



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

DISEÑO Y SIMULACIÓN DE UN SISTEMA PARA EL CONTROL DEL  
ESTADO METABÓLICO DE CÉLULAS ANIMALES EN CULTIVO

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO Y  
MAGISTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA MENCIÓN QUÍMICA

DAMIÁN FRANCISCO BAEZA FERNÁNDEZ

PROFESORES GUÍA:

ZIOMARA P. GERDTZEN HAKIM

J. CRISTIAN SALGADO HERRERA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

LEANDRO HERRERA ZEPPELIN

M. ELENA LIENQUEO CONTRERAS

CLAUDIA ALTAMIRANO GÓMEZ (PUCV)

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos  
FONDECYT 11080016 y 11090268

SANTIAGO DE CHILE

AGOSTO 2012

# Resumen

Resultados experimentales señalan que las células animales pueden alcanzar múltiples estados metabólicos con distintas razones de tasa de producción de lactato a tasa de consumo de glucosa ( $\Delta L/\Delta G$ ), lográndose razones muy por debajo de la razón estequiométrica igual a 2 [ $mol/mol$ ].

En el presente trabajo de tesis se planteó y ajustó un modelo metabólico que describe el metabolismo de un cultivo de control y se corroboró su falta de capacidad de alcanzar más de un estado estacionario a través de la comparación con datos experimentales y un análisis de estabilidad posterior. La simplificación de dicho modelo inicial, la obtención de un único punto atractor como estado estacionario y el análisis de variaciones de niveles de expresión génica de ciertas enzimas glicolíticas permitió el planteamiento de un modelo de regulación que varía la concentración de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) con el cual se simuló un cultivo hasta alcanzar estado metabólico alterado ( $\Delta L/\Delta G < 0,1$  [ $mol/mol$ ]).

El modelo metabólico regulado se utilizó para la simulación de un cultivo continuo alterado para el diseño y ajuste de controladores proporcional (P), basado en modelo lineal y basado en modelo no lineal para la regulación de la concentración de glucosa de entrada frente a perturbaciones en el crecimiento celular. La simulación de la respuesta de lazo cerrado del sistema mostró una fuerte interacción de lazos con el lazo de control de crecimiento celular y los análisis de robustez y de sensibilidad permitieron concluir que el controlador P posee una mayor robustez que el controlador basado en modelo lineal, pero que este último posee una mejor respuesta frente a limitantes que podrían existir a nivel industrial. Por otra parte, el pobre desempeño del controlador basado en modelo no lineal demuestra un desafío de ajuste del mismo producto de las múltiples posibles fuentes del mal desempeño.

Como línea de trabajo futuro se puede mejorar la respuesta simulada de los controladores basados en modelo, analizando la eliminación de offset para el caso lineal y los problemas de rendimiento del basado en modelo no lineal.

Experimental data indicate that mammalian cells can reach multiple steady states having distinct ratios of lactate production rate to glucose consumption rate ( $\Delta L/\Delta G$ ), reaching ratios well below the stoichiometric ratio of 2 [*mol/mol*].

In the following thesis a metabolic model that describes the metabolic response of a control culture was proposed and fitted, and its lack of capacity of reaching more than one steady state was verified by means of comparison with experimental data and further through a stability analysis. The simplification of said initial model, the obtainment of a sole attractor point as steady state and the analysis of the variation of gene expression levels of certain glycolytic enzymes supported the establishment of a regulation model that varies the concentration of the lactate dehydrogenase (LDH) enzyme, with which a culture presenting a metabolic shift was simulated and a distinct steady state was reached ( $\Delta L/\Delta G < 0,1$  [*mol/mol*]).

The regulated metabolic model was used to simulate a continuous culture with a metabolic shift for the design and parametrization of a proportional (P), linear model based and non linear based controllers for the regulation of glucose feed concentration faced with disturbances related to cell growth. Closed loop response simulations show a strong loop interaction with the cell growth control loop, and robustness and sensibility analysis concluded that the P controller is more robust than a linear model based controller, but the latter adapts better to limitations that could exist on an industrial scale. Moreover, the poor response observed for the non linear model based controller gives way to an additional parametrization problem due to the many possible sources of poor performance.

Guidelines for future work can be related to improving the simulated response of the model based controllers through possible studies of offset elimination for the linear based and performance problems of the non linear based.

*A Tomás*

# Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos los involucrados en la etapa universitaria de mi vida, gracias a los que conocí durante los diferentes tramos del plan de estudios; a mis amigos de primer año, a mis amigos de especialidad y a los que conocí por esas casualidades de la vida. No se me puede olvidar tampoco la casa de estudios que, a pesar de que la facultad de ciencias físicas y matemáticas corresponde a un espacio alejado del resto de la universidad, da cabida para la pluralidad que existe en nuestro país. Por lo mismo, quiero agradecer a mis padres por haberme impulsado a estudiar en la Universidad de Chile.

Agradezco a mis profesores guías por la paciencia y el apoyo que me entregaron durante mi trabajo de tesis, gracias por tener una perspectiva clara y distinta de lo que son las enseñanzas del departamento y por su calidez a la hora de responder las consultas.

Agradezco también a los proyectos de iniciación FONDECYT 11080016 y 11090268 por el financiamiento del proyecto en el cual me vi involucrado.

Finalmente, a todos los artistas que conformaron la biblioteca de música que escuché durante todo el tiempo que estuve escribiendo la tesis, se agradece la inspiración.

# Índice General

<b>Resumen</b>	<b>I</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>IV</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Organización de la tesis . . . . .	3
1.2. Objetivo de la tesis . . . . .	4
1.3. Objetivos específicos de la tesis . . . . .	4
<b>2. Antecedentes</b>	<b>5</b>
2.1. Metabolismo en células animales . . . . .	5
2.2. Antecedentes biológicos de la alteración del estado metabólico en células animales	6
<b>3. Modelo metabólico celular animal</b>	<b>9</b>
3.1. Antecedentes . . . . .	9
3.2. Descripción matemática de metabolismo celular animal . . . . .	10
3.3. Modelación de sistema bio-reactor-cultivo . . . . .	11
3.4. Condiciones de simulación . . . . .	14
3.5. Ajuste de parámetros . . . . .	18
3.5.1. Metodología de ajuste de parámetros . . . . .	20
3.5.2. Resultados de ajuste de parámetros y simulación con parámetros ajustados	22
3.6. Análisis estadístico de parámetros ajustados . . . . .	25
3.6.1. Prueba de t de Student . . . . .	25
3.6.2. Resumen de parámetros ajustados y resultados de análisis estadístico . . .	27
3.7. Análisis de estabilidad del estado estacionario del sistema . . . . .	29

3.7.1.	Análisis de estabilidad por medio de valores propios . . . . .	29
3.7.2.	Análisis de estabilidad por medio de diagrama de fases . . . . .	31
3.8.	Discusión de resultados de la simulación del modelo ajustado . . . . .	32
<b>4.</b>	<b>Simplificación del modelo metabólico</b>	<b>35</b>
4.1.	Motivación . . . . .	35
4.2.	Descripción del modelo . . . . .	35
4.2.1.	Vías metabólicas . . . . .	35
4.2.2.	Cinéticas enzimáticas . . . . .	36
4.3.	Ajuste de parámetros . . . . .	40
4.3.1.	Resultados de ajuste de parámetros y simulación con parámetros ajustados	40
4.3.2.	Análisis estadístico de parámetros ajustados . . . . .	42
4.4.	Análisis de estabilidad del estado estacionario del sistema . . . . .	44
4.5.	Discusión de resultados de simplificación de modelo . . . . .	45
<b>5.</b>	<b>Modelo de regulación</b>	<b>47</b>
5.1.	Motivación . . . . .	47
5.2.	Análisis de sensibilidad del modelo metabólico inicial . . . . .	48
5.3.	Planteamiento de modelo de regulación génica inicial . . . . .	53
5.4.	Modelo de regulación . . . . .	55
5.4.1.	Función de Hill . . . . .	56
5.4.2.	Ajuste de parámetros de modelo de regulación . . . . .	57
5.5.	Validación de modelo de regulación génica . . . . .	59
5.5.1.	Comparación con datos experimentales . . . . .	59
5.5.2.	Cálculo de razón estequiométrica $\Delta L/\Delta G$ . . . . .	62
5.5.3.	Reversibilidad de estado metabólico . . . . .	65
5.6.	Discusión de resultados de simulación con modelo de regulación . . . . .	67
<b>6.</b>	<b>Control del estado metabólico</b>	<b>70</b>
6.1.	Motivación . . . . .	70

6.2.	Antecedentes . . . . .	71
6.2.1.	Características del sistema . . . . .	71
6.2.2.	Objetivo de control . . . . .	72
6.2.3.	Análisis de respuesta de lazo abierto . . . . .	74
6.3.	Criterios de diseño de controladores . . . . .	85
6.4.	Control clásico . . . . .	86
6.4.1.	Diseño de controlador proporcional . . . . .	88
6.4.2.	Resultados de ajuste . . . . .	89
6.5.	Control avanzado . . . . .	94
6.5.1.	Control óptimo . . . . .	95
6.5.2.	Controlador basado en modelo lineal . . . . .	98
6.5.3.	Controlador basado en modelo no lineal . . . . .	112
6.6.	Análisis de robustez de controladores . . . . .	126
6.6.1.	Controlador proporcional . . . . .	126
6.6.2.	Controlador basado en modelo lineal . . . . .	128
6.7.	Análisis de sensibilidad de controladores . . . . .	131
6.7.1.	Restricción de concentraciones de glucosa . . . . .	132
6.7.2.	Aumento de intervalo de muestreo . . . . .	137
6.7.3.	Aumento de intervalo de muestreo y restricción de concentraciones de glucosa . . . . .	139
6.8.	Discusiones . . . . .	141
<b>7.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>146</b>
	<b>Glosario</b>	<b>151</b>
	<b>Referencias</b>	<b>156</b>
	<b>Apéndice</b>	<b>167</b>
A.	Ecuaciones de balances de masa utilizadas para el modelo metabólico de una célula animal en cultivo . . . . .	167

A .1.	Glicólisis . . . . .	167
A .2.	Pentosa fosfato . . . . .	169
A .3.	Ciclo TCA . . . . .	170
A .4.	Transporte y metabolismo de amino ácidos . . . . .	171
B .	Velocidades de reacción y parámetros para el modelo metabólico de una célula animal	172
C .	Parámetros de simulación . . . . .	193
D .	Códigos MATLAB . . . . .	197

# Índice de figuras

3.1. Vías metabólicas del metabolismo celular de una célula animal. . . . .	11
3.2. Diagrama del sistema de reactor con cultivo celular operando en forma continua. .	12
3.3. Concentraciones experimentales de glucosa, lactato y de células del cultivo de control.	15
3.4. Razón $\Delta L/\Delta G$ observado experimentalmente para el cultivo de control. . . . .	16
3.5. Concentraciones experimentales de glucosa, lactato y de células del cultivo alterado.	17
3.6. Razón $\Delta L/\Delta G$ observado experimentalmente para el cultivo alterado. . . . .	17
3.7. Simulación de cultivo de control con modelo sin ajustes. . . . .	18
3.8. Simulación de cultivo de control con modelo ajustado. . . . .	23
3.9. Simulación de cultivo alterado con modelo ajustado. . . . .	24
3.10. Diagrama de fases para el estado estacionario del modelo metabólico inicial. . . . .	32
4.1. Modelo metabólico simplificado. . . . .	36
4.2. Simulación del cultivo de control con el modelo simplificado ajustado. . . . .	41
4.3. Simulación del cultivo alterado con el modelo simplificado ajustado. . . . .	41
4.4. Simulación del cultivo de control con el modelo simplificado sin ajustar. . . . .	43
4.5. Diagrama de fases para el estado estacionario del modelo metabólico simplificado.	45
5.1. Diagrama con ubicación de enzimas afectadas dentro de la cadena de reacciones metabólicas. . . . .	50
5.2. Glucosa extra celular utilizada para análisis enzimático de sensibilidad. . . . .	51
5.3. Menores valores de MSE para las concentraciones de lactato. . . . .	52
5.4. Menores valores de MSE para las concentraciones de piruvato. . . . .	52
5.5. Simulación de cultivo alterado con implementación de función $F(t)$ . . . . .	54

5.6. Función de Hill con diferentes valores de coeficiente de Hill (n) y $K_X = 0,5$ . . . . .	57
5.7. Resultados de simulación de modelo con modelo de regulación génica para LDH en cultivo alterado. . . . .	58
5.8. Comparación de curvas de glucosa y lactato simulados con modelo metabólico con regulación con cultivo celular alterado. . . . .	61
5.9. Comparación de curva de concentración celular simulada con modelo metabólico con regulación con cultivo celular alterado. . . . .	62
5.10. Comparación de curva de $\Delta L/\Delta G$ simulada con cultivo celular alterado. . . . .	62
5.11. Resultados de cálculo de $\Delta L/\Delta G$ para cultivo de control simulado. . . . .	64
5.12. Resultados de cálculo de $\Delta L/\Delta G$ para cultivo alterado simulado. . . . .	64
5.13. Resultados de cálculo de $\Delta L/\Delta G$ de un cultivo alterado frente a pulsos de glucosa (valores experimentales). . . . .	66
5.14. Resultados de cálculo de $\Delta L/\Delta G$ de un cultivo alterado simulado frente a pulsos de glucosa (acercamiento de eje). . . . .	66
5.15. Acercamiento de resultados de cálculo de $\Delta L/\Delta G$ de un cultivo alterado simulado frente a pulsos de glucosa (acercamiento de eje). . . . .	67
6.1. Representación gráfica del proceso y las diferentes variables que lo afectan. . . . .	72
6.2. Montaje experimental con los lazos comunes de control utilizados. . . . .	73
6.3. Montaje a simular con el lazo de control a diseñar. . . . .	74
6.4. Origen de perturbaciones a analizar. . . . .	75
6.5. Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada. . . . .	76
6.6. Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un anti-escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada. . . . .	77
6.7. Efecto de la perturbación por medio de un escalón y anti-escalón en el coeficiente de dilución. . . . .	78
6.8. Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución. . . . .	79

6.9. Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un anti-escalón de un 10% del coeficiente de dilución. . . . .	79
6.10. Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un escalón de un 10% de la tasa de crecimiento celular máximo $\mu_{max}$ . . . . .	81
6.11. Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un anti-escalón de un 10% de la tasa de crecimiento celular máximo $\mu_{max}$ . . . . .	81
6.12. Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un escalón de un 10% de la constante de activación de crecimiento celular por presencia de glucosa, $K_{glc}^S$ . . . . .	82
6.13. Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un anti-escalón de un 10% de la constante de activación de crecimiento celular por presencia de glucosa, $K_{glc}^S$ . . . . .	83
6.14. Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un escalón de un 10% de la constante de activación de crecimiento celular por presencia de glucosa, $K_{glc}^S$ (aumento de intervalo de simulación). . . . .	83
6.15. Respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada con la inclusión del lazo de control proporcional de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular abierto. . . . .	90
6.16. Acercamiento de respuesta del sistema frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada con la inclusión del lazo de control proporcional de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular abierto. . . . .	91
6.17. Concentraciones de glucosa y lactato extracelular y concentración celular simulada para la respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada. . . . .	91
6.18. Respuesta del sistema frente a un escalón de un 10% del parámetro $\mu_{max}$ con la inclusión del lazo de control proporcional de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	92

6.19. Respuesta optimizada del sistema obtenida por minimización del ITAE de la respuesta frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada con la inclusión del lazo de control proporcional de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	93
6.20. Predicción de modelo de proceso. . . . .	96
6.21. Lazo de control con controlador basado en modelo. . . . .	97
6.22. Esquema de proceso de identificación de sistemas. . . . .	101
6.23. Muestreo utilizado para la estimación de modelo ARX (variables de desviación). . . . .	102
6.24. Comparación de simulación de $\Delta L/\Delta G$ con modelo ARX y muestreo. . . . .	103
6.25. Respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular abierto. . . . .	106
6.26. Respuesta del sistema con $\lambda = 0,1$ frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular abierto. . . . .	106
6.27. Respuesta del sistema frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular abierto. . . . .	107
6.28. Concentraciones de glucosa y lactato extracelular y concentración celular simulada para la respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada. . . . .	108
6.29. Respuesta del sistema frente a un escalón de un 10% de la tasa de crecimiento celular máxima, $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	109
6.30. Respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% del parámetro $\mu_{max}$ con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	110

6.31. Respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 30% del offset seguido por un escalón de un 10% del parámetro $\mu_{max}$ con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	111
6.32. Respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% del parámetro $\mu_{max}$ seguido por un escalón de un 10% del offset con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	111
6.33. Estructura básica de una red neuronal. . . . .	113
6.34. Red perceptrón multi-capa. . . . .	114
6.35. Red perceptrón multi-capa ligada. . . . .	114
6.36. Red cascada completamente conectada. . . . .	115
6.37. Estructura básica de la red neuronal a construir. . . . .	117
6.38. Conjunto de datos utilizados para la identificación de sistemas con red neuronal (datos no escalados). . . . .	118
6.39. Simulación de conjunto de muestra utilizado para el entrenamiento de la red neuronal óptima con red neuronal de 1 capa oculta con 24 neuronas (datos escalados). . . . .	119
6.40. Estructura de la red neuronal óptima. . . . .	120
6.41. Respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada con la inclusión del lazo de control basado en modelo no lineal de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular abierto. . . . .	121
6.42. Concentraciones de glucosa y lactato extracelular y concentración celular simulada para la respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada. . . . .	122
6.43. Respuesta optimizada del sistema frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución. . . . .	122
6.44. Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución. . . . .	123

6.45. Respuesta del sistema frente a un escalón de un 10 % de la tasa de crecimiento celular máxima, $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	124
6.46. Respuesta del sistema frente a un escalón de un 10 % de la tasa de crecimiento celular máxima, $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	125
6.47. Respuesta del sistema frente a un escalón de un 5 % de la tasa de crecimiento celular máxima, $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	126
6.48. Respuesta del sistema frente a un escalón de un 15 % de la tasa de crecimiento celular máxima, $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	127
6.49. Respuesta del sistema frente a un escalón de un 20 % de la tasa de crecimiento celular máxima, $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	127
6.50. Respuesta del sistema frente a un escalón de un 30 % de la tasa de crecimiento celular máxima, $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	128
6.51. Respuesta del sistema frente a un escalón de un 5 % de la tasa de crecimiento celular máxima, $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	129
6.52. Respuesta del sistema frente a un escalón de un 15 % de la tasa de crecimiento celular máxima, $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	129
6.53. Respuesta del sistema frente a un escalón de un 20 % de la tasa de crecimiento celular máxima, $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	130
6.54. Dependencia del offset de la magnitud de la perturbación de la tasa máxima de crecimiento celular $\mu_{max}$ . . . . .	130

6.55. Respuesta del controlador proporcional discreto utilizando un intervalo de muestreo de 0,004 [hr], frente a una perturbación de un 10 % de $\mu_{max}$ . . . . .	133
6.56. Acercamiento de respuesta del controlador proporcional discreto utilizando un intervalo de muestreo de 0,004 [hr], frente a una perturbación de un 10 % de $\mu_{max}$ . . . . .	133
6.57. Comparación de dinámica de variable de salida del controlador proporcional con su aproximación discreta utilizando un intervalo de muestreo de 0,004 [hr], frente a una perturbación de un 10 % de $\mu_{max}$ . . . . .	134
6.58. Respuesta del controlador basado en modelo lineal frente a una perturbación de un 10 % de $\mu_{max}$ con una alimentación de concentraciones restringidas de glucosa. . . . .	135
6.59. Respuesta del controlador proporcional discreto con un intervalo de muestreo de 0,004 [hr], frente a una perturbación de un 10 % de $\mu_{max}$ con una alimentación de concentraciones restringidas de glucosa. . . . .	136
6.60. Acercamiento de respuesta del controlador proporcional discreto con un intervalo de muestreo de 0,004 [hr], frente a una perturbación de un 10 % de $\mu_{max}$ con una alimentación de concentraciones restringidas de glucosa. . . . .	136
6.61. Comparación de dinámica de variable de salida del controlador proporcional con su aproximación discreta utilizando un intervalo de muestreo de 0,033 [hr], frente a una perturbación de un 10 % del coeficiente de dilución. . . . .	138
6.62. Respuesta del controlador basado en modelo lineal de la Figura 6.30, con el intervalo de muestreo modificado a 1 [hr], frente a un escalón de un 10 % de la tasa de crecimiento celular máxima, $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	139
6.63. Respuesta del controlador basado en modelo lineal de la Figura 6.30, con el intervalo de muestreo modificado a 1 [hr] y restricciones sobre la concentración de glucosa disponible, frente a un escalón de un 10 % de la tasa de crecimiento celular máxima, $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado. . . . .	140

# Capítulo 1

## Introducción

El crecimiento de la industria biotecnológica en la última década no ha sido menor, alcanzando casi un 16 % solamente en EE.UU. En particular, las industrias biotecnológicas relacionadas con los productos farmacéuticos han aumentado en casi un 2 % en 5 años. Más allá de que los bio-procesos llevan más de una década instaurados dentro de la industria, el aumento de una industria que tiene una capitalización de mercado que rodea los 360.000 millones de dolares ha generado interés en los estudios relacionados con dicha área [1].

Dentro de los procesos biotecnológicos, los cultivos celulares animales son relevantes en la industria farmacéutica debido a que participan en el proceso productivo de una gran cantidad de productos farmacéuticos entre los que se encuentran las enzimas, anticuerpos monoclonales, vacunas virales, hormonas e inmunoreguladores tales como IgG, lactoferrina, clorofila, vacunas contra la influenza, etc [2–5]. Sin embargo, los cultivos donde se producen bio-farmacéuticos generalmente requieren de condiciones de cultivo específicas, lo que hace que sean susceptibles a una baja productividad o una muerte celular significativa debido a leves variaciones en las condiciones de operación.

El alto valor de los productos farmacéuticos otorga una gran importancia a la optimización de los bio-procesos involucrados en la producción de los mismos. Por esta razón, la investigación y desarrollo ha orientado los estudios bioquímicos hacia la comprensión del metabolismo celular y las dinámicas del crecimiento [4, 6], así como también las condiciones de cultivo que favorecen la formación de los productos deseados [2, 7, 8].

En un cultivo celular, la cantidad de producto metabólico deseado es proporcional al número de células presentes en un cultivo. Además, a partir del conocimiento básico de las reacciones bioquímicas aparecen la concentración de sustrato, las condiciones de reacción o cultivo y la existencia o

no de un producto inhibitorio como factores incidentes en la dinámica del crecimiento celular. Es con esto que se justifica la obtención de una alta concentración celular como un objetivo establecido en el diseño de los bio-procesos, considerándose un punto de operación deseado.

La dependencia del crecimiento celular de la concentración de productos metabólicos inhibidores genera la posibilidad de aumentar la concentración celular por medio de la disminución de los mismos en el cultivo. Sin embargo, la dificultad y el alto costo de remover selectivamente un compuesto en un cultivo crea la inquietud de buscar formas alternativas para la misma finalidad, generándose el desafío de controlar las condiciones de cultivo con la finalidad de obtener bajas concentraciones de producto inhibitorio.

El estudio del problema descrito ha revelado que las células animales son capaces de alterar su respuesta metabólica frente a una determinada concentración de glucosa y alcanzar un estado metabólico alterado con una menor producción de lactato, metabolito inhibitor del crecimiento celular animal [9].

La sensibilidad de los cultivos celulares animales frente a las condiciones de cultivo pone exigencias sobre el diseño de controladores para mantener un estado metabólico bajo o alterado, en donde en la literatura se ha catalogado un estado como alterado cuando la proporción de la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa en un cultivo es inferior a la razón de 0,1 [ $mol/mol$ ], muy por debajo de la razón estequiométrica igual a 2,0 [ $mol/mol$ ] que se ha observado bajo condiciones de cultivo sin mayor restricción de sustrato [12]. Esto genera un desafío importante al aplicar las teorías de control para mantener un cultivo, sensible a las condiciones de cultivo, en un estado metabólico alterado, un problema de control de procesos que no ha sido abordado anteriormente. Por otra parte, el diseño de controladores para determinados bio-procesos, en donde el fenómeno bioquímico que ocurre al interior de un bio-reactor no es de conocimiento absoluto, ha motivado la utilización de modelos dinámicos para simular un sistema biológico complejo. La descripción de un sistema biológico por medio de un modelo dinámico permite la simulación de la respuesta dinámica del sistema frente a una determinada señal de entrada evitando el costo asociado a la recopilación de datos experimentales, siempre y cuando el modelo represente adecuadamente el proceso y/o fenómeno bioquímico abordado.

Sumado al creciente interés por el modelamiento de bio-procesos se encuentra el diseño de controladores de distinta índole para regular diferentes condiciones de cultivo que requieren de especial atención debido a la sensibilidad de estos cultivos frente a ellas. Con un modelo matemático

de proceso es posible diseñar controladores de diferente índole mediante los controladores clásicos proporcional (P), proporcional derivativo (PD), proporcional integral (PI) y proporcional integral derivativo (PID), y controladores de técnica avanzada como lo son el control óptimo y el control difuso, tarea que se ha llevado a cabo y se ha aplicado en la industria [10].

## **1.1. Organización de la tesis**

Esta tesis posee la siguiente estructura:

- En el segundo capítulo se presentan los antecedentes bioquímicos relacionados con el fenómeno de la variación del estado metabólico en células animales. Se plantean los antecedentes teóricos de la producción de lactato y los antecedentes experimentales que enmarcan la variación del estado metabólico, fenómeno a simular por medio de un modelo metabólico.
- En el tercer capítulo se muestra la construcción del modelo metabólico inicial que se utilizó para el desarrollo del sistema biológico completo. También se incluyen la metodología de ajuste de parámetros del modelo metabólico inicial y un análisis de estabilidad del mismo que corrobora la falta de capacidad del modelo inicial de alcanzar más de un estado estacionario.
- El cuarto capítulo incluye los criterios de simplificación del modelo metabólico construido en el tercer capítulo, su ajuste y un análisis de estabilidad que justifica la necesidad de incluir un modelo de regulación para describir el fenómeno de alteración de estado metabólico.
- El quinto capítulo describe los antecedentes biológicos relacionados con el fenómeno de la variación del estado metabólico y documenta la integración del modelo de regulación génica en el modelo matemático del cuarto capítulo para poder describir el fenómeno de variación del estado metabólico. Se presentan los supuestos realizados para el planteamiento de este modelo de regulación y los resultados obtenidos de la comparación con resultados experimentales que presentan diferentes modos de operación a lo largo del cultivo. El modelo final obtenido será utilizado para la simulación de un sistema de bio-reactor continuo cuya alimentación de glucosa será controlada por un controlador cuyo diseño se presenta en el capítulo sexto.
- En el sexto capítulo se presenta el diseño y simulación de tres controladores de la alimentación de glucosa a un cultivo animal para la regulación de su estado metabólico. Se simuló

y analizó la respuesta del sistema de lazo abierto a fin de establecer la perturbación más relevante para el sistema utilizando el modelo metabólico desarrollado en los capítulos anteriores, haciendo hincapié en la reversibilidad de la variación del estado metabólico. Se resuelve el problema de diseño del controlador de la concentración de glucosa bajo la premisa del problema servo frente a una perturbación de un 10% del coeficiente de dilución. Los controladores diseñados incluyen un controlador proporcional, un controlador basado en modelo lineal y un controlador basado en modelo no lineal, todos ajustados por medio de la minimización del error integral ponderado por el tiempo (ITAE).

## **1.2. Objetivo de la tesis**

El objetivo principal de la presente tesis es el diseño de un sistema de control que permita obtener la estrategia óptima de alimentación de glucosa a un reactor continuo con un cultivo de células animales a fin de mantener dicho cultivo celular operando bajo las condiciones de operación necesarias para mantener un estado metabólico alterado.

## **1.3. Objetivos específicos de la tesis**

Los objetivos específicos de la presente tesis son los siguientes:

1. Establecer un modelo metabólico y simular un cultivo continuo con regulación génica para células CHO.
2. Simular un cultivo de células CHO en un reactor continuo bajo diferentes condiciones de operación (batch, continuo y fed-batch).
3. Diseñar diferentes estrategias de control de la alimentación del cultivo para la regulación del estado metabólico en células CHO.
4. Analizar y comparar la respuesta de diferentes controladores frente al problema de mantener el cultivo celular en un estado metabólico alterado.

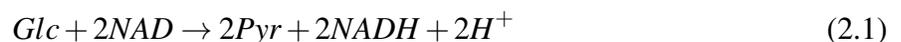
# Capítulo 2

## Antecedentes

### 2.1. Metabolismo en células animales

El metabolismo celular animal puede ser considerado como un circuito de reacciones metabólicas, catalizadas enzimáticamente y de alta complejidad, que puede comenzar con la entrada del sustrato principal al citoplasma de una célula animal. Junto con existir una red de reacciones químicas que se correlacionan para formar la completitud del metabolismo existen metabolitos participantes de dichas reacciones que se relacionan entre sí por medio de estas reacciones catalizadas enzimáticamente.

La glicólisis es la vía metabólica que abarca la transformación de glucosa en piruvato para formar simultáneamente 2 moléculas de adenosin trifosfato (ATP), compuesto valioso porque se relaciona con la producción de energía para que la célula pueda llevar a cabo sus funciones básicas. La reacción global que ocurre en la glicólisis es la siguiente:



de donde cada molécula de glucosa forma dos moléculas de piruvato.

El piruvato es considerado uno de los metabolitos más relevantes del metabolismo celular animal por ser un compuesto que relaciona tres grandes hitos metabólicos: el consumo de glucosa, la producción de lactato y el transporte de piruvato al compartimento mitocondrial que luego participará en el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). El piruvato regula el primero de estos hitos pues la producción de piruvato ocurre de manera irreversible en la reacción catalizada por la enzima piruvato quinasa (PK, E.C.# 2.7.1.40 [11]) y se ha observado en células de riñón de hamster bebé (BHK) que bajo condiciones comunes de cultivo un 69% del total de glucosa consumida es utilizada para

producir piruvato [13]. La producción de lactato y el transporte de piruvato al espacio mitocondrial son reacciones paralelas lo que hace que teóricamente el flujo de piruvato hacia la mitocondria, al igual que la cantidad de piruvato utilizado para producir lactato, podría variar dependiendo de la concentración de enzima catalizadora de la reacción de generación de lactato y de la actividad de los canales de transporte de piruvato hacia la mitocondria. Por otra parte, la formación de lactato es producto de la reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH, E.C.# 1.1.1.27 [11]) y consiste en la siguiente reacción de óxido-reducción:



con lo que, teóricamente, la relación estequiométrica máxima entre la glucosa y el lactato ( $\Delta L/\Delta G$ ) es 2,0. Sin embargo, se ha observado experimentalmente que dicha relación estequiométrica, en el estado estacionario del cultivo celular continuo, puede disminuir alcanzando valores de hasta 0,03 [*mol/mol*] y que varía dependiendo de las condiciones de cultivo que llevaron a dicho estado estacionario, como por ejemplo el uso de diferentes concentraciones de alimentación de glucosa o glutamina y/o duración de modos de operación batch, fed-batch y/o continuo [12].

## **2.2. Antecedentes biológicos de la alteración del estado metabólico en células animales**

Estudios relacionados con el análisis de la respuesta metabólica de una célula animal han concluido que frente a concentraciones inferiores a 1,24 [*mM*] de glucosa residual se observa una variación en los flujos específicos de producción de lactato y de consumo de glucosa [13]. Sumado a esto, el análisis de flujos metabólicos indica que las mismas concentraciones bajas afectan la proporción de piruvato que pasa a la mitocondria y a formar lactato. Se ha observado que frente a una concentración de 0,14 [*mM*] de glucosa la célula produce casi un 80% menos de lactato y la entrada de piruvato al ciclo TCA pasa a ser 132 veces lo que sería con una concentración de 1,24 [*mM*] de glucosa [13]. Los análisis de flujos metabólicos han confirmado que las células animales, bajo condiciones de baja concentración de glucosa, distribuyen de distinta manera los productos metabólicos, dando pie a un metabolismo más eficiente pues se favorece las reacciones de producción de adenosin trifosfato (ATP), metabolito vital para la producción de energía de la célula, y no las de lactato [14].

La variación de los flujos metabólicos en células animales expuestas a bajas concentraciones residuales de glucosa apoyan los hallazgos experimentales de que la razón  $\Delta L/\Delta G$  puede alcanzar valores de hasta 0,03 [*mol/mol*] [12].

A fin de entender el fenómeno de la variación del estado metabólico en una célula animal es necesario entender los antecedentes biológicos que permiten definir un criterio respecto a lo que se puede considerar una variación del estado metabólico en estas células. En primer lugar, la alteración del estado metabólico en una célula animal tiene como respuesta más representativa la variación de la razón estequiométrica  $\Delta L/\Delta G$ . Bajo este criterio el estado metabólico de una célula se puede clasificar en tres grupos: normal o alto ( $\Delta L/\Delta G \geq 1$  [*mol/mol*]), intermedio ( $1,0$  [*mol/mol*]  $> \Delta L/\Delta G > 0,1$  [*mol/mol*]) y alterado o bajo ( $0,1 \leq \Delta L/\Delta G$ ) [12]. Si bien el fenómeno de variación del estado metabólico parece ser netamente a nivel de regulación metabólica, se ha constatado experimentalmente que la respuesta metabólica diferencial entre un cultivo en un estado u otro va de la mano con una variación de niveles de expresión de genes asociados a la producción de ciertas enzimas, en particular en glicólisis [15].

Se han realizado comparaciones de los niveles de expresión de los genes asociados a algunas de las enzimas que participan en la glicólisis a fin de tener una noción de qué genes sufren de una variación de los niveles de expresión al variarse el estado metabólico. Los resultados de estos análisis con las enzimas afectadas se encuentran resumidos en la Tabla 2.1, en donde se detalla si los niveles de expresión de genes asociados a ciertas enzimas sufren variación al estar en un estado metabólico alterado.

Tabla 2.1: Resumen análisis de variación de niveles de expresión génicos de un cultivo con su estado metabólico alterado en comparación a un cultivo sin variación de su estado metabólico [15].

Enzima	Análisis Proteómico	Análisis Génico		
		PCR Tiempo Real	GeneChip	Microarray cDNA
TPI	Si hay variación	Si hay variación	Si hay variación	Si hay variación
PGM	Si hay variación	Si hay variación	Si hay variación	No hay variación
EN	Si hay variación	Si hay variación	Si hay variación	Si hay variación
LDH	Si hay variación	Si hay variación	No hay variación	Si hay variación
PK	No hay variación	Si hay variación	Si hay variación	Si hay variación
PFK	No hay variación	Si hay variación	Si hay variación	No hay variación

De la Tabla 2.1 se puede concluir, al comparar un estado metabólico de control con uno alterado, que el fenómeno de la variación de estado metabólico no ocurre únicamente a nivel metabólico. El hecho de que el fenómeno se lleve a cabo también a nivel de expresión de genes asociados a

determinadas enzimas sugiere que podría haber una variación en la cantidad de enzimas afectadas.

# Capítulo 3

## Modelo metabólico celular animal

### 3.1. Antecedentes

Los altos costos que implica llevar a cabo estudios experimentales relacionados con la ingeniería metabólica han generado un cambio en el enfoque de los mismos estudios. Con lo anterior, el planteamiento de modelos matemáticos que describen la dinámica del metabolismo celular ha tenido un mayor énfasis en la última década. El planteamiento de modelos matemáticos se ha aplicado para diversas líneas celulares, desde líneas de metabolismo simple como es el caso de las bacterias, hasta modelos metabólicos para redes metabólicas complejas como son las de las células animales [4, 6, 16–19].

Para el caso particular de la presente tesis se ha optado por abordar el modelamiento del metabolismo celular de línea celular animal y específicamente de la cepa de células de ovario de hamster chino (CHO). La revisión exhaustiva de la literatura permite concluir que los modelos metabólicos poseen vías metabólicas comunes que se diferencian tanto en el orden secuencial de sus reacciones, como también en los parámetros utilizados para representar las cinéticas enzimáticas involucradas. Por lo mismo se hace necesario tomar una base metabólica correcta de la línea celular a simular para desarrollar el sistema de ecuaciones que representa un sistema bioquímico complejo como es el de un cultivo celular animal en un bio-reactor, esto con la finalidad de obtener una respuesta simulada de acuerdo a lo observado experimentalmente. Además, de la literatura se pueden rescatar numerosos modelos que simulan el metabolismo celular animal pero ninguno aborda específicamente el problema de trazar un modelo metabólico capaz de seguir la dinámica de un cultivo celular que cambia de estado metabólico.

## 3.2. Descripción matemática de metabolismo celular animal

La base para la representación matemática del cultivo celular es el modelo de metabolismo celular. La representación de dicho modelo metabólico puede tener diferentes formas dependiendo del fin de dicho modelo como también puede tener un planteamiento matemático diferente como es una descripción estocástica o por medio de ecuaciones diferenciales ordinarias [20]. La finalidad última del modelo a utilizar es representar de manera fiel la respuesta metabólica de un cultivo celular animal frente a determinadas condiciones de operación. Se ha tomado como base el metabolismo de una línea celular animal por su relevancia en la industria farmacéutica [4].

El metabolismo de las células animales consiste, a grandes rasgos, en una red de reacciones químicas catalizadas enzimáticamente que siguen cinéticas determinadas, en donde dichas velocidades dependen de los metabolitos participantes en cada reacción metabólica. Se ha tomado como base un modelo matemático que contempla 46 ecuaciones diferenciales ordinarias que cierran el balance de masa de 44 metabolitos internos y 2 compuestos extra celulares como modelo metabólico. El modelo metabólico inicial se basa en modelos cinéticos existentes y ha sido validado utilizando los análisis de flujos metabólicos [21].

El modelo metabólico utilizado para células animales, obtenido del planteamiento del balance de masa por metabolito y considerando un volumen constante, está planteado por medio de ecuaciones diferenciales ordinarias de la forma general:

$$\frac{d\vec{C}}{dt} = \mathbf{S}\vec{r} - \vec{\tau}(\vec{C}) \quad (3.1)$$

en donde  $\vec{C}$  corresponde al vector de concentraciones de los distintos metabolitos celulares,  $\mathbf{S}$  es la matriz estequiométrica,  $\vec{r}$  es el vector de velocidades de reacción asociados, y  $\vec{\tau}(\vec{C})$  corresponde al vector de transporte y consumo. El modelo anterior es no lineal debido a que las velocidades de reacción tienen la forma:

$$r_i = r_i^{max} f_i(\vec{C}) \quad (3.2)$$

en donde  $r_i^{max}$  es la constante de velocidad de la reacción  $i$  y  $f_i(\vec{C})$  es una función no lineal que

describe la dependencia de la velocidad de reacción de los reactantes  $\vec{C}$  involucrados. Las cinéticas enzimáticas obtenidas para el modelo son en su mayoría de forma de Michaelis-Menten y algunas expresiones cinéticas son derivables utilizando el método de Cha [22, 23].

En la Figura 3.1 se encuentra un diagrama del metabolismo celular a utilizar como base de planteamiento, en donde se detallan las reacciones enzimáticas y los metabolitos que participan en las mismas [21]. Los balances de masa y las expresiones de velocidades de cada una de las especies involucradas se encuentra en el Anexo A.

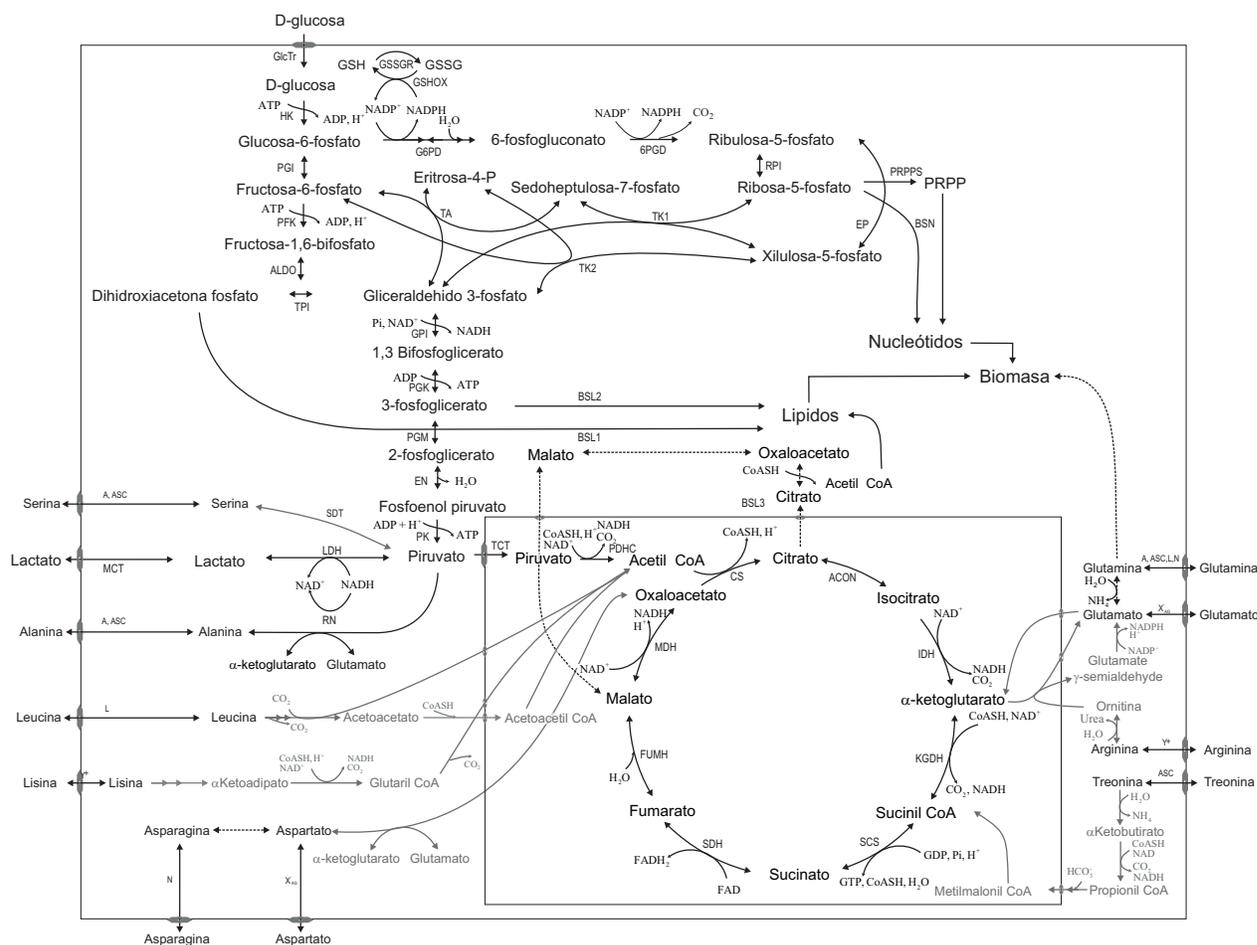


Figura 3.1: Vías metabólicas del metabolismo celular de una célula animal. Las reacciones con color gris fueron agrupadas de manera de contemplar una única reacción desde el reactante inicial de la cadena reactiva en gris hasta el producto final de la reacción [21].

