

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE CONTROL AUTOMÁTICO**

**Análisis y Optimización de Producción de Lípidos Neutros y Biomasa en  
cultivos de Microalgas**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA**

**Christian Abraham Enríquez Olguín**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

**en la Especialidad de Control Automático**

Director de Tesis:

**Dr. Jorge Antonio Torres Muñoz**

Ciudad de México

Noviembre, 2016



# Resumen

La complejidad implícita en el comportamiento de microalgas cultivadas en bioreactores, empleadas como alternativa para la generación de energías renovables, ha generado una serie de conflictos en los esfuerzos por modelar y optimizar el proceso de producción de biomasa y lípidos neutros. Dichas dificultades se encuentran relacionadas con las dinámicas no lineales de las variables acopladas físicas, químicas y biológicas, las cuales determinan el crecimiento, reproducción, muerte y adaptación celular, así como la síntesis de subproductos intracelulares.

Es bien sabido que en condiciones de estrés metabólico se favorece la cantidad de biomasa en el cultivo, que el fenómeno de foto-inhibición determina perfiles no lineales de crecimiento celular respecto a la cantidad luminosa que recibe el bioreactor dadas sus características geométricas, que las células presentan un proceso de foto-adaptación, que en función de la cantidad de biomasa se generan gradientes de luz a través del cultivo y que a nivel celular se sintetizan subproductos en función de las rutas metabólicas y el consumo de nutrientes. Estos y otros fenómenos involucrados en dicho sistema, han sido capturados en modelos matemáticos que describen y predicen el comportamiento del mismo. Además, bajo ciertas reducciones y consideraciones, impuestas a los modelos inicialmente propuestos que suprimen su carácter realista, se han llevado a cabo análisis de optimización.

En el presente trabajo se realiza tanto el análisis como la optimización de un modelo matemático que involucra los fenómenos antes mencionados en un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales de cinco estados. Para el análisis se emplean métodos asintóticos con el objetivo de conocer las tendencias de comportamiento del sistema. Por su parte, la optimización se logra estática y dinámicamente en ambientes tanto controlados como semicontrolados, mediante la proposición de funciones de productividad de biomasa y lípidos, a través de la aplicación de la teoría del cálculo variacional.

# Abstract

The implicit complexity of microalgae behaviour in bioreactors, used as an alternative to generate renewable energy, has generated some issues in modelling and optimizing biomass and neutral lipid productivities. Such difficulties are related with nonlinear dynamics of coupled physical, biological and chemical variables which determine growth, reproduction, death and cellular adaptation, as well as synthesis of intracellular products.

Some important and well known phenomena such as metabolic stress conditions which promotes biomass production in the culture, light gradient distribution, photoinhibition dynamics which determines nonlinear profiles of cellular growth versus the incident light intensity on the bioreactor geometry, photoadaptation dynamics and synthesis of subproducts based on metabolic pathways and nutrient uptake, have been captured in descriptive and predictive models. Moreover, some research groups have studied optimization analysis based on simplified models, in which the realism is lost under certain imposed assumptions.

This manuscript explains the analysis and optimization carried out with a mathematical model involving the phenomena mentioned above, in a nonlinear system of ordinary differential equations with five states. It has been applied asymptotic methods in order to explore the behavioral trend of the system. Further, static and dynamic optimization in both controlled and semi-controlled environments have been computed through the construction of biomass and lipid productivity functions, based on the calculus of variations theory.

## **Agradecimientos**

A mi madre, padre, hermana y hermano, en quienes siempre he encontrado un apoyo incondicional.

A mi asesor de tesis, Dr. Jorge Antonio Torres Muñoz quien generosamente aceptó guiar mi trabajo de investigación y me ha apoyado a lo largo de todo el proceso. Al Dr. Ramón Silva Ortigoza por los valiosas enseñanzas que me estimularon a estudiar el posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## **Dedicatoria**

A las profesoras y los profesores quienes han formado parte de mi trayectoria académica.

A las y los estudiantes quienes me han compartido gratas experiencias y valiosos conocimientos en mi labor como docente.

---

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Justificación . . . . .	2
1.2. Planteamiento del Problema . . . . .	3
1.3. Solución Propuesta . . . . .	4
1.4. Alcances y Contribuciones . . . . .	5
1.5. Objetivos . . . . .	6
1.6. Organización del trabajo . . . . .	7
<b>2. Estado del Arte y Marco Teórico</b>	<b>8</b>
2.1. Modelos Matemáticos de Cultivos de Microalgas . . . . .	8
2.2. Optimización de Biomasa y Subproductos generados en Cultivos de Microal- gas basada en el Modelado Matemático . . . . .	12
2.3. Métodos Asintóticos y de Optimización Estática y Dinámica . . . . .	14
<b>3. Metodología y Análisis</b>	<b>18</b>
3.1. Descripción del Modelo y Justificación . . . . .	18
3.2. Estabilidad Asintótica . . . . .	24
3.3. Histéresis . . . . .	27
3.4. Optimización Estática y Dinámica . . . . .	28
<b>4. Resultados y Conclusiones</b>	<b>33</b>
4.1. Histéresis . . . . .	34
4.2. Optimización Estática . . . . .	35
4.3. Optimización Dinámica . . . . .	39
4.4. Conclusiones Generales y Trabajos Futuros . . . . .	49
<b>Bibliografía</b>	<b>53</b>

---

# Capítulo 1

## Introducción

Las microalgas son organismos fotosintéticos, eucariotas y polifiléticos los cuales tienen la capacidad de convertir sustancias contaminantes como el dióxido de carbono o nitrógeno inorgánico en sustancias útiles para la producción de biocombustibles (bioetanol, biometano, biometanol, biohidrógeno), alimento usado en ganadería y acuicultura o la generación de componentes bioactivos (proteínas, beta caroteno, pigmentos, antioxidantes, polisacáridos, triglicéridos, ácidos grasos, vitaminas). Además pueden ser empleadas en procesos de tratamiento de aguas residuales, mitigación de gases de efecto invernadero o generación de energía eléctrica [1, 2, 30–32]. De acuerdo a las fuentes de carbono y de energía que emplean las microalgas, pueden ser cultivadas en condiciones fotoautotróficas, quimioheterotróficas, mixotróficas o fotoheterotróficas. El cultivo puede llevarse a cabo en estanques abiertos o en bioreactores con ambiente controlado de laboratorio a través de técnicas continuas, discontinuas y semicontinuas.

Se ha observado que el crecimiento de las microalgas se encuentra afectado por diversos factores tales como la cantidad de energía luminosa que incide en el cultivo, disponibilidad de nutrientes, temperatura, pH, salinidad, metabolismo propio del organismo, interacciones a nivel poblacional, foto-adaptación y sistema de agitación [30].

En el presente trabajo se desea determinar las condiciones óptimas de operación de un monocultivo continuo mixotrófico para la especie *Isochrysis Galbana* en un fotobioreactor, cuyas variables que determinan su crecimiento han de ser elegidas de acuerdo a los modelos y datos disponibles en la literatura actual, con el principal objetivo de generar aportaciones teóricas para la optimización del proceso de generación de biocombustibles como alternativa sustentable ante los perjuicios ambientales ocasionados por las fuentes de energía hasta

ahora utilizadas.

## 1.1. Justificación

La creciente y evidente necesidad por el estudio y desarrollo de técnicas que promuevan la generación de energías renovables en sustitución al uso de fuentes fósiles, ha dirigido la atención de muchos científicos de diversas áreas al modelado, análisis y optimización de los procesos que involucran el cultivo de microalgas para la generación de biocombustibles.

El empleo de microalgas trae consigo múltiples ventajas en relación a las metodologías tradicionales de plantas terrestres destinadas a la producción de bioetanol, un combustible alternativo para el transporte, cuya tendencia a la explotación de valiosas tierras agrícolas limita aun más los recursos alimenticios naturales actualmente disponibles [5, 41, 43]. Otras de las virtudes del uso de dichos organismos se relaciona con la integración de los cultivos en la reducción de la acumulación de dióxido de carbono en el ambiente debido a las emisiones industriales, así como en la tercera y cuarta etapa en el tratamiento de aguas residuales, ya que los microorganismos, además de ser fotosintéticos, se alimentan de nitrógeno inorgánico y fósforo para potenciar su crecimiento y tienen la capacidad de remover metales pesados y componentes orgánicos tóxicos [20, 26].

Por lo tanto representa una alternativa sustentable que cuenta con el potencial de generar energía con mayor eficiencia en el proceso de conversión de dióxido de carbono en lípidos neutros ricos en carbono. Cuando el agua, los nutrientes y el  $CO_2$  se encuentran en cantidades adecuadas, ésta alternativa podría satisfacer los requerimientos de combustible para el transporte en diversas regiones del planeta.

Los cultivos a gran escala han de diferir considerablemente de aquellos que se realizan en laboratorio mediante bioreactores cerrados equipados con sensores que permiten conocer los estados de ciertas variables de interés tales como la temperatura, cantidad de biomasa, pH, etc. en los que no se consideran algunos de los efectos medioambientales (meteorológicos) y de localización geográfica [41]. Sin embargo es preciso comenzar el estudio de la complejidad que subyace al cultivo con microalgas en ambientes controlados de laboratorio, para vislumbrar y evaluar sistemáticamente la apuesta por describir matemática y computacionalmente las dinámicas asociadas a dicho proceso, cuyo dominio resultaría en optimizar y disponer plenamente de los beneficios antes mencionados. En [23] se presenta un análisis de las consideraciones de diseño de foto-bioreactores para cultivos a gran escala

partiendo de la construcción de bioreactores cerrados de laboratorio con diversas formas y volúmenes.

## 1.2. Planteamiento del Problema

Las soluciones al problema mencionado en la sección anterior, mediante el enfoque matemático, requieren de descripciones que permitan el análisis cuantitativo y la predicción, con el objetivo de obtener información útil del sistema de control. El actual estado del arte de estudios que abordan el modelado de bioreactores con microorganismos fotosintéticos es extenso, sin embargo le caracteriza una falta de equilibrio entre factibilidad matemática y realismo. Es decir, modelos como [9, 34] son capaces de capturar muchos de los fenómenos observados experimentalmente en el sistema, sin embargo resulta en una representación matemática poco factible o "tratable" mediante las herramientas de análisis actualmente disponibles. Por otro lado reportes como [15, 22] muestran modelos matemáticamente factibles pero que dejan de lado el realismo que es necesario capturar dada la complejidad del sistema.

Dicha falta de equilibrio representa un reto en el área de modelado matemático, el cual posiblemente sea necesario afrontar mediante formalismos híbridos y metodologías mecánicas y experimentales. También figura como una de las razones por las cuales el control aplicado a éstos sistemas se presenta aún como problema abierto y que dichos sistemas no se hayan llevado a la práctica industrial para producciones a grandes escalas.

La obtención de perfiles de operación que conduzcan a una productividad óptima en las variables de interés del sistema también ha sido estudiado en trabajos como [15, 22, 25, 27], sin embargo las soluciones tanto analíticas como numéricas que se presentan se han logrado mediante reducciones y consideraciones que eliminan el carácter realista de los modelos originales. Las herramientas que se han empleado se basan en formalismos del cálculo variacional o de métodos heurísticos que determinan iterativamente las soluciones óptimas. Es preciso, por lo tanto, trabajar con un modelo sin reducciones y determinar, a través del mismo, las condiciones óptimas que generen el máximo de productividad de lípidos acumulados en las células del cultivo, ya que su extracción es uno de los productos más prometedores derivados de las microalgas por su potencial en la generación de biocombustibles.

Analizar los perfiles óptimos de productividad de biomasa no es una condición suficiente

y necesaria para obtener un incremento en la productividad de lípidos, es decir que existe una relación no lineal entre estas dos variables [41]. De hecho, es ampliamente conocido que los lípidos son acumulados en las células como resultado de factores que limitan el crecimiento [38]. Por lo tanto es necesario extender los alcances y contribuciones de los estudios actuales que en su mayoría se han desarrollado en torno a la optimización de cantidad de biomasa, a pesar de ser justificados con base en el aprovechamiento del potencial sustentable que tiene la utilización de lípidos [3, 15, 22]. En [38], sin embargo, se logran obtener perfiles óptimos en la producción tanto de biomasa como de lípidos en cultivos heterotróficos.

### 1.3. Solución Propuesta

Se pretende extraer un modelo matemáticamente factible y que sea capaz de capturar las dinámicas que permitan tener una descripción confiable del sistema, lo suficientemente adecuadas para que los resultados obtenidos puedan servir en las prácticas de laboratorio bajo ambientes controlados. El objetivo es el de hallar soluciones óptimas, mediante un enfoque inicial en estado estacionario y posteriormente a través del Principio del Máximo de Pontryagin.

La solución en términos generales es trabajar con un modelo que considere efectos de luz, el crecimiento de biomasa, respiración y producción de lípidos, mediante la consideración dos entradas de control, las mismas que en las observaciones experimentales determinan el crecimiento y reproducción celular, es decir, la cantidad de luz que capta el bioreactor y la cantidad de nutrientes que se le suministra al mismo. Por otro lado, con el objetivo de ofrecer información del sistema en ambientes semicontrolados se considerará la luz natural como la fuente de fotones incidente en el bioreactor.

La justificación de trabajar con dichas consideraciones en un solo modelo radica en la necesidad de aterrizar la idea de un bioproceso de células fotoautotrofas que optimicen éste subproducto el cual tiene propiedades potenciales para la generación de biocombustible, ya que es un trabajo que no se ha logrado actualmente.

Se busca entonces, conocer las condiciones que permitirán maximizar la productividad de lípidos en un bioreactor operado en modo mixotrófico. Para ello se analizará y considerará un modelo que incluya efectos de luz (gradientes, fotoinhibición y adaptación),

crecimiento de biomasa, producción de lípidos y respiración , con el objetivo de analizar las condiciones de estrés metabólico que den lugar a dicha optimización del bioproceso.

## 1.4. Alcances y Contribuciones

Se retoman modelos previamente construidos con el objetivo de trabajar con aquel que capture los fenómenos observados y cuyas soluciones se ajusten adecuadamente a los datos experimentales extraídos de distintos cultivos en fotobioreactores. El modelo resultante es representado mediante un sistema de cinco ecuaciones diferenciales no lineales en cuyo caso la determinación de soluciones analíticas resulta complicada, por lo que se emplean métodos numéricos para analizar el comportamiento de dicho sistema sin la necesidad de realizar reducciones basadas en suposiciones que eliminen el carácter realista del mismo. Esto como respuesta al déficit de análisis de optimización en modelos no reducidos y con el objetivo de aportar información valiosa en la literatura disponible para pruebas experimentales.

Además, para fines comparativos, también se ha considerado realizar el análisis y optimización de un modelo reducido y así conocer las diferencias cuantitativas de los resultados que se logran obtener con los ambos modelos.

Cabe mencionar que son reconocidos los fenómenos no capturados por el modelo elegido y que han sido observados en laboratorio y reportados, algunos como la sincronización celular, las dinámicas a nivel molecular de las vías metabólicas de señalización [16], la digestión anaeróbica [35], gradientes de distribución de nutrientes, salinidad y temperatura [33], entre otros. Sin embargo, es una primer valiosa aproximación a la aplicación de herramientas formales para la obtención de perfiles óptimos de operación.

El presente trabajo es bajo un enfoque puramente teórico basado en las condiciones necesarias que impone la teoría del cálculo variacional. La relevancia y utilidad práctica que se logra con los resultados aquí mostrados son susceptibles a ser comparados mediante otros enfoques de optimización tales como aquellos que ofrecen los métodos computacionales heurísticos. En este sentido, la validación práctica de los resultados obtenidos no se contempla en el presente trabajo.

Es necesario puntualizar que el término *reducido* contiene una carga teórica conceptual

la cual queda fuera del alcance de la presente investigación, por lo que en este contexto se emplea para hacer notar que, partiendo de una propuesta inicial de una representación matemática que surge de la observación y el empleo de datos experimentales, se aplican suposiciones que si bien reducen la complejidad del sistema, llegan a restarle valor descriptivo y predictivo al proceso de modelado inicialmente desarrollado y, en consecuencia, a la capacidad del mismo para ser empleado en la práctica.

## 1.5. Objetivos

A continuación se enlistan sistemáticamente los objetivos particulares que se fueron cumpliendo a lo largo del proceso de investigación:

- Revisar los modelos matemáticos disponibles en la literatura actual que describen la dinámica de las cantidades de biomasa y acumulación de lípidos neutros en fotobioreactores, con el fin de elegir un modelo que contenga las características biológicas y matemáticas deseadas.
- Validar teóricamente el modelo a través de simulaciones y análisis de su comportamiento asintótico y del fenómeno de histéresis reportado en las observaciones experimentales.
- Implementar el método de Multiplicadores de Lagrange para la optimización estática basada en dos entradas de control (tasa de dilución de nutrientes e intensidad luminosa).
- Implementar el método del Gradiente basado en el Principio del Máximo de Pontriagyn para la optimización dinámica, considerando las mismas entradas de control mencionadas en el punto anterior.
- Obtener el perfil de control óptimo de tasas de dilución de nutrientes, considerando al bioreactor expuesto a radiación luminosa en ciclos de noche-día, con el interés de ofrecer un panorama más amplio a los posibles estudios experimentales que deriven del presente trabajo.
- A partir del modelo antes mencionado proponer una reducción del mismo, analizarlo bajo los mismos enfoques y realizar las comparaciones, con bases interpretativas, en los resultados obtenidos para ambos modelos.

