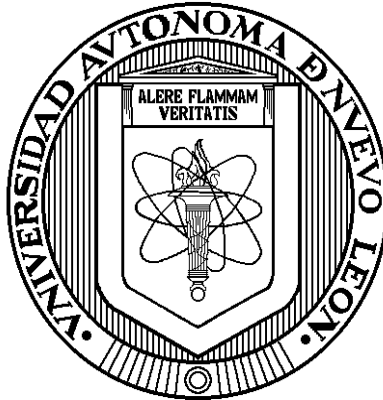


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE INGENIERIA MECANICA Y ELECTRICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



MODELADO Y ESTIMACION DE PROCESOS DE
FERMENTACION

POR:

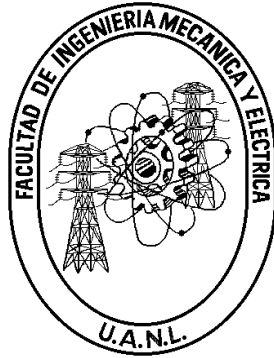
YAHARA GARCIA ALVARADO

TESIS

EN OPCION AL GRADO DE
DOCTOR EN INGENIERIA ELECTRICA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON
DICIEMBRE 2007

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE INGENIERIA MECANICA Y ELECTRICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



MODELADO Y ESTIMACION DE PROCESOS DE
FERMENTACION

POR:

YAHARA GARCIA ALVARADO

TESIS

EN OPCION AL GRADO DE
DOCTOR EN INGENIERIA ELECTRICA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA NUEVO LEON

DICIEMBRE 2007

Dedicatoria:

Al Misericordioso quien me ha ayudado durante toda mi vida.

A mi esposo por su ayuda y apoyo incondicional en el logro de mis metas.

A mis padres por su comprensión, entusiasmo, ejemplo y amor que ha sido mi inspiración.

A mis hermanos Nimbe, Erika y Erik mis amigos de toda la vida.

A mis hijos Noám Isacar y Rut mis recompensas de Hashem en esta vida

Agradecimientos:

A HaShem quien nunca me ha dejado ni me dejará.

A mi esposo quien me ha ayudado en todo momento.

Al Dr. Marco Tulio Mata Jiménez por el esfuerzo tomado para la culminación de este trabajo.

A la Dra. Ma. Guadalupe Aguilar por su asesoría incansable en mi entendimiento de los procesos de fermentación

A los doctores Efraín Alcorta García, José Antonio de la O'Serna y Javier Gómez por el tiempo tomado en la revisión de este documento.

Al CONACyT por su apoyo económico para poder realizar este trabajo.

Resumen

En la actualidad, los procesos biológicos han tomado importancia debido a su interés en el desarrollo de nuevas tecnologías para la obtención de productos de alto valor agregado. La industria de alimentos es el áreas con mayor aplicación donde las fermentaciones son un tipo de proceso muy empleado llevado a cabo en reactores biológicos que se valen de microorganismos capaces de consumir nutrientes para obtener productos. En el presente trabajo se determina el modelo matemático que puede predecir el crecimiento celular en procesos de fermentación aeróbico y anaeróbico a distintas concentraciones de ácido acético consiguiendo disminuir experimentación innecesaria, por lo que este modelo, es ajustado para representar diez experimentos distintos, para ello, se aplica un índice de desempeño en el que se incluye análisis de sensibilidad paramétrica, haciendo el ajuste con el método simplex de Nealder-Mead.

Como una meta de la industria biotecnológica es obtener mejores tasas de producción, sin la necesidad de invertir en tanta experimentación o en el alto costo de sensores; se presenta la aplicación de observadores de software como una herramienta para la estimación de las variables de interés. Se aplica el observador de Kalman con término no lineal para un proceso de fermentación en el que existe competencia por alimento (substrato) entre dos microorganismos. Este caso puede surgir en la obtención de etanol, por lo que es necesario controlar el microorganismo que afecta al proceso de manera no deseada; por lo que se diseñó una ley de control basada en el modelo dinámico general del sistema.

En las fermentaciones los reactores biológicos pueden operar de tres modos: con-

tinuo, semicontinuo y lote; el utilizado en el presente trabajo es el último y el más empleado de los tres; debido a esto, se muestra un estimador de lazo abierto muy empleado en la industria, aplicado a uno de los procesos experimentales.

El modelo matemático fue validado mediante datos experimentales, su ajuste es mostrado en el capítulo 3, se puede apreciar como el modelo determinado puede representar los diez procesos a pesar de su estructura no lineal que complica la estimación paramétrica. Los resultados del observador de Kalman y el estimador de lazo abierto son mostrados mediante simulaciones, estos logran predecir las variables de interés para posteriormente aplicar un algoritmo de control.

Índice general

Índice de figuras	VIII
Índice de cuadros	X
1. Introducción	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Planteamiento del problema	2
1.3. Justificación	3
1.4. Objetivo General	4
1.4.1. Objetivos particulares	4
1.5. Hipótesis	4
1.6. Estado del arte	5
1.7. Organización de la tesis	6
2. Metodología	8
2.1. Introducción	8
2.2. Tipos de modelos	10
2.3. Modelo general de crecimiento microbiano en un reactor biológico	11
2.3.1. Balance de masas en un biorreactor	11
2.3.2. Estructura del modelo de un proceso continuo	16
2.3.3. Estructura del modelo de un proceso semicontinuo	16
2.3.4. Estructura del modelo de un proceso en lote	17

2.3.5.	Tipos de tasa de crecimiento específica μ	17
2.3.6.	Tipos de producto obtenidos en un reactor biológico	20
2.4.	Consideraciones para selección y ajuste del modelo	21
2.5.	Estimación paramétrica	22
2.5.1.	Modelo de salida	22
2.5.2.	Linealización del modelo de salida	23
2.6.	Conclusiones	26
3.	Ajuste del modelo en procesos de fermentación	31
3.1.	Introducción	31
3.2.	Importancia de productos en la industria biotecnológica	31
3.3.	Descripción del proceso	33
3.4.	Modelado de un proceso de fermentación con dos productos	33
3.5.	Establecimiento de suposiciones	34
3.6.	Modelo de salida	36
3.7.	Estimación paramétrica	36
3.8.	Índice de desempeño	38
3.8.1.	Validación del modelo	39
3.9.	Resultados	39
3.10.	Conclusiones	39
4.	Estimación de procesos de fermentación	47
4.1.	Introducción	47
4.2.	Observador	48
4.3.	Procesos biológicos con interacción microbiana	52
4.4.	Observador para un proceso de competencia microbiana	53
4.4.1.	Modelo de competencia microbiana	54
4.4.2.	Aplicación del observador Kalman con término no lineal	57
4.4.3.	Simulaciones	59
4.5.	Ley de control para competencia	59

4.5.1.	Importancia del control de procesos	60
4.5.2.	Condiciones de control de procesos de fermentación	61
4.5.3.	Ley de control con μ iguales	62
4.5.4.	Ley de control para μ diferentes	63
4.5.5.	Simulaciones	66
4.5.6.	Conclusiones parciales	69
4.6.	Estimador de lazo abierto	71
4.6.1.	Diseño de parámetros	72
4.6.2.	Simulación	72
4.7.	Sumario	73
5.	Conclusiones finales	75
5.1.	Aportaciones	76
5.2.	Trabajos futuros	77
A.		78
A.1.	78
A.2.	79
Bibliografía		81

Índice de figuras

3.1. Reactor biológico operado en modo lote	34
3.2. Cinética en condiciones aeróbicas con concentración de ácido acético de $1 g^{-1}$ con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)	41
3.3. Cinética en condiciones aeróbicas con concentración de ácido acético de $3 g^{-1}$ con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)	42
3.4. Cinética en condiciones aeróbicas con concentración de ácido acético de $4 g^{-1}$ con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)	42
3.5. Cinética en condiciones anaeróbicas con concentración de ácido acético de $1 g^{-1}$ con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)	43
3.6. Cinética en condiciones anaeróbicas con concentración de ácido acético de $2 g^{-1}$ con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)	43
3.7. Cinética en condiciones anaeróbicas con concentración de ácido acético de $3 g^{-1}$ con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)	44

3.8. Cinética en condiciones anaeróbicas con concentración de ácido acético de $4 g^{-1}$ con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)	44
3.9. Cinética en condiciones anaeróbicas con concentración de ácido acético de $5 g^{-1}$ con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)	45
3.10. Cinética en condiciones anaeróbicas con concentración de ácido acético de $6 g^{-1}$ con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)	45
4.1. Sistema de competencia microbiana, x_1 biomasa dominante y x_2 dominada	59
4.2. Microorganismo dominante (-) y su estimado (- -)	60
4.3. Microorganismo dominado (-) y su estimado (- -)	61
4.4. Estabilización de la biomasa z_1 (-), z_2 (- -)	64
4.5. Tasa de dilución	64
4.6. Ley de control	65
4.7. Biomasa dominante (-) y su estimado (- -)	67
4.8. Biomasa dominada (-) y su estimado (- -)	68
4.9. Biomasa establecida en valores deseados	68
4.10. Valor de la tasa de dilución estabilizada	69
4.11. Tasas de crecimiento de a) Monod (negra) b) Haldane (azul)	70
4.12. Lectura de sustrato (-) y su estimación (- -)	73
4.13. Velocidad media de crecimiento (-) y su estimación (- -)	74

Índice de cuadros

2.1. Modelos matemáticos del crecimiento expresados en función de una sola variable: el sustrato limitante	27
2.2. Modelos matemáticos del crecimiento expresados en función de las concentraciones de sustrato y de producto	28
2.3. Modelos matemáticos del crecimiento expresados en función de las concentraciones de sustrato limitante y de biomasa	29
2.4. Modelos matemáticos del crecimiento microbiano expresados en función de la concentración de producto	29
2.5. Modelos matemáticos del crecimiento expresados en función de la concentración de biomasa	30
3.1. Condiciones iniciales a diferentes concentraciones de ácido acético en condiciones aeróbicas	40
3.2. Condiciones iniciales a diferentes concentraciones de ácido acético en condiciones anaeróbicas	40
3.3. Intervalos de confianza a diferentes concentraciones de ácido acético en condiciones aeróbicas	40
3.4. Intervalos de confianza a diferentes concentraciones de ácido acético en condiciones anaeróbicas	40
3.5. Valores paramétricos obtenidos graficamente a diferentes concentraciones de ácido acético en condiciones aeróbicas	41

3.6. Valores paramétricos obtenidos graficamente a diferentes concentra-
ciones de ácido acético en condiciones anaeróbicas 41

Capítulo 1

Introducción

1.1. Generalidades

La industria biotecnológica ha crecido en los últimos 10 años, expandiéndose debido a los avances en el conocimiento e interpretación de procesos biológicos complejos de manufactura de productos, tales como: alimentos, bebidas, farmacéuticos y especialmente químicos [28]. Una clave importante en estos procesos es la identificación de un microorganismo que genere un producto bioquímico deseado [35], ya que su buena selección contribuirá a obtener un mayor rendimiento. Siendo ésta la meta, la biotecnología se ha esmerado por mejorar las tasas de rendimiento que logren alcanzar los mejores perfiles de producción, al menor costo y en el menor tiempo posible [17]. En estos procesos, los reactores biológicos juegan un papel importante, ya que son utilizados en todas las actividades encargadas de la conversión de compuestos bioquímicos conocidos como fermentaciones.

El mejoramiento del desempeño de los reactores biológicos ha promovido la optimización sistemática y cuantitativa en estos procesos de conversión a escalas industriales [36], como una consecuencia básica se tiene la minimización del número de experimentos a desarrollar, lo cual es importante debido al gran costo y tiempo empleados en ellos. A menudo esta acción es interpretada como la determinación de

un conjunto de condiciones iniciales y perfiles de control que permitan lograr los más altos rendimientos (la máxima producción total del producto deseado), además de ajustarse a las restricciones del sistema. Para la formulación del objetivo de control, es sumamente importante contar con un modelo preciso del proceso [37] al que se le puedan aplicar técnicas de estimación u observación de estados, ya que los sensores son muy caros o no existen o son específicos según el proceso (tipo o tipos de biomasa, de substratos y de productos). Una vez estimadas las variables de interés, es posible determinar alguna ley de control que aplicada al proceso alcance los rendimientos deseados.

1.2. Planteamiento del problema

Con el establecimiento de plantas piloto de procesos biológicos automatizadas, se hace necesario contar con un control que tenga como objetivo el maximizar la obtención de un determinado producto, minimizando costos y tiempo para su logro, con esto surge la necesidad de desarrollar modelos matemáticos que utilicen la información obtenida durante la etapa de experimentación, ayudando así a la optimización en el desempeño de los biorreactores [39].

Dado un sistema de la forma:

$$\dot{x} = f(x, \mu(x, \beta)) \tag{1.1}$$

donde $x \in [0, +\infty)$ es el vector de estados con $\dim(x) = n$, f son funciones del vector de estados y de la tasa de crecimiento específica $\mu(x, \beta)$, la cual depende de uno o más estados y de parámetros. Se desea determinar la estructura de dicha tasa tal que considere los efectos tóxicos de ácidos orgánicos (etanol y ácido acético) productos del mismo proceso y el efecto de inhibición del crecimiento microbiano o biomasa (x). Dicha tasa debe ser incluida en el modelo matemático del proceso de fermentación realizado en el reactor biológico operado en modo lote y debe ser capaz

de representar satisfactoriamente el comportamiento del proceso. Para la estimación de parámetros se propone utilizar el método simplex de Nelder-Mead y un estudio de sensibilidad paramétrica.

Una vez que se cuenta con un modelo adecuado, el siguiente desafío es construir un estimador de estados. Variables de estado como la biomasa y parámetros como la tasa de crecimiento específico no se pueden medir directamente del proceso, esto hace que sean necesarias mediciones indirectas [16] y [9] de los estados y/o parámetros. En esta tesis se plantean algunas técnicas de estimación de biomasa y de la tasa de crecimiento específica, para ello se utilizó un observador de Kalman con término no lineal aplicado a un tipo de proceso de fermentación donde existe competencia microbiana por un mismo alimento (sustrato), las variables a estimar fueron las biomásas. Otro caso es la aplicación de un estimador de lazo abierto para estimar el sustrato y la velocidad media de crecimiento sin tener que determinar la tasa de crecimiento. Este estimador se aplicó al experimento mostrado en la figura 3.6. Una vez hecha la estimación se implementó una ley de control basada en el modelo dinámico general (MDG) con la cual se estabilizaron las biomásas (x_1 , x_2) en los valores deseados manteniendo vivos a ambos microorganismos. Para ambos casos se presentan las gráficas que validan el desempeño de ambas técnicas.

1.3. Justificación

La posibilidad de mejorar el rendimiento en la obtención de productos como el etanol y ácido acético en procesos de fermentación mediante el modelado de la tasa de crecimiento específica asociada al crecimiento celular, así mismo la disponibilidad del modelo y la posibilidad de realizar simulaciones da lugar a una posible disminución en el número de experimentos requeridos para escalar el proceso, minimizando el uso de materia prima (sustrato) y tiempo de proceso, generando un considerable ahorro económico. El modelo matemático, al ser capaz de representar satisfactoriamente el proceso tipo lote, es la base para extenderlo al tipo semicon-

tinuo y continuo que buscan producciones industriales. El nuevo modelo puede ser usado para la aplicación de técnicas de estimación y control para las cuales deberá cumplir con las condiciones estructurales requeridas.

1.4. Objetivo General

Optimizar el rendimiento de un proceso de fermentación en la obtención de productos de gran valor agregado.

1.4.1. Objetivos particulares

- Analizar los datos que resulten de la experimentación de procesos de fermentación para la obtención de productos de valor agregado
- Proponer una estructura de la tasa de crecimiento para dichos procesos
- Estimar los parámetros de la tasa propuesta
- Validar el modelo
- Aplicar un estimador de estados no lineal para un tipo de proceso de fermentación, en el cual las variables a estimar son las biomásas o crecimiento celular.
- Diseñar una ley de control no lineal para un tipo de proceso de fermentación que logre mantener vivas las biomásas o microorganismos

1.5. Hipótesis

Con la determinación de una tasa de crecimiento para el modelado de un proceso operado en modo lote, será posible aplicar un estimador de los estados no disponibles en la medición, para la aplicación de una ley de control que mejore el rendimiento celular en un reactor biológico.

1.6. Estado del arte

Se revisaron trabajos cuyo objetivo fuera aplicar técnicas de observabilidad para la estimación paramétrica de sistemas biológicos. En [4] se diseñó un observador bajo suposiciones técnicas (funciones Lipschitz); su principal resultado fue la construcción de un observador exponencial, es una clase de observador de Luenberger extendido, su desarrollo es muy cercano al observador de alta ganancia con un diseño simple. En [31] se propone una ley de control PID no lineal robusta, la ley de control linealizante es acoplada con un observador proporcional derivativo de orden reducido que estima los términos cinéticos desconocidos que se relacionan con la biorreacción. En [3] se diseñó un observador adaptativo que describe el proceso de crecimiento microbial utilizando la estructura de la tasa de crecimiento de Monod. La estabilidad y la convergencia se garantizan mediante la teoría de estabilidad de Lyapunov, además se adiciona una condición de excitación persistente para lograr la convergencia paramétrica del observador; la estimación de los estados fue rápida, no así la estimación paramétrica. En [34] se trabajó con estimadores basados en observadores, su principal objetivo es mostrar un método sistemático de sintonización para la estimación paramétrica.

En [20] se estudió el diseño de observadores prácticos con propiedades de observabilidad reducida, es decir, que a partir de la o las entradas y de las lecturas en línea del sistema, no se pueden estimar todos los demás estados, entonces el sistema pierde la característica de inyectividad; este problema fue solucionado empleando un observador de alta ganancia aproximado basado en eventos. En [19] se diseñó un observador no lineal de alta ganancia que tuvo un buen desempeño, se suponen perturbaciones en la medición de oxígeno (medición en línea) para lo cual construyen un observador integral de alta ganancia, el cual mostró un mejor desempeño que el observador de alta ganancia convencional. Estas técnicas fueron aplicadas a un proceso de tratamiento de aguas residuales, en donde se utilizó un control óptimo que logró minimizar el tiempo de reacción en el biorreactor reduciendo el tiempo en

cada ciclo del proceso. En [5] se usó un modelo multi-escala para describir el comportamiento dinámico del cultivo retroalimentado aeróbico; se diseñó un control de lazo cerrado que sigue la trayectoria de producción óptima de etanol, mediante una función objetivo que maximiza la concentración de producto final de la etapa lote, logrado mediante el uso de un algoritmo de control predictivo. En [6] se resaltan las ventajas y desventajas de dos aproximaciones empleadas en el diseño de un control adaptativo de un proceso biológico, que busca neutralizar el efecto tóxico de etanol o producto en el crecimiento celular, ambos métodos mostraron buenos resultados. En [15] proponen un control óptimo de lazo cerrado que se divide en dos partes, en la primera se determina un perfil de concentración de sustrato óptimo, y en la segunda se diseña un controlador que sigue dicho perfil. Esta ley fue probada en un proceso de lote alimentado con producción de biomasa, se comparó con otra ley de lazo abierto óptima resultando mejor la de lazo cerrado.

Con lo mencionado anteriormente, se puede concluir que para poder hablar de control y/o estimación de estados o parámetros es necesario contar primeramente con un modelo matemático, que pueda representar lo más fiel posible la dinámica de reacción en un reactor biológico, por este motivo el siguiente capítulo se enfoca particularmente en conceptos generales para el modelado de procesos de fermentación.

1.7. Organización de la tesis

La organización de este trabajo es la siguiente:

El Capítulo 2 trata la metodología considerada y los conceptos en la determinación del modelo matemático de procesos de fermentación de acuerdo al modo de operación del reactor biológico, se exponen criterios importantes para el establecimiento de la estructura final de la tasa de crecimiento, y se explica el método de estimación paramétrica mediante el método simplex de Nelder-Mead para modelos no lineales.

En el Capítulo 3 se caracteriza el modelo matemático de la tasa de crecimiento

de un proceso de fermentación con formación de productos, para ello son aplicados los conceptos y el método de estimación mostrados en el Capítulo 2. El modelo es ajustado para diez fermentaciones distintas, cuatro de ellas en condiciones aeróbicas y seis anaeróbicas.

En el Capítulo 4 se estudia el observador de Kalman con término lineal, se muestra su aplicación a un proceso de competencia microbiana empleado en la biodegradación de contaminantes orgánicos, a este le es aplicado un controlador que busca mantener ambas poblaciones microbianas vivas. También se aplica un estimador de lazo abierto a una fermentación realizada en un biorreactor operado en modo lote.

Por último en el capítulo 5 se dan las conclusiones de este trabajo así como la visión de trabajos por realizar.

Capítulo 2

Metodología

2.1. Introducción

Son de nuestro interés los procesos que consisten en la fermentación de un substrato mediante microorganismos tales como levaduras o bacterias, y cuyo objetivo es la obtención de un producto particular al mínimo costo y bajo las limitaciones de material, condiciones de pureza específicas y equipo existente. Los procesos de fermentación pueden clasificarse de acuerdo al modo de operación del biorreactor en de tipo: lote, semicontinuos y continuos [38]. El primer paso para la determinación de su modelo es aplicar criterios cuantitativos y cualitativos basados en las observaciones obtenidas de la experimentación [40]. Esta clase de sistemas se caracterizan por la no linealidad de sus expresiones matemáticas con que puede ser descrito el metabolismo celular, por lo que son clasificados de acuerdo al nivel de detalle usado para ello [37]. Su grado de complejidad es determinado por factores tales como: la cantidad de conocimiento que se tiene de ellos, el requerimiento de datos para su construcción y validación, requerimientos computacionales y la intención de su uso [7].

Para poder dar un panorama general del alcance e importancia de un modelo capaz de representar de manera satisfactoria el comportamiento de un proceso se

puede mencionar que en [26] se desarrolló un modelo nuevo que describe la producción de ácido acético; los parámetros fueron estimados mediante un algoritmo genético. Este nuevo modelo es capaz de explicar el comportamiento del proceso a escala industrial. En [32] se presenta un modelo matemático adaptativo para procesos de fermentación basado en ecuaciones de balance de masas y de átomo, además de ecuaciones que describen el sistema de ácido-base. El modelo es llevado a una forma o estructura adaptativa mediante la inclusión de ecuaciones de transporte para la transferencia de masas y de expresiones no estructuradas para las cinéticas de fermentación, resultando ser una herramienta muy útil en el monitoreo y predicción del proceso de fermentación. En [25] se buscó describir matemáticamente la fermentación tipo lote de etanol. Once modelos diferentes se consideraron tomando en cuenta la posibilidad de inhibición por sustrato o producto en el crecimiento celular. En [27] se construyó un modelo no estructurado y no segregado para un proceso de producción de etanol de pequeña escala en un reactor tipo torre con reciclado celular, fue aplicado para describir los datos experimentales obtenidos en un proceso de gran escala. El escalamiento no afectó el desempeño en el biorreactor considerando el modelo propuesto. En [30] proponen un modelo no estructurado para el análisis del comportamiento cinético del crecimiento celular en un cultivo tipo lote. Un método simplex fue usado para la estimación de los parámetros del modelo. En [29] estimaron los parámetros de varios modelos matemáticos que buscan describir el crecimiento celular y el consumo de sustrato. Esto fue realizado mediante el uso del método Gauss-Newton modificado. Por último en [22] se presenta un estudio fisiológico, cinético, cuantificado además del modelo del efecto "killer" en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismo muy empleada en la obtención de etanol.

Después de la revisión de los trabajos anteriores se desea enfatizar en la importancia que tiene el modelado de estos procesos, como una herramienta útil para determinar o predecir dentro de que rangos o límites pueden o deben operar, este conocimiento puede hacer la diferencia en el logro de mejores rendimientos en el menor tiempo, lo cual es el objetivo final.

En este capítulo se muestra las estructuras de modelos los modelos matemáticos comúnmente usados en los procesos de fermentación, los principios y criterios aplicados para la determinación de su estructura, su estimación paramétrica, el establecimiento del índice de desempeño y su validación; los conceptos dados en este capítulo fueron obtenidos de [22], [17], [7], [28], [24] y [18]. Finalmente se dan algunas conclusiones del capítulo.

2.2. Tipos de modelos

Se ha vuelto muy popular y útil el uso de modelos matemáticos que describan a los procesos de crecimiento microbial que sirvan como plataforma para la generación de algoritmos de control y/o estimación, tanto de variables como de parámetros. Es importante considerar y mantener en mente los objetivos del modelo, para incluir en su estructura la información necesaria e indispensable que asegure su exitoso empleo. Se pueden distinguir tres tipos de modelos usados para el control de estos procesos [17], mencionados a continuación.

- Modelos fisiológicos: este tipo de modelos se basan en el conocimiento que se tiene del proceso de crecimiento microbial, el cual es normalmente definido sin la necesidad de emplear expresiones matemáticas.
- Modelos estructurados: este tipo de modelos generalmente representan a los sistemas mediante ecuaciones diferenciales parciales que son matemáticamente muy complejas, por lo que la experimentación necesaria para su validación a gran escala es muy difícil y cara. Por esto no han sido usados aún para el control de biorreactores.
- Modelos no estructurados: en estos modelos se considera que el proceso se basa en el crecimiento celular homogéneo de uno o más microorganismos. Su representación matemática es relativamente más simple y pueden representar

la dinámica celular con una buena precisión, por lo que son muy usados para el diseño de controladores basados en el modelo.

Este último tipo de modelo es el de interés en este trabajo.

2.3. Modelo general de crecimiento microbiano en un reactor biológico

Como ya se mencionó en la introducción de este capítulo, una herramienta de gran importancia para el control de los bioprocesos es el poder contar con un modelo que pueda definir con la mejor precisión posible la dinámica del proceso. A este respecto se ha encontrado que los modelos más estudiados se han basado principalmente en leyes de conservación, como balances de masa y de energía para su determinación. Estos deben contener información por lo menos básica del proceso de conversión, tener bien definidos los estados bioquímicos, identificando los componentes a cambiar (concentraciones del proceso) y contar con información de rendimientos a diferentes condiciones de operación, sugeridas muchas veces por referencias bibliográficas previas relacionadas con el proceso en cuestión. Estos balances pueden ser extendidos haciendo otras consideraciones físicas como grado de reducción, número de electrones de intercambio, balances termodinámicos. A continuación se analiza el uso del balance de masa en un biorreactor.

2.3.1. Balance de masas en un biorreactor

El modelo matemático general de los procesos de fermentación es obtenido mediante el balance de materia en un biorreactor, una forma general de este concepto es la ley de conservación de la masa [19].

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Flujo másico} \\ \text{de acumulación} \end{array} \right\} = \left\{ \begin{array}{l} \text{Flujo másico} \\ \text{de ingreso} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Flujo másico} \\ \text{de salida} \end{array} \right\} + \left\{ \begin{array}{l} \text{Flujo másico} \\ \text{de formación} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Flujo másico} \\ \text{de consumo} \end{array} \right\} \quad (2.1)$$

Su representación matemática es la siguiente:

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = F_1C_{1i} - F_2C_{2i} + Vrf_i - Vrc_i \quad (2.2)$$

V = volumen de cultivo

F_1, F_2 = flujo de entrada y de salida

C_{1i}, C_{2i} = concentración de entrada y salida del componente i

rf_i, rc_i = velocidad de formación y de consumo del componente i

La concentración de salida se puede considerar idéntica a la que entra en el reactor biológico si el cultivo está bien mezclado, también el volumen variará según sean el flujo de entrada y de salida. Ahora bien, dependiendo de como sean F_1 y F_2 surgen los tres modos de operación de los biorreactores que son: en lote, semicontinuos y continuos. Se analiza primero el modo continuo.

Modo continuo: En este caso ambos flujos son iguales ($F_1 = F_2$), el volumen V es constante y la ecuación (2.2) queda de la siguiente manera [33],

$$V \frac{dC_i}{dt} = F(C_{1i} - C_{2i}) + V(rf_i - rc_i) \quad (2.3)$$

Se hace el análisis para cada componente,

1. Biomasa

- se considera que no hay consumo ni muerte de ella.

$$V \frac{dx}{dt} = F(x_{in} - x) + V(rf_x - 0) \quad (2.4)$$

como x_{in} es muy pequeña se le considera cero, se divide todo entre el volumen (V):

$$\frac{dx}{dt} = -\frac{F}{V}x + rf_x \quad (2.5)$$

como F/V es igual a la tasa de dilución, se sustituye por D y rf_x es $\mu(t)x$ donde $\mu(t)$ es la función de la tasa de crecimiento específica que puede estar en función de una o más variables y parámetros (se hablará con más detalle en la sección 2.3.5), se hará abuso de notación indicando por tasa de crecimiento específica solo μ :

$$\frac{dx}{dt} = -Dx + \mu x \quad (2.6)$$

2. Substrato (a partir de la ecuación (2.3))

- concentración de substrato al inicio considerado como una constante en la entrada
- existe salida
- no existe formación, solo consumo debido al crecimiento de biomasa.

