouse, Francia.
- [66] Reed, G., Rehm, J., Puhler, A. y Stadler, P. Biotechnology 4, *Measuring modelling and control*, VCH, Federal Republic of Germany, pp 181.

Capítulo 7

Apéndices

Apéndice A

Demostración de estabilidad

Sea un sistema no lineal representado como:

$$\begin{aligned}\dot{x}_t &= f(x_t, u_t, t) \\ x_t &\in \mathbb{R}^n, u_t \in \mathbb{R}^q, n \geq q\end{aligned}\tag{1}$$

El cual se asume puede ser representado exactamente por el algoritmo de RND. El objetivo es hacer estable el sistema por la Matriz A , además existen W_1^* y W_2^* , tal que el sistema puede ser representado por la siguiente Red Neuronal:

$$\dot{x}_t = A\hat{x}_t + W_{1,t}^*\sigma(x_t) + W_{2,t}^*\phi(x_t)\gamma(u_t)\tag{2}$$

No necesariamente se conocen los valores exactos de W_1^* y W_2^* , pero se asume que se encuentran acotados por:

$$W_1^*\Lambda_1^{-1}W_1^{*T} \leq \bar{W}_1, \quad W_2^*\Lambda_2^{-1}W_2^{*T} \leq \bar{W}_2\tag{3}$$

Donde $\Lambda_1, \bar{W}_1, \Lambda_2$ y \bar{W}_2 son matrices conocidas.

$$\dot{\hat{x}}_t = (A\hat{x}_t + W_{1,t}\sigma(\hat{x}_t) + W_{2,t}\phi(\hat{x}_t)\gamma(u_t))\tag{4}$$

$$\begin{aligned}W_{1,t} &\in L_\infty, \quad W_{2,t} \in L_\infty \\ \lim_{t \rightarrow 0} \dot{W}_{1,t} &= 0, \quad \lim_{t \rightarrow 0} \dot{W}_{2,t} = 0\end{aligned}$$

Con error de estimación y su dinámica, respectivamente:

$$\Delta_t = \hat{x}_t - x_t \quad (5)$$

$$\dot{\Delta}_t = \dot{\hat{x}}_t - \dot{x}_t \quad (6)$$

Se sustituye 2 y 4 en 6, y se obtiene:

$$\begin{aligned} \dot{\Delta}_t = & (A\hat{x}_t + W_{1,t}\sigma(\hat{x}_t) + W_{2,t}\phi(\hat{x}_t)\gamma(u_t)) - \\ & (A\hat{x}_t + W_{1,t}^*\sigma(\hat{x}_t) + W_{2,t}^*\phi(\hat{x}_t)\gamma(u_t)) \end{aligned} \quad (7)$$

donde $\tilde{W}_1 = W_1 - W_1^*$ y $\tilde{W}_2 = W_2 - W_2^*$, sustituyendo y reacomodando:

$$\dot{\Delta}_t = A\Delta_t + \tilde{W}_{1,t}\sigma(\hat{x}_t) + W_{1,t}^*\tilde{\sigma}_t + \tilde{W}_{2,t}\phi(\hat{x}_t)\gamma(u_t) + W_{2,t}^*\tilde{\phi}_t\gamma(u_t) \quad (8)$$

Se define la función de Lyapunov candidata para que el sistema sea definido positivo y el error asintóticamente estable:

$$V_t = \Delta_t^T P \Delta_t + tr \left[\tilde{W}_{1,t}^T K_1^{-1} \tilde{W}_{1,t} \right] + tr \left[\tilde{W}_{2,t}^T K_2^{-1} \tilde{W}_{2,t} \right] \quad (9)$$

Su derivada es:

$$\dot{V}_t = 2\Delta_t^T P \dot{\Delta}_t + 2tr \left[\tilde{W}_{1,t} K_1^{-1} \dot{\tilde{W}}_{1,t} \right] + 2tr \left[\tilde{W}_{2,t} K_2^{-1} \dot{\tilde{W}}_{2,t} \right] \quad (10)$$