## 1.6. Organización del trabajo

En el Capítulo 1 se ha ofrecido una panorama general del presente trabajo, a través de la justificación de la temática estudiada en el contexto de sostenibilidad ambiental, los problemas actuales de los enfoques matemáticos empleados en el bioproceso, las soluciones propuestas, los alcances y las aportaciones que se logran a través de dichas soluciones considerando el estado del arte, así como los objetivos particulares que se siguieron a lo largo del proceso de investigación. Considerando lo anterior, se logra una breve pero íntegra introducción y permite conocer el rumbo que toma el resto del escrito ya que aborda un tópico de gran amplitud y analizado a través múltiples disciplinas, filosofías y formalismos.

Por su parte, en el Capítulo 2 se muestra el estado del arte del modelado matemático y optimización de bioreactores, especificando las referencias sobre las cuales se realizó la elección del modelo del que se dispone en capítulos posteriores. Además se presenta el Marco Teórico (herramientas matemáticas) sobre el cual esta basada la propuesta del presente trabajo,

El Capítulo 3 se presenta la justificación matemática-biológica, el proceso de modelado seguido en las principales referencias, la descripción textual de los términos involucrados en el sistema de ecuaciones diferenciales y el análisis asintótico y de histéresis del modelo empleado.

Finalmente en el Capítulo 4 se muestran los resultados de la optimización tanto estática como dinámica, las respectivas interpretaciones biológicas, la comparación del modelo completo con su versión reducida y las propuestas sobre trabajos futuros en el área.

---

## Capítulo 2

# Estado del Arte y Marco Teórico

En el presente capítulo se realiza una breve pero completa exposición del estado de arte considerando revisiones que examinan los numerosos estudios y análisis realizados hasta la actualidad, desde un enfoque matemático, de las dinámicas de crecimiento y síntesis de subproductos de diversas microalgas en bioreactores. El proceso en cuestión es complejo por su naturaleza y se encuentra afectado por múltiples variables y parámetros físicos, químicos y biológicos tanto locales como medioambientales difíciles de modelar, por lo que, tanto el modelado como la optimización resultan problemas aún no resueltos y cuya aplicación práctica debe ser reconocida como un tema lejos de ser dominado en el mundo de la ciencia.

También se presenta una breve explicación de las herramientas matemáticas aplicadas al modelo que se utiliza en el presente trabajo, las cuales se basan, por un lado, en métodos numéricos empleados para la determinación de soluciones óptimas de sistemas tanto estáticos como dinámicos y, por el otro, en la teoría del análisis asintótico de sistemas dinámicos.

### 2.1. Modelos Matemáticos de Cultivos de Microalgas

Los modelos matemáticos aplicados al bioproceso en cuestión pueden ser clasificados en dos grupos de acuerdo a sus métodos de construcción, cuyo formalismo puede variar [1]. El primero engloba los modelos teóricos mecanísticos basados en leyes físico-químicas y en el conocimiento sobre la estructura interna y el funcionamiento del sistema, por ejemplo los flujos de masa y energía, los cuales proveen predicciones del comportamiento de las variables de interés y describen las relaciones causales que subyacen dichos comportamientos. La segunda categoría hace referencia a aquellos modelos experimentales no mecanísticos

los cuales ofrecen, sin observar el interior del sistema, una descripción de la respuesta observada a estímulos controlados. Los modelos cinéticos basados en datos experimentales mediante análisis de regresión pertenecen a esta última categoría, descritos esencialmente a través del formalismo de ecuaciones diferenciales.

En el presente trabajo se considera un método híbrido de modelado, construido mediante métodos tanto mecanísticos como experimentales, tal que permite conocer en cierto grado la estructura interna del sistema, es decir la dinámica intracelular de los organismos, posibilitando descripciones y predicciones del comportamiento poblacional a través de herramientas analíticas y simulaciones de las respuestas generadas por distintos perfiles en las entradas de control.

Las primeras descripciones matemáticas mediante modelos cinéticos se realizaron considerando la dinámica de poblaciones bajo condiciones de espacio y recursos ilimitados, posteriormente se consideró un sólo factor de crecimiento (nutrientes o intensidad luminosa), finalmente tomando en cuenta múltiples factores [11]. En [3, 31, 42] se presenta un breve recorrido del estado del arte de los modelos descriptivos dinámicos de microalgas representando los efectos de radiación luminosa y de nutrientes disponibles en el bioreactor. En [24] se muestra una revisión y valoración crítica de múltiples enfoques de modelado en los cuales capturan los efectos de luz y temperatura en el crecimiento de algas para cultivos en espacios abiertos no controlados.

La microalga *Nannochloropsis* es conocida por tener un elevado contenido de lípidos, en [44] se realiza una revisión de los modelos desarrollados para dicho organismo, en los que se analizan las tasas de crecimiento, la productividad de biomasa y la de lípidos, a partir del cual es posible observar la necesidad de llevar a cabo un análisis matemático riguroso y formal del proceso de optimización de productividad de lípidos a través de ecuaciones logísticas que describan el crecimiento de biomasa.

Una de las técnicas de modelado comúnmente empleadas para la representación del crecimiento de microalgas en foto-bioreactores es el modelo de Monod, el cual es útil por la simplicidad de su estructura matemática. Sin embargo, dicho modelo es incapaz de describir adecuadamente la dinámica del bioproceso, por esta razón se emplea otro modelo conocido como "*modelo de Droop*" (MD) que reproduce de manera más realista la dinámica del crecimiento de biomasa, el cual la relaciona con la concentración intracelular de nutrientes

[8, 17, 18]. El MD queda expresado de la siguiente manera:

$$\begin{cases} \dot{s} = Ds_{in} - \rho(s)x - Ds \\ \dot{q} = \rho(s) - \mu(q)q \\ \dot{x} = \mu(q)x - Dx \end{cases} \quad (2.1)$$

donde  $x$  representa la cantidad de biomasa,  $s$  la cantidad de nutrientes disueltos en la solución del bioreactor (sustrato) donde tiene lugar el ciclo celular,  $q$  la cantidad de nutriente intracelular,  $D$  la tasa de dilución,  $s_{in}$  la concentración del nutriente suministrado. Además la tasa de absorción de nutrientes  $\rho(s)$  es expresada por la siguiente función Michaelis-Menten:

$$\rho(s) = \bar{\rho} \frac{s}{s + K_s} \quad (2.2)$$

para la cual  $K_s$  es la constante de saturación media para el consumo de sustrato y  $\bar{\rho}$  la tasa de consumo máximo. La tasa de crecimiento  $\mu(q)$  se basa en la función de Droop expresada como:

$$\mu(q) = \tilde{\mu} \left( 1 - \frac{Q_o}{q} \right) \quad (2.3)$$

el parámetro  $\tilde{\mu}$  se define como la tasa de crecimiento para cantidades ilimitadas de recursos, mientras  $Q_o$  es la cantidad mínima de nutriente intracelular para la cual no es posible un aumento en la cantidad de biomasa.

Los estados que el modelo presenta ignoran la importancia que ciertos fenómenos tienen en las tasas de crecimiento de la biomasa celular. Si bien reproduce la dinámica en que las microalgas interactúan en un ambiente con características constantes, es importante captar la influencia de variables y fenómenos tales como la sincronización celular, la foto-adaptación, la producción de lípidos y otros subproductos de interés, muerte celular, digestión celular anaeróbica, la foto-inhibición, gradientes de iluminación, temperatura, pH y salinidad, entre otros.

Una extensión al MD se presenta en [3], donde se capta la dinámica de foto-adaptación, respiración, gradientes de luz, foto-inhibición y crecimiento al estrés metabólico. Dicho modelo se expresa como sigue:

$$\begin{cases} \dot{s} = (s_{in} - s)D - \rho(s, q)x \\ \dot{q} = \rho(s, q) - \mu(I_o, q, \xi)q \\ \dot{x} = (\mu(I_o, q, \xi) - D - R)x \\ \dot{I}^* = \varrho\mu(I_o, q, \xi)(\bar{I} - I^*) \end{cases} \quad (2.4)$$

la especificación de las variables y constantes que aparecen en 2.4 se presenta a detalle en el próximo Capítulo durante la descripción del modelo seleccionado. El sistema 2.4 resulta de ser de los más completos y adecuados para un tratamiento matemático y supone que la concentración espacial tanto de nutrientes como de biomasa es homogénea en todo el volumen del bioreactor y que la incidencia de fotones tiene una distribución espacial dada por una función exponencial basada en propiedades ópticas de las microalgas. Sin embargo no representa de manera explícita la producción de lípidos, la sincronización celular, la digestión anaeróbica, las posibles variaciones de temperatura, de pH o de salinidad, cuya consideración ayudaría a mejorar el entendimiento y la utilidad de las soluciones óptimas en la productividad para los cultivos de microalgas.

Por otro lado, un modelo que considera la síntesis de lípidos bajo el efecto de perfiles de disposición de nutrientes que generan estrés metabólico celular se presenta en [13]. Sin embargo no logra captar efectos de foto-inhibición, foto-aclimatación [29] o gradientes de luz en el volumen del reactor, efectos que a su vez alteran la dinámica de la síntesis de clorofila en las células. El modelo considera una red metabólica simplificada, descrita a nivel macromolecular en la microalga *Isochrysis aff. galbana* para un cultivo continuo, representada por dos ecuaciones diferenciales por medio de las cuales predice la movilización y acumulación de carbono intracelular. Dicho modelo se expresa por el siguiente conjunto de ecuaciones diferenciales:

$$\begin{cases} \dot{s} = Ds_{in} - \rho(s)x - Ds \\ \dot{q} = \rho(s) - \mu(q)q \\ \dot{x} = \mu(q)x - Dx \\ \dot{q}_l = (\beta q - q_l)\mu(q) - \phi\rho(s) \\ \dot{q}_f = -q_f\mu(q) + (\alpha + \phi)\rho(s) \end{cases} \quad (2.5)$$

Notar en (2.5) que las primeras tres ecuaciones son exactamente el MD, las últimas dos son ecuaciones semi-acopladas al MD (su dinámica no afecta al MD, pero si lo contrario) y representan la dinámica de almacenamiento de lípidos ( $\dot{q}_l$ ) y de azúcares ( $\dot{q}_f$  indirecta-

mente) en el bioreactor.

## 2.2. Optimización de Biomasa y Subproductos generados en Cultivos de Microalgas basada en el Modelado Matemático

Con el objetivo de hacer el mejor uso de los recursos empleados en el bioproceso, es necesario aplicar métodos de optimización que permitan determinar los perfiles óptimos a seguir en las entradas de control del sistema, tales que maximicen la productividad de biomasa y subproductos de interés. Se han empleado múltiples métodos para estos fines, considerando condiciones necesarias o suficientes que determinan los valores óptimos en las variables de control, maximizando por un lado las tasas de crecimiento y reproducción celular y por el otro la cantidad de subproductos generados por dichos organismos cuya finalidad práctica se ha mencionado anteriormente. A continuación se describen algunos de los trabajos revisados para el desarrollo de la presente investigación.

En [6] se obtiene una expresión matemática que determina las tasas máximas de crecimiento de biomasa en fotobioreactores en estado estacionario, proponiendo dicha expresión con base en la observación de Hartmanis acerca del valor práctico de los resultados teóricos en sistemas complejos. Sobre la misma línea de procesos de optimización en estado estacionario se encuentra el trabajo [22] basado en un modelo similar al que se considera en el presente trabajo.

La entrada de control considerada en [25, 27] se encuentra representada por la variable de radiación luminosa incidente en el bioreactor. En [25] se establece como objetivo la maximización de la tasa de crecimiento específica, el modelo se basa en una descripción mecanística que resulta en un sistema bilineal de segundo orden, empleando un enfoque de perturbación singular mediante un análisis de horizonte de tiempo infinito. Por otro lado, en [27] se propone una ley de control de realimentación de estado para la optimización en línea del crecimiento de microalgas en presencia de perturbaciones no medibles, sobre un modelo reducido a dinámicas lentas. En [14] se aplica un controlador adaptable que maximiza la producción de biomasa, analizando estabilidad del sistema en lazo cerrado mediante funciones de Lyapunov, sobre un modelo reducido que considera únicamente la dinámica de la biomasa bajo efectos de luz.

En [38] se maximizan funciones de productividad de lípidos y biomasa en cultivos heterotróficos para obtener perfiles de alimentación óptimos, mediante un controlador adaptable en lazo cerrado para la estimación de parámetros del modelo, empleando el algoritmo MADS (por sus siglas en inglés) implementado en un toolbox de Matlab. Enfoques distintos que emplean herramientas heurísticas para optimización de procesos son aplicadas en trabajos como [28] en el que se utiliza un algoritmo genético y de búsqueda de patrones para calcular los perfiles óptimos de control. Un interesante análisis [10], propone una función de costos de producción de biomasa en un sistema de cultivos abiertos, cuyo propósito es minimizarla, bajo restricciones de modelos de balance de masa-energía y de la cinética de crecimiento, a través de algoritmos de parametrización del vector de control.

Algunos de los trabajos que parten del MD se presentan en [15, 22]. Particularmente en [22] se considera un modelo macroscópico simplificado de un fotobioreactor basado en el MD, para el cual las entradas de control representan la tasa de dilución y la concentración de nutrientes suministrados al sustrato, el análisis de maximización de biomasa se lleva a cabo en estado estacionario y se demuestra la alcanzabilidad del equilibrio óptimo. Por otro lado, en [15] se determina analíticamente una ley de control que maximiza la productividad de biomasa considerando perfiles de radiación luminosa de día-noche y la tasa de dilución del nutriente (nitrógeno inorgánico) como variable de control.

Debido a que en capítulos posteriores se analiza un modelo modificado al propuesto en [15, 22], a continuación se lleva a cabo una breve descripción que servirá de base para visibilizar las diferencias de enfoques y los alcances de la presente investigación respecto al estado del arte.

En [22] se modifica el MD incluyendo efectos de atenuación de la luz sobre el crecimiento celular en un foto-bioreactor de geometría plana con una fuente de luz que incide de manera perpendicular a la superficie del reactor, además del efecto de la respiración y un mecanismo de regulación en el consumo celular de nutrientes. Para dicho sistema se define una dinámica de productividad  $P$ , la cual es la función a optimizar, en términos de la biomasa  $X$ , la cantidad de nutriente intracelular  $q$  y la intensidad luminosa incidente en la superficie  $I_o$ . Dadas  $I_o$  y  $q$  (constantes), se calcula analíticamente el valor óptimo de biomasa  $X_{opt}$  que maximiza  $P$ . Posteriormente se calcula la cantidad óptima de nutriente intracelular  $q_{opt}$ , la cual puede ser controlada ajustando los valores de las entradas de control representadas por la tasa de flujo de entrada del nutriente (tasa de dilución)  $D(t)$  y la concentración del mismo  $s_{in}(t)$ . Finalmente se calculan los valores de dichas entradas de

control que maximizan la productividad y se analiza la alcanzabilidad del sistema. Es importante notar que todo el análisis antes mencionado se lleva a cabo en estado estacionario.

Por otro lado en [15] se lleva a cabo un trabajo más completo desde el punto de vista de optimización, a costa de trabajar con un modelo menos realista y que ignora muchos de los fenómenos antes mencionados. Dicho modelo representa el crecimiento de biomasa con el modelo de Monod, considerando la respiración celular y, en el término  $\nu$  (que representa la tasa de crecimiento) los efectos de atenuación de luz. Importante mencionar que el análisis se realiza con una fuente de luz natural, por lo tanto es un término que capta los cambios de iluminación durante el día y la noche, la cual se modela como la función pulso. La suposición fuerte en el modelo es que la cantidad de nutrientes siempre se encuentra disponible en condiciones de máximo crecimiento, lo cual implica que la concentración de sustrato se mantiene en valores máximos constantes. Se agrega una simplificación adicional sustituyendo una función que es creciente y acotada, por otra función de las mismas características de mayor simplicidad matemática, con lo cual el sistema se reduce a una sola ecuación diferencial ordinaria. Finalmente se lleva a cabo analíticamente la optimización dinámica de la productividad a través del Principio del Máximo de Pontryagin.