Resultando:

$$V \frac{ds}{dt} = F(s_{in} - s) - Vrc_s \quad (2.7)$$

dividiendo entre V , sustituyendo F/V por D y rc_s es $\mu x/Y_{x/s}$ donde $Y_{x/s}$ es el rendimiento o coeficiente de conversión de biomasa a sustrato [21], se tiene:

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{\mu x}{Y_{x/s}} + D(s_{in} - s) \quad (2.8)$$

3. Producto

- no se introduce producto en el proceso ni hay consumo,

- hay salida y formación.

La expresión es la siguiente:

$$V \frac{dC_p}{dt} = -FC_{2p} + Vrf_p \quad (2.9)$$

dividiendo la expresión entre V e igualando la velocidad de formación de producto a $\alpha\mu x$ donde α es el coeficiente de rendimiento o conversión de biomasa a producto, se tiene la ecuación:

$$\frac{dp}{dt} = \alpha\mu x - Dp \quad (2.10)$$

Algunos modelos incluyen el balance de oxígeno cuando el tipo de fermentación estudiada es aeróbica y la participación de esta variable es importante. La velocidad de transferencia del oxígeno o rO_2 , desde la fase gaseosa (burbujeante) hasta la fase líquida está dada por la siguiente ecuación [21]:

$$rO_2 = K_{La}(C_L^* - C_L) = \frac{dC_L}{dt} \quad (2.11)$$

donde

K_{La} es el coeficiente de transferencia volumétrico de oxígeno en h^{-1} (1/horas).

C_L es la concentración de oxígeno disuelto en el líquido en g/l (gramos/litro).

C_L^* es la constante de saturación de oxígeno en g/l (gramos/litro).

C_L^* es la concentración de oxígeno disuelto que estaría en equilibrio con la presión parcial de oxígeno de la fase gaseosa. El K_{La} depende del diseño del biorreactor, de las condiciones de operación (caudal de aire, agitación) y de la viscosidad del cultivo. A mayor viscosidad menor K_{La} . Este parámetro es una medida de la capacidad que posee un biorreactor para suministrar O_2 .

Si se incluye un estudio estequiométrico [33] se tiene :

$$rO_2 = \frac{\mu x}{Y_{x/o}} \quad (2.12)$$

donde $Y_{x/o}$ es el coeficiente de rendimiento o de conversión de oxígeno a biomasa, sustituyendo la ecuación (2.12) en (2.11) y despejando la velocidad de concentración de oxígeno disuelto en el líquido, se obtiene:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_{La}(C_L^* - C_L) - \frac{\mu X}{Y_{x/o}} \quad (2.13)$$

Este balance puede ser más complejo debido al tipo de cultivo, en los casos aquí presentados el cultivo es tipo continuo por lo que el balance está dado por [21]:

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Tasa de} \\ O_2 \text{ disuelto} \end{array} \right\} = \left\{ \begin{array}{l} O_2 \text{ disuelto} \\ \text{de entrada} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} O_2 \text{ disuelto} \\ \text{de salida} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Respiración} \\ \text{endógena} \end{array} \right\} + \left\{ \begin{array}{l} \text{Transferencia de} \\ \text{saturación de } O_2 \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Pérdida de } O_2 \text{ disuelto} \\ \text{por crecimiento de biomasa} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Transferencia de} \\ O_2 \text{ disuelto} \end{array} \right\}$$

resultando la ecuación:

$$F \frac{dC_L}{dt} = FC_{in} - FC_L - r + K_{La}C_L^* - \left(\frac{\mu}{Y_{x/o}} \right) - K_{La}C_L$$

Reacomodando se tiene

$$F \frac{dC_L}{dt} = - \left(\frac{\mu}{Y_{x/o}} + r \right) + F(C_{in} - C_L) + K_{La}(C_L^* - C_L) \quad (2.14)$$

donde C_{in} es la concentración de oxígeno disuelto de entrada. En este caso se considera la respiración endógena (r) despreciable [19] y sustituyendo la tasa de dilución

se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{dC_L}{dt} = - \left(\frac{\mu}{Y_{x/o}} \right) x + D(C_{in} - C_L) + K_{La}(C_L^* - C_L) \quad (2.15)$$

2.3.2. Estructura del modelo de un proceso continuo

Considerando los principios de balance de masas anteriores, la estructura del modelo de un sistema de crecimiento celular aeróbico es de la siguiente manera general [33]:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= -Dx + \mu x \\ \frac{ds}{dt} &= -\frac{\mu x}{Y_{x/s}} + D(s_{in} - s) \\ \frac{dp}{dt} &= \alpha \mu x - Dp \\ \frac{dC_L}{dt} &= - \left(\frac{\mu}{Y_{x/o}} \right) x + D(C_{in} - C_L) + K_{La}(C_L^* - C_L) \end{aligned} \quad (2.16)$$

La mayoría de los modelos no estructurados se basan en los criterios aquí presentados, las diferencias en su establecimiento fueron debido a las consideraciones que se hicieron como son:

- el tipo de tasa de crecimiento microbial
- las variables de interés
- los valores que podrían ser despreciados
- las técnicas aplicadas para el logro de sus objetivos
- y los sensores con que cuentan.

2.3.3. Estructura del modelo de un proceso semicontinuo

Estos procesos también conocidos como lote alimentado pueden modelarse a partir de los mismos principios dados en el análisis de la Sección 2.3.1, la diferencia

es que se llevan a cabo sin que haya salida de medio de cultivo (es decir biomasa, substrato y producto), la variación del volumen en el biorreactor no es cero sino una constante, y el proceso se termina cuando el medio ha alcanzado un cierto volumen en el biorreactor. Bajo estos últimos aspectos se muestra el modelo general para procesos de lote alimentado anaeróbico [19], [28] y [8]:

$$\begin{aligned}
 \frac{dx}{dt} &= -\frac{F}{V}x + \mu x \\
 \frac{ds}{dt} &= -\frac{\mu x}{Y_{x/s}} + \frac{F}{V}(s_o - s) \\
 \frac{dp}{dt} &= \alpha \mu x - \frac{F}{V}p \\
 \frac{dV}{dt} &= Cte.
 \end{aligned}
 \tag{2.17}$$

2.3.4. Estructura del modelo de un proceso en lote

Este tipo de operación no admite entradas, por lo que no es posible proponer una ley de control de lazo cerrado, sin embargo, estos cultivos son muy importantes, ya que a partir de ellos se determinan los parámetros de importancia y se define bajo qué criterios es viable extender el modelo a los tipos continuos y/o semicontinuos, así como su escalamiento a niveles de producción industriales. De manera sencilla la estructura del modelo general para un proceso de fermentación anaeróbico es:

$$\begin{aligned}
 \frac{dx}{dt} &= \mu x \\
 \frac{ds}{dt} &= -\frac{\mu x}{Y_{x/s}} \\
 \frac{dp}{dt} &= \alpha \mu x
 \end{aligned}
 \tag{2.18}$$

2.3.5. Tipos de tasa de crecimiento específica μ

En [22] se hace referencia al estudio de procesos que presentan un efecto de inhibición o "killer". En este trabajo se muestran varias tasas de crecimiento y los

criterios que se consideran para su establecimiento cuando este efecto se presenta. Esta condición es la que más influye en un proceso de fermentación y puede estar en función de una o varias variables y/o parámetros. Debido a esto, es importante determinar la expresión matemática que al ser sustituida en el modelo general pueda representar satisfactoriamente el crecimiento microbiano en un biorreactor, la obtención de producto y el consumo de sustrato. La precisión del modelo depende fuertemente de la estructura de esta función que describa adecuadamente el crecimiento celular en un rango de condiciones del medio.

Analizando la tasa de crecimiento μ , se pueden observar seis fases que describen su comportamiento en un cultivo tipo lote (las siguientes definiciones fueron tomadas de [22]):

- **Fase de latencia:** Esta fase se sitúa inmediatamente después de la inoculación (preadaptación en matraz) del microorganismo o cepa en el medio. Durante esta primera etapa, el microorganismo se adapta a su nuevo medio, se reorganiza y sintetiza nuevas enzimas.

Este tiempo de adaptación puede variar en función del estado fisiológico del microorganismo y de factores físico-químicos tales como la temperatura, el pH, el oxígeno. De igual manera los nutrientes y los sustratos presentes en el medio pueden inducir la represión de actividades metabólicas. Es posible reducir y aún de suprimir la fase de latencia por la inoculación de una población "preadaptada" habiendo sido objeto de un precultivo en las mismas condiciones de crecimiento.

- **Fase de aceleración:** La fase de aceleración comienza desde la adaptación efectiva de las células a sus nuevas condiciones de cultivo. Durante este periodo, el valor de μ aumenta hasta alcanzar su valor máximo ($\mu_{\text{máx}}$).
- **Fase de crecimiento exponencial:** Esta fase se caracteriza por una multiplicación exponencial de la población microbiana. Las células se encuentran

entonces en un estado fisiológico óptimo y la tasa de crecimiento μ se mantiene en su valor máximo $\mu_{\text{máx}}$.

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\text{max}}x \quad (2.19)$$

- **Fase de desaceleración:** Durante la fase de desaceleración, el valor de μ disminuye hasta hacerse nulo. Esta reducción de la velocidad de crecimiento puede deberse a un agotamiento de ciertos elementos nutritivos del medio o provocada por la acumulación en el curso del cultivo de productos metabólicos tóxicos para el microorganismo.
- **Fase estacionaria:** Durante toda la duración de la fase estacionaria, la concentración de biomasa permanece constante ($x = \text{cte}$). La velocidad específica de crecimiento es por lo tanto nula ($\mu = 0$). Este estado global del cultivo puede ser explicado por una interrupción de la duplicación celular o por un equilibrio entre la velocidad de crecimiento ($\frac{dx}{dt}$) y la velocidad de mortalidad ($\frac{dx_m}{dt}$) ver [19].

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad (2.20)$$

- **Fase de decadencia:** La decadencia corresponde a una disminución de la población microbiana, se trata de la última etapa del proceso. Esta pérdida de biomasa es causada por una carencia energética (agotamiento de las reservas) o por una intoxicación por productos metabólicos.

$$\frac{dx}{dt} = -Kx \quad (2.21)$$

El objetivo de un modelo matemático consiste en describir cuantitativamente el comportamiento representado por los valores obtenidos mediante experimentación

y que están en función de las concentraciones de interés (biomasa, substrato, producto) y parámetros (tasas de rendimiento, parámetro de inhibición). La influencia de algunas variables se puede despreciar frente al efecto de otras, esta simplificación permite establecer modelos matemáticos generalizados en función de un número limitado de variables. En las Tablas de 2.1 a 2.5 se muestran distintas tasas de crecimiento recopiladas de [22].

2.3.6. Tipos de producto obtenidos en un reactor biológico

Las dinámicas de formación de productos microbianos pueden ser de tres tipos,

- **Asociado al crecimiento:** el producto es formado simultáneamente al crecimiento de biomasa. En este caso, la velocidad específica de formación de producto (ν_p) y de crecimiento son proporcionales [9].

$$\frac{1}{x} \frac{dP}{dt} = \nu_p = \alpha\mu(X, \beta) \quad (2.66)$$

Como ejemplo está la producción de ácido glutámico.

- **No asociada al crecimiento:** la secreción del producto se efectúa durante la fase estacionaria, mientras la velocidad de crecimiento es nula. En este caso la velocidad específica de formación del producto es constante.

$$\frac{1}{x} \frac{dP}{dt} = \nu_p = \beta \quad (2.67)$$

Como ejemplo clásico se tiene la producción de antibióticos.

- **Parcialmente asociada al crecimiento:** la producción tiene lugar durante la fase de crecimiento y durante la fase estacionaria. Entonces, la velocidad específica de producción puede ser expresada según el formalismo matemático de Luedeking y Piret:

$$\frac{1}{x} \frac{dP}{dt} = \nu_p = \alpha\mu + \beta \quad (2.68)$$

Un ejemplo es la fermentación láctica y la producción de goma de xanthane.

A continuación se explica un método de modelado de procesos de fermentación.

2.4. Consideraciones para selección y ajuste del modelo

Cuando se tiene la necesidad de determinar un modelo matemático a partir de una serie de experimentos, es importante manejar apropiadamente los datos para el establecimiento correcto de las hipótesis a considerar. Una sugerencia del manejo de los resultados experimentales se da a continuación:

- **Análisis de datos:** una parte muy importante en el modelado de procesos de fermentación es primeramente contar con una banco de datos confiables del experimento en cuestión. Primeramente se deben ordenar para analizarlos en detalle, ésto se hace en conjunto con alguien especializado en el área de fermentaciones que ayude con la interpretación de los datos. Los datos son obtenidos mediante la toma de muestras cada determinado tiempo del medio de cultivo en el reactor biológico, estos tiempos pueden variar según sea el tipo de biomasa, substrato o producto a manejar. Estos datos están dados en cantidades celulares por lo que deben ser procesados para pasarlos en gramos por litro que son las unidades con las que se trabaja comúnmente.
- **Preparación de la información:** una vez que los datos han sido analizados se procede a su graficación, se deben ajustar a curvas suaves mediante herramientas de software, como ajuste a un polinomio. A partir de estas curvas ya suavizadas se obtienen las velocidades específica y de estas se procede a obtener los valores de algunos parámetros mediante ecuaciones [ver apéndice B]. Los valores calculados son usados en las simulaciones.
- **Establecimiento de hipótesis:** una vez obtenidos los valores paramétricos de

manera teórica y de haber analizado la información experimental se procede al establecimiento de hipótesis. Los criterios a considerar son:

- Tipo de crecimiento celular
- Tipo de formación de producto
- Tipo de funcionamiento del reactor biológico

Son de gran importancia en la determinación del modelo.

2.5. Estimación paramétrica

Para lograr una buena estimación paramétrica es necesario proponer una estructura de la tasa de crecimiento, que con los datos teóricos pueda en una primera aproximación, representar mediante simulación los datos experimentales, de tal forma que con un ajuste paramétrico sea posible determinar un modelo exacto que represente satisfactoriamente las dinámicas de biomasa, substrato y producto del sistema. Para ello es necesario contar también con un modelo de salida, que junto con los datos experimentales se puedan someter a un método de ajuste paramétrico. A continuación se muestra el proceso para realizar la estimación paramétrica que se aplicará en el capítulo tres.

2.5.1. Modelo de salida

Además del modelo del sistema es necesario determinar una función o un modelo de salida que pueda relacionar o representar el conjunto de datos resultantes de la experimentación. No existe una guía o método universal para su diseño, en [24] se sugiere graficar los datos y si una línea recta no se ajustan a estos, se busca su aproximación a una curva suave; la forma de la curva y la correcta interpretación de los datos podrían sugerir la estructura del modelo de salida. Un serio problema surge si existen errores de medición adheridos a las variables de salida, ya que al ajustar

el modelo estos errores no están incluidos. Algunas veces es considerado este error constante [30] y en otros casos se hace ajustar el modelo de salida a un polinomio, tomando como error de medición a la diferencia entre datos y el polinomio [29]. El modelo de salida que se emplea en la Sección 3.6 está formado por los estados del sistema, que para el caso de los procesos biológicos aquí referidos son:

$$\begin{aligned} y_1 &= x \\ y_2 &= s \\ y_3 &= p \end{aligned} \tag{2.69}$$

donde y_1 , y_2 y y_3 son las mediciones de las concentraciones de biomasa, substrato y producto, respectivamente. Si las condiciones iniciales de estas variables no se conocen con precisión, también se puede incluir su ajuste si el valor inicial tomado en el desarrollo del método no está muy alejado del real.

2.5.2. Linealización del modelo de salida

Una vez que se cuenta con la estructura del modelo del sistema, el modelo de salida y el conjunto de datos experimentales, se puede proceder al ajuste paramétrico.

Sea el modelo del sistema y el modelo de salida dado por:

$$\frac{dX}{dt} = f(X, \beta, t), \dots x(0) = \eta \tag{2.70}$$

$$y = g(X(t), \beta, t) \tag{2.71}$$

Donde X son los estados, η son las condiciones iniciales y β los parámetros. Se asume que no hay errores en las mediciones del modelo de salida.

Se calculan las soluciones de (2.70) quedando en función de condiciones iniciales y parámetros representadas simbólicamente por:

$$X(t) = F(X(t), \beta, t) \quad (2.72)$$

La técnica de nuestro interés consiste en linealizar el modelo de salida para hacer uso de técnicas lineales. El mínimo deseado de la suma de los cuadrados de los errores se encuentra de manera iterativa, se requiere de valores iniciales de los parámetros y de manera cíclica se obtienen nuevos estimados hasta que el criterio de convergencia es alcanzado. Un problema en este método es que al ser un modelo no lineal, pueden existir más de un mínimo, por lo que si los valores iniciales de los parámetros están muy lejos de los valores que minimicen la función objetivo, puede terminar en otro mínimo diferente al deseado. Linealizando el modelo de salida $y(t)$ y considerando la solución del modelo se obtiene la siguiente expresión [29]:

$$g(X, \beta, t) = g_0 + \frac{\partial g_0}{\partial X^T} \frac{\partial F_0}{\partial \eta^T} \Delta \eta + \left[\frac{\partial g_0}{\partial X^T} \frac{\partial F_0}{\partial \beta^T} + \frac{\partial g_0}{\partial \beta^T} \right] \Delta \beta \quad (2.73)$$

donde g_0 así como las derivadas parciales $\frac{\partial g_0}{\partial X^T}$, $\frac{\partial F_0}{\partial \eta^T}$, $\frac{\partial F_0}{\partial \beta^T}$ y $\frac{\partial g_0}{\partial \beta^T}$ son evaluadas en los puntos (η, β) considerados como condiciones iniciales, $\Delta \eta$ es el incremento entre condiciones iniciales η y las ajustadas, $\Delta \beta$ es el incremento entre los parámetros iniciales β y los ajustados, y F_0 son las soluciones del sistema quedando las expresiones en función de condiciones iniciales y parámetros,

$$X(t) = F_0(t, \beta, \eta) \quad (2.74)$$

considerando la propiedad que nos dan las funciones de sensibilidad de estimar el primer orden del efecto de la variación paramétrica en las soluciones (véase [18]) se tienen las siguientes matrices,

$$\Lambda = \frac{\partial F}{\partial \eta^T} \quad (2.75)$$

$$M = \frac{\partial F}{\partial \beta^T} \quad (2.76)$$

Introduciendo las matrices en (2.73) la expresión puede ser simplificada de la siguiente manera:

$$g(X, \beta, t) = g_0 + \left[\frac{\partial g_0}{\partial X^T} \Lambda : \frac{\partial g_0}{\partial X^T} M + \frac{\partial g_0}{\partial \beta} \right] \Delta \nu \quad (2.77)$$

donde

$$\Delta \nu = \begin{bmatrix} \Delta \eta \\ \Delta \beta \end{bmatrix} \quad (2.78)$$

Por último, la expresión (2.77) se sustituye en una función objetivo o índice de desempeño, que se verá a continuación y se procederá a la estimación.

Índice de desempeño

La estimación de parámetros del modelo se basa en la minimización de una expresión llamada índice de desempeño. Existen diversas técnicas para este propósito, el método aplicado en el caso que se expondrá en el siguiente capítulo es el método simplex de Nealder-Mead [29] y [30], este índice se expresa:

$$J = \sum_{i=1}^n W [Y_i - g_i(X_i, \beta, t)]^2 \quad (2.79)$$

donde n es el número de muestras, W es una matriz de pesos que puede ser la identidad, Y_i son las mediciones, y $g_i(X_i, \beta, t)$ es la expresión (2.77). Una vez establecida esta función, el problema de estimación no lineal es un problema de optimización en el espacio de parámetros, donde Y 's y X 's son valores numéricos y β 's las variables.

Este método simplex es empleado por la facilidad que presenta una herramienta en Matlab para su aplicación. El método requiere que la función a minimizar (2.79) esté dentro de un conjunto compacto, el cual lo determina el mismo programa vea [41].

2.6. Conclusiones

En este capítulo se estudió la metodología a emplear mostrando la importancia de los modelos no estructurados que describen a los procesos biológicos, específicamente a las fermentaciones. Se aplicó el principio de conservación de masa en la obtención del modelo general considerando el modo de operación del bioreactor, ya que de ello depende la selección de ecuaciones a emplear para el modelado. Se mencionaron los tipos de tasas y las características importantes a considerar para su selección. También se habló de los tipos de productos que pueden existir según su influencia en el crecimiento de biomasa. Se describió la importancia del establecimiento de la estructura del modelo del sistema, del modelo de salida y de la estimación paramétrica para poder lograr que el modelo propuesto pueda representar satisfactoriamente los datos experimentales; para esto fue necesario mostrar herramientas de optimización como lo es el índice de desempeño empleando el método simplex de Nelder-Mead. Este método es el aplicado en el capítulo siguiente en el modelado de procesos de fermentación.

$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \quad (2.22)$ <p>Monod (1942)</p>	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S - S} \quad (2.23)$ <p>Hanson y Tsao (1972)</p>
$\mu = \mu_m \frac{S^n}{K_S + S^n} \quad (2.24)$ <p>Moser (1958)</p>	$\mu = \mu_m \frac{S}{(S + K_S) \left(1 + \frac{S}{K_I}\right)} \quad (2.25)$ <p>Andrews (1968)</p>
$\mu = \mu_m \frac{S \left(1 + \frac{S}{K_I}\right)}{S + K_S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (2.26)$ <p>Webb</p>	$\mu = \mu_m \frac{S}{S + K_S \left(\frac{S^2}{K_I}\right) \left(1 + \frac{S}{K_I}\right)} \quad (2.27)$ <p>Yano y Coll (1972)</p>
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \exp\left(\frac{-S}{K_I}\right) \quad (2.28)$ <p>Aiba y Coll</p>	$\mu = \mu_m \left[\exp\left(-\frac{S}{K_I}\right) - \exp\left(-\frac{S}{K_S}\right) \right] \quad (2.29)$ <p>Teissier</p>
$\mu = \mu_m \frac{S}{S + K_S \left(1 + \frac{\sigma}{K_I}\right)} \quad (2.30)$ <p>$\sigma =$ fuerza iónica Webb</p>	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S^*} \quad (2.31)$ $\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S^*} \quad (2.32)$ <p>Wayman y Tseng</p>
$\mu = \mu_m \frac{S}{S + K_S \left(1 - \frac{S}{S_C}\right)} \left(1 - \frac{S}{S_C}\right)^n \quad (2.33)$ <p>Han y Levenspiel (1988)</p>	$\mu = \mu_m \frac{S_1}{K_{S_1} + S_1} \frac{S_2}{K_{S_2} + S_2} \quad (2.34)$ <p>Tsao y Hanson (1975)</p>
$\mu = \mu_m \left[1 - \exp\left(\frac{-S}{K_S}\right) \right] \quad (2.35)$ <p>Tessier</p>	$\mu = \mu_m \frac{S}{S + K_S} \left(1 + \frac{S}{S_C}\right)^n \quad (2.36)$ <p>Luong (1987)</p>
$\mu = \frac{\mu_m S \left(1 + \frac{S}{K_I}\right)}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (2.37)$ <p>Edwards (1970)</p>	$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S + \left(\frac{S^2}{K_I}\right) \left(1 + \frac{S}{K_I}\right)} \quad (2.38)$ <p>Edwards (1970)</p>

$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P} \quad (2.39)$ $\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \frac{K_P}{S + K_P P}$ <p>Aborhey y Williamson (1977)</p>	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P} \quad (2.40)$ <p>Aiba y col. (1968)</p>
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \frac{1}{1 + P^2} \quad (2.41)$ <p>Kishimoto y col. (1983)</p>	$\mu = \mu_m \frac{N}{N + K_N \left(\frac{P}{K_P} + 1 \right)^2} \quad (2.42)$ <p>N = Substancia sulfurosa Leh y Charles (1989)</p>
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S + SPK_P} \quad (2.43)$ <p>Ishizaki y col. (1989)</p>	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S + \frac{SP^2}{K_P}} \quad (2.44)$ <p>Beal (1991)</p>
$\mu = \mu_m \frac{S}{S + K_S \left(1 - \frac{P}{P_C} \right)^m} \left(1 - \frac{P}{P_C} \right)^n \quad (2.45)$ <p>Han y Levenspiel (1988)</p>	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} (1 - KP) \quad (2.46)$ <p>Luong (1987)</p>
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{P}{P_C} \right)^n \quad (2.47)$ <p>Levenspiel (1980)</p>	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{P}{P_C} \right) \quad (2.48)$ <p>Ghose y Tyagi</p>
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \exp(-KP) \quad (2.49)$ <p>Aiba y col.</p>	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \sqrt{\left(1 - \frac{P}{P_C} \right)} \quad (2.50)$ <p>Bazua y Wilke</p>

Cuadro 2.2: Modelos matemáticos del crecimiento expresados en función de las concentraciones de sustrato y de producto

$\mu = \mu_m \frac{S}{BX + S} \quad (2.51)$ <p>Comtois (1959)</p>	$\mu = \mu_m \frac{S}{S + K_S \left(1 - \frac{X}{X^*}\right)^m} \left(1 - \frac{X}{X^*}\right) \quad (2.52)$ <p>Han y Levenspiel (1988)</p>
---	---

Cuadro 2.3: Modelos matemáticos del crecimiento expresados en función de las concentraciones de substrato limitante y de biomasa

$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{P}{P_c}\right) \quad (2.53)$ <p>Bibal y col. (1989)</p>	$\mu = \mu_m \frac{K_P}{K_P + P} \quad (2.54)$ <p>Tayeb y col. (1984)</p>
$\mu = \mu_m \exp(-aP + b) \quad (2.55)$ <p>Taniguchi y coll. (1987)</p>	$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{P}{P_c}\right)^* \quad (2.56)$ <p>Levenspiel (1980)</p>
$\mu = \mu_m - K(P - K_I) \quad (2.57)$ <p>Holzberg y col.</p>	

Cuadro 2.4: Modelos matemáticos del crecimiento microbiano expresados en función de la concentración de producto

$\mu = \mu_m[1 - Ax] \quad (2.58)$ <p style="text-align: center;">Logística</p>	$\mu = \mu_m[1 - (Ax)^\alpha] \quad (2.59)$ <p style="text-align: center;">Muchandani y col. (1988)</p>
$X = a_0 + a_1(t-t_i) + a_2(t-t_i)^2 + \dots + a_n(t-t_i)^n \quad (2.60)$ <p style="text-align: center;">Spline</p>	$x = a \exp[-(b - ct)] \quad (2.61)$ <p style="text-align: center;">Gomperz</p>
$Y = a \{1 + b \exp[c(d - t)]\}^{(-\frac{1}{b})} \quad (2.62)$ <p style="text-align: center;">Richards</p>	$Y = \left(\frac{1 - b \exp(c + 1 - b - at)}{1 - b} \right)^{\left(\frac{1}{b}\right)} \quad (2.63)$ <p style="text-align: center;">Schnute</p>
$Y = a \left[1 + \exp - \frac{(b + kt)}{c} \right]^{(-c)} \quad (2.64)$ <p style="text-align: center;">Stannard</p>	$Y = a \{1 - \exp[-b \exp(c \ln t)]\} \quad (2.65)$ <p style="text-align: center;">Weibull</p>

Cuadro 2.5: Modelos matemáticos del crecimiento expresados en función de la concentración de biomasa

Capítulo 3

Ajuste del modelo en procesos de fermentación

3.1. Introducción

En el capítulo anterior se desarrolló la metodología que sirve de base para el modelado de procesos de fermentación; a tales procesos se les dedica este capítulo. Este capítulo inicia con la importancia de los productos en la industria biotecnológica y la caracterización de la estructura de la tasa de crecimiento microbiana obtenida mediante la metodología mostrada en el capítulo anterior. Dicha caracterización debe ser capaz de representar los datos obtenidos mediante experimentación, es decir un modelo matemático validado.

3.2. Importancia de productos en la industria biotecnológica

De un estudio realizado en [42], se menciona que la producción anual de bagazo de caña de azúcar es de 200 millones de toneladas mundiales, y sólo el 16 % está industrializado; actualmente se desea integrarlo a los productos biotecnológicos, la salud

y la alimentación entre otros. El territorio mexicano producen más de 14,071,000 toneladas de bagazo anuales que es frecuentemente utilizado como combustible en los molinos del centro azucarero o como fertilizante.

Desde finales del siglo la industria azucarera ha estado sufriendo serios problemas al verse afectada por la importación de fructuosa (un edulcorante derivado del maíz que sustituye al azúcar en procesos como la elaboración de refrescos). Esto trajo la quiebra de 27 ingenios de 60 existentes en el país. Siendo esta situación preocupante, como una propuesta para su solución, investigadores de la Unidad y Desarrollo de Alimentos (UNIDA) del Instituto Tecnológico de Veracruz y de la Universidad Veracruzana, propusieron la utilización del bagazo de caña de azúcar para la obtención de otros productos alternos obtenidos a través de la fermentación alcohólica como son: etanol, ácido acético y xilitol.