Se lleva a cabo el analisis para cada término y se sustituye 8 por $\dot{\Delta}_t$, especialmente interesa el analisis del termino siguiente:

$$2\Delta_t^T P \dot{\Delta}_t = 2\Delta_t^T P [A\Delta_t + \tilde{W}_{1,t}\sigma(\hat{x}_t) + W_{1,t}^*\tilde{\sigma}_t + \tilde{W}_{2,t}\phi(\hat{x}_t)\gamma(u_t) + W_{2,t}^*\tilde{\phi}_t\gamma(u_t)] \quad (11)$$

$$\begin{aligned} = & 2\Delta_t^T P A \Delta_t + 2\Delta_t^T P \left[\tilde{W}_{1,t}\sigma(\hat{x}_t) + \tilde{W}_{2,t}\phi(\hat{x}_t)\gamma(u_t) \right] \\ & + 2\Delta_t^T P \left[W_{1,t}^*\tilde{\sigma}_t + W_{2,t}^*\tilde{\phi}_t\gamma(u_t) \right] \end{aligned} \quad (12)$$

Se aplica la condición de acotamiento conocido como el *Teorema de Desigualdad de Matrices*:

Teorema A. Para algunas matrices $X \in \mathfrak{R}^{n \times k}$, $Y \in \mathfrak{R}^{n \times k}$ y una matriz definida positiva $\Lambda - \Lambda^T > 0$, $\Lambda \in \mathfrak{R}^{n \times n}$ la siguiente matriz de desigualdad se plantea:

$$X^T Y + (X^T Y)^T \leq X^T \Lambda^{-1} X + Y^T \Lambda Y \quad (13)$$

la desigualdad 13 es valida para cada $X, Y \in \mathfrak{R}^{n \times k}$ y para una matriz definida positiva $0 < \Lambda = \Lambda^T \in \mathfrak{R}^{n \times n}$. Entonces se aplica a 12. y se arregla de la siguiente manera:

$$2\Delta_t^T P W_{1,t}^* \tilde{\sigma}_t \longrightarrow X^T = \Delta_t^T P W_{1,t}^*; Y = \tilde{\sigma}_t; X = W_{1,t}^{*T} P \Delta_t \quad (14)$$

y se tiene:

$$\begin{aligned} 2\Delta_t^T P W_{1,t}^* \tilde{\sigma}_t + W_{1,t}^{*T} P \Delta_t \tilde{\sigma}_t^T &\leq \Delta_t^T P (W_{1,t}^* \Lambda^{-1} W_{1,t}^{*T}) P \Delta_t + \tilde{\sigma}_t^T \Lambda \tilde{\sigma}_t \\ \Delta_t^T P W_{1,t}^* \Lambda^{-1} W_{1,t}^{*T} P \Delta_t + \tilde{\sigma}_t^T \Lambda \tilde{\sigma}_t &\leq \Delta_t^T P \bar{W}_1 P \Delta_t + \Delta_t^T D_\sigma \Delta_t \end{aligned} \quad (15)$$

y se aplica lo mismo para el término $2\Delta_t^T P W_{2,t}^* \tilde{\phi}_t \gamma(u_t)$, entonces:

$$2\Delta_t^T P W_{2,t}^* \tilde{\phi}_t \gamma(u_t) \longrightarrow X^T Y; X = W_{2,t}^{*T} P \Delta_t; Y = \tilde{\phi}_t \gamma(u_t) \quad (16)$$

y se obtiene:

$$\begin{aligned} \Delta_t^T P W_{2,t}^* \tilde{\phi}_t \gamma(u_t) + \gamma^T(u_t) \tilde{\phi}_t^T W_{2,t}^{*T} P \Delta_t &\leq \Delta_t^T P (W_{2,t}^* \Lambda^{-1} W_{2,t}^{*T}) P \Delta_t + \gamma^T(u_t) \tilde{\phi}_t^T \Lambda \tilde{\phi}_t \gamma(u_t) \\ \Delta_t^T P W_{2,t}^* \tilde{\phi}_t \gamma(u_t) + \gamma^T(u_t) \tilde{\phi}_t^T W_{2,t}^{*T} P \Delta_t &\leq \Delta_t^T P \bar{W}_2 P \Delta_t + \Delta_t^T D_\phi \bar{u}_t \Delta_t \end{aligned} \quad (17)$$

$$\| \gamma(u_t) \|^T = \gamma^T(u_t) \gamma(u_t) \quad (18)$$

Luego:

$$2\Delta_t^T P A \Delta_t = \Delta_t^T [P A + (P A)^T] \Delta_t = \Delta_t^T [P A + A^T P] \Delta_t \quad (19)$$

entonces:

$$\begin{aligned} 2\Delta_t^T P \dot{\Delta}_t &\leq \Delta_t^T (P A + A^T P) \Delta_t + \Delta_t^T P \bar{W}_1 P \Delta_t + \Delta_t^T D_\sigma \Delta_t + \\ &\quad \Delta_t^T P \bar{W}_2 P \Delta_t + \Delta_t^T D_\phi \bar{u}_t \Delta_t \end{aligned} \quad (20)$$

Factorizando se llega a:

$$\begin{aligned} \dot{V}_t &= 2\Delta_t^T P \dot{\Delta}_t + 2tr \left[\bar{W}_{1,t}^T K_1^{-1} \dot{\bar{W}}_{1,t}^T \right] + 2tr \left[\bar{W}_{2,t}^T K_1^{-1} \dot{\bar{W}}_{2,t}^T \right] \leq \quad (21) \\ &\Delta_t^T P A \Delta_t + \Delta_t^T (P \bar{W}_1 P + D_\sigma) \Delta_t + \Delta_t^T (P \bar{W}_2 P + D_\phi \bar{u}_t) \Delta_t \end{aligned}$$

Y de 21 se obtiene la definición de las leyes de aprendizaje:

$$\bar{W}_{1,t} K_1^{-1} \dot{\bar{W}}_{1,t} = -\Delta_t^T P \bar{W}_1 \sigma(\hat{x}_t) \quad (22)$$

$$\bar{W}_{1,t} K_1^{-1} \dot{\bar{W}}_{1,t} = -\Delta_t^T P \bar{W}_1 \sigma(\hat{x}_t)$$

$$\dot{\bar{W}}_{1,t} = \dot{W}_{1,t} = -K_1 \Delta_t^T P \sigma(\hat{x}_t) \quad (23)$$

$$\dot{\bar{W}}_{2,t} = \dot{W}_{2,t} = -K_2 \Delta_t^T P \phi(\hat{x}_t) \gamma(u_t) \quad (24)$$

Donde 23 y 24 son la leyes de aprendizaje que garantizan la actualización de los pesos sinápticos de la RND.

Por ultimo se describe la obtención de la Ecuación de Riccati a partir de la ecuación de Lyapunov con lo que se demuestra que es un sistema Asintóticamente estable.

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} V_t &\leq \Delta_t^T [P A + A^T P + P \bar{W}_{1,t} P + D_\sigma + P \bar{W}_{2,t} P + D_\phi \bar{u}] \Delta_t \\ &= \Delta_t^T [P A + A^T P + P (\bar{W}_{1,t} + \bar{W}_{2,t}) P + D_\phi \bar{u} + D_\sigma] \Delta_t + \\ &\quad \Delta_t^T Q_0 \Delta_t - \Delta_t^T Q_0 \Delta_t \\ &= \Delta_t^T [P A + A^T P + P (\bar{W}_{1,t} + \bar{W}_{2,t}) P + D_\phi \bar{u} + D_\sigma + Q_0] \Delta_t - \Delta_t^T Q_0 \Delta_t \quad (25) \end{aligned}$$

donde el termino $-\Delta_t^T Q_0 \Delta_t$ es definido negativo y Asintóticamente Estable.