### 2.3. Métodos Asintóticos y de Optimización Estática y Dinámica

En la presente sección se tiene por objetivo presentar brevemente los resultados que permiten analizar la estabilidad global del modelo, para posteriormente demostrar que el sistema de ecuaciones captura el fenómeno de histéresis observado experimentalmente. Además incluye los métodos empleados para determinar los valores óptimos de las variables de control tales que maximizan, estática y dinámicamente, las funciones de productividad tanto de biomasa como de lípidos neutros.

- Los métodos asintóticos serán la base teórica para analizar estabilidad global del sistema, resultado útil para demostrar que las variables de estado se encuentran acotadas implícitamente en el modelo, dichos métodos se basan en resultados como [7, 39]:

*Lema 1:*

Sean  $y(t)$  y  $z(t)$  funciones que satisfacen las siguientes igualdades:

$$\begin{aligned} y'(t) &= F(t, y(t)) \\ z'(t) &= G(t, z(t)) \end{aligned} \tag{2.6}$$

con  $t \in [a, b]$ . Si, además,  $y(a) = z(a)$  y  $F(t, u) \leq G(t, u)$  para toda  $t$  y  $u$  apropiadas, entonces  $y(t) \leq z(t)$  para toda  $t \in [a, b]$ .

En este sentido, no es necesario determinar la solución explícita  $y(t)$ , el problema se reduce a encontrar funciones  $G(t, u)$  que satisfacen la desigualdad. Cabe mencionar que el Lema 1 también se cumple con la desigualdad opuesta ( $G(t, u) \leq F(t, u)$ ).

- La optimización en estado estacionario se logra igualando las derivadas a cero y, a partir del sistema de ecuaciones algebraicas resultantes, dado que se cuenta con restricciones impuestas implícitamente en el modelado sobre las variables de estado, se plantea el siguiente problema:

Se desea hallar el vector  $z \in D \subseteq R^n$  tal que minimice una función de costo  $J(z)$  sujeta a las restricciones  $f(z) = 0$ , es decir

$$z^* = \arg \min_{z \in D} J(z) \text{ tal que } f(z) = 0 \tag{2.7}$$

donde  $J : R^n \rightarrow R$ ,  $f : R^n \rightarrow R^m$  son funciones dadas y  $m \leq n$ .

Para ello se emplea el método de Multiplicadores de Lagrange [4, 36] el cual determina las siguientes condiciones necesarias de primer orden:

$$\begin{aligned} f(z) &= 0, \\ \frac{\partial L}{\partial z}(z) &= 0 \end{aligned} \tag{2.8}$$

donde  $L \triangleq J + \lambda^T f$ ,  $\lambda \in R^n$  son las constantes conocidas como multiplicadores de Lagrange. Por lo tanto, el problema se reduce en hallar los valores de dichas con-

stantes, tales que satisfagan las condiciones 3.20.

- El problema de optimización dinámica se plantea como sigue [40]:

*Se desea hallar un perfil del vector de control  $u(t)$  que propicie que el sistema con condiciones iniciales*

$$\begin{aligned} \dot{x}(t) &= f(x(t), u(t), t), \\ x(t_0) &= x_0 \end{aligned} \tag{2.9}$$

*siga una trayectoria admisible, tal que minimice un funcional de costo  $J(u)$  sobre todos los controles admisibles. Donde  $x \in D \subseteq \mathbb{R}^n$ ,  $u \in U \subseteq \mathbb{R}^m$  y  $J : \mathbb{R}^m \rightarrow \mathbb{R}$ ,  $f : \mathbb{R}^{n+m} \rightarrow \mathbb{R}^n$  son funciones dadas.*

La determinación de dichas trayectorias óptimas se lleva a cabo mediante el Método del Gradiente del Máximo Descenso basado en las condiciones necesarias que impone el Principio del Máximo de Pontryagin. Por lo tanto, bajo el enfoque del cálculo de variaciones, se puede presentar a través de las siguientes ecuaciones [37]:

$$\left\{ \begin{aligned} \dot{x}_{opt}(t) &= \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial p} = f(x_{opt}, u_{opt}, t) \\ \dot{p}_{opt}(t) &= -\frac{\partial \mathcal{H}}{\partial x} = -\left[ \frac{\partial f}{\partial x}(x_{opt}, u_{opt}, t) \right]^T p_{opt}(t) - \frac{\partial \mathcal{L}}{\partial x}(x_{opt}, u_{opt}, t) \\ \mathbf{0} &= \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial u} = \left[ \frac{\partial f}{\partial u}(x_{opt}, u_{opt}, t) \right]^T p_{opt}(t) + \frac{\partial \mathcal{L}}{\partial u}(x_{opt}, u_{opt}, t) \\ x_{opt}(t_i) &= x_o \\ p_{opt}(t_f) &= \frac{\partial h}{\partial x}(x_{opt}(t_f)) \end{aligned} \right. \tag{2.10}$$

donde  $\mathcal{H}(x(t), u(t), p(t), t) \triangleq \mathcal{L}(x(t), u(t), t) + p^T(t)[f(x(t), u(t), t)]$  es el Hamiltoniano,  $\mathcal{L}$  el Lagrangiano y  $p(t)$  el vector de coestados.

La aplicación del método del Gradiente requiere proponer una trayectoria nominal de control  $u^{(i)}(t), t \in [t_i, t_f]$  y se emplea para resolver las ecuaciones diferenciales  $\dot{x}^{(i)}(t)$  y  $\dot{p}^{(i)}(t)$  definidas en (2.10) con las condiciones de frontera  $x^{(i)}(t_i) = x_o$  y

$p^{(i)}(t_f) = \frac{\partial h}{\partial x}(x^{(i)}(t_f))$ . Si la trayectoria de control propuesta satisface  $\left\| \frac{\partial \mathcal{H}^{(i)}}{\partial u} \right\| \leq \delta$  ( $\delta$  es una constante positiva predefinida) entonces  $u^{(i)}$ ,  $x^{(i)}$  y  $p^{(i)}$  son extremos relativos. De lo contrario se genera una nueva trayectoria  $u^{(i+1)}(t) = u^{(i)}(t) - \tau \frac{\partial \mathcal{H}^{(i)}}{\partial u}(t)$  ( $\tau$  es el tamaño del paso que aproxima la trayectoria  $u(t)$  hacia  $u_{opt}(t)$ ) generándose de esta manera el proceso iterativo, donde además  $\left\| \frac{\partial \mathcal{H}^{(i)}}{\partial u} \right\|^2 \triangleq \int_{t_i}^{t_f} \left[ \frac{\partial \mathcal{H}^{(i)}}{\partial u}(t) \right]^T \left[ \frac{\partial \mathcal{H}^{(i)}}{\partial u}(t) \right] dt$ .

La implementación y los resultados de los métodos arriba mencionados, en el sistema en cuestión, se describen a detalle en los próximos Capítulos, así como los valores de los parámetros y la definición detallada de cada función.

---

## Capítulo 3

# Metodología y Análisis

Hasta ahora se han presentado, en la sección del estado del arte, algunas expresiones matemáticas que capturan las dinámicas de interés en los cultivos de microalgas, se ha prestado especial atención en estos modelos ya que cuentan con el mismo enfoque y formalismo que el modelo estudiado en el presente trabajo. En las próximas secciones se describe brevemente el proceso de modelado, se presenta el sistema de ecuaciones que lo representan, se menciona la justificación de haber elegido dicho modelo y se describe textualmente cada término involucrado.

Posteriormente se ofrece un análisis de estabilidad a través de métodos asintóticos descritos en el Capítulo anterior, con el objetivo de emplear los resultados en los requerimientos del formalismo aplicado para los métodos de optimización.

Finalmente se presentan las secciones de Histéresis y Optimización en las que, por un lado, se especifican las ecuaciones que han sido simuladas para demostrar el comportamiento histerético capturado por el modelo propuesto y observado experimentalmente, y por otro aquellas empleadas en la programación del método del Gradiente y en la determinación de los multiplicadores de Lagrange con base en las expresiones (2.10) y (3.20).

### 3.1. Descripción del Modelo y Justificación

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los principales objetivos de la presente investigación alude a la aportación de resultados útiles en la práctica de laboratorio. Por lo tanto se desea trabajar con un modelo que considere la intensidad luminosa y el suministro de nutrientes (tasas de dilución) como variables capaces de modificar el comportamiento

del sistema, ya que son de fácil acceso en un sentido práctico. El resto de las variables que afectan las dinámicas del bioproceso se pueden considerar constantes ya que se opera bajo ambientes controlados. Debido que se trabaja con organismos fotosintéticos, es de gran importancia considerar los efectos de luz tales como la fotoaclimatación, la fotoinhibición, las dinámicas de producción de biomoléculas que controlan el proceso de fotosíntesis (clorofila) y los gradientes de iluminación a través del volumen del bioreactor.

Se requiere además de un modelo que se base en las ecuaciones de Droop ya que es mediante estas expresiones que se captura el realismo de las dinámicas de crecimiento. Dicho modelo debe ser matemáticamente factible de manera tal que el cálculo de los perfiles de optimización no resulte inaccesible mediante equipos de cómputo con procesadores estándar. El formalismo de ecuaciones diferenciales ordinarias resulta conveniente ya que el número de variables de interés no es elevado, los parámetros se encuentran bien ajustados en reportes previos y las muchas herramientas tanto analíticas como numéricas justifican su utilización.

El resto de las consideraciones han sido evaluadas de acuerdo al potencial práctico de modelos disponibles en la literatura actual. Considerando lo anterior como una serie de requerimientos iniciales que justifican la elección del modelo que a continuación se presenta, se retoma y describe el proceso de modelado desarrollado en [3] cuyo resultado es una modificación al modelo de [13], el cual es a su vez una extensión del MD y el sistema de ecuaciones que lo describe mostrado en (2.5), incluye la dinámica de acumulación de carbohidratos y lípidos neutros bajo efectos de limitación de nutrientes (nitrógeno). El modelo resultante se describe a continuación:

El efecto de fotoinhibición se modela a partir de curvas características obtenidas de experimentos realizados en la cepa *Skeletononema costatum* y se incluye en la expresión (2.3), describiendo la tasa de crecimiento celular mediante la cinética de Haldane como:

$$\mu(q, I) = \tilde{\mu} \frac{I}{I + K_{sI} + I^2/K_{iI}} \left(1 - \frac{Q_o}{q}\right) \quad (3.1)$$

el coeficiente de inhibición  $K_{iI}$  y el parámetro  $K_{sI}$  definen la intensidad luminosa  $I_{opt} = \sqrt{K_{iI}K_{sI}}$ , para la cual  $\mu(q, I)/\left(1 - \frac{Q_o}{q}\right)$  presenta un máximo dadas las curvas características.

La distribución luminosa en un bioreactor, suponiendo la incidencia perpendicular de

una fuente sobre una superficie de geometría plana, puede representarse mediante una función exponencial decreciente Beer-Lambert como

$$I(z) = I_o e^{-\xi z} \quad (3.2)$$

donde  $\xi = aChl + bx + c$  es el término de atenuación luminosa (depende linealmente del contenido de clorofila  $Chl$  y de la cantidad de biomasa  $x$ , ya que  $a, b, c$  son valores constantes),  $I_o$  es la cantidad luminosa incidente en la superficie y  $z$  la distancia de la superficie al fondo del bioreactor de profundidad  $L$ .

La concentración de clorofila es proporcional a la cantidad de proteínas de la célula (por lo tanto al término  $xq$ ) y se encuentra relacionada con la cantidad de luz a la cual las células son fotoaclimatadas ( $I^*$ ). Explícitamente queda expresada como

$$Chl = \gamma(I^*)xq \quad (3.3)$$

donde

$$\gamma(I^*) = \gamma_{max} \frac{K_{I^*}}{I^* + K_{I^*}} \quad (3.4)$$

$\gamma_{max}$  es la máxima proporcionalidad alcanzable de clorofila respecto a la cantidad de nutriente intracelular y  $K_{I^*}$  una constante de inhibición.

Debido a que la fotoaclimatación no es instantánea, ante cambios de luz su dinámica se representa como:

$$\dot{I}^* = \varrho\mu(q, I)(\bar{I} - I^*) \quad (3.5)$$

donde

$$\bar{I} = \frac{I_o}{L} \int_0^L e^{-\xi z} dz = \frac{I_o - I(L)}{\ln\left(\frac{I_o}{I(L)}\right)} \quad (3.6)$$

es la radiación luminosa promedio que incide en el cultivo y  $\varrho$  la tasa de fotoaclimatación.

La fotoaclimatación también tiene efectos directos en la tasa de crecimiento, dicho fenómeno puede ser captado en el modelo mediante la siguiente expresión:

$$K_{sI} = K_{sI}^* \frac{x}{ChI} \quad (3.7)$$

donde  $K_{sI}^*$  es una constante de saturación media.

El consumo de nutrientes presentes en el sustrato tiene un límite máximo para el cual las células quedan saturadas, por lo tanto la expresión (2.2) se modifica de la siguiente manera

$$\rho(s, q) = \bar{\rho} \frac{s}{s + K_s} \left(1 - \frac{q}{Q_I}\right) \quad (3.8)$$

En [19] se muestra que una manera precisa de estimar la tasa de crecimiento celular en un fotobioreactor consiste en calcular el valor promedio de  $\mu(q, I)$  a través de la distribución luminosa en el cultivo. El cálculo consiste en realizar un simple cambio de variable y el resultado, se expresa a continuación:

$$\mu(I_o, q, \xi) = \tilde{\mu} \frac{2K_{iI}}{\lambda\sqrt{\Delta}} \arctan \left( \frac{I_o(1 - e^{-\lambda})\sqrt{\Delta}}{2I_o^2 e^{-\lambda} + I_o(1 + e^{-\lambda})K_{iI} + 2K_{iI}K_{sI}} \right) \left(1 - \frac{Q_o}{q}\right) \quad (3.9)$$

donde  $\Delta = 4K_{iI}K_{sI} - K_{iI}^2$  y  $\lambda = \xi L$ .

Las ecuaciones (3.1)-(3.9) fueron obtenidas de [3] y el resultado se expresa en (2.4), donde restaría especificar que  $R$  representa la tasa de respiración y muerte celular, cuyo término sugiere que es proporcional a la cantidad de biomasa.

Por otro lado, resulta útil la estructura del modelo (2.5), que describe la dinámica de flujo y acumulación de lípidos neutros y carbohidratos en un par de ecuaciones semi-acopladas al MD, donde  $\beta$  y  $\phi$  representan los coeficientes de síntesis y movilización de ácidos grasos respectivamente,  $\alpha$  el coeficiente de síntesis de proteínas,  $q_l$  la cantidad de lípidos acumulados y  $q_f$  cantidades de materia de carbono funcional acumulada (incluye carbohidratos).

Se observa que, debido al formalismo, las escalas espacio-temporales de representación, las variables y los parámetros que incorporan, es posible añadir las últimas dos ecuaciones de (2.5) al sistema (2.4). Tal observación ha sido analizada en [12], efectuando ligeras modificaciones a algunas expresiones que resultan del proceso de modelado antes descrito, a

saber, el término de respiración y muerte celular, la tasa de absorción de nutrientes, los parámetros del modelo y el término de atenuación luminosa.

El modelo resultante que considera todos los efectos antes mencionados, mostrado en [12], queda representado por el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{cases} \dot{s} = (s_{in} - s)D - \rho(s, q)x \\ \dot{q} = \rho(s, q) - (\mu(I_o, q, \xi) - R)q \\ \dot{x} = (\mu(I_o, q, \xi) - D - R)x \\ \dot{q}_l = (\beta q - q_l)\mu(I_o, q, \xi) - \phi\rho(s, q) + Rq_l \\ \dot{I}^* = \varrho\mu(I_o, q, \xi)(\bar{I} - I^*) \end{cases} \quad (3.10)$$

donde  $R = r_o + r_1\rho(s, I, q)$  ( $\rho$  se modifica en términos de  $I_o$ ),  $\xi = aChl + c$ . En el presente trabajo, a diferencia de [12], se considera  $\rho$  y  $\mu$  tal como se presenta en las ecuaciones (3.1) y (3.8) respectivamente (con  $I = \bar{I}$ ), con el objetivo de disminuir el costo computacional sin perder el detalle descriptivo. Otra diferencia notable es que en la ecuación de  $\dot{q}_l$ , el término  $\mu$ , no se retoma directamente del modelo de Droop.

Los parámetros son calculados por medio de la función *Isqnonlin* de Matlab [12], la cual utiliza un algoritmo que minimiza un criterio de error cuadrático entre los datos experimentales y el modelo, donde las condiciones iniciales se proponen con los valores reportados en [3] y [13].

Para tener un mejor entendimiento de (3.10) y de las interpretaciones de los resultados de optimización, a continuación se describen de manera textual los términos involucrados en el sistema:

La ecuación para  $\dot{s}$  describe los cambios de concentración de nutriente extracelular del sustrato. El primer término del lado derecho representa la diferencia entre las concentraciones de entrada y salida (ya que se trata de un cultivo continuo) dando como resultado las concentraciones netas dentro del bioreactor. El segundo término determina la pérdida de  $s$  debido al consumo celular de nutrientes.