### 3.3. Modelación de sistema bio-reactor-cultivo

Previa a la integración del modelo de metabolismo celular inicial a un modelo de bio-reactor con células en cultivo, se realizó una auditoría exhaustiva del modelo a fin de verificar los balances

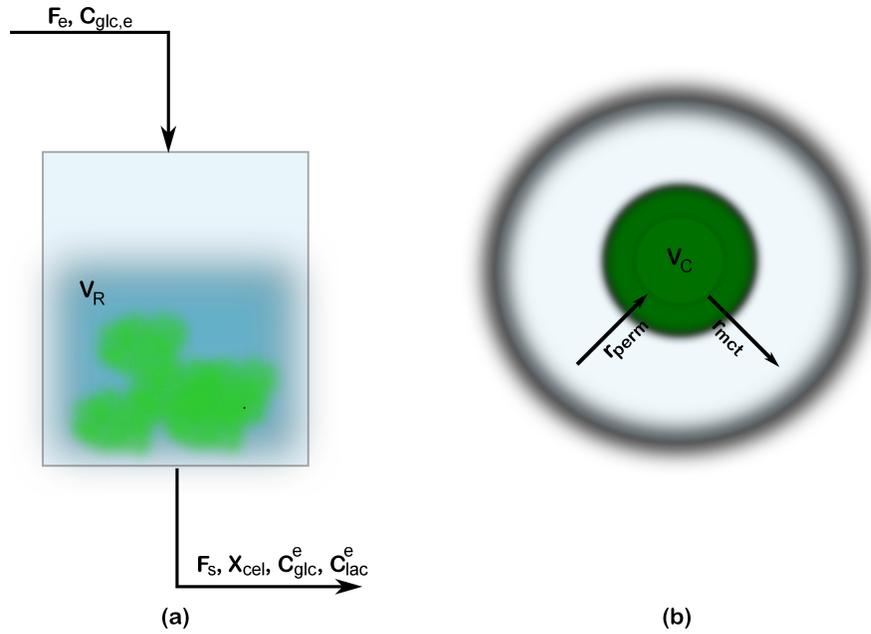


Figura 3.2: Diagrama del sistema de reactor con cultivo celular operando en forma continua. (a) diagrama del bio-reactor con las variables de operación asociadas, y (b) una ampliación de una célula del cultivo con los flujos y las velocidades asociadas a los mismos,  $r_{perm}$  y  $r_{mct}$  (ver Anexo A).  $F_e$  es el flujo de entrada,  $F_s$  es el flujo de salida,  $C_{glc,e}$  es la concentración de glucosa entrante,  $C_{glc}^e$  es la concentración de glucosa del flujo de salida,  $C_{lac}^e$  es la concentración de lactato del flujo de salida,  $X_{cel}$  es la concentración celular presente en el flujo de salida,  $V_R$  es el volumen del reactor, y  $V_{celula}$  es el volumen celular.

de masa internos y la correspondencia de las expresiones de cinéticas asociadas a cada reacción enzimática. La auditoría consistió principalmente en la verificación de los planteamientos de balances de masa, análisis de las diferentes cinéticas en base a los métodos de construcción utilizados y la revisión bibliográfica de los parámetros de dichas cinéticas.

Una vez verificado el modelo de metabolismo inicial, se procedió a englobar el mismo dentro de un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias que representa la interacción entre un bio-reactor y el cultivo celular. Para plantear el sistema matemáticamente se realizó un balance de masa global para el bio-reactor y un balance de biomasa, además de balances de masa por especie para la glucosa y el lactato extra celular, omitiendo el balance existente de estos últimos en el modelo de metabolismo celular inicial. Si bien es sabido que las células animales no solo consumen glucosa, este trabajo se enfocó netamente en la glucosa como sustrato principal debido a que el consumo del mismo es más significativo que el de otros sustratos como la glutamina [13, 24].

De esta manera el sistema de ecuaciones para el bio-reactor es obtenido por las ecuaciones del balance de masa realizado sobre el bio-reactor descrito en el diagrama de la Figura 3.2.

Las ecuaciones siguen el planteamiento general de balance de masa:

$$\text{Acumulación} = \text{Entrada} - \text{Salida} + \text{Generación} - \text{Consumo}$$

Que se traduce en lo siguiente para el caso del sistema completo:

*Balance global del reactor*

$$\frac{d(\rho_R V_R)}{dt} = \rho_e F_e - \rho_s F_s$$

Suponiendo un reactor perfectamente agitado ( $\rho_R = \rho_s$ ) y que la densidad del medio alimentado es igual al del medio de cultivo ( $\rho_R = \rho_e$ )

$$\frac{d(V_R)}{dt} = F_e - F_s \quad (3.3)$$

*Balance de especies en el reactor*

Glucosa:

$$\frac{d(C_{glc}^e \cdot V_R)}{dt} = F_e \cdot C_{glc,e} - F_s \cdot C_{glc}^e - r_{cons} \cdot V_R$$

donde  $r_{cons}$  corresponde a la tasa de consumo de glucosa por parte del cultivo celular.

$$\frac{d(C_{glc}^e)}{dt} = \frac{F_e}{V_R} \cdot C_{glc,e} - \frac{F_s}{V_R} \cdot C_{glc}^e - r_{perm} \cdot X_{cel} \cdot V_{cel} \quad (3.4)$$

donde  $r_{perm}$  [ $mmol/L \cdot s \cdot celula$ ] corresponde a la tasa de permeación de glucosa desde el medio al citoplasma, por célula, y  $X_{cel}$  [ $10^9 celulas/L$ ] a la concentración celular en el reactor.

Lactato:

$$\frac{d(C_{lac}^e \cdot V_R)}{dt} = F_e \cdot C_{lac,e} - F_s \cdot C_{lac}^e + r_{gen} \cdot V_R$$

donde  $r_{gen}$  es la tasa producción de lactato por parte del cultivo celular. El medio alimentado no contiene lactato por lo que  $F_e \cdot C_{lac,e} = 0$ .

$$\frac{d(C_{lac}^e)}{dt} = -\frac{F_s}{V_R} \cdot C_{lac}^e + r_{mct} \cdot X_{cel} \cdot V_{cel} \quad (3.5)$$

$r_{mct}$  [ $mmol/L \cdot s \cdot celula$ ] corresponde a la tasa de producción de lactato extra celular para una célula.

Para los anteriores balances de masa se supuso constante el volumen del reactor y el volumen

de la célula, un consumo uniforme de glucosa y una producción uniforme de lactato por parte del cultivo celular.

*Balance de biomasa en el reactor*

$$\frac{d(X_{cel} \cdot V_R)}{dt} = F_e \cdot X_{cel,e} - F_s \cdot X_{cel} + \mu \cdot X_{cel} \cdot V_R$$

en donde  $\mu$  es la tasa de crecimiento del cultivo celular. Se supuso que no hay entrada de nuevas células con el medio de alimentación con lo que  $F_e \cdot X_{cel,e} = 0$ . Además, se planteó que el crecimiento celular seguía una dinámica de tipo monod de la siguiente forma:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_{glc}^e}{K_{glc}^S + C_{glc}^e} \cdot \frac{K_{lac}^I}{K_{lac}^I + C_{lac}^e} \quad (3.6)$$

en donde  $\mu_{max}$  [1/hr] es la tasa máxima de crecimiento específico,  $K_{glc}^S$  [mmol/L] es la constante de activación de crecimiento por la presencia de glucosa y  $K_{lac}^I$  [mmol/L] es la constante de inhibición del crecimiento por la presencia de lactato. Debido al alcance del problema a desarrollar en la presente tesis se supuso que no existe muerte celular pues se busca analizar el comportamiento de un cultivo celular previo a cualquier indicador de muerte celular. De esta manera, el balance resultante de biomasa es:

$$\frac{d(X_{cel})}{dt} = (\mu - F_s) \cdot X_{cel} \quad (3.7)$$

### 3.4. Condiciones de simulación

Para la simulación de la respuesta dinámica del bio-reactor se utilizaron las condiciones de operación descritas en la literatura [25]. Esto con la finalidad de comparar las curvas obtenidas experimentalmente con dicho montaje y sus condiciones de operación con las curvas simuladas y, de ser necesario, realizar un ajuste de los parámetros cinéticos.

De esta forma, la simulación del cultivo de control considera las siguientes condiciones de operación:

- **Etapa Batch:** El cultivo de células animales permanece durante 45 horas en un reactor batch de 250 [mL] de capacidad con una concentración inicial de glucosa de 18,4 [mM].
- **Etapa Continua:** Posterior a la etapa con modo de operación batch, se da inicio a un modo de operación continuo hasta cumplir 250 horas de cultivo. El coeficiente de dilución durante

esta etapa es de  $0,031 [1/hr]$  y se alimenta el cultivo con una concentración constante de  $5,276 [mM]$  de glucosa.

Los resultados experimentales observados para un cultivo bajo las condiciones de cultivo de control se muestran en las Figuras 3.3 y 3.4.

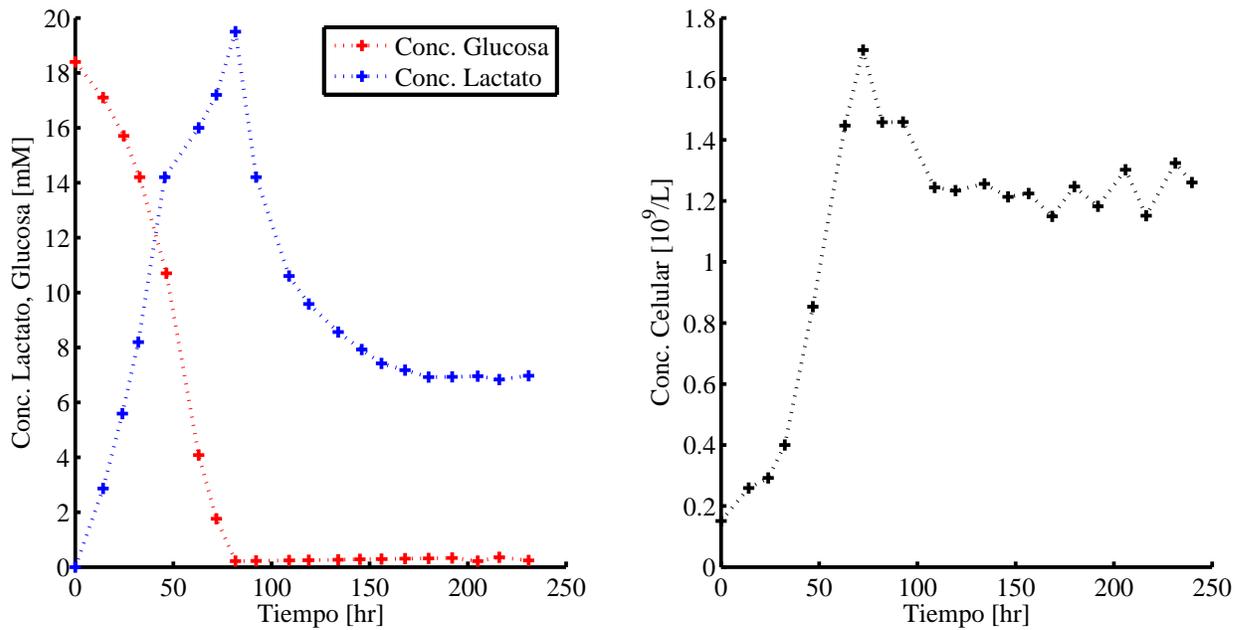


Figura 3.3: Concentraciones experimentales de glucosa, lactato y de células del cultivo de control [25]. El cultivo consiste en un modo de operación batch hasta las 45 [hr] y una operación continua desde las 45 [hr] hasta el final.

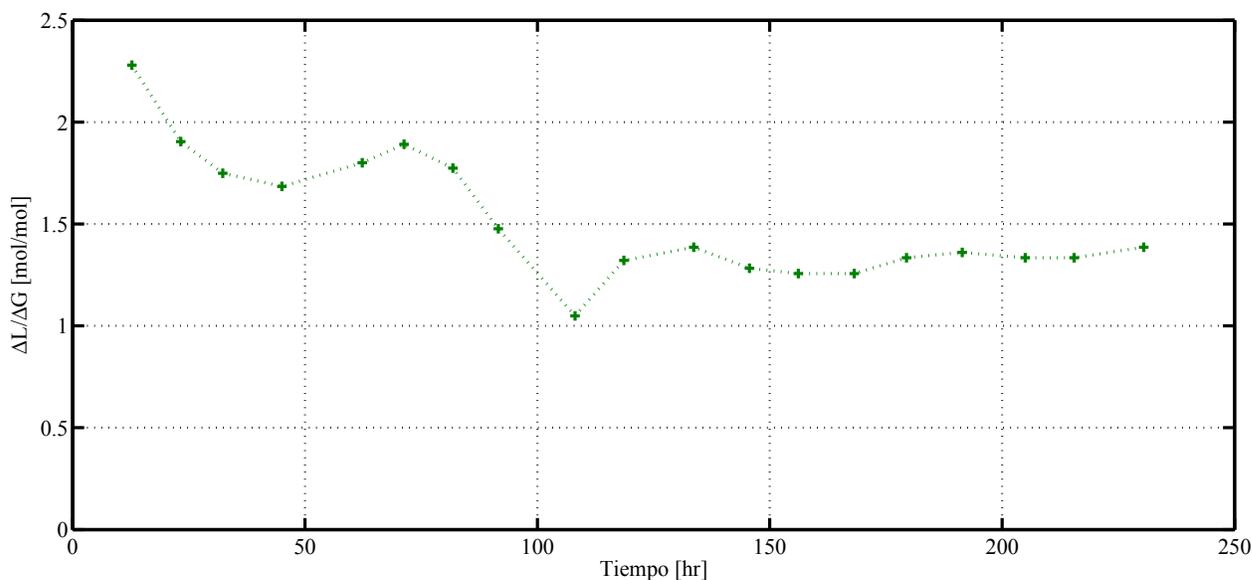


Figura 3.4: Razón  $\Delta L/\Delta G$  observado experimentalmente para el cultivo de control [25]. El cultivo consiste en un modo de operación batch hasta las 45 [hr] y una operación continua desde las 45 [hr] hasta el final.

Por otra parte, las condiciones de operación reportadas en [25] para un cultivo con estado metabólico alterado son:

- **Etapa Batch:** El cultivo permanece en modo de operación batch con una concentración inicial de glucosa de 0,722 [mM], en un reactor de 550 [mL] de capacidad, hasta alcanzar una concentración de 0,278 [mM] de glucosa en el bio-reactor.
- **Etapa Fed-Batch:** Posterior a la etapa batch, se mantiene el cultivo con una concentración extra celular de 0,278 [mM] de glucosa por medio de la alimentación intermitente de una corriente de entrada de glucosa con una concentración de 66,704 [mM].
- **Etapa Continua:** A las 105 horas de operación se da inicio a un modo de operación continuo con las mismas condiciones de operación utilizadas para la etapa continua del cultivo de control.

Los resultados experimentales observados para un cultivo bajo las condiciones de cultivo alterado recién mencionadas se muestran en las Figuras 3.5 y 3.6.

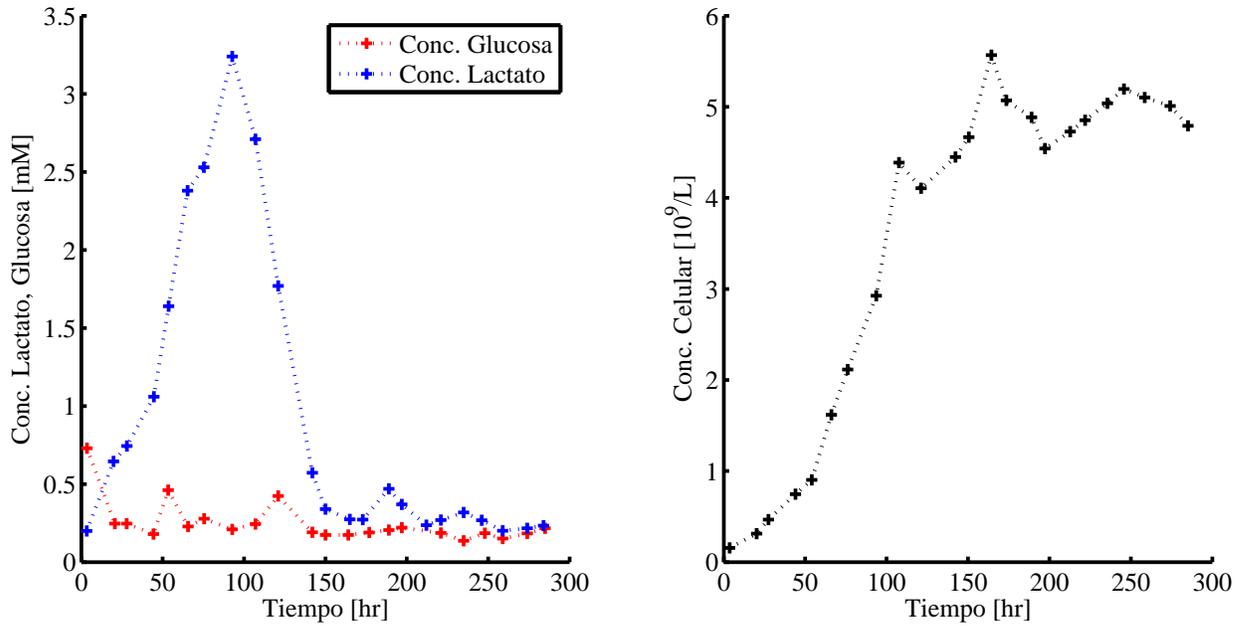


Figura 3.5: Concentraciones experimentales de glucosa, lactato y de células del cultivo alterado [25]. El cultivo consiste en un modo de operación batch hasta aproximadamente las 23 [hr], una operación fed-batch hasta las 105 [hr], y una operación continua desde las 105 [hr] hasta el final.

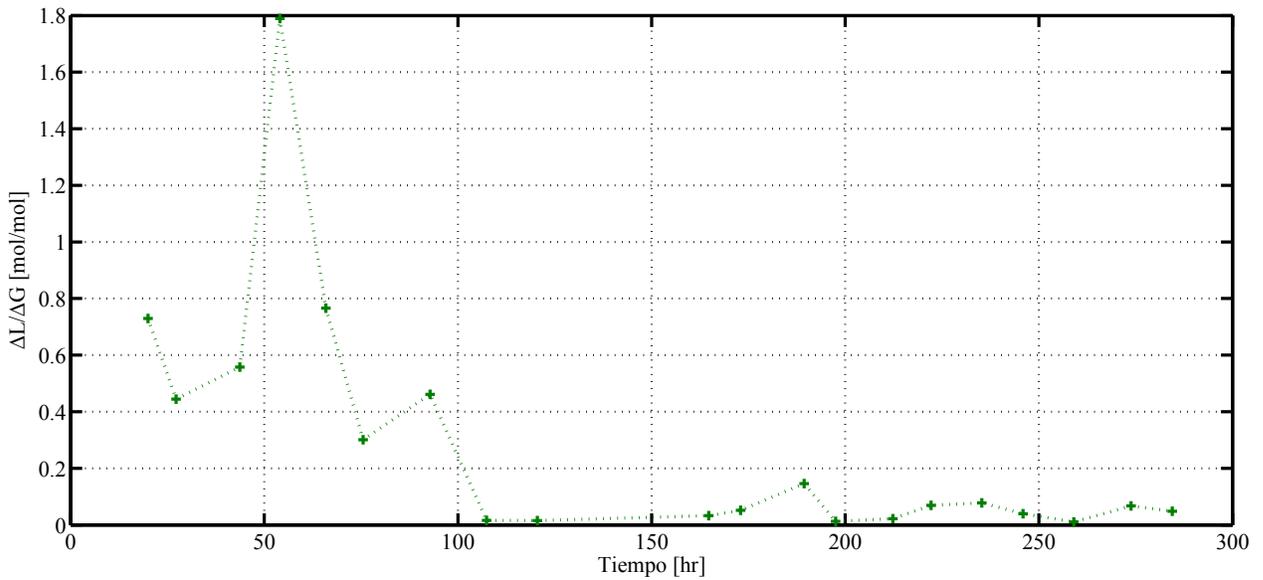


Figura 3.6: Razón  $\Delta L/\Delta G$  observado experimentalmente para el cultivo alterado [25]. El cultivo consiste en un modo de operación batch hasta aproximadamente las 23 [hr], una operación fed-batch hasta las 105 [hr], y una operación continua desde las 105 [hr] hasta el final.

La comparación de las concentraciones de las Figuras 3.3 y 3.5 muestra concentraciones menores de glucosa residual en los tramos anteriores al modo de operación continuo (previo a las 45 [hr] para el cultivo de control y a las 105 [hr] para el cultivo alterado) debido a que dentro de las

condiciones de operación del cultivo alterado existe una mayor restricción de la glucosa alimentada al cultivo. Por otra parte, las concentraciones de lactato son muy inferiores para el cultivo alterado, observándose un máximo de concentración cercano a  $3,5 [mM]$  para el cultivo alterado comparable con cerca de  $20 [mM]$  para el cultivo de control. A su vez, la concentración celular alcanzada hacia el final del cultivo de control oscila en torno a los  $1,3 [10^9/L]$  mientras que para el cultivo alterado se alcanzan valores cercanos a los  $5 [10^9/L]$ .

En cuanto a las curvas de la razón  $\Delta L/\Delta G$ , en la Figura 3.6 se observan valores inferiores a los  $0,2 [mol/mol]$  en todo el tramo continuo del cultivo alterado de la (a partir de las  $105 [hr]$ )

### 3.5. Ajuste de parámetros

El modelo dinámico planteado fue simulado considerando las condiciones de operación del cultivo de control y la respuesta metabólica celular fue contrastada con resultados los experimentales de la literatura [25]. Para la simulación del crecimiento celular se utilizaron como parámetros  $\mu_{max} = 0,033[1/hr]$ ,  $K_{glc}^S = 0,05[mM]$  y  $K_{lac}^I = 14[mM]$  provenientes de la literatura [26]. Los resultados se muestran en la Figura 3.7.

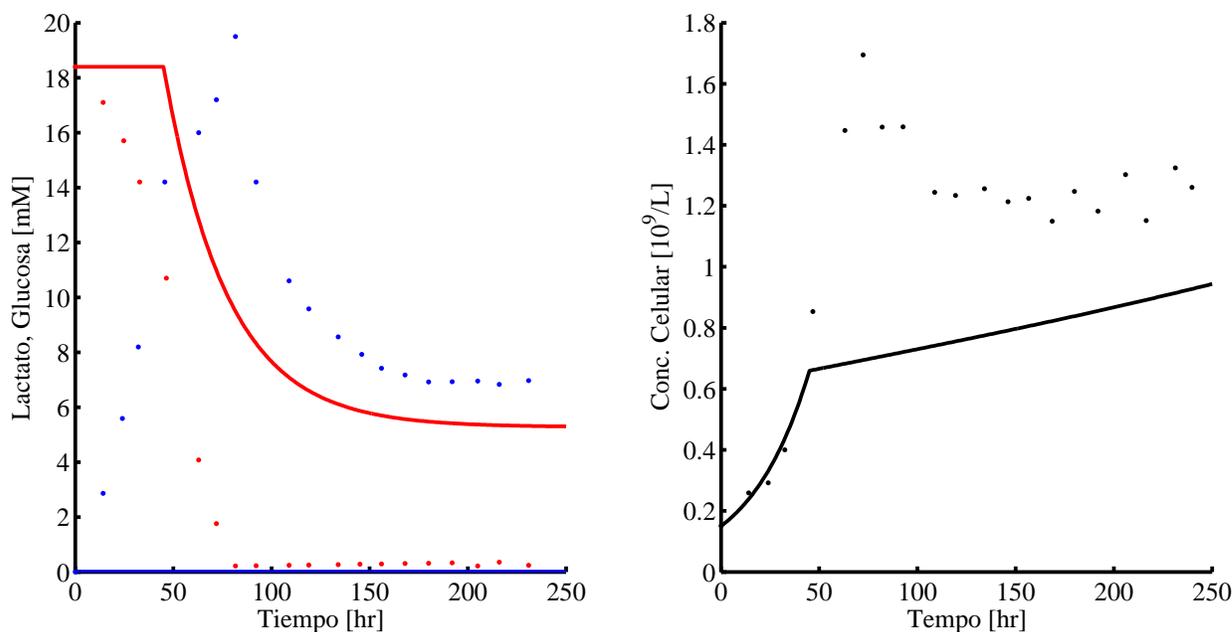


Figura 3.7: Simulación de cultivo de control. —: Conc. simulada de lactato, —: Conc. simulada de glucosa, —: Conc. celular simulada, ■: Conc. experimental de lactato, ■: Conc. experimental de glucosa, ■: Conc. celular experimental

Al analizar la Figura 3.7 se puede observar, para la curva de glucosa, un tramo de baja variación

de concentración (hasta las 46 horas de simulación) y luego una fuerte disminución de la concentración debido a que se inicia la etapa continua del cultivo y el consumo de parte del cultivo es menor al flujo de salida del reactor por lo que se produce un lavado de glucosa (la concentración de glucosa alcanza una concentración de equilibrio menor producto de una variación del coeficiente de dilución, el cual genera una variación negativa de la concentración de glucosa al interior del reactor) hasta alcanzar un nuevo equilibrio. Esto también es identificable para la concentración celular en donde existen dos tramos claros con una dinámica diferente. Por otra parte, la curva de concentración de lactato no tiene una variación apreciable a simple vista pero aumenta de una concentración de 0 [mM] hasta aproximadamente 0,002 [mM], muy por debajo de lo observado experimentalmente.

De la Figura 3.7 también se observa que el sistema no fue capaz de retratar los resultados experimentales en primera instancia por lo cual se estudió la posibilidad de realizar un ajuste de los parámetros del modelo de metabolismo celular inicial para obtener un mejor ajuste de los resultados de simulación, a los datos experimentales. Un ajuste de parámetros se fundamentó en que, si bien los parámetros de modelo utilizados inicialmente son todos obtenidos de la literatura correspondiente, el modelo corresponde a la relación de modelos cinéticos de una misma línea celular con la finalidad de revisar la respuesta metabólica de una célula a nivel citoplasmático y mitocondrial, no a nivel extra celular como es el caso de la presente tesis. La ligazón forzada de cinéticas de diferentes fuentes de literatura tiene como consecuencia que algunas reacciones enzimáticas se vuelvan controlantes de manera injustificada y los tiempos de las respuestas metabólicas simuladas no corresponde a lo observado experimentalmente. Además, los parámetros cinéticos iniciales corresponden a una línea celular animal con variaciones de especies como *homo sapiens* [27, 28] y *rattus* [29], y condiciones metabólicas como deficiencia enzimática [30] y estrés oxidativa [31], lo que otorga una determinada variabilidad que se observa al simular la respuesta del cultivo a un nivel macro como es el cultivo al interior de un bio-reactor.

Se realizó un ajuste manual de los parámetros cinéticos basándose en las curvas experimentales del cultivo de control. Se simuló el sistema completo del bio-reactor con el cultivo celular bajo las condiciones experimentales para los cuales se obtuvieron los resultados experimentales para la concentración extra celular de glucosa, lactato y la concentración celular para el cultivo de control.

### 3.5.1. Metodología de ajuste de parámetros

La metodología utilizada para el ajuste manual de los parámetros del modelo, cuyas ecuaciones y parámetros se encuentran en los Anexos A y B, respectivamente, fue la siguiente:

1. Amplificación de todas las velocidades enzimáticas pertenecientes a la glicólisis excepto la velocidad asociada a la permeación de glucosa, es decir, las expresiones cinéticas relacionadas con la actividad enzimática de la hexoquinasa, glucosa 6-fosfato isomerasa, fosfofructoquinasa, aldolasa, triosefosfato isomerasa, gliceraldehido fosfato isomerasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa y piruvato quinasa (ver  $r_{HK}$ ,  $r_{PGI}$ ,  $r_{PFK}$ ,  $r_{ALD}$ ,  $r_{TPI}$ ,  $r_{GPI}$ ,  $r_{PGK}$ ,  $r_{PGM}$ ,  $r_{ALD}$ ,  $r_{PK}$  en Apéndice B) fueron amplificadas por un factor  $P^k$ . La finalidad de la amplificación es aumentar la velocidad de reacción de la glicólisis para evitar que se produzcan reacciones controlantes intermedias, esto por medio del aumento de la cantidad de enzimas catalizadoras que participan en la glicólisis. La motivación detrás de la amplificación estuvo en que se observó que las curvas de concentración de la Figura 3.7 tienen una respuesta metabólica que calza cualitativamente con los resultados experimentales pero que no ocurre dentro del rango de tiempo establecido.
2. La amplificación descrita anteriormente tuvo como resultado un primer ajuste que, cualitativamente, coincidía con las curvas experimentales pero que se presumía podía tener menor error de ajuste a las curvas. En determinados tramos de la simulación la pendiente de la concentración de glucosa era muy baja, lo que se asoció a que el consumo de glucosa también era muy bajo dado por una cantidad insuficiente de transportadores de glucosa hacia el compartimento citoplasmático. Con el anterior supuesto se ponderó la velocidad de permeación de glucosa (ver  $r_{perm}$  en Apéndice B) por un factor  $P^{GLC}$  para obtener un mejor ajuste a la curva de concentración de glucosa experimental, obteniéndose resultados positivos.
3. Una vez ajustada la curva de concentración de glucosa se procedió al ajuste de parámetros relacionados directamente con la producción de lactato. La concentración citoplasmática de lactato depende de dos reacciones; el lactato citoplasmático es parte de los productos de la catálisis enzimática de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y es transportado extracelularmente por medio de los canales de transporte de monocarboxilatos de la célula. Al ponderar ambas velocidades por un factor común los resultados no fueron satisfactorios por lo que se optó por ponderar las velocidades asociadas a la enzima LDH (ver  $r_{LDH}$  en Apéndice

B) y al transporte de monocarboxilatos por los factores  $P^{LAC}$  y  $P^{k2}$ , respectivamente. De esta manera se aumentó la cantidad de enzimas participantes en la reacción  $r_{LDH}$  para aumentar la producción de lactato y se aumentó el número de transportadores de lactato cuya acción es descrita por la tasa  $r_{MCT}$ .

4. Debido a que existía una concentración de lactato citoplasmático superior a 0,1 [mM], concentración esperable para el metabolismo de una célula que no presenta alteración en su estado metabólico [21], se modificó la relación de equilibrio planteado entre la concentración de lactato extra celular y citoplasmático (ver  $r_{MCT}$  en Apéndice B). Inicialmente de 100, se ponderó dicha relación de equilibrio por  $P^{LAC1}$ . El efecto bioquímico de lo anterior corresponde a aumentar la constante de equilibrio entre el lactato extracelular y el citoplasmático de manera que la diferencia entre ambos debe ser 100 veces más alta para que el flujo de lactato extracelular sea con dirección hacia el citoplasma y no hacia el exterior.
5. Se procedió a ajustar la curva de la concentración celular. Este ajuste se dejó para después de los ajustes de las curvas de concentración de glucosa y lactato porque la cinética de crecimiento planteada considera una menor cantidad de parámetros y, por lo mismo, se supuso una menor dificultad de ajuste. Los parámetros de crecimiento celular usados inicialmente fueron obtenidos de la literatura [26] y el ajuste de los mismos fue sin tomar en consideración las variaciones en el offset de las curvas de concentración de lactato y glucosa provocados, pues los parámetros se volverían a ajustar por medio de la obtención de los mínimos cuadrados.

La finalidad de realizar un primer ajuste de forma manual era para tener un acercamiento práctico de la incidencia de los distintos parámetros cinéticos en la respuesta metabólica y también para tener un primer conjunto de parámetros con un orden de magnitud establecido, de manera de ahorrar recursos computacionales en un segundo ajuste.

Una vez obtenidos los parámetros de forma manual se procedió a hacer ajuste de los mismos por medio de la minimización de la suma ponderada de los residuales cuadráticos. La suma de los residuales cuadráticos totales se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\Phi = \sum_i \sum_{j=1}^n (\phi_{i,j} \omega_{i,j}) \quad (3.8)$$

en donde

$$\phi_{i,j} = \epsilon' \epsilon = (C_i^{experimental}(t) - C_i^{simulado}(t))' (C_i^{experimental}(t) - C_i^{simulado}(t)) \quad (3.9)$$

$$i = \{ \text{glucosa, lactato, conc. celular} \}$$

$$j = 1, \dots, n$$

en donde  $\Phi$  corresponde a la suma ponderada de la suma de los residuales cuadráticos  $\phi_{i,j}$  de cada una de las curvas de concentración  $i$  a comparar en determinados tramos  $j$  de la simulación.  $\vec{C}_{simulado}$  corresponde al conjunto de datos simulados,  $\vec{C}_{experimental}$  al conjunto de datos experimentales y  $n$  es el tamaño de la muestra. Los conjuntos de datos de los vectores  $\vec{C}_{simulado}$  y  $\vec{C}_{experimental}$  deben ser del mismo tamaño y comprender las concentraciones para los mismos instantes de tiempo de manera que sean comparables. Los pesos  $\omega_{i,j}$  corresponden a  $\frac{1}{\sigma^2}$ , en donde  $\sigma$  corresponde a la desviación estándar de la suma de los residuales para una curva de concentración  $i$  en un tramo  $j$ . La finalidad de utilizar pesos diferentes en diferentes tramos de la simulación fue para darle un mayor peso a los tramos difíciles de ajustar como fueron los puntos de la segunda mitad de la etapa continua. Se consideraron la suma de los residuales cuadráticos de las curvas de concentración de glucosa y lactato, junto con la curva de concentración celular. Además, la curva de concentración de lactato fue dividida en tres tramos en donde el tramo 1 corresponde al conjunto de puntos ubicados de 0 a 46 [hr] de cultivo, correspondiente a la etapa batch del cultivo, el tramo 2 de 46 a 134 [hr], que incluye los datos experimentales de la primera mitad de la etapa continua y el tramo 3 de 134 a 231 [hr], que abarca los datos experimentales desde la mitad de la etapa continua hasta el final del cultivo.

La metodología del ajuste de parámetros fue por medio del método de minimización no lineal sin restricciones de la suma de los residuales cuadráticos aplicando el método simplex Nelder-Mead a un punto inicial  $P_0$ , que en este caso, correspondió al vector con los parámetros ajustados manualmente [32].

### 3.5.2. Resultados de ajuste de parámetros y simulación con parámetros ajustados

La anterior minimización del valor de la suma de los residuos cuadráticos obtuvo como resultado los valores de los ponderadores exhibidos en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Resumen de parámetros ajustados.

Parámetro	Valor
$p^{GLC}$	6.132,2
$p^{LAC}$	5.987,9
$p^{LAC1}$	855,4
$p^k$	10.434,5
$p^{k2}$	100,7

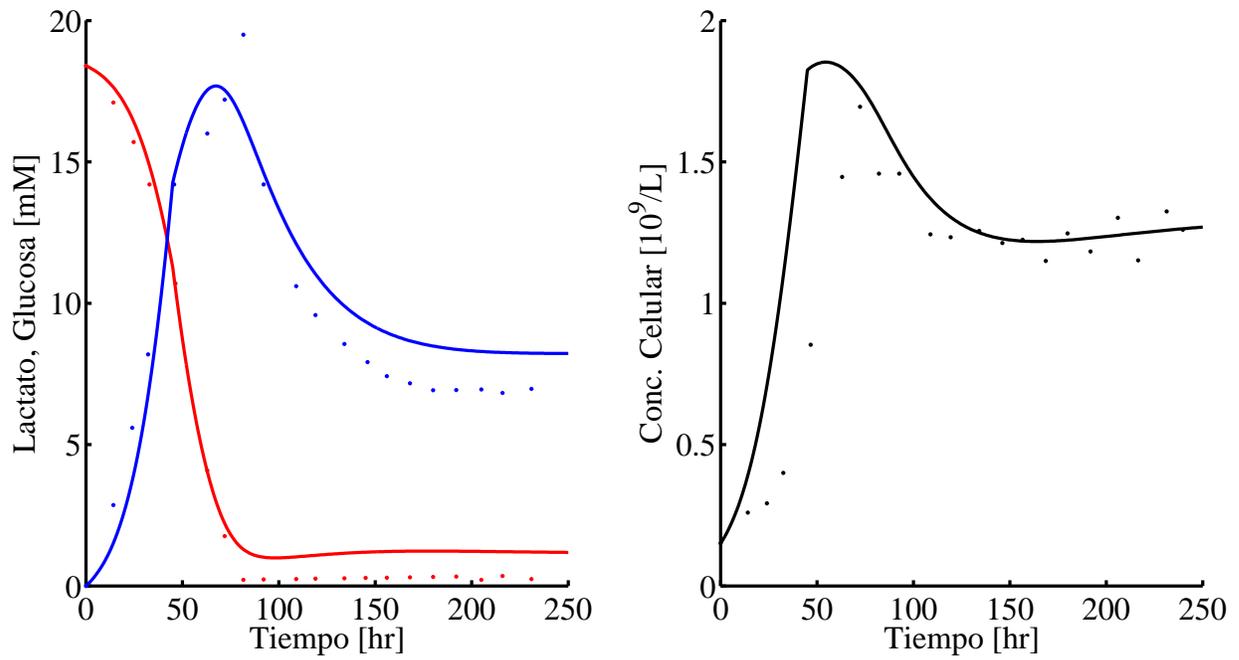


Figura 3.8: Simulación de cultivo de control. —: Conc. simulada de lactato, —: Conc. simulada de glucosa, —: Conc. celular simulada, ■: Conc. experimental de lactato, ■: Conc. experimental de glucosa, ■: Conc. celular experimental.

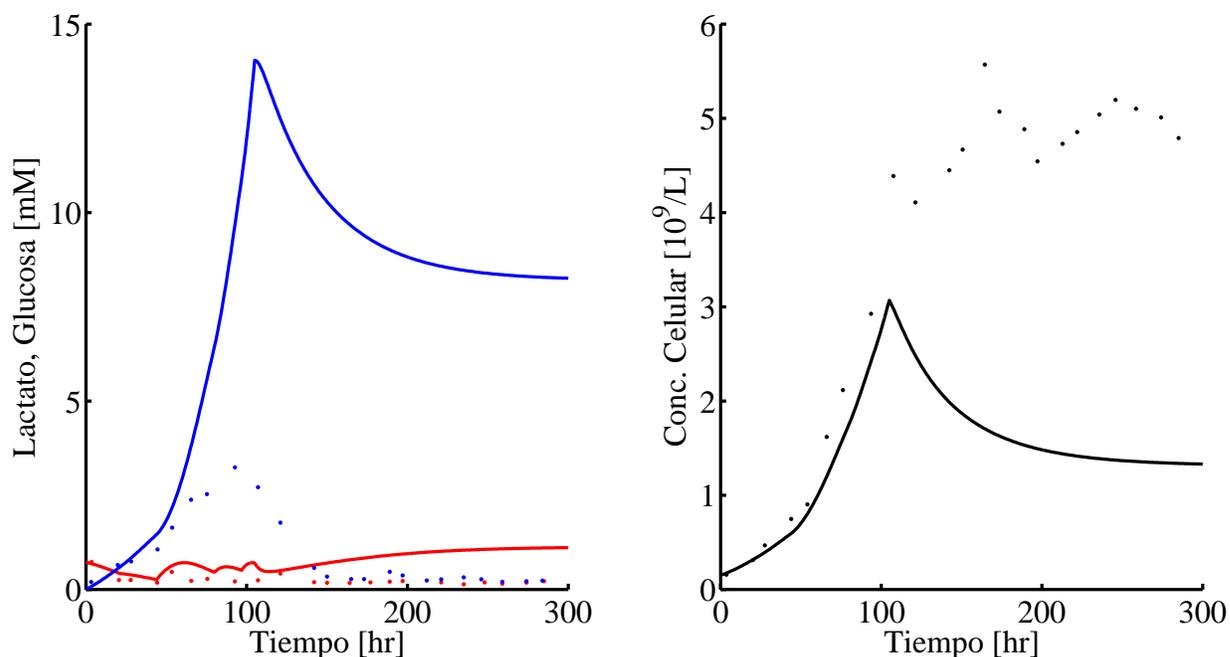


Figura 3.9: Simulación de cultivo alterado. —: Conc. simulada de lactato, —: Conc. simulada de glucosa, —: Conc. celular simulada, ■: Conc. experimental de lactato, ■: Conc. experimental de glucosa, ■: Conc. celular experimental. El cultivo consiste en un modo de operación batch hasta aproximadamente las 23 [hr], una operación fed-batch hasta las 105 [hr], y una operación continua desde las 105 [hr] hasta el final.