Un mercado biotecnológico creciente es la producción a gran escala de etanol como combustible líquido renovable, siendo su producción en 1998 de 31.2 billones de litros; en Brasil está siendo empleado en lugar de la gasolina. El ácido acético es un producto que es importado por México. El xilitol es un alcohol dulce natural de alto valor sobre agregado con un costo en el mercado de \$6 USD por libra, tiene características importantes como su poder edulcorante similar a la sacarosa, se utiliza como sustituto del azúcar principalmente en dulces que no producen caries, en preparaciones de higiene oral (dentífricos y enjuague bucal), y en comidas para diabéticos debido a su metabolismo altamente independiente de la insulina, también se utiliza en preparaciones farmacéuticas (tabletas, pastillas para la garganta, jarabe para la tos, tabletas multivitamínicas) y como sustituto de glucosa en soluciones para nutrición parenteral.

Un objetivo obvio e importante es el poder llevar a estos procesos a niveles industriales, para lo cual se vuelve necesario y fundamental contar con un modelo matemático que pueda representar con gran fidelidad el proceso. Dicho modelo debe ser determinado a partir del comportamiento dinámico del proceso con el biorreactor, operando en modo lote para posteriormente extenderlo a operaciones semicontinua

y continua. La razón que ha influido para el estudio de este tipo de procesos es que aún la comunidad científica de biotecnología no ha quedado satisfecha con los resultados de rendimiento hasta el momento logrados, por lo que se considera un área con mucho por hacer.

3.3. Descripción del proceso

Numerosos estudios han sido realizados [21] y [28] para explicar el papel que juega el etanol y la forma de los posibles efectos de los ácidos orgánicos (ácido acético, ácido octanóico, etc.) así como el efecto entre ellos. No todos los microorganismos presentan la misma sensibilidad a ácidos orgánicos (etanol, ácido acético). La utilización de glucosa como sustrato por la levadura o microorganismo *Brettanomyces bruxellensis* a diferentes concentraciones de ácido acético bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas son causa de investigación. La presencia de dicho ácido provoca disturbios en el crecimiento y en la actividad fermentativa del microorganismo cuando sus concentraciones exceden los 2gl^{-1} . Se desea determinar la tasa de crecimiento específica que considere este efecto tóxico, la cual, al ser incluida en el modelo matemático general del proceso de fermentación tipo lote, pueda representar dicho comportamiento satisfactoriamente. La Figura 3.1 muestra el proceso físico estudiado a continuación.

3.4. Modelado de un proceso de fermentación con dos productos

Los procesos de fermentación además de considerar el modo de operación del biorreactor, si es un proceso aeróbico o anaeróbico, debe también considerar si cuenta con una o más biomasas, sustratos o productos. En esta sección se modela un proceso de fermentación en el que se obtienen dos productos etanol y ácido acético.

Análisis y arreglo de datos



Figura 3.1: Reactor biológico operado en modo lote

Se realizaron varios experimentos en un biorreactor operado en lote bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, se observó el crecimiento celular así como la obtención de dos productos, etanol y ácido acético. Los datos fueron ajustados a un polinomio de manera que se tuvieran curvas suaves para compararlas con el modelo propuesto. Para ello se diseñó un programa en Matlab que además de suavizar las curvas calcula las velocidades específicas y algunos parámetros. Una vez que se tuvo esta información se realizaron gráficas de los datos para analizarlos y así proceder al establecimiento de hipótesis.

3.5. Establecimiento de suposiciones

El modelo se construye de acuerdo a las siguientes hipótesis establecidas según las observaciones experimentales:

Los experimentos se puede dividir en dos casos

1. Cuando el medio de cultivo es alimentado de oxígeno durante el proceso
 - Todo el sustrato es consumido

- El sustrato no es totalmente consumido
2. Cuando existe una condición anaeróbica no estricta (el único oxígeno presente es el que fue disuelto en el medio inicial)
- Un fenómeno de inhibición debido a la combinación de biomasa y sustrato estuvo presente durante toda la fermentación

El modelo propuesto para la condición aeróbica está formado por las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned}
 \frac{dx}{dt} &= \mu x \\
 \frac{ds}{dt} &= -\frac{\mu x}{Y_{x/s}} \\
 \frac{dp_1}{dt} &= \alpha_1 \mu x \\
 \frac{dp_2}{dt} &= \alpha_2 \mu x
 \end{aligned} \tag{3.1}$$

La tasa de crecimiento μ que se propone es a partir de la establecida por Ishizaki en 1989 que presenta condiciones de inhibición debido al sustrato y al producto, y tiene la forma

$$\mu = \mu_{max} \frac{s}{K_s + s + K_i s p} \tag{3.2}$$

De acuerdo a las suposiciones y a los datos, se observa inhibición debido al sustrato y a la biomasa, teniendo la siguiente estructura,

$$\mu = \mu_{max} \frac{s}{K_s + s + K_i^q s x^q} \tag{3.3}$$

donde x es concentración de biomasa, s es concentración de sustrato, p_1 producto uno o etanol, p_2 producto dos o ácido acético, μ_{max} tasa de crecimiento máxima, $Y_{x/s}$ constante de rendimiento de biomasa a sustrato, K_s es la constante de saturación de sustrato, K_i el recíproco de la constante de inhibición, $\alpha_{1,2}$ relación entre la μ y etanol o ácido acético, q exponente en K_1 y x .

Para el caso anaeróbico las ecuaciones fueron las mismas, pero con sólo un producto que fue etanol. Los datos experimentales se ajustaron a un polinomio para suavizar las curvas, el parámetro μ_{max} se obtiene mediante la ecuación de velocidad específica de crecimiento (ver apéndice B).

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (3.4)$$

3.6. Modelo de salida

Se consideran los datos experimentales para proponer el modelo de salida, se determinan las concentraciones de biomasa, substrato y productos a distintas horas, éstas son tomadas como las soluciones de las ecuaciones de balance durante la fermentación, por tanto, son los valores a los que se debe ajustar el modelo.

$$y = g(X(t), \beta, t) = \begin{pmatrix} x \\ s \\ p_1 \\ p_2 \end{pmatrix} \quad (3.5)$$

donde y son datos observados, X estados o variables del sistema, β parámetros a estimar y t el tiempo en que se tomaron las mediciones. En el caso de este proceso, los estados son biomasa, substrato, producto uno y producto dos.

3.7. Estimación paramétrica

En el modelo (3.1) y la tasa propuesta (4.49) existen varios parámetros, lo que complica ajustarlos todos, por ello los parámetros q y α_2 son obtenidos mediante una herramienta gráfica de prueba y error mediante la solución de las ecuaciones ordinarias del sistema biológico en Matlab. Para el caso aeróbico las variables x y parámetros β a estimar son,

$$X = \begin{pmatrix} x \\ s \\ p_1 \\ p_2 \end{pmatrix}, \quad \beta = \begin{pmatrix} Y_{x/s} \\ K_s \\ \alpha_1 \\ K_i \end{pmatrix}$$

Para el caso anaeróbico los parámetros obtenidos gráficamente son q y α_1 , las variables X y parámetros β estimados son,

$$X = \begin{pmatrix} x \\ s \\ p \end{pmatrix}, \quad \beta = \begin{pmatrix} Y_{x/s} \\ K_s \\ K_i \end{pmatrix}$$

Con el sistema en función de variables y parámetros se procede a la obtención de las matrices expresadas en las ecuaciones (2.75) y (2.76),

$$\Lambda = \begin{pmatrix} \frac{\partial F_1}{\partial \eta_1} & \cdots & \cdots & \frac{\partial F_1}{\partial \eta_4} \\ \frac{\partial F_2}{\partial \eta_1} & \ddots & & \vdots \\ \frac{\partial F_3}{\partial \eta_1} & & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial F_4}{\partial \eta_1} & \cdots & \cdots & \frac{\partial F_4}{\partial \eta_4} \end{pmatrix}, \quad M = \begin{pmatrix} \frac{\partial F_1}{\partial \beta_1} & \cdots & \cdots & \frac{\partial F_1}{\partial \beta_4} \\ \frac{\partial F_2}{\partial \beta_1} & \ddots & & \vdots \\ \frac{\partial F_3}{\partial \beta_1} & & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial F_4}{\partial \beta_1} & \cdots & \cdots & \frac{\partial F_4}{\partial \beta_4} \end{pmatrix} \quad (3.6)$$

Considerando al modelo de salida formado por los estados x , s , p_1 y p_2 se tiene

$$\Gamma = \frac{\partial g}{\partial X^T} = I \quad \Upsilon = \frac{\partial g}{\partial \beta^T} = 0 \quad (3.7)$$

donde $X^T = [x, s, p_1, p_2]$, $F(X, \beta, \eta)$ son las soluciones numéricas del sistema a cada instante de tiempo, β son los parámetros a estimar y η las condiciones iniciales. La expresión final de acuerdo con (2.73) es,

$$Y_{mod} = g(X, \beta, t) = g_0 + \Lambda \eta + M \Delta \beta \quad (3.8)$$

En la sección siguiente se habla del ajuste de parámetros mediante un índice de desempeño.

3.8. Índice de desempeño

Los valores finales de los parámetros $\beta = [Y_{x/s} \alpha_1 K_s K_i]$ se encuentran mediante la minimización del índice de desempeño como se muestra en [29] y [30], se linealiza el modelo con respecto a los parámetros para ambos casos (aeróbico y anaeróbico), se resuelve el modelo numéricamente; las condiciones iniciales son los valores experimentales en tiempo cero (para la condición aeróbica X_0, S_0, P_{10}, P_{20} y para la condición anaeróbica X_0, S_0, P_{10}); los valores se muestran en la Tabla 3.1 y 3.2, respectivamente. El análisis de sensibilidad se incluye en la obtención de soluciones numéricas, las cuales a su vez se introducen en el índice de desempeño a minimizar

$$\min J = \sum_{i=1}^n (Y_{data,l} - Y_{m,l})^T (Y_{data,l} - Y_{m,l}) \quad (3.9)$$

en donde

$Y_{data,l}$ son los valores experimentales obtenidos de cada variable a cada instante l

$Y_{m,l}$ son los valores numéricos obtenidos de la solución del modelo en cada instante l

La estimación se lleva a cabo mediante el método simplex de Nelder-Mead, se calculan los intervalos de confianza de los parámetros $Y_{x/s}$, α_1 , K_s y K_i mediante métodos estadísticos [24] y [29]. Los límites de confianza individuales para cada parámetro estimado con nivel de probabilidad $(1 - \alpha_t)$ se obtienen mediante las siguientes expresiones

$$R = \left(\sum_{l=1}^N H_l^N W H_l \right) S_r^2 \quad (3.10)$$

$$S_r^2 = \frac{\min J(\beta)}{f} = \frac{\min J(\beta)}{nl - \lambda} \quad (3.11)$$

$$\zeta = \beta_{it} t(f, 1 - \alpha_t/2) * \sqrt{R_{vii}} \quad (3.12)$$

Donde $t(f, 1 - \alpha_t/2)$ es el valor de la distribución-t para f grados de libertad y para $(1 - \alpha_t/2)$ probabilidades, $\sqrt{R_{vii}}$ son las raíces cuadradas de los elementos de la diagonal principal de la matriz de covarianza R [24] y W es la matriz de pesos que en este caso es la identidad. Los valores se usan en la simulación del modelo propuesto y son comparados con los datos, las cinéticas están muy bien descritas como se muestra en las Figuras de 3.2 a la 3.10. Las Tablas 3.3 y 3.4 muestran los valores finales de los parámetros y los intervalos de confianza para ambas condiciones (aeróbica y anaeróbica respectivamente).

Los valores de los parámetros μ_{max} , q y α_2 en condiciones aeróbicas se muestran en la Tabla 3.5, y los de μ_{max} y q para condiciones anaeróbicas se muestran en la Tabla 3.6.

3.8.1. Validación del modelo

Se realizó el ajuste paramétrico para cuatro fermentaciones aeróbicas y para seis fermentaciones anaeróbicas en un biorreactor operado en modo lote. Sus valores finales se usaron en la simulación del modelo propuesto y se compararon con los datos experimentales, las cinéticas fueron ajustadas como se muestra en las Figuras de 3.2 a la 3.10.

3.9. Resultados

A continuación se muestran las figuras donde se aprecia cómo el modelo propuesto con la estimación paramétrica hecha puede representar satisfactoriamente los datos experimentales.

3.10. Conclusiones

En este capítulo se destacó la importancia de tecnologías nuevas que permiten solucionar problemas económicos importantes. Se expusieron diversas considera-

Condiciones iniciales en gl^{-1}				
<i>Variable (gl^{-1})</i>	1	2	3	4
x_o	0.01	0.019	0.01	0.01
s_o	48	51.93	46	48
p_{10}	0.01	0.03	0.01	0.01
p_{20}	1.22	2.23	3.5	3.95

Cuadro 3.1: Condiciones iniciales a diferentes concentraciones de ácido acético en condiciones aeróbicas

Condiciones iniciales en gl^{-1}						
<i>Variable (gl^{-1})</i>	1	2	3	4	5	6
x_o	0.04	0.019	0.03	0.05	0.04	0.05
s_o	50	47.2	48.8	49.2	50.2	49.6
p_{10}	0.06	0.03	0.001	0.052	0.01	0.06

Cuadro 3.2: Condiciones iniciales a diferentes concentraciones de ácido acético en condiciones anaeróbicas

Concentraciones de ácido acético gl^{-1}				
<i>Variable</i>	1	2	3	4
$Y_{x/s}(gl^{-1})$	0.13 \pm 0.012	0.097 \pm 0.008	0.082 \pm 0.01	0.092 \pm 0.017
K_s	21.51 \pm 5.60	10 \pm 3.75	9.36 \pm 2.19	10 \pm 3.2
α_1	2.21 \pm 0.19	3.6 \pm 0.34	5.81 \pm 0.75	3.97 \pm 0.79
$K_i(gl^{-1})$	2.58 \pm 0.25	1.17 \pm 0.18	2.21 \pm 0.27	1.84 \pm 0.33

Cuadro 3.3: Intervalos de confianza a diferentes concentraciones de ácido acético en condiciones aeróbicas

Concentración de ácido acético gl^{-1}				
<i>Variable</i>	1	2	3	4
$Y_{x/s}$	0.094 \pm 0.008	0.095 \pm 0.006	0.095 \pm 0.014	0.074 \pm 0.013
$K_s(gl^{-1})$	5.04 \pm 8.53	12.68 \pm 2.56	10 \pm 10.38	20 \pm 7.06
α_1	5.27 \pm 0.45	5.52 \pm 0.35	4.34 \pm 0.67	6.66 \pm 1.19
$K_i(gl^{-1})$	7.03 \pm 0.63	2.41 \pm 0.16	9.91 \pm 1.52	3.35 \pm 0.56

Cuadro 3.4: Intervalos de confianza a diferentes concentraciones de ácido acético en condiciones anaeróbicas

Concentraciones de ácido acético gl^{-1}				
Parámetro	1	2	3	4
$\mu_{max}(h^{-1})$	0.2624	0.0959	0.052	0.0537
α_2	0.55	0.55	0.65	0.3
q	1	1	2	4

Cuadro 3.5: Valores paramétricos obtenidos graficamente a diferentes concentraciones de ácido acético en condiciones aeróbicas

Concentración de ácido acético gl^{-1}						
Parámetro	1	2	3	4	5	6
$\mu_{max}(h^{-1})$	0.2816	0.1171	0.2079	0.1258	0.0536	0.0397
q	1	1	1	2	3	3

Cuadro 3.6: Valores paramétricos obtenidos graficamente a diferentes concentraciones de ácido acético en condiciones anaeróbicas

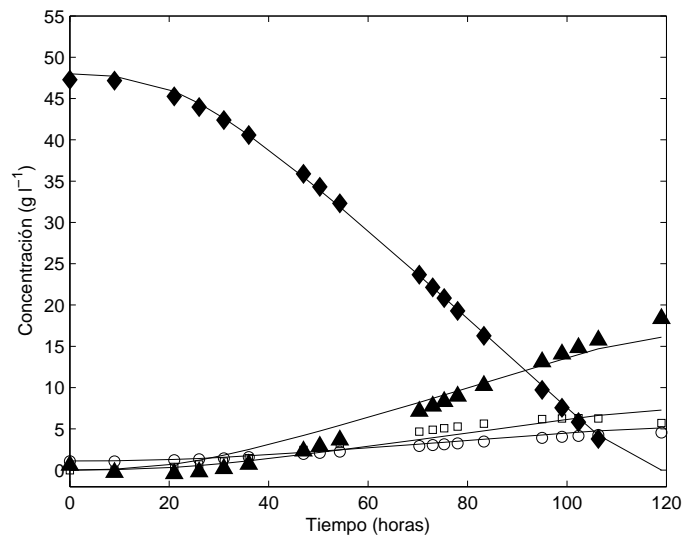


Figura 3.2: Cinética en condiciones aeróbicas con concentración de ácido acético de $1 g^{-1}$ con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)

ciones importantes para el establecimiento del modelos que representen apropiadamente las dinámicas del proceso de fermentación, los casos expuestos fueron en

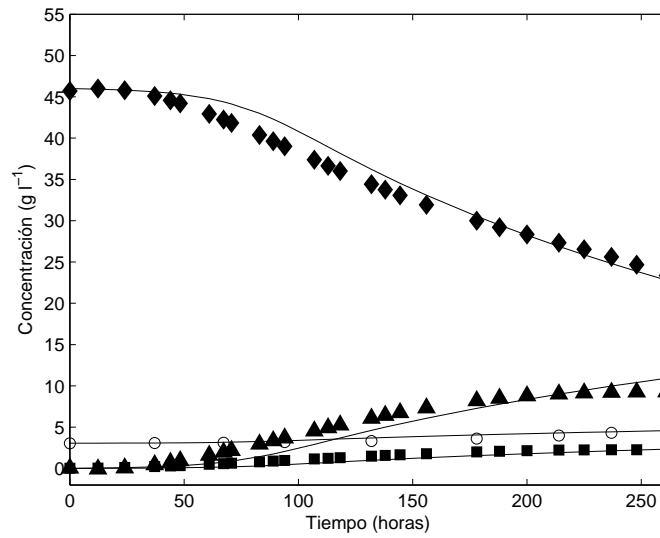


Figura 3.3: Cinética en condiciones aeróbicas con concentración de ácido acético de 3 g^{-1} con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)

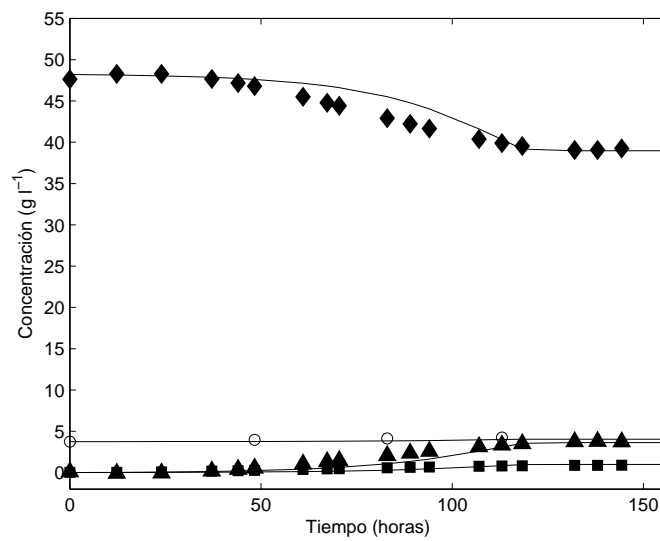


Figura 3.4: Cinética en condiciones aeróbicas con concentración de ácido acético de 4 g^{-1} con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)

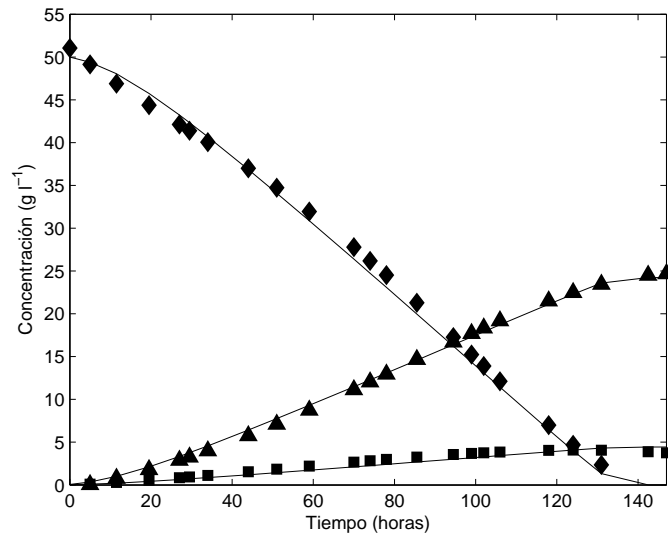


Figura 3.5: Cinética en condiciones anaeróbicas con concentración de ácido acético de 1 g^{-1} con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)

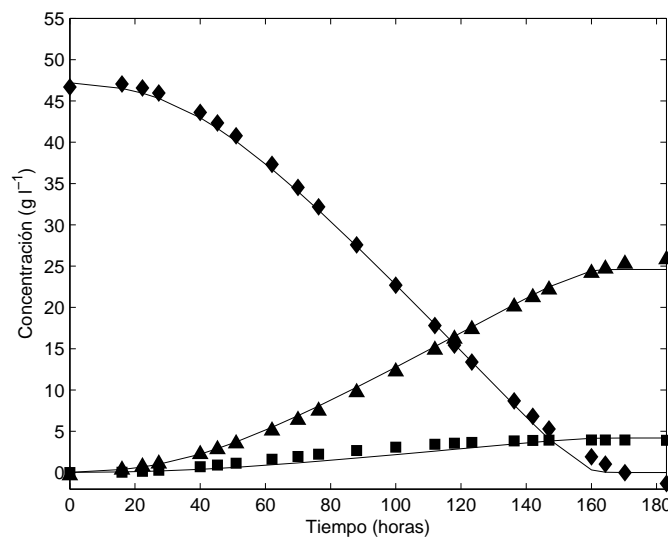


Figura 3.6: Cinética en condiciones anaeróbicas con concentración de ácido acético de 2 g^{-1} con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)

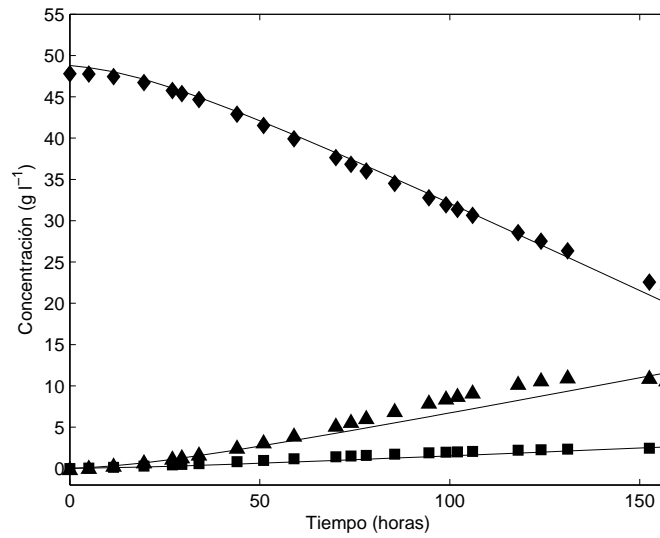


Figura 3.7: Cinética en condiciones anaeróbicas con concentración de ácido acético de 3 g^{-1} con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)

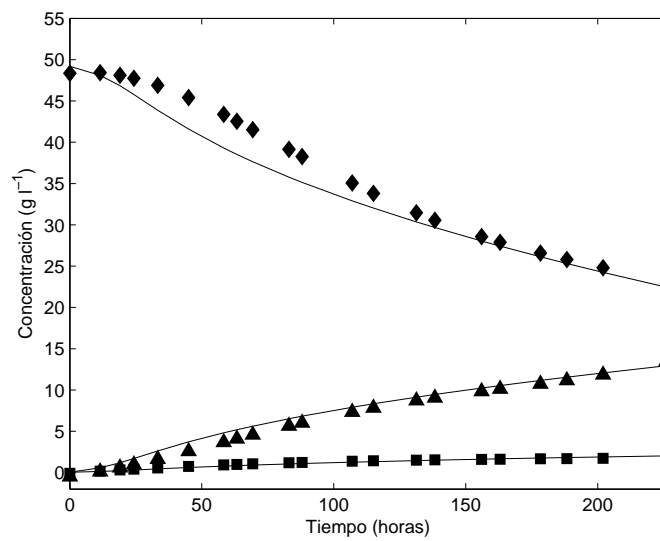


Figura 3.8: Cinética en condiciones anaeróbicas con concentración de ácido acético de 4 g^{-1} con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)

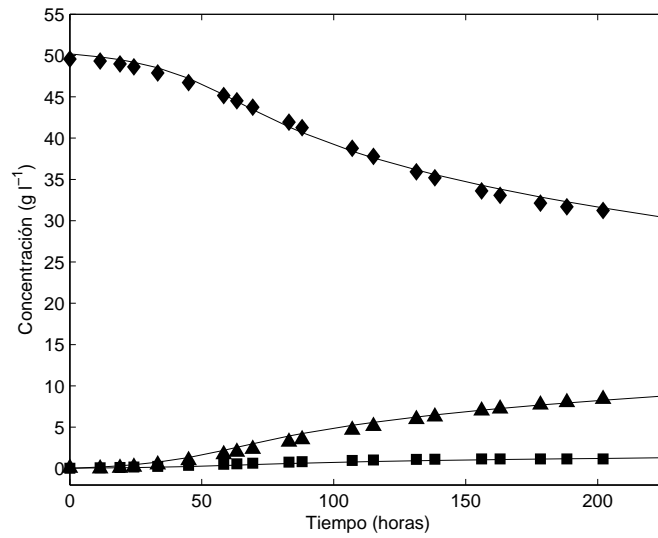


Figura 3.9: Cinética en condiciones anaeróbicas con concentración de ácido acético de 5 g l^{-1} con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)

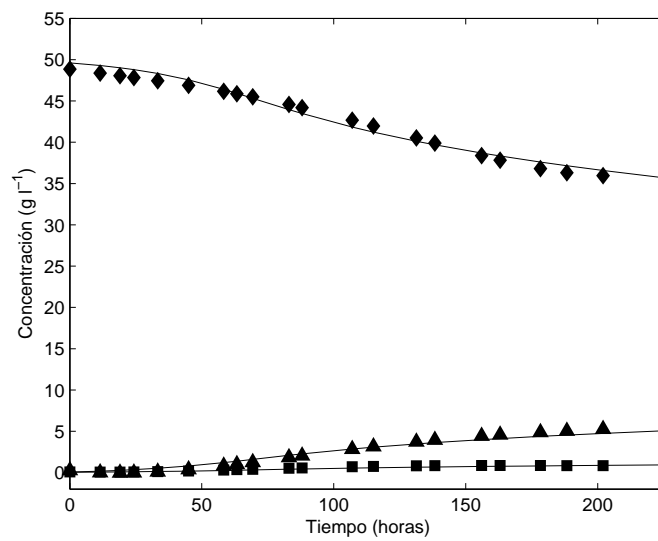


Figura 3.10: Cinética en condiciones anaeróbicas con concentración de ácido acético de 6 g l^{-1} con concentración de biomasa (cuadrado), sustrato (diamante), etanol (triángulo), ácido acético (círculo)

condiciones aeróbicas y anaeróbicas, el primero con la obtención de dos productos (etanol y ácido acético), en el segundo con un producto (etanol). Para los procesos aquí mostrados, las consideraciones hechas para el diseño del modelo fueron suficientes para poder representar las dinámicas de los sistemas, en ambos casos se aplicó el mismo método de estimación paramétrica, la cual es empleada en modelos no lineales. Es importante mencionar que es complicado estimar varios parámetros al mismo tiempo, por lo que se recurre a herramientas gráficas para la determinación de los parámetros. Para decidir cuales parámetros pueden ser determinados con esta herramienta, se analizan las curvas de velocidades específicas. La tasa de crecimiento es propuesta considerando la influencia del ácido acético como inhibidor. En ambas condiciones el modelo representa satisfactoriamente las dinámicas del proceso al ajustarse a los valores obtenidos experimentalmente. Este modelo es una aportación que permitirá a la comunidad científica la aplicación de controladores, observadores y estimadores de estado, facilitando la extensión del modelo a otros modos de operación en los reactores biológicos.

Capítulo 4

Estimación de procesos de fermentación

4.1. Introducción

La necesidad de conocer el comportamiento de las variables durante el proceso así como el limitado desarrollo de sensores o el alto costo de los existentes [17], ha hecho que el diseño de observadores o estimadores de software para procesos biológicos sea de importancia, además de dar la oportunidad de desarrollar e implementar en línea algoritmos de control que permitan minimizar tiempos y/o costos y maximizar la producción en dichos sistemas. Existen diferentes técnicas de estimación de estados que se distinguen por la calidad y cantidad de conocimiento que se tenga del proceso de acuerdo con [7]:

1. Mediciones indirectas que usan las mediciones de algunas variables para estimar las que no se pueden medir
2. Observadores que pueden hacer uso del modelo dinámico del proceso para calcular los valores de variables no medibles, éstos son usados donde las dinámicas del proceso están cambiando durante el curso del mismo.

