

## Sensores suaves en procesos biotecnológicos

A. I. Cabrera Llanos, M. G. Ramírez Sotelo

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del IPN  
Barrio La Laguna Ticoman s/n, GAM, C. P. 07340 México D. F.  
(Recibido: 18 de marzo de 2007; Aceptado: 9 de mayo de 2007)

Se describe el desarrollo de un sensor virtual o suave aplicado a la estimación de las variables de un proceso de fermentación en lote alimentado para el cultivo de *Sacharomyces cerevisiae*. Se desarrolla el algoritmo del estimador basado en redes neuronales diferenciales también llamado neuro-observador, se detallan los elementos que lo conforman y los resultados obtenidos al aplicarlo a una base de datos de dos experimentos de fermentación, con duración de 24 horas cada uno, finalmente se comparan la evolución temporal de las variables estimadas como la concentración de biomasa y la concentración de trehalosa en contra de las variables en una base de datos para determinar el desempeño del neuro-observador.

*Palabras clave:* Sensor suave; Redes neuronales diferenciales; Procesos de Fermentación en lote alimentado; *Sacharomyces cerevisiae*

In this paper we describe the virtual sensor or soft sensor applied to the fed batch fermentation process estimation with *Sacharomyces cerevisiae* yeast culture. The algorithm based on the differential neural networks is developed and this algorithm is called neuro-observer. The details for this structure are described and the application on the data for two fermentation process during a period of 24 hours of evolution of each one. Finally the estimate variables (biomass concentration and trehalose concentration) are compared versus the measured variables evolution to show the neuro-observer performance.

*Keywords:* Soft sensor; Differential neural networks; Fed batch fermentation process; *Sacharomyces cerevisiae*

### 1. Introducción

El desarrollo de la instrumentación moderna ha venido creciendo a partir de los diferentes tipos de sensores que aparecen día a día en el mercado, la mayoría de estos reproducen con mayor calidad las señales censadas y describen en rangos lineales más amplios las variaciones de las señales a censar, por otra parte esto requiere de un mejor soporte del sistema de interfaz con la conexión de medición en tiempo real. Estos sistemas presentan dos problemas, uno la posibilidad de que la medición de alguna variable no pueda realizarse en forma física y otro que el costo se incrementa ya que se considera tanto el sistema de medición como de los sensores.

Una nueva alternativa para el censo de variables, se presenta con el desarrollo de los llamados sensores suaves o virtuales, estos son sensores que determinan la variación de las variables a partir de un algoritmo de computación y mediante el uso de una base de datos tomados de un proceso en particular [1], [2]. Estos sensores consideran que la evolución dinámica de todas las variables guarda una estrecha relación con respecto a cada una de las variables y con la evolución total del proceso, así que al conocer alguna de ellas se puede estimar el valor de cualquier otra [1].

Por otra parte, el proceso de identificación y estimación permiten reducir ruido y algunos efectos no deseables en las mediciones del proceso [3], [4]. La razón fundamental por la cual se utilizan métodos basados en redes neuronales, es debido a que estas técnicas pueden utilizarse sin la necesidad del conocimiento de un modelo del

proceso [5], a este tipo de métodos se les denomina de caja negra cuando no es posible acceder al conocimiento del modelo, de otra manera recibirán el nombre de caja gris y caja blanca cuando se tiene conocimiento parcial y total del modelo respectivamente, las redes neuronales permiten obtener un aproximado de un proceso cuando es considerado como caja negra [6], por lo cual no dependen de la modelación que se realice del proceso.

En este artículo presentamos el desarrollo de un sensor suave aplicado a la medición de variables de un proceso de fermentación en lote alimentado donde se describen las variables de concentración de biomasa, concentración de sustrato, concentración de trehalosa y el volumen en el fermentador; estas variables representan la evolución dinámica del sistema y determinan su desempeño, sin embargo, la determinación de las concentraciones indicadas se hace de manera muestral, el objetivo de este trabajo consiste en el desarrollo de un sensor en línea [7], con la base de datos de algunas de las variables, que estime la evolución de aquellas variables que no pueden ser medidas en forma directa, para llevar a cabo este objetivo se usa la técnica de redes neuronales diferenciales [3] con la que se desarrolla un sistema estimador llamado neuro-observador. De esta manera, en la sección siguiente se describe el modelo del proceso de fermentación en lote alimentado para un cultivo de *Sacharomyces cerevisiae*, así como, el método de estimación por medio de las redes neuronales diferenciales.