Las curvas resultantes del anterior ajuste de parámetros se encuentran en las Figuras 3.8 y 3.9. Se aprecia de la Figura 3.8 que el ajuste de parámetros es cualitativamente satisfactorio, las curvas obtenidas de la simulación siguen la dinámica de la respuesta metabólica del cultivo animal, observada a nivel experimental, frente a las condiciones de operación detalladas en la sección 3.4 con la existencia de errores de ajuste al final del tramo continuo. La reducción del error de ajuste por medio del aumento del peso asociado al último tramo de ajuste generó una pérdida significativa de la respuesta experimental en los tramos anteriores por lo que se optó por mantener el ajuste realizado para darle robustez al modelo frente a cambios en el modo de operación del cultivo. Aún así, no puede considerarse como única solución al problema de reducción del error de ajuste.

La introducción de un consumo adicional de glucosa para la formación de biomasa (rendimiento de sustrato) podría superar el problema del error de ajuste pero dicho consumo no es constante lo que significaría un trabajo de ajuste de parámetros de un modelo de consumo de sustrato considerado innecesario. Dicho trabajo se desestimó pues las curvas simuladas logran captar cualitativamente y, hasta una extensión satisfactoria, cuantitativamente la dinámica del cultivo en ambos modos de operación además que el análisis de la curva experimental de la razón  $\Delta L/\Delta G$  deja en evidencia que existe una reducción de la razón  $\Delta L/\Delta G$  hacia el final del cultivo. Si bien dicha reducción no es

suficiente para considerarse una variación a un estado metabólico alterado [12], si demuestra que hay una variación en la cantidad de lactato producido con respecto al consumo de glucosa en dicho tramo.

Tal como se observa en la Figura 3.9, el modelo metabólico ajustado no es capaz de retratar la respuesta metabólica de un cultivo alterado. De la Figura 3.9 se tiene que el cultivo simulado produce una cantidad máxima de lactato que casi cuadriplica al máximo obtenido de manera experimental y producto de este exceso de lactato la inhibición del crecimiento es muy fuerte para un cultivo celular animal con una variación de estado metabólico. La baja de concentración que se nota en la curva de concentración de lactato de la Figura 3.9 corresponde al inicio del modo de operación continuo (105 [hr]).

Además, tanto para el cultivo de control como el alterado, las concentraciones de glucosa y lactato, y la concentración celular tienen valores muy semejantes al final del cultivo. Esto justificó un análisis comparativo del estado estacionario para ambos cultivos, por lo que se procedió a obtener el estado estacionario de cada uno por medio de la simulación hasta obtener una variación inferior a  $1 \cdot 10^{-5}$  para las concentraciones de lactato extra-celular y citoplasmático, glucosa extra-celular y citoplasmático, piruvato citoplasmático y mitocondrial, volumen y concentración celular.

La similitud de los valores de estado estacionario alcanzado para los cultivos alterado y de control permite suponer que el modelo es capaz de entregar una respuesta metabólica única, lo que establecería que el modelo con su actual ajuste de parámetros no es capaz de retratar más de un estado metabólico.

## **3.6. Análisis estadístico de parámetros ajustados**

### **3.6.1. Prueba de t de Student**

Para establecer la significancia estadística de los parámetros obtenidos a partir del anterior ajuste, se realizó un análisis estadístico a los parámetros ajustados. Bajo la suposición de que el error asociado a los residuales  $\epsilon$  de un ajuste, definidos en la ecuación 3.9, siguen una distribución gaussiana, se realizó un test de hipótesis a los parámetros ajustados por medio del análisis de los intervalos de confianza aplicando una distribución t de Student.

La prueba de t de Student consiste, básicamente, en la comparación de dos muestras de datos en donde una muestra soporta una hipótesis nula de una prueba estadística y la otra a la hipótesis

a respaldar. A su vez, una prueba de t de Student pareada es utilizada cuando existen muestras dependientes, es decir, que se ha realizado un mismo experimento con muestreo de un número  $n$  de datos, al menos dos veces y se desea realizar una comparación entre ellas.

Obtenidos el par de espacios muestrales para cada hipótesis se procede a calcular el estadístico t, que en este caso corresponden al conjunto de datos simulados de concentración celular, de glucosa y de lactato con el modelo sin ajuste de parámetros y al conjunto de los mismos datos simulados con el modelo con ajuste de parámetros:

$$t = \frac{\bar{C}_D - \mu_0}{s_{Conc,D}/\sqrt{n}} \quad (3.10)$$

en donde  $\bar{C}_D$  y  $s_{Conc,D}$  son el promedio y la desviación estándar, respectivamente, de las diferencias entre los valores  $C_{i,j}$  de cada conjunto muestral  $i = inicial, ajustado$  en donde  $j = 1, \dots, n$ , siendo  $n$  el número de datos a comparar y  $\mu_0$  es la media poblacional de la diferencia entre el dato experimental y el simulado. La constante  $\mu_0$  es diferente a cero cuando se desea analizar si el promedio de la diferencia  $\bar{C}_D$  entre muestras es significativamente diferente de la media  $\mu_0$ .

Una vez calculado el estadístico t se procede a hallar el p-value de la muestra en una Tabla de distribución t de Student utilizando el valor t calculado y los grados de libertad de la muestra que corresponden a  $n - 1$ , y para concluir respecto de la significancia estadística de la diferencia entre muestras se fija un nivel de confianza y, si dicho p-value se encuentra bajo el nivel fijado, se rechaza la hipótesis nula [33].

Para el caso particular del análisis de los parámetros ajustados se llevó a cabo una prueba t de Student pareada a los residuales  $\epsilon$  para el caso base de las curvas simuladas sin ajuste de parámetros considerado como hipótesis nula  $H_0$  y los residuales del modelo con el ajuste del parámetro  $i$ , considerada la hipótesis a probar  $H_i$ . Lo que se busca comprobar, a través de la prueba t de Student, es que el promedio de la diferencia de residuales  $\bar{C}_D = \bar{\epsilon}_D$  es significativamente distinto de cero, es decir que  $\mu_0 = 0$  de manera de poder concluir que el ajuste del parámetro analizado es significativo. El establecimiento de significancia de un parámetro permite suponer, con una alta probabilidad, que la diferencia en la respuesta simulada que se genera al realizar el ajuste de dicho parámetro no es por otro efecto más que por la variación del parámetro en cuestión [34].

De esta manera se tiene:

$$H_0 : p_i = p_{i,0} \quad (3.11)$$

$$i = \{ \text{GLC, LAC, LAC1, k, k2} \}$$

$$H_i : p_i \neq p_{i,0} \quad (3.12)$$

$$i = \{ \text{GLC, LAC, LAC1, k, k2} \}$$

en donde  $p_i$  corresponde al ponderador  $i$  y  $p_{i,0}$  corresponde al valor de dicho ponderador previo al ajuste de parámetros.

### 3.6.2. Resumen de parámetros ajustados y resultados de análisis estadístico

En la Tabla 3.2 se tienen los valores de los ponderadores utilizados en el último ajuste y su nivel de significancia dentro del modelo. La significancia de un parámetro es el resultado de la prueba t de Student para un intervalo de confianza de un 95 %, de asociarse a un p-value superior a 0,05 se rechaza la hipótesis alternativa  $H_i$  para dicho parámetro  $i$  y se concluye que el ajuste de dicho parámetro para el tramo en cuestión de una curva de concentración no es significativo, es decir, que cualquier la diferencia que se podría haber generado en una curva de concentración no es necesariamente producto del ajuste realizado con  $P_i$ .

Tabla 3.2: p-values y significancia al 95 % de parámetros ajustados

Parámetro	$\varepsilon_{\text{Conc. Glucosa}}$		$\varepsilon_{\text{Conc. Lactato}}$		$\varepsilon_{\text{Conc. Celular}}$	
	p-value	Significante	p-value	Significante	p-value	Significante
$p^{GLC}$	0,0001	SI	0,0005	SI	0,0170	SI
$p^{LAC}$	0,0001	SI	0,0011	SI	0,0123	SI
$p^{LAC1}$	0,0056	SI	0,0081	SI	0,0590	NO
$p^k$	0,2561	NO	0,0059	SI	0,0118	SI
$p^{k2}$	0,4074	NO	0,0013	SI	0,0038	SI

Se desprende de la Tabla 3.2 también que el ajuste de los parámetros es significativo a casi todos los niveles salvo por 3 parámetros ( $p^{LAC1}$ ,  $p^k$  y  $p^{k2}$ ). Se pueden considerar aislados debido a que cada uno de dichos parámetros produce un cambio insignificante en el promedio de los residuales en únicamente una curva, lo que no es motivo suficiente de descarte. También se concluye que los

parámetros  $P^{LAC}$ ,  $P^{GLC}$  tienen una alta significancia pues poseen los valores p-value más bajos para los casos de las curvas de concentración de glucosa y de lactato.

Con el fin de analizar la relevancia del ajuste de cada parámetro en cada curva de concentración y comparar dichos ajustes con la simulación con el modelo sin modificación de sus parámetros se comparó la respuesta simulada del modelo sin ajustes y con un único parámetro de ajuste  $P^{GLC}$ ,  $P^{LAC}$ ,  $P^{LAC1}$ ,  $P^k$  y  $P^{k2}$  aplicado, con los datos experimentales utilizados para su ajuste. La comparación se llevó a cabo por medio de los residuales ( $\epsilon$ , ver ecuación 3.9).

El  $\epsilon$  de las curvas simuladas con el modelo inicial sin variación de parámetros se muestra en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3:  $\epsilon$  de las curvas simuladas con el modelo sin ajuste y ajustado con sus respectivos intervalos de confianza calculados para un 95 % de probabilidad.

<b>Modelo</b>	$\epsilon_{Conc.Glucosa}$	$\epsilon_{Conc.Lactato}$	$\epsilon_{Conc.Celular}$
Sin ajustar	$-5,575 \pm 1,092$	$9,178 \pm 2,202$	$0,455 \pm 0,127$
Ajustado	$-0,701 \pm 0,157$	$-0.525 \pm 0.643$	$-0,155 \pm 0,119$

Tabla 3.4:  $\epsilon$  de las curvas simuladas con los parámetros ajustados con sus intervalos de confianza calculados para un 95 % de probabilidad.

<b>Parámetro</b>	$\epsilon_{Conc.Glucosa}$	$\epsilon_{Conc.Lactato}$	$\epsilon_{Conc.Celular}$
$P^{GLC}$	$-5,567 \pm 1,091$	$9,173 \pm 2,201$	$0,456 \pm 0,127$
$P^{LAC}$	$-5,575 \pm 1,092$	$9,178 \pm 2,202$	$0,455 \pm 0,127$
$P^{LAC1}$	$-5,575 \pm 1,092$	$9,178 \pm 2,202$	$0,455 \pm 0,127$
$P^k$	$-5,575 \pm 1,092$	$9,178 \pm 2,202$	$0,455 \pm 0,127$
$P^{k2}$	$-5,575 \pm 1,092$	$9,178 \pm 2,202$	$0,455 \pm 0,127$

El resultado de la comparación de los datos simulados y experimentales se muestra en la Tabla 3.4. De la comparación con los resultados de la Tabla 3.3 se observa una mayor importancia del ajuste del parámetro  $P^{GLC}$  en comparación a los parámetros  $P^{LAC}$ ,  $P^{LAC1}$ ,  $P^k$  y  $P^{k2}$  pues es el que posee una mayor reducción del error de ajuste cuando es ajustado por sí solo. Por otra parte, los parámetros restantes poseen un error de ajuste muy similar y no con diferencias significativas con respecto al caso basal sin ajuste de parámetros.

Finalmente, la comparación de los valores calculados de  $\epsilon$  de la Tablas 3.3 y 3.4 permite suponer que es muy probable que los ajustes más incidentes en la reducción del  $\epsilon$  de las curvas de concentración de glucosa, lactato y celular se llevaron a cabo a nivel de los parámetros involucrados en planteamiento del crecimiento celular descrito en la ecuación 3.6 pues se reduce casi en un

orden de magnitud para el error de ajuste a las curvas de concentración de glucosa y de lactato y a prácticamente un 25 % el error de ajuste a la curva de concentración celular.

### 3.7. Análisis de estabilidad del estado estacionario del sistema

Como se aprecia en la Figuras 3.8 y 3.9, el modelo inicial retrata la respuesta metabólica del cultivo sin variación de estado metabólico pero no es capaz de describir la del cultivo frente a condiciones bajo las cuales se induce un cambio en el estado metabólico de la célula. Es por esto que se hace necesario corroborar si la carencia de una respuesta metabólica acorde con lo obtenido experimentalmente corresponde a un error de planteamiento del modelo o de las condiciones de simulación. Para esto, la existencia de un único punto estable apuntaría a que el modelo matemático inicial no tiene más de un estado estacionario estable y, por ende, el sistema biológico planteado requiere de la inclusión de un modelo adicional de regulación del estado metabólico.

#### 3.7.1. Análisis de estabilidad por medio de valores propios

Considerando el sistema de ecuaciones diferenciales

$$\dot{\vec{C}} = f(\vec{C}, \theta) \quad (3.13)$$

con el vector de condiciones iniciales  $\vec{C}(0) = \vec{C}_0$ , se puede escribir matricialmente como

$$\dot{\vec{C}} = \mathbf{A}\vec{C} \quad (3.14)$$

tiene la siguiente solución analítica

$$\vec{C} = e^{\mathbf{A}t}\vec{C}_0 \quad (3.15)$$

que se puede escribir también de la forma

$$\vec{C}(t) = \sum_{j=1}^n c_j e^{\lambda_j t} w^{[j]} \quad (3.16)$$

donde  $\lambda_j$  y  $w^{[j]}$  corresponden a los valores y vectores propios de  $\mathbf{A}$ , respectivamente.

La forma general de  $\lambda_j$  es

$$\lambda_j = a_j + ib_j \quad (3.17)$$

con lo que la expresión 3.16 queda de la forma

$$\vec{C}(t) = \sum_{j=1}^n c_j e^{a_j t} [\cos(b_j t) + i \sin(b_j t)] w^{[j]} \quad (3.18)$$

en donde el valor de  $b_j$  incide en la oscilación y el valor de  $a_j$  determina la estabilidad de la respuesta del sistema frente a una perturbación.

La perturbación de un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales dentro de una vecindad de su estado estacionario  $\vec{C}_s$  tiene la forma  $f(\vec{C}_s + \delta)$  y se puede escribir como la siguiente expansión de Taylor (considerando una perturbación  $\delta$  pequeña)

$$f_j(\vec{C}_s + \delta) \approx f_j(\vec{C}_s) + \sum_{k=1}^n \left. \frac{\partial f_j}{\partial C_k} \right|_{\vec{C}_s} \delta = f_j(\vec{C}_s) + \sum_{k=1}^n \left. \frac{\partial f_j}{\partial C_k} \right|_{\vec{C}_s} \delta = f_j(\vec{C}_s) + \sum_{k=1}^n J_{jk} \Big|_{x_s} \delta \quad (3.19)$$

en donde  $J_{jk}$  es el componente de la fila  $j$  y columna  $k$  de la matriz jacobiana  $\mathbf{J}$  de  $f(\vec{C}, \theta)$ .

De la aproximación anterior se tiene

$$f(\vec{C}_s + \delta, \theta) \approx f(\vec{C}_s) + \mathbf{J}(\vec{C}_s, \theta) \delta \quad (3.20)$$

De esta manera el estudio del estado estacionario de un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias se relaciona con el análisis de la respuesta del sistema ante una perturbación  $\delta$ . De las deducciones anteriores se tiene pues  $f(\vec{C}_s)$  es constante en el tiempo por lo que  $\frac{df(\vec{C}_s)}{dt} = 0$

$$\dot{\delta} = \mathbf{J}(x_s, \theta) \delta \quad (3.21)$$

por lo que el análisis de la estabilidad del estado estacionario frente a una perturbación  $\delta$  se convierte en un análisis de los valores propios de la matriz en la vecindad  $\delta$ .

De la ecuación 3.18 se puede deducir que la incidencia de  $a_j$  en la estabilidad del estado estacionario de un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias depende de lo siguiente:

- Si  $a_j = \text{Re}(\lambda_j) \forall j < 0$ , entonces para cualquier perturbación el estado estacionario será estable en la vecindad  $\delta$ .
- Si  $a_j = \text{Re}(\lambda_j) \forall j > 0$ , entonces para cualquier perturbación el estado estacionario será inestable.
- Si  $a_j = \text{Re}(\lambda_j) \forall j \leq 0$ , entonces para cualquier perturbación el estado estacionario será neu-

tralmente estable en la vecindad  $\delta$ .

El criterio utilizado para establecer que un punto corresponde al estado estacionario fue que el valor de la derivada para el crecimiento celular y para los metabolitos citoplasmáticos, extracelulares y mitocondriales de glucosa, lactato y piruvato fuese inferior a  $1 \cdot 10^{-5}$  o que el valor de la iteración  $n$  no superara en  $1 \cdot 10^{-5}$  el valor de la iteración  $(n - 1)$  durante 10 iteraciones. El objetivo de presentar dos criterios de estado estacionario es para superar posibles oscilaciones en los valores de las concentraciones.

La aplicación del análisis numérico descrito al modelo metabólico inicial concluyó que la matriz jacobiana evaluada en el estado estacionario del modelo inicial es semi-definida negativa, es decir, que todos sus valores propios tienen parte real menor o igual a cero. Esto descarta la posibilidad de que el estado estacionario sea inestable. Sin embargo, la existencia de valores propios iguales a cero no permite concluir, solamente del análisis de los valores propios, que el estado estacionario es un punto atractor estable en una vecindad de  $\vec{C}_s$ .

### **3.7.2. Análisis de estabilidad por medio de diagrama de fases**

Con la motivación de que el análisis de los valores propios del jacobiano evaluado en el estado estacionario no fue concluyente en cuanto a la estabilidad del estado estacionario del modelo inicial, se realizó un análisis de estabilidad por medio de un diagrama de fases. El diagrama de fases consiste esencialmente en un gráfico de las trayectorias que sigue un sistema cuando es perturbado desde el estado estacionario  $P_{ss}$  hasta otro punto  $P_i$ , en donde las trayectorias trazan el comportamiento desde el punto  $P_i$  hasta alcanzar nuevamente el equilibrio, que puede coincidir con el punto  $P_{ss}$ .

La relevancia de ver el comportamiento del sistema planteado frente a perturbaciones recae, básicamente, sobre la respuesta del sistema frente a perturbaciones en la concentración de lactato y de glucosa. Es por esto que el diagrama de fases se realizó considerando solamente perturbaciones en la concentración de lactato y glucosa. La elección de los puntos iniciales de las trayectorias fue de manera aleatoria, se escogió de manera aleatoria la magnitud de la perturbación dentro un rango de entre 0 y 18,4 [mM], y 0 y 20 [mM] para la concentración de glucosa y lactato en el estado estacionario, respectivamente. La obtención de las trayectorias asociadas a cada perturbación fue por medio de la simulación del sistema completo en bajo un régimen continuo durante 1.000 horas.

El resultado de la construcción del diagrama de fases se presenta en la Figura 3.10, se puede observar que para las condiciones probadas solo existe un punto atractor estable que corresponde al estado estacionario del modelo inicial.

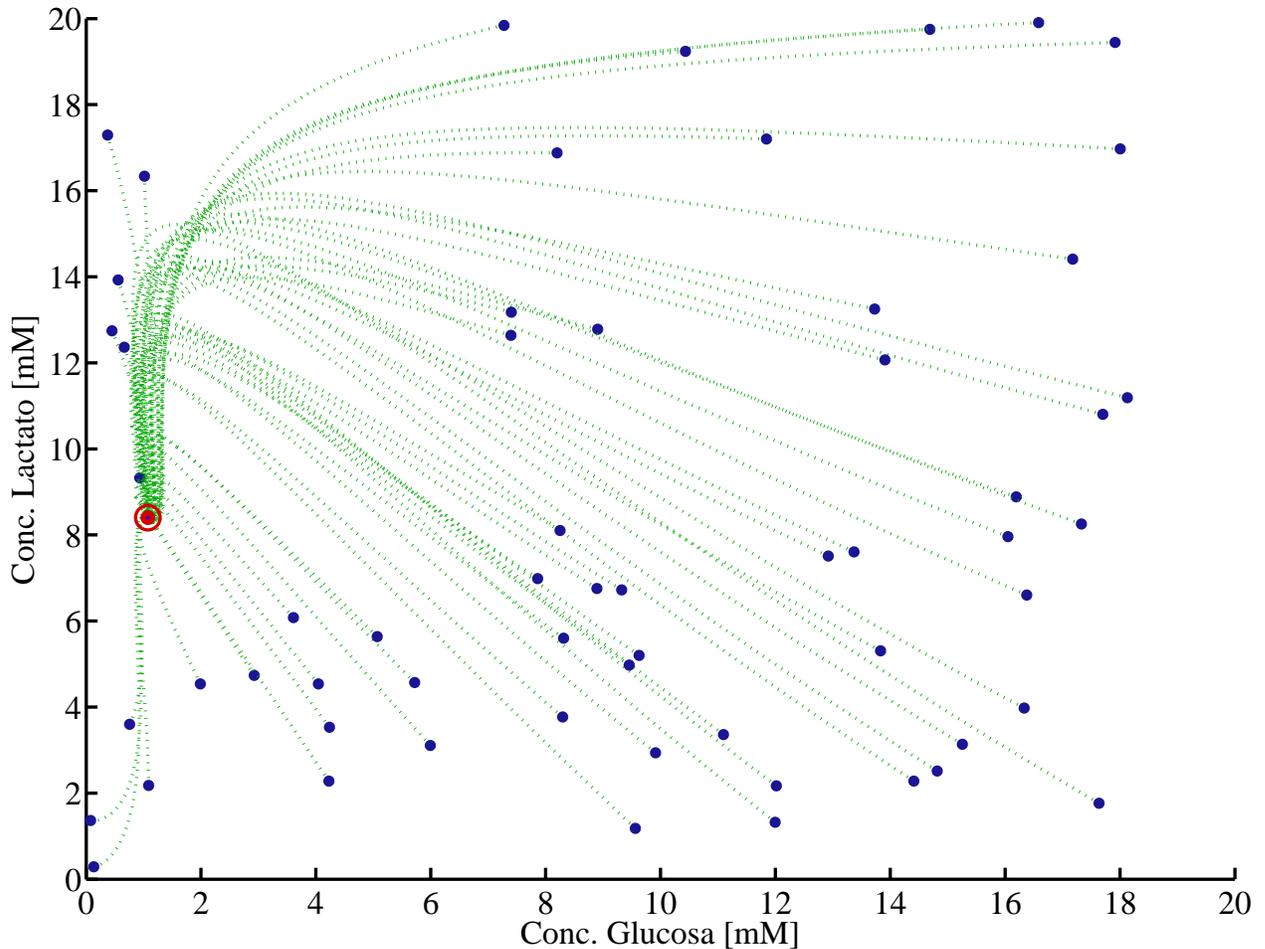


Figura 3.10: Diagrama de fases para el estado estacionario del modelo metabólico inicial. El punto rojo corresponde al estado estacionario del sistema  $P_{SS}$  y los puntos azules a los puntos iniciales  $P_i$  (perturbaciones al estado estacionario).

### 3.8. Discusión de resultados de la simulación del modelo ajustado

En primer lugar se puede notar, de los resultados de la simulación del modelo ajustado, que el sistema tiene una respuesta metabólica cualitativamente similar al obtenido experimentalmente. Esto respalda la metodología utilizada para obtener los parámetros de ajuste y es secundado por el análisis de significancia realizado por medio de prueba t de Student. Se observó que, salvo por tres casos puntuales, el ajuste se definió significativo con una probabilidad mayor a 95 %, llegando

en casos a ser superior al 99,99%. De esta manera la utilización de los ponderadores  $P^{GLC}$ ,  $P^{LAC}$ ,  $P^{LAC1}$ ,  $P^k$  y  $P^{k2}$  se justifica debido a que tiene una alta probabilidad que la reducción del  $\epsilon$  que genera el uso de dichos ponderadores no ocurre por otro factor que no sea el ajuste de parámetros que se genera.

A su vez, se observa también que el ponderador  $P^{GLC}$  es el factor de ajuste que genera mayor reducción del  $\epsilon$  entre los ponderadores utilizados reduciéndose el  $\epsilon$  de  $4,224 \pm 1,916$ ,  $9,078 \pm 2,221$  y  $139,626 \pm 93,632$  a  $3,807 \pm 2,034$ ,  $8,769 \pm 2,279$  y  $44,395 \pm 21,009$  de las curvas simuladas de glucosa, lactato y concentración celular, respectivamente. Sin embargo la comparación de los  $\epsilon$  y sus intervalos de confianza identifican al ajuste de parámetros del modelo de crecimiento celular como lo más incidente en el ajuste final del modelo metabólico, lográndose valores de  $\epsilon$  de  $0,354 \pm 0,075$ ,  $0,66 \pm 0,152$  y  $0,085 \pm 0,057$  de las curvas simuladas de glucosa, lactato y concentración celular, respectivamente. Así, se puede considerar que los ajustes que se llevaron a cabo son requeridos para lograr que el modelo metabólico utilizado simule mejor las curvas de concentración experimentales.

A pesar de lo anterior se constató que el ajuste realizado no es capaz de captar con precisión la respuesta dinámica en las últimas horas de cultivo observada a nivel experimental, correspondiente a la fase estacionaria. A nivel experimental se observó una reducción de la tasa de producción de lactato corroborado con una baja de la razón  $\Delta L/\Delta G$  hasta aproximadamente 1,5 [mM] (ver Figura 3.4), que no se considera producto del fenómeno de variación de estado metabólico por los rangos de variación en las que se encuentra pero si puede considerarse una variación que no es capaz de captar el modelo metabólico debido a que este último simula únicamente la regulación metabólica que se puede llevar a cabo en un cultivo que, de acuerdo a la literatura, no es la única que existe [15].

La falta de capacidad del modelo ajustado de captar la dinámica de un cultivo celular animal con una leve variabilidad de la tasa producción de lactato y un mayor consumo glucosa es lo que ha generado el error de ajuste observado. Aún así, se considera que el modelo metabólico ajustado es una aproximación matemática suficiente para retratar la respuesta metabólica de un cultivo que no posee variación de su estado metabólico. Por otra parte, la inclusión de un modelo adicional de regulación de consumo de glucosa para la formación de biomasa se considera también innecesario debido a que genera una complejización excesiva del modelo actual.

Los resultados obtenidos en el marco de la simulación del modelo metabólico permiten concluir

que el modelo es capaz de adoptar la respuesta metabólica de un cultivo células animales que no presentan variación en su estado metabólico. Sin embargo, el modelo metabólico inicial no tiene la misma respuesta metabólica que un cultivo animal en un estado metabólico alterado, la principal diferencia yace en el exceso de producción de lactato por parte del cultivo simulado. Se puede notar también que el estado estacionario alcanzado tanto para las condiciones de cultivo de control, como alterado, es el mismo lo que respalda que el modelo metabólico tiene un único punto atractor estable.

Finalmente, la existencia de un único atractor estable genera la posibilidad de que el fenómeno de la alteración de respuesta metabólica no ocurre solamente a nivel metabólico y que podría existir un sistema de regulación interno en otro nivel fuera de lo metabólico. La literatura respalda que el fenómeno de variación del estado metabólico ocurre también a nivel de niveles de expresión génicos, lo que sustentaría la inclusión de un modelo de regulación génica dentro del modelo inicial para poder obtener la respuesta metabólica de un cultivo celular animal que presenta una variación en su estado metabólico [15].

# Capítulo 4

## Simplificación del modelo metabólico

### 4.1. Motivación

Para ahorrar recursos computacionales asociados a la implementación y corroboración de un modelo de regulación continuo se optó por simplificar el modelo metabólico obtenido en el Capítulo 3. La base para dicha simplificación fue una simplificación del mismo modelo inicial ajustado con datos experimentales de consumo de glucosa y galactosa de cultivos de células CHO [35].

### 4.2. Descripción del modelo

#### 4.2.1. Vías metabólicas

El modelo simplificado inicial posee las vías metabólicas presentadas en la Figura 4.1, en donde las cinéticas de las reacciones corresponden a cinéticas enzimáticas de la forma de Michaelis-Menten. Como base se utilizó un modelo de metabolismo de células CHO simplificado de la literatura [35]. Las reacciones asociadas al consumo de galactosa fueron suprimidas del modelo original por la relevancia otorgada al consumo de glucosa en el fenómeno de la variación del estado metabólico, debidamente justificada en la sección 2.2 y la cinética para el ciclo TCA fue reemplazada por la reacción  $r_{TCT}$  del modelo completo (ver Apéndice B).

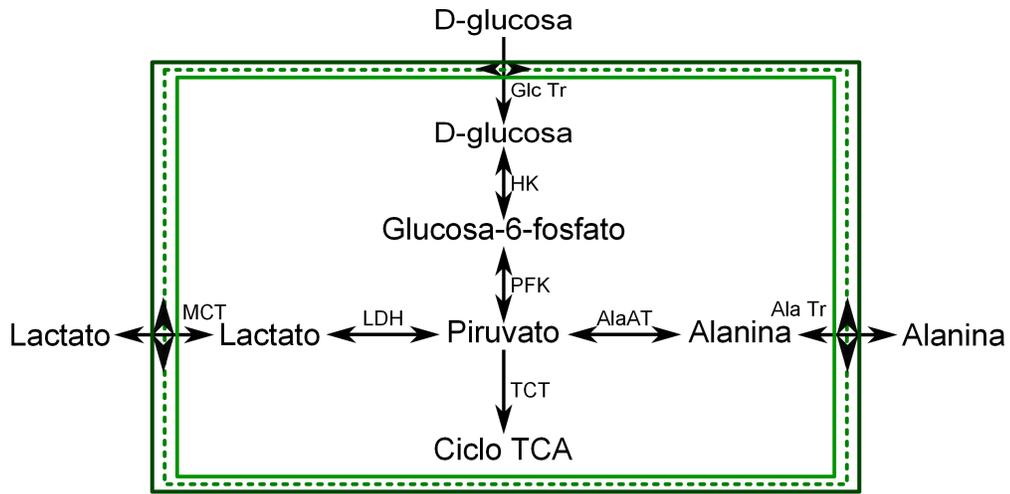


Figura 4.1: Modelo metabólico simplificado.

#### 4.2.2. Cinéticas enzimáticas

Las cinéticas que definen las diferentes vías metabólicas del modelo simplificado inicial se presentan a continuación:

##### Glicólisis

*Transporte de glucosa* [36]

$$r_{GlcTr} = \frac{k_{GlcTr}^f C_{GLC}^e - k_{GlcTr}^r C_{GLC}^c}{1 + \frac{C_{GLC}^e}{K_{GlcTr}^e} + \frac{C_{GLC}^c}{K_{GlcTr}^c}} \quad (4.1)$$

$$k_{GlcTr}^f = 77,47 [hr^{-1}]$$

$$k_{GlcTr}^r = 7,75 \cdot 10^{-1} [hr^{-1}]$$

$$K_{GlcTr}^c = 1,5 [mM]$$

*Hexoquinasa* [27]

$$r_{HK} = \frac{\frac{v_{max,HK}^f C_{MgATP}^c C_{GLC}^c}{K_{i,GLC}^{HK} K_{MgATP}^{HK}} - \frac{v_{max,HK}^r C_{MgADP}^c C_{G6P}^c}{K_{G6P}^{HK} K_{MgADP}^{HK}}}{1 + \frac{C_{GLC}^c}{K_{i,GLC}^{HK}} + \frac{C_{MgATP}^c}{K_{i,MgATP}^{HK}} + \frac{C_{G6P}^c}{K_{i,G6P}^{HK}} + \frac{C_{MgATP}^c C_{GLC}^c}{K_{i,GLC}^{HK} K_{MgATP}^{HK}} + \frac{C_{MgATP}^c C_{G6P}^c}{K_{i,G6P}^{HK} K_{i,MgATP}^{HK}}} \quad (4.2)$$

$$v_{max, HK}^f = 72 \cdot 10^5 [hr^{-1}]$$

$$v_{max, HK}^r = 60 [hr^{-1}]$$

$$K_{MgATP}^{HK} = 6,3 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{i, MgATP}^{HK} = 6,3 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{MgADP}^{HK} = 2,3 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{i, MgADP}^{HK} = 2,3 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{G6P}^{HK} = 4 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{i, G6P}^{HK} = 6,7 [mM]$$

$$K_{GLC}^{HK} = 0,1 [mM]$$

$$K_{i, GLC}^{HK} = 0,1 [mM]$$

*Fosfofructoquinasa* [37]

$$r_{PFK} = \left( \frac{k_{PFK}^f \frac{C_{ATP}^c C_{F6P}^c}{K_{ATP}^{PFK} K_{F6P}^{PFK}} - k_{PFK}^r \frac{C_{ADP}^c C_{PYR}^c}{K_{ADP}^{PFK} K_{FBP}^{PFK}}}{\Delta} \right) \cdot \frac{1 + \alpha L \left( \frac{\Delta'}{\Delta} \right)^3}{1 + \alpha L \left( \frac{\Delta'}{\Delta} \right)^4} \quad (4.3)$$

$$\Delta = \left( 1 + \frac{C_{F6P}^c}{K_{F6P}^{PFK}} \right) \left( 1 + \frac{C_{ATP}^c}{K_{ATP}^{PFK}} \right) + \frac{C_{ADP}^c}{K_{ADP}^{PFK}} + \frac{C_{PYR}^c}{2 K_{FBP}^{PFK}} \left( 1 + \frac{C_{ADP}^c}{K_{ADP}^{PFK}} \right) \quad (4.4)$$

$$\Delta' = \left( 1 + \frac{C_{F6P}^c}{K_{F6P}'^{PFK}} \right) \left( 1 + \frac{C_{ATP}^c}{K_{ATP}'^{PFK}} \right) + \frac{C_{ADP}^c}{K_{ADP}'^{PFK}} + \frac{C_{PYR}^c}{2 K_{FBP}'^{PFK}} \left( 1 + \frac{C_{ADP}^c}{K_{ADP}'^{PFK}} \right) \quad (4.5)$$

$$\alpha = \frac{K_{F6P}^{PFK} K_{ATP}^{PFK}}{K_{F6P}'^{PFK} K_{ATP}'^{PFK}} \quad (4.6)$$

$$L = L_0 \left( \frac{1 + \frac{C_{ATP}^c}{K_{i, ATP}^{PFK}}}{1 + d \frac{C_{ATP}^c}{K_{i, ATP}^{PFK}}} \frac{1 + e \frac{C_{AMP}^c}{K_{\alpha AMP}^{PFK}}}{1 + \frac{C_{AMP}^c}{K_{\alpha AMP}^{PFK}}} \right)^4 \quad (4.7)$$

$$k_{PFK}^r = \frac{k_{PFK}^f K_{ADP}^{PFK} K_{FBP}^{PFK}}{K_{ATP}^{PFK} K_{F6P}^{PFK}} \quad (4.8)$$

$$k_{PFK}^f = 6,75 \cdot 10^4 [mM]$$

$$K_{ATP}^{PFK} = 8 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{F6P}^{PFK} = 1,8 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{ATP}'^{PFK} = 2,5 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{F6P}'^{PFK} = 20 [mM]$$

$$K_{FBP}^{PFK} = 4,02 [mM]$$

$$K_{ADP}^{PFK} = 2,71 [mM]$$

$$K_{i,ATP}^{PFK} = 8,7 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{\alpha AMP}^{PFK} = 6 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$d = 0,01 [-]$$

$$e = 0,01 [-]$$

$$L_0 = 13 [-]$$

*Transportador de tricarboxilato* [38, 108–110]

$$r_{TCT} = k_{TCT} \frac{C_{PYR}^c}{K_{PYR}^{TCT} + C_{PYR}^c} \quad (4.9)$$

$$k_{TCT} = 19,62 \cdot 10^{-1} [mM/hr]$$

$$K_{PYR}^{TCT} = 2,00 \cdot 10^{-2} [mM]$$

## Metabolismo de lactato

Transportador de monocarboxilato [38]

$$r_{MCT} = \frac{k_{MCT}^f \frac{C_{LAC}^c}{K_f^{MCT}} - k_{MCT}^r \frac{C_{LAC}^e}{K_r^{MCT}}}{1 + \frac{C_{LAC}^c}{K_f^{MCT}} + \frac{C_{LAC}^e}{K_r^{MCT}}} \quad (4.10)$$

$$k_{MCT}^f = 3,66 \cdot 10^2 [mM \cdot hr^{-1}]$$

$$k_{MCT}^r = 710,03 [hr^{-1}]$$

$$K_f^{MCT} = 5 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_r^{MCT} = 1,9386 [mM \cdot hr^{-1}]$$

Lactato deshidrogenasa [37]

$$r_{HK} = \frac{\frac{v_{max,LDH}^f C_{NADH}^c C_{PYR}^c}{K_{PYR}^{LDH} K_{NADH}^{LDH}} - \frac{v_{max,LDH}^r C_{NAD}^c C_{LAC}^c}{K_{LAC}^{LDH} K_{NAD}^{LDH}}}{1 + \frac{C_{PYR}^c}{K_{PYR}^{LDH}} + \frac{C_{NADH}^c}{K_{NADH}^{LDH}} + \frac{C_{PYR}^c C_{NADH}^c}{K_{PYR}^{LDH} K_{NADH}^{LDH}} + \frac{C_{LAC}^c}{K_{LAC}^{LDH}} + \frac{C_{NAD}^c}{K_{NAD}^{LDH}} + \frac{C_{LAC}^c C_{NAD}^c}{K_{LAC}^{LDH} K_{NAD}^{LDH}}} \quad (4.11)$$

$$v_{max,LDH}^r = \frac{v_{max,LDH}^f K_{LAC}^{LDH} K_{NAD}^{LDH}}{K_{PYR}^{LDH} K_{NADH}^{LDH} K_{eq}^{LDH}} \quad (4.12)$$

$$v_{max,LDH}^f = 5,1036 \cdot 10^8 [mM \cdot hr^{-1}]$$

$$K_{PYR}^{LDH} = 0,6 [mM]$$

$$K_{NADH}^{LDH} = 8 \cdot 10^{-3} [mM]$$

$$K_{LAC}^{LDH} = 17 [mM]$$

$$K_{NAD}^{LDH} = 2,53 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{eq}^{LDH} = 2 [-]$$

Al comparar el modelo simplificado con el modelo metabólico completo se observan las siguientes diferencias:

- Las vías metabólicas de la glicólisis han sido acopladas en las reacciones asociadas a la PK y de la PFK.

- Se ha eliminado por completo la vía de la pentosa fosfato. El modelo inicial descrito en [35] no incluye la vía de la pentosa fosfato y se optó por omitir dicha vía metabólica porque la literatura indica que el fenómeno de regulación génica afecta principalmente los flujos metabólicos que llegan al punto de intersección generado por el consumo de piruvato hacia la mitocondria y para la producción de lactato [13].
- El modelo inicial tampoco incluye una descripción detallada de la síntesis de aminoácidos ni del ciclo TCA. Estos procesos metabólicos han sido abordados por medio de un tapón que busca simular un consumo sin una descripción detallada del mismo.

Se escogió dicho modelo simplificado porque describe las vías metabólicas relevantes para el fenómeno de la variación del estado metabólico que son aquellas vías cuyo punto en común es el piruvato. La relevancia del piruvato yace en que se puede transportar hacia el espacio mitocondrial o se puede utilizar para generar dos productos lactato o alanina, cuya distribución define el estado metabólico del cultivo. La producción de lactato, producto inhibitorio de crecimiento celular, y alanina, aminoácido generado con la presencia excesiva de piruvato, son fenómenos bioquímicos propios de un estado metabólico de control [13].

### 4.3. Ajuste de parámetros

Al igual que para el modelo completo, se realizó un trabajo de ajuste del modelo a curvas experimentales de glucosa, lactato y de crecimiento celular para un cultivo de control.

#### 4.3.1. Resultados de ajuste de parámetros y simulación con parámetros ajustados

A diferencia del ajuste realizado para el modelo metabólico completo, en el modelo simplificado, únicamente se tuvo como resultado de ajuste la necesidad de ponderar la expresión  $r_{perm}$  por un ponderador  $P_{Glc} = 0,485$ . Se mantuvieron los valores de  $\mu_{max}$  y  $K_{lac}^I$  del ajuste realizado para el modelo completo. Las curvas resultantes de la simulación del cultivo de control y alterado con los parámetros ajustados se encuentran en las Figuras 4.2 y 4.3, respectivamente.