3. Filtros de Kalman extendidos que pueden incluir información de las incertidumbres en el modelo así como de los errores de medición.
4. Estado secuencial/estimadores de parámetros que adapten los parámetros del modelo a los datos observados de manera continua.

En este capítulo se estudia el observador de Kalman extendido y su aplicación para un tipo de sistema no lineal, a éste le es aplicada una ley de control basada en el modelo dinámico general. También se aplica un estimador de lazo abierto que permite determinar la tasa de crecimiento al proceso presentado en la figura 3.6.

4.2. Observador

Para el sistema no lineal de la forma:

$$\begin{aligned}\dot{x} &= f(x) + g(x)u \\ y &= h(x)\end{aligned}\tag{4.1}$$

se dan las siguientes definiciones

Definición 1: Considerar el sistema descrito por (4.1). Dados dos estados x_1 y x_2 se dicen ser distinguibles si existe una función de entrada u tal que

$$y(t_0, x_1, u) \neq y(t_0, x_2, u)\tag{4.2}$$

donde $y(t_0, x_i, u)$ con $i = 1, 2$ es la función de salida correspondiente a la función de entrada u y a la condición inicial $x_i(0)$.

Definición 2: Considerar el sistema no lineal (4.1). El espacio de observación \mathcal{V} del sistema es el espacio lineal (sobre R) de funciones h_1, h_2, \dots, h_p y todas sus respectivas derivadas de Lie:

$$L_{x_1} L_{x_2} \dots L_{x_k} h_j, j \in p, k = 1, 2, \dots\tag{4.3}$$

en el conjunto $\{f, g_1, \dots, g_m\}$.

Teorema 1: Considerando al sistema 4.1 con dimensión n y a su espacio de observación

$$d\vartheta = \text{span}\left\{\frac{\partial h(x)}{\partial x}, \frac{\partial L_f h(x)}{\partial x}, \dots, \frac{\partial L_f^i h(x)}{\partial x}\right\} \quad (4.4)$$

Se asume que:

$$\dim(d\vartheta(x_0)) = n \quad (4.5)$$

Entonces el sistema es localmente observable en x_0 . Esta condición es conocida como condición de rango de observabilidad.

La ecuación (4.1) puede presentar varias estructuras o ser transformadas (cuando exista dicha transformación) a formas convenientes para las cuales ya existe alguna forma de observador determinada [8]. Una de estas estructuras son los llamados sistemas afines en el estado o de inyección de entrada:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= A(u, y)x + \varphi(u, y) \\ y &= Cx \end{aligned} \quad (4.6)$$

donde $x(t) \in R^n$ son las variables de estado, $y(t) \in R^p$ es la salida, $u(t) \in R^m$ es la entrada, $A(u, y)$ es una matriz que depende de u y de y , C es una matriz constante y $\varphi(u, y)$ es un vector que depende también de u y de y . Para esta forma de estructura se aplica el observador de Kalman que se basa en la minimización del criterio presentado en [1] y [2], dicho observador tiene la forma:

$$\begin{aligned} \dot{z} &= A(u, y)z + \varphi(u, y) + P^{-1}C^T(y - \hat{y}), \quad \hat{y} = Cz \\ \dot{P} &= -\theta P - A^T(u, y)P - PA(u, y) + C^T C \end{aligned} \quad (4.7)$$

donde P es una matriz que pertenece a la variedad de matices definida positiva simétrica de $GL(n, R)$ y sus soluciones conservan dicha característica y θ es una

constante mayor que cero que ayuda al observador a converger. Si definimos el error $e = x - z$ de las expresiones (4.6) y (4.7) se nota que $\varphi(u, y)$ no afecta

$$\dot{e} = (A(u, y) - P^{-1}C^T C)e \quad (4.8)$$

de manera que se puede tener $\varphi(u, y)$, pudiéndose aplicar el mismo observador[1]. A continuación se presentan otras definiciones importantes que fueron tomadas de [2].

Si se consideran las entradas admisibles pertenecientes a $L_{loc}^\infty[0, +\infty)$, es decir, al espacio Boreliano de funciones localmente acotadas en el intervalo $[0, +\infty)$, el cual toma sus valores en R^m .

Definición 3: u es universal para el sistema (4.6) en el intervalo $[0, T]$ si existe $\alpha > 0$ tal que,

$$\int_0^T \phi_u^T(s, 0)C^T C \phi_u(s, 0)ds \geq \alpha I \quad (4.9)$$

el lado izquierdo de la desigualdad es llamado índice de universalidad denotado por $I_{[0, T]}(u)$.

Definición 4: Decimos que $u \in L^\infty[0, +\infty)$ es una entrada de excitación persistente si:

$$\exists T > 0; \exists t_o > 0; \exists \alpha > 0; \forall t \geq t_o; I_{[0, T]}(u) \geq \alpha I \quad (4.10)$$

Teorema 2: Si $u \in L_{loc}^\infty[0, +\infty)$ es una entrada regularmente persistente entonces (4.7) es un observador exponencial para (4.6), donde $\theta > 0; z(t) \in R^n y P(t) \in PS(n)$, donde $PS(n)$ es la variedad de matrices definidas positivas simétricas de $GL(n, R)$, $A^T(u, y)$ y C^T son las matrices transpuestas de $A(u, y)$ y C . Es decir:

$$\exists \square t_0 > 0; \forall \square t \geq t_0; \square \|z(t) - x(t)\| \leq K e^{-\theta t} \quad (4.11)$$

donde K es una constante dependiente solamente del estado inicial de (4.6) y (4.7). Ésto se puede probar de la siguiente manera:

De la ecuación de error se tiene:

$$\begin{aligned}
e(t) &= x(t) - z(t) \\
\dot{e} &= \dot{x} - \dot{z} \\
\dot{e} &= A(u, y)x + \varphi(u, y) - (A(u, y)z + \varphi(u, y) + P^{-1}C^T(Cx - Cz)) \\
\dot{e} &= (A(u, y) - P^{-1}C^TC)e \tag{4.12}
\end{aligned}$$

Sea $V(t) = e^T P e$ una función de Lyapunov, al derivarla se tiene:

$$\begin{aligned}
\dot{V}(t) &= e^T [P\dot{e} + e\dot{P}] + P e \dot{e}^T \\
\dot{V}(t) &= e^T P (A(u, y) - P^{-1}C^TC)e + e^T (-\theta P - A^T(u, y)P - PA(u, y) + C^TC)e \\
&\quad + P e [(A(u, y) - P^{-1}C^TC)e]^T \\
\dot{V}(t) &= -e^T P \theta e + P e [-(P^{-1}C^TC)e]^T \\
\dot{V}(t) &= -\theta e^T P e - e^T C^T C e \\
\dot{V}(t) &= -\theta V(t) - e^T C^T C e \tag{4.13}
\end{aligned}$$

Se puede notar que $e^T C^T C e \geq 0$ lo que implica que $0 \leq V(t) \leq V(0)e^{-\theta t} \forall t \geq 0$. Debido a que u es regularmente persistente, se tiene que $\exists t_0 > 0; \forall t \geq t_0; P(t) \geq \alpha I$ por lo que el observador descrito en (4.7) puede ser aplicado.

Partiendo de los conceptos anteriores se tiene,

Teorema 3: De manera general, el sistema no lineal (4.6) puede extenderse de manera que:

$$x = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_n \end{pmatrix}, \quad A(u, y) = \begin{pmatrix} 0 & \lambda_{12} & \dots & \lambda_{1n} \\ 0 & \lambda_{22} & \dots & 0 \\ \vdots & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & 0 & \dots & \lambda_{nn} \end{pmatrix}, \quad \varphi(u, y) = \begin{pmatrix} s_1 \\ s_2 \\ \vdots \\ s_n \end{pmatrix}$$

$$y = Cx = [1 \ 0 \ \dots \ 0]x \quad (4.14)$$

$$\vartheta = \begin{pmatrix} C \\ CA(u, y) \\ \vdots \\ CA^n(u, y) \end{pmatrix} \quad (4.15)$$

Si el determinante de ϑ es diferente de cero entonces 4.6 es observable y el observador 4.7 puede aplicársele directamente.

4.3. Procesos biológicos con interacción microbiana

En los procesos biológicos existen casos de interacción entre distintas poblaciones microbianas llamados cultivos mixtos, siendo éstos de importancia por sus aplicaciones en la preparación de alimentos fermentados. Las condiciones básicas por las cuales se mantienen a dos microorganismos en un biorreactor son [43]:

1. Cuando el substrato limitante es el mismo
 - Cuando las tasas de crecimiento específico coinciden
 - Cuando la especie con crecimiento más rápido es inhibida por su propio producto
 - Cuando el producto de la especie con crecimiento más rápido activa el crecimiento de la otra especie
 - Cuando su correcta combinación incrementa la conversión al producto deseado

2. Cuando los substratos limitantes son diferentes
 - Cuando diferentes substratos limitantes son alimentados en el cultivo

- Cuando el producto de una de las especies es el substrato limitante del crecimiento de la otra
- Cuando existe una relación predador-depredador

Términos como comensalismo, predación, mutualismo, amensalismo, neutralismo y competencia son referidos a este tipo de cultivos, de los cuales se estudia el último; el tipo de competencia aquí referido es por una misma fuente de alimentación ó por el tamaño de la población final (espacio). El modelo que se emplea en esta investigación consiste de dos microorganismos, uno de ellos dominante y por lo tanto capaz de eliminar al microorganismo más débil. El objetivo principal es lograr que el microorganismo más débil sobreviva y alcance una cierta diferencia de crecimiento con respecto al microorganismo dominante, para lo cual es necesario primero estimar su crecimiento (biomasas), debido a la estructura que presenta el modelo, se muestra la aplicación de un observador de Kalman con término no lineal definido para sistemas afines en el estado. Este modelo puede ser aplicado en la obtención de alcoholes, vinos, cerveza. La operación del biorreactor se realiza de modo continuo y con mezcla homogénea.

4.4. Observador para un proceso de competencia microbiana

Existen diversas causas que provocan la competencia microbiana, depende principalmente de sus tasas de crecimiento específicas; para cuando se tiene un mismo substrato limitante se mencionaron cuatro casos, hay una quinta causa, cuando por la misma naturaleza del proceso se presentan condiciones donde se activa un microorganismo no deseado y la competencia microbiana sucede sin provocarla desde el principio, este es el caso en la obtención de etanol, donde el microorganismo dominante y no deseado elimina al microorganismo de interés.

4.4.1. Modelo de competencia microbiana

De acuerdo con lo visto en la Sección 2.3, se hace a continuación el análisis del balance de masas para un proceso de competencia microbiana en un reactor biológico operado en modo continuo. Considerando mezcla homogénea y flujos de entrada y salida iguales se tiene de la expresión mostrada en (2.3)

$$V \frac{dC_i}{dt} = F(C_{1i} - C_{2i}) + V(rf_i - rc_i)$$

Biomasa: De la ecuación 2.4

$$V \frac{dx}{dt} = F(x_{in} - x) + V(rf_x - 0)$$

No hay entrada de biomasa (x_{in}) pero si salida (x), existe también formación (rf_x) pero no hay consumo, con esto se puede hablar de una acumulación en el biorreactor. Si $x_{in} = 0$, y la concentración de microorganismos, x , influye en la velocidad con que aumenta la población ($rf_x = \mu x$) se tiene:

$$V \frac{dx}{dt} = -Fx + V\mu x \quad (4.16)$$

Dividiendo entre V , posteriormente sustituyendo F/V por la tasa de dilución D se obtiene la expresión dada en la ecuación 2.6

$$\frac{dx}{dt} = -Dx + \mu x$$

Si se tienen dos microorganismos, el volumen en el biorreactor y los flujos de entrada y salida son los mismos para ambas poblaciones, las tasas de crecimiento dependerán de cada uno. Las expresiones finales para las biomásas son:

$$\begin{aligned} \frac{dx_1}{dt} &= -Dx_1 + \mu_1 x_1 \\ \frac{dx_2}{dt} &= -Dx_2 + \mu_2 x_2 \end{aligned} \quad (4.17)$$

Substrato: En el caso del sustrato, asumiendo mezcla homogénea, volumen constante en el biorreactor, flujos de entrada y salida iguales así como un solo sustrato para ambas poblaciones microbianas. Partiendo de la expresión (2.3), se tiene sustrato de entrada o alimentación (S_f), sustrato de salida (s), dentro del biorreactor no hay formación, por lo tanto $rf_i = 0$ donde $i = s$, existe consumo de sustrato (rc_s). Es necesario considerar el rendimiento o relación entre biomasa formada con respecto al sustrato consumido ($Y_{x/s}$) de la siguiente expresión

$$Y_{x/s} = \frac{rf_x}{rc_s} \quad (4.18)$$

donde rf_x es la velocidad de formación de biomasa y rc_s es la velocidad de consumo de sustrato, de la ecuación (4.18) se despeja la velocidad de consumo resultando la siguiente expresión

$$V \frac{ds}{dt} = F(S_f - s) + V \left(0 - \frac{rf_x}{Y_{x/s}} \right) \quad (4.19)$$

Ésta es la expresión para una sola biomasa, para el caso de dos microorganismos se consideran tasas de crecimiento específico para cada una, así como los rendimientos ($Y_{x1/s}$ y $Y_{x2/s}$), las velocidades de formación de biomasa serán diferentes para cada microorganismo:

$$V \frac{ds}{dt} = F(S_f - s) - V \left(\frac{rf_{x1}}{Y_{x1/s}} + \frac{rf_{x2}}{Y_{x2/s}} \right) \quad (4.20)$$

dividiendo la expresión entre V , y sustituyendo F/V por la tasa de dilución D , a rf_{x1} , rf_{x2} , $Y_{x1/s}$ y $Y_{x2/s}$ por $\mu_1 x_1$, $\mu_2 x_2$, Y_1 y Y_2 respectivamente

$$\frac{ds}{dt} = D(S_f - s) - \frac{\mu_1 x_1}{Y_1} - \frac{\mu_2 x_2}{Y_2} \quad (4.21)$$

Se tiene un modelo SISO que representa a dos microorganismos compitiendo por un mismo sustrato en un biorreactor que opera de modo continuo [12] y [22] y que

tiene la forma:

$$\begin{aligned}\dot{s} &= -\frac{\mu_1(s)}{Y_1}x_1 - \frac{\mu_2(s)}{Y_2}x_2 + D(S_f - s) \\ \dot{x}_1 &= \mu_1(s)x_1 - Dx_1 \\ \dot{x}_2 &= \mu_2(s)x_2 - Dx_2 \\ y &= s\end{aligned}\tag{4.22}$$

Donde s , x_1 y x_2 son las variables de estado del sistema y representan al substrato, al microorganismo uno y dos respectivamente, D es la tasa de dilución o entrada del sistema, se toma a s como la variable de salida y se considera una mezcla homogénea en el biorreactor. μ_1 y μ_2 son las tasas de crecimiento específico de los microorganismos x_1 y x_2 y tienen la estructura de Monod [ver Tabla 2.1]. Para el análisis se considera que

- La competencia sólo es por un nutriente esencial (substrato) en un cultivo mixto que contiene sólo dos microorganismos.
- No existe otra clase de interacción entre las poblaciones.
- Ambas poblaciones muestran una respuesta similar (μ_1 y μ_2 tienen la forma de Monod) a las condiciones de crecimiento predominantes.

Este modelo se presenta en procesos donde hay una contaminación o inhibición por uno de los microorganismos, o también se puede dar el caso de simbiosis. Existen distintas condiciones de competencia, la aquí considerada es cuando una de las tasas de crecimiento es mayor que otra, es decir $\mu_{max1} > \mu_{max2}$ y $K_{s1} > K_{s2}$. Este modelo es aplicable para la obtención de alcoholes (etanol, vinos, cerveza) y aguas residuales.

4.4.2. Aplicación del observador Kalman con término no lineal

Sea el sistema no lineal (4.22) con tasa de crecimiento específica de Monod,

$$\mu(s) = \mu_m \frac{s}{K_s + s}$$

se tiene:

$$x = \begin{pmatrix} s \\ x_1 \\ x_2 \end{pmatrix}, \quad A(u, y) = \begin{pmatrix} 0 & -\frac{\mu_1(s)}{Y_1} & -\frac{\mu_2(s)}{Y_2} \\ 0 & \mu_1(s) & 0 \\ 0 & 0 & \mu_2(s) \end{pmatrix}, \quad \varphi(u, y) = \begin{pmatrix} D(S_f - s) \\ -Dx_1 \\ -Dx_2 \end{pmatrix}$$

$$y = Cx = [1 \ 0 \ 0]x \quad (4.23)$$

$$\vartheta = \begin{pmatrix} C \\ CA(u, y) \\ CA^2(u, y) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & -\frac{\mu_1(s)}{Y_1} & -\frac{\mu_2(s)}{Y_2} \\ 0 & -\frac{\mu_1^2(s)}{Y_1^2} & -\frac{\mu_2^2(s)}{Y_2^2} \end{pmatrix} \quad (4.24)$$

el determinante de ϑ es diferente de cero con $s > 0$.

Del Teorema 1 se analiza el espacio de observación:

$$\begin{aligned} h(x) &= s \\ L_f h(x) &= -\frac{\mu_1(s)x_1}{Y_1} - \frac{\mu_2(s)x_2}{Y_2} \\ L_f^2 h(x) &= \left(-\frac{\mu_{max1}x_1 K s_1}{Y_1(K s_1 + s)^2} - \frac{\mu_{max2}x_2 K s_2}{Y_2(K s_2 + s)^2} \right) \left(-\frac{\mu_1(s)x_1}{Y_1} - \frac{\mu_2(s)x_2}{Y_2} \right) \\ &\quad - \frac{\mu_1^2(s)x_1}{Y_1} - \frac{\mu_2^2(s)x_2}{Y_2} \end{aligned} \quad (4.25)$$

De acuerdo a la expresión (4.4):

$$d\vartheta = \begin{pmatrix} 1 & \left(-\frac{\mu_{max1}x_1Ks_1}{Y_1(Ks_1+s)^2} - \frac{\mu_{max2}x_2Ks_2}{Y_2(Ks_2+s)^2} \right) & \Pi_1 \\ 0 & -\frac{\mu_1(s)}{Y_1} & \Pi_2 \\ 0 & -\frac{\mu_2(s)}{Y_2} & \Pi_3 \end{pmatrix} \quad (4.26)$$

donde las funciones Π_i con $i = 1, \dots, 3$ son las derivadas de $L_f^2 h(x)$ con respecto a los estados. El determinante de esta matriz que representa al espacio de observación es:

$$\det(d\vartheta) = -\frac{\mu_1(s)\Pi_3}{Y_1} - \frac{\mu_2(s)\Pi_2}{Y_2} \quad (4.27)$$

Si hacemos a $x_1 = 0$ y $x_2 = 0$ se tiene:

$$\det(d\vartheta) = \frac{\mu_1(s)\mu_2(s)}{Y_1Y_2} (\mu_2(s) - \mu_1(s)) \quad (4.28)$$

podemos concluir que la condición para que se mantenga la observabilidad es que $s \neq 0$, y se sabe que por condición física del sistema $s > 0$.

$$\det(d\vartheta) \neq 0, \forall s > 0 \quad (4.29)$$

Por lo que (4.7) puede ser un observador para (4.22), las ecuaciones resultantes son:

$$\dot{z}_1 = -\frac{\mu_1 z_2}{Y_1} - \frac{\mu_3 z}{Y_2} + D(S_f - s) + \frac{(P_4 P_6 - P_5^2)}{\Gamma} (y - \hat{y}) \quad (4.30)$$

$$\dot{z}_2 = \mu_1 z_2 - D z_2 + \frac{(P_3 P_5 - P_2 P_6)}{\Gamma} (y - \hat{y}) \quad (4.31)$$

$$\dot{z}_3 = \mu_2 z_3 - D z_3 + \frac{(P_2 P_5 - P_3 P_4)}{\Gamma} (y - \hat{y}) \quad (4.32)$$

$$\dot{P} = -\theta P - A^T(u, y)P - PA(u, y) + C^T C \quad (4.33)$$

$$\Gamma = P_1 P_4 P_6 + 2P_2 P_3 P_5 - P_3^2 P_4 - P_1 P_5^2 - P_6 P_2^2 \quad (4.34)$$

donde Γ es el determinante de la matriz P .

4.4.3. Simulaciones

En la Figura 4.1 se muestra el comportamiento de la biomasa para una tasa de dilución que varía de 0.15 a 0.25 en intervalos de 12.5 horas.

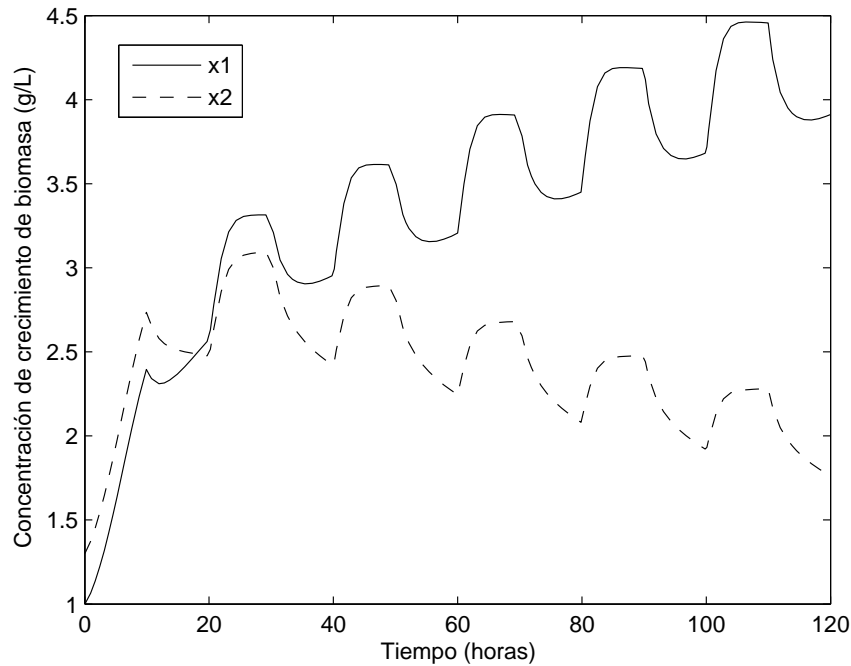


Figura 4.1: Sistema de competencia microbiana, x_1 biomasa dominante y x_2 dominada

Las estimaciones de x_1 y x_2 obtenidas a partir de (4.30) considerando la lectura en línea de sustrato se muestran en las figuras (4.2) y (4.3), el parámetro θ del observador (4.7) en lazo abierto es de 0.6 obtenido empíricamente, los demás valores son los mismos que en lazo cerrado.

4.5. Ley de control para competencia

Para la optimización del desempeño de biorreactores han surgido dos aproximaciones, la primera llamada trayectorias óptimas o de regulación y la segunda aproximación es la de minimización de un criterio de costo que no viole el comportamiento

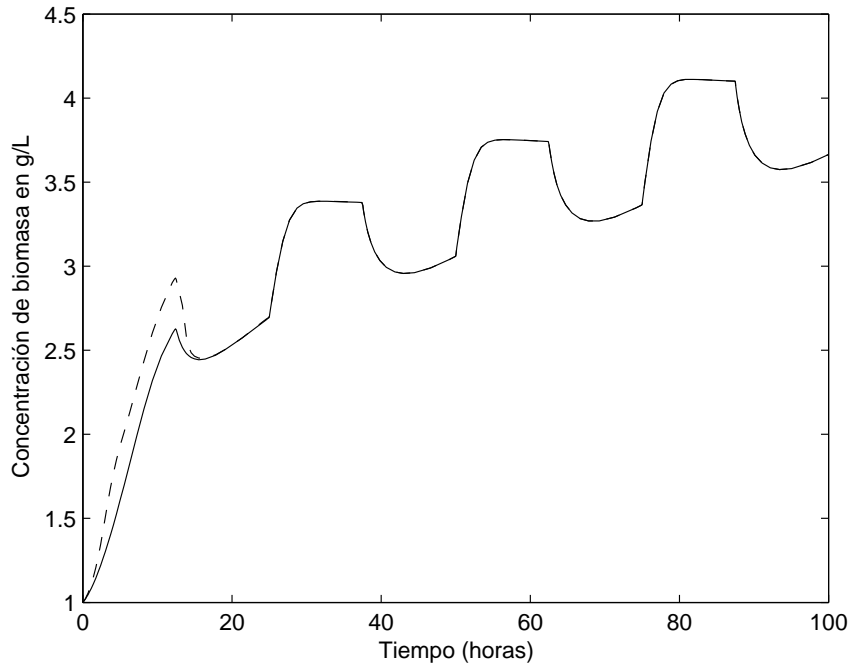


Figura 4.2: Microorganismo dominante (-) y su estimado (- -)

dinámico del modelo matemático que describe el proceso (seguimiento).

4.5.1. Importancia del control de procesos

Los procesos semicontinuos y continuos tienen la necesidad de contar con el control que busque maximizar la obtención de estos productos, minimizando costos y tiempo para su logro. Es entonces cuando se convierte en un problema de control que presenta los inconvenientes de ser procesos representados mediante modelos matemáticos no lineales, además de no contar con todos los sensores que monitoren el proceso. Debido a esto algunas mediciones se realizan fuera de línea, es decir, tomando muestras a intervalos de tiempo y analizándolas en laboratorios, lo cual hace imposible corregir en tiempo real al proceso en caso de presentarse un comportamiento no satisfactorio. Es pues necesario implementar dichos sensores o estimadores que ayuden a la obtención de valores suficientes y confiables de las dis-

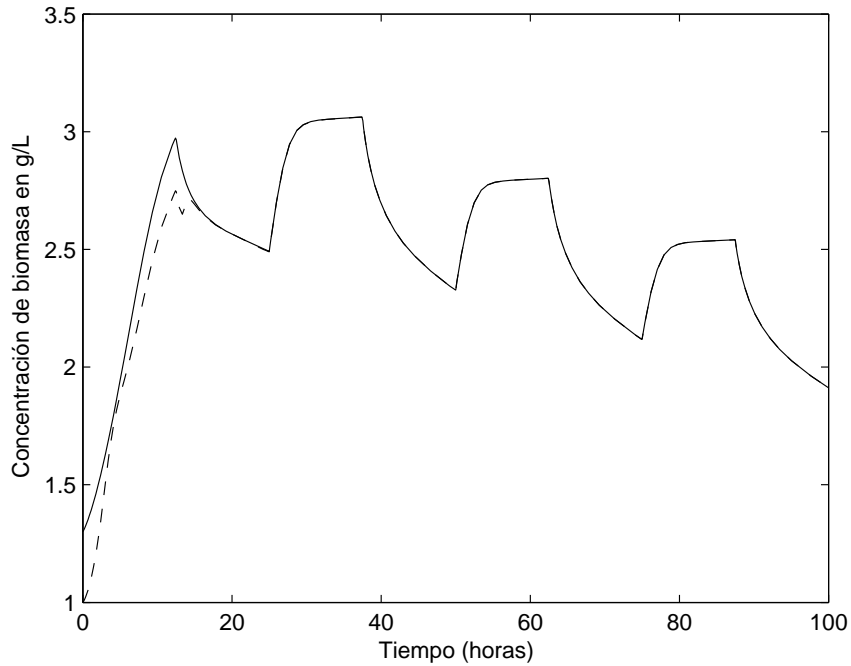


Figura 4.3: Microorganismo dominado (-) y su estimado (- -)

tintas variables que intervienen en el proceso, haciendo posible la implementación de leyes de control específicas y eficaces para los fines deseados. En este capítulo se muestra la aplicación de un observador definido para sistemas afines en el estado, y de una ley de control basada en el modelo dinámico general (MDG), aplicado a un proceso de competencia microbiana por un mismo sustrato. Se busca que ambos microorganismos sobrevivan y sólo exista una diferencia mínima entre ambas poblaciones microbianas.