La segunda ecuación determina los cambios en las cantidades de nutriente intracelular como resultado del consumo de sustrato. El primer término representa la incorporación de

nutriente al interior de la célula, el factor multiplicativo  $x$ , que aparece en la ecuación de  $\dot{s}$ , no se incluye debido a que  $q$  es medida como una concentración relativa a  $x$ . El segundo término representa la reducción de  $q$  debido a la tasa neta de crecimiento (diferencia de  $\mu$  y  $R$ ) de biomasa (cuando incrementa la biomasa, la cantidad de nutriente intracelular disminuye a menos que sea compensada por la concentración o la tasa de dilución de dicho nutriente).

En la expresión del lado derecho a  $\dot{x}$ , el término  $\mu$  es la tasa de crecimiento por unidad de biomasa, al ser multiplicada por  $x$  define la tasa de crecimiento del total de biomasa en el reactor. Por la forma que tiene (3.1), sugiere que si  $q$  estuviese por debajo de  $Q_o$  entonces no existe suficiente nutriente intracelular que permita la subsistencia del organismo, dicho efecto no es considerado en el modelo. El segundo término describe las cantidades de biomasa que salen del bioreactor. El tercero incluye la muerte y respiración celular que influyen de manera negativa al aumento de  $x$ .

La ecuación para  $\dot{q}_l$  proviene de un análisis de balances de masa de [13] en el que, en términos muy generales, considera que el nutriente consumido por las microalgas, cuyo flujo es gobernado por reacciones macroscópicas, es inicialmente incorporado en un compartimento de almacenamiento de carbohidratos. En una segunda fase, estos carbohidratos se emplean para sintetizar en paralelo tanto elementos funcionales de la biomasa (proteínas y ácidos nucleicos) como lípidos neutros, que a su vez son almacenados para también producir eventualmente elementos funcionales. La reacción que incluye la síntesis de lípidos neutros es descrita por  $\beta\mu qx$ , el cual es el primer término (relativo a  $x$ ) del lado derecho de la ecuación. Si se agrupa  $(\mu - R)q_l$ , entonces el término representa la reducción de  $q_l$  debido a la tasa neta de crecimiento de biomasa (tal como en el caso de  $q$ ). Además, el término  $\phi\rho$  determina las pérdidas de lípidos cuando son usados para sintetizar elementos funcionales.

La última de las ecuaciones representa la dinámica de una variable conceptual que describe la radiación a la cual las células se fotoaclimatan [21], fenómeno que permite al organismo adaptar la síntesis de clorofila a la cantidad de luz que reciben. En cultivos de baja densidad (sin gradientes de luz) y en estado estacionario  $I^* = \bar{I}$ . Sin embargo considerando variaciones de luz a través del volumen del bioreactor y cambios en la radiación incidente, ya que la adaptación no es instantánea, se genera un retardo en la influencia que tiene sobre la síntesis de clorofila, tal dinámica es capturada mediante  $\bar{I} - I^*$ , siendo

proporcional a la tasa de crecimiento lo cual asegura que la adaptación no se lleve acabo en ausencia de luz, ver (3.1).

### 3.2. Estabilidad Asintótica

En la presente sección se muestran las cotas superiores e inferiores que determinan la estabilidad del sistema (3.10), siempre que la condición inicial de cada variable de estado se encuentre en el intervalo especificado. Estas propiedades, además de demostrar que el sistema no se desestabiliza cuando  $t \rightarrow \infty$  para valores iniciales adecuados, sirven para la aplicación del método de optimización sin necesidad de agregar restricciones en el mismo. Considerando  $s(t), q(t)$  positivos para  $t \geq 0$ , entonces en dicho intervalo se cumplen las siguientes propiedades:

**Propiedad 1:**

$$q(o)e^{-r_o t} \leq q(t) \leq q(0)e^{-\gamma_2 t} + \frac{\gamma_1}{\gamma_2}[1 - e^{-\gamma_2 t}] \quad (3.11)$$

donde  $\gamma_1 = \tilde{\mu}Q_o + \bar{\rho}$ ,  $\gamma_2 = \tilde{\mu} - r_o - r_1\bar{\rho}$ , con  $Q_o \leq q(0) \leq Q_l$

*Demostración:*

Sustituyendo (3.8), (3.1) y  $R = r_o + r_1\rho(s, q)$  en  $\dot{q} = \rho - (\mu - R)q$ , donde además: como  $K_s > 0 \Rightarrow 0 < \frac{s}{s + K_s} < 1$ , por definición  $0 < \frac{s}{s + K_s}(1 - \frac{q}{Q_l}) < 1$  y por construcción se tiene que  $0 \leq \frac{I}{I + K_{sI} + I^2/K_{iI}} \leq 1$ , entonces

$$r_o q \leq \dot{q} \leq \gamma_1 - \gamma_2 q$$

La versión lineal del Lema 1 (enunciado en el Capítulo 2) sugiere que  $G(t, u) = u'(t) = -Cu(t) + D$ , con  $C, D$  constantes. Resolviendo esta ecuación diferencial se conocen las cotas de  $y(t)$ .

Considerando lo anterior, para determinar la cota superior se considera que  $G(t, u) = \gamma_1 - \gamma_2 u$ , en el caso de la inferior  $G(t, u) = r_o u$ . ■

**Propiedad 2:**

$$x(o)e^{-(D+r_o+r_1\bar{\rho})t} \leq x(t) \leq x(0)e^{-(D+r_o+r_1\bar{\rho}-\tilde{\mu})t} \quad (3.12)$$

con  $x(0) > 0$ .

*Demostración:*

Partiendo de  $\dot{x} = [\mu - D - R]x$  y retomando las herramientas de la demostración anterior, se tiene que

$$-(D + r_o + r_1\bar{\rho})x \leq \dot{x} \leq (\tilde{\mu} - D - r_o - r_1\bar{\rho})x$$

mediante el mismo razonamiento de la versión lineal del Lema 1 se determinan las cotas. ■

**Propiedad 3:**

$$e^{-\tau t + (\theta/r_o)(1-e^{-r_o t})} [s(0) - Ds_{in} \frac{1}{\tau}] + Ds_{in} \frac{1}{\tau} \leq s(t) \leq s(o)e^{-Dt} + s_{in}[1 - e^{-Dt}] \quad (3.13)$$

donde  $\tau = D + \frac{\bar{\rho}}{K_s} x_{max}$ ,  $\theta = \frac{\bar{\rho}q(0)}{K_s Q_l} x_{max}$ , con  $s(0) > 0$ .

*Demostración:*

Considerando  $\dot{s} = (s_{in} - s)D - \rho x$ , entonces:  $\dot{s} \leq Ds_{in} - Ds$ . Por otro lado, del caso anterior se considera  $x_{max} = \text{máx}[x(0)e^{-(D+r_o+r_1\bar{\rho}-\tilde{\mu})t}]$ , sustituyendo (3.8) y retomando la propiedad 1, se tiene que

$$\dot{s} \geq Ds_{in} - Ds - \bar{\rho} \frac{s}{K_s} \left(1 - \frac{q(0)e^{-r_o t}}{Q_l}\right) x_{max}.$$

considerando la versión lineal del Lema 1, ahora  $u'(t)$  es una ecuación diferencial de coeficientes variables donde el factor integrante esta dado por  $e^{\tau t + (\theta/r_o)e^{-r_o t}}$ . ■

**Propiedad 4:**

$$q_l(0)e^{-(\tilde{\mu}-r_o)t} - \frac{\phi\bar{\rho}}{\tilde{\mu}-r_o} [1 - e^{-(\tilde{\mu}-r_o)t}] \leq q_l(t) \leq \frac{S_3}{S_1} + \frac{S_2}{S_1 - S_2} e^{-\gamma_2 t} + e^{-s_1 t} \left( q_l(0) - \frac{S_3}{S_1} - \frac{S_2}{S_1 - \gamma_2} \right) \quad (3.14)$$

donde  $\varsigma_1 = -(r_1\bar{\rho} + r_0)$ ,  $\varsigma_2 = \beta\tilde{\mu}q(0) - \frac{\beta\tilde{\mu}\gamma_1}{\gamma_2}$ ,  $\varsigma_3 = \frac{\beta\tilde{\mu}\gamma_1}{\gamma_2}$ , con  $q_l(0) > 0$

*Demostración:*

Debido a que  $\dot{q}_l = (\beta q - q_l)\mu - \phi\rho + Rq_l$  y considerando la propiedad 1 se llega a

$$-(\tilde{\mu} - r_o)q_l - \phi\bar{\rho} \leq \dot{s} \leq -\varsigma_1 q_l + \varsigma_2 e^{\gamma_2 t} + \varsigma_3$$

en este caso el factor integrante esta dado por  $e^{\varsigma_1 t}$ . ■

**Propiedad 5:**

$$(-a\gamma_m K_I^* x(0)e^{-(D+2r_o+r_1\bar{\rho})t} q(0) - K_I^* c) \frac{1}{c} \leq I^*(t) \leq I^*(0)e^{-\varrho\tilde{\mu}t} + I_o[1 - e^{-\varrho\tilde{\mu}t}] \quad (3.15)$$

con  $I^*(0) > 0$ .

*Demostración:*

Se considera (3.2), por lo que  $0 \leq \frac{I(z)}{I_o} \leq 1 \Rightarrow \ln(I(z)/I_o) \leq 0$  y como  $z > 0 \Rightarrow \xi \geq 0$ .

Ya que  $\xi = aChl + c \Rightarrow I^* \geq (-a\gamma_m K_I^* xq - K_I^* c) \frac{1}{c}$ , finalmente se emplean las propiedades 1 y 2 para determinar esta cota inferior.

Por otro lado  $\dot{I}^* = \varrho\mu(\bar{I} - I^*)$ , donde de (3.6) se sabe que  $\bar{I} = I_o[\frac{1 - e^\lambda}{\lambda}]$ . La función  $w(\lambda) = \frac{1 - e^\lambda}{\lambda}$  no está definida en  $\lambda = 0$  pero  $\lim_{\lambda \rightarrow 0} w = 1$ , además cuando  $\lambda \rightarrow \infty$ ,  $w \rightarrow 0$  y como  $\lambda = \xi L$  y  $\xi \geq 0$  entonces  $0 < w < 1$ , finalmente

$$\dot{I}^* \leq \varrho\tilde{\mu}I_o - \varrho\tilde{\mu}I^*$$

y se aplica el mismo razonamiento que en las demostraciones anteriores. ■

Adicionalmente, si se considera (3.3), (3.4) y (3.7) entonces  $K_{sI} = K_{sI}^* \frac{I^* + K_I^*}{\gamma_m K_I^* q}$ , como de la propiedad 5 se sabe que  $I^* \geq -K_I^* \Rightarrow K_{sI} \geq 0$ , y se verifica que  $0 \leq \frac{I^* + K_I^*}{I + K_{sI} + I^2/K_{iI}} \leq 1$ .

### 3.3. Histéresis

De acuerdo a [13] existe un comportamiento de histéresis, observado a nivel experimental, entre las cantidades de nutriente intracelular y lípidos neutros acumulados. Esto es, dado un estado estacionario  $B$  del organismo el cual mantiene una cantidad constante de nutriente intracelular y de lípidos, al modificarse las condiciones de operación en su medio, se determina una dinámica de transición tendiente a otro estado estacionario  $C$  en el cual se mantienen otras cantidades de nutrientes y lípidos, dichas transiciones producen trayectorias distintas al cambiar de un punto de equilibrio a otro, generadas en el plano  $q - q_l$  cuyas variables se encuentran parametrizadas por la variable  $t$ .

El fenómeno descrito en el párrafo anterior se logra capturar mediante el modelo (3.10), para demostrarlo, a continuación se describe el desarrollo matemático y la expresión resultante empleada en las simulaciones que revelan dicho comportamiento.

Considerando el sistema de ecuaciones (3.10), en estado estacionario, la cantidad de lípidos neutros acumulados esta dada por <sup>1</sup>:

$$q_l^* = \frac{((\phi - \beta)\mu - \phi R)q^*}{R - \mu} \quad (3.16)$$

Se propone la variable  $y = q_l - q_l^*$ , donde  $q_l^*$  se especifica en (3.16) y  $y$  representa la distancia entre la cantidad de lípido y su valor en estado estacionario. Por lo tanto:

$$\dot{y} = \dot{q}_l + \phi \dot{q} + \frac{\beta}{(R - \mu)^2} \left[ (R - \mu)(\dot{\mu}q + \mu \dot{q}) - (\mu q)(\dot{R} - \dot{\mu}) \right] \quad (3.17)$$

Además de (3.10) se sabe que  $\dot{q}_l = (\beta q - q_l)\mu - \phi \dot{q} - \phi \mu q + \phi R q + R q_l$ , con lo cual (3.17) se convierte en:

$$\dot{y} = (R - \mu)y + \frac{\beta}{(R - \mu)^2} \left[ (R - \mu)(\dot{\mu}q + \mu \dot{q}) - (\mu q)(\dot{R} - \dot{\mu}) \right] \quad (3.18)$$

La expresión (3.18) se utiliza para la simulación, y los resultados, junto con un breve análisis, se incluyen en el siguiente Capítulo.

---

<sup>1</sup>El superíndice  $\star$  representará de aquí en adelante los valores en estado estacionario, en el caso de la variable conceptual de fotoaclimatación se escribirá como  $I^{\star\star}$ .

### 3.4. Optimización Estática y Dinámica

La productividad de un compuesto (biomasa, lípidos, pigmentos, etc) es la cantidad de dicho compuesto producido en un bioreactor por unidad de tiempo. En la presente investigación se desea determinar las condiciones de operación de un bioreactor para maximizar la productividad de lípidos y biomasa a través de las entradas de control incluidas en el modelo (3.10), determinadas por la tasa de dilución  $D(t)$  y la cantidad de luz incidente en el bioreactor  $I_o(t)$ .

La intensidad luminosa tiene un efecto directo en la tasa de crecimiento, pero no en el consumo de nutrientes. Además la tasa de crecimiento incrementa con ciertas cantidades de nutriente intracelular (estrés metabólico), y decrementa con cantidades grandes, es decir existe una no linealidad entre las variables de cantidad-concentración de nutrientes y crecimiento de la biomasa. Un comportamiento no lineal cualitativamente semejante se presenta con distintas intensidades luminosas que inciden en el reactor (fotoinhibición).

La cantidad de nutriente consumido por las células (dependiente de su disposición en el sustrato) afecta la síntesis de proteínas y material intracelular que controla el proceso de fotosíntesis. La concentración intracelular de pigmentos (principalmente clorofila) afecta la absorción luminosa celular y con ello la distribución de luz en el bioreactor, lo cual implica que para elevados niveles de biomasa, la luz es fuertemente atenuada y disminuye el crecimiento [3], [21].

Por lo tanto las variables de biomasa, incidencia-gradientes de luz, concentración intracelular de nutrientes-pigmentos y el resto descritas en la Sección 3.1, se encuentran relacionadas de manera no lineal, conformando una complejidad de interacciones para la cual es necesario hallar una solución óptima a través de herramientas matemáticas como las mostradas en la Sección 2.3. Más aún, tal como se menciona en la Sección 1.2, hallar las condiciones óptimas de operación que maximizan la productividad de biomasa, no implica que los mismos perfiles en las variables de control determinen los máximos de productividad de lípidos.

A continuación se presentan las expresiones matemáticas empleadas en las simulaciones, las cuales resuelven el problema de optimización con base en los métodos descritos en el Capítulo 2.

Comenzando por un análisis en estado estacionario, se definen las funciones de costo las cuales permiten conocer la producción de biomasa ( $P_x$ ) y lípidos neutros ( $P_l$ ) generados en el bioreactor por unidad de tiempo, se encuentran determinadas por la diferencia entre la tasa de crecimiento  $\mu$  (término que representa el proceso de biosíntesis y reproducción/crecimiento celular) y la tasa de respiración celular  $R$  (el cual determina el costo de biosíntesis y la muerte celular), siendo proporcionales a la cantidad de biomasa y de lípido intracelular como:

$$\begin{aligned} P_x &= (\mu - R)x \\ P_l &= (\mu - R)xq_l \end{aligned} \quad (3.19)$$

notar que en el equilibrio  $\mu - R = D$ .

Se agrega además la siguiente notación:  $X = [s, q, x, I^*, q_l]^T$  y  $u = [D, I_o]^T$  representando al vector de estado y de control, respectivamente. Donde  $\dot{X} = f(X, u, t)$  cuyas restricciones se encuentran implícitas en el modelo y  $D \in [0, 1]$ ,  $I_o \in [0, I_{o_{max}}]$ .