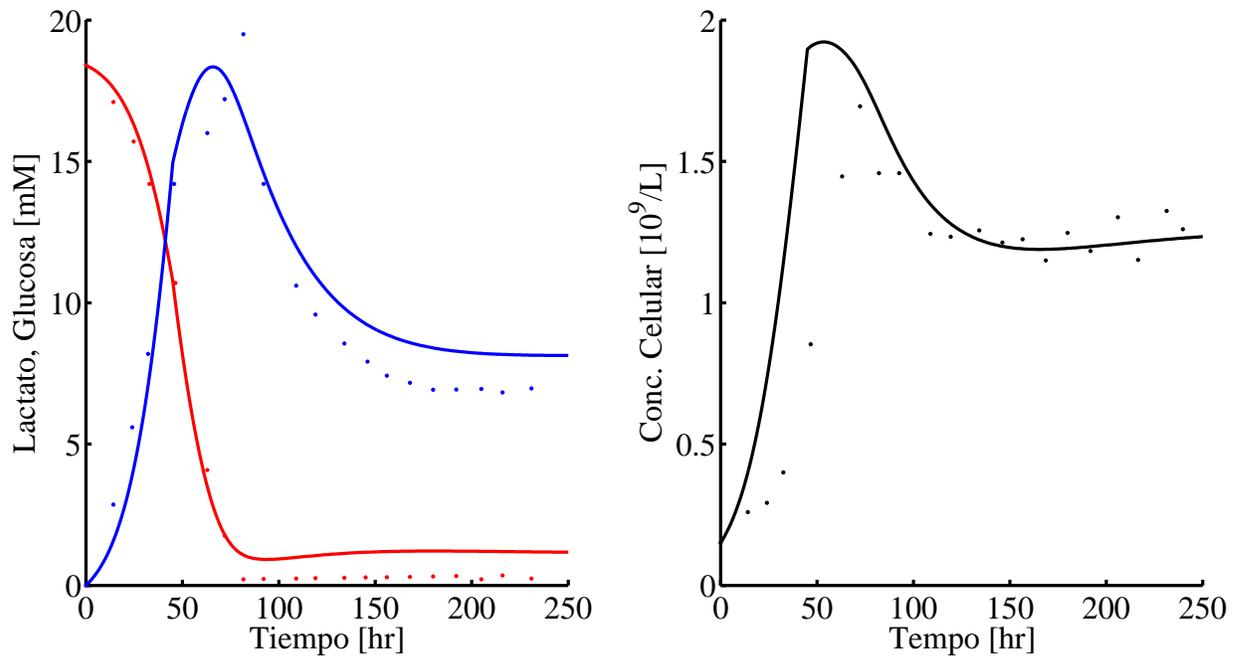


Figura 4.2: Simulación del cultivo de control con el modelo simplificado ajustado. —: Conc. simulada de lactato, —: Conc. simulada de glucosa, —: Conc. celular simulada, ■: Conc. experimental de lactato, ■: Conc. experimental de glucosa, ■: Conc. celular experimental. El cultivo consiste en un modo de operación batch hasta las 45 [hr] y una operación continua desde las 45 [hr] hasta el final.

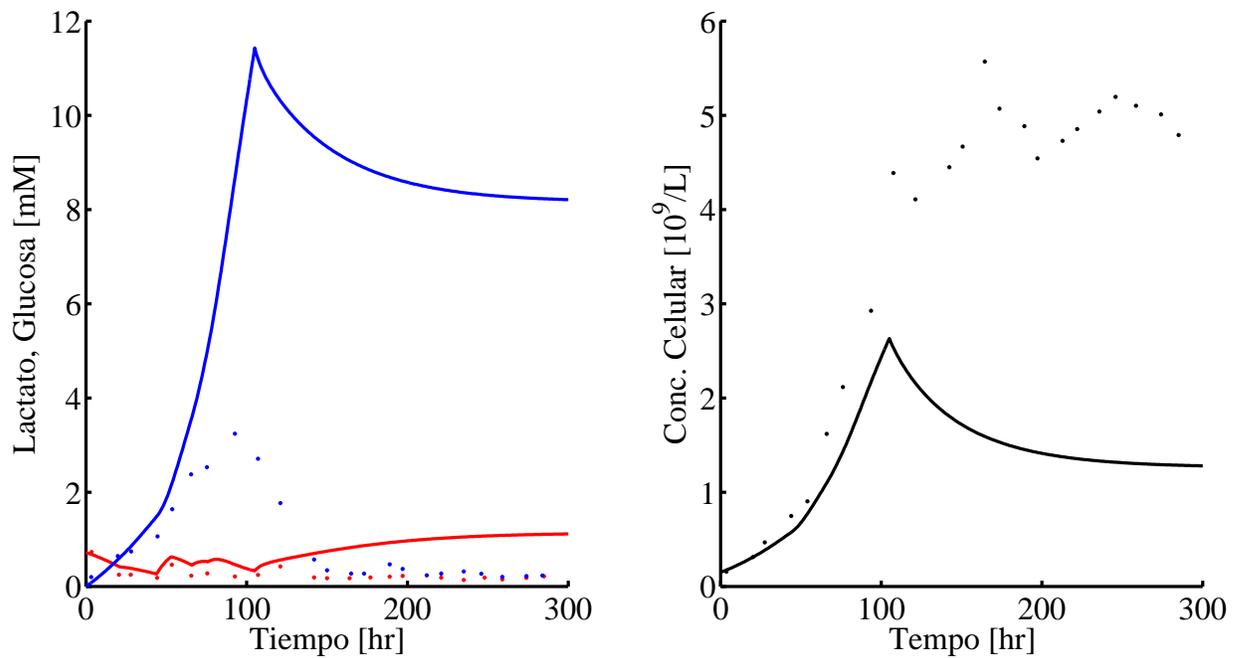


Figura 4.3: Simulación de cultivo alterado con el modelo simplificado ajustado. —: Conc. simulada de lactato, —: Conc. simulada de glucosa, —: Conc. celular simulada, ■: Conc. experimental de lactato, ■: Conc. experimental de glucosa, ■: Conc. celular experimental.

### 4.3.2. Análisis estadístico de parámetros ajustados

Al igual que para el modelo metabólico completo se realizó un análisis estadístico por medio de la prueba  $t$  de Student a fin de saber la significancia de los parámetros de ajuste utilizados. Como ya fue adelantado, el resultado del ajuste del modelo dió como resultado un único factor de ajuste  $P_{Glc} = 0,485$ . A priori, la necesidad de un único ajuste de la magnitud mencionada deja en claro que el modelo sin ajuste posee un comportamiento bastante cercano a lo visto experimentalmente para el cultivo de control. Resultados de la simulación del cultivo de control sin el ajuste de parámetros, i.e.  $P_{Glc} = 1$ , se encuentran retratadas en la Figura 4.4. Sin embargo, cabe destacar que el modelo a ajustar incluye las modificaciones descritas en la sección 4.2.1.

Los p-values y la significancia del parámetro de ajuste  $P_{Glc}$  se encuentran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: p-values y significancia al 95 % de parámetros ajustados.

Parámetro	$\varepsilon_{Conc.Glucosa}$		$\varepsilon_{Conc.Lactato}$		$\varepsilon_{Conc.Celular}$	
	p-value	Significante	p-value	Significante	p-value	Significante
$P_{Glc}$	0,1298	NO	0,1160	NO	0,0069	SI

El parámetro de ajuste  $P_{Glc}$  no es significativo en el caso de la raíz del error cuadrático medio de las curvas de concentración de lactato y glucosa, pero si en el caso de la curva de concentración celular. Sin embargo, cabe señalar que probabilidad de que el ajuste no sea por la variación de  $P_{Glc}$ , para ambas curvas donde no existe significancia, es sobre el 85 % lo que no permite descartar completamente el ajuste realizado. Por otra parte, la comparación de la curva de concentración celular de la Figura 4.4 con la de la Figura 4.2 aclara la alta probabilidad predicha ( $1 - p\text{-value}$ ) de que la variación del  $\varepsilon$  del ajuste sea producto del ajuste del ponderador  $P_{Glc}$  (sobre 99 %).

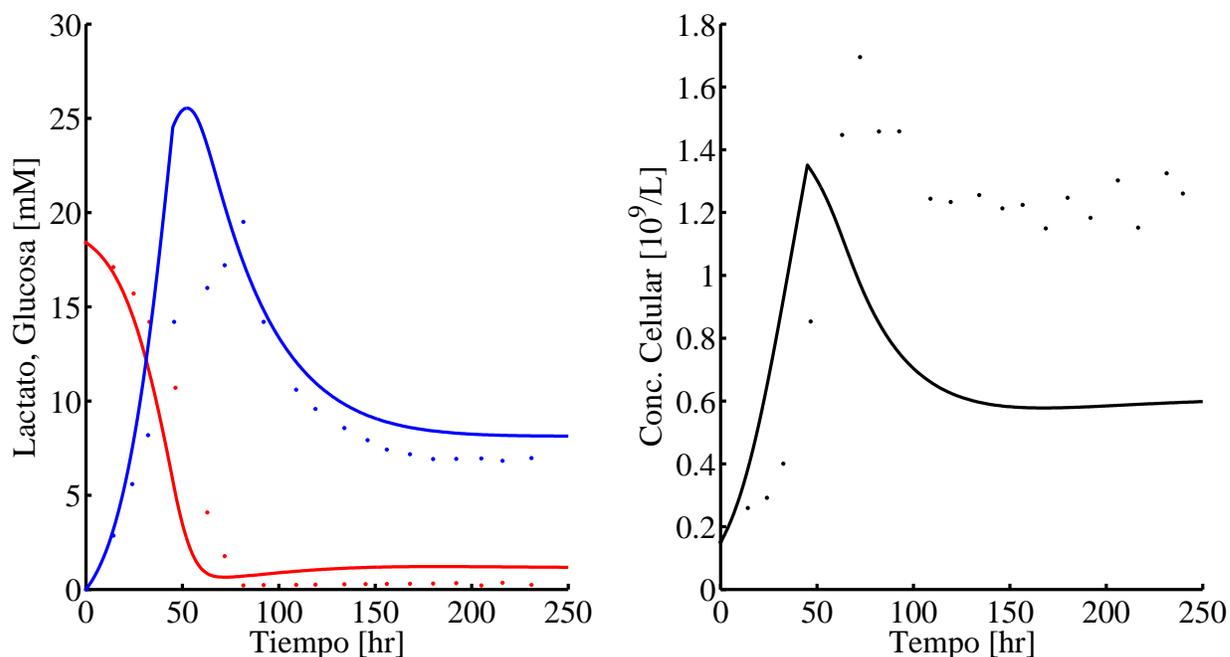


Figura 4.4: Simulación de cultivo de control con el modelo simplificado sin ajustes. —: Conc. simulada de lactato, —: Conc. simulada de glucosa, —: Conc. celular simulada, ■: Conc. experimental de lactato, ■: Conc. experimental de glucosa, ■: Conc. celular experimental.

La simulación de los datos experimentales nuevamente presenta un error de ajuste en el mismo tramo en el cual se observó para la simulación utilizando el modelo inicial. Este error de ajuste, tal como se planteó en el capítulo anterior no resta capacidad de captar la respuesta de un cultivo celular sin variación alguna en su estado metabólico pero si muestra una pérdida de generalidad al suponer que los cultivos de control no poseen variación de su razón  $\Delta L/\Delta G$ .

El residual del ajuste,  $\epsilon$ , de las curvas simuladas con el modelo simplificado sin ajuste de parámetros se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2:  $\epsilon$  de las curvas simuladas con el modelo sin ajuste, de la Figura 4.4, con sus respectivos intervalos de confianza calculados para un 95 % de probabilidad.

$\epsilon_{Conc.Glucosa}$	$\epsilon_{Conc.Lactato}$	$\epsilon_{Conc.Celular}$
$2,717 \pm 0,638$	$3,593 \pm 1,003$	$0,883 \pm 0,208$

Finalmente, el  $\epsilon$  de las curvas simuladas con el modelo simplificado con el ajuste único del parámetro  $P_{Glc}$  se muestra en la Tabla 4.3 y los valores de  $\epsilon$  para el modelo simplificado completamente ajustado se encuentran en la Tabla 4.4.

Al igual que para el modelo inicial el modelo simplificado presenta una reducción de los valores absolutos promedios de  $\epsilon$  al comparar el modelo sin ajustes con el ajustado. También para este

Tabla 4.3:  $\epsilon$  de las curvas simuladas con el parámetro  $P_{Glc}$  ajustado con su intervalos de confianza calculado para un 95 % de probabilidad.

Parámetro	$\epsilon_{Conc.Glucosa}$	$\epsilon_{Conc.Lactato}$	$\epsilon_{Conc.Celular}$
$P_{Glc}$	$-3,765 \pm 0,736$	$5,619 \pm 1,466$	$0,811 \pm 0,195$

Tabla 4.4:  $\epsilon$  de las curvas simuladas con el modelo ajustado con sus respectivos intervalos de confianza calculados para un 95 % de probabilidad.

$\epsilon_{Conc.Glucosa}$	$\epsilon_{Conc.Lactato}$	$\epsilon_{Conc.Celular}$
$-0,576 \pm 0,218$	$-0,62 \pm 0,62$	$-0,156 \pm 0,131$

ajuste de parámetros se observa que hay una mayor disminución de los valores absolutos promedios de  $\epsilon$  una vez ajustado el modelo de crecimiento celular, lo que nuevamente otorga suma incidencia a dicho modelo. Sin embargo, se observan que los valores de  $\epsilon$  para el modelo simplificado son un 51,3 % y un 61,9 % más bajos para las curvas de concentración de glucosa, lactato, respectivamente, y un 94,1 % mayor para la curva de concentración celular en comparación al modelo inicial sin ajustes por lo que el modelo simplificado sin ajustes logra representar mejor las curvas de concentración que su símil anterior lo que puede deberse al hecho de que el modelo simplificado fue utilizado para simular curvas cultivos batch de células CHO [35], es decir, se simuló su dinámica considerando un sistema cultivo-bioreactor, al contrario del modelo inicial en donde el objetivo fue estudiar la dinámica intracelular de los metabolitos [21].

#### 4.4. Análisis de estabilidad del estado estacionario del sistema

La falta de capacidad del modelo simplificado de obtener la respuesta metabólica de un cultivo alterado con un único juego de parámetros y la similitud del estado estacionario alcanzado para el cultivo de control y el alterado motivó a un análisis de estabilidad del estado estacionario obtenido por el modelo simplificado para el cultivo de control.

Se realizó el mismo análisis de la sección 3.7, en donde el vector de valores propios del estado estacionario es semi-definida negativa con un único valor propio con parte real igual a 0. El restante de los valores propios poseen partes reales que van desde  $-0,021$  hasta  $-2,333 \cdot 10^{10}$ .

Debido a que el vector de valores propios define al sistema como neutralmente estable, se construyó un diagrama de fases que se dispone en la Figura 4.5, se puede observar que existe también un único punto atractor estable que corresponde al estado estacionario del modelo simplificado.

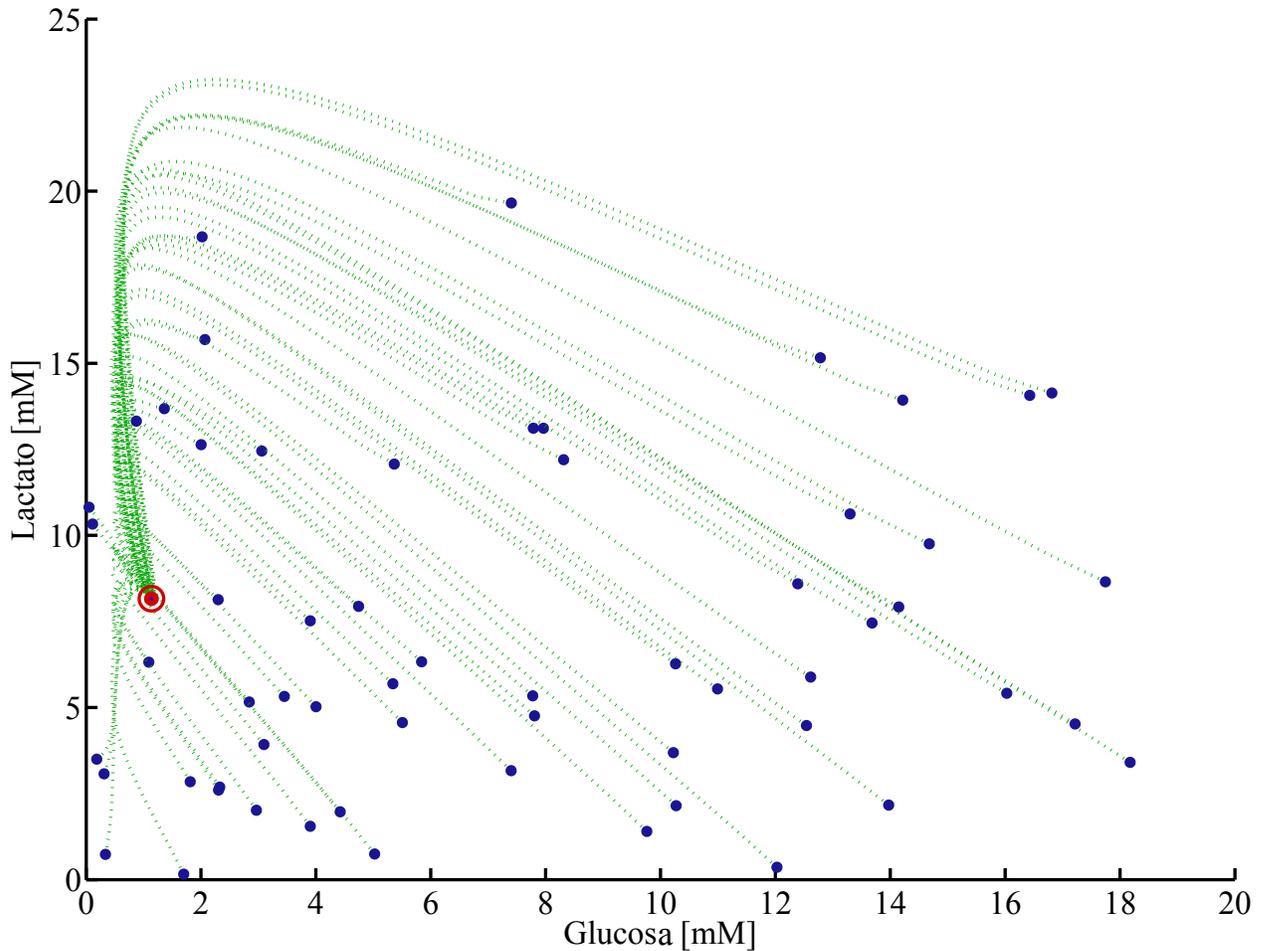


Figura 4.5: Diagrama de fases para el estado estacionario del modelo metabólico simplificado. El punto rojo corresponde al estado estacionario del sistema  $P_{SS}$  y los puntos azules a los puntos iniciales  $P_i$  (perturbaciones al estado estacionario).

## 4.5. Discusión de resultados de simplificación de modelo

La simplificación del modelo se llevó a cabo para reducir el número de variables a manipular y para ahorrar recursos computacionales, lográndose reducir los tiempos de simulación del modelo inicial a un 17% usando su simplificación. Si bien con la simplificación se pierde la posibilidad de observar en detalle lo que ocurre a nivel intracelular, los resultados avalan que el modelo simplificado es capaz de representar la respuesta metabólica del cultivo de control.

De esta manera, los resultados obtenidos para el modelo simplificado pueden considerarse satisfactorios pues además de ser comparables con los datos experimentales, coinciden con aquellos obtenidos para el modelo metabólico inicial. Sin embargo, al igual que los resultados obtenidos para el modelo completo, es muy probable el requerimiento de un modelo adicional de regulación

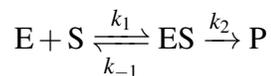
es necesario para capturar la respuesta metabólica alterada.

# Capítulo 5

## Modelo de regulación

### 5.1. Motivación

Tal como se indicó en la descripción general de lo que son los modelos metabólicos, la catálisis enzimática es la que define las reacciones que componen las diferentes vías metabólicas. Son las enzimas (E) las que participan con un sustrato (S) para generar un producto metabólico (P). Ahora bien, dicho fenómeno enzimático puede ser definida matemáticamente como una ecuación o planteamiento que relaciona E, S y P, en donde para el caso de las ecuaciones de cinética enzimática existen formas generales o variaciones de éstas. Uno de los planteamientos enzimáticos más utilizados es la forma de Michaelis-Menten en donde se supone una reacción enzimática de la forma:



y se realiza el desarrollo de la cinética enzimática considerando las suposiciones de Michaelis-Menten (disociación del complejo intermediario  $ES$  es la etapa controlante en la reacción y estado cuasi-estacionario), de manera de que la velocidad de formación del producto P tiene la forma de la ecuación 5.1.

$$r = r^{max} \frac{S}{K_M + S} \quad (5.1)$$

donde  $r^{max} = k_{cat}E_0$ , siendo  $E_0$  la concentración total inicial activa de enzima, y  $k_{cat}$  la constante catalítica que corresponde a la constante de velocidad de la conversión del complejo  $ES$  al complejo  $EP$  ( $k_2$ ). La construcción de ecuaciones de tipo Michaelis-Menten supone que la cantidad de enzima activa se mantiene constante a lo largo del tiempo y es por ello que se utiliza la concentración inicial  $E_0$ .

En su mayoría, las cinéticas enzimáticas utilizadas tanto en el modelo inicial como el simplificado son variaciones de la cinética de tipo Michaelis-Menten que consideran una componente  $r^{max}$ , ponderado por una función no lineal que depende de un sustrato S, que supone una concentración constante de enzimas activas. Sin embargo, estudios proteómicos y de nivel de expresión de genes de cultivos CHO, cuyo estado metabólico se ha visto alterado, concluyen que existe una variación reversible de los niveles de expresión de ciertas enzimas glicolíticas [15]. De esta manera, apoyado en los resultados experimentales relativos a la variación del nivel de expresión de genes de las enzimas glicolíticas, se podría descartar la suposición teórica de Michaelis-Menten relacionada con la concentración total invariante de las enzimas activas, para ciertas cinéticas.

Una variabilidad de cantidad de enzimas se traduciría en que dos estados metabólicos diferentes podrían tener diferentes cantidades de enzimas catalizando las reacciones metabólicas o que la misma concentración de enzimas podría tener una actividad variable en el tiempo. Lo anterior no podría ser representado por un mismo conjunto de parámetros tal como se corroboró con los resultados de las simulaciones utilizando el modelo inicial y simplificado, respectivamente presentados en las Figuras 3.8 y 4.2, y con los análisis de estabilidad del estado estacionario simulado por ambos.

Utilizando como base lo indicado antes se propuso el desarrollo de un modelo adicional de regulación enzimática a implementarse en el modelo inicial. El modelo de regulación debe considerar una variación de la cinética enzimática de ciertas cinéticas glicolíticas producto de una variación de concentración de las enzimas participantes o de una variación de actividad.

De los antecedentes experimentales fue posible suponer que un modelo de regulación debe partir de la base de que hay variación en el número de enzimas activas en el metabolismo celular animal y para esto se realizó un estudio de sensibilidad del modelo metabólico inicial frente a la variación en la cinética de algunas reacciones metabólicas.

## **5.2. Análisis de sensibilidad del modelo metabólico inicial**

La finalidad del análisis de sensibilidad de la respuesta metabólica del modelo metabólico inicial fue para determinar las enzimas más incidentes en el metabolismo trazado. Para dicho análisis se procedió a utilizar el modelo metabólico inicial sin ajuste alguno de parámetros, pues la relevancia yace en la respuesta del modelo mismo frente a diferentes perturbaciones y no la comparación

con datos experimentales. Como base para establecer el marco numérico de las perturbaciones se utilizaron los datos de PCR en tiempo real de la literatura [15], resumidos en la Tabla 5.1. La Tabla 5.1 muestra la comparación de un cultivo de control y un cultivo alterado, en cuanto a los niveles de expresión de seis genes, analizados por medio de PCR en tiempo real. En la Figura 5.1 se tiene un diagrama que muestra la ubicación de las enzimas de la Tabla 5.1 en el contexto de las vías metabólicas. Las enzimas afectadas por la variación de los niveles de expresión de dichos genes se utilizaron como base para el análisis de la sensibilidad del modelo metabólico inicial frente a perturbaciones en las cinéticas de las velocidades asociadas a dichas enzimas.

Tabla 5.1: Variación de niveles del estado metabólico alterado comparado con el estado metabólico basal (sin variación) de expresión por PCR en tiempo real [15].  $\downarrow X$  indica que hay un nivel de expresión  $X$  veces menor en el cultivo alterado, en comparación con el cultivo de control.

<b>Gen</b>	<b>Variación de Nivel de Expresión</b>
Fosfofructoquinasa (PFK)	$\downarrow 2,0$
Triosefosfato Isomerasa (TPI)	$\downarrow 7,3$
Fosfoglicerato Mutasa (PGM)	$\downarrow 2,4$
Enolasa 3 (EN)	$\downarrow 2,3$
Piruvato Quinasa (PK)	$\downarrow 2,9$
Lactato Deshidrogenasa 1 (LDH)	$\downarrow 2,4$

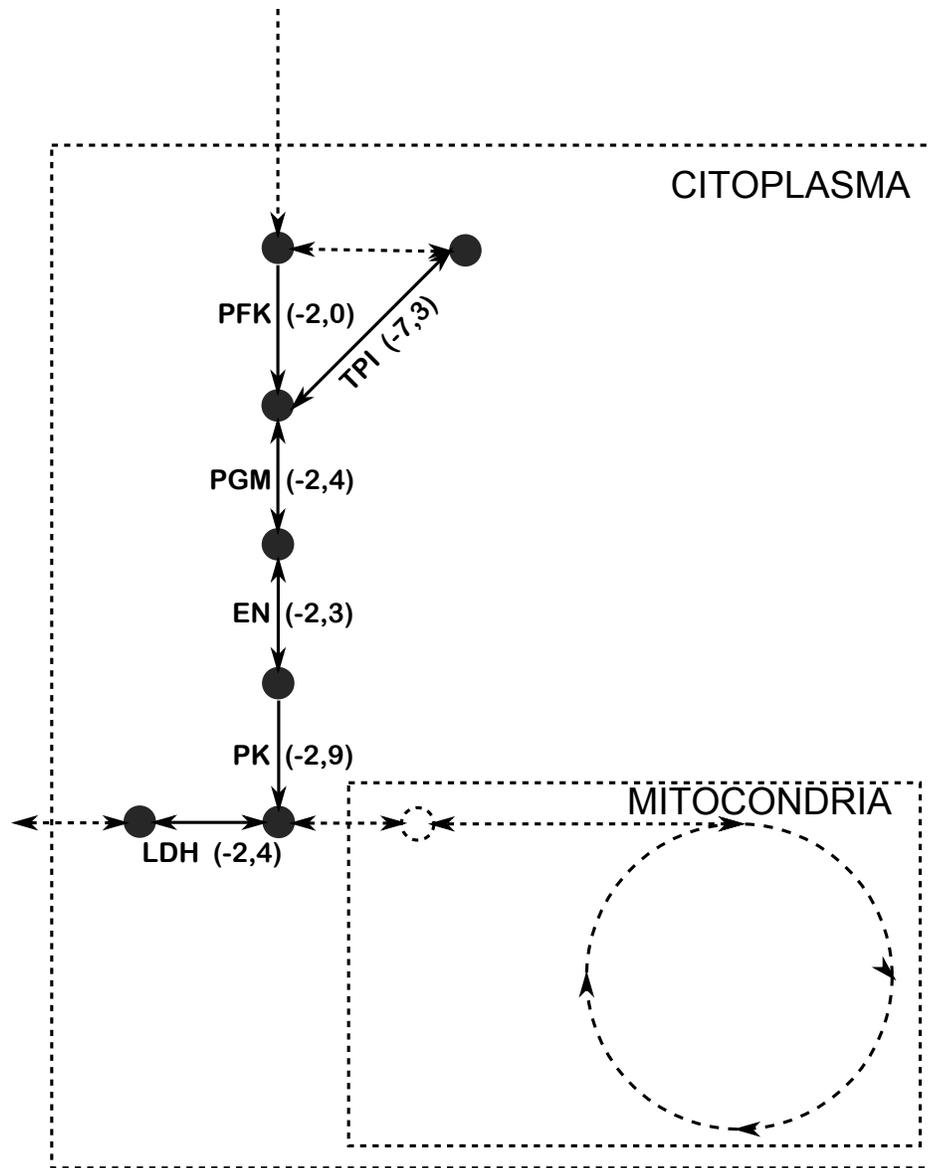


Figura 5.1: Diagrama con ubicación de enzimas afectadas dentro de la cadena de reacciones metabólicas.

Utilizando como base los niveles de variación obtenidos por PCR en tiempo real se ponderaron las cinéticas enzimáticas por un ponderador  $E_i \in [0, 1]$ , en donde  $i = \{PFK, TPI, PGM, EN, PK, LDH\}$  son cada uno de las enzimas de la primera columna de la Tabla 5.1. Bajo los supuestos iniciales se tendría una actividad máxima, constante e igual a la concentración inicial de enzima, es decir que  $E_i = 1$ . Es por esto que, para analizar la relevancia de cada una de las enzimas en la perturbación del sistema, se utilizó como base de comparación la respuesta simulada del modelo metabólico inicial sin ajustes frente a las condiciones de glucosa retratadas en la Figura 5.2 con la ponderación de

las velocidades cinéticas  $r_{PFK}$ ,  $r_{TPI}$ ,  $r_{PGM}$ ,  $r_{EN}$ ,  $r_{PK}$  y  $r_{LDH}$  por su respectivo  $E_i^* = 1/\gamma_i$ , donde  $\gamma_i$  corresponde a la variación del nivel de expresión de la enzima  $i$  (segunda columna de la Tabla 5.1).

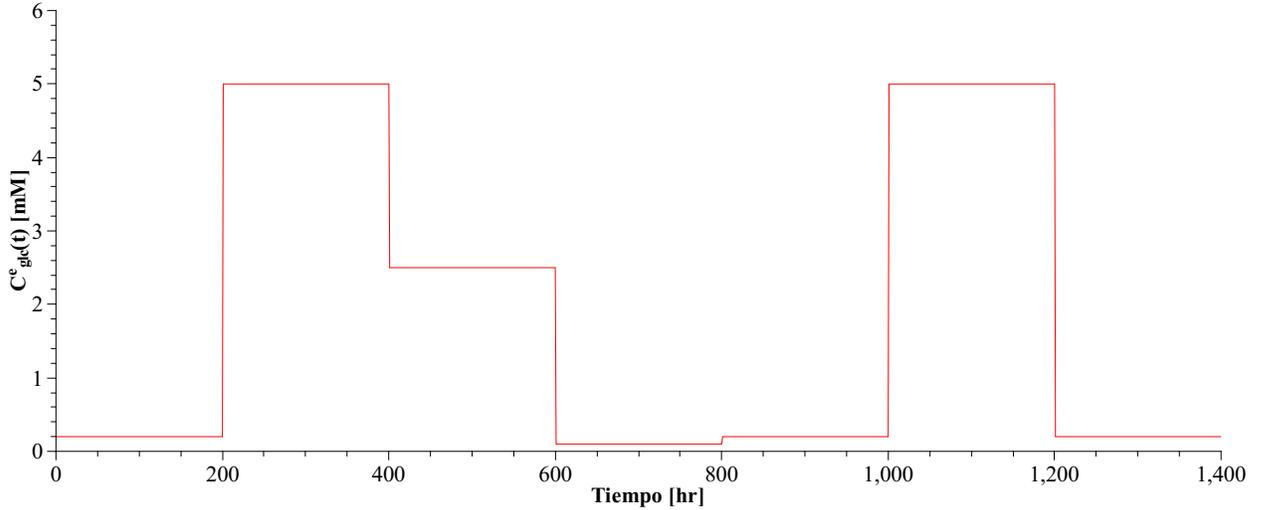


Figura 5.2: Glucosa extra celular utilizada para análisis enzimático de sensibilidad.

Se trazó como base de comparación la respuesta simulada de concentración de piruvato y de lactato citoplasmático del modelo metabólico inicial frente a la concentración de glucosa de la Figura 5.2 con la velocidad enzimática de las seis enzimas en cuestión ponderadas simultáneamente por sus respectivos ponderadores  $E_i^*$ . Posterior a esto se simuló la respuesta del modelo metabólico inicial bajo las mismas condiciones de glucosa con la perturbación de todas las posibles combinaciones que se pueden obtener de las seis enzimas, a fin de abarcar todas las posibilidades de perturbación que pueden afectar el sistema. La utilización de la respuesta de concentración de piruvato y de lactato se debe a que son los metabolitos que sufren cambios más significativos de concentración en el fenómeno de la alteración del estado metabólico [13].

Se comparó, por medio del error cuadrático medio (MSE), las concentraciones de piruvato y lactato citoplasmático obtenidas para el caso base (todas las velocidades enzimáticas ponderadas simultáneamente) con las concentraciones obtenidas para cada una de las tuplas posibles de enzimas perturbadas.

El MSE se calculó como el promedio de la suma de los residuales entre dos muestras de  $n$  datos, como se indica en la ecuación 5.2

$$MSE(\vec{C}_{\{PFK, TPI, PGM, EN, PK, LDH\}}(t), \vec{C}_j(t)) = \frac{\sum_{i=1}^n (C_{\{PFK, TPI, PGM, EN, PK, LDH\}, i} - C_{j, i})^2}{n} \quad (5.2)$$

en donde para este caso  $\vec{C}_{\{PFK, TPI, PGM, EN, PK, LDH\}}(t)$  corresponde al vector de concentraciones de lactato o piruvato con las seis enzimas variadas en concentración y  $\vec{C}_j(t)$  es el vector de concentraciones con variaciones a las enzimas que pertenecen a la combinación  $j$  de enzimas.

Los resultados de los menores valores de MSE, es decir las curvas de concentración más semejantes a las observadas para el caso base, obtenidos con sus respectivas combinaciones enzimáticas se encuentran en las Figuras 5.3 y 5.4.

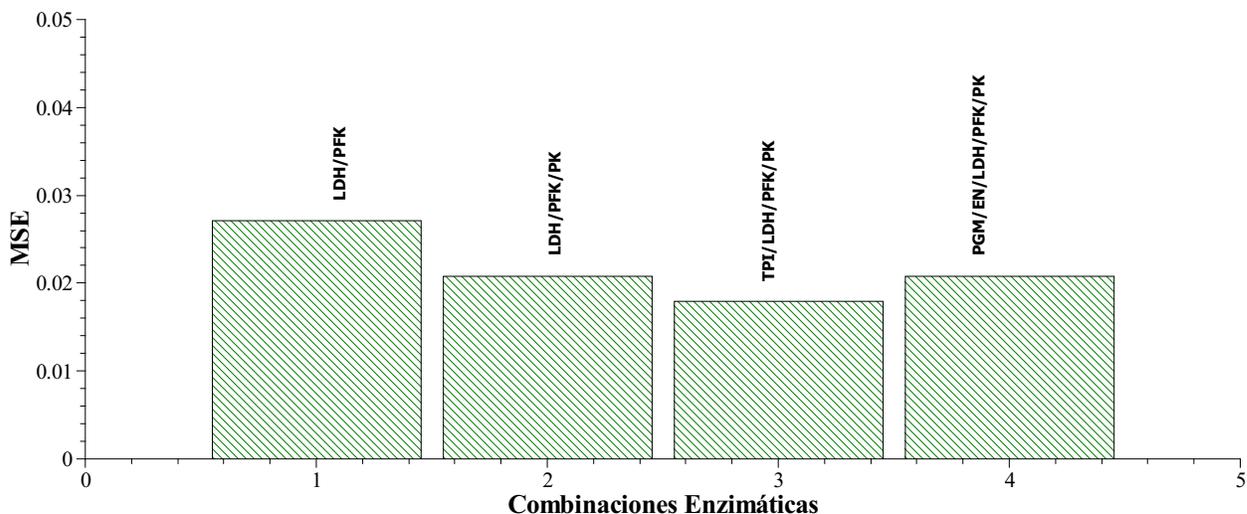


Figura 5.3: Menores valores de MSE para las concentraciones de lactato.

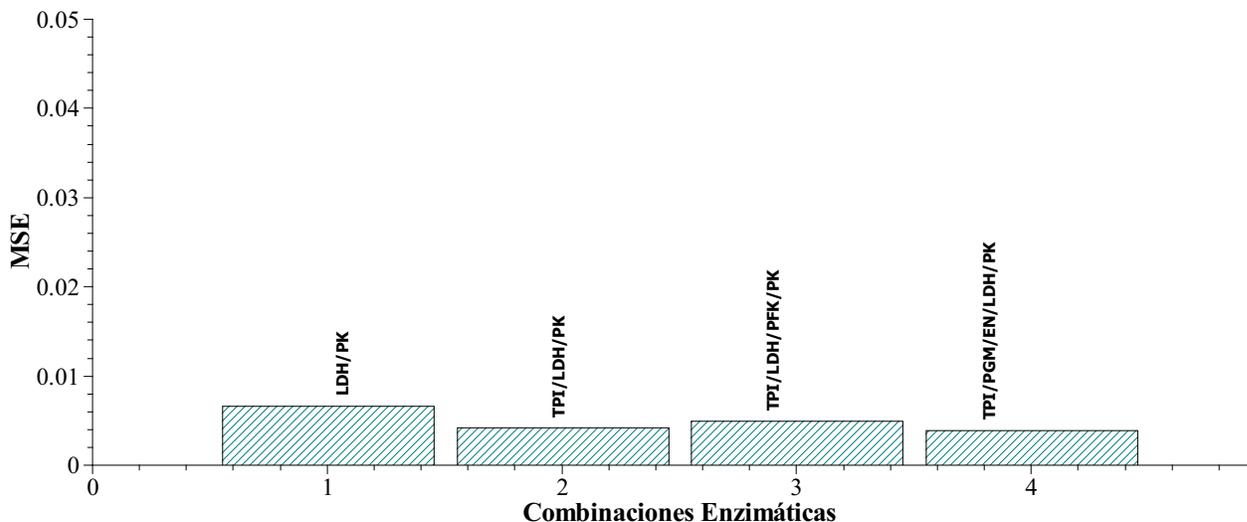


Figura 5.4: Menores valores de MSE para las concentraciones de piruvato.

De las mismas Figuras 5.3 y 5.4 se puede notar que la enzima LDH se encuentra en todas las

combinaciones, lo que sugiere que dicha enzima es de suma relevancia en un posible modelo de regulación interno pues las curvas más semejantes al caso base son las simuladas con una tupla que incluye la variación de  $r_{LDH}$ . Además destacan la incidencia de las enzimas PK y TPI.

Los resultados obtenidos son esperables pues se analizaron las concentraciones de lactato y de piruvato, compuestos más cercanos a las enzimas de menores valores de MSE. La presencia de TPI dentro de los menores valores de MSE también es esperable por la alta variación del nivel de expresión génico (ver Tabla 5.1).

### 5.3. Planteamiento de modelo de regulación génica inicial

De la sección anterior quedó establecido que existen velocidades enzimáticas más significativas cuando se trata de alteraciones al modelo matemático trazado. Lo anterior, sumado a que no existe un único juego de parámetros que retrate más de un estado metabólico, motiva la posibilidad de que existan diferentes juegos de parámetros que permitan que el modelo metabólico inicial tenga la respuesta metabólica deseada. Con esto en mente se procedió a realizar una búsqueda manual de juegos de parámetros que corroboran esta hipótesis.

Para corroborar lo anterior y tener una primera aproximación del orden de magnitud de los juegos de parámetros requeridos, se realizó un ajuste manual de parámetros de un único ponderador  $F$  que pondera las cinéticas enzimáticas en donde participa la enzima LDH en el modelo simplificado, de manera de obtener una nueva cinética  $r_{LDH}^* = F \cdot r_{LDH}$ . Para el ajuste del ponderador  $F$  se varió el valor de éste en tramos de 21 horas que tuvo como resultado una función discreta  $F(t)$ . La razón de utilizar intervalos de 21 horas para hacer una primera estimación de parámetros se debe a que cada 21 horas se cumple un hito operacional en el cultivo; las primeras 21 horas corresponden a la etapa batch del cultivo y las siguientes 84 horas a la etapa fed-batch. Se mantuvo constante el factor  $F$  posterior a las 105 horas de cultivo porque la concentración de glucosa se mantiene relativamente constante una vez iniciado el modo continuo de cultivo.

$$F(t) = \begin{cases} 1 \cdot 10^{-7} & 0 \leq t < 21 \\ 1,5 \cdot 10^{-8} & 21 \leq t < 42 \\ 1,8 \cdot 10^{-8} & 42 \leq t < 63 \\ 1 \cdot 10^{-9} & 63 \leq t < 84 \\ 2,5 \cdot 10^{-10} & 84 \leq t < 105 \\ 3 \cdot 10^{-11} & 105 \leq t \end{cases}$$

La respuesta metabólica obtenida por la implementación de la función  $F(t)$  se encuentra en la Figura 5.5. La función  $F(t)$  entrega cinco juegos de parámetros diferentes que permiten al modelo tener una respuesta metabólica de bajo error en lo que corresponde a la curva de concentración de lactato simulada con respecto a la curva de concentración experimental.