4.5.2. Condiciones de control de procesos de fermentación

En los sistemas de bioprocesos donde el objetivo es la obtención de algún producto específico, se ha buscado, mediante el diseño de algoritmos de control, el optimizar la producción reduciendo costos y tiempo. Se pueden encontrar diseños óptimos [11], [14] y [10], adaptativos [6], basados en retroalimentación de salida [8] controles ro-

bustos o simples leyes linealizantes. En conclusión, el propósito es regular alguna de las variables, ya sea el substrato (s) que es la fuente de alimento o carbono, la biomasa (x) que es el microorganismo empleado o el producto deseado (p), haciéndolos alcanzar y/o seguir un punto de referencia o un perfil de comportamiento. Este punto o perfil puede ser determinado al fijar ciertas condiciones de operación, resultado del análisis teórico hecho por el especialista en control [8] y [13], o como una condición dada por el especialista en bioprocesos. Si una de las variables tiene que seguir una referencia, una ley de control no lineal donde $x^* \in \Omega(x)$ (siendo Ω el dominio de x) puede ser implementada. En [6] se propone una ley de control linealizante basada en el Modelo Dinámico General (MDG) que se aplica en este caso y que consiste de tres pasos. Primero se toma la variable a estabilizar en un punto y cuya derivada es cero,

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad (4.35)$$

esto es:

$$\frac{dx}{dt} = f(x) + g(x)u = 0 \quad (4.36)$$

Después es seleccionado el modelo de referencia para la regulación

$$\gamma(x^* - x) = \frac{dx}{dt} \quad (4.37)$$

El tercer paso consiste en igualar las ecuaciones y despejar la variable de control.

$$u = \frac{\gamma(x^* - x) - f(x)}{g(x)} \quad (4.38)$$

4.5.3. Ley de control con μ iguales

En el caso de competencia microbiana aquí considerado, se busca mantener vivos a ambos microorganismos (x_1 y x_2) y que el valor de x_1 sea mayor que x_2 por lo menos en 0.5. Para poder cumplir con ambos requerimientos es necesario observar el comportamiento de ambos microorganismos, determinar el total de biomasa que se

puede obtener y repartirla de tal manera que se cumpla con la segunda condición. Se aplica el control entrada/salida mostrado anteriormente fijando a x_2 , consecuentemente x_1 también se estabiliza cumpliendo con lo requerido. Para el diseño del control se considera la variable estimada z_3 , e igualando la expresión al valor en el que se desea establecerla (con $z_3 \rightarrow z_3^{ref}$), del que se sabe que su derivada es cero por ser una constante:

$$\frac{dz_3}{dt} = \Psi(z_3^{ref} - z_3) \quad (4.39)$$

Donde $\Psi > 0$ es un parámetro de sintonización. Por último se despeja D quedando de la forma:

$$D = \frac{-\Psi(z_3^{ref} - z_3) + \mu_2(z_1)z_3 + \frac{P_2P_3 - P_3P_4}{\Gamma}(y - \hat{y})}{z_3} \quad (4.40)$$

De la Figura 4.4 se observa que la biomasa total es de 6.4 para casi las 30 horas, se logra estabilizar a x_2 en un valor de 3g/l antes de las 50 horas cumpliendo con las condiciones de control. En la Figura 4.4 se muestran las dinámicas de z_1 y z_2 aplicando la ley de control mostrada en la expresión anterior.

En la figura 4.5 se muestra la tasa de dilución o entrada aplicada al sistema y en la Figura 4.6 se muestra la ley de control determinada en (4.40). Los valores de simulación fueron $s(0)=0.4$, $x_1 = 1$, $x_2=1.3$, $z_1=1$, $z_2 = 1$, $z_3 = 1$, $\mu_{max1}=0.4$, $\mu_{max2}=0.34$, $K_{s1}=0.4$, $K_{s2}=0.3$, $Y_1=1/.3636$, $Y_2=1/.5$, y $S_f=3$. $\theta =0.4$ y $\Psi=0.13$. La figura 4.6 muestra el comportamiento de la ley de control u propuesta.

4.5.4. Ley de control para μ diferentes

De la expresión (4.22) donde s , x_1 y x_2 son las variables de estado del sistema y representan al substrato, al microorganismo uno y dos respectivamente, D es la tasa de dilución o entrada del sistema, se toma a s como la variable de salida y se considera una mezcla homogéneo en el biorreactor. μ_1 y μ_2 son las tasas de crecimiento específico de los microorganismos x_1 y x_2 y tienen la estructura de

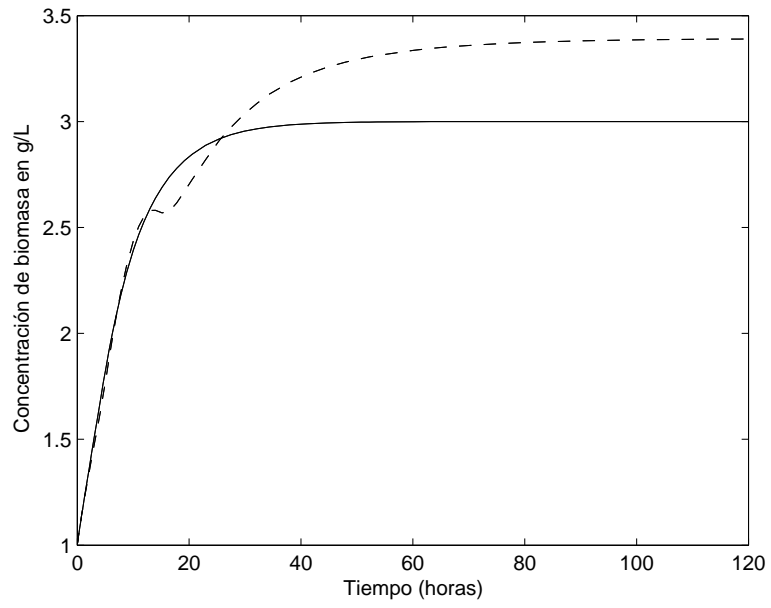


Figura 4.4: Estabilización de la biomasa z_1 (-), z_2 (- -)

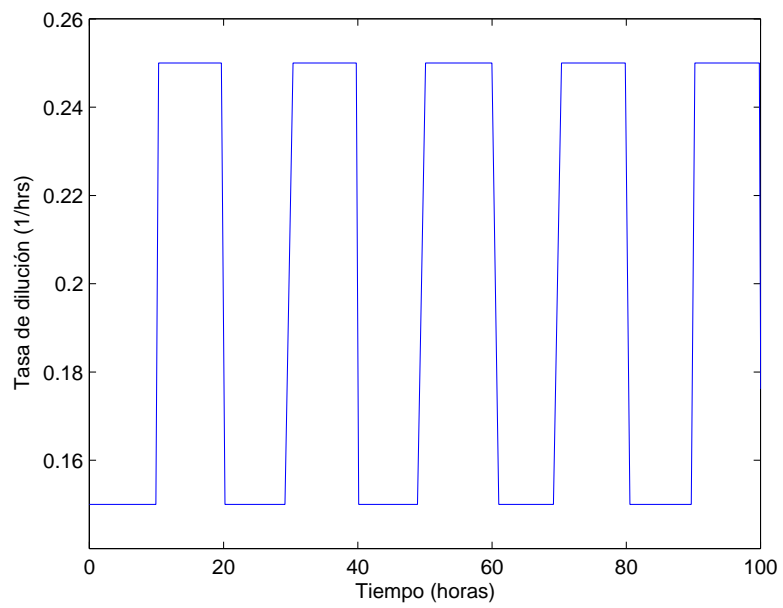


Figura 4.5: Tasa de dilución

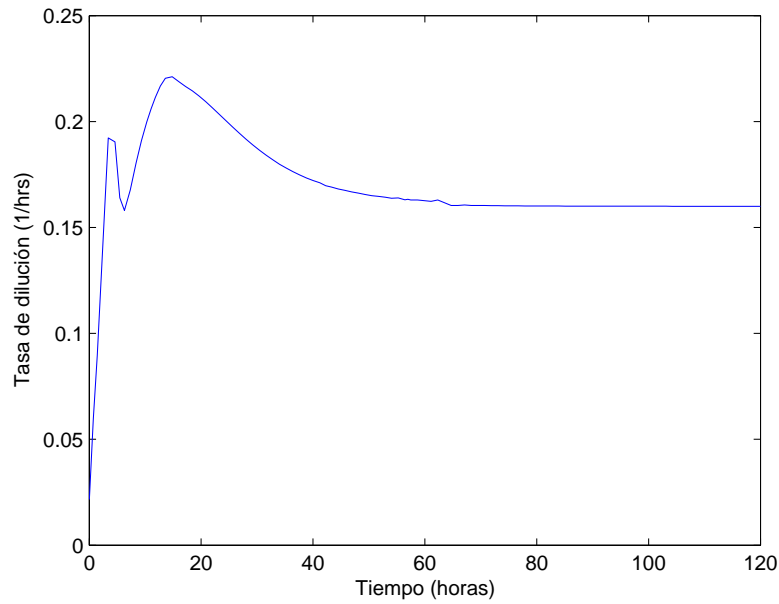


Figura 4.6: Ley de control

Monod y Haldane (4.41) [11] y [8]:

$$\begin{aligned}\mu_1 &= \frac{\mu_{max1}s}{Ks_1 + s} \\ \mu_2 &= \frac{\mu_{max2}s}{Ks_2 + s + \frac{s^2}{K_I}}\end{aligned}\tag{4.41}$$

Existen distintas condiciones de competencia, la aquí considerada es cuando una de las tasas de crecimiento es mayor que otra, es decir $\mu_{max1} > \mu_{max2}$ y $Ks_1 > Ks_2$. Se busca primero mantener vivos a ambos microorganismos (x_1 y x_2) y segundo que el valor de x_2 (microorganismo débil) sea mayor que x_1 (microorganismo dominante) por lo menos 0.5 grs/l . Una forma de estabilizar ambos microorganismos es mediante una gráfica de ambas tasas de crecimiento con respecto al sustrato, en la intersección de ambas tasas se tiene el valor de s con el cual las tasas son iguales.

$$\mu x_1 = \mu x_2 \quad (4.42)$$

$$\frac{\mu_{max1} x_1}{K s_1 + s} = \frac{\mu_{max2} x_2}{K s_2 + s + \frac{s^2}{K_I}} \quad (4.43)$$

Haciendo $D = \mu x$ se logran estabilizar ambas biomásas, sólo que no en puntos deseados o predeterminados. Para poder cumplir con ambos objetivos de control es necesario observar el comportamiento de ambos microorganismos, se vuelve a determinar el total de biomasa que se puede obtener, al ser aplicado el control mostrado anteriormente a la variable de interés, se debe repartir la biomasa buscando fijar el valor de x_2 , de tal manera que se cumpla con la segunda condición del control, consecuentemente x_1 también se estabiliza. Para el diseño del control se considera la variable estimada z_3 , e igualando la expresión al valor en el que se desea establecer z_3 (con $z_3 \rightarrow z_3^{ref}$), del que se sabe que su derivada es cero por ser una constante:

$$\frac{dz_3}{dt} = \Psi(z_3^{ref} - z_3) \quad (4.44)$$

Donde $\Psi > 0$ es un parámetro de sintonización. Por último despejamos la tasa de dilución quedando la expresión siguiente:

$$D = -\frac{\Psi(z_3^{ref} - z_3) + \mu_2(z_1)z_3}{z_3} \quad \text{con } z_3 > 0 \quad (4.45)$$

4.5.5. Simulaciones

Para un sistema de competencia microbiana, donde uno de los microorganismos es dominante y que cuenta con tasas de crecimiento diferentes, se le aplica un observador teniendo como entrada la lectura de substrato; en la Figura 4.7 y 4.8 se muestra la respuesta del observador en la estimación de los estados x_1 y x_2 conforme a (4.30); el parámetro de sintonización θ de acuerdo a (4.7) fue de 0.424 para lazo abierto.

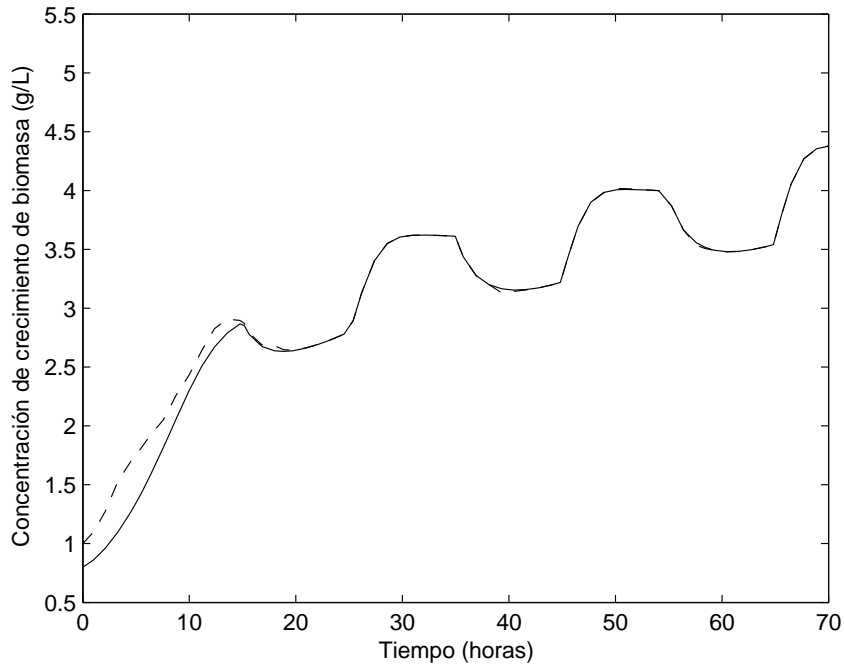


Figura 4.7: Biomasa dominante (-) y su estimado (- -)

En la Figura 4.8 se puede ver como el microorganismo x_2 tiende a morir. Aún cuando el microorganismo dos tiene tasa de crecimiento de Haldane, el parámetro que más influye en su comportamiento es su tasa de crecimiento máxima. Se puede ver que antes de las 20 horas el observador ha logrado estimar ambas variables.

En la Figura 4.9 se puede ver al observador con la ley de control, se determina la biomasa total siendo de 6.2 g^{-1} y se distribuyó de tal manera que x_2 sea mayor que x_1 con una diferencia de por lo menos 0.5.

La ley de control $u = D$ obtenida por (4.45) se muestra en la Figura 4.10 y se observa que se logran las condiciones de control deseadas.

El valor de la ley de control se estabiliza en el valor obtenido al igualar las tasas de crecimiento de 0.1712 como se ve en la Figura 4.11

La ley de control mostrada en la Figura 4.5 se estabiliza en 0.1712, de acuerdo con la Figura 4.6. Los valores de simulación fueron $s(0) = 0.4$, $x_1(0) = 0.8$, $x_2(0) =$

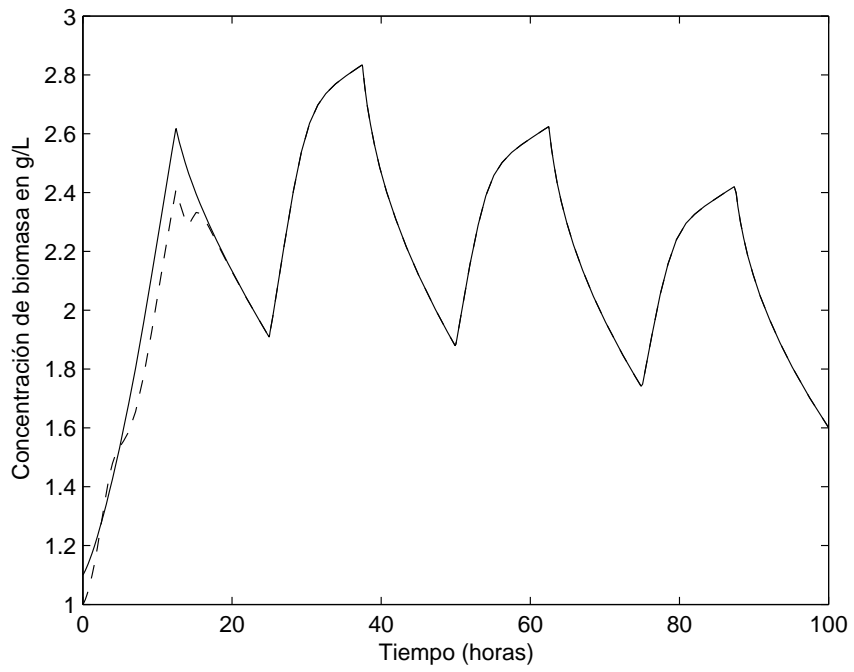


Figura 4.8: Biomasa dominada (-) y su estimado (- -)

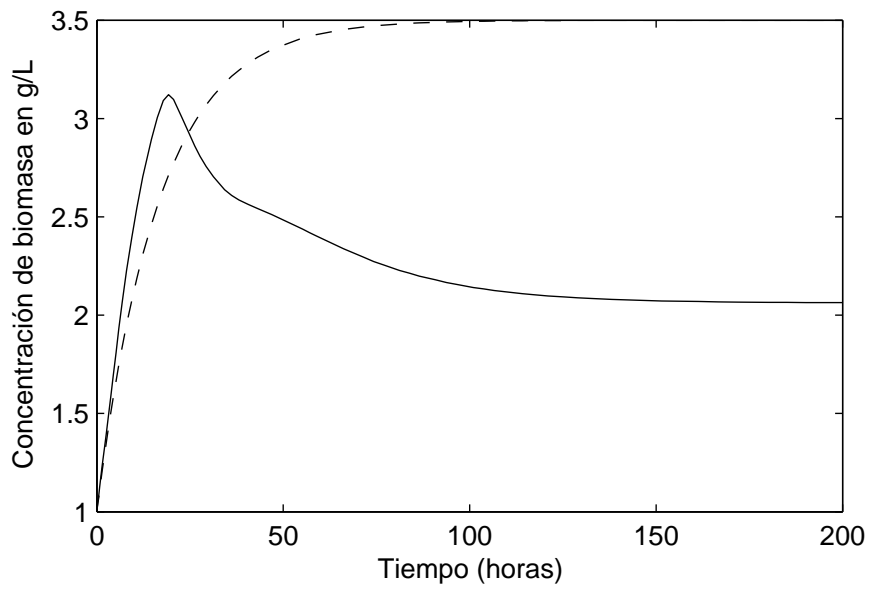


Figura 4.9: Biomasa establecida en valores deseados

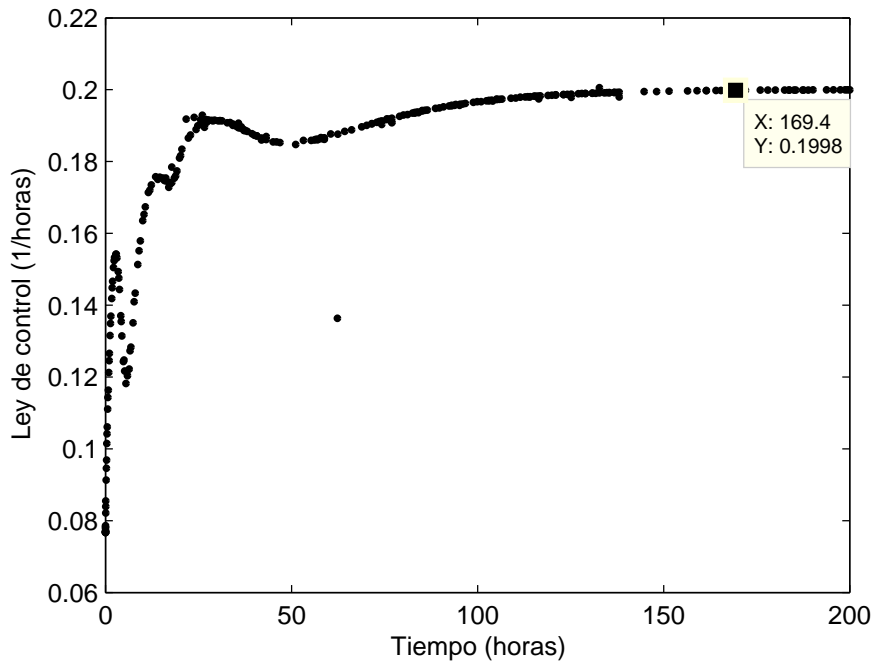


Figura 4.10: Valor de la tasa de dilución estabilizada

1.1, $z_1(0) = 1$, $z_2(0) = 1$, $z_3(0) = 1$, $\mu_{max1} = 0.36$, $\mu_{max2} = 0.34$, $K_{s1} = 0.4$, $K_{s2} = 0.3$, $K_I = 5$, $Y_1 = 1/.3636$, $Y_2 = 1/.5$, y $S_f = 3$. El valor de $\theta = .4$ de acuerdo con (4.7) de lazo cerrado fue de 0.0496 y de Ψ de acuerdo a (4.45) fue de 0.06.

4.5.6. Conclusiones parciales

Como se pudo apreciar en la gráfica, el observador de lazo cerrado logra estimar antes de las 30 horas los estados x_1 y x_2 mediante (4.7) teniendo como lectura en línea a s . El parámetro de sintonización para su convergencia en lazo abierto es mayor que cuando se aplicó la ley control. La implementación del observador es necesaria debido al requerimiento de conocer las dinámicas de las demás variables y así poder diseñar una ley de control que permitiera llevar a valores de población deseados a los dos microorganismos en el biorreactor. El observador empleado es de tipo Kalman con término no lineal, para el cual el sistema ya contaba con la estructura apropiada

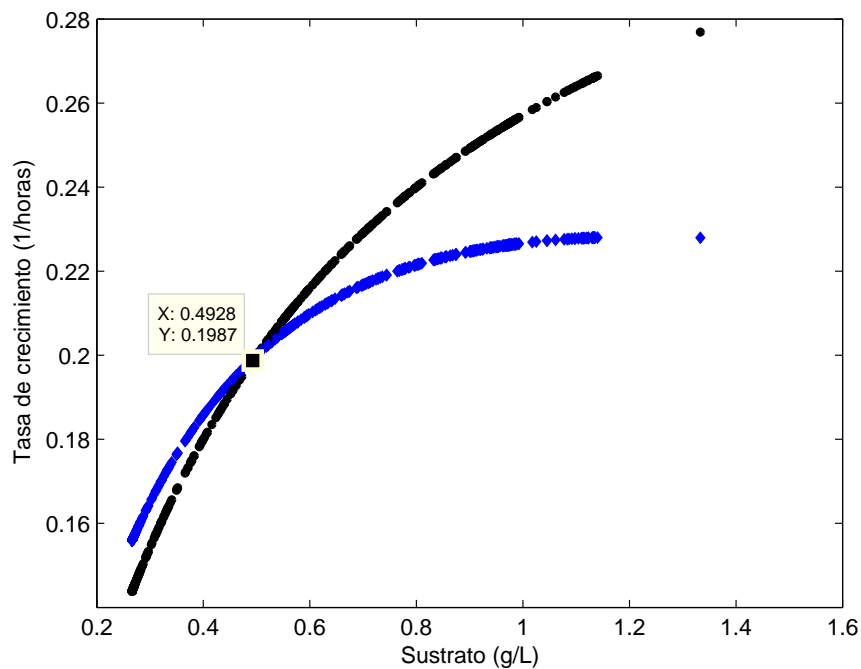


Figura 4.11: Tasas de crecimiento de a) Monod (negra) b) Haldane (azul)

afín en el estado. La ley de control por retroalimentación parcial (parcial; porque sólo dos de los estados fueron necesarios considerar en la ley de control) se desarrolla en tres pasos a partir de las estimaciones. El valor en el cual se estabiliza u puede calcularse mediante una gráfica de μ_1 y μ_2 contra s , en su intersección se considera el valor que la tasa de dilución debe tomar para mantener vivas a ambas biomasas, sin embargo, esta condición no logra establecer los perfiles de crecimiento deseados, por lo que es necesario aplicar un control que lleve a nuestro sistema a comportamientos deseados, una vez logrado el objetivo, la ley de control toma el valor estabilizante μ_x . La ley de control logra mantener vivos a ambos microorganismos y los establece en niveles de crecimiento deseados.

4.6. Estimador de lazo abierto

De acuerdo con [18] sea el sistema siguiente:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (4.46)$$

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{\mu x}{Y_{x/s}} \quad (4.47)$$

$$\frac{dp}{dt} = \alpha \mu x \quad (4.48)$$

con tasa de crecimiento

$$\mu = \mu_{max} \frac{s}{K_s + s + K_i^q s x^q} \quad (4.49)$$

Se desea estimar la velocidad media del crecimiento de biomasa sin conocer la estructura de la tasa de crecimiento. Definiendo al sistema:

$$\dot{x} = \eta_1(x)\theta + \eta_2(x) \quad (4.50)$$

$$\dot{s} = -K\theta \quad (4.51)$$

donde θ es el parámetro desconocido, x y s son las variables de estado, $\theta = \mu x$ y $K = 1/Y_{x/s}$.

Utilizando las hipótesis mostradas en [34]:

- θ es un parámetro desconocido posiblemente variante en el tiempo.
- Las variables de interés para la aplicación de este estimador son x y s .
- La medición disponible en línea es el estado x .

la estructura del estimador queda:

$$\frac{d\hat{s}}{dt} = \eta_1(s)\hat{\theta} + \eta_2(s) - \omega(s - \hat{s}) \quad (4.52)$$

$$\frac{d\hat{\theta}}{dt} = [\eta_1(s)]^T \Upsilon (s - \hat{s}) \quad (4.53)$$

En este estimador θ es tomado como otra variable pero sin dinámica.

4.6.1. Diseño de parámetros

Los dos parámetros ω y Υ son muy importantes para establecer la regla de ajuste, la forma de lograrlo se presenta a continuación:

Al considerar el error entre las ecuaciones (4.52) y (4.50) se obtiene

$$\frac{de_s}{dt} = Ke_\theta - \omega e_s \quad (4.54)$$

$$\frac{de_\theta}{dt} = -\Upsilon e_s \quad (4.55)$$

Reescribiendo estas ecuaciones en forma de matriz se obtiene:

$$\frac{de}{dt} = \begin{pmatrix} -\omega & K \\ -\Upsilon & 0 \end{pmatrix} e \quad (4.56)$$

La ecuación característica de esta matriz es:

$$\det(\lambda I - A) = \lambda^2 + \lambda\omega + K\Upsilon \quad (4.57)$$

ahora se deben elegir polos reales

$$\omega^2 - 4K\Upsilon = 0 \quad (4.58)$$

$$\Upsilon = \frac{\omega^2}{4K} \quad (4.59)$$

Este análisis, además de no ser complicado, sólo necesita diseñar un parámetro. Valores óptimos de ω se sugieren en [34].

4.6.2. Simulación

Las siguientes figuras muestran como el estimador puede representar la velocidad media del sistema dado. Los valores paramétricos de simulación fueron $\mu_{max} =$

0.1171, $Y_s = 0.095$, $\alpha = 5.52$, $K_s = 12.68$, $K_i = 2.41$, $q = 1$, $\omega = 10$, $\Upsilon = 25Y_s$ y con condiciones iniciales $x(0) = 0.019$ y $s(0) = 47.2$.

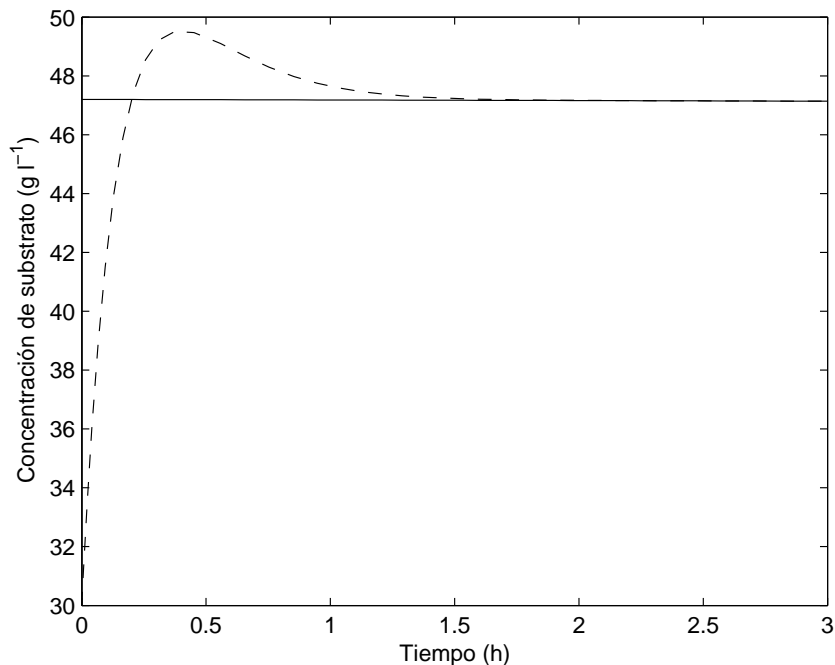


Figura 4.12: Lectura de sustrato (-) y su estimación (- -)

Se logra estimar antes de las dos horas, este estimador ha sido ampliamente aplicado en bioprocesos.

4.7. Sumario

En este capítulo se mostraron herramientas de estimación, se citaron conceptos útiles en el diseño de observadores; se vio la aplicación del observador de Kalman para sistemas afín en el estado para un sistema de competencia microbiana al cual se le aplicó un control basado en el modelo dinámico general, que pudo cumplir con las condiciones de control. También se mostró la aplicación de un estimador de lazo abierto aplicado en la obtención de la velocidad media de crecimiento, esta estimación es importante para el cálculo de parámetros iniciales en un proceso de

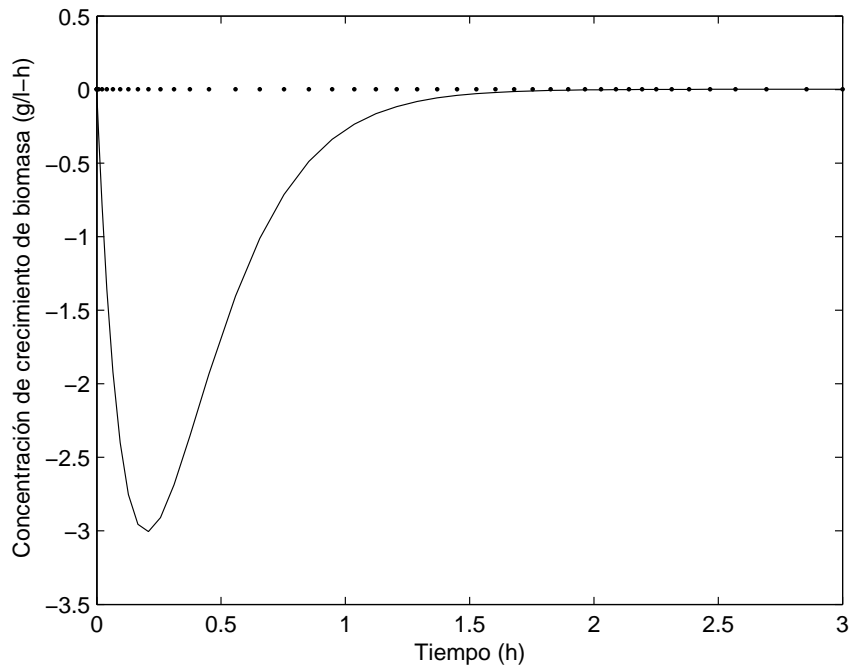


Figura 4.13: Velocidad media de crecimiento (-) y su estimación (- -)

ajuste paramétrico. La importancia de contar con este tipo de herramientas se ha vuelto de mucha ayuda en la actualidad para el modelado de procesos biológicos que buscan mejorar sus rendimientos.