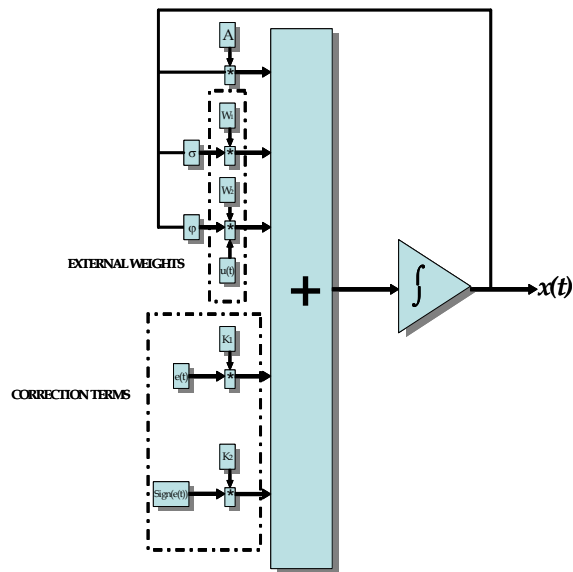


Figura 1. Diagrama a bloques del Neuro-observador.

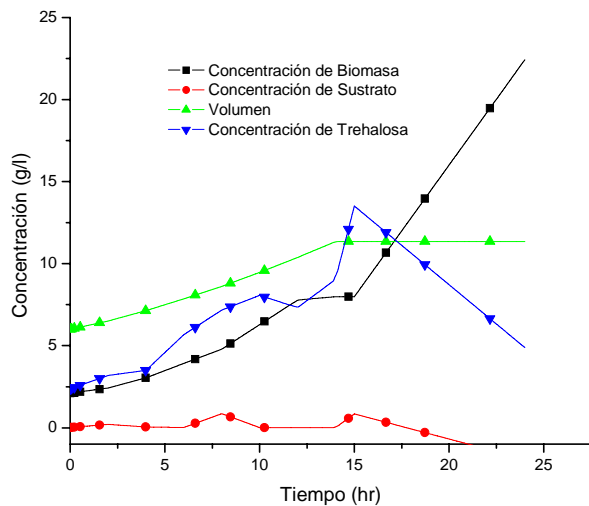


Figura 2. Concentración de Biomasa (X), concentración de sustrato (S), volumen en el medio (V) y concentración de trehalosa intracelular (wt) medidas experimentalmente en el primer proceso de producción de levadura.

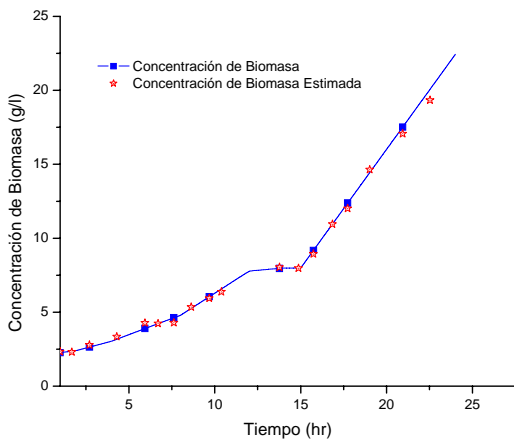


Figura 3. Concentración de Biomasa (X) y concentración de Biomasa (X) estimada mediante el neuro-observador en el primer proceso de producción de levadura.

## 2. Metodología

En esta sección se describe el modelo del fermentador en lote alimentado, el cual será usado para entrenar a la red neuronal, también se describe el algoritmo de estimación basados en redes neuronales diferenciales llamado neuro-observador, donde se detallan sus características. La metodología consistió en la toma de muestras de un proceso de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*, para tres corridas experimentales en el proceso de fermentación de producción de levadura, llevado a cabo con una duración de 24 horas cada uno. Los datos obtenidos en forma convencional (mediante la toma de muestras, pesado del material celular, etc), fueron utilizados para formar una base de datos para cada uno de los experimentos. Como experimento testigo; se procedió a diseñar el neuro-observador para el proceso, tomando en cuenta que las únicas variables a medir fueron la concentración de sustrato y el volumen del medio, con estas consideraciones se llevo a cabo la estimación de la concentración de biomasa y concentración de trehalosa por medio del neuro-observador, los resultados fueron comparados con los datos experimentales de la base ya formada.