De la ecuación 25 deriva la Ecuación de Riccati:

$$P A + A^T P + P R P + Q = 0 \quad (26)$$

Apéndice B

Modelos dinámicos en función de CO₂

A partir de los modelos matemáticos descritos en la sección 1.2.2 se obtuvieron los modelos dinámicos en función de la concentración de CO₂. La metodología fue la siguiente.

Haciendo la Consideración de que el CO₂ tiene una dinámica semejante a la del producto en la fermentación alcohólica ya que la ecuación estequiométrica lo permite así:



Siendo los productos principales el etanol y el dióxido de carbono. Tenemos

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{\mu}{Y_{XCO_2}}X - \frac{Q_e}{V}CO_2 \quad (B.1)$$

El segundo término puede ser eliminado ya que representa la medición de dióxido de carbono en el flujo de alimentación, μ representa la ecuación de Monod de crecimiento celular. Entonces para X, S, P y V se tiene:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{Q_e}{V}X \quad (B.2)$$

queda igual.

$$\text{Sustrato en el medio} = \text{Sustrato alimentado} - \text{Sustrato consumido} \quad (B.3)$$

entonces $(S_e - S) = S$ consumido. Pero en esta relación va incluido el sustrato consumido para producción de etanol y para crecimiento celular. Y considerando que el sensor de dióxido de carbono de lecturas de $g L^{-1}$ será la lectura del CO₂ producido por fermentación.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{XS}}X + \frac{Q_e}{V}(CO_{2fe}) \quad (B.4)$$

Ahora se establece el factor molar que relacione sustrato y dióxido de carbono:

$$[CO_{2fe}] = g \text{ de } CO_2 \times \frac{1 \text{ mol de } CO_2}{44 \text{ g de } CO_2} \times \frac{180 \text{ g de glu}}{1 \text{ mol de glu}} \times 0,5 = g \text{ de glu. consumida} \quad (B.5)$$

$$\frac{90 \text{ g de } CO_2}{44} = \text{glucosa que se consume para productos} \quad (B.6)$$

Considerando rendimientos de $Y_{XP} = 0,41$ y $Y_{XS} = 0,59$. El sustrato consumido total tiene la relación:

$$\frac{90 \text{ g de } CO_2}{44 \times 0,41} = \text{glucosa total consumida} \quad (B.7)$$

entonces:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{XS}}X + \frac{Q_e}{V} \left(\frac{90 \text{ g de } CO_2}{17,6} \right) \quad (B.8)$$

Siguiendo la misma metodología se tiene: Etanol $46 g mol^{-1}$ y CO₂ $44 g mol^{-1}$.

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{XP}}X + \frac{Q_e}{V} \left(\frac{46 \text{ g de } CO_2}{44} \right) \quad (B.9)$$

Apéndice C

Medio de Cultivo

Tomado de Lainioti, et. al., 2010.

Para la propagación y mantenimiento de la cepa se utilizó el medio sólido, con la siguiente composición:

- | | |
|------------------------|----------------------|
| ▪ Dextrosa | 40 g L ⁻¹ |
| ▪ Peptona de Carne | 20 g L ⁻¹ |
| ▪ Extracto de levadura | 10 g L ⁻¹ |
| ▪ Agar Bacteriológico | 20 g L ⁻¹ |

También se utilizó medio de cultivo “Agar Dextrosa Sabouraud”, según las indicaciones del frasco, a 65 g L⁻¹. Este medio se utilizó para el mantenimiento de la cepa.

Para el crecimiento en el biorreactor se utilizó el mismo medio pero sin el agar.