En consecuencia y retomando las herramientas mostradas en el Capítulo 2, el problema de optimización estática queda formalmente planteado como sigue: Se desea maximizar  $P_x(X, u, t)$  y  $P_l(X, u, t)$  determinadas por (3.19) sujeto a las restricciones  $f(X, u, t) = 0$ .

Para lograrlo se requiere encontrar  $(X, u)$  tales que maximicen  $P_x$  y  $P_l$ , las condiciones necesarias de primer orden para encontrar puntos estacionarios en el presente problema con restricciones de igualdad quedan determinadas como sigue

$$\begin{aligned} f(X, u) &= 0, \\ \frac{\partial H}{\partial X}(X, u) &= 0 \end{aligned} \quad (3.20)$$

donde  $H \triangleq -P + \lambda^T f$ .  $P$  es cualquiera de las funciones de productividad definidas en (3.19) y  $\lambda^T = [\lambda_1, \dots, \lambda_5]$  son los multiplicadores de Lagrange.

Al igualar las derivadas del sistema (3.10) a cero, las ecuaciones algebraicas resultantes representan un sistema no lineal para el cual no existe solución analítica, por lo tanto con el objetivo de averiguar cuál es el comportamiento en estado estacionario del sistema para entradas de control admisibles constantes, se ha empleado un método numérico (descrito en el Capítulo 4) que permita conocer las soluciones aproximadas para distintos valores de  $u$

logrando obtener superficies determinadas por los ejes coordenados  $(D, I_o, P_x)$  y  $(D, I_o, P_l)$ .

Ahora se considera un modelo simplificado con el objetivo de obtener información útil del sistema en casos en los cuales es posible ignorar los efectos de gradientes de luz en los cultivos, es decir aquellos que presenten una baja densidad celular, que la síntesis de clorofila sea despreciable comparada con la cantidad de biomasa o que la geometría del bioreactor sea de baja profundidad, lo cual implica que la intensidad luminosa en el volumen del bioreactor es homogénea. Por lo tanto (3.10) se reduce al considerar que  $\bar{I} = I_o$  y  $\bar{\mu}(\bar{I}) = \bar{\mu}(I_o)$ .

Las ecuaciones en estado estacionario del modelo reducido quedan como:

$$\begin{cases} I^{**} = I_o \\ \Delta_1 q^{*2} - \Delta_2 q^* + \Delta_3 = 0 \\ s^* = \frac{Dq^*Q_lK_s}{\bar{\rho}(Q_l - q^*) - Dq^*Q_l} \\ x^* = \frac{S_{in} - s^*}{q^*} \\ q_l^* = \frac{((\phi - \beta)\mu - \phi R)q^*}{R - \mu} \end{cases} \quad (3.21)$$

donde

$$\begin{aligned} \Delta_1 &= (r_1 D \gamma_m K_I^* I_o)(I_o + K_{iI}) \\ \Delta_2 &= \tilde{\mu} I_o \gamma_m K_I^* K_{iI} - (D + r_o)(I_o^2 \gamma_m K_I^* + I_o \gamma_m K_I^* K_{iI}) - (r_1 D K_{sI}^* K_{iI})(I^{**} + K_I^*) \\ \Delta_3 &= (I^{**} K_{sI}^* K_{iI} + K_I^* K_{sI}^* K_{iI})(D + r_o) + \tilde{\mu} I_o \gamma_m K_I^* K_{iI} Q_o \\ \mu &= \frac{(\tilde{\mu} I_o \gamma_m K_I^* K_{iI})(q^* - Q_o)}{I_o^2 \gamma_m K_I^* q^* + I_o \gamma_m K_I^* q^* K_{iI} + (I^{**} + K_I^*) K_{sI}^* K_{iI}} \end{aligned}$$

El conjunto de ecuaciones (3.21) se simulan con el objetivo de obtener una representación gráfica de una superficie que describa el comportamiento de la productividad para distintos valores en las variables de control.

Por otro lado, para abordar el problema de optimización dinámica, el enfoque del cálculo de variaciones para la solución de problemas de control óptimo determina las condiciones necesarias que conducen a un problema no lineal de dos valores en la frontera cruzados. En el presente trabajo se aplica uno de los métodos numéricos usados para encontrar las funciones de control  $u(t)$  óptimas, asociadas a un determinado conjunto de condiciones ini-

ciales, conocido como el método del Gradiente o del Máximo Descenso que permite hallar la solución a dicho problema.

Como se ha demostrado con anterioridad, el modelo determina las cotas de las variables de estado dado un conjunto adecuado de condiciones iniciales. Además, sin pérdida de generalidad para el análisis del sistema y debido a que en la práctica existen tiempos límites de cultivo, se considera que  $t_f$  es fijo cuyas unidades están dadas en *días*. Se observa que los valores finales de las variables de estado no se encuentran restringidos, es decir  $X(t_f)$  es libre. Finalmente que, como ya se mencionó antes,  $D \in [0, 1]$ ,  $I_o \in [0, I_{omax}]$ .

Ya que los estados transitorios del sistema tienen largas duraciones, será necesario, para llevar a cabo el proceso de optimización dinámica, la modificación de las funciones de productividad definidas en (3.19). Si se desea conocer un perfil de control que permita optimizar el proceso en cortos periodos de tiempo (por ejemplo por día) el sistema no alcanzará el equilibrio, por lo tanto las funciones de productividad quedan redefinidas como los siguientes valores promedio:

$$\begin{aligned} P_x &= \frac{1}{t_f - t_i} \int_{t_i}^{t_f} (\mu(\cdot, t) - R(\cdot, t))x(t)dt \\ P_l &= \frac{1}{t_f - t_i} \int_{t_i}^{t_f} (\mu(\cdot, t) - R(\cdot, t))x(t)q_l(t)dt \end{aligned} \quad (3.22)$$

donde, en términos generales  $P = \left(\frac{1}{t_f - t_i}\right) \int \mathcal{L}(X(t), u(t), t)dt$  puede ser tanto  $P_x$  como  $P_l$  y  $\mathcal{L}$  es el Lagrangiano.

Por lo anterior es posible resumir el problema de optimización dinámica como sigue: Se desea determinar un control admisible  $u_{opt}(t)$  tal que produzca que el sistema (3.10) siga una trayectoria admisible  $X_{opt}$ , maximizando las funciones de productividad  $P_x$  y  $P_l$  definidas en (3.22).

El planteamiento anterior, de acuerdo a lo mostrado en el Capítulo 2, modifica (2.10) al siguiente conjunto de expresiones:

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{X}_{opt}(t) = \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial p} = f(X_{opt}, u_{opt}, t) \\ \dot{p}_{opt}(t) = -\frac{\partial \mathcal{H}}{\partial x} = -\left[ \frac{\partial f}{\partial x}(X_{opt}, u_{opt}, t) \right]^T p_{opt}(t) - \frac{\partial \mathcal{L}}{\partial x}(X_{opt}, u_{opt}, t) \\ \mathbf{0} = \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial u} = \left[ \frac{\partial f}{\partial u}(X_{opt}, u_{opt}, t) \right]^T p_{opt}(t) + \frac{\partial \mathcal{L}}{\partial u}(X_{opt}, u_{opt}, t) \\ X_{opt}(t_i) = X_o \\ p_{opt}(t_f) = \mathbf{0} \end{array} \right. \quad (3.23)$$

donde  $\mathcal{H}(X(t), u(t), t) \triangleq -\mathcal{L}(X(t), u(t), t) + p^T(t)[f(X(t), u(t), t)]$  es el Hamiltoniano.

El vector de coestados y el Hamiltoniano quedarían expresados explícitamente como

$$\begin{aligned} p &= [p_1, p_2, p_3, p_4, p_5]^T \\ \mathcal{H} &= -\mathcal{L} + p_1 \dot{s} + p_2 \dot{q} + p_3 \dot{x} + p_4 \dot{I}^* + p_5 \dot{q}_l \end{aligned} \quad (3.24)$$

donde:  $\mathcal{L} = (\mu - R)x$  si se desea optimizar la producción de biomasa y  $\mathcal{L} = (\mu - R)xq_l$  la de lípidos.

La metodología de aplicación del conjunto de ecuaciones (3.23) se ha descrito en la Sección 2.3 y los resultados se muestran en el Capítulo 4.

---

## Capítulo 4

# Resultados y Conclusiones

El propósito principal del presente trabajo se enfoca a la aportación de material teórico, a través de representaciones matemáticas basadas en investigaciones previas, que resulte de utilidad en experimentos de laboratorio donde existen condiciones controladas de operación. En este sentido, en el Capítulo 3 se ha presentado y analizado un modelo que, de acuerdo al estado de las investigaciones actuales, es uno de los más completos disponibles en la literatura ya que involucra una gran cantidad de fenómenos acoplados entre si y una estructura matemática factible para su análisis. Por lo tanto fue necesario desarrollar un análisis de estabilidad que justifique su utilidad práctica y el nivel de realismo que es capaz de capturar. Con la misma intención, se ha calculado la dinámica de las variables que tienen por objetivo mostrar el fenómeno de histéresis observado experimentalmente en reportes previos, lo cual abona a la validación teórica que justifica la utilización del modelo propuesto. Finalmente se han empleado un conjunto de metodologías que permiten optimizar el proceso para maximizar las cantidades de biomasa y de lípidos neutros acumulados en el bioreactor.

De acuerdo a lo mencionado en el párrafo anterior, en el presente capítulo se muestran los resultados de simulaciones basadas en las metodologías y análisis hasta ahora desarrollados, de manera tal que ofrecen perfiles de operación cuantitativos que generarán resultados óptimos en la práctica. La validación experimental de los resultados aquí mostrados queda fuera del alcance del presente trabajo, sin embargo también ayudan a entender cualitativamente las dinámicas y relaciones no lineales y no intuitivas entre las variables involucradas, lo cual resultaría imposible mediante simples observaciones que pueden dar lugar a conclusiones reduccionistas y erróneas.

## 4.1. Histéresis

En esta sección se verifica, mediante una simulación, que efectivamente el modelo captura el comportamiento de histéresis reportado en los datos experimentales mostrados en [13]. Para ello se retoma lo descrito en la Sección 3.3 y se consideran las siguientes funciones de control:

$$I_o(t) = 800 \quad , \quad 0 \leq t \leq 90$$

$$D(t) = \begin{cases} 0,5 & , \quad 0 \leq t \leq 30 , 60 \leq t \leq 90 \\ 1 & , \quad 30 < t < 60 \end{cases} \quad (4.1)$$

con las que se genera una dinámica en la cantidad de nutriente intracelular y de lípidos neutros  $q$  y  $q_l$ , respectivamente, como se muestra en la Figura 4.1. A los valores que se encuentran en equilibrio dentro del intervalo de tiempo  $0 \leq t \leq 30$  (estado estacionario  $B$ ) se les nombra  $q_1$  y  $q_{l1}$ , del mismo modo aquellos en equilibrio en  $30 < t < 60$  (estado estacionario  $C$ ) se denotan como  $q_2$  y  $q_{l2}$ , es decir  $q_2 < q_1$  y  $q_{l2} < q_{l1}$ .

El objetivo de la simulación es alcanzar el estado estacionario  $B$ , seguido de  $C$  y posteriormente  $B$ , durante intervalos de tiempo visibles, mediante (4.1), es decir generar transiciones bidireccionales entre dos estados de equilibrio del sistema.

En la Figura 4.1 se muestran los resultados de simulación <sup>1</sup> de la dinámica impuesta por 3.18 y 4.1, donde las condiciones iniciales son  $X_o = [1,2, 0,1, 28, 1000, 0,12]$ .

Para la primera transición, a partir de las gráficas y de (3.18) se tienen las siguientes observaciones: como  $y$ , por definición, es cero en estado estacionario y permanece no negativo durante el transitorio generado por el primer cambio en  $D$  (de 0,5 a 1) y además  $R - \mu < 0$  en  $0 \leq t \leq 90$ , entonces el segundo término del lado derecho de (3.18) es positivo, todo esto implica que  $q_l$  se encuentra por arriba de la línea de equilibrio  $q_l^*(q^*)$  (línea punteada en la Figura 4.1). Tal comportamiento determina la trayectoria del punto B al punto C. La correspondiente trayectoria de A a B es el transitorio desde las condiciones iniciales dadas hasta el primer equilibrio alcanzado.

Observaciones análogas se tienen de la trayectoria del punto C al punto B mostrada en la Figura 4.1 y que determinan el comportamiento de histéresis antes mencionado. Cabe

<sup>1</sup>Todas las simulaciones se han llevado a cabo en el software Matlab R2009a

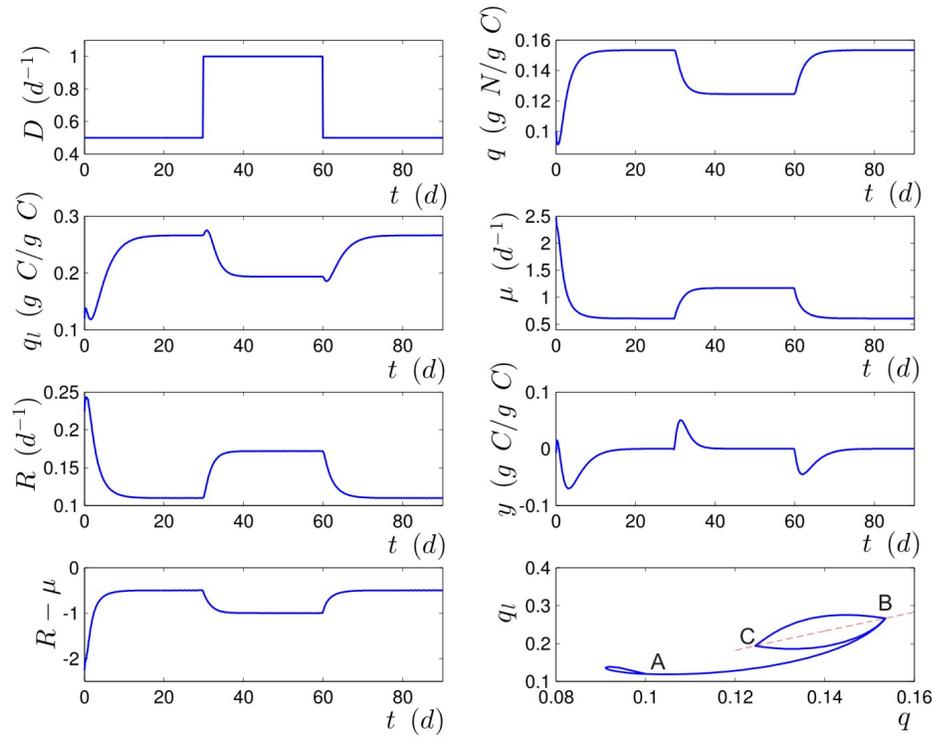


Figura 4.1: Comportamiento de Histéresis

mencionar que, de acuerdo las gráficas de la Figura 4.1, cuando incrementa la cantidad de nutriente intracelular disminuye la tasa de crecimiento lo cual podría resultar contradictorio, sin embargo esta dinámica explica el fenómeno de crecimiento ante estrés metabólico. La relación entre  $q$ ,  $q_i$  y  $R$  queda en completo acuerdo con lo establecido en el modelo (3.10).

## 4.2. Optimización Estática

Un análisis de optimización estática aplicado a un sistema dinámico permite conocer los extremos relativos y/o globales en un espacio determinado por el conjunto de puntos de equilibrio de un sistema cuando se considera que los estados transitorios no tienen influencia en dichos puntos de equilibrio. Con el objetivo de extraer tal información del comportamiento del sistema, se ha aplicado un método de optimización estática al modelo (3.10), descrito en la Sección 3.4, basado en las funciones de productividad (3.19) y en las

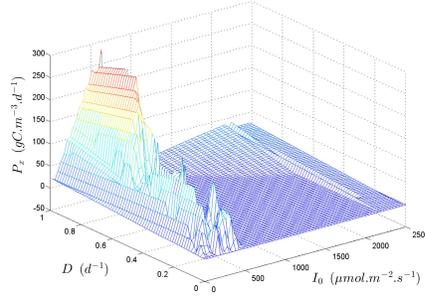
condiciones necesarias impuestas por (3.20).

Se comienza por determinar el sistema que resulta al igualar las derivadas a cero, y tal como se mencionó antes, las ecuaciones algebraicas obtenidas representan un sistema no lineal para el cual no existe solución cerrada. Por lo tanto se implementó un método numérico conocido como Método de Región de Confianza, a través de la función *fsolve* de Matlab, en el que se resuelve el sistema de ecuaciones no lineales  $F_i(x) = 0, i = 1, 2, \dots, n$  (donde  $n$  es el tamaño del vector  $x$ ) minimizando la suma de cuadrados de las incógnitas, si el resultado de la suma es cero entonces  $x$  es tal que  $F(x) = 0$ . Las condiciones iniciales empleadas en el algoritmo son:  $[s_o, q_o, x_o, I_o^*, q_{I_o}, D_o, I_{oo}] = [1, 2, 0, 12, 28, 100, 0, 1]$ . Los valores de los parámetros constantes del modelo (3.10), han sido extraídos de [12] y se muestran en la Tabla 4.1.