### 2.1 Modelo del Biorreactor

Las variables del fermentador en lote alimentado son descritas [8], [9] por las ecuaciones:

$$\dot{X} = (\mu - X)D \tag{1}$$

$$\dot{S} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \mu X + D(S_{in} - S)$$

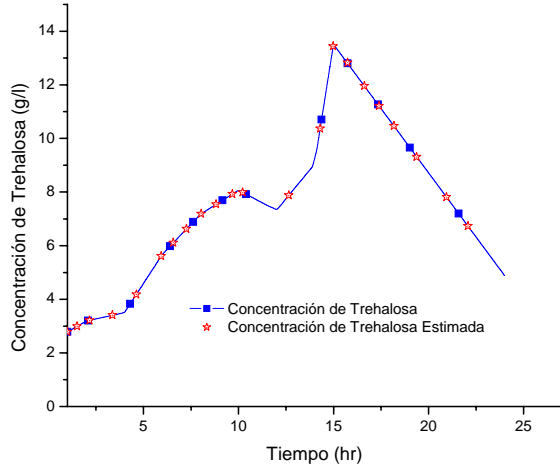
$$\dot{V} = DV - F_{out}$$

donde  $X$  es la concentración de biomasa en el biorreactor y en el medio;  $S$  es la concentración de sustrato de alimentación en el biorreactor y en el medio;  $S_{in}$  es la concentración de sustrato en el medio entrante;  $F_{out}$  es el flujo saliente del biorreactor;  $\mu$  la razón de crecimiento específico para el microorganismo;  $Y_{x/s}$  el coeficiente de consumo de sustrato por la biomasa y  $V$  es el volumen en el biorreactor.

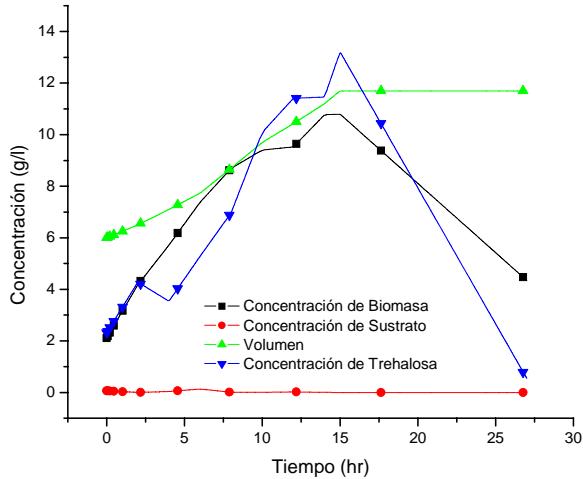
Para la razón de crecimiento específico  $\mu$  se considero un proceso en el cual se describe este coeficiente en función de

$$\mu = \mu_m \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \tag{2}$$

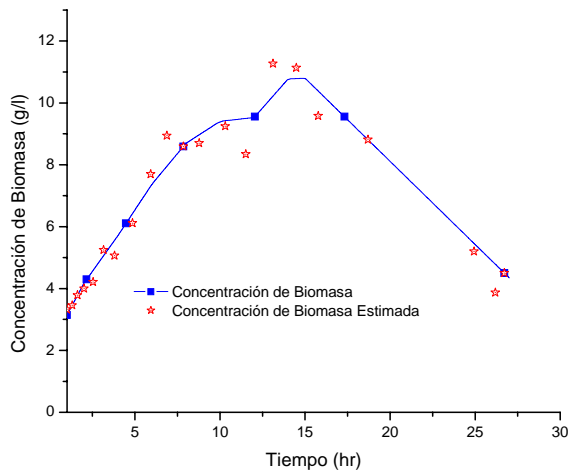
donde  $\mu_m$  la velocidad específica de crecimiento máxima;  $K_s$  es la constante de saturación a la fuente de carbono.