Metodología:

Utilizar agua destilada para disolver el volumen requerido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Ajustar el pH a 5.0 con solución de ácido clorhídrico (HCl) al 10 % (*m/v*) o hidróxido de sodio (NaOH) al 10 % (*m/v*), según sea el caso. Esterilizar en autoclave a 120 °C y 15 lb in⁻² durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta una temperatura de aproximadamente 50 °C. En condiciones asépticas vaciar en las cajas Petri y dejar enfriar hasta que solidifique el agar.

Inocular con una asada de *Saccharomyces cerevisiae* y hacer el estriado para garantizar el crecimiento aislado de colonias. Incubar a 30 °C en posi-

ción invertida para evitar que se deshidrate el gel. El proceso dura de 24 a 48 horas.

Apéndice D

Tablas de muestreo inóculos

Tablas que indican los tiempos de muestreo para los inóculos crecidos en matraces y tubos con taparrosa para su caracterización. Posteriormente se muestran las gráficas de crecimiento celular y el tiempo de duración de cada etapa del crecimiento celular.

Análisis de Crecimiento de Inóculos			Se utilizó un mililitro de muestra			
Tiempo [h]	Matraz 1 (Abs. a 540 nm)	FD	Biomasa [$g L^{-1}$]	Matraz 2 (Abs. A 540 nm)	FD	Biomasa [$g L^{-1}$]
0	0	1	0.0000	0	1	0.0000
2.25	0.008	1	0.0203	0.004	1	0.0101
4.83	0.036	1	0.0913	0.012	1	0.0304
7.41	0.094	1	0.2383	0.137	1	0.3474
8.49	0.405	1	1.0269	0.294	1	0.7454
20.91	0.94	10	23.8337	0.926	10	23.4787
24.41	0.969	10	24.5690	0.989	10	25.0761
29.24	0.938	10	23.7830	0.981	10	24.8732

Indica el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en matraces Erlenmeyer de 250 mL, la concentración de biomasa (en $g L^{-1}$) obtenida por la técnica de densidad óptica a 540 nm y el factor de dilución (FD) para cada muestra.

Análisis de Crecimiento de Inóculos			Se utilizó un mililitro de muestra			
Tiempo [h]	Tubo 1 (Abs. 540 nm)	FD	Biomasa [g L ⁻¹]	Tubo 2 (Abs. 540 nm)	FD	Biomasa [g L ⁻¹]
0	0.012	1	0.0304	0.085	1	0.2155
2.25	0.051	1	0.1293	0.079	1	0.2003
4.83	0.036	1	0.0913	0.158	1	0.4006
7.41	0.748	1	1.8966	0.617	1	1.5644
8.49	0.965	1	2.4468	0.959	1	2.4315
20.91	1.048	10	26.5720	1.04	10	26.3692
24.41	0.955	10	24.2140	1.119	10	28.3722
29.24	0.952	10	24.1379	1.118	10	28.3469

Indica el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en tubos con taparrosca, la concentración de biomasa (en g L⁻¹) obtenida por la técnica de densidad óptica a 540 nm y el factor de dilución (FD) para cada muestra.

Apéndice E

Análisis de biomasa, Espectrofotometría

Realización de la curva tipo para medición de biomasa usando densidad óptica. Técnica desarrollada por Ríos Lozano M., 2011.

- Previamente crecer la cepa de interés (*S.c. ATCC – 9763*) durante 24 horas a 30 °C y 200 rpm en el medio de interés (Dextrosa) matraces Erlenmeyer de 250 mL a un volumen de 50 mL, poner a peso constante las charolas de aluminio a 80°C durante 24 horas.
- Colocar 50 mL de medio en el matraz con la cepa de interés en un tubo Falcon y centrifugar a 8500 rpm durante 18 minutos a temperatura ambiente. Tirar el sobrenadante.
- Realizar dos lavados a la muestra con agua destilada (adicionando el volumen inicial) y centrifugar a 8500 rpm, durante 18 minutos. Tirar el sobrenadante.
- A la biomasa final, adicionarle 50 mL de agua destilada (adicionando el volumen inicial) y realizarle factores de dilución (FD), el volumen mínimo total debe ser de 5 mL. (FD recomendados: 5, 8, 10, 20, 40 y 50).