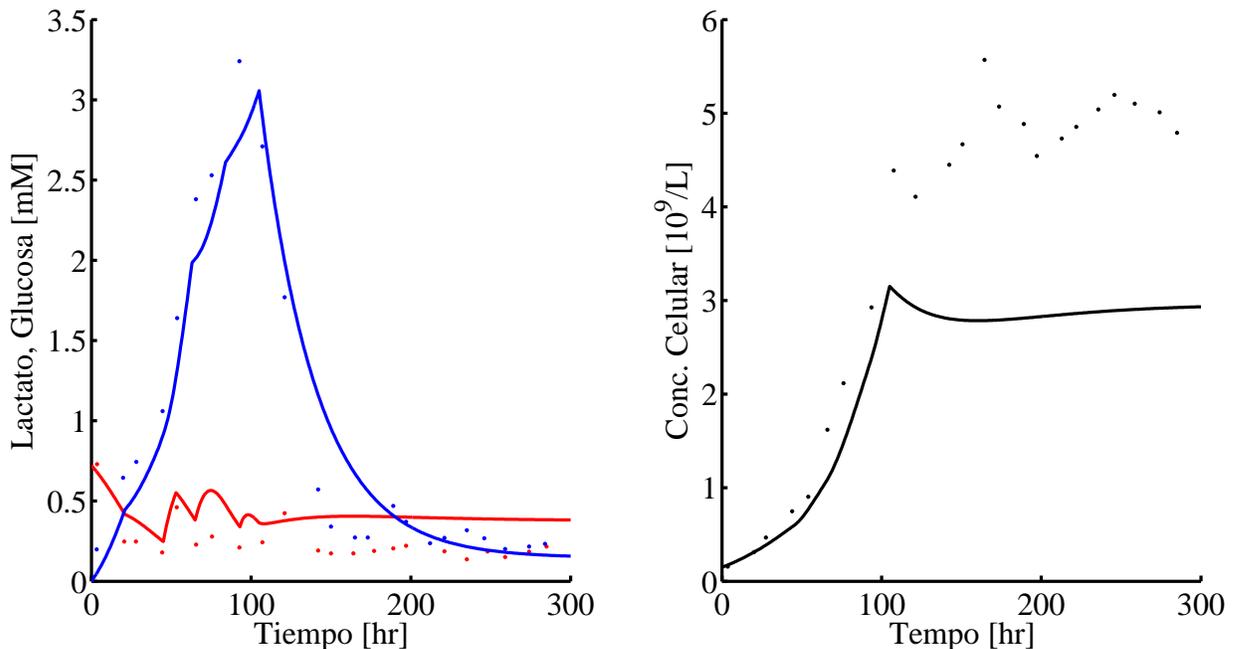


Figura 5.5: Resultados de simulación de cultivo alterado con implementación de función  $F(t)$ . —: Conc. simulada de lactato, —: Conc. simulada de glucosa, —: Conc. celular simulada, ■: Conc. experimental de lactato, ■: Conc. experimental de glucosa, ■: Conc. celular experimental.

Una vez obtenida la respuesta del modelo simplificado frente a la variación de la cinética  $r_{LDH}$  se procedió al planteamiento de un modelo de regulación que relacionara las variaciones de la cinética con las condiciones de cultivo.

La simulación de las curvas de concentración del cultivo alterado generó errores de ajuste notorios en las curvas de concentración extracelular de glucosa y concentración celular. Sin embargo,

hay que destacar que la finalidad del ajuste manual fue tener una noción del orden de magnitud de los valores que debe adoptar el modelo de regulación, así como también el efecto que genera la inclusión de una variabilidad en los parámetros cinéticos. Aún así, en la Figura 5.5 se observa que la curva de concentración celular simulada pasa muy por debajo de la curva experimental en el tramo continuo del cultivo, la respuesta simulada para dicho tramo se encuentra en un valor cercano a  $3 [10^9/L]$  y experimentalmente se tienen valores que oscilan alrededor de  $5 [10^9/L]$ . Dicha diferencia se sustenta además en que la curva de concentración de glucosa residual simulada se encuentra por sobre la curva experimental, esto es producto de una baja concentración celular. La concentración de glucosa en el reactor es resultado del consumo del cultivo celular, cuya densidad está por debajo de la cantidad de células observadas experimentalmente.

En vista de las observaciones anteriores se ajustó nuevamente la constante de activación de crecimiento por la presencia de glucosa,  $K_{glc}^S$ . Si bien para todos los cultivos celulares es justo suponer una misma relación de dependencia del crecimiento celular de la concentración de glucosa y de lactato, puede existir una variación del parámetro  $K_{glc}^S$ . La anterior variación se debe a que, dependiendo del estado metabólico en el que se encuentran las células, se observa una respuesta de crecimiento celular distinta, asociado a una constante distinta de activación por glucosa. La constante  $K_{glc}^S$  corresponde a una constante de activación aparente que contempla la ponderación de actividades de los diferentes transportadores de glucosa, GLUT1, GLUT3 y GLUT5 que existen en la célula. Al variar de estado metabólico, la célula podría cambiar la forma de distribución de la glucosa por los diferentes transportadores de glucosa lo que se refleja como un cambio de ponderación del  $K_{glc,i}$  asociado a un canal  $i$  de glucosa [39, 40].

## 5.4. Modelo de regulación

Con los parámetros aproximados para lograr la respuesta metabólica deseada se procedió a idear un modelo que relacionara dichos parámetros con el fenómeno bioquímico de la variación del estado metabólico. La literatura señala y recalca en que la alteración del estado metabólico es producto de bajas concentraciones de glucosa residual y es por esto que se optó por relacionar valores de  $F$  con la concentración extra celular de glucosa [12, 13]. Además, la alteración del estado metabólico corresponde a un fenómeno reversible y los cultivos en estados metabólicos bajos presentan una respuesta instantánea frente a perturbaciones en la glucosa residual [15, 41].

Los elementos descritos indican que el modelo de regulación debía ser una función continua que depende, al menos, de la concentración de glucosa extra-celular y que modifique la cinética de la LDH,  $r_{LDH}$ . Además, el desglose matemático presentado en la sección 5.1 limita el rango de la función a un valor entre 0 y 1.

### 5.4.1. Función de Hill

La función de Hill es utilizada comúnmente para describir el acople de un promotor  $S_X$  a una proteína  $X$  y [42].

Suponiendo el acople de  $n$  moléculas de  $S_X$  a  $X$ , la proteína  $X$  puede estar unida a  $n$  moléculas de  $S_X$ , descrito por el complejo  $[nS_XX]$ , o sin unir, descrito por el término  $X_0$ . De esta manera la concentración total de proteínas  $X_T$  es:

$$[nS_XX] + X_0 = X_T \quad (5.3)$$

Lo anterior bajo la suposición de que cualquier estado intermedio de acople, es decir cuando el número de moléculas acopladas es inferior a  $n$ , es despreciado.

La tasa de colisiones moleculares necesarias para la formación del complejo  $[nS_XX]$  viene dada por el producto de la concentración de proteína libre,  $X_0$ , y la concentración de  $S_X$  elevado a  $n$ :

$$r_{colision} = k_{ON} \cdot X_0 \cdot S_X^n \quad (5.4)$$

en donde el parámetro  $k_{ON}$  corresponde a la tasa de formación del complejo  $[nS_XX]$ . El motivo de la potencia es por la probabilidad de encontrar  $n$  copias de  $S_X$  en un mismo instante. A su vez, la tasa de disociación del intermediario  $[nS_XX]$  es:

$$r_{disociacion} = k_{OFF} \cdot X_0 \cdot [nS_XX] \quad (5.5)$$

La tasa total de concentración de  $[nS_XX]$  corresponde a la diferencia entre la tasa de colisiones y de disociaciones:

$$\frac{d([nS_XX])}{dt} = k_{ON} \cdot X_0 \cdot S_X^n - k_{OFF} \cdot X_0 \cdot [nS_XX] \quad (5.6)$$

en donde el equilibrio alcanzado cuando  $\frac{d([nS_X X])}{dt} = 0$  es:

$$k_{OFF} \cdot X_0 \cdot [nS_X X] = k_{ON} \cdot X_0 \cdot S_X^n \quad (5.7)$$

Al sustituir la ecuación 5.7 en la ecuación 5.3 se tiene:

$$\frac{k_{OFF}}{k_{ON}} \cdot [nS_X X] = (X_T - [nS_X X]) \cdot S_X^n \quad (5.8)$$

Finalmente, se puede despejar la ecuación de Hill:

$$\frac{[nS_X X]}{X_T} = \frac{S_X^n}{K_X^n + S_X^n} \quad (5.9)$$

donde  $K_X^n = \frac{k_{OFF}}{k_{ON}}$  es el coeficiente de activación y n es el coeficiente de Hill, que determina la forma de la función de Hill. A mayor valor de n la función de Hill se asemeja más a un escalón perfecto como se puede apreciar en la Figura 5.6.

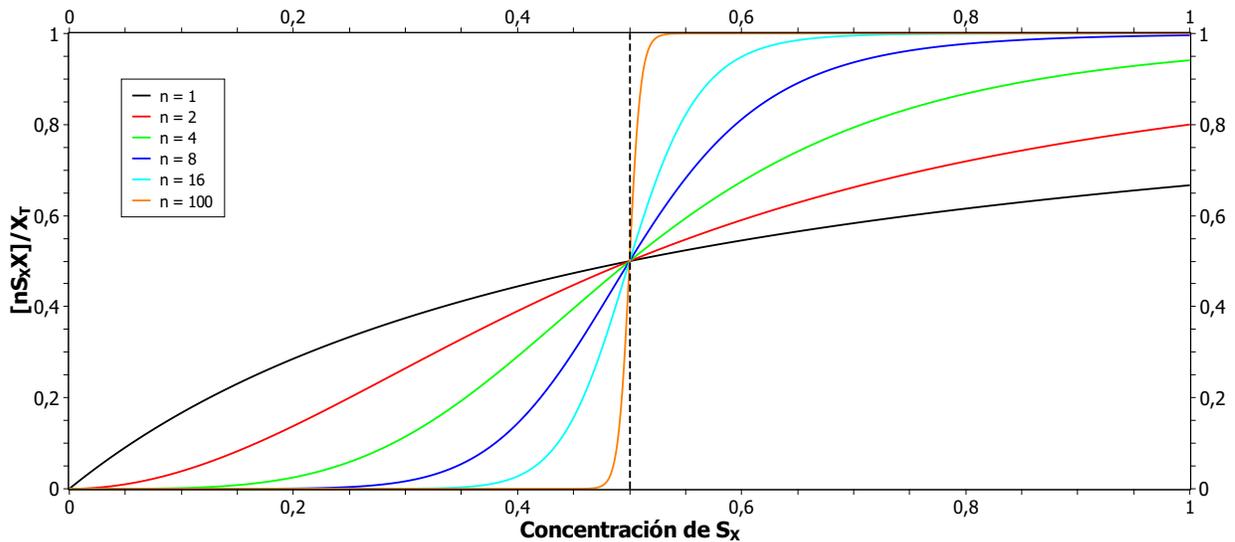


Figura 5.6: Función de Hill con diferentes valores de coeficiente de Hill (n) y  $K_X = 0,5$ .

#### 5.4.2. Ajuste de parámetros de modelo de regulación

Posterior al ajuste manual de los parámetros del modelo de regulación discreto se reemplazó el perfil discreto de parámetros  $F$  por el modelo continuo que modifica la cinética  $r_{LDH}$  para obtener

un modelo de Hill dado por:

$$r'_{LDH} = \frac{S_X^n}{K_X^n + S_X^n} \cdot r_{LDH} \quad (5.10)$$

La literatura señala que la tasa de producción de lactato en células de riñón de hamster bebé (BHK) se encuentra en su máximo y relativamente constante con concentraciones de glucosa residual sobre 1,24 [mM] [13], el cuál se supuso que es aplicable para células CHO debido a la similitud de las tasas de reacción de sus cinéticas enzimáticas glicolíticas [43]. De esta manera, para el ajuste de parámetros del modelo de regulación se realizó un ajuste del coeficiente de Hill,  $n$ , manteniendo fijo el parámetro  $K_X = 1,24[mM]$ . La metodología utilizada fue, al igual que para otros ajustes de parámetros, un ajuste manual para obtener un valor inicial para un ajuste por minimización de los residuos cuadráticos por el método de Nelder-Mead.

### Resultados ajuste de parámetros de modelo de regulación

El ajuste del coeficiente de Hill ( $n$ ) dió como resultado un valor  $n = 14,74$ , lo que indica la existencia de 15 moléculas de acople que participan en la expresión del gen de la LDH. Las curvas resultantes del ajuste del coeficiente de Hill del modelo de regulación se encuentra en la Figura 5.7.

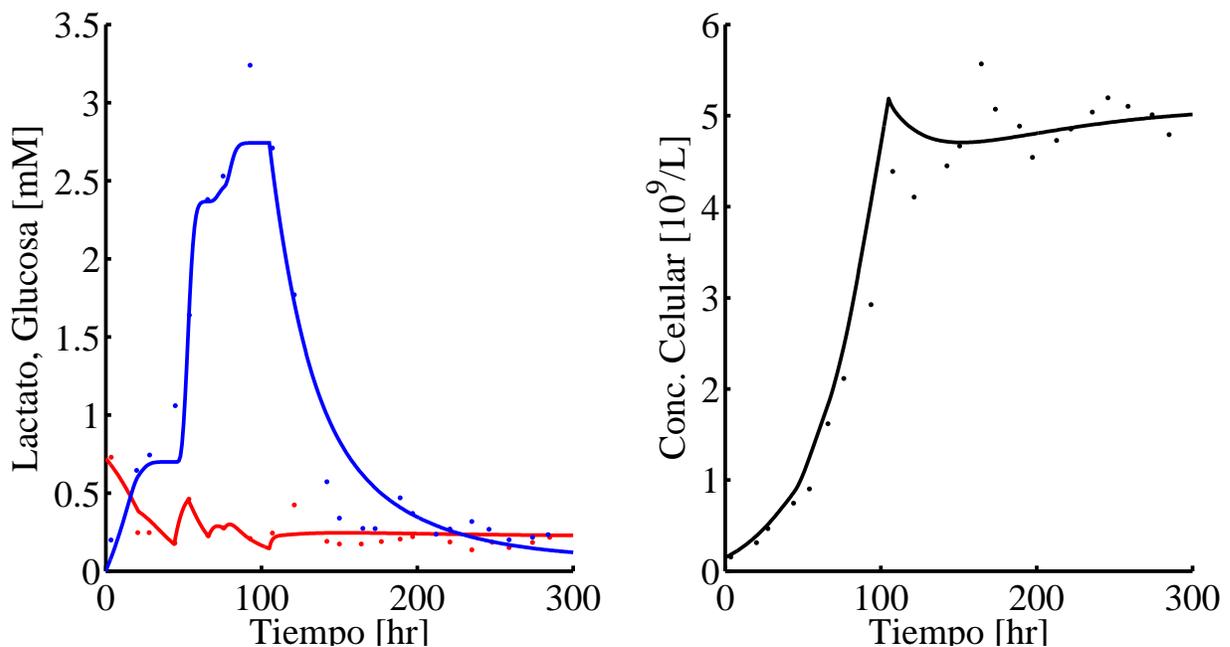


Figura 5.7: Resultados de simulación de modelo con modelo de regulación génica para LDH en cultivo alterado. —: Conc. simulada de lactato, —: Conc. simulada de glucosa, —: Conc. celular simulada, ■: Conc. experimental de lactato, ■: Conc. experimental de glucosa, ■: Conc. celular experimental.

Se observa de la Figura 5.7 que hay tramos donde la concentración de lactato se mantiene relativamente constante. Esto se produce en tramos donde la concentración de glucosa es lo suficientemente baja como para que  $r_{LDH}$  tome un valor cercano a cero.

La simplicidad del modelo de regulación permitió obtener por medio del ajuste de pocos parámetros la respuesta metabólica de un cultivo alterado debido a que consistió en el ajuste de un único parámetro. Es aquella simpleza la que reduce la exactitud del resultado, generando errores de ajuste en la curva de lactato de mucho menor valor que sin el modelo de regulación. Además, en conjunto con el nuevo ajuste del modelo de crecimiento celular se pudo eliminar los errores de ajuste de las curvas de glucosa y de concentración celular. De esta manera se puede considerar que la respuesta metabólica simulada cumple tanto cualitativamente como cuantitativamente con lo observado experimentalmente. La mejora cuantitativa del ajuste de las curvas simuladas a los datos experimentales se ve claramente representado en la Tabla 5.2, en donde los valores de  $\epsilon$  se redujeron a menos de un 0,1 % para el caso de la curva de lactato, y a un poco más de un 5 % en el caso de la concentración celular.

Tabla 5.2:  $\epsilon$  de las curvas simuladas con el modelo sin regulación y con regulación con sus respectivos intervalos de confianza calculados para un 95 % de probabilidad.

<b>Modelo</b>	$\epsilon_{Conc.Glucosa}$	$\epsilon_{Conc.Lactato}$	$\epsilon_{Conc.Celular}$
Sin regulación	$-0,43 \pm 0,136$	$5,947 \pm 1,56$	$2,171 \pm 0,65$
Con regulación	$-0,025 \pm 0,029$	$-0,006 \pm 0,095$	$-0,119 \pm 0,17$

## 5.5. Validación de modelo de regulación génica

### 5.5.1. Comparación con datos experimentales

El modelo de regulación tiene las cualidades buscadas para simular la respuesta metabólica experimental de un cultivo de control y alterado de acuerdo con la literatura [25]. Sin embargo, una única fuente experimental para corroborar la capacidad del modelo final generaliza en exceso el modelo sin precedentes. Por ello se simuló y se comparó con otra fuente de datos experimentales.

De modo de validar el modelo, fue simulada la respuesta metabólica para un cultivo alterado con las condiciones presentadas en la Tabla 5.3 (datos no publicados). El cultivo consiste de tres etapas, al igual que el cultivo alterado utilizado para fijar los parámetros del modelo, una batch, fed-batch y continua. Para la simulación de las curvas se modificó solamente el parámetro  $K_{glc}$  a fin de

obtener una curva de concentración celular con el menor valor de la suma de residuos cuadráticos. De esta manera las curvas obtenidas de concentración de lactato y de glucosa corresponden a la respuesta metabólica propia del modelo y es posible una comparación idónea con los resultados experimentales.

Tabla 5.3: Condiciones de cultivo utilizados experimentalmente para obtener un cultivo de células MAK en un estado metabólico alterado (datos no publicados).  $F_e$  corresponde al flujo de alimentación durante el modo de operación fed-batch,  $C_{glc,e}$  es la concentración de glucosa del medio alimentado durante el modo fed-batch,  $F_{e,2}$  corresponde a dosificaciones adicionales utilizadas durante la etapa continua, y  $C_{glc,e,2}$  es la dosificación de glucosa de dichas dosificaciones adicionales.

<b>Modo de Operación</b>	<b>Tiempo de Operación [hr]</b>	$F_e$ [ $\frac{mL}{hr}$ ]	$C_{glc,e}$ [mM]	$F_{e,2}$ [ $\frac{mL}{hr}$ ]	$C_{glc,e,2}$ [mM]	$D$ [ $\frac{1}{hr}$ ]
Batch	0 - 19	-	-	-	-	-
Fed-Batch	19 - 32	0,257	64,087	-	-	-
Fed-Batch	32 - 38	0,686	64,087	-	-	-
Fed-Batch	38 - 55	0,206	64,087	-	-	-
Fed-Batch	55 - 68	0,848	64,087	-	-	-
Fed-Batch	68 - 83	0,871	64,087	-	-	-
Fed-Batch	83 - 95	0,163	64,087	-	-	-
Continuo	95 - 105	-	-	2,203	5,551	0,033
Continuo	105 - 122	-	-	0,885	5,551	0,033
Continuo	122 - 133	-	-	-	-	0,03

La comparación de los resultados simulados con los experimentales para la concentración de glucosa, lactato y celular se observan en las Figuras 5.8 y 5.9. La comparación permite establecer que la simulación tiene una respuesta similar a la obtenida experimentalmente salvo por la curva de concentración celular en el tramo que se ubica entre las 95 [hr] y el final del cultivo. La existencia de una diferencia de los resultados obtenidos por la simulación y los experimentales se justifica con la simpleza del modelo de crecimiento celular utilizado. El uso de un modelo de crecimiento simplificado facilita la parametrización de éste pero puede provocar problemas de ajuste adicionales producto de la exclusión de fenómenos como la muerte celular o la variación de la constante de activación de crecimiento celular por glucosa,  $K_{glc}$ , y de la suposición de que todas las células

de un cultivo son idénticas. Es posible reducir el error asociado a la diferencia entre la curva de concentración celular simulada y la experimental por medio de la variación de la constante  $K_{glc}$  pero la disminución de la concentración celular en el tramo de cultivo en cuestión genera una mayor concentración de glucosa residual, una mayor concentración de lactato producto del aumento en la tasa de producción de la misma y, por lo mismo, una mayor razón  $\Delta L/\Delta G$ .

A pesar de la presencia de dicha diferencia en las curvas de concentración celular, la curva simulada se asemeja en el comportamiento cualitativo con la curva experimental. Además, de que el cultivo se encuentra dentro de los rangos experimentales cuando se trata de la razón  $\Delta L/\Delta G$  como aparece en la Figura 5.10.

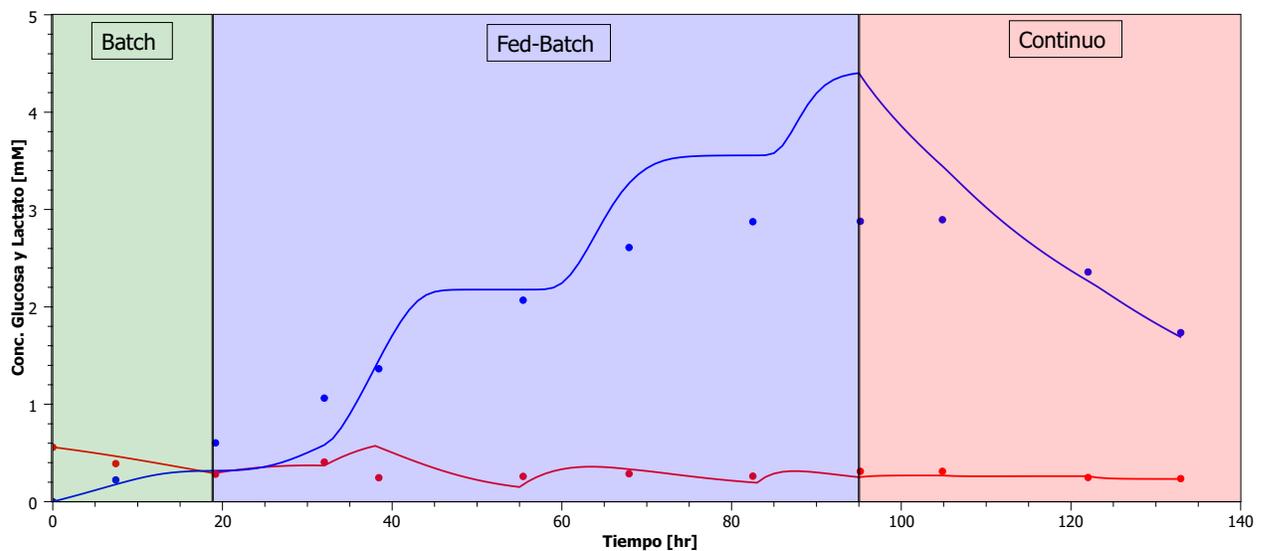


Figura 5.8: Resultados de comparación de curvas de glucosa y lactato simulados con modelo metabólico con regulación con cultivo celular alterado. —: Conc. simulada de lactato, —: Conc. simulada de glucosa, •: Conc. experimental de lactato, •: Conc. experimental de glucosa.

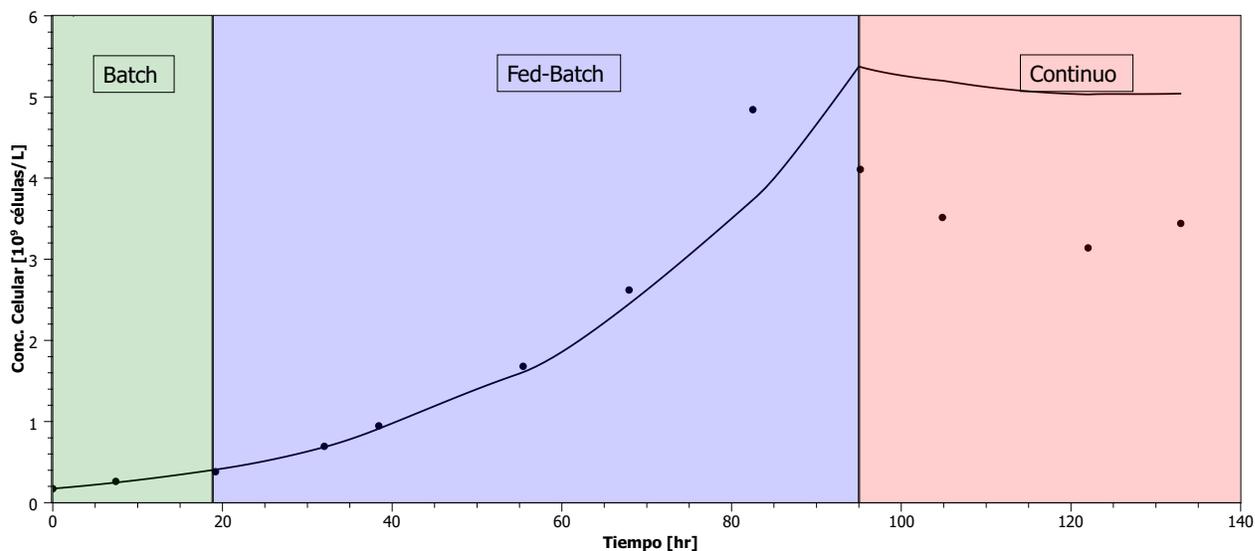


Figura 5.9: Resultados de comparación de curva de concentración celular simulada con cultivo celular alterado. —: Conc. celular simulada, ●: Conc. celular experimental.

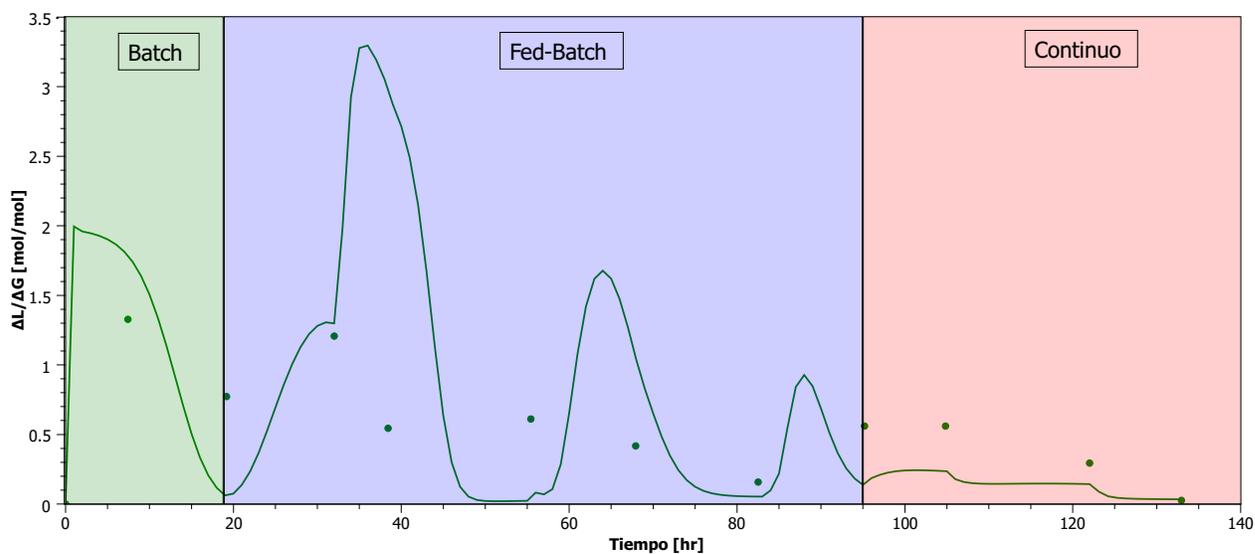


Figura 5.10: Resultados de comparación de curva de  $\Delta L/\Delta G$  simulada con cultivo celular alterado. —: Conc. celular simulada, ●: Conc. celular experimental.

### 5.5.2. Cálculo de razón estequiométrica $\Delta L/\Delta G$

A fin de verificar que el modelo final se encuentra dentro del marco teórico establecido se calculó la razón estequiométrica  $\Delta L/\Delta G$  para el cultivo de control y el alterado durante la simulación para corroborar que dicho valor no excediera el límite teórico de 2,0 al final del cultivo, cuando se encuentra más cerca de alcanzar el estado estacionario. Durante el estado transiente si pueden existir valores de  $\Delta L/\Delta G$  superiores a 2,0 [mol/mol], y se han observado experimentalmente [25],

por tratarse de una etapa en donde el cultivo varía hasta llegar a, de tener, un estado estacionario estable.

El valor de  $\Delta L/\Delta G$  corresponde a la razón entre la tasa específica de producción de lactato  $q_{lac}$  y la tasa específica de consumo de glucosa  $q_{glc}$ . Donde las tasas específicas de glucosa y lactato se calculan experimentalmente por medio de las ecuaciones 5.11 y 5.12, respectivamente.

$$q_{glc} = \frac{2}{(X_i \cdot V_{R,i} + X_{i-1} \cdot V_{R,i-1})} \frac{S_{glc,i} - S_{glc,i-1}}{t_i - t_{i-1}} \quad (5.11)$$

$$q_{lac} = -\frac{2}{(X_i \cdot V_{R,i} + X_{i-1} \cdot V_{R,i-1})} \frac{S_{lac,i} - S_{lac,i-1}}{t_i - t_{i-1}} \quad (5.12)$$

en donde  $X_i$  corresponde a la concentración celular,  $V_{R,i}$  al volumen del reactor,  $S_{glc,i}$  al consumo acumulado de glucosa y  $S_{lac,i}$  a la producción acumulada de lactato en el tiempo  $i$ .

El consumo acumulado de glucosa y la producción acumulada de glucosa son calculados por medio de balances de masa entre un instante pasado  $t - 1$  y el instante actual  $t$ . Las ecuaciones de balance de masa para modo de operación batch/fed-batch/continuo se encuentran detalladas en las ecuaciones 5.13 y 5.14.

$$S_{glc} = C_{glc,e}^{t_{i-1}} \cdot F_e^{t_{i-1}} \cdot (t_i - t_{i-1}) + C_{glc,i-1}^e \cdot V_{i-1} - C_{glc,i}^e \cdot V_i - C_{glc}^{e,t_{i-1}} \cdot F_s^{t_{i-1}} \cdot (t_i - t_{i-1}) \cdot V_i \quad (5.13)$$

$$S_{lac} = C_{lac,i}^e \cdot V_i - C_{lac,i-1}^e \cdot V_{i-1} + C_{lac}^{e,t_{i-1}} \cdot F_s^{t_{i-1}} \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (5.14)$$

Debido a que el cálculo de la derivadas temporales  $q_{glc}$  y  $q_{lac}$ , por medio de una diferencia entre dos puntos, genera un resultado de alta frecuencia de oscilación cuando se varían las condiciones de cultivo se optó por calcular la derivada exacta de  $S_{glc}$  y  $S_{lac}$  de una función Spline en el tiempo  $t$ . La derivada de la función Spline se calculó en línea por medio de la función *dNaturalSPLINE.mat* (ver Apéndice D) utilizando los últimos 10 puntos con un intervalo de separación mínimo de 0,01 horas a fin de evitar errores numéricos.

Los valores calculados para los cultivos de control y alterado simulados con las condiciones de simulación descritas en la sección 3.4 se encuentran en las Figuras 5.11 y 5.12. Se corroboró, por medio de los cálculos realizados, que el modelo final con regulación se atiene al marco teórico

relativo a la relación estequiométrica existente entre la producción de lactato y el consumo de glucosa ( $\Delta L/\Delta G$ ), para las etapas continuas en ambos cultivos.

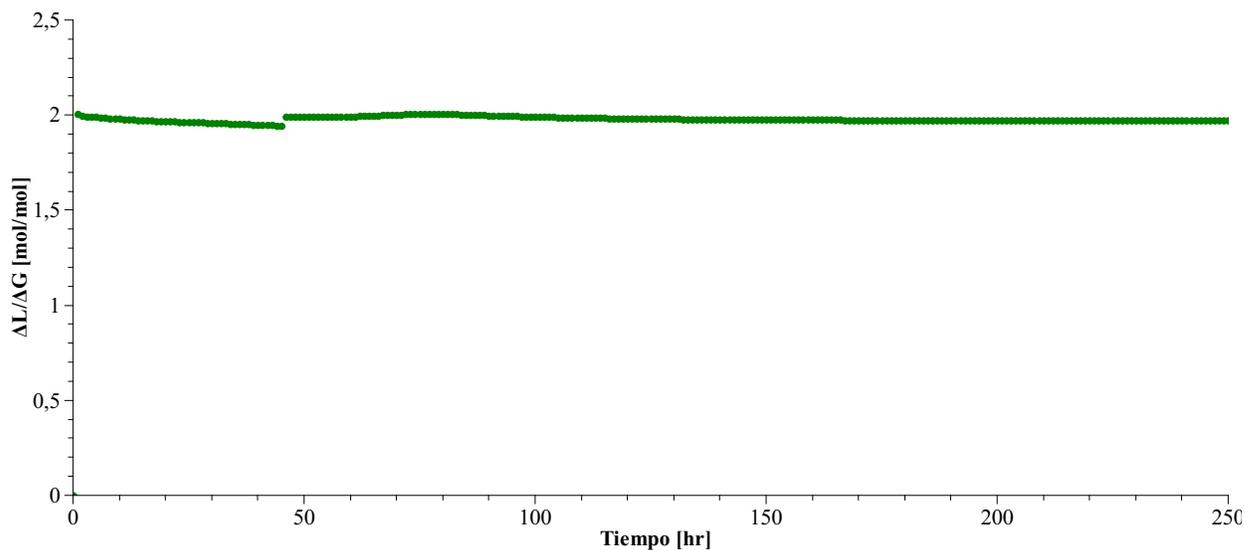


Figura 5.11: Resultados de cálculo de  $\Delta L/\Delta G$  para cultivo de control simulado. Cultivo batch hasta las 45 [hr] y cultivo continuo desde las 45 [hr] hasta el final del cultivo. ●:  $\Delta L/\Delta G$  simulada.

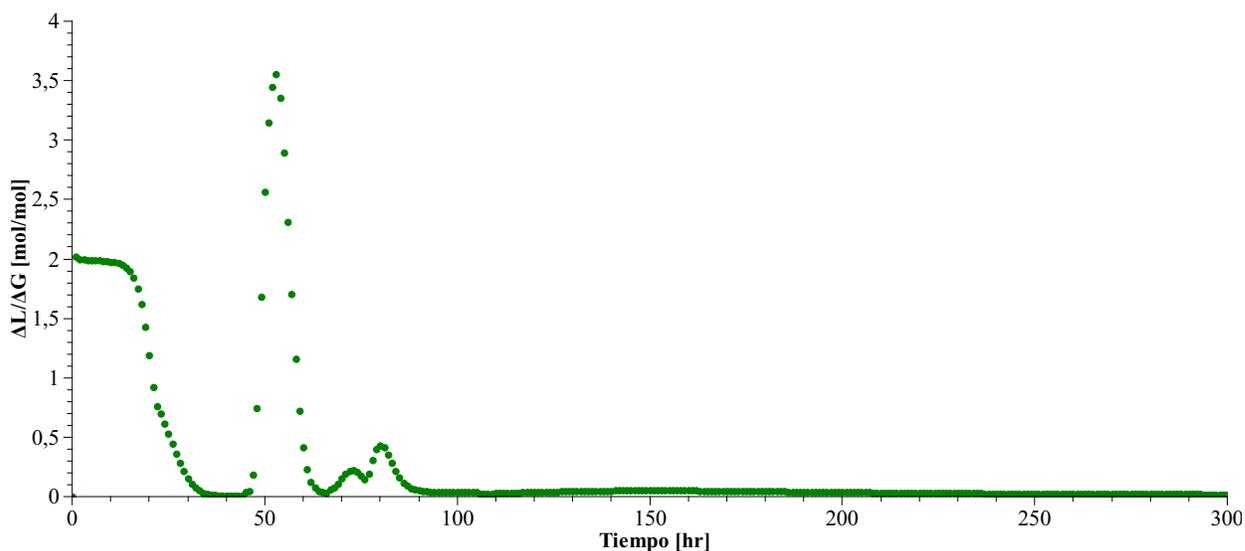


Figura 5.12: Resultados de cálculo de  $\Delta L/\Delta G$  para cultivo alterado simulado. Cultivo batch hasta las 23 [hr], fed-batch de las 23 hasta las 105 [hr] y cultivo continuo desde las 105 [hr] hasta el final del cultivo. ●:  $\Delta L/\Delta G$  simulada.

En la Figura 5.11 se observa que la razón  $\Delta L/\Delta G$  se mantiene en un rango cercano a 2 [mol/mol] alcanzándose un valor de 1,97 [mol/mol] hacia el final del cultivo.

Por su parte, la Figura 5.12 muestra la dinámica del cultivo alterado en donde, entre las 21 y 105 [hr] de cultivo, hay una mayor variabilidad del valor de  $\Delta L/\Delta G$  debido a que corresponde a la etapa

fed-batch del cultivo en donde los cultivos son inducidos a un estado metabólico bajo. Por otra parte, los valores de  $\Delta L/\Delta G$  superan el máximo teórico en el tramo fed-batch por la naturaleza discreta del cálculo de la razón  $\Delta L/\Delta G$ ; la tasa de producción de lactato se calcula en el tiempo  $t$  en base a la diferencia de concentración entre  $t$  y  $t - 1$  y para la tasa de consumo de glucosa se considera la alimentación en el tiempo  $t - 1$  por lo que si en el tiempo  $t$  se aumenta la concentración de glucosa de entrada este afectará en  $t + 1$  la tasa de consumo de glucosa pero afectará en  $t$ , generándose de manera aparente una mayor razón  $\Delta L/\Delta G$ . Lo anterior afecta los estados transientes de cultivo pero no afecta cuando un cultivo tiene una operación de menor variación de la concentración de glucosa de entrada como son la operación batch y continua.

El valor de la razón  $\Delta L/\Delta G$  al final del cultivo alterado corresponde a 0,019 [mol/mol] que concuerda con los órdenes de magnitud observados experimentalmente para cultivos en estados metabólicos alterados [12, 25].

### 5.5.3. Reversibilidad de estado metabólico

Junto con establecerse experimentalmente que el fenómeno de alteración del estado metabólico es un fenómeno que ocurre tanto a nivel génico como metabólico, se ha concluido que el fenómeno no tiene carácter irreversible. La literatura señala que cultivos inducidos a un estado metabólico alterado vuelven a un estado metabólico alto cuando son expuestos a condiciones de alta concentración de glucosa [25]. Estudios de los niveles de expresión génica señalan que, si bien existe una variación de los niveles de expresión de algunos genes, dicha variación no corresponde a una mutación y por tanto el fenómeno génico es reversible [15]. Además se ha observado experimentalmente que la razón  $\Delta L/\Delta G$  de un cultivo celular alterado tiene la dinámica presentada en la Figura 5.13 cuando es perturbado desde el estado estacionario con pulsos de hasta 2,0 [mM] de glucosa. En la Figura 5.13 se muestra que un cultivo alterado vuelve a un estado metabólico bajo luego de ser perturbado.

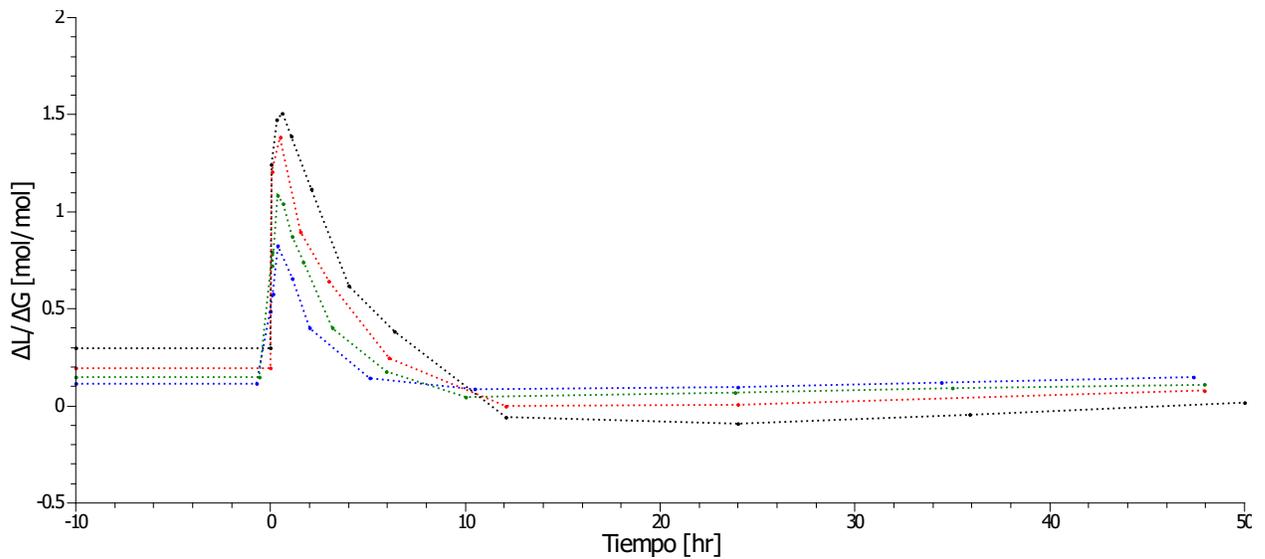


Figura 5.13: Resultados de cálculo de  $\Delta L/\Delta G$  de un cultivo alterado frente a pulsos de glucosa de  $\bullet$ : 0,25 [mM],  $\bullet$ : 0,5 [mM],  $\bullet$ : 1,0 [mM] y  $\bullet$ : 2,0 [mM] [41].