**Figura 4.** Concentración de Trehalosa (wT) y concentración de trehalosa estimada (wT) mediante el neuro-observador en el primer proceso de producción de levadura.



**Figura 5.** Concentración de Biomasa (X), concentración de sustrato (S), volumen en el medio (V) y concentración de trehalosa intracelular (wT) medida experimentalmente en el segundo proceso de producción de levadura.



**Figura 6.** Concentración de Biomasa (X) y concentración de Biomasa Estimada (X) mediante el neuro-observador en el segundo experimento de producción de levadura.

## 2.2 Redes Neuronales Diferenciales

La técnica de Redes Neuronales Diferenciales es un algoritmo matemático que permite desarrollar procedimientos para la identificación de un proceso, así como el desarrollo de estimadores en línea [10]. Esta técnica se basa en el supuesto de que un sistema de tipo no lineal como el modelo mostrado en (1), en forma general puede describirse por medio de la expresión

$$\begin{aligned} \dot{x}_t &= f(x_t, u_t, t) \\ y_t &= C_0 x_t \end{aligned} \quad (3)$$

donde  $x_t \in \mathfrak{R}^n$  es el vector de estado,  $y_t$  es la salida del sistema la cual se considera una combinación lineal del vector de estado dado por  $C_0 \in \mathfrak{R}^{p \times n}$ ,  $u_t \in \mathfrak{R}^p$  es la señal de control que se aplica al sistema. Suponemos que para este sistema existe un sistema estimador basado en las redes neuronales diferenciales de la forma

$$\dot{\hat{x}}_t = A \hat{x}_t + W_{1,t} \sigma(\hat{x}_t) + W_{2,t} \phi(\hat{x}_t) \gamma(u_t) + K_t (y_t - \hat{y}_t) \quad (4)$$

donde  $\hat{x}_t \in \mathfrak{R}^n$  es el vector de estimación de la red neuronal diferencial,  $A$  representa la matriz estable de Hurwitz,  $u_t \in \mathfrak{R}^p$  es la señal de control aplicada a la red neuronal,  $W_{1,t} \in \mathfrak{R}^{n \times k}$  es la matriz de pesos de la red,  $W_{2,t} \in \mathfrak{R}^{n \times k}$  es la matriz de pesos para la señal de control en la red,  $K_t$  representa la matriz del observador de tipo Luenberger. Las funciones de activación  $\sigma(\hat{x}_t)$  y  $\phi(\hat{x}_t)$  son consideradas campos vectoriales de tipo sigmoideal y transformaciones  $\sigma(x_t) : \mathfrak{R}^n \rightarrow \mathfrak{R}^k$  y  $\phi(x_t) : \mathfrak{R}^n \rightarrow \mathfrak{R}^{p \times s}$  respectivamente, de la forma

$$\sigma_i(x) = a_i \left( 1 + e^{-b_i x_i} \right)^{-1} - c_i \quad (5)$$

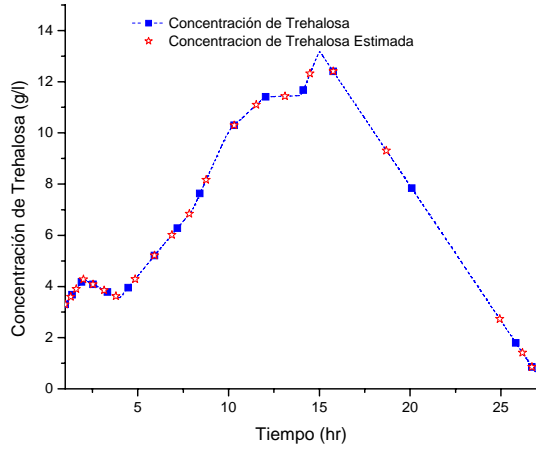
y para la función de la señal de entrada

$$\phi_{ij}(x) = \hat{a}_i \left( 1 + e^{-\sum_p \hat{b}_{ij}^p x_i} \right)^{-1} - \hat{c}_i \quad (6)$$

de tal forma que la red neuronal es clasificada como de tipo Hopfield. La estructura de esta red se muestra en la figura No. 1.

La condición en la señal de entrada  $u_t$  se asume que se encuentra acotada de tal forma  $\|u_t\|^2 \leq \bar{u}$ .