▪

$$FD = (Volumen\ total)/(Volumen\ de\ la\ muestra) \quad (E.1)$$

- Leer la absorbancia de los FD a 540 nm utilizando como blanco agua destilada.

- Colocar 5 mL de la muestra correspondiente en una charola previamente pesada y dejar secando durante 24 horas a 80 °C.
- Pesar las charolas.
- Determinar la biomasa de cada muestra en $g L^{-1}$ y graficar en el eje de las “x” biomasa en peso seco y en el eje de las “y” Abs a 540 nm.

Apéndice F

Muestreo de Fermentaciones

El muestreo de las fermentaciones se llevó a cabo de acuerdo a la siguiente tabla de tiempos.

Fermentación 1		Fermentación 2	
No. de muestra	tiempo [h]	No. de muestra	tiempo [h]
0	0	0	0
1	1.17	1	1.167
2	2.33	2	3.517
3	4.5	3	5.35
4	5.5	4	8.517
5	7.5	5	10.85
6	8.83	6	12.6
7	9.66	7	25.35
8	19.66	8	31.35
9	31.66		

Relación de muestreo para los procesos de fermentación desarrollados.

Apéndice G

Azúcares Reductores y DNS

Método del ácido dinitrosalicílico (DNS)

Pasos para la elaboración del reactivo:

- Disolver 1.6 gramos de NaOH en 50 mL de H₂O destilada.
- Adicionar 30 gramos de tartrato de Na y K.
- Adicionar 1 gramo de DNS.
- Aforar a 100 mL con H₂O destilada.
- Almacenar en un frasco ámbar a 4 °C.

Se debe hacer un stock de dextrosa a 1 g L⁻¹ para preparar las diluciones y hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones por duplicado:

Tubo	Vol. Stock [mL]	Vol. H ₂ Od [mL]	Dextrosa [g L ⁻¹]
1	0	1	0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1	0	1

Procedimiento:

A cada uno de los tubos adicionar 1 mL de reactivo de DNS. Agitar con vórtex y llevar a baño de agua en ebullición durante 5 minutos exactos. Enfriar en hielo, agregar 8 mL de agua destilada y agitar con vórtex.

Para las muestras problema, en lugar de tomar 1 mL del stock, se toma 1 mL de la muestra y se realiza el mismo procedimiento empleado en la obtención de la curva patrón. Si la lectura es mayor de 0.6 de absorbancia, es necesario hacer diluciones de la muestra antes de aplicar la técnica y repetir la determinación.

Con los valores obtenidos de la curva patrón (promedio de las dos series de tubos) se grafica absorbancia (eje Y de coordenadas cartesianas) *vs* concentración de dextrosa [g L^{-1}] (eje X), obteniéndose aproximadamente una recta. Se realiza una regresión lineal para ajustar los datos experimentales a una recta. El coeficiente de correlación debe ser igual o mayor a 0,989.

Para obtener la concentración de azúcar en la muestra problema, se interpola el valor de la absorbancia en la gráfica o se sustituye en la ecuación de la recta obtenida por la regresión lineal.

$y = mx + b$, donde:

- y es la absorbancia de la muestra problema
- m es la pendiente de la recta
- b es la ordenada al origen
- x es la concentración de azúcar de la muestra problema en g L^{-1}

Apéndice H

Buffer y calibración, analizador bioquímico

El equipo tenía una solución de 2 g L^{-1} de etanol comercial para su calibración. La membrana utilizada contenía a la enzima alcohol oxidasa con una vida útil de 5 días.