En vista de los resultados experimentales de la Figura 5.13 se procedió a corroborar la capacidad del modelo metabólico con regulación de revertir el estado alterado obtenido para las condiciones de cultivo alterado de la sección 3.4. Para esto se simuló la respuesta metabólica frente a perturbaciones de glucosa de 0,3, 0,6, 1,2, 2,3 y 8,4 [mM] desde el estado estacionario y se graficó la razón  $\Delta L/\Delta G$ , resultados mostrados en las Figuras 5.14 y 5.15.

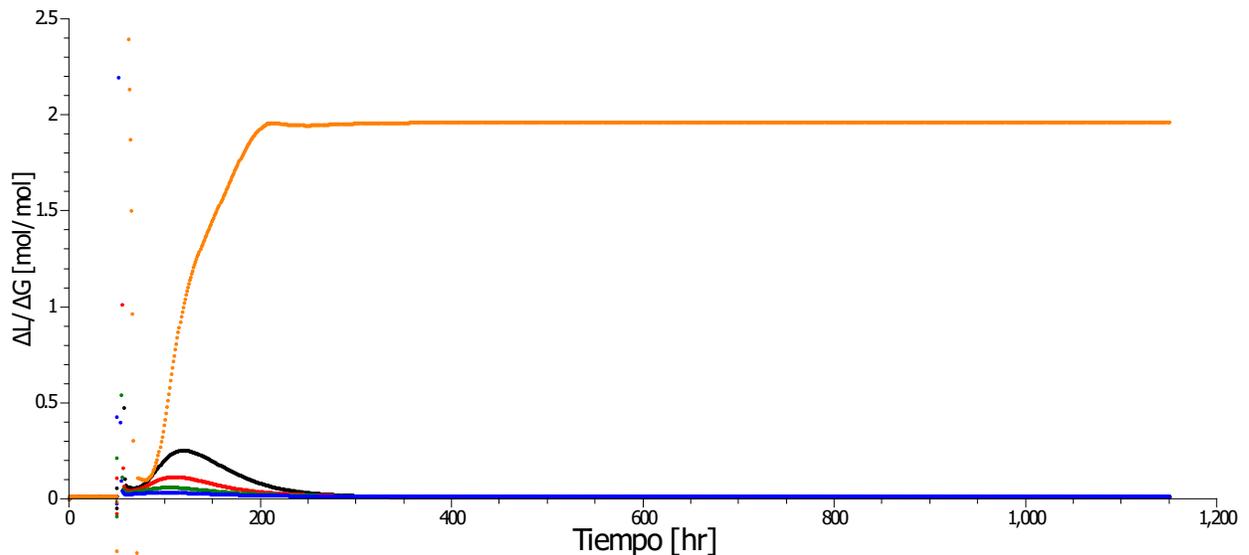


Figura 5.14: Resultados de cálculo de  $\Delta L/\Delta G$  de un cultivo alterado simulado frente a pulsos de glucosa de  $\bullet$ : 0,3 [mM],  $\bullet$ : 0,6 [mM],  $\bullet$ : 1,2 [mM],  $\bullet$ : 2,3 [mM] y  $\bullet$ : 8,4 [mM].

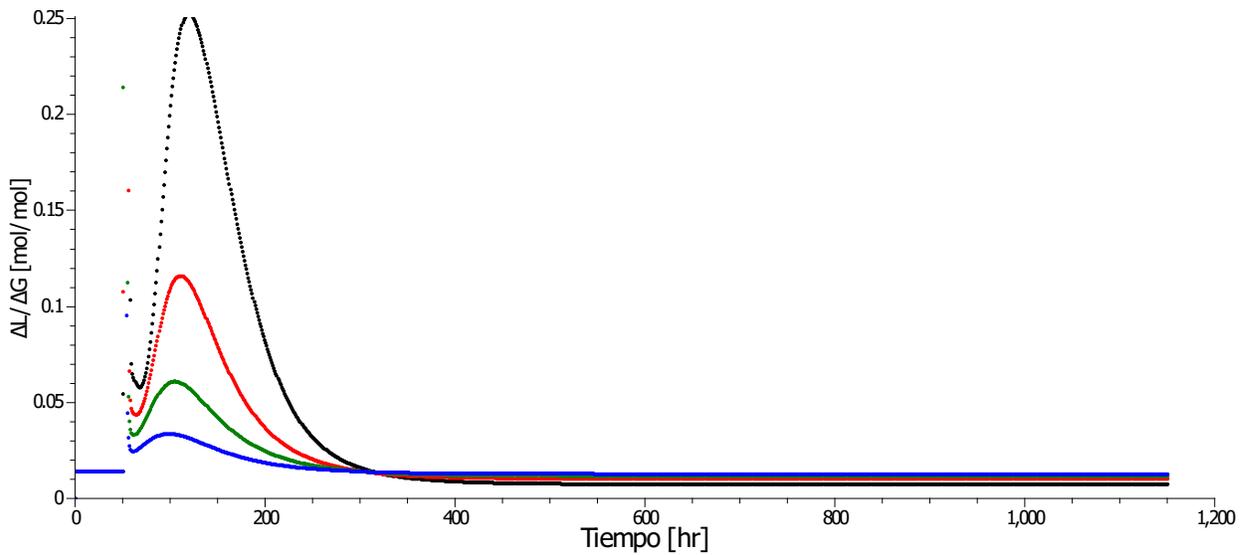


Figura 5.15: Acercamiento de resultados de cálculo de  $\Delta L/\Delta G$  de un cultivo alterado simulado frente a pulsos de glucosa de  $\bullet$ : 0,3 [mM],  $\bullet$ : 0,6 [mM],  $\bullet$ : 1,2 [mM] y  $\bullet$ : 2,3 [mM].

La Figura 5.14 muestra que el sistema vuelve a un estado metabólico alterado luego de perturbarse con pulsos de glucosa de 2,3 [mM] o menos, y que es capaz de volver a un estado metabólico alto con una perturbación muy alta de glucosa, retratada en la Figura 5.14 con la curva de respuesta frente a una perturbación de glucosa de 8,391 [mM].

La generación de un cambio de estado metabólico al aplicar un pulso de 8,4 [mM] de glucosa se debe a que genera un aumento de la glucosa al interior del reactor al nivel de que el modelo de regulación alcanza su saturación y la velocidad de reacción  $r'_{LDH}$  se aproxima al valor anterior de  $r_{LDH}$ , es decir que  $\frac{S_X^n}{K_X^n + S_X^n}$  tiende a 1.

De la Figura 5.15 se puede concluir que el sistema demora más en volver al estado metabólico alterado a mayor pulso de glucosa, lo que se observa experimentalmente también y que se muestra en la Figura 5.13. Tal como aparece en la Figura 5.13, la Figura 5.14 muestra que el valor de la razón  $\Delta L/\Delta G$  del estado estacionario alcanzado posterior al pulso de glucosa es menor al valor inicial y que a mayor pulso se alcanza una razón  $\Delta L/\Delta G$  menor en el estado estacionario.

## 5.6. Discusión de resultados de simulación con modelo de regulación

Los resultados de la simulación de las curvas de concentración de glucosa, lactato y celular con el modelo que incluye regulación génica muestra que se ha logrado obtener un modelo matemático

capaz de captar la respuesta metabólica de un cultivo celular sin variación de su estado metabólico y de un cultivo celular cuyo estado metabólico se ha visto alterado. Los resultados además avalan que el modelo metabólico obtenido es capaz de captar la dinámica observada a nivel experimental para cultivos bajo diferentes condiciones de cultivo lo que es de suma relevancia para el estudio de la variación del estado metabólico. Estos resultados también respaldan la capacidad del modelo metabólico de retratar la reversibilidad del fenómeno de la variación del estado metabólico logrando simular el paso de un cultivo celular en un estado metabólico alterado a su estado metabólico basal y en los marcos de tiempo observados experimentalmente.

La obtención de un modelo metabólico representativo que contempla el fenómeno de variación del estado metabólico puede ser utilizado para el análisis de respuestas metabólicas bajo diferentes condiciones de cultivo con lo que se podría cuantificar el efecto sobre las concentraciones de glucosa y lactato de utilizar diferentes modos de operación, así como estudiar los efectos sobre la concentración celular. Esto permite reducir significativamente los costos asociados a montajes experimentales y a personal especializado que se requiere para llevar a cabo estudios de este tipo a nivel de laboratorio. Además, permite representar la respuesta del sistema para el diseño y análisis de diferentes controladores para regular el estado metabólico, el objetivo principal de la presente tesis.

La revisión de la literatura indica de que, en materia de modelos de regulación génica, existen aprontes estandarizados para enfrentar el planteamiento de un modelo de regulación génica. Los modelos comúnmente usados siguen un planteamiento diferencial en donde se traza un número de ecuaciones diferenciales que buscan representar la variación de la concentración *mRNA* y de proteínas en el tiempo, o un planteamiento booleano en donde los efectos positivos o negativos sobre la concentración de proteína en el tiempo son representados como una serie de funciones ON/OFF [44–47]. Sin embargo, dichos modelos requieren del conocimiento mínimo de los genes afectados así como una descripción detallada de los factores que inciden en su activación o represión. Es por esto que el apronte utilizado para el desarrollo del modelo de regulación utilizado en esta tesis se puede considerar empírico.

Existe evidencia experimental que soporta que la relación entre la tasa de producción de lactato y la concentración residual de glucosa es de tipo Monod [13], es por esto que la utilización de una función de Hill para regular la producción de lactato es un apronte que tiene precedentes.

Respecto a la corroboración del modelo con regulación, lo realizado se puede considerar su-

ficiente para corroborar la veracidad del modelo de regulación pues se constató que el modelo con regulación es capaz de retratar resultados experimentales de una fuente ajena a la utilizada para ajustar el modelo que comprende también múltiples etapas de cultivo con condiciones diferentes de operación. Se corroboró además que la matriz de cinéticas enzimáticas se encuentra bien planteada debido a que, alcanzado el estado estacionario, no supera 2,0 la razón  $\Delta L/\Delta G$ .

La respuesta metabólica del sistema frente a diferentes pulsos de glucosa concuerda con lo observado experimentalmente y se constató que el fenómeno de alteración del estado metabólico de un cultivo es representado debidamente con sus características más relevantes. Quedó comprobado que la simulación los cultivos alterados simulados poseen una baja razón  $\Delta L/\Delta G$  y que el fenómeno de alteración su estado metabólico tiene el carácter reversible que también se ha observado experimentalmente.

# Capítulo 6

## Control del estado metabólico

### 6.1. Motivación

Cómo ya ha sido detallado en los capítulos previos, la alteración del estado metabólico de un cultivo celular animal requiere de un trabajo de laboratorio minucioso. Esto sumado a la fácil reversibilidad del fenómeno da cabida al problema técnico de mantener un cultivo celular en un estado metabólico bajo sin la necesidad de tener personal especializado constantemente supervisando el cultivo. Es por esto que una solución al problema técnico descrito pasa por el diseño de un controlador capaz de generar la estrategia de alimentación óptima para mantener un estado metabólico bajo. De manera que el objetivo de un controlador a diseñar sería mantener un cultivo alterado dentro de un rango de operación deseado de  $\Delta L/\Delta G$ .

La gran variedad de controladores permiten escoger de un abanico de posibilidades que van desde controladores clásicos como son los controladores P, PD, PID, la utilización de métodos de control avanzados como son los controladores óptimos, donde el objetivo del controlador es variar las condiciones de operación de manera de llevar un proceso a su punto de operación óptimo, un controlador difuso que contempla el establecimiento de reglas de control que permiten al controlador tomar una determinada acción en base a un determinado escenario de control, o métodos de control inteligente que utilizan como base una red neuronal artificial para construir un controlador basado en modelo, entre otros [48–50].

A priori, para el diseño de dicho controlador se deben analizar las distintas variables manipulables y su incidencia en la reversibilidad de la variación del estado metabólico. Además se deberán considerar todos los lazos posibles de control que podrían haber aparte del lazo de regulación del estado metabólico.

## 6.2. Antecedentes

### 6.2.1. Características del sistema

Para diseñar correctamente un lazo de control para cualquier sistema es necesario conocer las distintas variables que participan en él. El detalle de los diferentes tipos de variable consideradas a nivel de laboratorio se lista más abajo y un desglose del sistema a controlar se muestra en la Figura 6.1 [9].

- Variables de entrada manipulables: En esta categoría se encuentran la tasa de dilución, el flujo de gases  $O_2$ ,  $N_2$  y  $CO_2$  (para regular la concentración de oxígeno disuelto), la temperatura, concentración de glucosa alimentada, concentración de glutamina alimentada, concentración de amino ácidos alimentados y el flujo de NaOH (para regular el pH ácido del cultivo debido a la producción de ácido láctico [26]).
- Variables de salida: Comprende la concentración de glucosa, lactato, concentración de células, volumen, tasa de consumo de oxígeno (OUR), tasa consumo específico de glucosa, oxígeno disuelto (DO), pH, densidad óptica (OD), tasa de crecimiento celular ( $\mu$ ), tasa de producción específica de lactato y razón consumo de glucosa a producción de lactato ( $\Delta L/\Delta G$ ).
  - Medibles: De las anteriormente mencionadas las variables medibles on-line comprenden: concentración de glucosa, de lactato y celular, volumen, OUR, OD, pH y DO.
  - No medibles o solamente calculables: Por otra parte las variables de salida que no son medibles con sensores pero que son calculables incluyen la tasa consumo específico de glucosa, tasa de crecimiento celular ( $\mu$ ), tasa de producción específica de lactato y razón consumo de glucosa a producción de lactato ( $\Delta L/\Delta G$ ). También se considera una perturbación medible un error en la concentración de glucosa de entrada requerida.
- Perturbaciones:
  - Medibles: Las perturbaciones medibles que podrían existir son las asociadas a los errores propios de los equipos utilizados. Por ejemplo, las bombas peristálticas utilizadas pueden tener un error de hasta un 5% y que puede ser medido por flujómetros [25].
  - No medibles: Las perturbaciones no medibles existentes se asocian principalmente con el crecimiento celular. No son medibles y se deben principalmente a que los cultivos

celulares son muy sensibles a las condiciones de cultivo a la cual son expuestas las células, generándose variaciones en el coeficiente de crecimiento  $\mu$  producto de variaciones de pH, de concentración de sustrato, de concentración de metabolitos inhibidores de crecimiento, etc.

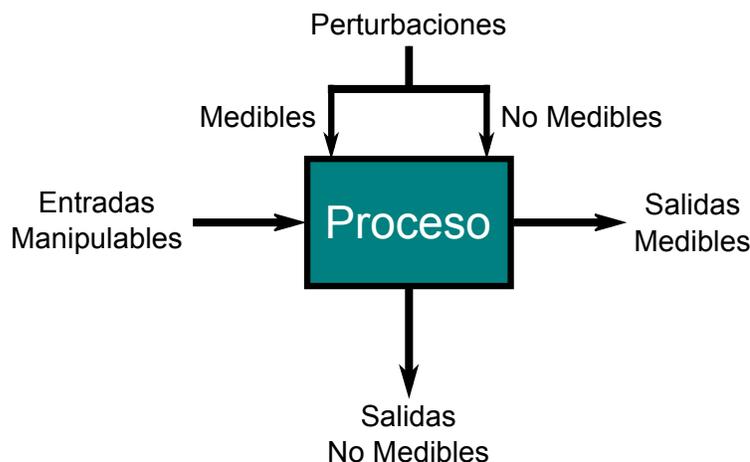


Figura 6.1: Representación gráfica del proceso y las diferentes variables que lo afectan.

### 6.2.2. Objetivo de control

La finalidad del controlador a diseñar es producir la estrategia óptima de alimentación de glucosa para mantener el cultivo celular en un estado metabólico alterado ( $\Delta L/\Delta G$  inferior a 0,1). De esta manera se tiene el estado metabólico del cultivo como variable de salida, y la variable manipulada por el controlador es la concentración de glucosa de entrada. Un montaje experimental comúnmente utilizado para alterar el estado metabólico de un cultivo celular animal se presenta en la Figura 6.2 y el lazo de control a diseñar y simular se incluye en la Figura 6.3.

La selección de la concentración de glucosa de entrada por sobre otras variables manipulables, principalmente la tasa de dilución ( $D$ , manipulado por medio de la variación del flujo de entrada y de salida) es que, experimentalmente, en un cultivo continuo el coeficiente de dilución es manipulado en función de la tasa de crecimiento celular,  $\mu$ , de manera que  $D = \mu$  para evitar un lavado/acumulación innecesaria del cultivo, es decir, que la concentración celular baje/suba debido a que el flujo de salida es mayor/menor que  $\mu$ . La tasa de dilución además cumple con la restricción de ser menor que un valor crítico  $D_c$  que corresponde al valor máximo que puede adoptar la tasa de crecimiento del cultivo celular, con esto se asegura evitar un lavado completo del cultivo. En vista de lo anterior se tiene que el sistema descrito corresponde a un planteamiento con más de un lazo

de control simultáneo, transformándolo de un sistema simulado de un único lazo simulado (SISO) a un sistema de múltiples lazos (MIMO).

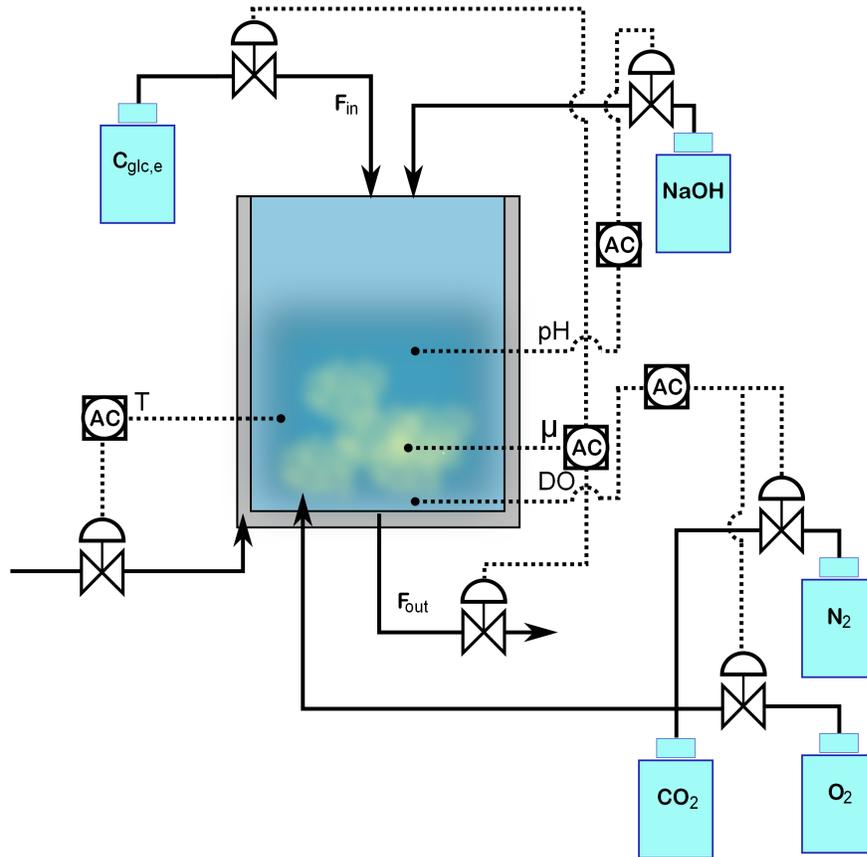


Figura 6.2: Montaje experimental con los lazos comunes de control utilizados [9]. Línea punteada representa lazo de control asociado a variable de entrada y que actúa sobre variable manipulable. Línea continua representa flujo de entrada de variable manipulable.

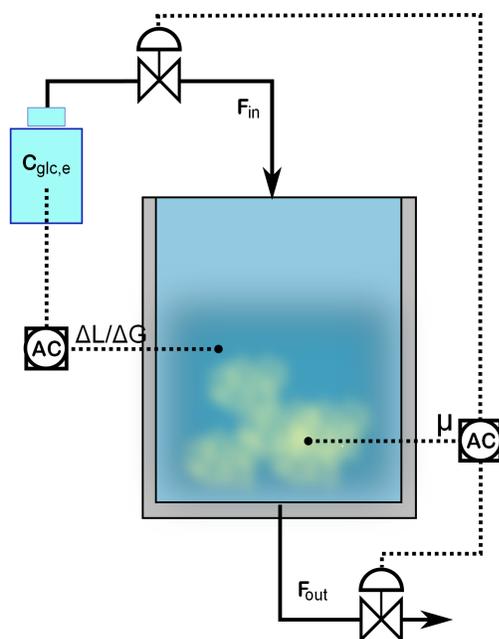


Figura 6.3: Montaje a simular con el lazo de control a diseñar. Línea punteada representa lazo de control asociado a variable de entrada y que actúa sobre variable manipulable. Línea continua representa flujo de entrada de variable manipulable. La tasa de dilución se fija a través del volumen y los flujos volumétricos de entrada y salida del reactor y se fija en base a la tasa de crecimiento celular. El lazo de control de la concentración de glucosa de entrada en base a la variable  $\Delta L/\Delta G$  es el lazo a diseñar.

### 6.2.3. Análisis de respuesta de lazo abierto

Previo a la elección y diseño del controlador se analizó la respuesta del sistema de lazo abierto frente a diferentes perturbaciones. Se optó por analizar el problema de regulación y no el problema servo pues el objetivo del controlador es mantener el cultivo alterado en un estado metabólico bajo frente a posibles perturbaciones, no modificar el set-point relacionado con el estado metabólico  $\Delta L/\Delta G$ , es por esto que se analizó únicamente la respuesta de lazo abierto frente a las posibles perturbaciones que podrían existir y no sólo la respuesta frente a variaciones en la variable manipulable.

De los lazos existentes presentados en la Figura 6.2, el único considerado para la simulación de la respuesta es el lazo de control de la tasa de crecimiento celular en función del coeficiente de dilución. Esto debido a que el modelo planteado considera solamente el flujo de productos y reactivos metabólicos y supone el control ideal del restante de las variables (pH, temperatura y concentración de oxígeno) de manera que se mantienen constantes e inafectadas por la variación de estado metabólico.

Las perturbaciones aplicadas para el análisis fueron escalones y anti-escalones de un 10% del estado estacionario de la concentración de glucosa de entrada, el coeficiente de dilución, la constante de activación de crecimiento celular  $K_{glc}^S$  y el coeficiente máximo de crecimiento celular,  $\mu_{max}$ . La concentración de glucosa y el coeficiente de dilución fueron elegidos como perturbaciones relevantes pues se relacionan con errores comunes observados en los equipos de dosificación y en las bombas utilizadas para alimentar el reactor. Por otra parte, los parámetros de simulación  $K_{glc}^S$  y  $\mu_{max}$  se escogieron por tratarse de parámetros que modifican la dinámica del crecimiento celular y que se ha observado experimentalmente que pueden variar a lo largo de un cultivo [41]. Además, tal como se señaló anteriormente, el parámetro  $K_{glc}^S$  corresponde a un valor ponderado de la actividad de los transportadores de glucosa y por lo mismo puede sufrir variaciones dependiendo de las condiciones de cultivo. Por otra parte,  $\mu_{max}$  se ha utilizado como un parámetro que busca englobar tanto la tasa de crecimiento como la tasa de mortalidad del cultivo, que también es sensible a las condiciones de cultivo. De manera gráfica, las perturbaciones consideradas para el análisis de respuesta de lazo abierto y la variable medible se presentan en la Figura 6.4.

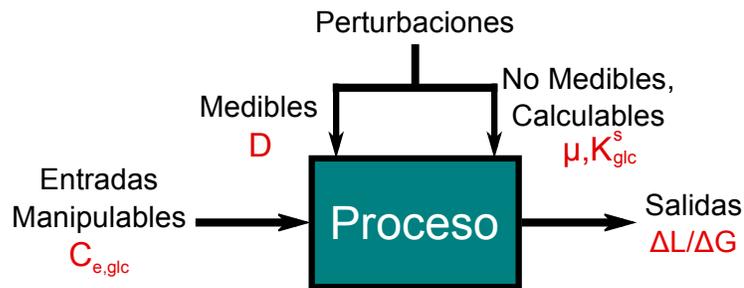


Figura 6.4: Origen de perturbaciones a analizar.

Para el análisis de la respuesta frente a dichas perturbaciones se utilizó como punto de partida el estado estacionario alcanzado por el cultivo alterado simulado en base a las condiciones indicadas en la sección 3.4, cuyo valor estacionario de  $\Delta L / \Delta G$  es 0,014 [mol/mol]. Si bien el valor estacionario de  $\Delta L / \Delta G$  de 0,014 [mol/mol] es obtenible de manera teórica no es representativo de lo logrado a nivel práctico principalmente porque para alcanzar el estado estacionario se requieren, teóricamente, de más de 500 horas de cultivo. Sin embargo, para los efectos de análisis y simulación se puede considerar correcto.

## Escalón de la concentración de glucosa de entrada

En las Figuras 6.5 y 6.6 se presentan las respuestas del sistema frente a un escalón y un anti-escalón en la concentración de glucosa que entra al reactor. Un aumento de la concentración en cuestión genera un aumento en la razón  $\Delta L/\Delta G$ , esto se debe a que aumenta la concentración de glucosa al interior del reactor lo que afecta directamente la función de regulación del cultivo (ver ecuación 5.10) y retrata la sensibilidad del metabolismo y su cadena reactiva frente a una variación en la condición de cultivo más relevante para el estado metabólico, la concentración residual de glucosa. Frente a incrementos en la concentración de sustrato, los cultivos animales tienden a una mayor tasa de producción de lactato lo que genera una inevitable alza en la razón  $\Delta L/\Delta G$  [13].

La reducción de la razón  $\Delta L/\Delta G$  cuando enfrentado a una baja en la concentración de glucosa alimentada se debe a que disminuye la concentración de glucosa al interior del reactor y el cultivo celular alcanza un nuevo estado estacionario con una concentración menor de células. La baja de concentración celular se debe a que la tasa de crecimiento celular ( $\mu$ ) disminuye producto de una menor disponibilidad de sustrato (menor concentración de glucosa residual) y se genera un lavado de células del cultivo.

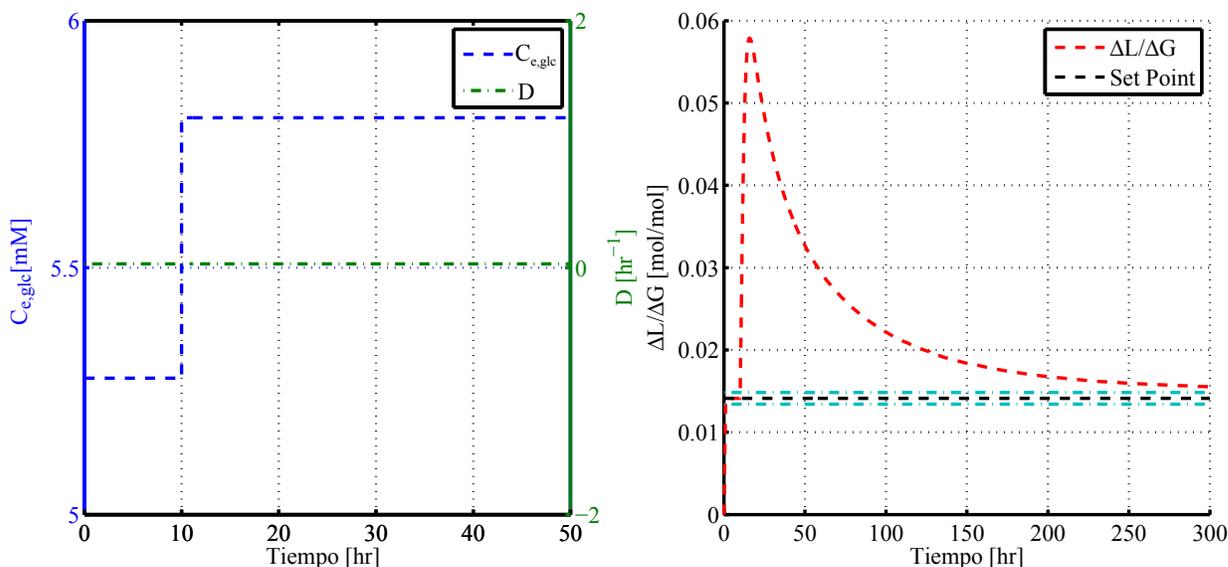


Figura 6.5: Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un escalón de un 10 % de la concentración de glucosa de entrada. ---: set point  $\pm 5\%$  de set point.

La dinámica de las respuestas de las Figuras 6.5 y 6.6 son de primer orden, libres de respuesta inversa y sub-amortiguadas. La corroboración de la respuesta sub-amortiguada es por la existencia de un overshoot (diferencia positiva entre el valor máximo alcanzado y el valor alcanzado para

el estado cuasi-estacionario) que es mayor para el caso del escalón. Para ambos casos el error de ajuste existente, al final de la simulación, de la razón  $\Delta L/\Delta G$  con respecto al set point es superior al 5%. También se puede observar que ambas respuestas no tienen tiempos muertos pues el sistema responde inmediatamente tanto al escalón como al anti-escalón.

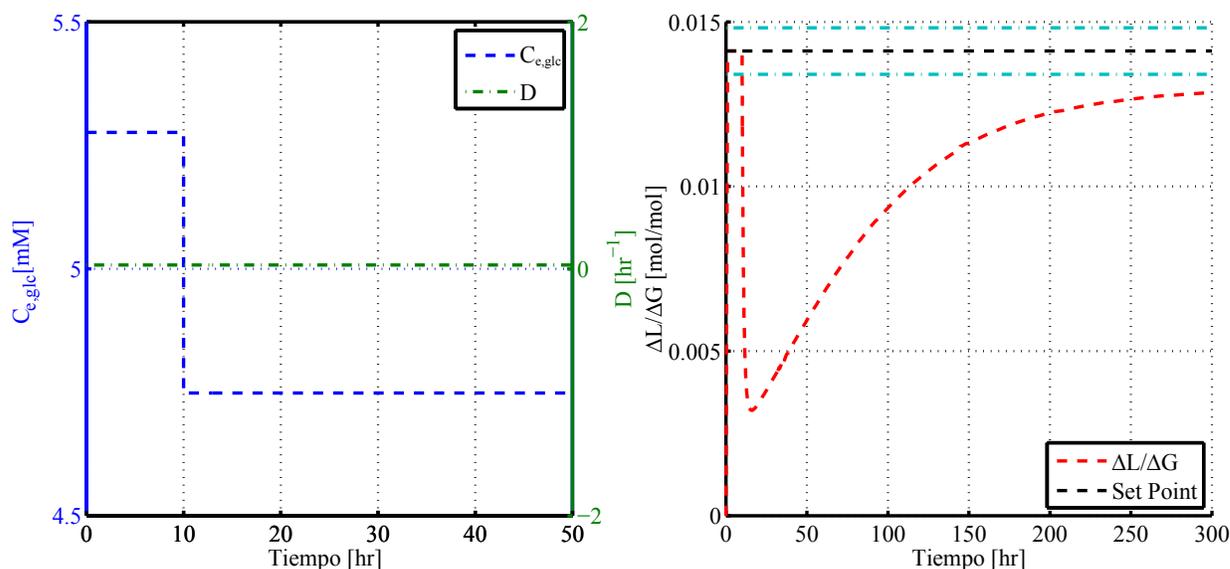


Figura 6.6: Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un anti-escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada. ---: set point  $\pm 5\%$  de set point.

### Escalón del coeficiente de dilución

La respuesta del sistema frente a perturbaciones en el coeficiente de dilución se encuentran retratadas en las Figuras 6.8 y 6.9.

En comparación con el escalón de la concentración de glucosa de entrada se observa que el coeficiente de dilución es más incidente en el fenómeno de reversión del estado metabólico alterado al estado metabólico basal. El estado metabólico que posee el cultivo, en el nuevo estado estacionario que se alcanza a las 300 horas, es característica de un cultivo sin variación de su estado metabólico, donde la razón  $\Delta L/\Delta G$  es aproximadamente 2,0. Lo anterior es producto de una baja de la concentración de células en el reactor que genera un aumento de la concentración de glucosa en el reactor producto de un menor consumo de sustrato por parte del cultivo. Del balance de masa de biomasa en el reactor (ver ecuación 3.7), un aumento del coeficiente de dilución sin consideración de la tasa de crecimiento celular  $\mu$  genera el lavado del cultivo y las condiciones inversas genera una acumulación de células que afecta directamente la densidad celular. La disminución de la cantidad de células posteriormente afecta la concentración de glucosa al interior del reactor debido

al consumo de las mismas; una menor concentración celular significa un menor consumo neto de glucosa lo que genera un aumento en la disponibilidad de glucosa y, por la función de regulación implementada, genera un alza en la producción de lactato y las células que no han sido lavadas pasan a un estado metabólico alto. La explicación del efecto inverso (anti-escalón del coeficiente de dilución), es análogo y es explicitado a través de la Figura 6.7.

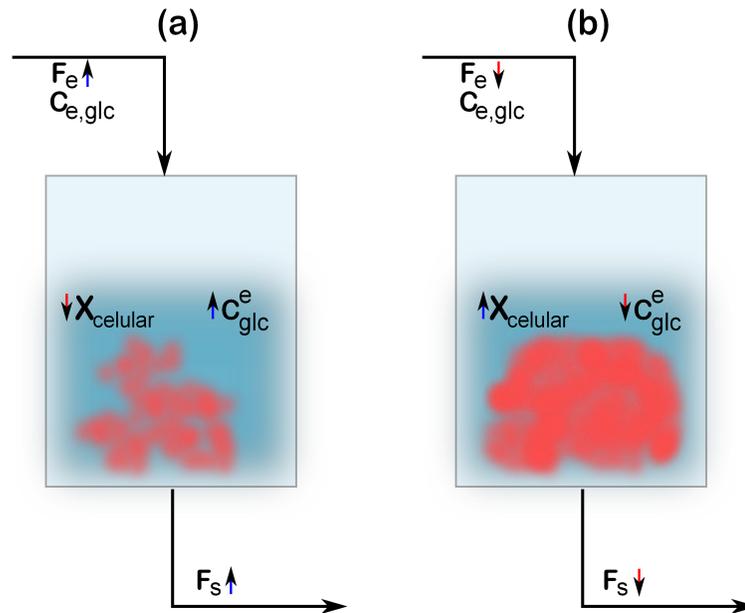


Figura 6.7: Efecto de la perturbación por medio de un (a) escalón y (b) anti-escalón en el coeficiente de dilución.

Para el caso de la aplicación de un anti-escalón se observa una disminución fuerte de la razón  $\Delta L/\Delta G$  y nuevamente, al hacer la comparación de la Figura 6.9 con la Figura 6.6, se puede notar que el efecto de un cambio en el coeficiente de dilución sobre la razón  $\Delta L/\Delta G$  es más relevante para el problema de regulación que el efecto ocasionado por una variación de la concentración de glucosa alimentada porque el valor final de  $\Delta L/\Delta G$  del cultivo se aleja mucho más del set point llevando el cultivo a un estado metabólico basal.

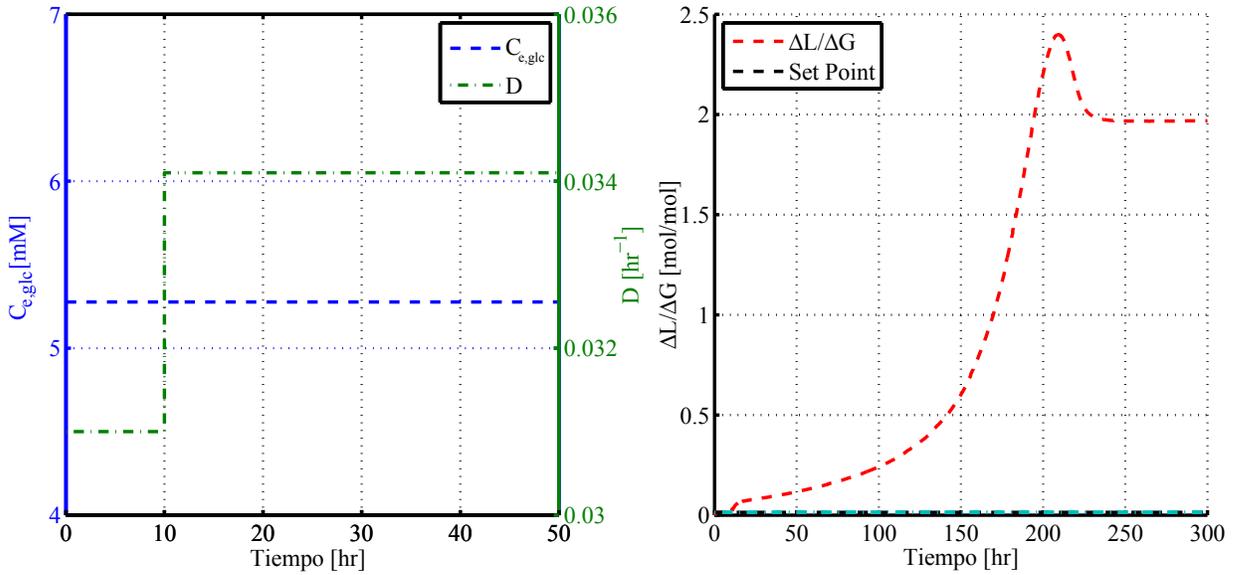


Figura 6.8: Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución. ---: set point  $\pm 5\%$  de set point.

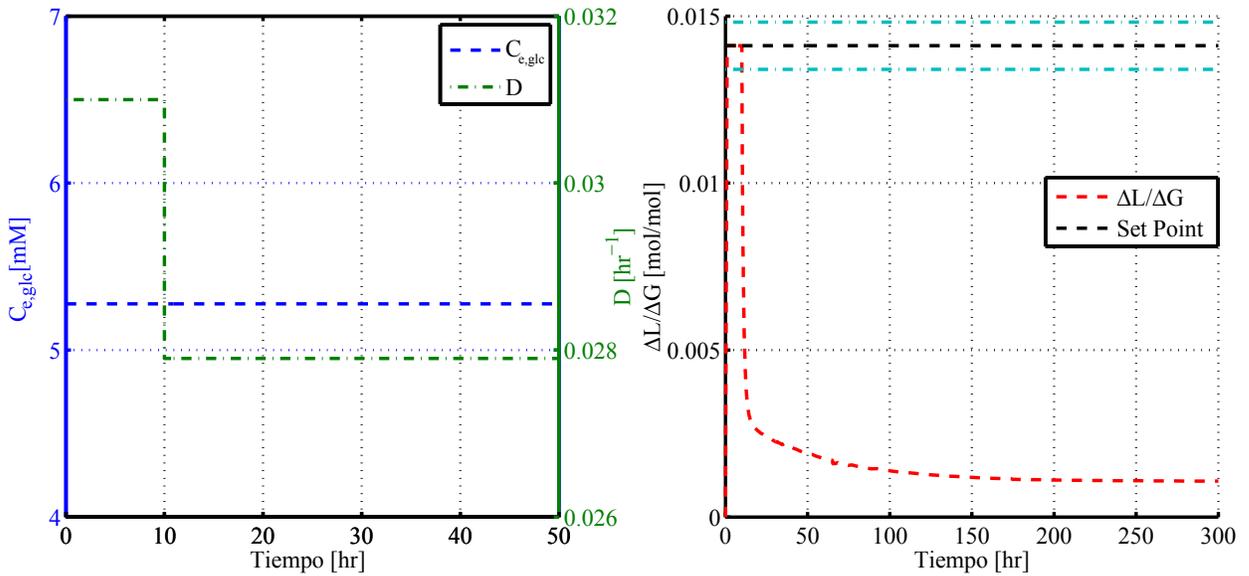


Figura 6.9: Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un anti-escalón de un 10% del coeficiente de dilución. ---: set point  $\pm 5\%$  de set point.

La dinámica de las respuestas de las Figuras 6.8 y 6.9, al igual que para las perturbaciones de la concentración de glucosa de entrada son de primer orden y no tienen respuesta inversa. El error de ajuste de la razón  $\Delta L/\Delta G$  al final de la simulación con respecto al set point es superior al 5% y es mucho mayor al observado para el escalón positivo y negativo de la concentración de glucosa.