Considerando lo anteriormente descrito se puede enunciar una ley de aprendizaje [10] o actualización para las matrices de peso dada por



**Figura 7.** Concentración de Trehalosa (wT) y concentración de trehalosa estimada (wT) mediante el neuro-observador en el segundo proceso de producción de levadura.

$$\begin{aligned} \dot{W}_{1,t} &= -(\Gamma_{1,t} + \delta \Gamma_{2,t}) [W_{1,t} - W_1^*] \sigma(\hat{x}_t) \sigma(\hat{x}_t)^T - M_{1,t} \\ \dot{W}_{2,t} &= -\|\gamma(u_t)\|^2 (\Gamma_{1,t} + \delta \Gamma_{2,t}) [W_{2,t} - W_2^*] \phi(\hat{x}_t) \phi(\hat{x}_t)^T - M_{2,t} \\ W_{1,0} &= W_1^*; W_{2,0} = W_2^* \end{aligned} \quad (7)$$

donde

$$\begin{aligned} \Gamma_{1,t} &= (PN^{-T}C_0^+) (\Lambda_{\Delta C}^{-1}) (C_0^{+T}N^{-1}P) \\ \Gamma_{2,t} &= PN^{-T}N^{-1}P \\ M_{1,t} &= 2PN^{-T}\sigma(\hat{x}_t) (C_0\hat{x}_t - y_t)^T C_0^+ \\ M_{2,t} &= 2PN^{-T}\phi(\hat{x}_t) \gamma(u_t) (C_0\hat{x}_t - y_t)^T C_0^+ \end{aligned} \quad (8)$$

donde  $N = C_0^T (C_0^+)^+$  siendo la notación del signo +, denota la pseudoinversa de Penrose,  $P$  es una matriz simétrica obtenida al resolver al ecuación de Riccati dado por

$$PA + A^T P + PR_0 P + Q_0 = 0 \quad (9)$$

Por medio del anterior algoritmo se determinan los cambios de los pesos de tal manera que se ajustan a las variables del proceso estudiado, para elegir el estado para ser estimado (aquel que no puede ser medido directamente) usando los datos de los estados que si pueden ser medidos, se elige la forma de la matriz  $C_0^+$ . Por otro lado, el ajuste de la constante  $K_t$  se lleva a cabo mediante el proceso de ensayo y error y mediante la relación.

$$K_t = P^{-1} C_0^T \Lambda_{\Delta C}^{-1} \quad (10)$$

de esta manera el sistema es ajustado, en este artículo realizamos el ajuste mediante el uso del modelo mostrado en la sección anterior, posteriormente se utilizó la base de datos reales del proceso y se procedió a estimar dos variables, en este caso la concentración de biomasa y la

concentración de trehalosa, un producto que no es obtenido en forma directa, ya que se debe hacer crecer el microorganismo y después extraer el producto moliéndolo.

### 2.3 Características del Fermentador

Todos los experimentos fueron llevados a cabo con un cultivo de levadura comercial [11]. El microorganismo fue aislado para obtener la célula colonizante, así fue identificado como *Saccharomyces cerevisiae*. El medio de cultivo fue mantenido a condiciones de (glucosa de 20 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura de 10 g L<sup>-1</sup>, agar-agar 20 g L<sup>-1</sup>) a 4°C. El fermentador utilizado fue de 15 L de la marca Applikon Z81315 M607. Las condiciones experimentales fueron: temperatura de 30°C, pH=5.0, flujo de aire de 450 L h<sup>-1</sup>, oxígeno disuelto al 10 % del valor de saturación de (0.8 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> ca). El pH del cultivo fue controlado con amoníaco con agua (20 % v/v) y esta solución fue la fuente de nitrógeno del cultivo. Para la parte de lote alimentado el flujo de glucosa para el biorreactor estaba en relación con el coeficiente de respiración (RQ), el cual fue calculado de los datos de la composición del gas que fluía. La concentración de glucosa fue considerada en valores mínimos o cercanos a cero para el líquido de trabajo del biorreactor con la finalidad de minimizar la producción de alcohol.