Se preparó el siguiente buffer, este funcionó como fase móvil y para el enjuagado de la membrana después de haber cuantificado una muestra de etanol. Los reactivos fueron disueltos en 250 mL de agua destilada, la ampicilina se adicionó una vez aforado a 900 mL.

Fosfato de sodio dibásico	(Na_2HPO_4)	7.75 g
Fosfato de sodio monobásico	(NaH_2PO_4)	0.435 g
Cloruro de sodio	(NaCl)	2.25 g
EDTA disódico	($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)	1.375 g
Benzoato de sodio	($\text{NaC}_6\text{H}_5\text{CO}_2$)	1.25 g
Ampicilina		100 mg L^{-1}

Además se preparó una solución de 2 g L^{-1} de etanol en agua mili-Q, para comprobar la calibración del equipo.

Apéndice I

Código de programación para el NO

En el cuadro I.1 se muestra el algoritmo de programación para el NO en la plataforma de *Matlab*, la programación en código tal cual fue utilizada para el funcionamiento del observador. La matriz A fue propuesta según los criterios de estabilidad requeridos (igual que con la RND) y las variables $u(s)$ representan el flujo de información en el programa ya sea por retroalimentación o acción de otras funciones, son enumeradas de acuerdo al orden de entrada al subsistema correspondiente. Por ejemplo, el cuadro I.1 representa el sistema del Neuro observador y el cuadro I representa el subsistema de las leyes de aprendizaje, por ello la definición de las variables $u(s)$ inicia con 1, 2, 3 . . . , hasta n .

Figura I.1: Código de programación para el NO en la plataforma de MatLab.

```

function y=RedNOB(s)
% Modelo de la RND y el termino de Luenberger:
%dx=A*xe+W1*sig(xe)+W2*fi(xe)*gama(u)+K(y-ye)

%Se define la matriz de estabilidad de Hurwitz:
A=[-50 0 0 0;0 -20 0 0;0 0 -20 0;0 0 0 -5];

%Ahora se definen las señales de entrada provenientes de las
%funciones de activación, sigma y phi:
sig=[s(1);s(2);s(3);s(4)];
fi=[s(5) 0 0 0;0 s(6) 0 0;0 0 s(7) 0;0 0 0 s(8)];

%Se definen las señales del vector de estados estimados
%como retroalimentación:
xe=[s(9);s(10);s(11);s(12)];

%Se definen las entradas de los pesos sinápticos provenientes de
%el subsistema de las leyes de aprendizaje:
W1=[s(13) s(14) s(15) s(16);s(17) s(18) s(19) s(20);
s(21) s(22) s(23) s(24);s(25) s(26) s(27) s(28)];
W2=[s(29) s(30) s(31) s(32);s(33) s(34) s(35) s(36);
s(37) s(38) s(39) s(40);s(41) s(42) s(43) s(44)];

%El vector z son las señales correspondientes a K(y-ye):
z=[s(45);s(46);s(47);s(48)];

%El vector z es calculado de la siguiente manera:
x=[u(1);u(2);u(3);u(4)];%Son los estados de la planta
xe=[u(5);u(6);u(7);u(8)];%Son los estados estimados.
K=[1500.00 0 0 0;0 9000.00 0 0;0 0 5000.00 0;0 0 0 3000.00];
%Es la matriz de ganancia del observador.
%el termino 1,1 da la ganancia de la biomasa, el 2,2 es el que
da la ganancia de sustrato, el 3,3 da la ganancia del producto
y el 4,4 da la ganancia del volumen.

Co=[0 0 0 0;0 0 0 0;0 0 0 0;0 0 0 1];
y=Co*x;
ye=Co*xe;
dy=y-ye;
ky=K*dy;
z=[y,ye,ky];
%El vector de la señal de control U:
gamma=[s(49);s(49);s(49);s(49)];
%Finalmente, se escribe el código completo del NO
dx=(A*xe)+(W1*sig)+(W2*fi*gamma)+z;
%Y se define las señales de salida correspondientes a X, S, P y V,
%respectivamente, para ser integradas.
y=[dx(1),dx(2),dx(3),dx(4)];