Ambas respuestas tampoco tienen tiempos muertos pero si presentan una dinámica muy dife-

rentes entre sí. La respuesta frente a un escalón del coeficiente de dilución presenta un overshoot por lo que es una respuesta sub-amortiguada mientras que la ausencia de overshoot para la respuesta frente a un anti-escalón del coeficiente de dilución es indicador de una respuesta críticamente amortiguada o sobre-amortiguada.

### **Escalón de $\mu_{max}$**

Junto con realizarse perturbaciones de variables manipulables del sistema se perturbaron parámetros del crecimiento celular como  $\mu_{max}$  para analizar la respuesta del sistema frente a variaciones en el crecimiento celular. En la Figuras 6.10 y 6.11 se observa una respuesta opuesta al observado para el escalón del coeficiente de dilución. La tasa de crecimiento celular planteada (ver Ecuación 3.6)  $\mu$  es directamente proporcional al parámetro  $\mu_{max}$  y, por lo mismo, un aumento/reducción de  $\mu_{max}$  manteniendo constante el coeficiente de dilución genera un aumento/disminución de la concentración celular. Las perturbaciones realizadas para el coeficiente  $\mu_{max}$  fueron de un 10% de manera de realizar una comparación de respuesta de lazo cerrado, bajo las mismas condiciones, con las otras variables estipuladas para el análisis. Si bien pueden existir variaciones de la tasa de crecimiento de un cultivo que excedan el 10% planteado, experimentalmente no se ha observado que dichas perturbaciones ocurran bajo condiciones continuas de cultivo ni tampoco por tiempos prolongados [41].

Tal como se indicó para el caso del coeficiente de dilución, un aumento/reducción de la concentración celular genera un mayor/menor consumo de glucosa y, por tanto, una disminución/aumento de la producción de lactato producto del aumento o la baja en la glucosa disponible al interior del reactor.

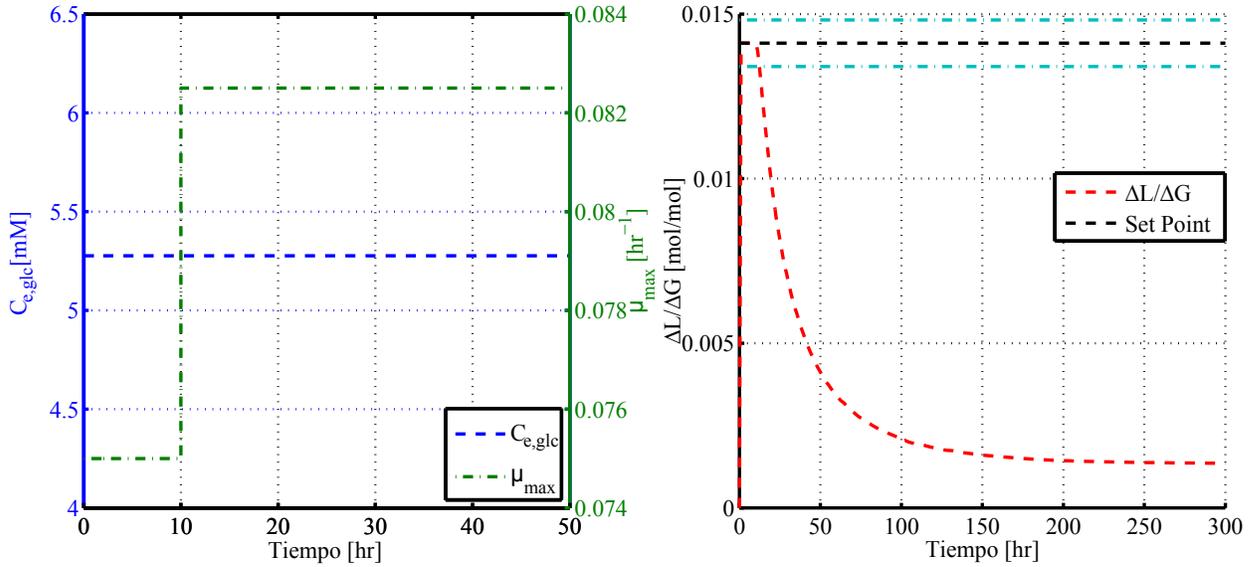


Figura 6.10: Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un escalón de un 10% de la tasa de crecimiento celular máximo  $\mu_{max}$ . -.-: set point  $\pm 5\%$  de set point.

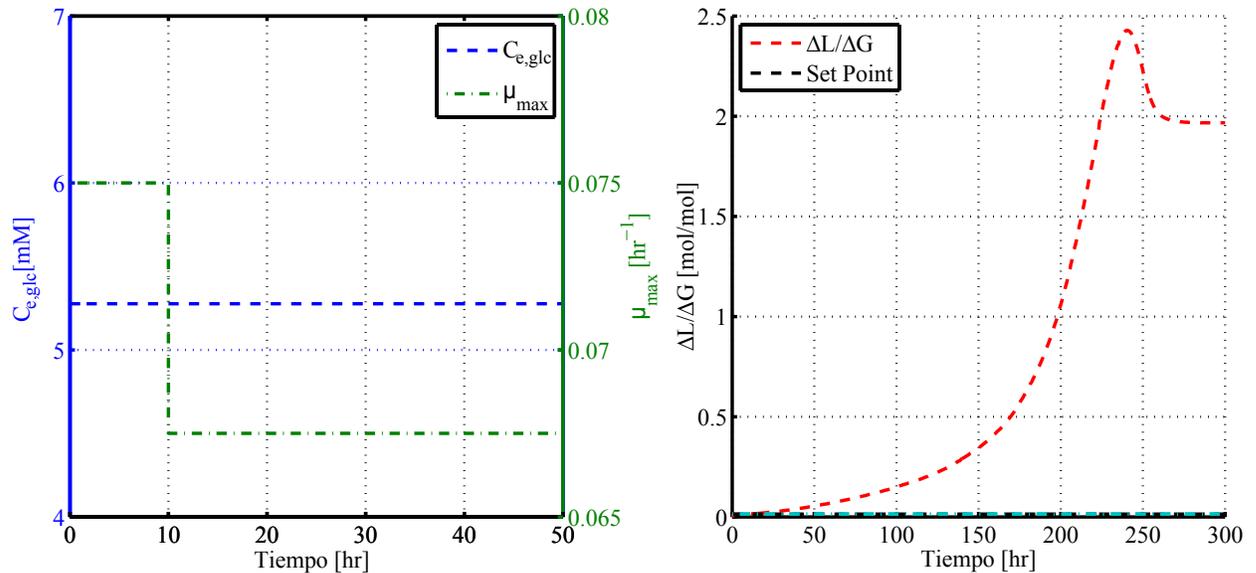


Figura 6.11: Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un anti-escalón de un 10% de la tasa de crecimiento celular máximo  $\mu_{max}$ . -.-: set point  $\pm 5\%$  de set point.

### Escalón de $K_{glc}^S$

Finalmente, la última perturbación realizada fue a la constante de activación de crecimiento celular por presencia de glucosa,  $K_{glc}^S$ , cuyos resultados se aprecian en las Figuras 6.12, a 6.14. La curva presentada en la Figura 6.14 corresponde a la simulación de la respuesta de lazo abierto de la Figura 6.12 con un tiempo de simulación extendido, esto a fin de mostrar que dicha perturbación

es capaz de llevar el cultivo a un estado metabólico alto pero con una mayor demora que los casos de un escalón de un 10% en el coeficiente de dilución y un anti-escalón de un 10% en el parámetro  $\mu_{max}$ .

Un aumento en el valor del parámetro de crecimiento  $K_{glc}^S$  genera una reducción en la tasa de crecimiento celular  $\mu$  por el planteamiento de este último (ver ecuación 3.6). Se puede considerar que el efecto de la perturbación positiva de  $K_{glc}^S$  no es de tan alta incidencia como el caso de las respuestas frente a perturbaciones de  $\mu_{max}$  y el coeficiente de dilución debido al mayor tiempo de estabilización en un estado metabólico basal. El menor efecto se debe principalmente a que la relación inversa entre  $\mu$  y  $K_{glc}^S$  no es explícita y el efecto de la perturbación se ve amortiguado por el valor de la concentración de glucosa extra celular en el estado estacionario. De manera más clarificadora, en el estado estacionario el valor de  $C_{e,glc}^e$  es de 0,225 [mM] y el valor de  $K_{glc}^S$  previo al escalón es de 0,316 [mM] por lo que, de acuerdo a la ecuación 3.6, la tasa de crecimiento celular  $\mu$  en el estado estacionario se puede escribir como  $\mu^{ss} = \alpha \cdot 0,4155$  y en el valor de  $\mu$  en el instante de la perturbación es  $\mu^{ss} = \alpha \cdot 0,3925$ . De acuerdo a los cálculos anteriores se tiene que el escalón de un 10% de  $K_{glc}^S$  genera una reducción efectiva de aproximadamente 5% de  $\mu$  lo que permite fundamentar la gran diferencia que existe entre la respuesta frente a un anti-escalón de  $\mu_{max}$  y la respuesta ante un escalón de  $K_{glc}^S$ .

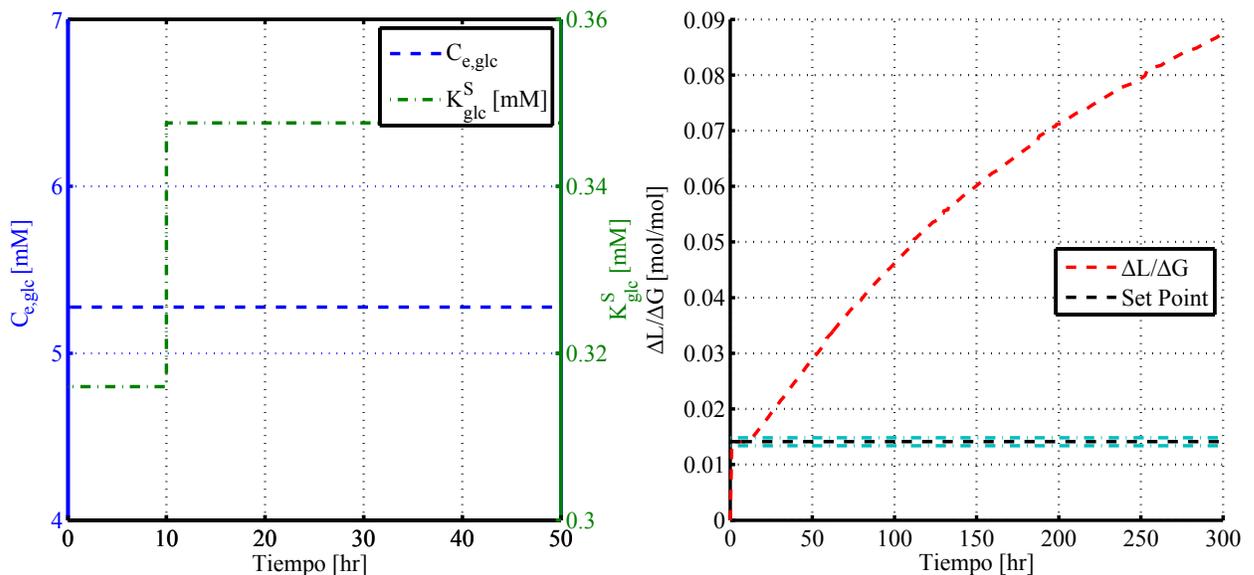


Figura 6.12: Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un escalón de un 10% de la constante de activación de crecimiento celular por presencia de glucosa,  $K_{glc}^S$ . ---: set point  $\pm 5\%$  de set point.

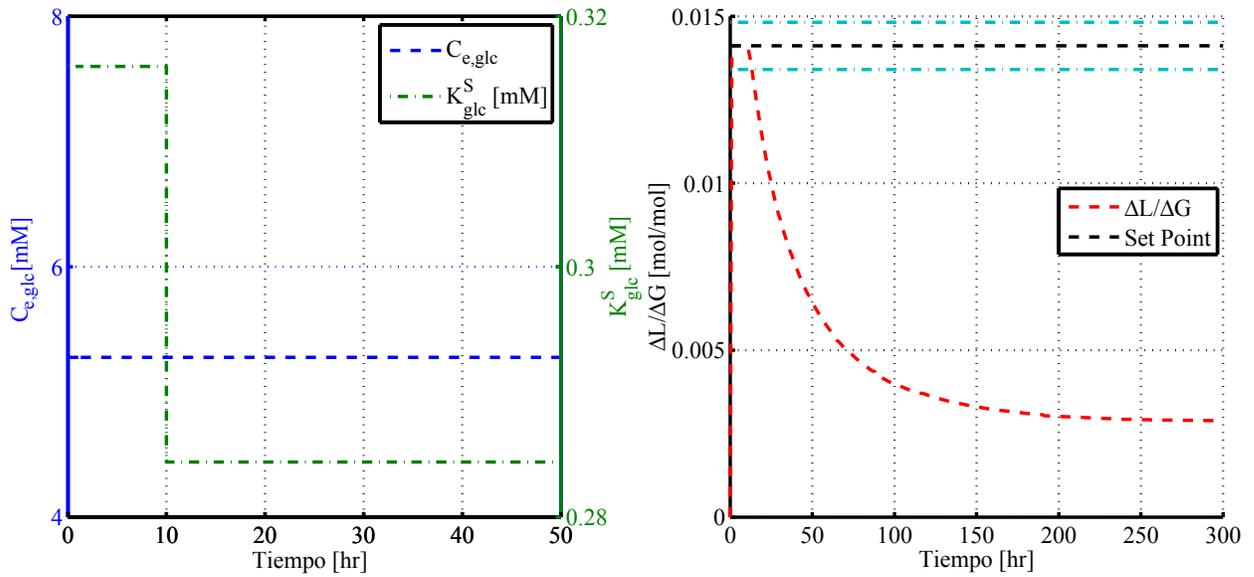


Figura 6.13: Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un anti-escalón de un 10% de la constante de activación de crecimiento celular por presencia de glucosa,  $K_{glc}^S$ . ---: set point  $\pm 5\%$  de set point.

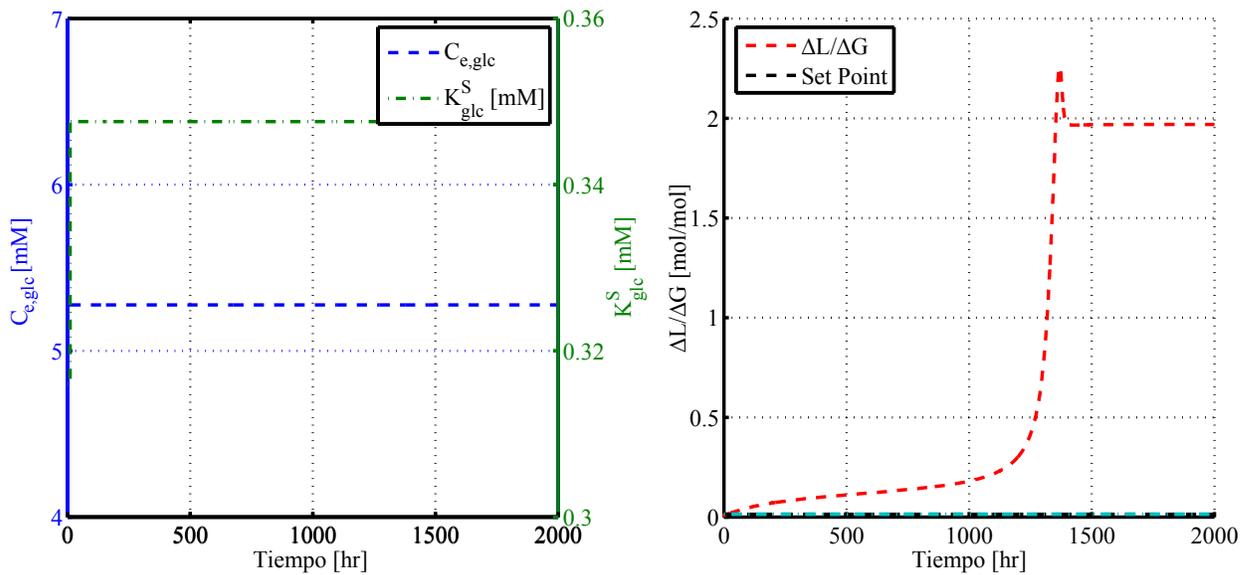


Figura 6.14: Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un escalón de un 10% de la constante de activación de crecimiento celular por presencia de glucosa,  $K_{glc}^S$ . ---: set point  $\pm 5\%$  de set point.

## Discusiones

En la Tabla 6.1 se presentan las características más importantes de las curvas resultantes de la aplicación de escalones y anti-escalones, de las variables mencionadas, al sistema con sus lazos de control sin efecto. Así mismo, se incluyen únicamente las perturbaciones cuya respuesta lleva

a un aumento de la razón  $\Delta L/\Delta G$  pues el objetivo de control es mantener el sistema en un estado metabólico alterado ( $\Delta L/\Delta G < 0,1[mol/mol]$ ). La caracterización de cada curva incluye el valor estacionario de la respuesta (B), la magnitud en que excede el máximo valor de dicho valor estacionario (A), el overshoot (O), el factor de amortiguamiento ( $\zeta$ ) y la razón de decaimiento (RD), donde:

$$O = \frac{A}{B} \quad (6.1)$$

$$O = \exp\left(\frac{-\pi\zeta}{\sqrt{1-(\zeta)^2}}\right) \quad (6.2)$$

$$RD = O^2 \quad (6.3)$$

Tabla 6.1: Caracterización de curvas de respuesta con lazos del sistema abiertos.

<b>Variable</b>	<b>Perturbación</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>O</b>	<b><math>\zeta</math></b>	<b>RD</b>
$C_{glc,e}$	10 %	0,0427	0,0152	2,809	0,312	7,892
D	10 %	0,429	1,97	0,218	0,437	0,0473
$\mu_{max}$	-10 %	0,461	1,9702	0,234	0,42	0,0548
$K_{glc}^S$	10 %	0,285	1,9686	0,145	0,524	0,021

Todas las respuestas consideradas en la Tabla 6.1 tienen un factor de amortiguamiento inferior a 1, esto implica que las respuestas son subamortiguadas. Las respuestas sub-amortiguadas son aquellas que tienen un tiempo de respuesta menor a las respuestas sobreamortiguadas ( $\zeta > 1$ ) o críticamente amortiguadas ( $\zeta = 1$ ), pero una mayor oscilación. A simple vista se corrobora dicho resultado con la existencia de un “overshoot” en todas las curvas, característica propia de respuestas con  $\zeta$  inferior a 1.

El sistema es muy sensible tanto frente a un escalón positivo como negativo de la concentración de glucosa de entrada, con esto se puede concluir que la pendiente de la curva en el tiempo del escalón es prácticamente vertical y por ende igual a  $\pm\infty$ . Además, de la Tabla 6.1 se tiene que para las perturbaciones de la concentración de entrada de glucosa el factor de amortiguamiento es el más bajo lo que implica que posee una oscilación más pronunciada que se puede notar a nivel del valor del “overshoot” y la razón de decaimiento.

De los resultados anteriormente retratados de la respuesta del sistema frente a perturbaciones

positivas y negativas de diversa índole se tiene que las perturbaciones más incidentes sobre el fenómeno de la variación del estado metabólico son un escalón de un 10% en el coeficiente de dilución y un anti-escalón de un 10% en el parámetro  $\mu_{max}$ .

Cabe destacar que la magnitud instantánea del coeficiente de dilución y la tasa de crecimiento celular, en su tiempo de inicio, es igual en ambos casos pues al alcanzar el estado estacionario el valor de  $\mu$  se equipara con el del coeficiente de dilución. Lo anterior permite respaldar que la comparación entre ambas perturbaciones determina que un escalón del coeficiente de dilución es la perturbación más significativa sobre el sistema. Si bien ambas perturbaciones logran la reversibilidad del cambio de estado metabólico haciendo que el cultivo vuelva a tener una razón  $\Delta L/\Delta G$  igual a 2, dicha reversión se lleva a cabo de manera más rápida en el caso de la perturbación del coeficiente de dilución.

Lo anterior permite establecer que frente a una perturbación de un 10% del coeficiente de dilución es que el controlador debe responder adecuadamente frente al problema de regulación. Con esto se establece un criterio de diseño de controlador sumamente relevante debido a que, del análisis de lazo abierto, la perturbación de un 10% del coeficiente de dilución genera el efecto más incidente, una vuelta al estado metabólico basal en el menor tiempo.

### 6.3. Criterios de diseño de controladores

A fin de realizar una comparación objetiva de controladores de diferente índole fue necesario establecer los criterios de diseño de éstos. Tal como se comentó anteriormente, el objetivo de control es adoptar la estrategia de alimentación óptima de manera de mantener un cultivo en un estado metabólico alterado. Para esto se han fijado los siguientes parámetros de diseño:

- **Rendimiento frente al problema de regulación:** Cada controlador diseñado debe considerar el problema de regulación por la naturaleza del objetivo de control. Se definió como perturbación más relevante un escalón en el coeficiente de dilución de un 10% sobre el valor del estado estacionario alcanzado para el cultivo alterado ( $0,031 [hr^{-1}]$ ).
- **Definición de estado metabólico alterado:** A fin de cuantificar el rendimiento de los controladores frente a la mantención del estado metabólico se definió una banda de  $\pm 5\%$  de la razón  $\Delta L/\Delta G$  del estado estacionario alcanzado de  $0,014 [mol/mol]$ , obtenido por medio de simulación del cultivo alterado descrito en la Sección 3.4, como set point.

- **Apertura de lazos:** Para el diseño del sistema de control de la alimentación de glucosa, el lazo de control que relaciona el coeficiente de dilución con la tasa de crecimiento celular se mantuvo abierto. Es decir, debido a la existencia de interacciones entre lazos de control en sistemas que comprenden más de un lazo se debe ajustar cada lazo de control manteniendo los otros lazos abiertos [51].
- **Supuestos:** A fin de poder visualizar plenamente la acción pura del controlador se ha optado por suponer idealidad de los equipos involucrados en el lazo de control. Es decir, se ha supuesto que no existen errores asociados a la medición de datos y que las variables calculadas se encuentran disponibles de manera inmediata. Sin embargo, para paliar la falta de robustez que significa la aplicación de dicha idealidad, se tomó un escalón de un 10% en el coeficiente de dilución, lo cual corresponde al doble de la magnitud reportada a nivel experimental [25]. La finalidad del supuesto de una medición sin error es para facilitar la comparación de los diferentes controladores a diseñar, liberando las respuestas de ruido producto de errores de medición. Por otra parte, la omisión de los tiempos muertos producto de muestreos y cálculos corresponde a una normalización de los tiempos de respuesta de los controladores y permite incluir dentro del diseño los controladores continuos. Sin embargo, la sensibilidad frente a condiciones reales de operación, como la imposibilidad de tener un proceso de muestreo sin tiempos muertos, deberá ser analizada.

## 6.4. Control clásico

Los denominados controladores clásicos incluyen controladores proporcionales (P), proporcionales derivativos (PD), proporcionales integrales (PI) y proporcionales integrales derivativos (PID), siendo éste último el de uso más común en la industria.

El planteamiento básico de los controladores clásicos es el controlador proporcional que, tal como sugiere su nombre, parte con la implementación de un controlador cuya acción de control busca corregir el error de desviación del set point ( $\epsilon$ ) por medio de la aplicación de una acción de control proporcional a dicho error, de la manera que se plantea en la ecuación 6.4.

$$C_{glc,e}(t) = c_P(t) + C_{glc,e}(t-1) = K_c \cdot \epsilon(t) + C_{glc,e}(t-1) + c_s \quad (6.4)$$

donde  $c_P(t)$  corresponde a la acción de control proporcional,  $K_c$  a la ganancia de control,  $\epsilon$  es la

diferencia entre la variable medida y su set point ( $y_{sp} - y_m$ ), y  $c_s$  corresponde a la acción de control cuando  $\varepsilon$  es igual a 0. Para el objetivo de control planteado se espera que no se varíe la concentración de glucosa de entrada cuando se esté operando en el set point, es decir que  $\frac{dC_{glc,e}(t)}{dt} = 0$  cuando  $\varepsilon = 0$ , y para cumplir con esta restricción  $c_s$  debe ser igual a cero.

La componente derivativa de los controladores PD y PID se presenta en la ecuación 6.5 y busca predecir el error futuro de la variable de salida aplicando una acción de control proporcional a la gradiente de error en el tiempo  $t$ .

$$C_{glc,e}(t) = c_D(t) + C_{glc,e}(t-1) = K_c \cdot \tau_D \cdot \frac{d(\varepsilon(t))}{dt} + C_{glc,e}(t-1) + c_s \quad (6.5)$$

Finalmente, los controladores PI y PID presentan una componente integral que tiene la forma de la ecuación 6.6, donde  $\tau_I$  es la tasa de reseteo del controlador, es decir, el tiempo que se demora la componente integral en repetir la acción proporcional del controlador. La función de la integral en la componente  $I$  de los controladores PI y PID busca reducir el error de ajuste al set point del controlador pues un error persistente en el tiempo quedará incluido en dicha integral y se reflejará en la acción de control.

$$C_{glc,e}(t) = c_I(t) + C_{glc,e}(t-1) = \frac{K_c}{\tau_I} \cdot \int \varepsilon(t) dt + C_{glc,e}(t-1) + c_s \quad (6.6)$$

Así, el controlador proporcional corresponde únicamente al planteamiento de la ecuación 6.4 y los controladores PI, PD y PID corresponden a la suma de dos o más de las ecuaciones 6.4, 6.6 y 6.5, respectivamente.

El ajuste de los parámetros de control  $K_c$ ,  $\tau_D$  y  $\tau_I$  puede ser por medio de diversos métodos que pueden variar desde un método simple como es el método de decaimiento de un cuarto, en donde se ajustan los parámetros fijando el valor de la razón de decaimiento para que sea igual a 1/4, métodos de rendimiento integral-temporal como son los criterios de minimización de IAE (error integral absoluto), ISE (error integral cuadrado) y/o ITAE (error integral absoluto ponderado por el tiempo), o un método semi-empírico como es el de Cohen y Coon que consiste en aproximar la respuesta de lazo abierto de un sistema por un sistema de primer orden con retardo [52].

### 6.4.1. Diseño de controlador proporcional

Se descartaron los controladores que poseen componente integral (PI y PID) porque el criterio de diseño estipulado requiere de una mantención del estado metabólico que se traduce en mantener el valor de  $\Delta L/\Delta G$  en una banda de un 5% alrededor del set point por lo que la precisión de control con respecto al set point no necesita ser alto y, por lo mismo, la componente integral del controlador es innecesario. Por otra parte, el comportamiento ruidoso que puede tener la razón  $\Delta L/\Delta G$  en las fases de transición permite justificar el uso de un controlador proporcional por sobre un controlador proporcional derivativo. De esta manera, a fin de retratar el comportamiento básico de los denominados controladores clásicos, se optó por diseñar un controlador proporcional.

El método utilizado para el ajuste de parámetros del controlador proporcional es la minimización del error integral absoluto ponderado por el tiempo. El error integral absoluto ponderador por el tiempo o ITAE consiste en la suma continua de la desviación de la variable de salida con respecto al set point, ponderado por el instante temporal en que ocurren, como se aprecia en la ecuación 6.7.

$$ITAE = \int_0^{\infty} t \cdot |\varepsilon(t)| dt \quad (6.7)$$

en donde la minimización del ITAE fue a lo largo un intervalo de 40 [hr] para asegurar el menor tiempo de respuesta dentro de ese rango de tiempo. Debido a que el tiempo  $t$  pondera el error  $\varepsilon(t)$ , un intervalo muy grande prioriza los errores que ocurren hacia el final del intervalo por lo que el tiempo de respuesta del controlador puede verse afectado.

Por otra parte, los errores integrales absoluto y cuadrado se presentan en las ecuaciones 6.8 y 6.9, respectivamente.

$$IAE = \int_0^{\infty} |\varepsilon(t)| dt \quad (6.8)$$

$$ISE = \int_0^{\infty} \varepsilon^2(t) dt \quad (6.9)$$

Se escogió la minimización del ITAE por sobre la minimización del IAE e ISE debido a que, para efectos prácticos, se prefiere una acción de control que asegura una vuelta rápida a la banda de control. El criterio de minimización del IAE permite reducir errores pequeños (preferido para errores inferiores a 1) y la minimización del ISE permite reducir grandes errores (mayores que

1) que podrían existir. La minimización se llevó a cabo utilizando aplicando el método simplex Nelder-Mead a un punto inicial obtenido tras un ajuste manual del controlador [32].

### 6.4.2. Resultados de ajuste

Como resultado de la minimización del ITAE, el parámetro  $K_c$  obtenido fue 1.362, corroborado por medio de la comparación del valor de ITAE para valores de  $K_c$  de diferente orden de magnitud. La simulación de la respuesta del sistema frente a un escalón de un 10 % del coeficiente de dilución con el lazo de control de la concentración de glucosa cerrado se presenta en las Figuras 6.15 y 6.16. La dinámica de la variable manipulable,  $C_{glc,e}$ , sigue la misma dinámica que la densidad celular de la Figura 6.17 constatándose que se disminuye la concentración de glucosa para alimentar la cantidad requerida por el cultivo cuya concentración va disminuyendo a lo largo del tiempo producto del lavado de células en el bioreactor. Por otra parte, el aumento del coeficiente de dilución genera un lavado de lactato y, para mantener la  $\Delta L/\Delta G$  la acción de control alimenta una concentración de glucosa levemente superior al requerido por el cultivo celular de manera que se genera una diferencia positiva entre el flujo de glucosa que entra y la que sale con lo que existe una acumulación. La simulación de la respuesta del controlador proporcional fue hasta las 1.000 [hr] debido a que la propagación de errores numéricos generó una oscilación creciente que impidió la simulación en MATLAB® por un intervalo más largo. La fuente de generación de dichos errores propagados podría deberse a que el sistema de ecuaciones diferenciales es de tipo Stiff lo que, en conjunto con una aproximación asintótica de la respuesta de control al set point, establecido requiere de una tolerancia numérica muy pequeña para evitar las oscilaciones observadas.

Tabla 6.2: Valores de ITAE para diferentes valores de  $K_c$ . \*valor óptimo obtenido.

$K_c$	ITAE
1.858,1	0,07
1.625,9	0,08
1.393,6	0,05
1.362,2*	0,008
929,1	0,09
696,8	0,1

El sistema con control proporcional se demora aproximadamente 5 horas (a partir de la hora 10, cuando se perturba el sistema) en estabilizarse la razón  $\Delta L/\Delta G$  dentro de la banda de  $\pm 5\%$  del set point.

Debido a que el lazo de control que manipula el coeficiente de dilución en función de la tasa de crecimiento celular se encuentra abierto, la respuesta de la Figura 6.16 no es la misma que existe al cerrar el lazo de control faltante (ver Figura 6.19) debido a que la interacción entre ambos lazos genera variaciones en la respuesta. La simulación de la respuesta dinámica con ambos lazos de control cerrados fue considerando un control perfecto del coeficiente de dilución a través de la restricción  $D = \mu$  y realizando un escalón de un 10% en el coeficiente  $\mu_{max}$ . Al analizar la nueva respuesta de control observamos que existe una mayor oscilación antes de entrar a la banda de control y que la razón  $\Delta L/\Delta G$  se demora más en asentarse dentro de la banda (aproximadamente 20 horas), lo que se debe a la existencia de una interacción entre ambos lazos de control y requiere de un segundo ajuste. La interacción de dos lazos es un problema típico de los problemas MIMO de control, en donde la variación de una variable manipulable asignada para el control de una variable de salida afecta además otra variable de salida, lo que puede generar oscilaciones indeseadas y desajustes de la respuesta controlada [51].

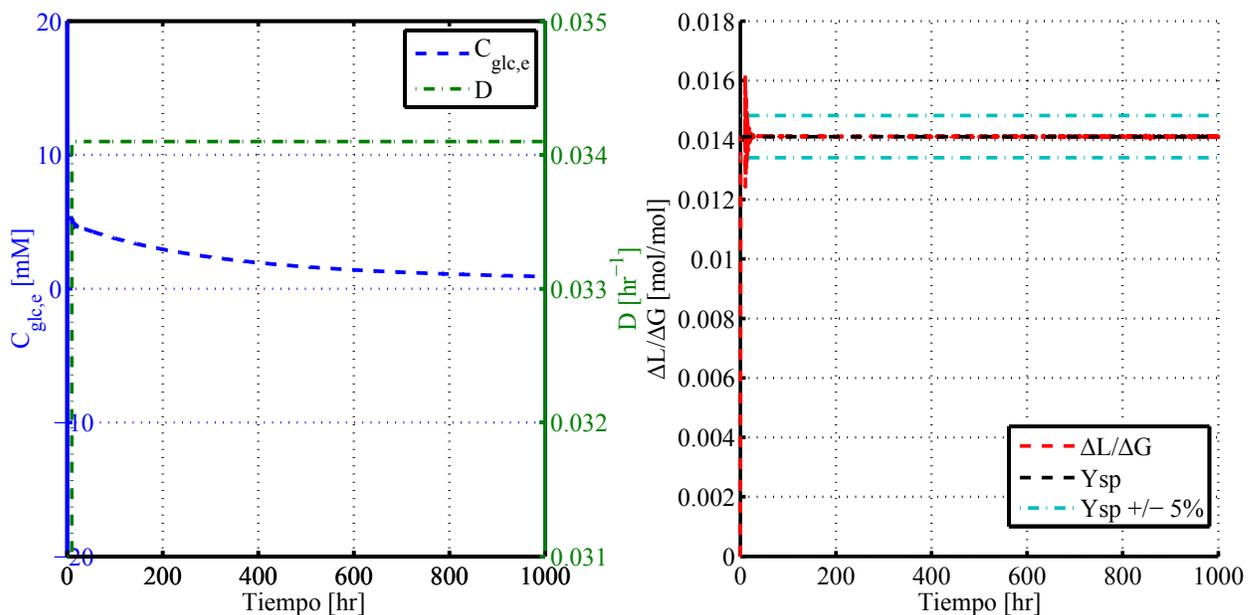


Figura 6.15: Respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada con la inclusión del lazo de control proporcional de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular abierto.

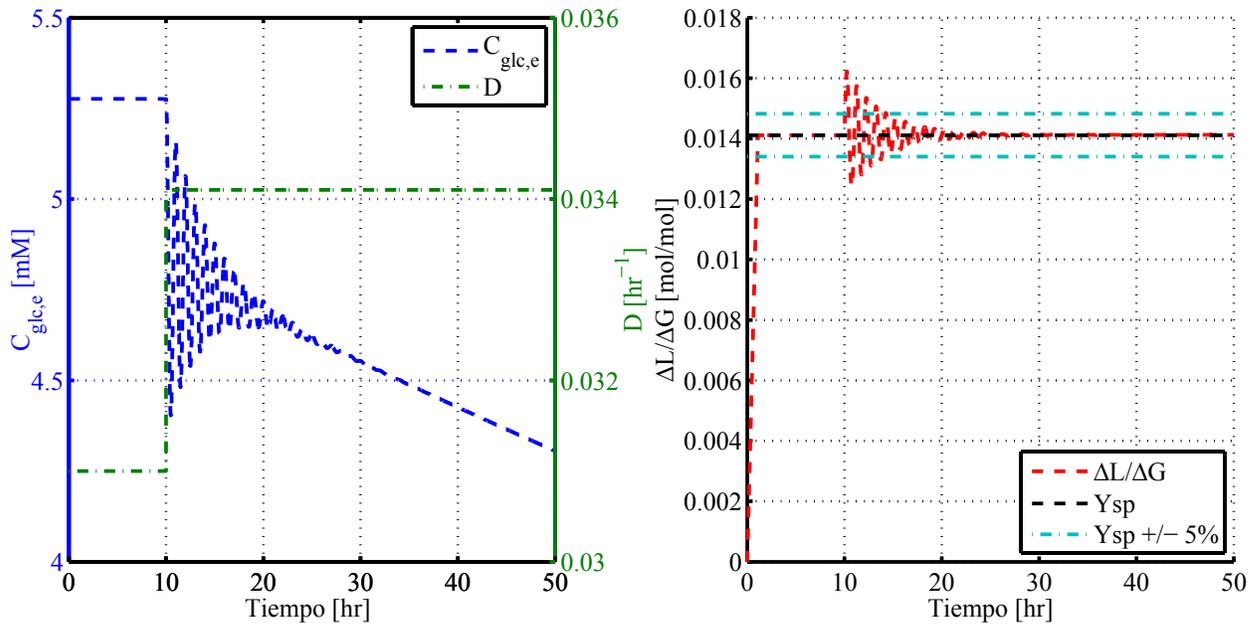


Figura 6.16: Acercamiento de respuesta del sistema frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada con la inclusión del lazo de control proporcional de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular abierto. ---: set point  $\pm 5\%$  de set point.

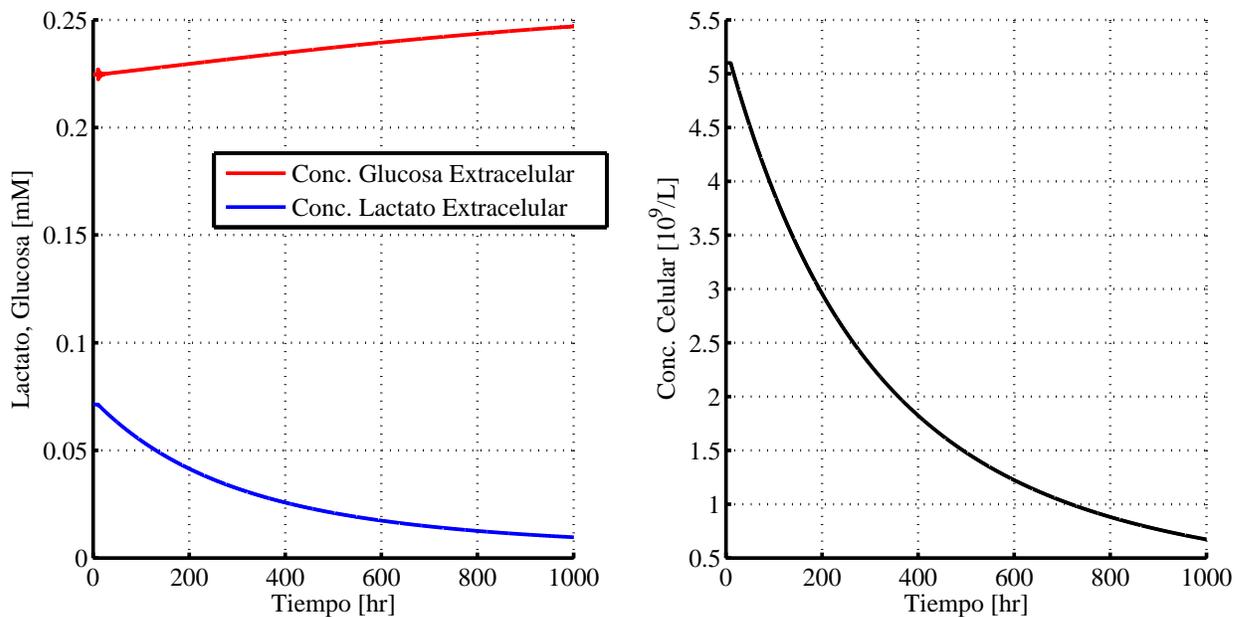


Figura 6.17: Concentraciones de glucosa y lactato extracelular y concentración celular simulada para la respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada.

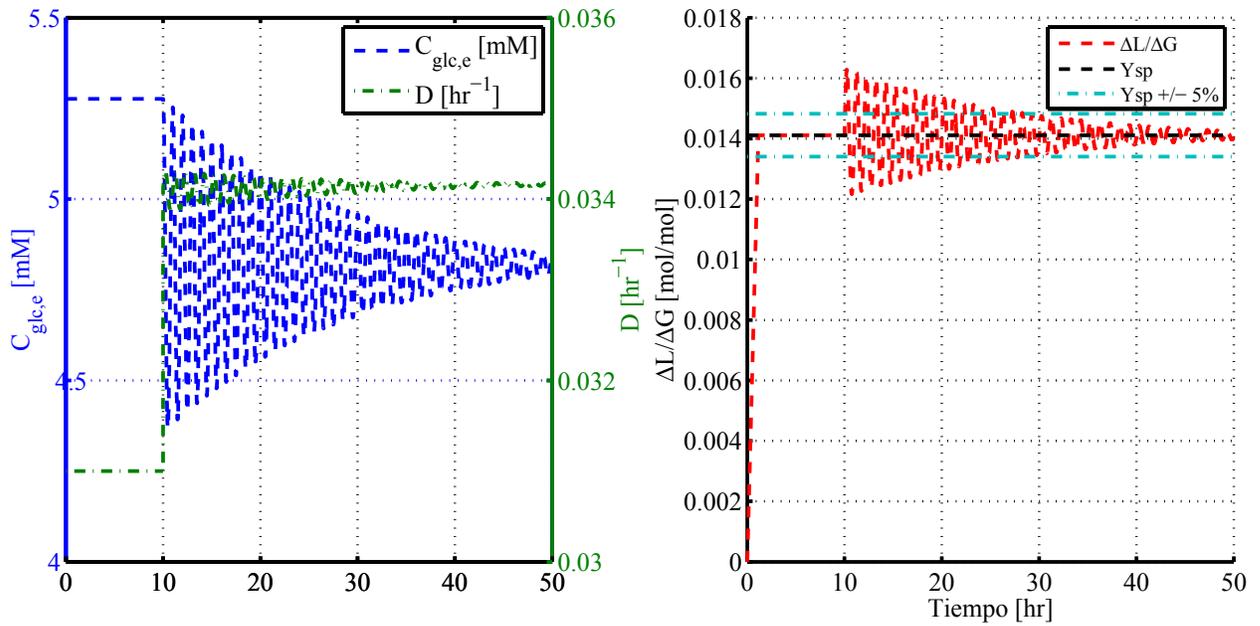


Figura 6.18: Respuesta del sistema frente a un escalón de un 10% del parámetro  $\mu_{max}$  con la inclusión del lazo de control proporcional de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

Para el ajuste del controlador proporcional con ambos lazos de control cerrados se minimizó nuevamente el valor del ITAE en un intervalo de 40 horas. El nuevo valor de  $K_c$  fue 870,4 y el resultado de la simulación de la respuesta del sistema ante una perturbación de un 10% del parámetro  $\mu_{max}$ , con ambos lazos de control cerrados, se muestra en la Figura 6.19.