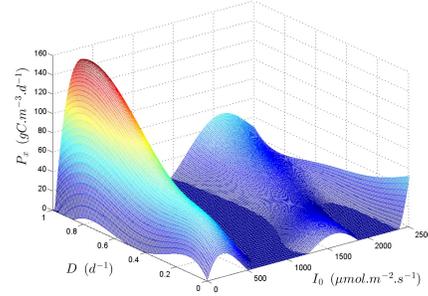
Parámetro	Valor [Unidades]
$\tilde{\mu}$	7.8 [ $d^{-1}$ ]
$Q_o$	0.046 [ $gN/gC$ ]
$K_{sI}^*$	1.4 [ $\mu mol/(m^2 s)$ ]
$K_{iI}$	295 [ $\mu mol/(m^2 s)$ ]
$\bar{\rho}$	0.33 [ $gN/(gC \cdot d)$ ]
$K_s$	0.0012 [ $gN/m^3$ ]
$Q_l$	0.2 [ $gN/gC$ ]
$r_o$	0.01 [ $d^{-1}$ ]
$r_1$	1.3 [ $gC/gN$ ]
$\beta$	3.8 [ $gC/gN$ ]
$\phi$	2.9 [ $gC/gN$ ]
$\gamma_{max}$	0.9 [ $gChl/gN$ ]
$\varrho$	1
$K_I^*$	93 [ $\mu mol/(m^2 s)$ ]
$a$	16.2 [ $m^2/gChl$ ]
$c$	0.087 [ $m^{-1}$ ]
$s_{in}$	20 [ $gN/m^3$ ]

Tabla 4.1: Parámetros del modelo

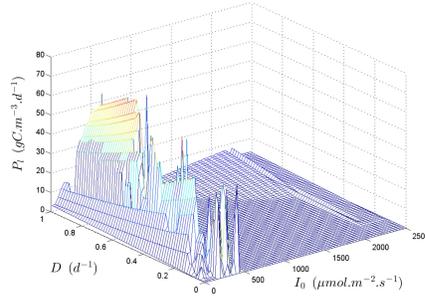
Dicho método permite conocer las soluciones aproximadas para distintos valores de  $u$  constantes, logrando obtener superficies determinadas por los ejes coordenados  $(D, I_o, P_x)$  y  $(D, I_o, P_l)$  cuyas gráficas se muestran en la Figura 4.2, a través de las cuales es posible observar los fenómenos no lineales de fotoinhibición celular y de estrés generado por exceso de nutrientes, además que ofrece un punto de partida para simulaciones posteriores.



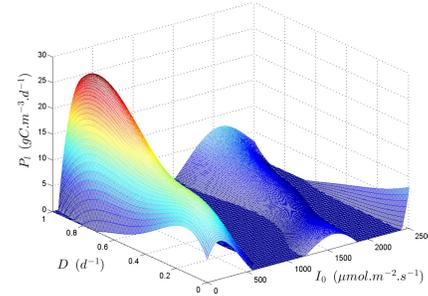
(a) Productividad Biomasa



(b) Productividad Biomasa ajustada mediante *Curve Fitting Toolbox* de Matlab



(c) Productividad Lípidos



(d) Productividad Lípidos ajustada mediante *Curve Fitting Toolbox* de Matlab

Figura 4.2: Superficies de Productividad en estado estacionario para  $D \in [0, 1]$ ,  $I_o \in [0, 2500]$

Se procede a calcular los extremos relativos de acuerdo al planteamiento del problema enunciado en la Sección 3.4, por medio del cual resulta un sistema de 12 ecuaciones algebraicas no lineales (3.20) con 12 incógnitas  $(X, u, \lambda)$ . La solución a dicho sistema se obtuvo mediante el método numérico descrito anteriormente. Se observó que al variar las condiciones iniciales los resultados difieren en gran medida, lo cual sugiere que las superficies no cumplen con condiciones de regularidad, por lo tanto los resultados mostrados en la Figura 4.2 resultan útiles para determinar las condiciones iniciales tanto en las variables de estado como en las de control y así hallar el máximo en cada una de las funciones de productividad. La Tabla 4.2 (en la columna de "Modelo Completo") muestra los valores óptimos estacionarios de los controles que determinan el valor especificado de productividad, así como los resultados obtenidos para los valores que toman los Multiplicadores de Lagrange.

Los valores mostrados en la Tabla 4.2 estan en acuerdo con las superficies mostradas en la Figura 4.2.

	Modelo Completo		Modelo Simplificado	
	$P_x = 261.889$	$P_l = 140.203$	$P_x = 160.882$	$P_l = 30.7865$
$s_o$	2.3	1.70	1.2	1.2
$q_o$	0.1358	0.09	0.1	0.1
$x_o$	35	38	28	28
$I_o^*$	2.5	2	250	250
$q_{l_o}$	.22	1.15	0.12	0.12
$D_{l_o}$	.78	0.35	0.6	0.6
$I_{o_o}$	535	423	500	500
$\lambda_{1o} - \lambda_{5o}$	0	0	0	0
$s$	21.3415	16.99139	0.0004485	0.0296
$q$	0.0639	0.0618	0.062	0.1227
$x$	345.1358	379.8901	161.17215	162.7107
$I^*$	118.6912	1.4844	85.4037	892.8571
$q_l$	0.363	1.10896	0.0772	0.1896
$D$	0.7588	0.8328	0.9982	0.9982
$I_o$	432.5462	422.3784	85.4037	892.8571
$\lambda_1$	0.0047	0.2035	0.2858	0.0274
$\lambda_2$	4.3943	-0.0903	2.2245	37.1882
$\lambda_3$	-0.0018	-0.4078	-0.5098	-0.2228
$\lambda_4$	0.000422	0.00054627	0.0497	-0.0015
$\lambda_5$	.0.000025	-0.0288	0.00016852	18.7159

Tabla 4.2: Parámetros obtenidos en la optimización en estado estacionario de ambos modelos

Ahora se considera el modelo simplificado, también descrito en la Sección 3.4, expresado en (3.21). En este caso el sistema tiene soluciones exactas las cuales se han graficado para los mismos valores de las entradas de control que en el caso no reducido, cuyos resultados se muestran en la Figura 4.3.

Se puede observar que al ignorar el efecto de gradientes de luz a través del volumen del bioreactor las superficies son suaves lo cual facilita la determinación de los extremos de las funciones productividad. Para las gráficas mostradas en las Figuras 4.2 y 4.3 los máximos se encuentra en regiones distintas regiones, lo cual demuestra la importancia de tomar en cuenta dicho fenómeno en cultivos de alta densidad. Cabe mencionar que en

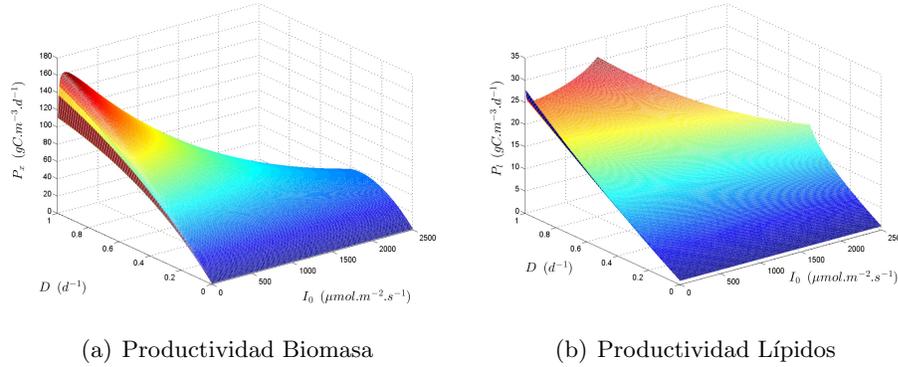


Figura 4.3: Superficies de Productividad en estado estacionario para  $D \in [0, 1]$ ,  $I_o \in [0, 2500]$  del sistema reducido

una región del dominio (en una vecindad alrededor del punto  $(1, 2500)$ ) de la superficie mostrada la Figura 4.3.b del modelo simplificado, el valor de  $P_l$  se indefinice en el conjunto de los números reales, por lo tanto dicha versión del modelo (3.10) es incapaz de capturar el comportamiento del bioproceso.

Finalmente se optimiza el sistema reducido mediante el método de multiplicadores de Lagrange con las condiciones planteadas en (3.20) y las funciones de productividad en (3.19). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.2.

Comparando valores máximos de productividad obtenida en ambas versiones del modelo (ver Tabla 4.2), muestran que cuando se considera una distribución de luz homogénea lo cual implica la operación de cultivos de baja densidad celular o reactores de baja profundidad, se obtiene como resultado una menor productividad tanto de biomasa como de acumulación de lípidos.

### 4.3. Optimización Dinámica

En la presente sección se tiene por objetivo mostrar los resultados obtenidos al aplicar el método del Gradiente descrito en las Secciones 2.3 y 3.4, sobre el modelo (3.10) y con los parámetros mostrados en la Tabla 4.1. Se llevaron a cabo simulaciones divididas en dos categorías, en la primera de las cuales se presentan los resultados en ambientes controlados, ya que se considera que se tiene acceso físico sobre las variables de control  $I_o$  y  $D$  que,

de acuerdo al modelo, determinan por completo los estados de las variables de interés. La segunda categoría se ha etiquetado como resultados en ambientes semicontrolados debido a que, con el objetivo de ofrecer un mejor panorama en sentido práctico, se han calculado numéricamente los perfiles óptimos de operación del sistema considerando que la variable de control  $I_o$  se encuentra determinada por ciclos de iluminación de día y noche. Las gráficas van acompañadas de las observaciones que surgen en cada simulación.

### 4.3.1. Ambiente controlado

Retomando las funciones de productividad (3.22) y el conjunto de ecuaciones (3.23), se agrega una función saturación simple para introducir las cotas de las variables de control como:  $u_{aplicada} = \max(u_{min}, \min(u_{max}, u))$  donde  $u_{max} = (1, 1500)$  y  $u_{min} = (0, 0)$ . Además se ha considerado que:  $D^{(i+1)}(t) = D^{(i)}(t) - \tau_1 \frac{\partial \mathcal{H}^{(i)}}{\partial D}$  y  $I_o^{(i+1)}(t) = I_o^{(i)}(t) - \tau_2 \frac{\partial \mathcal{H}^{(i)}}{\partial I_o}$ . Se llevaron a acabo simulaciones tanto en el modelo completo como en el simplificado. Los resultados son interpretados y comparados a continuación:

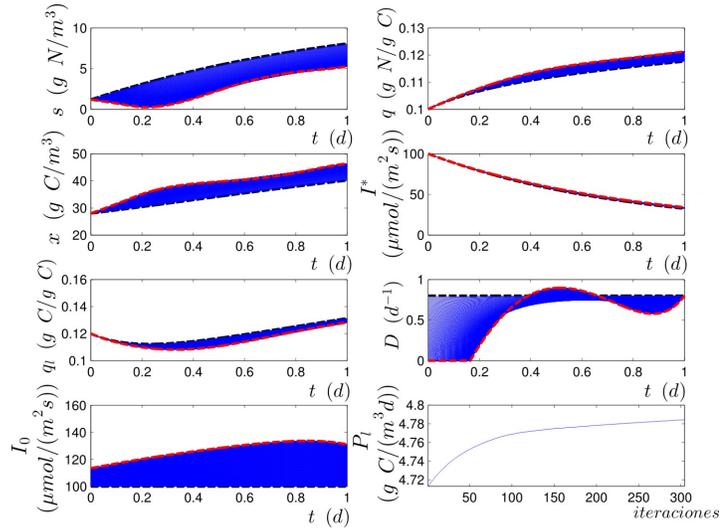
*Simulación 1:* Se consideraron los siguientes parámetros  $X_o = [1.2, 0.1, 28, 100, 0.12]^T$ ,  $t_i = 0$ ,  $t_f = 1$ ,  $u^{(0)}(t) = [0.8, 100]^T$   $t \in [t_i, t_f]$ ,  $\delta = 0.1$ ,  $\tau_{1,2} = 0.001$ , los resultados se muestran en las gráficas de la Figura 4.4a. Para las cuales resultaron 304 iteraciones y una productividad de 4.782.

Todas las gráficas que resultan de las simulaciones de optimización dinámica muestran una curva de color negro que representa la iteración inicial, un conjunto de curvas azules obtenidas en el resto de las iteraciones y una curva de color rojo que determina los óptimos en las variables de estado y control.

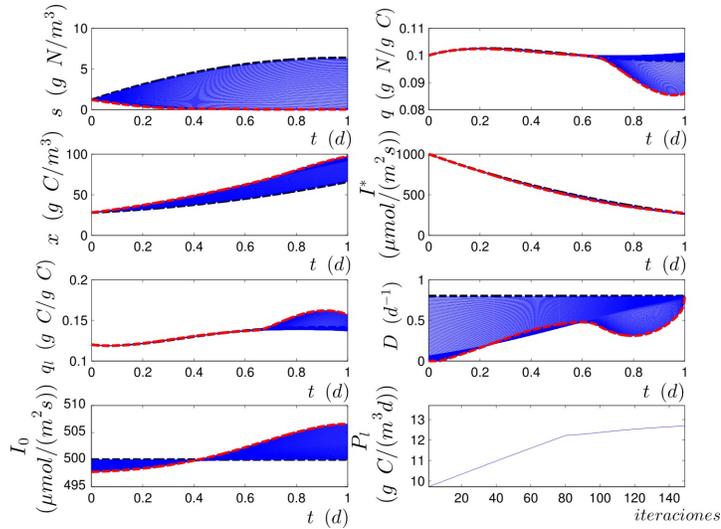
*Simulación 2:*  $X_o = [1.2, 0.1, 28, 1000, 0.12]^T$ ,  $t_i = 0$ ,  $t_f = 1$ ,  $u^{(0)}(t) = [0.8, 500]^T$   $t \in [t_i, t_f]$ ,  $\delta = 1$ ,  $\tau_{1,2} = 0.001$ , los resultados se muestran en las gráficas de la Figura 4.4b. En las que resultaron 142 iteraciones y una productividad de 13.9509.

En las Simulaciones 1 y 2 que se ha considerado la optimización de productividad de lípido neutro intracelular, las variaciones en  $I_o$  son de baja magnitud para fines prácticos, aunque su dinámica responde a los datos experimentales en los que se observa el fenómeno de fotoinhibición.

Lo anterior sugiere que para lograr un valor máximo de productividad de lípidos en



(a) Simulación 1



(b) Simulación 2

Figura 4.4: Optimización de Productividad de Lípidos

un intervalo de tiempo dado, es necesario conocer la magnitud de la radiación luminosa con la cual fueron fotoaclimatadas las microalgas y comenzar el proceso de producción con incidencia luminosa en magnitudes cercanas, creando perfiles según se muestran en las gráficas de la Figura 4.4.

La productividad lograda en la Simulación 2 es considerablemente mayor que en la

Simulación 1, se debe a que el cultivo es aclimatado con una mayor cantidad de radiación luminosa. Es importante mencionar que para valores mayores a 500 en  $I_o^{(0)}(t)$   $t \in [t_i, t_f]$  el método diverge sin hallar óptimos locales de operación, ya que podrían existir condiciones de no regularidad en las trayectorias de las variables (estados de operación no deseables) o que la norma elegida para medir la razón de cambio del Hamiltoniano es inadecuada.

Se observa también que  $D(t)_{opt}$  (curva roja) no tiene una forma repetida en ambas simulaciones, sin embargo las gráficas sugieren que en un intervalo de tiempo inicial, el cultivo debe mantener una tasa de dilución nula la cual va incrementando hasta llegar a un valor en el que vuelve a decaer, este comportamiento también responde al fenómeno no lineal de estrés celular que se ha observado para obtener máximos de productividad.

*Simulación 3:*  $X_o = [1.2, 0.1, 28, 100, 0.12]^T$ , los controles propuestos son  $u^{(0)}(t) = [0.5, 500]^T$   $t \in [t_i, t_f]$ ,  $\delta = 0.3$ ,  $\tau_{1,2} = 0.0001$ . Los resultados en la Figura 4.5a. Se obtuvieron 192 iteraciones y productividad de 48.232.