Capítulo 5

Conclusiones finales

En la Industria de Bioprocesos el objetivo principal es obtener productos al menor costo y tiempo posibles, lográndolo bajo dos líneas de acción, una es minimizando las restricciones mediante la construcción o mejora del equipo y/o del microorganismo, la segunda acción es encontrando un control o procedimiento operacional que use óptimamente las dinámicas del proceso. La estrategia a seguir depende de las consideraciones que pueden ser las siguientes:

1. Elección del cultivo: se buscan las cepas adecuadas para la producción del producto que se quiera desarrollar
2. Cultivo en masa: se realiza el proceso de multiplicación de los microorganismos
3. Reacciones celulares: los productos por los cuales se están cultivando las células, solamente se producirán bajo condiciones bastante específicas y probablemente no serán las mismas para la producción de biomasa
4. Operación del proceso: se controlan las variables del proceso que buscan la reproducción de los microorganismos. Cada proceso tiene sus propias características específicas
5. Recuperación del producto: en etapa final se busca la recuperación del producto creado (separación del producto)

En este trabajo se mostró la importancia de contar con el modelado matemático como una herramienta muy importante para la caracterización y diseño óptimo de procesos de fermentación.

5.1. Aportaciones

La interpretación de los datos fue muy importante para alcanzar los objetivos del presente trabajo, se logró:

- Determinar la influencia de la concentración de ácido acético y de la condición anaeróbica en el crecimiento del microorganismo.
- Mediante el modelo determinado se realizó la interpretación de los datos experimentales ayudando a la formulación de nuevas hipótesis y evitando la experimentación innecesaria que aumenta los costos.
- Mantener con vida al microorganismo en un proceso de interacción microbiana, en donde por la misma naturaleza del proceso se activa un segundo microorganismo capaz de eliminar al primero.
- Estimar la cinética del crecimiento celular mediante el observador de Kalman que sirvió para el diseño de la ley de control del siguiente punto.
- Estabilizar el crecimiento de ambos microorganismos en valores deseados mediante una ley de control basada en el Modelo Dinámico General.
- Obtener la velocidad media de la tasa de crecimiento sin saber la estructura de la tasa usándose para proponer los valores iniciales en la estimación paramétrica.

5.2. Trabajos futuros

El modelo determinado en este trabajo fue hecho a nivel experimental que corresponde a la primera etapa para llegar a producciones industriales. Los pasos siguientes deben considerar otras variables en el modelado como:

- El tipo de agitador que afecta a la concentración de sustrato y la densidad celular que puede provocar baja productividad del biorreactor
- La velocidad de agitación que logre una mezcla homogénea.
- El control del flujo de entrada y salida en el reactor biológico de manera que el volumen se mantenga constante.

Estas consideraciones son para procesos semicontinuos y continuos, por lo que se debe extender el modelo a estos modos de operación. Además de existir otros procesos que también necesitan ser analizados como son el de centrifugación y cristalización para la obtención del producto final.

En la aplicación del observador de Kalman con término no lineal a procesos de fermentación de competencia microbiana, se debe estudiar el desempeño para casos con inhibición; para otro tipo de competencia y para más de dos microorganismos.

Apéndice

Apéndice A

A.1.

- **Proceso:** (Procedimiento) Conjunto de pasos o etapas bien organizadas para la obtención o logro de algún objetivo específico
- **Sensor:** Mecanismo que mide y convierte información física de un cierto medio en una forma legible como voltaje análogo, corriente, carga o frecuencia
- **Actuador:** Son dispositivos capaces de generar una fuerza a partir de líquidos, de energía eléctrica y/o gaseosa. Recibe la orden de un controlador y da una salida necesaria para activar a un elemento final de control como lo son las válvulas, motores, etc.
- **Control:** Planear, organizar, dirigir
- **Proceso Biológico:** Conjunto de etapas bien organizadas para la obtención o logro de algún producto específico mediante organismos vivos
- **Biotecnología:** es la aplicación de los principios científicos y de la ingeniería al procesamiento de materiales por agentes biológicos para proveer bienes y

serviciosdos

- Fermentación: Degradación controlada de un producto alimenticio. Proceso biológico que ocurre en la oscuridad y que no involucra cadenas respiratorias con oxígeno o nitrato como aceptor de electrones
- Biomasa: es el peso total de todos los organismos de un hábitat particular. Cuatro tipos de microorganismos son usados para producir biomasa bacterias, levadura, hongos y algas
- Sustrato: es la fuente de carbono de la biomasa, ejemplo glucosa, xilosa, etc.
- Producto(s): son los metabolitos resultantes del proceso de fermentación. Ejemplos etanol, ácido acético, xilitol, etc.

A.2.

Rendimientos

$$Y_{x/s} = \frac{(x_f - x_o)}{(s_o - s_f)} \quad (\text{A.1})$$

$$Y_{x/o_2} = \frac{(x_f - x_o)}{(O_i - O_f)} \quad (\text{A.2})$$

$$Y_{p/s} = \frac{(p_f - p_o)}{(s_o - s_f)} \quad (\text{A.3})$$

Velocidades Medias

$$rx = \frac{dx}{dt} \quad (\text{A.4})$$

$$rs = \frac{ds}{dt} \quad (\text{A.5})$$

$$rp = \frac{dp}{dt} \quad (\text{A.6})$$

Velocidades Específicas

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (\text{A.7})$$

$$v_s = \frac{1}{x} \frac{ds}{dt} \quad (\text{A.8})$$

$$v_p = \frac{1}{x} \frac{dp}{dt} \quad (\text{A.9})$$

Bibliografía

- [1] Hammouri and J. de Leon Morales. "Observers Synthesis for State-Affine Systems". *Proceedings of the 29th Conference on Decision and Control, Honolulu, Hawaii December 1990*.
- [2] J. de Leon Morales and T. Chorot, "On Observers for a Class of Nonlinear Systems", *Proceedings of the 30th Conference on Decision and Control, England, December 1991*,
- [3] T. Zhang y M. Guay, "Adaptive nonlinear observers of microbial growth processes", *Journal of Process Control*, Vol. 12, pp.633-643, 2002
- [4] J. P. Gauthier, H. Hammouri and S. Othman, "A Simple Observer for Nonlinear Systems Applications to Bioreactors", *IEEE Transaction On Automatic Control*, Vol 37, No. 6, pp. 875-880, June 1992.
- [5] Abhishek S. Soni y Robert S. Parker, "Fed-Batch Bioreactor Control using a Multi-Scale Model", *Proceedings of the American Control Conference*, 2371-2376, Denver Colorado June 4-6, 2003.
- [6] M. Ignatova, T. Patarinska, V. Ljubenova, J. Bucha, J. Bohm, P. Nedoma, "Adaptive Stabilisation of Ethanol Production During the Continuous Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*", *IEE Proceedings*, pp. 666-672, 2003.

- [7] Andreas Lübbert y Sten Bay Jorgensen, "Bioreactor performance: a more scientific approach for practice", *Journal of Biotechnology*, vol 85 pp. 187-212, 2001.
- [8] Manuel J. Betancur, Jaime A. Moreno y Germán Buitrón, "Practical optimal control for fed-batch bioreactors", *IFAC, 2004*.
- [9] N.I. Marcos, M. Guay y D. Dochain, "Output feedback adaptive extremum seeking control of a continuous stirred tank bioreactor with Monod's kinetics", *Elsevier Journal of Process Control*, vol. 14 pp. 807-818, 2004.
- [10] A. Maloum and A. Rapaport, "Robust nonlinear SISO and SIMO control for a class of uncertain bioreactors under input constraint", *Montpellier Cedex, France*.
- [11] F.Y. Zeng, B. Dahhou and G. Goma, "Time Minimal Adaptive Control for a Repeated Fed-Batch Fermentation Reactor", *Toulouse, France*.
- [12] S. Dikshitulu, B.C. Baltzis, S. Pavlou y G.A. Lewandowski, "Competition between two microbial populations in a sequencing fed-batch reactor: Theory, experimental verification, and implications for waste treatment applications", *Biotechnology and bioengineering*, vol. 42, pp. 643-656, 1993.
- [13] Jan F. Van Impe, Johan E. Claes, Vincent G. Ryckaert and Georges Bastin, "Characterization of optimal feed rate profiles for fed-batch fermentation processes", *IEEE*, pp. 1947-1952, 1994.
- [14] Libei Chen, Georges Bastin y Vincent Van Breusegem, "Adaptive nonlinear regulation of fed-batch biological reactors: an Industrial Application", of the 30th Conference on Decision and control, pp. 2130-2135, Brighton, England, December 1991.
- [15] W. Vanichsriratana, D. McFarlane, T. Keshavarz y J.R. Leigh, "Comparison of open loop optimal control and closed loop optimal control of a fermentation

- process", *UKACC International Conference on Control, Conference Publication No. 427*, pp. 258-263, September 1996.
- [16] N.I. Marcos, M. Guay, D. Dochain y T. Zhang, "Adaptive extremum-seeking control of a continuous stirred tank bioreactor with Haldane's Kinetics", *Journal of Process Control, Elsevier*, vol. 14, pp. 317-328, 2003.
- [17] A. Johnson, "The control of fed-batch fermentation processes-A survey", *Automatica*, vol. 23, No. 6, pp. 691-705, 1987.
- [18] Hassan K. Khalil, "Nonlinear Systems", *Prentice-Hall, Inc, 1996, Upper Saddle River, New Jersey 07458*, 2nd edition, ISBN 0-13-228024-8".
- [19] Anand Eleazar Sánchez Orta, "Estimación y control para procesos de fermentación aeróbicos", *Programa Doctoral de Ingeniería Eléctrica, Universidad Autónoma de Nuevo León*, 2001, México, Noviembre.
- [20] Alejandro Vargas "Observer design for nonlinear systems with reduced observability properties", *UNAM- University of Stuttgart, Germany*, 2003, México, Abril.
- [21] Ma. Guadalupe Aguilar Uscanga, "Caractérisation cinétique et métabolique D'une souche de Brettanomyces", *Institut National Polytechnique de Toulouse*, 1998, Francia, Juin.
- [22] Felipe R. Portugal, «Killer» Chez Saccharomyces Cerevisiae études physiologiques et cinétiques quantification et modélisation@", *Institut National Polytechnique de Toulouse*, 1999, Francia, Décembre.
- [23] Ricardo Marino, "Nonlinear Control Design", *Prentice-Hall Europe, 1995, Prentice Hall Information and System Sciences Series*, First Published, isbn 0-13-342635-1.

- [24] David M. Himmelblau "Process analysis by Statistical Methods", *John Wiley Sons, Inc.*, 1969, Prentice Hall Information and System Sciences Series, First Published.
- [25] Gülnur Birol, Pemra Doruker, Betül Kirdar, Z. Ilse Önsan y Kutlu Ülgen, "Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccharomyces cerevisiae*", *Process Biochemistry*, vol. 33, No. 7, pp. 763-771, 1998.
- [26] José M. González-Sáiz, Consuelo Pizarro y Diego Garrido Vidal, "Evaluation of Kinetic Model for Industrial Acetic Fermentation: Proposal of a New Model Optimized by Genetic Algorithms", *Process Biotechnol Prog.*, vol. 19, pp. 599-611, 2003.
- [27] S.C. Oliveira, H.F. De Castro, A.E. S. Visconti, R. Giudici, "Continuous ethanol fermentation in a tower reactor with flocculating yeast recycle: scale-up effects on process performance, kinetic parameters and model predictions", *Bioprocess Engineering*, vol. 20, pp. 525-530, Springer-Verlag, 1999.
- [28] Michael A. Henson, "Exploiting cellular Biology to manufacture high-value products", *IEEE Control Systems Magazine*, pp. 54-62, August 2006.
- [29] M. Nihtilä, J. Virkkunen, "Practical Identifiability of Growth and Substrate Consumption Models", *Biotechnol. and Bioeng.*, vol. 19, pp. 1831-1850, 1977.
- [30] J.S. Aranda-Barradas, M.L. Delia, J.P Riba, "Kinetic Study and Modelling of the Xylitol Production Using *Candida Parapsilosis* in Oxygen-Limited Culture Conditions", *Bioprocess Eng.*, vol. 22, pp. 219-225, 2000.
- [31] Ricardo Aguilar, Rafael Martínez-Guerra y Alexander Poznyak, "Non-linear PID Controller for the Regulation of Fixed Bed Bioreactors", *Proceedings of the 41st IEEE, Conference on Decision and Control*, Las Vegas Nevada USA, December 2002.

- [32] Randolf von Schalien, Kaj Fagervik, Gjörn Saxén, Knu Ringbom and Mikael Rydström, "Adaptive On-line Model for Aerobic *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 48, pp. 631-638, 1995.
- [33] Rodolfo Ertola, Osvaldo Yantorno y Carlos Mignone, "Microbiología Industrial Monografía", *Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos*, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 1994. www.science.oas.org/Simbio/mbio;nd/mbio;nd.htm
- [34] M. Perrier, S. Feye de Azevedo, E. C. Ferreira and D. Dochain, "Tuning of observer-based estimators: theory and application to the on-line estimation of kinetic parameters", *Control Engineering Practice*, vol. 8, pp. 377-388, Elsevier, 2000.
- [35] D. A. Abbott, S. H. Hynes, W. M. Ingledew, "Growth rates of Dekkera/Brettanomyces yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations", *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 66, pp. 641-647, Springer-Verlag 2004.
- [36] Daniel R. Omstead, "Computer Control of Fermentation Processes", *CRC Press, Inc.*, 1990, ISBN 0-8493-5496.
- [37] Suteaki Shioya, Kazuyuki Shimizu and Toshiomi Yoshida, "REVIEW Knowledge-Based Design and Operation of Bioprocess Systems", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 87, No. 3, pp. 261-266, 1999.
- [38] Daniel Rojas Bravo, "Apuntes: Conceptos Básicos de Reactores Químicos", *Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara*, 1998. http://academic.csuohio.edu/jgatica/courses/che404/industrial_reactors.html
- [39] Jeongseok Lee, Sang Yup Lee, Sunwon Park and Anton P. J. Middelberg, "Control of fed-batch fermentations", *Biotechnology Advances*, vol. 17, pp. 24-48, Elsevier, 1999.

- [40] Worasit Tochampa, Sarote Sirisansaneeyakul, Wirat Vanichsiratana, Penjit Srinophakun, Huub H. C. Bakker and Yusuf Chisti, "A model of xylitol production by the yeast *Candida mogii*", *Bioprocess Biosyst Eng.*, vol. 28, pp. 174-183, Springer-Verlag, 2005.
- [41] Jeffrey C. Lagarias, James A. Reeds, Margaret H. Wright and Paul E. Wright, "Convergence Properties of the Nelder Mead Simplex Method in Low Dimensions", *SIAM J. OPTIM.* vol. 9, No. 1, pp. 112-147, 1998.
- [42] Nancy Fernández Rodríguez, "EL BAGAZO Y LAS FIBRAS ANUALES PRESENTE Y FUTURO PARA SU INDUSTRIALIZACIÓN", *Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel*, pp. 1-13, 2000.
- [43] Alan T. Bull, "Companion to Microbiology", *Longman, London*, 1978.

Modeling of yeast *Brettanomyces bruxellensis* growth at different acetic acid concentrations under aerobic and anaerobic conditions

Garcia Alvarado Yahara · Mendez Ancona Javier ·
Mata Jimenez Marco Tulio · Gómez Rodriguez Javier ·
Aguilar Uscanga Maria Guadalupe

Received: 22 May 2007 / Accepted: 31 May 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Glucose utilization by *Brettanomyces bruxellensis* at different acetic acid concentrations under aerobic and anaerobic conditions was investigated. The presence of the organic acid disturbs the growth and fermentative activity of the yeast when its concentration exceeds 2 g l^{-1} . A mathematical model is proposed for the kinetic behavior analysis of yeast growing in batch culture. A Matlab algorithm was used for estimation of model parameters, whose confidence intervals were also calculated at a 0.95 probability level using a *t*-Student distribution for *f* degrees of freedom. The model successfully simulated the batch kinetics observed at different concentrations of acetic acid under both oxygen conditions.

Keywords *Brettanomyces bruxellensis* · Acetic acid · Glucose · Mathematical model

Abbreviations

k_{La} Oxygen transfer rate (h^{-1})
 μ Specific growth rate (h^{-1})

μ_{\max} Maximum specific growth rate (h^{-1})
 K_s Substrate saturation constant (g l^{-1})
 K_i Reciprocal of the inhibitor constant (l g^{-1})
 α_1 Ethanol/biomass yield coefficient (g_p/g_x)
 α_2 Acetic acid/biomass yield coefficient (g_{p2}/g_x)
 α_t Probability level for the *t*-Student distribution
 x Biomass concentration in the reactor (g l^{-1})
 s Substrate concentration in the reactor (g l^{-1})
 p_1, p_2 Ethanol, acetic acid concentration in the reactor (g l^{-1})
 x_0, s_0, p_{10}, p_{10} Biomass, substrate and products concentration when $t = 0$ (g l^{-1})
 $Y_{x/s}$ Biomass on glucose yield coefficient (g_x/g_s)
 β Confidence interval
 ρ_i Estimated *i*-parameter value
 $\rho = [Y_{x/s}, \alpha_1, K_s, K_i]$
 f Degree of freedom for the estimation
 R Covariance matrix of the estimate
 $R_{vii}^{1/2}$ Square roots of the diagonal elements of the covariance matrix
 N Number of time points
 n Number of model states (variables) $n = 3$ for anaerobic and $n = 4$ for aerobic conditions.
 η Number of parameter estimated
 S_r Variance of the residual error estimation (g l^{-1})
 H Jacobian matrix of y_m with respect to ρ evaluated at the *l* time point
 $Y_{m, l}$ Numerical model values for each variable (x, s, p_1, p_2) calculated at instant *l* (g l^{-1})

G. A. Yahara · M. J. M. Tulio
Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica,
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Av. Universidad s/n Col. Universidad,
C.P. 66450 San Nicolás de los Garza,
Nuevo Leon, Mexico
e-mail: jyahara@yahoo.com

M. A. Javier · G. R. Javier · A. U. M. Guadalupe (✉)
Instituto Tecnológico de Veracruz-UNIDA- Dpto.
Ing. Eléctrica y Electrónica,
Av. Miguel A. de Quevedo 2779 Col. Formando Hogar,
CP. 91860 Veracruz, Ver, Mexico
e-mail: gaguilar@itver.edu.mx

$Y_{\text{data}, 1}$	Experimental values for each variable (x , s , p_1 , p_2) at instant 1 (g l^{-1})
q	Exponent for K_i and x

description of the dynamic behavior of cell growth in the bioreactor.

Introduction

The genus *Brettanomyces* has been recognized as a wine spoilage yeast, imparting undesirable odors and flavors along with a high production of acetic acid [1–4] and as a polluting yeast in alcoholic fermentations [5–7]. This yeast has low nutritional requirements [8], and is well known to be sensitive to oxygen availability [9, 10]. Custer (1940) (cited in [4]) found that resting cells of *Brettanomyces claussenii* under aerobic conditions fermented glucose at a higher rate than in the absence of oxygen. The term “Custer effect” was introduced in [6] (negative Pasteur effect). This effect is attributed to the inhibition of the alcoholic fermentation under anaerobic conditions, and to the strong tendency of *Brettanomyces* to produce acetic acid from glucose with a parallel reduction of NAD^+ [11]. In particular, yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera* show a strong Custer effect [4]. The effect of acetic acid upon the growth of *Saccharomyces cerevisiae* and also of *Brettanomyces bruxellensis* was evaluated in [13, 14], and complete inhibition of growth and glucose consumption were reported in a medium containing 6 g l^{-1} acetic acid under anaerobic conditions and 4 g l^{-1} with an air flow rate of 60 l h^{-1} for *Brettanomyces bruxellensis*, and 7.5 g l^{-1} for *S. cerevisiae*. In [12] the effect of oxygen was tested by keeping the dissolved oxygen concentration between 40 and 80 % saturation. Under these conditions, they found that *Brettanomyces sp.* produced 12 g l^{-1} acetic acid at a final pH of 1.91, and residual glucose was 40%. [15, 16] reported a similar fermentation with *Dekkera* and *Brettanomyces intermedius*. They observed that for a high aeration rate and 120 g l^{-1} initial glucose, the sugar was never totally consumed (quantity used: 55 g l^{-1}) and acetic acid production was 30 g l^{-1} . These results are also consistent with previous papers [7, 16]. In [17] it was also found that *Dekkera intermedia* NRRL YB-4553 produced 42.8 and 14.9 g l^{-1} acetic acid from glucose and ethanol, respectively after 64.5 h. One factor that characterizes oxygen transfer in an aerobic fermentation process is k_{La} , so the effect of acetic acid at anaerobic and aerobic conditions was evaluated by changing the initial concentration of acetic acid. The objectives of the present investigation were to study the effect of initial acetic acid concentration on biomass, ethanol and acetic acid production and glucose consumption, and to develop a mathematical model using the batch kinetic data, which would enable the analysis and

Materials and methods

Microorganism

The yeast strain used was isolated from an alcoholic fermentation during the contamination of an industrial plant (distillery). It was identified as *Brettanomyces bruxellensis* by the Institute of Hygiene and Epidemiology Mycology of Brussels (IHEM), and registered under the number 6037.

Culture media

B. bruxellensis was preserved at 4°C on a medium composed of agar-agar, glucose and yeast extract (2, 2, and 1 % w/v). A minimum culture medium was used, which consisted of 5% glucose, 0.2% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0.5% KH_2PO_4 , 0.04% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.1% yeast extract. The pH was adjusted to 4.0 using 10% (v/v) orthophosphoric acid. After sterilization 1, 2, 3, 4, 5, and 6 g l^{-1} acetic acid concentrations were added in the case of anaerobic conditions, and 1, 2, 3, and 4 g l^{-1} under aerobic condition.

Culture conditions

The experiments were carried out in a 2 l bioreactor (Setric type “SET 2”), with a 1.4 l working volume. Temperature was regulated at 30°C , pH was not controlled and the stirrer speed was set at 250 rpm. The medium culture was sterilized for 30 min at 120°C , and the aeration rate was 0.10 vvm ($k_{La} = 6.4 \text{ h}^{-1}$; oxygen transfer rate = $43 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$). The dissolved oxygen transfer rates were calculated using the equation $\text{OTR} = k_{La} (C^* - C)$. Inoculum was added to attain 3×10^6 viable cells per ml.

Analytical techniques

Growth was followed by measuring the optical density of yeast cell suspensions at 620 nm. This measurement was previously correlated to dry cell weight.

Glucose, ethanol, glycerol and acetic acid concentrations were determined by HPLC with a TPS Spectra System apparatus using a Biorad Aminex HPX-87H column heated to 40°C and a refraction index detector (TPS RefractoMonitor V). The mobile phase was sulfuric acid (0.005 M) flowing at 0.4 ml min^{-1} . Specialized software (BORWIN V 1.2) allowed the surface of detected peaks to be calculated. A calibration curve was produced for a concentration range of 0–20 g l^{-1} for each component. The experimental error was estimated at less than 3%.

Kinetic modeling for growth and production

A modified version of the mathematic growth rate model presented in [22] was used:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s + K_i s^q} \tag{1}$$

The model for the kinetic analysis of glucose consumption and ethanol, biomass and acetic acid production was built upon the following assumptions, which have been postulated coherently with the experimental observations [23]

- The experiments can be divided into two cases:
 - (1) When oxygen is fed in the medium during the whole fermentation (0.1 vvm).
 - All the substrate is consumed
 - Substrate concentration is not totally consumed
 - (2) When a non-strict anaerobic condition exists (the only oxygen present is dissolved in the initial medium).
- An inhibition phenomenon caused for the combination of biomass and substrate was present during the whole fermentation

Considering these hypotheses, the model is composed of the five following proposed equations for aerobic condition:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s + K_i^q s^q} \tag{2}$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \tag{3}$$

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{\mu x}{Y_{x/s}} \tag{4}$$

$$\frac{dp_1}{dt} = \alpha_1 \mu x \tag{5}$$

$$\frac{dp_2}{dt} = \alpha_2 \mu x \tag{6}$$

where x is the biomass concentration (g l^{-1}), s is the glucose concentration (g l^{-1}), and p_1 and p_2 are the products, ethanol and acetic acid concentrations, respectively (g l^{-1}), μ_{\max} (the maximum specific growth rate (h^{-1})), $Y_{x/s}$ (biomass to substrate yield (gg^{-1})), $\alpha_{1,2}$ (relation between specific growth rate and ethanol or acetic acid production, respectively), K_s (substrate saturation constant), K_i (reciprocal of the inhibitor constant) and q (exponent in inhibition constant K_i and biomass x). For anaerobic condition the model is

composed from Eqs (2)–(3) considering just ethanol as the product. Concentration curves were estimated by smoothing experimental data and fitting them to a polynomial expression. Parameter μ_{\max} was obtained from the specific growth speed equation:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \tag{7}$$

Parameters q and α_2 were estimated independently by a graphic tool in Matlab. The final parameter values $\rho = [Y_{x/s} \alpha_1 K_s K_i]$ were obtained by linearization of the proposed model with respect to the parameters to be estimated and minimizing the performance index by the least square criterion that includes the linearization of the model ($Y_{m,l}$):

$$\min J(\rho) = \sum_{l=1}^N (Y_{\text{data},l} - Y_{m,l})^T (Y_{\text{data},l} - Y_{m,l}) \tag{8}$$

The estimation was done iteratively with a Nelder-Mead simplex algorithm. A initial values were supposed to start the algorithm. $Y_{m,l}$ values were obtained by solving the model numerically with a fourth order Runge-Kutta method, the initial condition were the experimental values at zero time (for aerobic condition X_0, S_0, P_{10}, P_{20} and for anaerobic condition X_0, S_0, P_{10}). The initial conditions used in the model are showed in Tables 1, 2.

The confidence interval [24, 25] for the parameters $Y_{x/s}, \alpha_1, K_s$ and K_i were obtained by a statistical method [26, 27], which includes a parameter sensitivity analysis of the model [28]:

$$H = \begin{bmatrix} \frac{\partial y_{m,1}}{\partial \rho_1} & \dots & \frac{\partial y_{m,1}}{\partial \rho_n} \\ \dots & \dots & \dots \\ \frac{\partial y_n}{\partial \rho_1} & \dots & \frac{\partial y_n}{\partial \rho_n} \end{bmatrix} \tag{9}$$

The individual confidence limits of each parameter estimate at probability level $(1 - \alpha_i)$ were obtained with the expressions below:

Table 1 Initial condition for aerobic conditions at different acetic acid concentrations

Acetic acid concentration (g l^{-1})	1	2	3	4
X_0 (g l^{-1})	0.01	0.019	0.01	0.01
S_0 (g l^{-1})	48	51.93	46	48
P_{10} (g l^{-1})	0.01	0.03	0.01	0.01
P_{20} (g l^{-1})	1.22	2.23	3.5	3.95

Table 2 Initial condition for anaerobic conditions at different acetic acid concentrations

Acetic acid concentration (g l ⁻¹)	1	2	3	4	5	6
Variable						
X ₀ (g l ⁻¹)	0.04	0.019	0.03	0.05	0.04	0.05
S ₀ (g l ⁻¹)	50	47.2	48.8	49.2	50.2	49.6
P ₁₀ (g l ⁻¹)	0.06	0.03	0.001	0.052	0.01	0.06

$$R = \left(\sum_{l=1}^N H_l^N W H_l \right) S_r^2 \tag{10}$$

$$S_r^2 = \frac{\min J(\rho)}{f} = \frac{\min J(\rho)}{nl - \eta} \tag{11}$$

$$\beta_i = \rho_i \pm t(f, 1 - \alpha_i/2) * \sqrt{R_{vii}} \tag{12}$$

where $t(f, 1 - \alpha_i/2)$ is the value of the t -distribution for f degrees of freedom and for $(1 - \alpha_i/2)$ probabilities, $R_{vii}^{1/2}$ are the square roots of the diagonal elements of the covariance matrix R [26] and W is the identity weighting matrix. The final values were used in the simulation of the proposed model; these values were compared with data, and the kinetics was described very well, as shown in the figures. Tables 3, 4 show the final parameter values and the confidence interval for both conditions (aerobic and anaerobic, respectively):

The μ_{max} , q and α_2 values for aerobic condition are showed in Table 5, μ_{max} and q values for anaerobic condition are showed in Table 6.