```

```

function y=LApNOB(s)
%Definimos las señales de entrada procedentes de las funciones de
%activación sigma y fi, además se definen las señales procedentes de
la
%retroalimentación de los pesos en forma matricial:
sig=[s(1);s(2);s(3); s(4)];
fi=[s(5) 0 0 0;0 s(6) 0 0;0 0 s(7) 0;0 0 0 s(8)];
W1=[s(9) s(10) s(11) s(12);s(13) s(14) s(15) s(16);
    s(17) s(18) s(19) s(20);s(21) s(22) s(23) s(24)];
W2=[s(25) s(26) s(27) s(28);s(29) s(30) s(31) s(32);
    s(33) s(34) s(35) s(36);s(37) s(38) s(39) s(40)];

%Señal de control u:
gama=[s(41);s(41);s(41);s(41)];

%dy está definido como (Co*x-Co*xe)
dy=[s(42);s(43);s(44);s(45)];

%Parámetro constante delta,
delta=1;
%Solución de la ecuación de Riccati P para la A establecida,
P=[0.1000 0 0 0;0 0.2500 0 0;0 0 0.2500 0;0 0 0 0.2500];
Co=[1 0 0 0;0 1 0 0;0 0 1 0;0 0 0 1];

%Condiciones iniciales a partir de las cuales evolucionan los pesos,
Wx1=[0.0001 0.0001 0.0001 0.0001;0.0001 0.0001 0.0001 0.0001;
    0.0001 0.0001 0.0001 0.0001;0.0001 0.0001 0.0001 0.0001];
Wx2=[0.0001 0.0001 0.0001 0.0001;0.0001 0.0001 0.0001 0.0001;
    0.0001 0.0001 0.0001 0.0001;0.0001 0.0001 0.0001 0.0001];

%Matriz paramétrica de constantes, definida como la identidad,
D=[1 0 0 0;0 1 0 0;0 0 1 0;0 0 0 1];

%Algoritmo de las leyes de aprendizaje a partir del cual se ajustan
los pesos sinápticos y a través del cual se garantiza el aprendizaje,
ne =Co'*(pinv(Co));
Gam=(P*(inv(ne'))*(pinv(Co)))*(inv(D))*((pinv(Co))'*(inv(ne)))*P);
Gam2=(P*(inv(ne'))*(inv(ne)))*P);
M1=2*P*(inv(ne'))*(sig*(dy))*pinv(Co);
M2=2*P*(inv(ne'))*fi*(gama*(dy))*pinv(Co);

%Leyes de aprendizaje
dW1=-((Gam+(delta*Gam2))*((W1-Wx1)*(sig*sig')))-M1;
dW2=-((norm(gama))^2)*(Gam+(delta*Gam2))*(W2-Wx2)*(fi*fi))-M2;

%Salida de los pesos sinápticos para ser integrados:
y=[dW1(1,1),dW1(1,2),dW1(1,3),dW1(1,4),dW1(2,1),dW1(2,2),dW1(2,3),
    dW1(2,4),dW1(3,1),dW1(3,2),dW1(3,3),dW1(3,4),dW1(4,1),dW1(4,2),
    dW1(4,3),dW1(4,4),dW2(1,1),dW2(1,2),dW2(1,3),dW2(1,4),dW2(2,1),
    dW2(2,2),dW2(2,3),dW2(2,4),dW2(3,1),dW2(3,2),dW2(3,3),dW2(3,4),
    dW2(4,1),dW2(4,2),dW2(4,3),dW2(4,4)];

```

Código de programación para las leyes de aprendizaje para el NO.