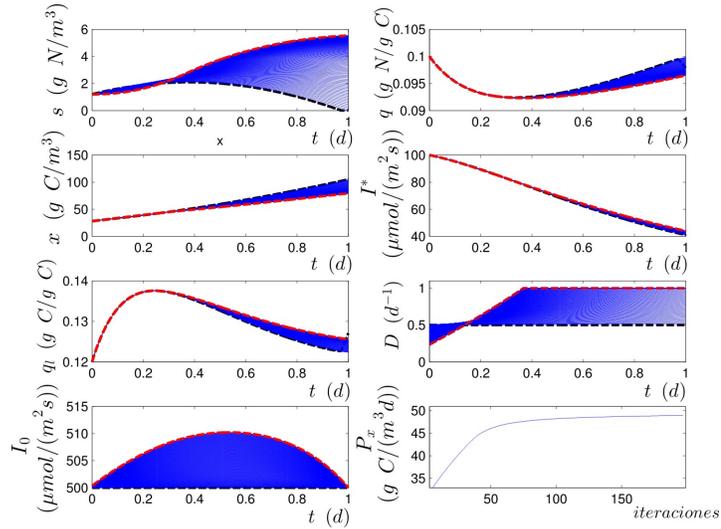
*Simulación 4:*  $X_o = [1.2, 0.1, 28, 100, 0.12]^T$ ,  $u^{(0)}(t) = [0.75, 1000]^T$   $t \in [t_i, t_f]$ ,  $\delta = 0.3$ ,  $\tau_{1,2} = 0.00001$ . En la Figura 4.5b se muestran las trayectorias óptimas resultantes, para las cuales resultaron 487 iteraciones y una productividad de 50.051.

Las Simulaciones 3 y 4 muestran las trayectorias de control que maximizan la productividad de biomasa. Cabe mencionar que a pesar de aumentar la cantidad de incidencia luminosa en el bioreactor, los niveles de productividad se asemejan en magnitud.

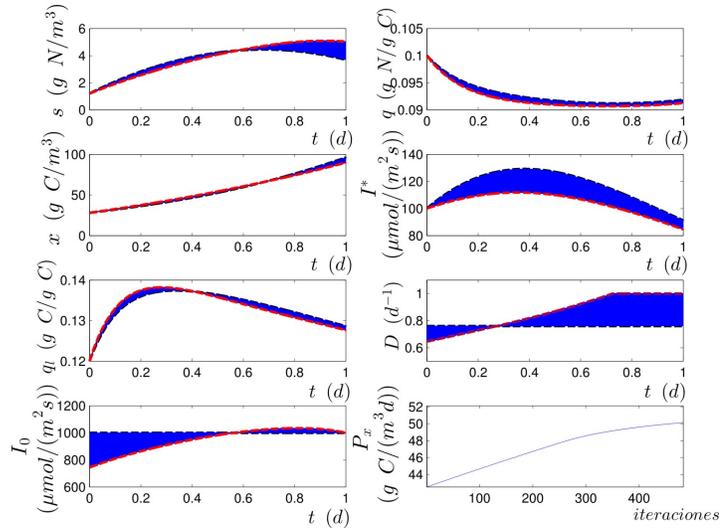
En este caso mientras aumentaba la magnitud de la función constante propuesta para  $I_o^{(0)}(t)$ , para encontrar convergencia en el método fue necesario que  $D^{(0)}(t)$  también se propusiera de mayor magnitud. Con dichos incrementos  $\left\| \frac{\partial \mathcal{H}^{(i)}}{\partial u} \right\|$  tiende a valores más pequeños.

También se pudo observar que al aumentar la condición inicial en  $I^*$  en valores mayores a 1500 los sistemas de ecuaciones diferenciales no presentaban solución, por lo que si las células son fotoaclimatadas con radiaciones luminosas de dichas magnitudes no es posible determinar mediante el presente método las trayectorias óptimas de operación.

En comparación con las Simulaciones 1 y 2, las Simulaciones 3 y 4 muestran que para



(a) Simulación 3



(b) Simulación 4

Figura 4.5: Optimización de Productividad de Biomasa

encontrar valor máximos de productividad de biomasa, las tasas de dilución aumentan prácticamente de manera lineal y una vez llegando al valor máximo se mantienen constantes, la pendiente de dicho incremento dependerá de la cantidad de incidencia luminosa en la superficie del bioreactor, según sugieren las gráficas de la Figura 4.5. Observando el comportamiento de  $I_o$  se concluye lo mismo que en el caso de la optimización de lípidos.

Por otro lado, se ha añadido la aplicación de la misma metodología de optimización al modelo simplificado mencionado con anterioridad, las siguientes simulaciones muestran los resultados obtenidos para estos casos.

*Simulación 5:*  $X_o = [1.2, 0.1, 28, 500, 0.12]^T$ ,  $u^{(0)}(t) = [0.5, 500]^T$   $t \in [t_i, t_f]$ ,  $\delta = 0.03$ ,  $\tau_1 = 0.0001$  y  $\tau_2 = 1$ . Las gráficas se muestran en la Figura 4.6a. Se obtuvieron 156 iteraciones y un valor de productividad de 4.183.

*Simulación 6:*  $X_o = [1.2, 0.1, 28, 500, 0.12]^T$ ,  $u^{(0)}(t) = [0.8, 1200]^T$   $t \in [t_i, t_f]$ ,  $\delta = 0.1$ ,  $\tau_1 = 0.001$  y  $\tau_2 = 1$ . El método converge después de 348 iteraciones a un valor de productividad de 2.422. Los resultados en la Figura 4.6b.

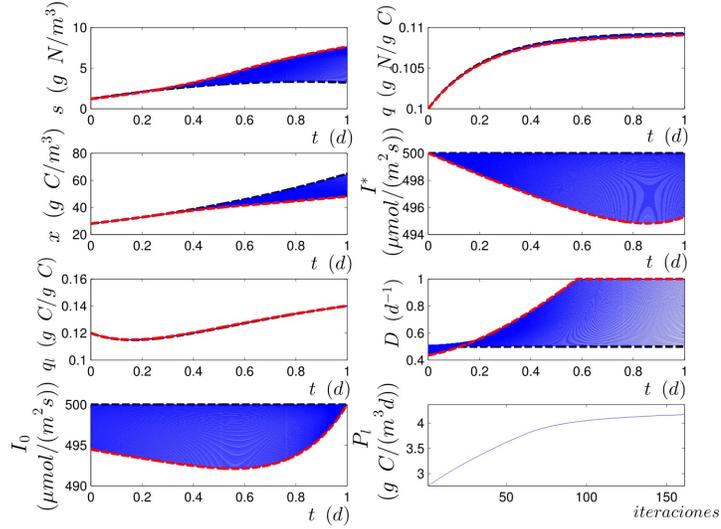
Se puede observar que para valores constantes de  $I_o^{(0)}(t)$  cercanos a  $I_{o_{max}}$ , el control óptimo obtenido en  $D$  tiende a ser una función constante en su valor máximo, es decir que la tasa de dilución debe ser la máxima cuando el cultivo se encuentra expuesto grandes cantidades de radiación luminosa.

Además el comportamiento que muestra  $I_{o_{opt}}$  difiere considerablemente de los resultados obtenidos en las simulaciones previas, es decir que no se observa el fenómeno de fotoinhibición en el modelo simplificado. Una clara diferencia que muestran las Figuras 4.4 y 4.6, es que para un bioreactor que no presenta gradientes de luz, la magnitud de la productividad disminuye considerablemente.

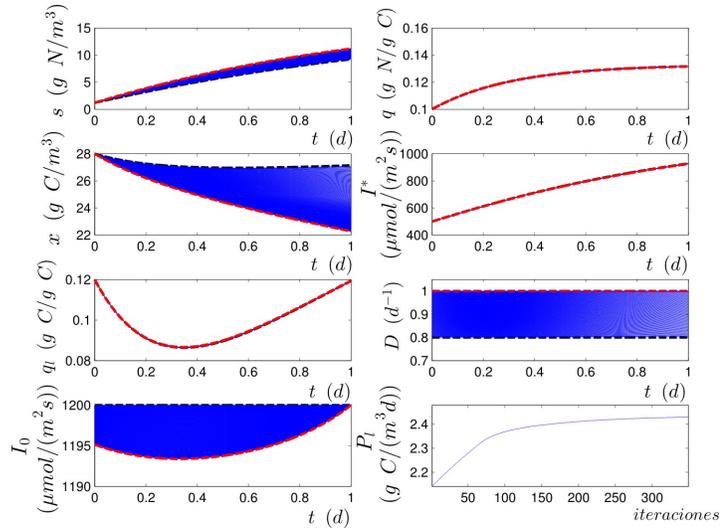
Dichos resultados se deben a que el modelo refleja el hecho de que al considerar una distribución de luz homogénea, la profundidad en la geometría del reactor y la densidad celular es baja, lo cual implica cultivos con cantidades pequeñas de biomasa ya no se considera explícitamente la variable de volumen del bioreactor.

*Simulación 7:*  $X_o = [1.2, 0.1, 28, 1000, 0.12]^T$   $u^{(0)}(t) = [0.5, 500]^T$   $t \in [t_i, t_f]$ ,  $\delta = 0.2$ ,  $\tau_1 = 0.0001$  y  $\tau_2 = 1$ . Las gráficas correspondientes en la Figura 4.7a. Se generaron 295 iteraciones para un valor de productividad de 4.09

*Simulación 8:*  $X_o = [1.2, 0.1, 28, 1000, 0.12]^T$ ,  $u^{(0)}(t) = [0.75, 1200]^T$   $t \in [t_i, t_f]$ ,  $\delta = 0.1$ ,  $\tau_1 = 0.0001$  y  $\tau_2 = 1$ . En este caso se obtuvieron 562 iteraciones y un máximo de productividad de 2.401. Los resultados de la Simulación en la Figura 4.7b.



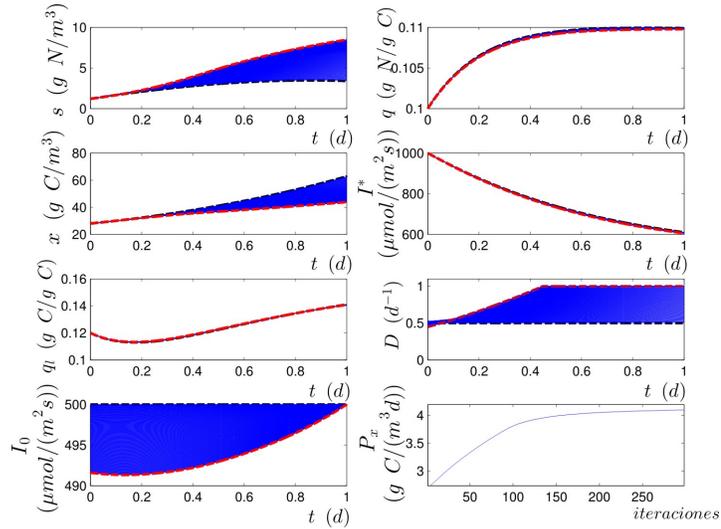
(a) Simulación 5



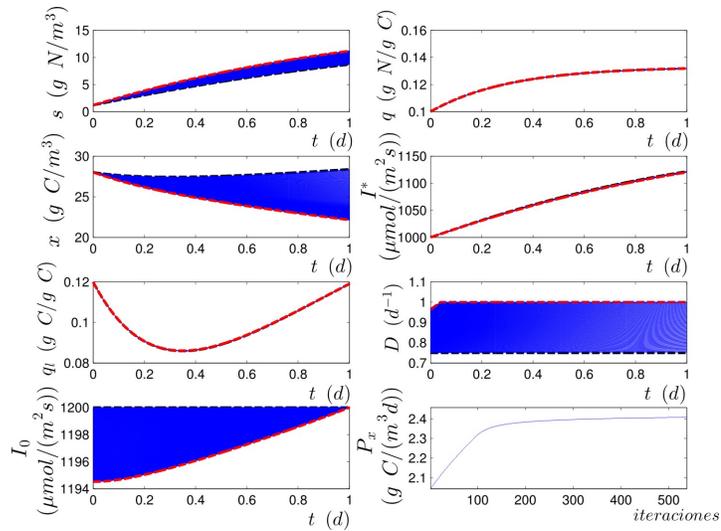
(b) Simulación 6

Figura 4.6: Optimización de Productividad de Lípidos en modelo reducido

Los comportamientos cualitativos de las variables de control son similares a los perfiles obtenidos en las Simulaciones 5 y 6. Las gráficas de la Figura 4.7 muestran que ante distintas propuestas de  $u^{(0)}(t)$ , se obtienen magnitudes de productividad diferentes, sin embargo en ambas simulaciones se logra la convergencia del método. Lo anterior demuestra que el modelo presenta múltiples estados estacionarios y que los valores encontrados son sola-



(a) Simulación 7



(b) Simulación 8

Figura 4.7: Optimización de Productividad de Biomasa en modelo reducido

mente máximos locales de acuerdo a las condiciones iniciales de operación determinadas.

Otra observación importante es que al considerar el modelo simplificado en comparación con el modelo completo, las propuestas iniciales de  $u(t)$  (en todos los casos constantes) que permiten hallar máximos relativos para ambas funciones de productividad, se encuentran en un rango de valores mucho más amplio. Dicha observación no tiene una interpretación

física o biológica, ya que los casos de divergencia que se presentaron en las Simulaciones 1-4 para ciertos valores en  $u^{(0)}(t)$ , se explica con base en la no linealidad característica del modelo completo, específicamente el término exponencial que en el caso de la optimización estática obstaculiza la determinación de soluciones cerradas.

### 4.3.2. Ambiente semicontrolado

Se entiende por ambiente semicontrolado a las condiciones de operación de un sistema en las que solo algunas de las variables que determinan su comportamiento es posible modificarlas de manera arbitraria. Las prácticas experimentales con bioreactores incluyen este tipo de ambientes cuando los cultivos de microalgas son expuestos a radiaciones solares y la tasa de dilución representa la única entrada de control. Se considera este escenario para determinar los perfiles óptimos de operación dado el modelo (3.10).

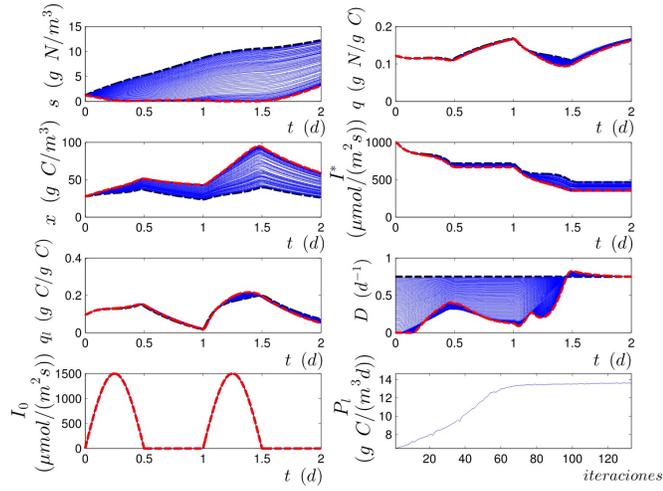
A continuación se ilustran dichos óptimos obtenidos mediante el método del Gradiente, en el que se propone que  $I_o(t)$  es una señal periódica que resulta de la multiplicación de un tren de pulsos con la función:  $1500 \sin(2\pi(t + 1))$  (ver Figura 4.8). Se llevaron a cabo simulaciones tanto para el modelo completo como para la versión simplificada considerando ambas funciones de productividad, cuyas gráficas se muestran a continuación.

*Simulación 9:*  $X_o = [1.2, 0.12, 28, 1000, 0.1]^T$ ,  $t_i = 0$ ,  $t_f = 2$ ,  $D^{(0)}(t) = 0.75 t \in [t_i, t_f]$ ,  $\delta = 0.15$ ,  $\tau_1 = 0.001$ . En este caso se obtuvieron 133 iteraciones y un máximo de productividad de lípidos de 13.621. Los resultados de la Simulación en la Figura 4.8a.

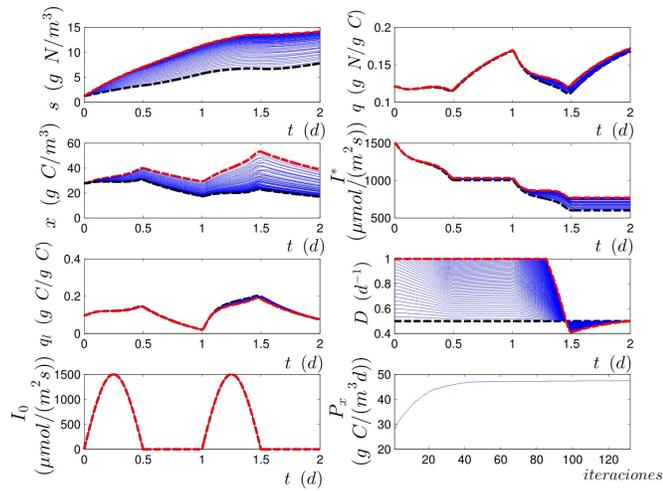
*Simulación 10:* Los parámetros son  $X_o = [1.2, 0.12, 28, 1500, 0.1]^T$ ,  $t_i = 0$ ,  $t_f = 2$ ,  $D^{(0)}(t) = 0.5 t \in [t_i, t_f]$ ,  $\delta = 0.2$ ,  $\tau_1 = 0.0005$ . Se logró convergencia después de 134 iteraciones y un máximo de productividad de biomasa de 46.423. Las gráficas correspondientes en la Figura 4.8b.