Table 3 Confidence intervals under aerobic conditions at different acetic acid concentrations

Acetic acid concentration (g l ⁻¹)	1	2	3	4
Parameter values				
Y _x	0.13 ± 0.012	0.097 ± 0.008	0.082 ± 0.01	0.092 ± 0.017
K _s (g l ⁻¹)	21.51 ± 5.60	10 ± 3.75	9.36 ± 2.19	10 ± 3.2
α ₁ ()	2.21 ± 0.19	3.6 ± 0.34	5.81 ± 0.75	3.97 ± 0.79
K _i (g l ⁻¹)	2.58 ± 0.25	1.77 ± 0.18	2.21 ± 0.27	1.84 ± 0.33

Table 4 Confidence intervals under anaerobic conditions at different acetic acid concentrations

Acetic acid concentration (g l ⁻¹)	1	2	3	4	5	6
Parameter values						
Y _x	0.094 ± 0.008	0.095 ± 0.006	0.095 ± 0.014	0.074 ± 0.013	0.061 ± 0.01	0.063 ± 0.018
K _s (g l ⁻¹)	5.04 ± 8.53	12.68 ± 2.56	10 ± 10.38	20 ± 7.06	20.68 ± 4.66	27.73 ± 12.43
α ₁ ()	5.27 ± 0.45	5.52 ± 0.35	4.34 ± 0.67	6.66 ± 1.19	6.77 ± 1.18	7.11 ± 2.54
K _i (g l ⁻¹)	7.03 ± 0.63	2.41 ± 0.16	9.91 ± 1.52	3.35 ± 0.56	1.96 ± 0.31	2.81 ± 0.87

Table 5 Parameter values estimated by a graphic tool for aerobic condition at different acetic acid concentrations

Acetic acid concentration (g l ⁻¹)	1	2	3	4
Parameter values				
μ _{max} (1/h)	0.2624	0.0959	0.052	0.0537
α ₂ (g l ⁻¹)	0.55	0.55	0.65	0.3
q	1	1	2	3

Table 6 Parameter values estimated by a graphic tool for anaerobic condition at different acetic acid concentrations

Acetic acid concentration (g l ⁻¹)	1	2	3	4	5	6
Parameter values						
μ _{max} (1/h)	0.2816	0.1171	0.2079	0.1258	0.0536	0.0397
q	1	1	1	2	3	3

Results and discussion

The influence of oxygen on the kinetics at 1, 2, 3 and 4 g l⁻¹ acetic acid concentrations can be appreciated in Fig. 1. It can be seen that for the last two, the substrate was not totally consumed, and ethanol and acetic acid production decreased. In the first two cultures, ethanol and acetic acid production increased, as did the kinetics under anaerobic conditions. In Fig. 2, the same behavior was noted; for 1 and 2 g l⁻¹ acetic acid concentrations, all the substrate was consumed and ethanol production increased; for 3, 4, 5 and

Fig. 1 Kinetics in aerobic condition at different acetic acid concentrations. **a** 1 g l^{-1} , **b** 2 g l^{-1} , **c** 3 g l^{-1} , and **d** 4 g l^{-1} . The symbols represent experimental data. The *solid lines* indicate model simulations. Biomass (*square*), substrate (*diamond*), ethanol (*triangle*), acetic acid (*circle*)

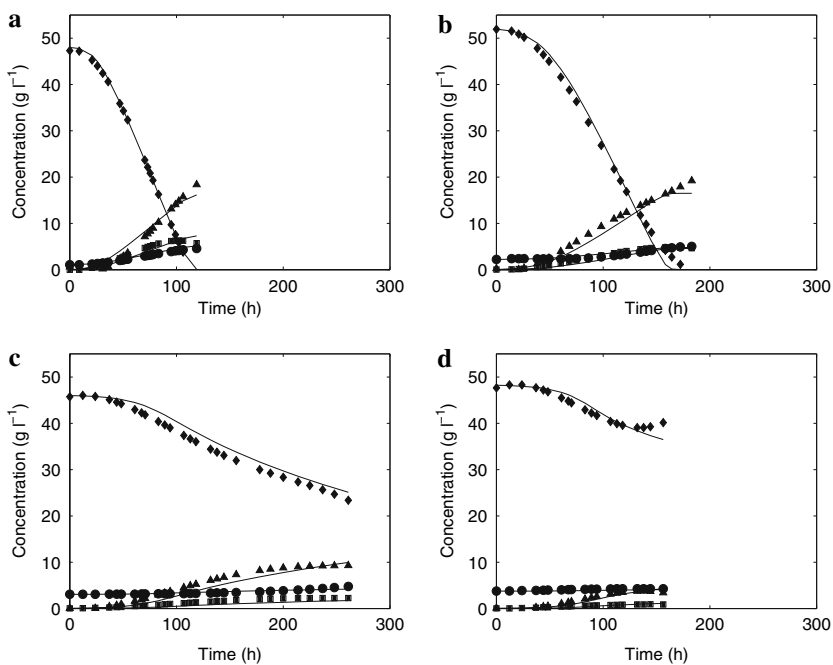
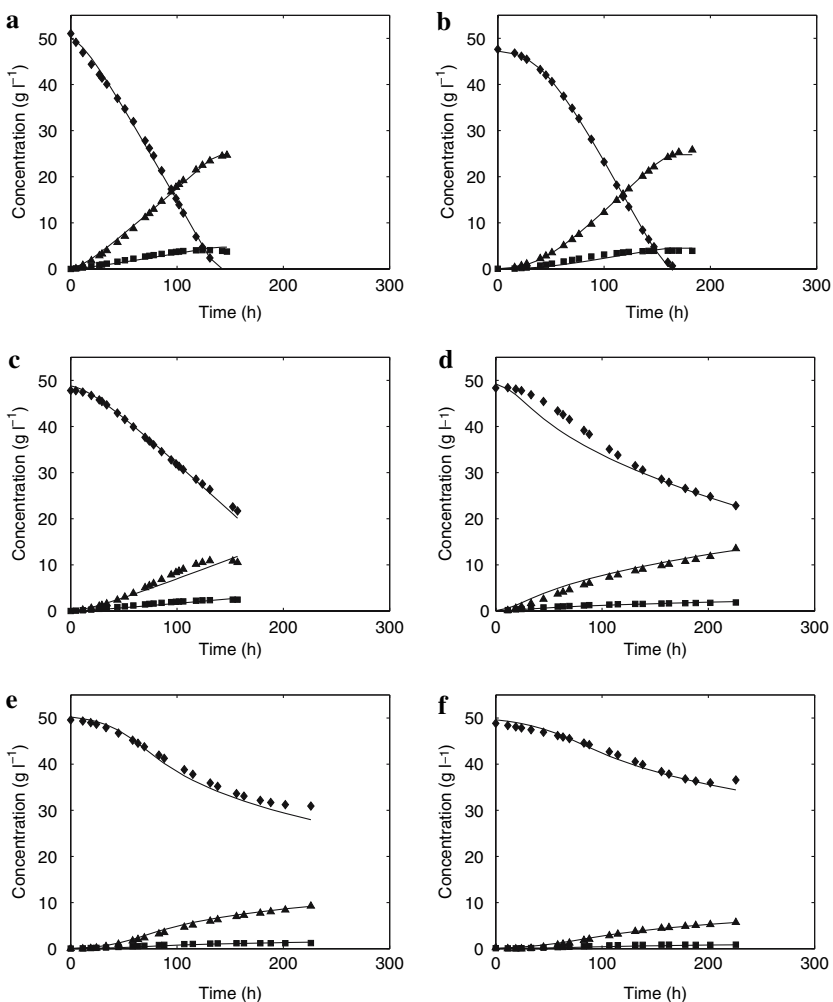


Fig. 2 Kinetics under anaerobic condition with different acetic acid concentrations. **a** 1 g l^{-1} , **b** 2 g l^{-1} , **c** 3 g l^{-1} , and **d** 4 g l^{-1} , **e** 5 g l^{-1} , **f** 6 g l^{-1} . The symbols represent experimental data. The *solid lines* indicate model simulations. Biomass (*square*), substrate (*diamond*), ethanol (*triangle*)



6 g l⁻¹ acetic acid, the substrate was not totally consumed, production decreased and acetic acid production was nil for all kinetics. It can be noted that ethanol production was greater under anaerobic conditions, but acetic acid concentration remained constant. Under aerobic conditions, the acetic acid concentration increased, the greatest value being in the first kinetic. The different behavior in this yeast suggests that the observed inhibitory effect on glucose metabolism is due to the presence of acetic acid produced during fermentation. Different investigations carried out on the inhibitory effect of acetic acid [18–20] show its toxicity acts at the cytoplasm level, where the enzymes involved in glycolysis are present. They also mention that the toxicity of this acid is dependent on the external pH, because the undissociated form is the active form, which penetrates the cellular membrane more easily; once inside, it dissociates, causing modification of the internal pH of the cell. In [13], complete inhibition of growth and glucose consumption by *Brettanomyces bruxellensis* were reported in a medium containing 6 g l⁻¹ acetic acid, under anaerobic conditions, and 4 g l⁻¹ with an air flow rate of 60 l h⁻¹. Recently, the influence of temperature and agitation on acetic acid production by *B. bruxellensis* in a glucose solution with an air flow rate of 0.6 vvm (288 l h⁻¹) were investigated [21]. The results showed that agitation had an important influence on metabolism, and that optimal temperature for acetic acid productivity was 30°C. The results obtained in this work indicate the strong influence of aerobic conditions and acetic acid concentration on this *Brettanomyces* strain.

Conclusions

As can be observed in the figures, the proposed model could represent the dynamic behavior of the fermentation process very well. For 1 and 2 g l⁻¹ acetic acid concentration, total substrate consumption for aerobic and anaerobic conditions can be seen; under anaerobic conditions, there was high ethanol production and biomass growth, and in the aerobic case, their values increased considerably. For the kinetics with acetic acid concentrations over 2 g l⁻¹, substrate consumption was not total. Ethanol production and biomass growth decreased, but acetic acid remained constant when there was no oxygen, and increased under aerobic conditions. The growth rate model proposed here was used to express the behavior of the experiment, and as the graphics show, it could fit the kinetics for all the cultures. Parameter estimation with the method posed in this paper did not allow an estimation of all parameters together because the linearization of the model with respect to some parameters became boundless. For this reason, a Matlab graphic tool was used for the estimation of μ_{\max} and α_2 .

Acknowledgments We wish to acknowledge the critical reading of the manuscript by Patricia M. Hayward-Jones, M.Sc.

References

1. Chatonnet P, Dubourdieu D, Biodron JN (1995) The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am J Enol Vitic* 46:463–468
2. de Miniac M (1989) Contamination des fermentations alcooliques industrielles par les levures du genre: *Brettanomyces*. I.A.A. : Juillet/ Août:559–563
3. Scheffers WA (1979) Anaerobic inhibition in yeasts (Custers effect). *Antonie Van Leeuwenhoek* 45:150
4. Wijsman MR, Van Dijken JP, Scheffers WA (1984) Effect of oxygen on growth and metabolite production by the yeast *Brettanomyces intermedius*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 50:112
5. Délia-Dupuy ML, de Miniac M, Phowchinda O, Strehaiano P (1995) Contamination par les levures *Brettanomyces* dans les fermentations alcooliques. *Microbiol Aliment Nutr* 13:349–359
6. Gilis JF (1999) Étude de contaminations de fermentations alcooliques industrielles par les levures *Brettanomyces*. Docteur Thèse, l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France
7. Scheffers WA, Wiken TO (1969) The Custer effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 35:Supplement: Yeast Symposium 1969
8. Aguilar-Uscanga MG, Délia ML, Strehaiano P (2000) Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*. Growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Can J Microbiol* 46:1046–1050
9. Aguilar-Uscanga MG, Délia ML, Strehaiano P (2003) *Brettanomyces bruxellensis* : effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:157–162
10. Scheffers WA (1979) Anaerobic inhibition in yeasts (Custers effect). *Antonie Van Leeuwenhoek* 45:150
11. Strehaiano P (1984) Phénomènes d'inhibition et fermentation alcoolique. Docteur Thèse d'Etat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France
12. Ciani M, Ferraro L (1997) Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in Winemaking. *J Sci Food Agric* 75:489–495
13. Aguilar-Uscanga MG, Délia ML, Strehaiano P (1999) Estudio Cinético sobre el crecimiento de *Brettanomyces bruxellensis* en glucosa a diferentes concentraciones iniciales de ácido acético. *M A N*. 17:181–190
14. Phowchinda O, Aguilar-Uscanga MG, DSelia ML, Vidal F, Strehaiano P (1997) Rôle de l'acide dans la concurrente entre deux genres levuriens en fermentation industrielle. *Comm. 6ème Congrès Français de Génie des Procédés*, Paris France 24–26 septembre, in J.J. BIMBENET et G. MURATET (coord.), *Génie de la Réaction en Microbiologie et Biochimie*. Collection Récents Progrès en Génie des Procédés, Lavoisier 11 57:79–84
15. Blondin B, Ratomahenina R, Arnaud A, Galzy P (1982) A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain. *Biotechnol Bioeng* 24:2031–2037
16. Peynaud E, Domercq S (1956) Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. *Arch Microbiol* 24:266–280
17. Freer SN, Dien B, Matsuda S (2003) Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeast under conditions of constant pH. *World J Microbiol Biotechnol* 19:101–105
18. Pampulha E, Loureiro-Diaz MC (1989) Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 31:547–550

19. Rasmussen JE, Schultz E, Snyder RE, Jones RS, Smith CR (1995) Acetic acid as a causative agent in producing struck fermentation. *Am J Enol Vitic* 46:278–280
20. Taherzadeh MJ, Niklasson C, Lidén G (1997) Acetic acid-friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*? *Chem Eng Sc* 52:2653–2659
21. Castro-Martinez C, Escudero-Abarca BI, Gomez-Rodríguez J, Hayward-Jones PM, Aguilar-Uscanga MG (2005) Effect of physical factors on acetic acid production in *Brettanomyces* strains. *J Food Process Eng* 28:113–143
22. Ishizaki A, Ohta T, Kobayashi G (1989) Batch growth Model for lactate fermentation. *J Ferment Bioeng* 68(2):123–130
23. Aguilar-Uscanga MG (1998) Caractérisation Cinétique et Métabolique D'une Souche de *Brettanomyces*. Docteur Thèse, l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France
24. Kyriakides E, Heydt GT (2006) Calculating confidence intervals in parameter estimation: a case study. *IEEE Trans Power Delivery* 21:508–509
25. Schellenberg A, Rosehart W, Aguado JA (2005) Maximum loading problems using stochastic nonlinear programming and confidence intervals. *IEEE* pp 3–8
26. Himmelblau DM (1969) *Process analysis by statistical methods*. Wiley, Texas
27. Nihtilä M, Virkkunen J (1977) Practical identifiability of growth and substrate consumption models. *Biotechnol Bioeng* 19:1831–1850
28. Khalil HK (1996) *Nonlinear systems*. Upper Saddle River, New Jersey

ORIGINAL ARTICLE

Modelling the growth and ethanol production of *Brettanomyces bruxellensis* at different glucose concentrations

M.G. Aguilar-Uscanga¹, Y. Garcia-Alvarado², J. Gomez-Rodriguez¹, T. Phister³, M.L. Delia⁴ and P. Strehaiano⁴

¹ Departamento. Ing. Eléctrica y Electrónica, Instituto Tecnológico de Veracruz, Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Veracruz, Ver, México

² Universidad Autónoma de Nuevo León, FIME, Monterrey, NL, México

³ Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Sciences, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA

⁴ Laboratoire de Génie Chimique, UMR-CNRS 5503, Toulouse Cedex 1, France

Keywords

biomass, *Brettanomyces bruxellensis*, fermentation, mathematic model, wine spoilage.

Correspondence

María Guadalupe Aguilar Uscanga, Instituto Tecnológico de Veracruz-UNIDA, Av. Miguel A. de Quevedo 2779 Col. Formando Hogar, CP. 91860. Veracruz, Ver, México.
E-mail: maguilaruscanga@yahoo.com.mx

2011/1766: received 16 January 2011, revised 13 April 2011 and accepted 3 May 2011

doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03081.x

Abstract

Aim: To study the effect of glucose concentrations on the growth by *Brettanomyces bruxellensis* yeast strain in batch experiments and develop a mathematical model for kinetic behaviour analysis of yeast growing in batch culture.

Methods and Results: A Matlab algorithm was developed for the estimation of model parameters. Glucose fermentation by *B. bruxellensis* was studied by varying its concentration (5, 9.3, 13.8, 16.5, 17.6 and 21.4%). The increase in substrate concentration up to a certain limit was accompanied by an increase in ethanol and biomass production; at a substrate concentration of 50–138 g l⁻¹, the ethanol and biomass production were 24, 59 and 6.3, 11.4 g l⁻¹, respectively. However, an increase in glucose concentration to 165 g l⁻¹ led to a drastic decrease in product formation and substrate utilization.

Conclusions: The model successfully simulated the batch kinetic observed in all cases. The confidence intervals were also estimated at each phase at a 0.95 probability level in a t-Student distribution for f degrees of freedom. The maximum ethanol and biomass yields were obtained with an initial glucose concentration of 138 g l⁻¹.

Significance and Impact of the Study: These experiments illustrate the importance of using a mathematical model applied to kinetic behaviour on glucose concentration by *B. bruxellensis*.

Introduction

The genus *Brettanomyces* has been recognized as a wine spoilage yeast, imparting undesirable odours and flavours along with a high levels of acetic acid (Chatonnet *et al.* 1995; Ciani and Ferraro 1997; Couto *et al.* 2005; Woolfit *et al.* 2007) and as a contaminating yeast in alcoholic fermentations (De Miniac 1989; Délia-Dupuy *et al.* 1995; Gilis 1999). While the genus is often viewed as a contaminant, recently, researchers have begun to assess its value for the production of both ethanol and acetic acid (Freer *et al.* 2003; Blomqvist *et al.* 2010; Galafassi *et al.* 2010). The yeast may be useful, as it has demonstrated higher

levels of tolerance to both end products when compared with *Saccharomyces cerevisiae* (Phowchinda *et al.* 1997). However, few works have been carried out to determine effective substrate levels or product inhibition levels for *Brettanomyces* in the production of either ethanol or acetic acid.

The inhibition of yeast growth is generally because of the presence of a chemical compound in the culture medium (substrate and nutrient concentrations) or of the accumulation of fermentation end products such as ethanol, carbon dioxide or acetic acid. The inhibitory effects of substrates can be demonstrated by the inhibitory effect of glucose concentrations over 150 g l⁻¹ on the synthesis

of numerous glycolytic enzymes (Holzer 1968). Strehai-ano and Goma (1983) proposed that the inhibitory effect of glucose is because of the accumulation of ethanol inside the cell. Therefore, the tolerance of the yeast to high concentrations of glucose will depend on their capacity to expel ethanol. This effect of inhibition can be translated into a more marked effect on microbial growth than on fermentation (Strehai-ano 1984). The effects of osmotic pressure and of water activity are bound to this phenomenon, as are the exchanges between the cell and the culture medium. Blondin *et al.* (1982) reported that neither *Dekkera* nor *Brettanomyces intermedius* with a high aeration rate and 120 g l⁻¹ initial glucose, ever totally consumed the sugar (quantity used: 55 g l⁻¹). In addition, acetic acid production was 30 g l⁻¹.

Numerous studies have been conducted to explain the inhibitory role of ethanol and the synergistic effect of organic acids (acetic acid, octanoic acid, etc.), in this growth inhibition. Not all yeasts present the same sensitivity to ethanol, the most resistant yeast being *S. cerevisiae*. However, typically between 10 and 15% ethanol in the culture medium will still inhibit *S. cerevisiae* (D'Amore *et al.* 1990). While ethanol tolerance in *S. cerevisiae* has been well studied, its mechanisms are still poorly understood (Ma and Liu 2010). Exposure to ethanol increases the fluidity of the cell membrane, causes changes in the cell wall, and amino acid metabolism, induces the production of heat shock proteins as well as lowering the rate of RNA and protein accumulation (Mishra and Prasad 1989; Hallsworth *et al.* 1998; Sales *et al.* 2000; Chandler *et al.* 2004; Hu *et al.* 2007). A number of transcriptional studies have found similar gene categories to be upregulated by ethanol these include cell energetics, transport, cell surface interactions, lipid metabolism, general stress response, trehalose metabolism, protein destination, ionic homeostasis and metabolic pathways including glycolysis and the TCA cycle (Alexandre *et al.* 2001, Chandler *et al.* 2004 Fujita *et al.* 2004). A number of gene categories are also downregulated including those involved in protein synthesis, RNA synthesis and amino acid metabolism (Alexandre *et al.* 2001; Chandler *et al.* 2004 Fujita *et al.* 2004). A recent study by Nardi *et al.* (2010) is the only study to date to examine the response of *Brettanomyces* to ethanol. Because there is currently only a partial genome available, they examined the expression of 9 genes known to be expressed in wine by *S. cerevisiae*. Of these 11 genes, three were involved in ethanol tolerance (ATP1, VPS34 and ERG6). The expression pattern in wine was found to be very different in comparison with that of *S. cerevisiae*. Most changes were insignificant; however, ATP1 was expressed at a higher level initially and ERG6 was not repressed in stationary phase. However, much more work

remains to be carried out on *Brettanomyces* stress responses.

The effects of ethanol on *S. cerevisiae* are primarily observed at the level of the plasma membrane (permeability) (D'Amore *et al.* 1990). However, various studies propose that the toxic effect of ethanol is because of the presence of other fermentation products, such as organic acids, fatty acids, aldehydes and other alcohols, which can accumulate during fermentation (Nagodawithana and Steinkraus 1976; Novak *et al.* 1981; Dombek and Ingram 1986). Ramos and Medeira-Lopez (1990) demonstrate that acetic acid decreases the tolerance of yeasts to ethanol (from 11% without acetic acid to 0% with 1% acetic acid) and that it reduces the range of temperatures for growth of *S. cerevisiae* (from 3 to 42°C without acetic acid to 19–26°C with 1% acetic acid). Similarly, a study carried out by Rodriguez-Alvarez *et al.* (1992) using *Candida shehate* on xylose demonstrated that supplementation with 0.4% acetic acid both decreased the tolerance of *C. shehate* to ethanol (5–2%) and narrowed its range of acceptable growth temperatures from 5–34°C to 21–27°C. *Brettanomyces bruxellensis*, however, is more resistant to acetic acid than *S. cerevisiae* while exhibiting a similar tolerance to ethanol (Phowchinda *et al.* 1997).

In this research, a detailed set of batch kinetic data for the fermentation of glucose by *B. bruxellensis* has been collected so as to acquire a better understanding of the environmental effects (the substrate availability, in particular) on final ethanol and biomass accumulation during the fermentation process. An important aspect of this study was the development of a mathematical model using the batch kinetic data that could predict the effect of this substrate and ethanol accumulation.

Materials and Methods

Microorganism

The yeast strain used was isolated from an alcoholic fermentation of an industrial plant (distillery). It was identified as *B. bruxellensis* by the Institute of Hygiene and Epidemiology Mycology of Brussels (IHEM) and registered under the number 6037.

Culture media

Brettanomyces bruxellensis was preserved at 4°C on a medium composed of agar; glucose and yeast extract (2, 2, 1%). A culture medium was used, which consisted of 5, 9.3, 13.8, 16.5, 17.6 or 21.4% glucose, with 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.5% KH₂PO₄, 0.04% MgSO₄.7H₂O and 0.1% yeast

extract added. The pH was adjusted to 4.0 using 10% (v/v) orthophosphoric acid.

Culture conditions

The experiments were carried out in a 2-l bioreactor (Setric SET 2, Setric Genie Industriel, Toulouse, France), with a 1.4-l working volume. Temperature was regulated at 30°C, the pH was not controlled, and the stirrer speed was set at 250 rev min⁻¹. The culture medium was sterilized for 30 min at 120°C, and the aeration rate was 0.10 vvm ($k_{La} = 6.4 \text{ h}^{-1}$; oxygen transfer rate = 43 mg O₂ l⁻¹ h⁻¹). The dissolved oxygen transfer rates were calculated using the equation $\text{OTR} = k_{La} (C^* - C)$. Inoculum was added to attain 3×10^6 viable cells per ml, and the rate of ethanol and biomass production and of sugar consumption were obtained during the exponential phase of growth.

Analytical techniques

Growth was followed by measuring the optical density of yeast cell suspensions at 620 nm. This measurement was previously correlated with dry cell weight.

Glucose, ethanol, glycerol and acetic acid concentrations were determined by HPLC with a TPS Spectra System apparatus (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), using a Bio-Rad Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) heated to 40°C and a refraction index detector (TPS RefractoMonitor V). The mobile phase was sulfuric acid (0.005 mol l⁻¹) flowing at 0.4 ml min⁻¹. Specialized software (BORWIN V 1.2) allowed the surface of detected peaks to be calculated. A calibration curve was produced for a concentration range of 0–20 g l⁻¹ for each component. The experimental error was estimated at <3%.

Results

Effect of the initial glucose concentration on the growth, ethanol production and substrate consumption: Fig. 1 shows the effect of initial contents of the sugar on the maximal specific growth rate (μ_{max}) and the consumption of substrate. The variation in maximal specific growth rate is very weak for an active interval of 50–138 g l⁻¹ initial glucose, as the value of μ_{max} maintains around 0.32–0.34 h⁻¹. The maximal value of the specific rate of growth decreases as the initial content of sugar increases. The μ_{max} does not exceed 0.09 h⁻¹ when the glucose content reaches 214 g l⁻¹. If we compare the different final concentrations of glucose for all fermentation, we observe great differences. Between 50 and 138 g l⁻¹ initial glucose, the yeast exhausts all the substrate; however, for glucose content up

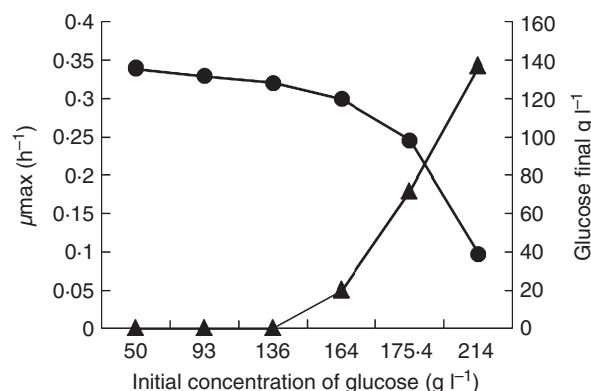


Figure 1 Effect of glucose concentration on specific rate growth. Glucose final concentration (▲) Maximal specific growth rate (●).

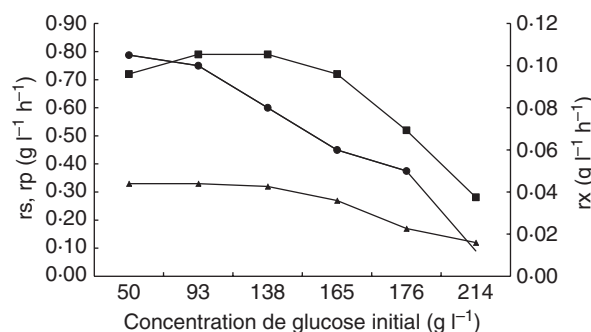


Figure 2 Effect of initial glucose concentration on the average production rate of ethanol, biomass and sugar consumption. Ethanol production in the culture medium (■) Glucose consumption in the culture medium (▲) Biomass production in the culture medium (●).

to 165 g l⁻¹, the final glucose concentration increases and the inhibition phenomenon appears. From Fig. 2, we can see the influence that initial glucose concentration exercises on the average rate of ethanol production, of biomass production and of sugar consumption. The higher the initial glucose concentration, the average of ethanol production rate is diminished. This rate fluctuates around 0.34 g l⁻¹ h⁻¹ for initial glucose concentrations of 50–138 g l⁻¹ and merely reaches 0.12 g l⁻¹ h⁻¹ for 214 g l⁻¹ initial glucose. This same phenomenon is observed for the average biomass production rate that ranges from 0.10 g l⁻¹ h⁻¹ (50 g l⁻¹ initial glucose) to 0.012 g l⁻¹ h⁻¹ (214 g l⁻¹ initial glucose). In the same way, we can observe that the inhibitory effect on the average glucose consumption rate begins with an initial concentration of 165 g l⁻¹; its maximal value of 0.80 g l⁻¹ h⁻¹ was reached between 93 and 138 g l⁻¹ but this begins to decrease very quickly beyond 165 g l⁻¹. To better appreciate the size of inhibition, we calculated the relative inhibition percentage for average ethanol and biomass production rates (Fig. 3). It clearly appears that the inhibition on cellular synthesis

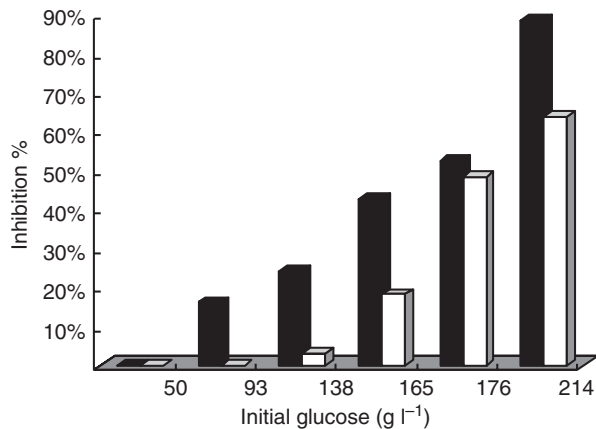


Figure 3 Inhibition % of biomass growth (■) and ethanol production (□) based on initial glucose.

activity is stronger than on ethanol production activity, since up to 93 g l⁻¹ initial glucose content, there is no effect on ethanol production, but the inhibition on the average biomass production rate, on the other hand, is already present (16%) and increases in a linear fashion with the increase in the initial glucose concentration.