### 3. Resultados.

La figura 2 muestra la evolución de todas las variables en el fermentador, en este caso se realizó la medición en forma de toma de muestras de las concentraciones de biomasa y trehalosa, con lo que se construyó la base para comprobar la eficiencia del neuro-observador. Los estados estimados por el neuro-observador son mostrados en la figura 3, para la biomasa en donde se observa su correspondencia con los datos medidos, cabe señalar que el neuro-observador reproduce estas evoluciones considerando la evolución de sólo los datos de la base como la concentración de sustrato y volumen en el medio y en la evolución de las variables se considera que los datos se reproducen como si fueran tomados en línea. La caída en la concentración de sustrato al final de tres horas del proceso de crecimiento de levadura produce un incremento en la trehalosa citoplasmática como se muestra en las figuras 2 y 4. Este resultado es reproducido por el estimador mostrando las curvas de los estados no medidos, es decir, concentración de trehalosa, se observa que las trayectorias se asemejan entre sí, mostrando la efectividad del neuro-observador en la estimación de este estado. Se debe recalcar que la variable de concentración de trehalosa no se encuentra definida dentro del modelo (1), que sirvió para el entrenamiento de la red, sin embargo, en el proceso de estimación entrega la evolución del estado. La repetibilidad del proceso se comprueba en la estimación que realiza el neuro-observador del segundo experimento de crecimiento de levadura, de una manera análoga el resultado para este proceso muestra tanto los estados

medidos en forma experimental como los estados estimados figuras 5, 6 y 7, donde los estados estimados se encuentran muy cercanos a la evolución de los estados experimentales proporcionando un error entre mediciones menor al 2%; en este caso las condiciones de la fermentación son diferentes y las evoluciones son también diferentes, sin embargo, el neuro-observador omite estas diferencias y estima los estados no medidos con igual exactitud.

#### 4. Conclusiones

El sistema neuro-observador realiza una estimación de las variables muy cercanas a las de la base de datos, determina la variable que no puede ser medida por medios directos en línea. Este tipo de sensor puede ser utilizado en sistemas donde la medición de una variable sea difícil de realizar o bien en sistemas cuyo modelo matemático sea complejo, permitiendo establecer una medición virtual de las variables mediante los datos de entrada y salida al proceso. Este trabajo puede servir de base para la realización de sensores virtuales en diferentes campos de investigación.

#### Agradecimientos

Los autores agradecemos a la SEPI-IPN, COFAA por el apoyo a través de los proyectos para la realización de este trabajo.

#### Referencias

- [1] J. de A Adilson, R. M. F., Soft sensors development for on-line bioreactor state estimation, *Computers and Chemical Engineering*, **24**, 1099 (2000).
- [2] L. Fortuna, S. Grazini, Soft sensors for monitoring and control of industrial processes, 1st ed. (New York, Springer, 2006).
- [3] A. Cabrera, A. Poznyak, T. Poznyak, J. Aranda, Identification of a fed batch fermentation process: comparison of computational and laboratory experiments, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **24**, 319 (2002).
- [4] O. Sotomayor, S. W. P., Software sensor for on-line estimation of the microbial activity in activated sludge systems, *The instrumentation, systems, and automation society*, **41**, 127 (2001).
- [5] L. Hudson, *Neural Network and artificial intelligence for biomedical engineering*, (Wiley-IEEE Press, 2000).
- [6] S. Haykin, *Neural Networks: A comprehensive Foundation*. New York, (New York, Cambridge University Press, 1994).
- [7] A. V. W. Ph. Bogaerts, Parameter identification for state estimation - application to bioprocess software sensor, *Chemical Engineering Science*, **59**, 2465 (2004).
- [8] B. McNeil, L. M. Harvey, *Fermentation a Practical Approach*. (New York, IRL Press, 1990).
- [9] N. G. McDuffie, *Biorreactor Design*. (Oxford, Butterworth-Heinemann., 1991).
- [10] A. S. Poznyak, E.N. Sanchez and W. Yu, *Dynamic Neural Networks for Nonlinear Control: Identification, State Estimation and Trajectory Tracking*. 1 st ed. (New Jersey, World Scientific, 2001).
- [11] J. S. Aranda, E. Salgado and P. Taillandier, *Biochem. Eng. J.*, **17**, 129 (2004)