Observar en las Simulaciones 9 y 10 que las curvas  $D_{opt}(t)$  difieren en gran medida, lo cual da una idea de la diferencia de los modos de operación requeridos en el mismo sistema cuando se desea optimizar productividad de lípidos o biomasa. Ya se mencionaba con anterioridad que maximizar cantidades de biomasa no implicaba maximizar la acumulación de lípidos neutros, estos resultados comprueban tal afirmación.

Bajo condiciones iniciales similares, el máximo de productividad alcanzado mediante



(a) Simulación 9



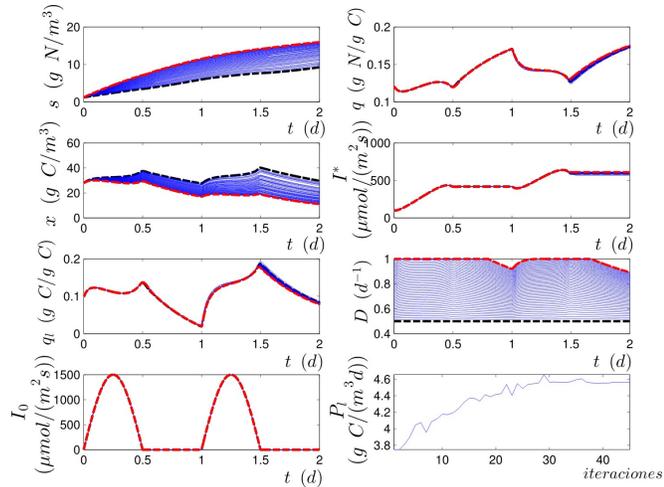
(b) Simulación 10

Figura 4.8: Optimización de Productividad de Lípidos y Biomasa

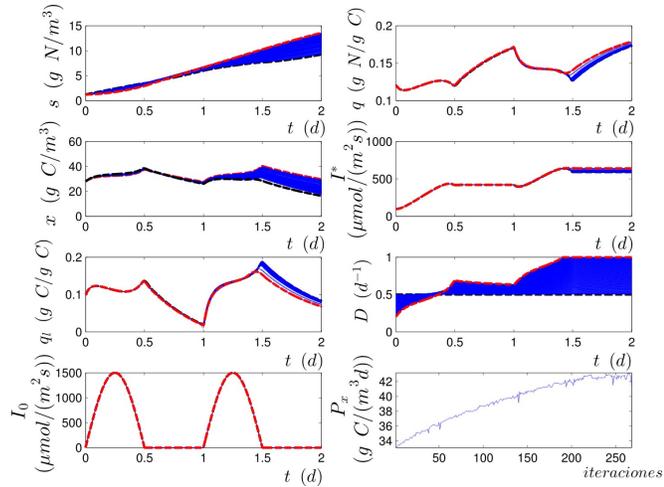
la Simulación 2 adquiere un valor cercano al obtenido en la Simulación 9, esta observación resulta muy valiosa ya que abre la posibilidad de sustituir las fuentes de luz, una de las cuales representa una alternativa sustentable. Dicha posibilidad aun requiere seguir siendo evaluada ya que los tiempos de operación son distintos, además de todas aquellas variables que ignora el modelo y que podrían resultar determinantes en las dinámicas del bioproceso al operar en ambientes semicontrolados. Una observación similar se desprende de las Simulaciones 4 y 10, respecto a  $P_x$ .

*Simulación 11:*  $X_o = [1.2, 0.12, 28, 100, 0.1]^T$ ,  $t_i = 0$ ,  $t_f = 2$ ,  $D^{(0)}(t) = 0.5 t \in [t_i, t_f]$ ,  $\delta = 2$ ,  $\tau_1 = 0.0001$ . Los perfiles se muestran en la Figura 4.9a, con un total de 46 iteraciones, alcanzando un máximo de productividad de lípidos de 4.551.

*Simulación 12:*  $X_o = [1.2, 0.12, 28, 100, 0.1]^T$ ,  $t_i = 0$ ,  $t_f = 2$ ,  $D^{(0)}(t) = 0.5 t \in [t_i, t_f]$ ,  $\delta = 2$ ,  $\tau_1 = 0.0001$ . Los resultados en la Figura 4.9b. Las condiciones de óptimas se alcanzaron después de 271 iteraciones y un máximo de productividad de biomasa de 43.783.



(a) Simulación 11



(b) Simulación 12

Figura 4.9: Optimización de Productividad de Lípidos y Biomasa en modelo reducido

La siguiente observación se cumple para las Simulaciones 9 y 11: La acumulación de lípidos  $q_l$ , muestra comportamientos semejantes para  $0 < t < 1$  y  $1 < t < 2$ , sin embargo en el segundo día de operación se amplifican las magnitudes, esto da idea de que mediante las curvas  $D_{opt}$  halladas la productividad de lípidos aumenta en el tiempo. Una observación semejante se tiene para las Simulaciones 10 y 11, en el caso de la biomasa.

Nuevamente, las magnitudes de productividad máxima obtenida mediante el modelo simplificado disminuyen con respecto al modelo completo, esto se debe a que se consideran cultivos de baja densidad celular.

La diferencia entre los resultados mostrados en las Secciones 4.2 y 4.3, permite concluir que los transitorios que presentan las variables de estado tienen influencia en el estado estacionario al cual tienden, lo cual destaca la importancia de realizar la optimización dinámica de un sistema de esta naturaleza.

#### 4.4. Conclusiones Generales y Trabajos Futuros

Con la presente investigación se ha logrado resolver el problema de optimización tanto dinámica como estática en un modelo que describe el comportamiento de organismos con dinámicas no lineales complejas. Sin embargo, se llevó a cabo un largo proceso de revisión de los modelos matemáticos disponibles en la literatura, con el objetivo de elegir aquel que pudiera ajustarse mejor a las observaciones experimentales de laboratorio y que cumpliera con las características matemáticas adecuadas para implementar los métodos numéricos de optimización.

Una vez elegido dicho modelo se aportó un análisis asintótico para justificar su utilización, además se obtuvieron las ecuaciones cuya simulación comprobó que es capaz de capturar el fenómeno de histéresis, para el cual la dinámica de lípidos después de inanición de nutrientes es distinta a las dinámicas posteriores al restablecimiento de nutrientes.

Sin perder de vista que se desea aportar información para próximos experimentos, se agregó un conjunto de simulaciones con perfiles de iluminación en ciclos de día y noche, con el objetivo de averiguar qué tanto difieren las magnitudes de productividad tanto de lípidos como de biomasa, las conclusiones mencionadas en la sección previa demuestran que efectivamente es viable el aprovechamiento la luz natural como fuente de energía luminosa. Adicionalmente, los resultados obtenidos en la Sección 4.3.2 incrementan los alcances

prácticos de la presente investigación, por ejemplo en condiciones de laboratorio para las que resulte costoso un aparato técnico de iluminación o cuando se considera que dicho aparato le resta el valor al concepto de sustentabilidad en el que se basan los cultivos de microalgas.

También se ha demostrado a lo largo de la sección 4.3 que considerar el modelo simplificado, lo cual equivale a ignorar los efectos de gradientes de luz, reduce la complejidad matemática y computacional en la determinación de soluciones tanto en estado estacionario como considerando los transitorios. Sin embargo, en términos prácticos no tiene ninguna aportación valiosa ya que los índices de productividad disminuyen considerablemente. Considerando lo anterior, se han cumplido satisfactoriamente los objetivos listados en la Sección 1.5.

Las principales aportaciones radican en haber analizado y optimizado un modelo que, de acuerdo al estado del arte, no había sido estudiado sin antes efectuar reducciones en el mismo. Con esto se ha demostrado que son innecesarias las consideraciones que restan realismo al modelo, construido con base en métodos tanto experimentales como mecanísticos, ofreciendo a la vez un gran poder predictivo.

Las afirmaciones mencionadas en el párrafo anterior se refuerzan a partir de las observaciones mencionadas en la sección anterior, donde se hace notar la importancia que tiene considerar el modelo completo, ya que por ejemplo desaparece el fenómeno de fotoinhibición cuya dinámica es característica del comportamiento del microorganismo. Evidentemente el próximo paso de la investigación es la validación experimental de los resultados mostrados en el Capítulo 4.

Como posibles extensiones se propone trabajar con modelos que consideren explorar las dinámicas que describen fenómenos tales como la sincronización celular o la digestión anaeróbica, lo cual posiblemente requiere contemplar enfoques híbridos de modelado. Dichos enfoques involucrarían, por ejemplo teoría de redes o métodos usados en el modelado multiescala, con el objetivo de describir a nivel microscópico las vías de señalización metabólicas o los ciclos celulares de los organismos.

Lo anterior permitiría conocer las interacciones moleculares que subyacen los comportamientos emergentes a nivel poblacional, lo cual resultaría de interés al área de la

ingeniería genética cuya intervención probablemente ayude a mejorar las índices de productividad analizados en la presente investigación. En estos casos es importante mencionar que se resulta imprescindible entablar discusiones de naturaleza ética, entorno a las posibles aplicaciones de la ingeniería genética en cultivos de microalgas.

Los observadores de estado, controladores adaptables o controladores robustos en lazo cerrado, son herramientas no invasivas que ofrece la teoría de control cuya aplicación sobre el modelo aquí estudiado resultaría interesante analizar. Otra posibilidad atractiva es llevar a cabo un análisis comparativo de los resultados obtenidos en el presente trabajo con respecto a aquellos que se lograrían a través de métodos heurísticos de optimización (redes neuronales o algoritmos genéticos).

Los parámetros aquí considerados han sido ajustados a datos experimentales de *Isochrysis affinis galbana*, sin embargo la estructura del modelo permite ajustar dichos parámetros a distintos organismos, queda el problema abierto para probar todas las metodologías aquí presentadas con organismos que puedan generar mejores resultados.

Por otro lado, se pueden llevar a cabo simulaciones bajo distintos modos de operación, es decir considerando cultivos discontinuos o bioreactores interconectados para posteriormente realizar un balance entre la productividad y los gastos de operación. También es posible considerar modelos que describan las dinámicas de interacción entre distintos organismos en el mismo cultivo.

Finalmente cabe destacar la importancia de las implicaciones sociales que se tienen al trabajar con temas en torno al tema de sustentabilidad, en el contexto actual de degradación ecosistémica. Haciendo énfasis en que paulatinamente se reivindiquen los enfoques espitémicos de la utilización de las herramientas matemáticas y computaciones, no solo en el sentido de analizar símbolos abstractos que en el mejor de los casos el campo de desarrollo son problemas de aplicación práctica, si no en proyectos creativos que impulsen iniciativas en beneficio al ambiente y la sociedad.

---

# Bibliografía

- [1] E.W. Becker. *Microalgae. Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, 1994.
- [2] J. Benemann. *CO<sub>2</sub> mitigation with microalgae systems*. *Energy Convers. Manage.*, 1997.
- [3] Olivier Bernard. *Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO<sub>2</sub> mitigation and biofuel production*. *Journal of Process Control*, 2011.
- [4] Dimitri P. Bertsekas. *Constrained Optimization and Lagrange Multiplier Method*. Athena Scientific, MIT, 1982.
- [5] Yusuf Chisti. *Biodiesel from microalgae*. *Biotechnology Advances*, 2007.
- [6] Jean-Francois Cornet y Claude-Gilles Dussap. *A Simple and Reliable Formula for Assessment of Maximum Volumetric Productivities in Photobioreactors*. *Biotechnol. Prog.*, 2009.
- [7] N. G. de Bruijn. *Asymptotic Methods in Analysis*. Dover, 1981.
- [8] M.R. Droop. *25 Years of Algal Growth Kinetics*. *Botanica Marina*, 1983.
- [9] Aaron Packer, et.al. *Growth and neutral lipid synthesis in green microalgae: A mathematical model*. *Bioresource Technology*, 2011.
- [10] Abdulla Malek, et.al. *Modeling and Dynamic Optimization of Microalgae Cultivation in Outdoor Open Ponds*. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2016.
- [11] Eunyong Lee, et.al. *Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review*. *Algal Research*, 2015.

- 
- [12] Francis Mairet, et.al. *Modelling microalgae growth in nitrogen limited photobioreactor for estimating biomass, carbohydrate and neutral lipid productivities. 18th IFAC World Congress*, 2011.
- [13] Francis Mairet, et.al. *Modelling neutral lipid production by the microalga Isochrysis aff. galbana under nitrogen limitation. Bioresource Technology*, 2011.
- [14] Francis Mairet, et.al. *Adaptive control for optimizing microalgae production. IFAC Computer Applications in Biotechnology*, 2013.
- [15] Frédéric Grognaard, et.al. *Optimization of a photobioreactor biomass production using natural light. Proceedings of the 49th CDC Conference*, 2010.
- [16] G. Cogne, et.al. *Identification of a metabolic network structure representative of arthrospira (spirulina) platensis metabolism. Biotechnol. Bioeng.*, 2003.
- [17] Gaël Bougaran, et.al. *Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. Journal of Theoretical Biology*, 2010.
- [18] Ivayla Vatcheva, et.al. *Experiment selection for the discrimination of semi-quantitative models of dynamical systems. Artificial Intelligence*, 2006.
- [19] L. Pottier, et.al. *A fully Predictive Model for One-Dimensional Light Attenuation by Chlamydomonas reinhardtii in a Torus Photobioreactor. Wiley InterScience*, 2005.
- [20] N. Abdel-Raouf, et.al. *Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences*, 2012.
- [21] Olivier Bernard, et.al. *Modelling planar photobioreactors in nitrogen limited conditions. Biotech. Bioeng.*, 2010.
- [22] Pierre Masci, et.al. *Microalgal biomass surface productivity optimization based on a photobioreactor model. 11th IFAC Symposium on Computer Applications in Biotechnology*, 2010.
- [23] Prabhuddha L. Gupta., et.al. *A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. World J Microbiol Biotechnol*, 2015.
- [24] Quentin Béchet, et.al. *Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. Biotechnology Advances*, 2013.

- 
- [25] Sergej Celikovsky, et.al. *Singular Perturbation Based Solution to Optimal Microalgal Growth Problem and its Infinite Time Horizon Analysis. Proceedings of the 47th IEEE Conference on Decision and Control*, 2008.
- [26] Shih-Hsin Ho, et.al. *Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>-emission mitigation systems - A review. Biotechnology Advances*, 2011.
- [27] Stepan Papacek, et.al. *Optimal Feedback Control of Microalgal Growth Based on the Slow Reduction. Proceedings of the 17th World Congress IFAC*, 2008.
- [28] Sung Jin Yoo, et.al. *Optimization of microalgal photobioreactor system using model predictive control with experimental validation. Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2016.
- [29] T. Anning, et.al. *Photoacclimation in the marine diatom skeletonema costatum. Limnol. Oceanogr.*, 2000.
- [30] Teresa M. Mata, et.al. *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010.
- [31] Xinping Zhou, et.al. *Sustainable production of energy from microalgae: Rview of culturing systems, economics and modelling. Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2015.
- [32] Yufeng Cui, et.al. *Electricity generation and microalgae cultivation in microbial fuel cell using microalgae-enriched anode and bio-cathode. Energy Conversion and Management*, 2014.
- [33] K. Flynn. *A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interactions in phytoplankton. J. Plankton Res.*, 1991.
- [34] Kevin J. Flynn. *A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interactions in phytoplankton. Journal of Plankton Research*, 2001.
- [35] S. Graef y J. Andrews. *Mathematical modeling and control of anaerobic digestion. Water Res.*, 1974.
- [36] Arthur E. Bryson Jr. *Dynamic Optimization*. Addison-Wesley, 1999.
- [37] Donald E. Kirk. *Optimal Control Theory. An Introduction*. Dover, 1998.
- [38] H. De la Hoz Siegler, et.al. *Optimization of microalgal productivity using an adaptive, non-linear model based strategy. Bioresource Technology*, 2012.

- 
- [39] Kenneth Lange y Francisco J. Oyarzun. *The attractiveness of the Droop Equations. Mathematical Biosciences*, 1992.
- [40] Daniel Liberzon. *Calculus of Variations and Optimal Control Theory. A Concise Introduction*. Princeton University Press, 2012.
- [41] Jeffrey W. Moody, Christopher M. McGinty y Jason C. Quinn. *Global evaluation of biofuel potential from microalgae. PNAS*, 2014.
- [42] K. Schügerl y K.-H. Bellgardt. *Bioreaction Engineering. Modeling and Control*. Springer, 2000.
- [43] René H. Wijffels, y Maria J. Barbosa. *An Outlook on Microalgal Biofuels. Science*, 2010.
- [44] Yaoyang XU y Wiebke J. Boeing. *Modeling maximum lipid productivity of microalgae: Review and next step. Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014.