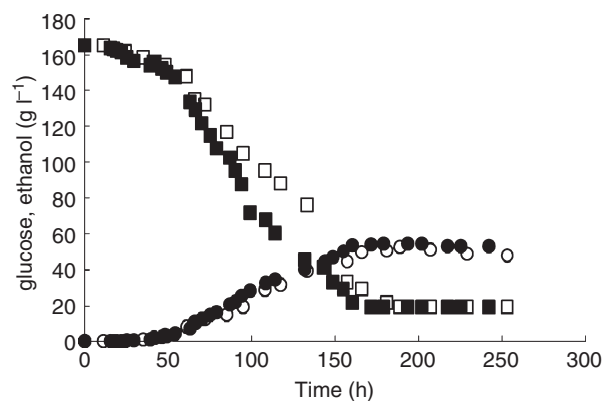


Figure 4 Effect of yeast extract (YE) concentration on the glucose consumption and ethanol production at 165 g l⁻¹ of glucose initial, ethanol at 1 g l⁻¹ YE (●), Ethanol at 2 g l⁻¹ YE (○), Glucose consumption at 1 g l⁻¹ YE (□), Glucose consumption at 2 g l⁻¹ YE (■).

Yeast extract (g l ⁻¹)	Time final (h)	X_{max} (g l ⁻¹)	P_{max} (g l ⁻¹)	S_f (g l ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	r_x (g l ⁻¹ h ⁻¹)	r_p (g l ⁻¹ h ⁻¹)	r_s (g l ⁻¹ h ⁻¹)
1.0	202	13.29	54.48	20.0	0.09	0.06	0.27	0.72
2.0	207	9.77	52.70	44.0	0.08	0.05	0.25	0.61

X_{max} , final concentration of biomass; P_{max} , final concentration of ethanol; S_f , final concentration of substrate; $Y_{x/s}$, biomass on glucose yield coefficient (g_x g_s⁻¹); r_x , average biomass production rate (g l⁻¹ h⁻¹); r_p , average ethanol production rate (g l⁻¹ h⁻¹); r_s , average substrate consumption rate (g l⁻¹ h⁻¹).

As inhibition becomes distinctly more pronounced from 165 g l⁻¹ initial glucose, we wanted to verify that the observed effect was not because of nutrient limitation for media components other than glucose for example of yeast extract. Therefore, a test was performed with 165 g l⁻¹ initial glucose (a case where inhibition is well marked), with the addition of 2 g l⁻¹ yeast extract (instead of 1.0 g l⁻¹). The other conditions of fermentations were not modified. In spite of the increase in yeast extract concentration, the inhibitory effect remained, as we observed both a blockage of glucose consumption and fermentative activity (Fig. 4) and the kinetics parameters were affected with addition of 2 g l⁻¹ yeast extract (see Table 1). As the difficulty that *Brettanomyces*, under these conditions, exhibits in the consumption of high levels of glucose is not likely to be attributed to nutrient limitation, it is most likely due to an inhibition by fermentation products. This inhibition could be explained by the ethanol and acetic acid contents (54.5 and 4.5 g l⁻¹, respectively) produced during fermentation (Ciani and Ferraro 1997; Aguilar-Uscanga *et al.* 2000).

The mathematical model

We determined a model which could represent the dynamics of the initial glucose concentration effect on biomass and ethanol production. The mathematical model used here was the nonstructured Monod type, modified and proposed in Han and Levenspiel (1988). The model was built upon the following assumptions, which have been postulated coherently with the experimental observations.

i Considering oxygen as the limited substrate and ethanol as an inhibiting product, the culture can be divided into three phases:

- Phase I: when oxygen is present in the medium ($C_L > 0$). This was in the first 42 h.
- Phase II: when oxygen was completely consumed ($C_L \equiv 0$). From 42 h until the fermentation is finished.
- Phase III: when product concentration (ethanol) presents an inhibition effect additional to high substrate concentration.

Table 1 Kinetic parameters obtained with 165 g l⁻¹ of initial glucose at two different concentrations of yeast extract by *Brettanomyces bruxellensis*

ii The presence of inhibition phenomenon by the substrate at the first phase of the fermentation.

iii It is supposed that $m = 0$, considering that the K_{m_o} constant value corresponding to the limited substrate (oxygen) is independent of glucose content and $n > 0$. This behaviour is of the ‘inhibition noncompetitive’ type.

So, considering these hypotheses, the model is composed of the equations described below:

The modified Monod equation for phase I when $C_L > 0$ is:

$$\mu_1 = \mu_{\max} \left(\frac{C_L}{C_L + K_{m,o}} \right) \left(1 - \frac{S}{S^*} \right)^n \quad (1)$$

For phase II, when ($C_L \equiv 0$), the specific growth rate was determined by the balanced equation for details see Aguilar-Uscanga *et al.* (2000):

$$\frac{dC_L}{dt} = K_{La}(C^* - C_L) - \frac{\mu x}{Y_O} = 0 \quad (2)$$

Where

$$\mu_2 = \frac{Y_O K_{La} C^*}{x} \quad (3)$$

For phase III, when $P = P_c$ (critical production concentration)

$$\mu_3 = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P_c - \alpha \mu_{\max} x}{\alpha \mu_{\max} x} \right) \quad (4)$$

Kinetic parameter estimation. The dynamic mass balance equations for the batch process are expressed below:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x, \quad \text{Specific growth rate definition} \quad (5)$$

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{\mu x}{Y_{x/s}}, \quad \text{Glucose uptake} \quad (6)$$

$$\frac{dp}{dt} = \alpha \mu x, \quad \text{Ethanol production} \quad (7)$$

$$\frac{dC_L}{dt} = K_{La}(C_L^* - C_L) - \frac{\mu x}{Y_O}, \quad \text{Oxygen concentration in the liquid phase} \quad (8)$$

Where μ is the specific growth rate (h^{-1}), μ_{\max} is the maximal specific growth rate (h^{-1}), C_L is the liquid-phase oxygen concentration ($mg O_2 l^{-1}$), K_{m_o} is the Monod saturation constant for oxygen as limiting substrate ($mg O_2 l^{-1}$), S is the glucose concentration ($g l^{-1}$), S^* is the substrate inhibitory concentration in the reactor ($g l^{-1}$), n is the number of parameter Estimated, dC_L/dt is the oxygen production in the culture medium

($mg O_2 l^{-1} h^{-1}$), k_{La} is the oxygen transfer reactor coefficient (h^{-1}), C^* is the gas–liquid equilibrium oxygen concentration ($mg O_2 l^{-1}$), X is the biomass concentration ($g l^{-1}$), Y_0 is the biomass on oxygen yield coefficient ($g_x/g O_2$), P is the ethanol concentration in the reactor ($g l^{-1}$), P_c is the ethanol concentration critic in the reactor ($g l^{-1}$), and α is the ethanol on biomass yield coefficient (g_p/g_x). $rx = dx/dt$ is the biomass production in the culture medium ($g_x l^{-1} h^{-1}$), $rs = ds/dt$ is the glucose consumption in the culture medium ($g_s l^{-1} h^{-1}$), $rp = dp/dt$ is the ethanol production in the culture medium ($g_p l^{-1} h^{-1}$), $Y_{x/s}$ is the biomass on glucose yield coefficient (g_x/g_s). X_0, S_0, P_{10}, C_{L0} are biomass, substrate and products concentration ($g l^{-1}$) when $t = 0$. The kinetic parameters $\mu_{\max}, Y_0, Y_{x/s}$ and α were estimated

Table 2 Initial kinetic parameter values for different glucose concentrations

Parameter	Initial parameter values ($g l^{-1}$)					
	50	93	138	165	176	214
μ_{\max}	0.1406	0.0755	0.141	0.129	0.0677	0.0714
$Y_{x/s}$	0.141	0.114	0.0826	0.0913	0.102	0.0392
Y_0	0.0025	0.0025	0.00250	0.0025	0.0025	0.0520
α	4.3	4.4	4.3	3.4	3.7	4.3
$K_{m,o}$	0.0001	0.001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
S^*	244	244	244	244	244	244
k_{La}	6	6	6	6	6	6
C^*	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7
N	1.86	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
P_c	**	**	**	53.8	44	33.7

μ_{\max} , maximal specific growth rate (h^{-1}); $Y_{x/s}$, biomass on glucose yield coefficient ($g_x g_s^{-1}$); Y_0 , biomass on oxygen yield coefficient ($g_x g O_2^{-1}$); α , ethanol on biomass yield coefficient (g_p/g_x); $K_{m,o}$, Monod saturation constant for oxygen as limiting substrate ($mg O_2 l^{-1}$); S^* , substrate inhibitory concentration in the reactor ($g l^{-1}$); k_{La} , oxygen transfer reactor coefficient (h^{-1}); C^* , gas–liquid equilibrium oxygen concentration ($mg O_2 l^{-1}$); n , number of parameter estimated; P_c , ethanol concentration critic in the reactor ($g l^{-1}$).

**This phenomenon was not present.

Table 3 Initial conditions to different glucose concentrations

Variable	Initial conditions in $g l^{-1}$					
	50	93	138	165	176	214
X_0	0.017	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01
S_0	49.34	92.8	138	165	175.4	214
P_0	0	0.02	0.01	0	0	0.02
C_{L0}	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7

X_0, S_0, P_{10} , biomass, substrate and products concentration ($g l^{-1}$) when $t = 0$; C_{L0} , liquid-phase oxygen concentration ($mg O_2 l^{-1}$) when $t = 0$.

from the experimental data (Table 2) and used as the initial estimate in an iterative approach which consisted of a performance index minimization until the final value of the parameter vector was reached, as shown in the study by Nihtilä and Virkkunen (1977). The performance index and the initial parameter values are shown below.

$$\min J = \sum_1^N (Y_{\text{exp}} - Y_{\text{mod}})^T (Y_{\text{exp}} - Y_{\text{mod}}) \quad (9)$$

Where N is the observation number, Y_{exp} are the experimental data, and Y_{mod} the model values. The model was solved numerically with the initial condition given by the

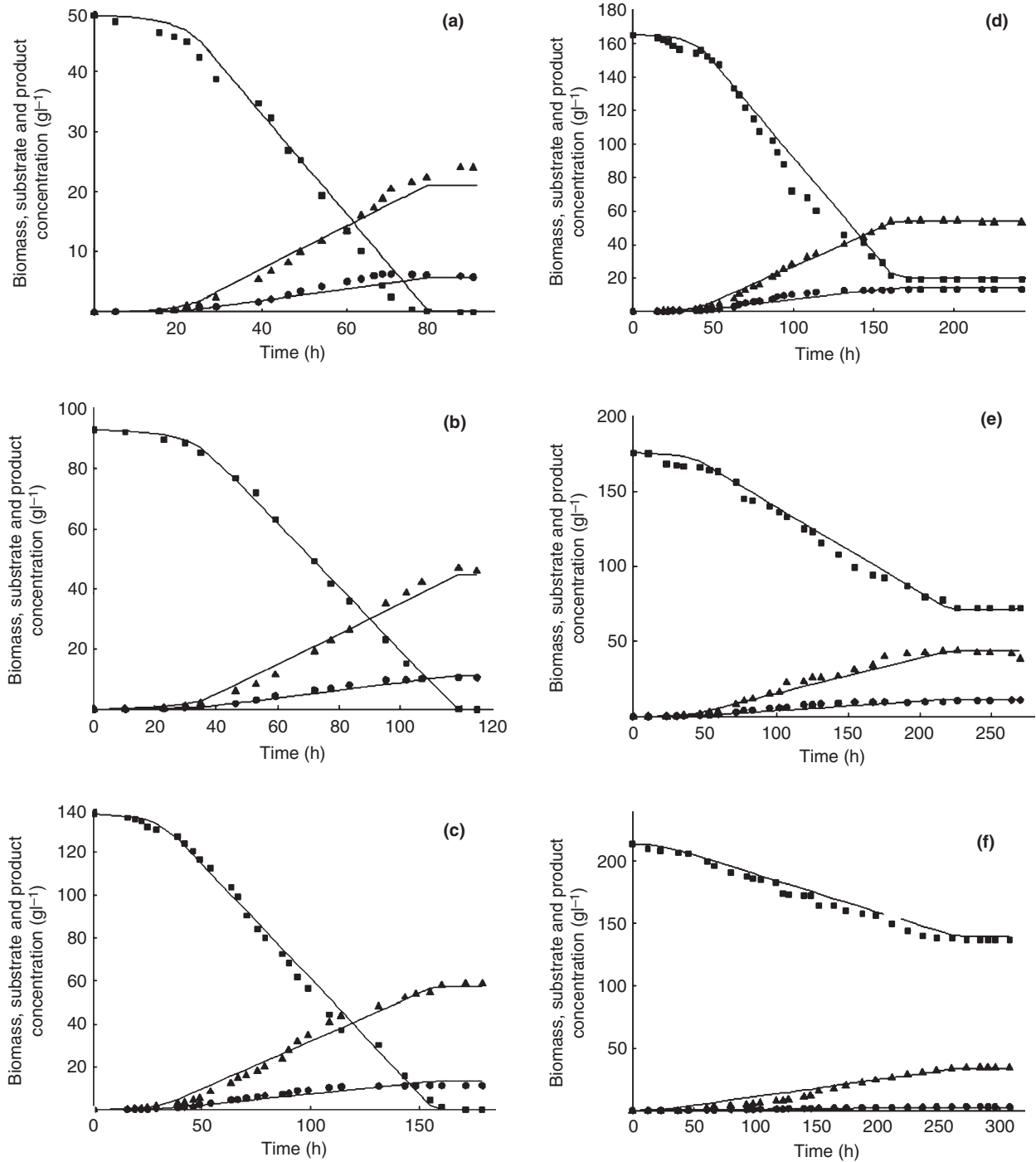


Figure 5 Kinetic with 50, 93, 138, 165, 176 and 214 g l⁻¹ glucose concentration. Biomass (●), substrate (■) and product (▲). Model Data (—).

experimental values at zero time (X_0 , S_0 , P_0 and C_{L0}) (see Table 3). The influence of oxygen on six kinetic factors with different glucose concentrations was observed; neither biomass nor substrate reached high concentration values in the first phase. Also, at high substrate concentration, a critical product inhibition effect was noted which did not allow biomass growth, substrate consumption and ethanol production. Figure 5 shows the substrate (glucose), product (ethanol) and biomass concentrations for cultures run at different initial glucose conditions. It can be seen that ethanol production is the product associated with growth in all cases, and the glucose concentration inhibition effect was greater for ethanol production than for biomass production. No product inhibition phenomena on yeast growth and ethanol production have appeared at the final ethanol concentration (max. 58 g l⁻¹) in the case of initial glucose concentration (50–138 g l⁻¹). The individual confidence limits of the estimates at probability level $(1 - \alpha)$ were also obtained with the expression:

$$\beta_i = \hat{\beta}_i \pm t(f, 1 - \alpha/2) \times \sqrt{R_{vii}} \quad (10)$$

Where $t(f, 1 - \alpha/2)$ is the value of the t distribution for f degrees of freedom and for probabilities $(1 - \alpha/2)$ and $(R_{vii})^{1/2}$ are the square roots of the diagonal elements of the covariance matrix as presented in Nihtilä and Virkkunen (1977). The final values were used in the simulation of the proposed model which was compared with data, and the kinetics could be described very well as shown in the figures. The only adjusted kinetic parameters were maximum growth rate, yields and alpha; the other parameters remained fixed. The final results and their confidence intervals are shown in Tables 4 and 5.

Discussion and conclusions

The observed effect of the initial glucose concentration on biomass production, as opposed to ethanol production in *Brettanomyces*, agrees with results obtained by Délia-Dupuy *et al.* (1995) using three strains of *Saccharomyces*. They describe a similar phenomenon for the three tested yeasts and indicate that the kinetic parameters are bound strongly to the level of initial substrate and that this dependence is more marked for biomass synthesis than for ethanol production. For *Brettanomyces*, this effect is distinctly pronounced over 165 g l⁻¹ of initial glucose.

As the difficulty that *Brettanomyces*, under these conditions, exhibits in the consumption of high levels of glucose is not likely to be attributed to nutrient limitation, it is most likely due to an inhibition by fermentation products. This inhibition could be explained by the ethanol and acetic acid contents produced during fermentation (Ciani and Ferraro 1997; Aguilar-Uscanga *et al.*

Table 4 Final parameter values

Parameter	Final parameter values					
	50 g l ⁻¹	93 g l ⁻¹	138 g l ⁻¹	165 g l ⁻¹	176 g l ⁻¹	214 g l ⁻¹
μ_{max}	0.2089	0.1025	0.0945	0.0891	0.00753	0.0781
$Y_{x/s}$	0.1252	0.1211	0.0353	0.1019	0.11	0.0353
Y_o	0.0026	0.0032	0.0026	0.0029	0.0015	0.0003
α	3.6	3.9637	4.2524	3.6382	3.841	12.7869

μ_{max} , maximal specific growth rate (h⁻¹); $Y_{x/s}$, biomass on glucose yield coefficient (g_x g_s⁻¹); Y_o , biomass on oxygen yield coefficient (g_x g O₂⁻¹); α , ethanol on biomass yield coefficient (g_p g_x⁻¹).

Table 5 Confidence intervals

Phase		Confidence interval					
		50	93	138	165	176	214
I	μ_{max}	±0.0382	±0.012	±0.0139	±0.0248	±0.0633	±0.144
	Y_x	±0.0846	±0.0571	±0.0506	±0.0112	±0.321	±0.178
	A	±2.51	±1.93	±2.27	±4.31	±12.28	±65.3
	Y_o	±0.00179	±0.00154	±0.00136	±0.00387	±0.00559	±0.00133
II	Y_x	±0.0511	±0.0234	±0.022	±0.0281	±0.0243	±0.314
	A	±1.51	±0.787	±0.9	±1.03	±0.874	±11.43
	Y_o	±0.00105	±0.000616	±0.000583	±0.000793	±0.000341	±0.000242
III	μ_{max}	*	*	*	±0.317	±1.28	±2.56
	Y_x				±0.182	±0.812	±0.973
	A				±6.72	±29.11	±3.532
	Y_o				±0.00512	±0.0116	±0.00751

μ_{max} , maximal specific growth rate (h⁻¹); $Y_{x/s}$, biomass on glucose yield coefficient (g_x g_s⁻¹); Y_o , biomass on oxygen yield coefficient (g_x g O₂⁻¹); α , ethanol on biomass yield coefficient (g_p g_x⁻¹).

*This phase was not present.

2000). With regard to accounting for the substrate inhibition effect in the model, the final parameter values were obtained for the proposed model by the application of an iterative method which can find a minimum error between data and model values as expressed in equation (eqn 9).

As has been shown in the Fig. 5, the proposed model could represent the dynamic behaviour of the fermentation process very well. For 50, 93 and 138 g l⁻¹ glucose concentrations, total substrate consumption can be seen, even when in the first phase (with oxygen present), there was neither high ethanol production nor biomass growth; in the second phase, their values increased considerably. For this kinetics, only two stages were considered. For the last three conditions with 163, 176 and 214 g l⁻¹ glucose concentrations, a third phase was included which models the presence of a critical product that shows inhibition effect stopping substrate consumption, biomass growth and ethanol production. For kinetic parameters estimation, a Simplex method was used, and final values were reached in just one or two interactions (Schellenberg et al. 2005). The individual confidence limits with a 0.95 probability that the interval contains the ensemble parameter value were also estimated showing for each phase in all kinetics that parameter α had a greater range than the others and that parameter Y_o had the smallest. In all the dynamics, the second phase had the largest error and the last three phases presented the smallest; this was principally because of the data number in each phase. For more details of the optimization method and confidence limit estimation, see Himmelblau (1970). As can be observed in the figures, the proposed model could represent the dynamic behaviour of the fermentation process very well. The maximum ethanol and biomass yields were obtained with an initial glucose concentration of 138 g l⁻¹. The experimental results showed that this model could predict the growth, ethanol production and glucose consumption pattern very well in batch culture.

Nomenclature

k_{La} Oxygen transfer reactor coefficient (h⁻¹)
 OTR Oxygen transfer rate (mg O₂ l⁻¹h⁻¹)
 μ Specific growth rate (h⁻¹)
 μ_{max} Maximal specific growth rate (h⁻¹)
 $rp = dp/dt$ Ethanol production in the culture medium (g_p l⁻¹ h⁻¹)
 $rs = ds/dt$ Glucose consumption in the culture medium (g_s l⁻¹ h⁻¹)
 $rx = dx/dt$ Biomass production in the culture medium (g_x l⁻¹ h⁻¹)
 dC_L/dt Oxygen production in the culture medium (mg O₂ l⁻¹ h⁻¹)

C_L Liquid-phase oxygen concentration (mg O₂ l⁻¹)
 C^* Gas-liquid equilibrium oxygen concentration (mg O₂ l⁻¹)
 K_{mo} Monod saturation constant for oxygen as limiting substrate (mg O₂ l⁻¹)
 M Number of model states (variables) $m = 4$
 n Number of parameter estimated
 S Substrate concentration in the reactor (g l⁻¹)
 S^* Substrate inhibitory concentration in the reactor (g l⁻¹)
 X Biomass concentration (g l⁻¹)
 Y_o Biomass on oxygen yield coefficient (g_x/g O₂)
 P Ethanol concentration in the reactor (g l⁻¹)
 P_c Ethanol concentration critic in the reactor (g l⁻¹)
 $Y_{x/s}$ Biomass on glucose yield coefficient (g_x/g_s)
 X_0, S_0, P_{10}, C_{L0} Biomass, substrate and products concentration when $t = 0$ (g l⁻¹)
 α Ethanol on biomass yield coefficient (g_p/g_x)
 N Observation number
 Y_{exp} Experiment data
 Y_{mod} Model values
 J Performance index used in parameter estimation (g² l⁻²)
 β Confidence interval
 ρ_i Estimated i -parameter value $\rho = [Y_{x/s}, \alpha_1, K_s, K_i]$
 f Degree of freedom of the estimation
 $R_{vii}^{1/2}$ Square roots of the diagonal elements of the covariance matrix.

Acknowledgements

We thank CONACYT for the financial support of this research: project no. 74485. We acknowledge the critical reading of the manuscript by Patricia M. Hayward-Jones, MSc.

References

- Aguilar-Uscanga, M.G., Delia, M.L. and Strehaiano, P. (2000) Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Canadian J Microbiol* **46**, 1046–1050.
- Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S. and Blondin, B. (2001) Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **498**, 98–103.
- Blomqvist, J., Eberhard, T., Schnürer, J. and Passoth, V. (2010) Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 1487–1497.
- Blondin, B., Ratomahenina, R., Arnaud, A. and Galzy, P. (1982) A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain. *Biotechnol Bioeng* **24**, 2031–2037.
- Chandler, M., Stanley, G.A., Rogers, P. and Chambers, P. (2004) A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Microbiol* **54**, 427–454.

- Chatonnet, P., Dubourdieu, D. and Biodron, J.N. (1995) The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American J Enol Vitic*, **46**, 463–468.
- Ciani, M. and Ferraro, L. (1997) Role of oxygen on acetic acid production *Brettanomyces/Dekkera* in Winemaking. *J Sci Food Agric* **75**, 489–495.
- Couto, J.A., Neves Filipe, C.F. and Hogg, T. (2005) Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. *Int J Food Microbiol* **104**, 337–344.
- D'Amore, T., Panchal, C., Russel, I. and Stewart, G. (1990) A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit Rev Biotechnol* **9**, 287–304.
- De Miniac, M. (1989) Contamination des fermentations alcooliques industrielles par les levures du genre: *Brettanomyces*, I A A Juillet/Août. 559–563.
- Délia-Dupuy, M.L., de Miniac, M., Phowchinda, O. and Strehaiano, P. (1995) Contamination par les levures *Brettanomyces* dans les fermentations alcooliques. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* **13**, 349–359.
- Dombek, K.M. and Ingram, L.O. (1986) Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl Environ Microbiol* **52**, 975–981.
- Freer, S.N., Dien, B. and Matsuda, S. (2003) Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. *World J Microbiol Biotechnol* **19**, 101–105.
- Fujita, K., Matsuyama, A., Kobayashi, Y. and Iwahashi, H. (2004) Comprehensive gene expression analysis of the response to straight-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* using cDNA microarray. *J Appl Microbiol* **97**, 57–67.
- Galafassi, S., Merico, A., Pizza, F., Hellborg, L., Molinari, F., Piškur, J. and Compagno, C. (2010) *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* doi: 10.1007/s10295-010-0885-4.
- Gilis, J.F. (1999) *Etude de contaminations de fermentations alcooliques industrielles par les levures Brettanomyces*. p. 185. Ph.D. Dissertation, Toulouse, France: Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Génie Chimique- I.N.P..
- Hallsworth, J.E., Nomura, Y. and Iwahara, M. (1998) Ethanol-induced water stress and fungal growth. *J Ferment Bioeng* **86**, 451–456.
- Han, K. and Levenspiel, O. (1988) Extended Monod kinetics for substrate, production, and cell inhibition. *Biotechnol Bioeng* **32**, 430–437.
- Himmelblau, D.M. (1970) *Process Analysis by Statistical Methods* New York, USA: Wiley.
- Holzer, H. (1968) *Aspects of Yeast Metabolism*. Mills, A.K., ed. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Hu, X.H., Wang, M.H., Tan, T., Li, J.R., Yang, H., Leach, L., Zhang, R.M. and Luo, Z.W. (2007) Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**, 1479–1487.
- Ma, M. and Liu, Z.L. (2010) Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 829–845.
- Mishra, P. and Prasad, R. (1989) Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **30**, 294–298.
- Nagodawithana, T.W. and Steinkraus, H.K. (1976) Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *S. cerevisiae* in rapid fermentation. *Appl Environ Microbiol* **3**, 158–162.
- Nardi, T., Remize, F. and Alexandre, H. (2010) Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: a comparative study of stress genes expression. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**, 925–937.
- Nihtilä, M. and Virkkunen, J. (1977) Practical identifiability of growth and substrate consumption models. *Biotechnol Bioeng* **19**, 1831–1850.
- Novak, M., Strehaiano, P. and Moreno, M. (1981) Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol Bioeng* **13**, 201–211.
- Phowchinda, O., Aguilar-Uscanga, M.G., Délia, M.L., Vidal, F. and Strehaiano, P. (1997) Rôle de l'acide acétique dans la concurrence entre deux genres levuriens en fermentation industrielle. In *Génie de la Réaction en Microbiologie et Biochimie*, Proceedings, 6th Congrès Française de Génie des Procédés, Paris, Sept. 24–26, ed. Bimbenet, J.J. and Muratet, G. pp. 79–84. Lavoisier, Paris: Collection Récents Progrès en Génie des Procédés.
- Ramos, M.T. and Medeira-Lopez, A. (1990) Effects of acetic acid on the temperature profile of ethanol tolerant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* **12**, 229–234.
- Rodriguez-Alvarez, A., Morais-Janeiro, M. and Madeira-Lopez, A. (1992) Effects of acetic acid on the temperature range of ethanol tolerant in *Candida shehatae* growing on D-xylose. *Biotechnol Lett* **14**, 1181–1186.
- Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E. and Lindsey, G. (2000) The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta* **1463**, 267–278.
- Schellenberg, A., Rosehart, W. and Aguado, J.A. (2005) Maximum loading problems using stochastic nonlinear programming and confidence intervals. In: *Proceedings of the 37th Annual North American Power Symposium 2005*. pp. 3–8. doi: 10.1109/NKPS.2005.1560493.
- Strehaiano, P. (1984) *Phénomènes d'inhibition et fermentation alcoolique*. Dr.ès Sciences dissertation, ENSICG-INP, Toulouse, France.
- Strehaiano, P. and Goma, G. (1983) Effect of initial substrate concentration in two wine yeasts: relation between glucose sensitivity and ethanol inhibition. *Am J Enol Vitic* **34**, 1–5.
- Woolfit, M., Rozpedowska, E., Piskur, J. and Wolfe, P. (2007) Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Euk Cell* **6**, 721–733.