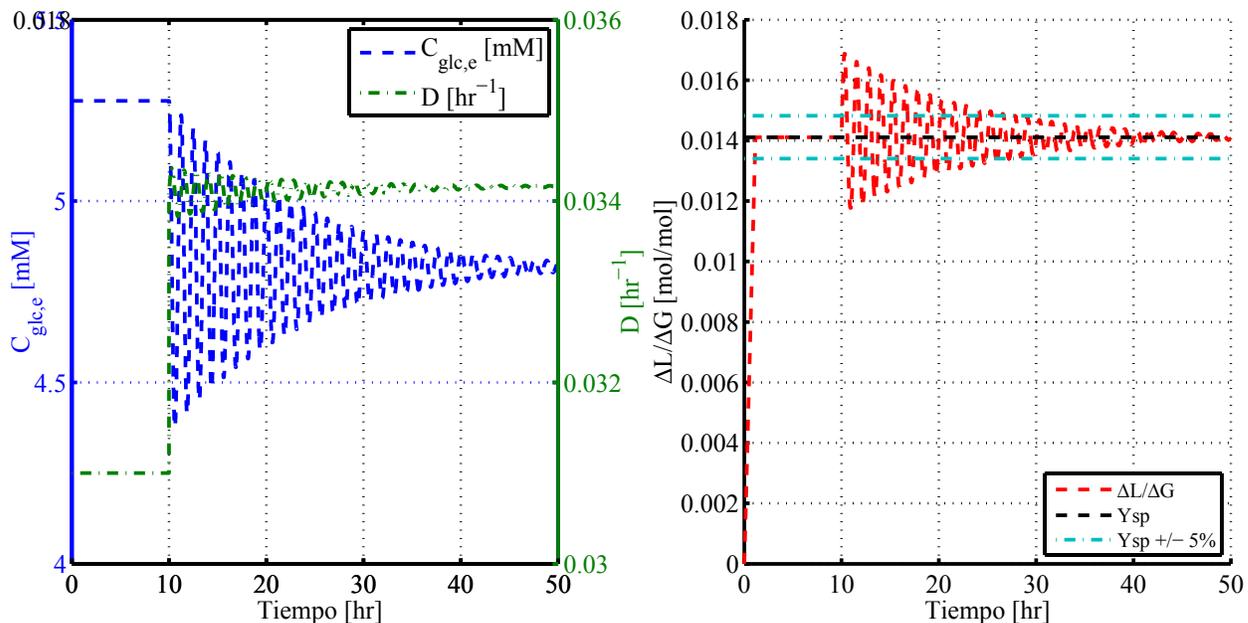


Figura 6.19: Respuesta optimizada del sistema obtenida por minimización del ITAE de la respuesta frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada con la inclusión del lazo de control proporcional de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

Al igual que para el ajuste sin el lazo de crecimiento celular cerrado, se realizó una comparación simple con valores de  $K_c$  de distintos orden de magnitud de manera de descartar la posibilidad de que el valor de  $K_c$  corresponde a un mínimo local del ITAE. La comparación se detalla en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3: Valores de ITAE para diferentes valores de  $K_c$ . \*valor óptimo obtenido.

$K_c$	ITAE
1.362,2	0,08
1.161,3	0,56
929,1	0,53
870,4*	0,51
464,5	0,55
23,2	1,8

La nueva respuesta de lazo cerrado de la Figura 6.19 posee un tiempo de respuesta de aproximadamente 17 horas, levemente menor al simulado con  $K_c$  igual a 1.362,2 (ver Figura 6.18).

Además de una reducción de aproximadamente un 15% del tiempo de respuesta, también se tiene un mayor overshoot producto de la mayor amplitud de la primera oscilación de la respuesta, éste aumenta de aproximadamente 0,0164 a 0,017 lo que corresponde a un aumento de un 3,7%.

Un aumento del “overshoot” también significa un aumento de la razón de decaimiento para el controlador de  $K_c$  igual a 870,4.

Los valores obtenidos de ganancia  $K_c$  muestran que para la regulación de la concentración de glucosa se requiere de cambios bruscos para el control del estado metabólico, esto se refleja en las altas tasas de cambio que se necesitó en la concentración de glucosa alimentada para paliar la perturbación. Hay que destacar que el perfil de glucosa observado en las respuestas de lazo cerrado con y sin el lazo de control de crecimiento celular es prácticamente imposible a escala industrial debido al rango necesario de concentraciones de glucosa y a la precisión de los mismos. Además, un planteamiento continuo no es factible de implementar a nivel industrial debido a que en la realidad no es factible tener una medición sin tiempos muertos. Lo anterior será debidamente analizado y discutido más adelante.

## 6.5. Control avanzado

La variedad de tipos de control avanzado ha aumentado significativamente, lo que ha generado numerosas técnicas de control que adoptan estrategias desmarcadas de las metodologías clásicas y que buscan ser una solución factible a problemas de control que poseen restricciones operacionales que pueden ser incluidos en los métodos de ajuste clásico debido a la alta simplicidad de los mismos. Las no linealidades inherentes de las dinámicas observadas en muchos bio-procesos ha hecho prescindir de técnicas de retro alimentación lineales como los controladores proporcionales y proporcional integral [53].

El problema de la no linealidad presente en las dinámicas de la gran mayoría de los procesos químicos y bio-procesos ha generado el estudio de técnicas avanzadas de control que buscan reducir los problemas típicos que surgen al controlar dichos procesos, a través de la construcción de modelos simplificados del proceso que apoyen las decisiones utilizadas para realizar las acciones de control [54]. Ejemplos de modelos de procesos utilizados son ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas para la descripción de un cultivo de levadura [55, 56], un modelo dinámico paramétrico discreto para la descripción del proceso de fermentación para la producción de etanol para combustible [57], entre otros.

Una de las primeras técnicas utilizadas para el fin de adaptar el control clásico a problemas de mayor complejidad fue precisamente eso, generar un esquema de control adaptativo. El principio

básico de diseñar controladores con parámetros de control que ya no eran estáticos sino que se adaptaban a las condiciones de proceso fue utilizado para sistemas de crecimiento bacteriano en donde el coeficiente de dilución es controlado en función de la cantidad de sustrato requerido en el bio-reactor [58].

Entre las técnicas avanzadas de control destaca también el control por lógica difusa que busca traducir las acciones realizadas por operarios de proceso a un lenguaje de control a través del uso de reglas de control que son derivados del valor de las variables de operación [59]. Su utilización ha sido llevado a múltiples planos como son los procesos de ventilación y enfriado por medio de la variación del flujo de aire dependiendo de la diferencia de temperatura existente con respecto a un punto de operación deseado (diferencia grande negativa, pequeña negativa, nula, pequeña positiva, y grande positiva) [60], digestión anaeróbica, en donde las reglas de control de pH fueron configuradas en base al pH existente, la concentración de metano y la tasa específica de producción de gas [61], y neutralización que contempla la titulación de una solución de acetato de sodio por medio de la regulación de un flujo de entrada de ácido clorhídrico utilizando una variable auxiliar que divide la curva de titulación del acetato de sodio en tres y 5 intervalos de variación de pH con respecto a un punto de operación (variación grande y negativa, variación pequeña y negativa, variación nula, variación pequeña y positiva, y variación grande y positiva) [62], entre otros.

Otro tipo de controlador avanzado, que es al que se hará énfasis en esta tesis es el denominado control óptimo o control basado en modelo. El gran número de aplicaciones que tiene dicho controlador muestra que es un controlador versátil y de buenos resultados, en donde algunas aplicaciones registradas incluyen lazos de control en la industria de polímeros, de refinación y de alimentos [10].

### **6.5.1. Control óptimo**

La base del control óptimo es, tal como dice su nombre, la optimización de los valores futuros de una variable manipulable por medio de la minimización o la maximización de una función objetivo. El control óptimo utiliza un modelo de proceso discreto para realizar predicciones a lo largo de un horizonte de predicción de largo  $N_p$  en base a un número  $N_c$  de movimientos en la variable manipulable. Con dichas predicciones se encuentra un óptimo basado en la función objetivo utilizada. Dicha optimización puede ser con o sin restricciones sobre los valores de las variables manipulables, variables de salida y/o la tasa de cambio de las mismas [55, 63–67].

En su forma general, dicha optimización comprende la minimización de la función objetivo que

se presenta en la ecuación 6.10.

$$J = \sum_{k=1}^{N_c} \Delta u_k \cdot \lambda \cdot \Delta u'_k + \sum_{k=1}^{N_p} \Delta \hat{y}_k \cdot Q \cdot \Delta \hat{y}_k \quad (6.10)$$

donde  $\Delta u$  es un vector, de  $N_p$  filas y un número de columnas igual al número total de variables de entrada que considera el modelo, que contiene las variaciones de la variable manipulable a lo largo del horizonte  $N_p$ ,  $\Delta \hat{y}$  es el vector, de  $N_p$  filas y un número de columnas igual al número total de variables de salida de interés, que contiene las desviaciones de los valores predichos con respecto al set point.  $\lambda$  y  $Q$  son vectores y corresponden a los pesos asociados a la componente de variables manipulables y a la variable de salida, respectivamente.  $\lambda$  es equivalente al costo de generar un cambio en el valor de la variable manipulable mientras que  $Q$  es el costo por operar en un punto distinto al set point [56].

Visto de forma gráfica, la función busca minimizar la suma del costo total por manipulación de variables de entrada y el error total entre el set point y la predicción del modelo presentados en la Figura 6.20.

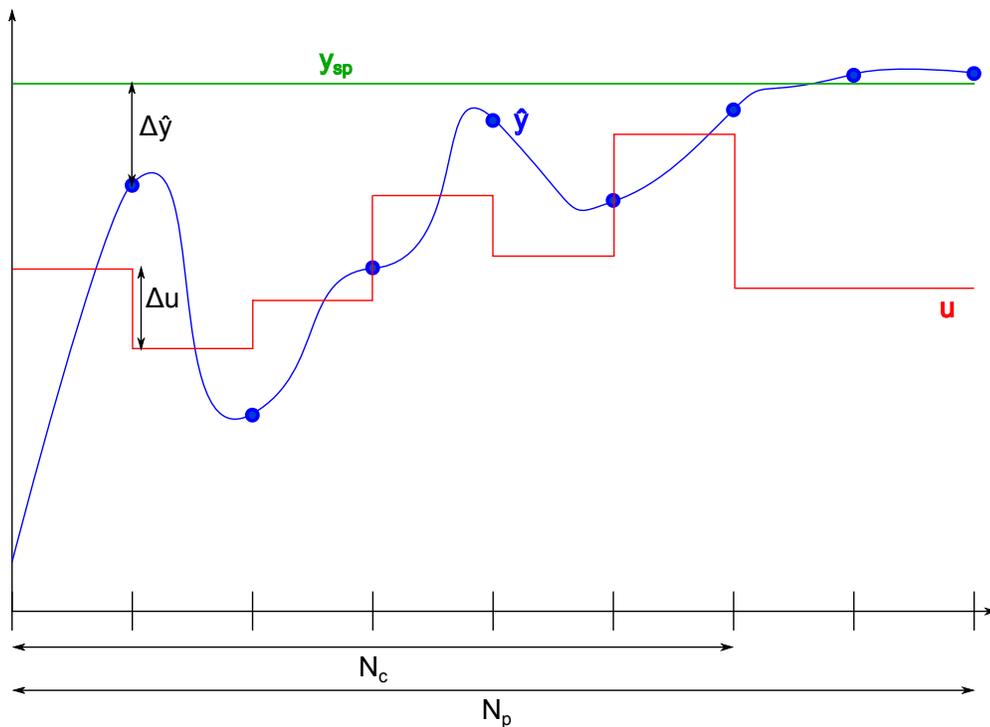


Figura 6.20: Predicción de modelo de proceso.

La metodología de control del lazo de control cerrado del controlador basado en un modelo de

proceso se muestra la Figura 6.21. En un instante  $k$ , se realiza una medición de la variable de salida  $y(k)$ , dicha variable luego es utilizada, junto con las perturbaciones identificadas del sistema  $d(k)$  y a las variables de entrada  $u(k)$ , para alimentar de información el modelo de proceso del controlador basado en modelo. El controlador basado en modelo optimiza una función objetivo, que puede tener la forma de la ecuación 6.10, para encontrar el valor  $u^*(k+1)$ .  $u^*(k+1)$  corresponde al primer valor del vector  $u$  utilizado por el modelo de proceso para predecir los valores  $\hat{y}$ . De esta forma el controlador implementa el primero de  $N_c$  cambios que el modelo de proceso ha predicho llevan el sistema a su set point de forma óptima considerando los costos de variación de la variable manipulable y los costos de operar fuera del set point. Finalmente, dicho valor  $u^*(k+1)$  es el que alimentará al proceso en el instante  $k+1$ .

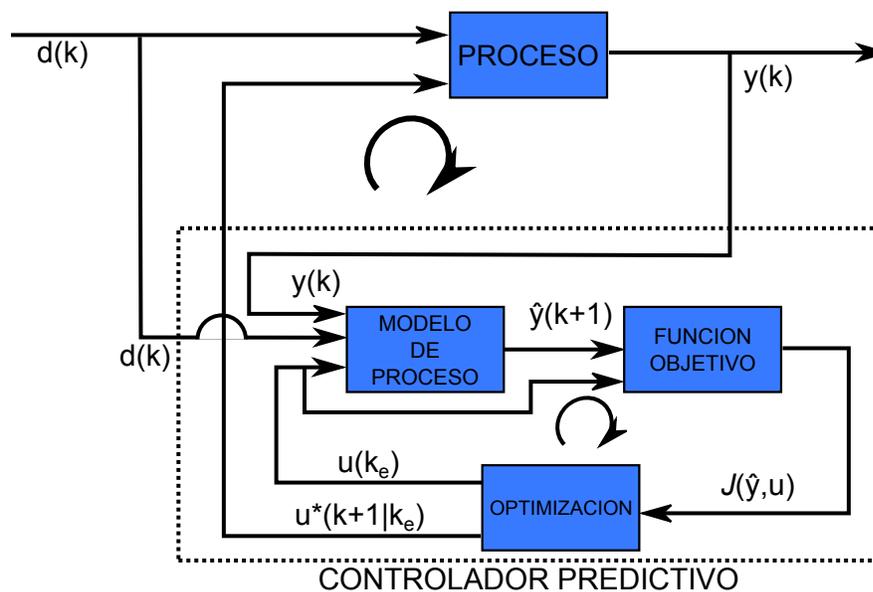


Figura 6.21: Lazo de control con controlador basado en modelo.

A pesar de los numerosos parámetros requeridos ( $N_p$ ,  $N_c$ ,  $\lambda$  y  $Q$ ) para la sintonización del controlador basado en modelo, el elemento más importante del controlador es el modelo de proceso. El modelo de proceso puede variar desde aproximaciones lineales o no lineales de la dinámica del proceso a modelos basados en redes neuronales artificiales [68–71]. La naturaleza y el grado de representatividad que posee el modelo de proceso afecta directamente el rendimiento global del controlador debido a que la capacidad del modelo de proceso de representar el proceso determina la calidad de la predicción a realizarse, lo que incide sobre el valor óptimo obtenido para la variable manipulable. Si bien la variable de salida es medida y dicha medición posteriormente es utilizado

como variable de entrada para el modelo de proceso, se podría considerar que el controlador obtiene el valor óptimo de la variable manipulable  $u^*$  en paralelo con el proceso generándose un lazo de control de aparentemente de retro alimentación pero que en la práctica no es debido a que la variable medida no es comparada directamente con el set point para realizar la decisión de control.

## 6.5.2. Controlador basado en modelo lineal

La utilización de modelos lineales va de la mano con la facilidad de uso, la robustez y la estabilidad que presentan algunos modelos [72]. Sin embargo, algunos métodos de linealización dan como resultado modelos estables dentro de un rango limitado de operación lo que implica un mal rendimiento del controlador cuando se encuentra bajo condiciones de operación que se encuentran fuera de la vecindad estable del modelo [73].

La primera aproximación lineal analizada fue la linealización del modelo metabólico utilizando un modelo lineal con forma de espacio estado. La obtención de un modelo lineal con forma de espacio de estado supone la representación de un modelo no lineal, cuyo planteamiento general es el de la ecuación 6.11 y para la presente tesis es el de la ecuación 6.12, como la forma lineal de la ecuación 6.13 [73].

$$\dot{\vec{x}} = f(\vec{x}) + g(\vec{x}) \cdot \vec{u} \quad (6.11)$$

$$\frac{d\vec{C}}{dt} = \mathbf{S} \cdot r^{\vec{m}ax} f(\vec{C}) - \vec{\tau}(\vec{C}) \cdot (F_e, F_s, C_{glc,e}) \quad (6.12)$$

$$\dot{\vec{C}} = \mathbf{A} \cdot \vec{C} + \mathbf{B} \cdot (F_e, F_s, C_{glc,e}) \quad (6.13)$$

donde las matrices  $\mathbf{A}$  y  $\mathbf{B}$  son obtenidos por medio de la expansión de Taylor truncada para el segundo orden en adelante del lado derecho de la ecuación 6.11, suponiendo variables de desviación con lo que  $f(\vec{C}_s)$  y  $g(\vec{C}_s)$  son iguales a cero.

$$\mathbf{A} = \left. \frac{\partial f(\vec{C})}{\partial \vec{C}} \right|_{\vec{C}_s} \quad (6.14)$$

$$\mathbf{B} = \left. \frac{\partial g(\vec{C})}{\partial \vec{C}} \right|_{\vec{C}_s} \quad (6.15)$$

De esta forma, se tiene que la matriz  $A$  corresponde a una matriz cuadrada igual al jacobiano de la función  $f(\vec{C})$ , cuya estabilidad puede ser analizada por medio del análisis de sus valores propios tal como se hizo en la sección 3.7.

Se realizó un análisis de estabilidad del modelo lineal por medio del análisis de los valores propios mencionado en capítulos anteriores. Los resultados del análisis de los valores propios de la matriz  $A$  indicaron que el estado estacionario del modelo lineal obtenido no es estable debido a que entre los valores propios de la matriz  $A$  hay un valor real positivo, lo que significa un comportamiento oscilatorio creciente de la función frente a cualquier perturbación de las variables de estado desde el estado estacionario.

### Identificación de sistemas lineales

La identificación de sistemas consiste en la construcción de modelos dinámicos lineales y no lineales en base a datos experimentales de las variables de entrada y salida de un sistema. Utilizando series de muestras dinámicas se busca estimar los parámetros de modelos denominados de caja negra, donde se desconoce completamente la relación entre variables de entrada y de salida, y de caja gris donde junto con relaciones dinámicas que se conocen, se buscan estimar un modelo dinámico ajustado a las muestras experimentales [70, 74–76].

Entre las formas lineales más comunes utilizados se encuentran los modelos diferenciales lineales auto-regresivos de entrada exógena (o ARX). Su utilización como modelo de proceso en controladores de modelo basado en modelo se debe a su facilidad de ajuste dado por el carácter convexo del problema de ajuste de los parámetros [72], lo que se ve reflejado en su amplio uso en la industria de la refinera del petróleo [10].

Poseen la forma general discreta de la ecuación 6.16

$$y(t) + a_1 \cdot y(t-1) + \dots + a_n \cdot y(t-n) = b_1 \cdot u(t-1) + \dots + b_m \cdot u(t-m) \quad (6.16)$$

donde  $y(t-i)$ ,  $i = 0, \dots, n$  corresponden a los valores de la variable de salida hasta  $n$  intervalos en el pasado,  $a_j$ ,  $j = 1, \dots, n$  corresponden a los ponderadores de cada valor pasado de la variable de salida,  $u(t-k)$ ,  $k = 1, \dots, m$  son los valores pasados de las variables manipulables hasta  $m$  intervalos en el pasado y  $b_k$  son sus respectivos ponderadores. Dichos ponderadores son los parámetros a estimar por medio de ajustes a datos experimentales utilizando el método de minimización de la suma del error cuadrático. Los modelos diferenciales son aplicables de forma fácil en los contro-

ladores basados en modelos pues al despejar el valor  $y(t)$  se tiene una función de predicción que puede ser utilizada como modelo de proceso.

Para la construcción del lazo de control óptimo de la Figura 6.21 se partió por la parametrización de un modelo lineal obtenido por identificación de sistemas que requirió, tal como se señaló anteriormente, de un conjunto de datos de muestreo para luego realizar el ajuste de los parámetros del modelo ARX.

Previo a la obtención de los datos de muestra se estableció que las variables de manipulables del sistema, de interés para la construcción del modelo lineal, son el coeficiente de dilución y la concentración de glucosa de entrada. Por otra parte, la variable de salida que interesa relacionar con dichas variables manipulables es la razón  $\Delta L/\Delta G$ . Si bien, en estricto rigor, el modelo debiese relacionar dichas variables manipulables con las variables de estado que se utilizan para calcular la razón  $\Delta L/\Delta G$  es mejor utilizar una menor cantidad de variables de manera de estimar la menor cantidad de parámetros posibles para así resolver de mejor manera el problema de optimización que surge por la minimización de la suma de los errores cuadráticos. El exceso de ajuste de parámetros podría entregar malas aproximaciones de alguna de las curvas de variables de estado lo que incidiría directamente en el posterior cálculo de la razón  $\Delta L/\Delta G$ . Así, el proceso de obtención de un modelo de proceso por identificación de sistemas se resume en la Figura 6.22.



Figura 6.22: Esquema de proceso de identificación de sistemas.

De esta manera, el conjunto de datos utilizado para la estimación del modelo fueron los presentados en la Figura 6.23, obtenidos por medio de la simulación durante 3.600 horas de los valores de la razón  $\Delta L/\Delta G$  calculados cada 0,1 [hr]. Se simuló durante 3.600 horas para obtener un conjunto de muestra amplio con gran variabilidad de datos. El uso de un intervalo de 0,1 [hr] para cada toma de datos fue para lograr una discretización cercano a operar con un muestreo con tiempos muertos bajos.

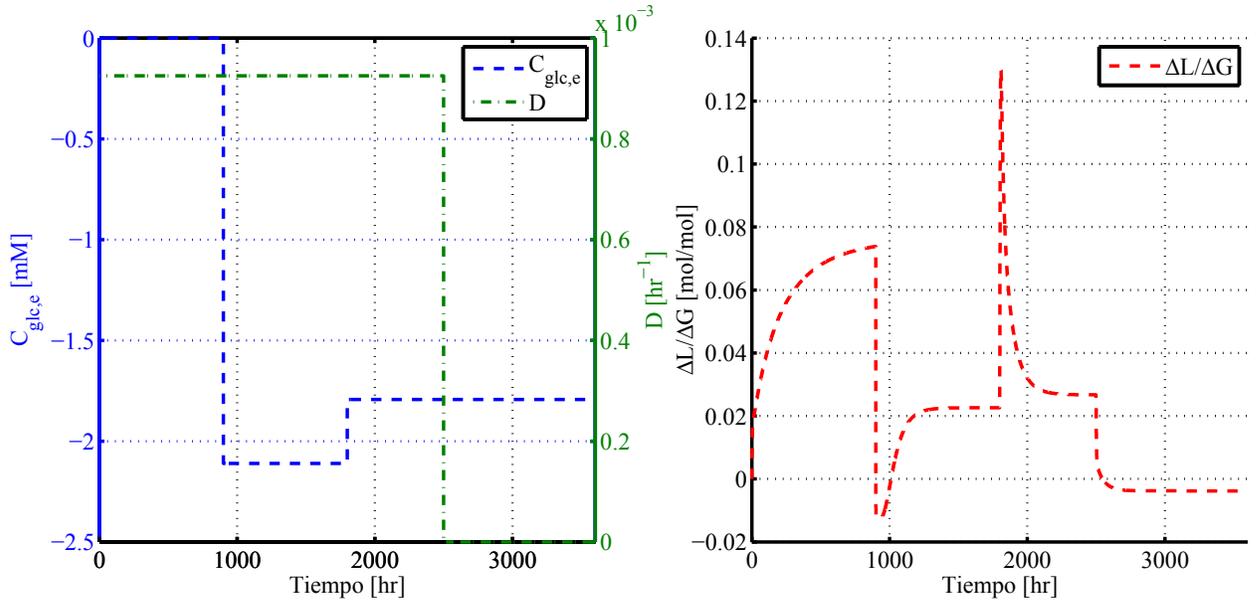


Figura 6.23: Muestreo utilizado para la estimación de modelo ARX (variables de desviación).

Los datos de la Figura 6.23 se encuentran en variables desviación y las perturbaciones sucesivas que se presentan se escogieron para que el conjunto de muestra comprendiera patrones dinámicos significativos para un modelo de proceso como son mantener un valor del coeficiente de dilución positivo y los efectos que produce una variación en la concentración de glucosa (que se observa en los primeros tres patrones, de 0 a 2500 horas), y la respuesta del sistema frente a variaciones del coeficiente de dilución manteniendo constante la concentración de glucosa de entrada (patrones entre las 1.800 y las 3.600 horas). Además, la duración de los patrones contempla que el sistema llegue al estado estacionario bajo las condiciones impuestas en cada tramo.

Los parámetros de construcción,  $n$  y  $m$ , del modelo ARX fueron escogidos como  $n = 1$ ,  $m = 1$  y se consideraron los vectores  $\vec{x}$  y  $\vec{u}$  igual a  $(\Delta L/\Delta G)$  y  $(C_{glc,e}, D)$ , respectivamente. Valores de  $n$  y  $m$  mayores a 1 orientan el modelo a darle mayor énfasis a los valores históricos de las variables medidas y las variables manipulables pero el objetivo del planteamiento con  $n = 1$  y  $m = 1$  es para que el modelo de proceso capte correctamente el efecto inmediato sobre  $\Delta L/\Delta G$  de variaciones en  $C_{glc,e}$  y  $D$ . De esta forma, el modelo de proceso será un modelo lineal simple que describe el valor de  $\Delta L/\Delta G(t)$  como una función dependiente de los valores de  $\Delta L/\Delta G(t-1)$ ,  $C_{glc,e}(t-1)$  y  $D(t-1)$  de la siguiente forma:

$$\Delta L/\Delta G(t) = (b_{1,1}, b_{1,2}) \cdot (C_{glc,e}(t-1), D(t-1))^T - a_1 \cdot \Delta L/\Delta G(t-1) \quad (6.17)$$

Los parámetros  $b_{1,1}$ ,  $b_{1,2}$  y  $a_1$  fueron obtenidos por el ajuste por medio de minimización de la suma del error cuadrático de ajuste a los datos de la Figura 6.23 de manera de resultar lo siguiente:

$$\Delta L/\Delta G(t) = (4,318 \cdot 10^{-6}, 0,0187) \cdot (C_{glc,e}(t-1), D(t-1))^T + 1 \cdot \Delta L/\Delta G(t-1) \quad (6.18)$$

La función de la ecuación 6.18 se ajusta con un error cuadrático medio de  $5,419 \cdot 10^{-8}$  y con un coeficiente de correlación  $R = 0,666$  a los datos de muestra. Un gráfico comparativo de los resultados de la simulación con el modelo ARX de la ecuación 6.18 se presenta en la Figura 6.24.

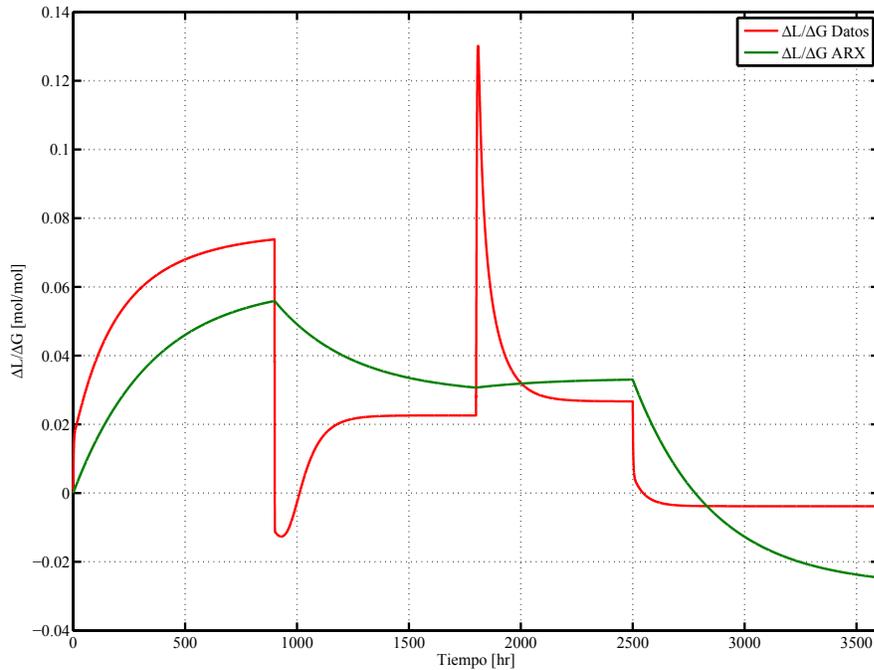


Figura 6.24: Comparación de simulación de  $\Delta L/\Delta G$  con modelo ARX y muestreo.

### Diseño de controlador basado en modelo lineal

Con la estimación del modelo lineal se procedió a la simulación del sistema con el lazo de control óptimo para lo cual se sintonizaron los parámetros del controlador que incluyen el horizonte de predicción  $N_p$ , el número de movimientos de control  $N_c$ , el costo por manipulación de variable de entrada  $\lambda$ , el peso del error del set point y la predicción  $Q$  y el tamaño del intervalo de muestreo  $T_s$ .

El ajuste de parámetros de un controlador basado en modelo no tiene una base establecida y existen numerosas técnicas, tales como fijar el horizonte de predicción  $N_p$ , la cantidad de variaciones de la variable manipulable  $N_c$ , los vectores de ponderación  $\lambda$  y  $Q$ , en función del tiempo

requerido para alcanzar un 60 %, un 80 %, un 90 % o un 95 % del estado estacionario del sistema, el tiempo de muestreo  $T_s$ , el tiempo de subida del proceso y/o las restricciones sobre las variables manipulables o de salida, cuya mayoría conlinda con la heurística [77]. Es por esto que se optó por seguir algunas líneas generales de sintonización de parámetros para fijar la mayor cantidad de parámetros posibles. El valor de  $T_s = 0,1 [hr]$  fue fijado con la construcción del modelo ARX, se podría utilizar un tiempo de muestreo mayor y proporcional a  $T_s$  pero la discretización tiene un intervalo discreto de 0,1 horas por lo que habría que obviar la dinámica que ocurre entre cada intervalo. El parámetro  $Q$  es un parámetro relevante cuando el objetivo de control busca dar mayor énfasis a determinados valores de salida que, cuando se tiene una única salida, puede ser el valor de salida en un tiempo determinado o, cuando se presentan más de una variable medida, puede ser una de las variables de salida consideradas. También puede servir, al igual que el vector  $\lambda$  para escalar la magnitud de una parte de la función objetivo con respecto a la otra. Debido a los valores que se espera que adopte  $\Delta L/\Delta G$ , no es necesario un escalamiento de dichos valores ni se requiere de una mayor relevancia de un tramo del horizonte de predicción, es por lo anterior que se mantuvo  $Q = \vec{1}$ .

$N_p$  y  $N_c$  podrían considerarse los parámetros más difíciles de ajustar debido a que no son parámetros que se pueden ajustar de manera independiente. Por razones obvias,  $N_c$  debe ser menor que  $N_p/T_s$ , es decir que no se puede realizar un número de movimientos de la variable manipulable de manera de superar el horizonte de predicción. De la literatura, el valor predeterminado de  $N_c$  es 1 debido a que se logra una acción de control menos agresiva y se ahorran recursos computacionales de manera significativa [78–82]. El horizonte de predicción  $N_p$  es el parámetro que designa la ventana de tiempo en el cual se espera que el controlador induzca una respuesta deseada sobre las salidas del proceso [77]. A nivel de laboratorio, cuando no existe un lazo de control automático para la concentración de glucosa, se llevan a cabo modificaciones de las variables de entrada y su respuesta comúnmente se analiza y se espera ver un cambio luego de 8 horas de operación y es por esto que se fijó  $N_p$  en 8 horas. La complejidad de elección del horizonte de predicción  $N_p$  yace en que un valor muy pequeño puede generar problemas de estabilidad del controlador mientras que valores muy altos repercuten en la acción de control generándose menor rendimiento [80]. Es por esto que se fijó un valor de  $N_p$  igual a 8 horas como planteamiento inicial para luego analizar y discutir la respuesta de control generada.

Con lo anterior se redujo el número de parámetros a ajustar a uno solo que es el costo de manipulación por de variable de entrada,  $\lambda$ , el cual fue ajustado minimizando el ITAE por un

intervalo de 40 horas utilizando el método simplex de Nelder-Mead [32]. Así, el valor de  $\lambda$  óptimo fue 0,016 que fue corroborado por medio de la comparación de la Tabla 6.4.

Tabla 6.4: Valores de ITAE para diferentes valores de  $\lambda$ . \*valor óptimo obtenido.

$\lambda$	ITAE
1	589,4
0,1	122,3
0,01	13,8
0,016*	10,3
0,001	19,3
0,0001	19,5

Los valores de ITAE de la Tabla 6.4 muestran que frente a cambios en la magnitud del parámetro  $\lambda$  varía significativamente el rendimiento del controlador. Los cambios más notorios son al aumentar  $\lambda$  en un orden de magnitud con lo que aumenta en un orden de magnitud también el valor del ITAE. Es muy probable que dicha variación sea producto de que un aumento de  $\lambda$  genera un aumento del costo de variación de la variable manipulable, al nivel de que es óptimo variar en menor grado la variable manipulable lo que genera una acción de control insuficiente. De otra forma, el aumento de  $\lambda$  genera una diferencia de órdenes de magnitud cuando se compara el primer sumando de la función objetivo ( $\sum_{k=1}^{N_c} \Delta u_k$ ) con el segundo ( $\sum_{k=1}^{N_p} \Delta \hat{y}_k \cdot Q \cdot \Delta \hat{y}_k$ ) por lo que la optimización se reduce a optimizar con mayor énfasis en el primer sumando. Lo anterior se ve claramente reflejado al comparar la respuesta simulada de lazo cerrado para  $\lambda = 0,0158$  y  $\lambda = 0,1$ , que se muestran en las Figuras 6.25 y 6.26, respectivamente.

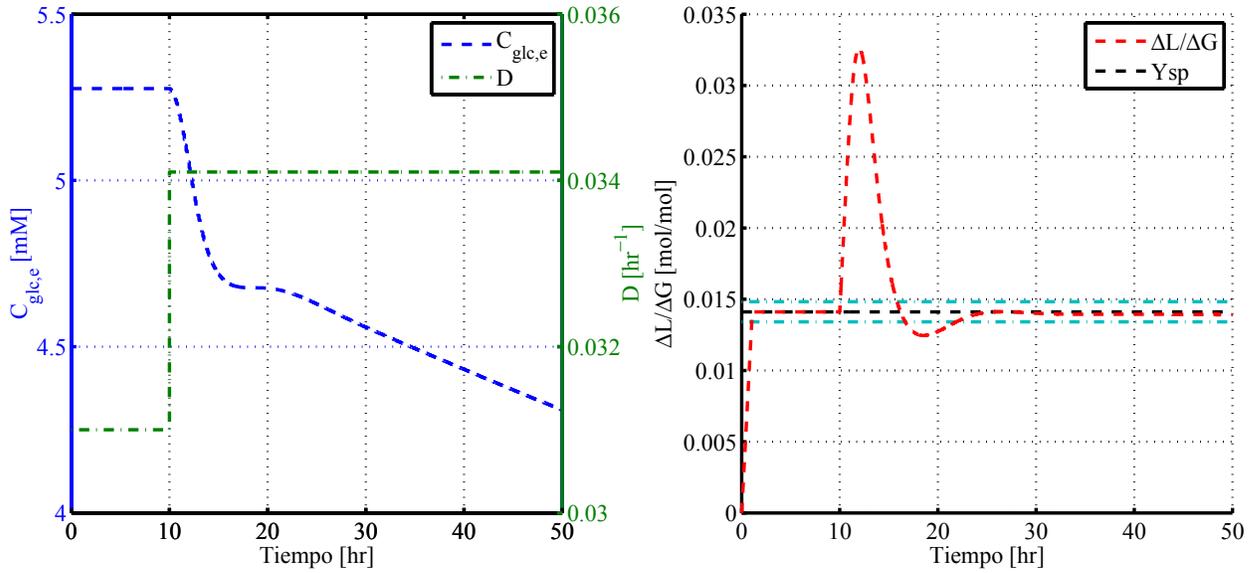


Figura 6.25: Respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular abierto. ---: set point  $\pm 5\%$  de set point.

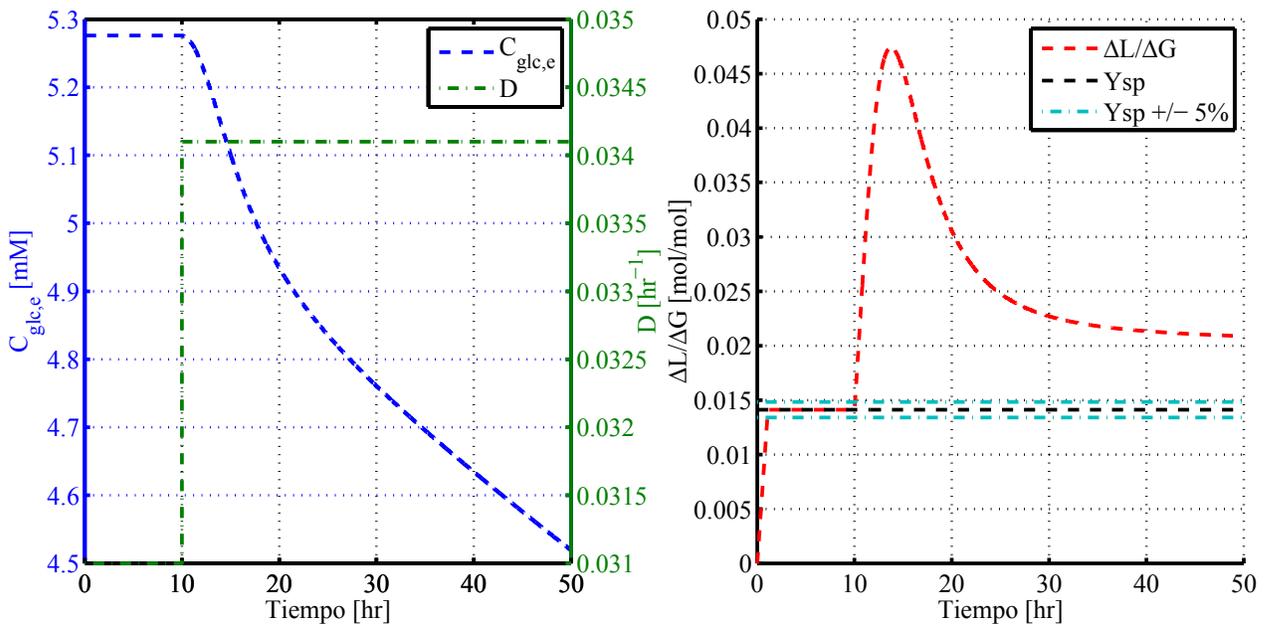


Figura 6.26: Respuesta del sistema con  $\lambda = 0,1$  frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular abierto. ---: set point  $\pm 5\%$  de set point.

Se simuló la respuesta de lazo cerrado para el mismo intervalo de tiempo utilizado para el controlador P. El lazo de control sometió la variable manipulable a cambios cada 0,1 horas por medio de la minimización de la ecuación 6.10, el cual se realizó utilizando un algoritmo de programación

cuadrática secuencial y sujeto a restricciones sobre el valor de la concentración de glucosa [83]. Las restricciones establecidas fueron un mínimo de 0 y un máximo de 2800 [mM], que corresponde a la concentración de saturación de la glucosa en agua a 25 °C [84].

La respuesta de lazo cerrado sin el lazo de control de crecimiento celular presenta una oscilación leve con un período de oscilación de aproximadamente 15 horas, un overshoot de casi 2,2 producto de la alta amplitud de la primera oscilación que se puede observar que se encuentra a aproximadamente 3,3 [mol/mol] del set point estipulado.

Los resultados de la simulación de la respuesta del lazo de control óptimo hasta alcanzar su estado estacionario son las curvas de las Figuras 6.27 y 6.28, y la repuesta con la inclusión del lazo de control del coeficiente de dilución se muestra en la Figura 6.29.

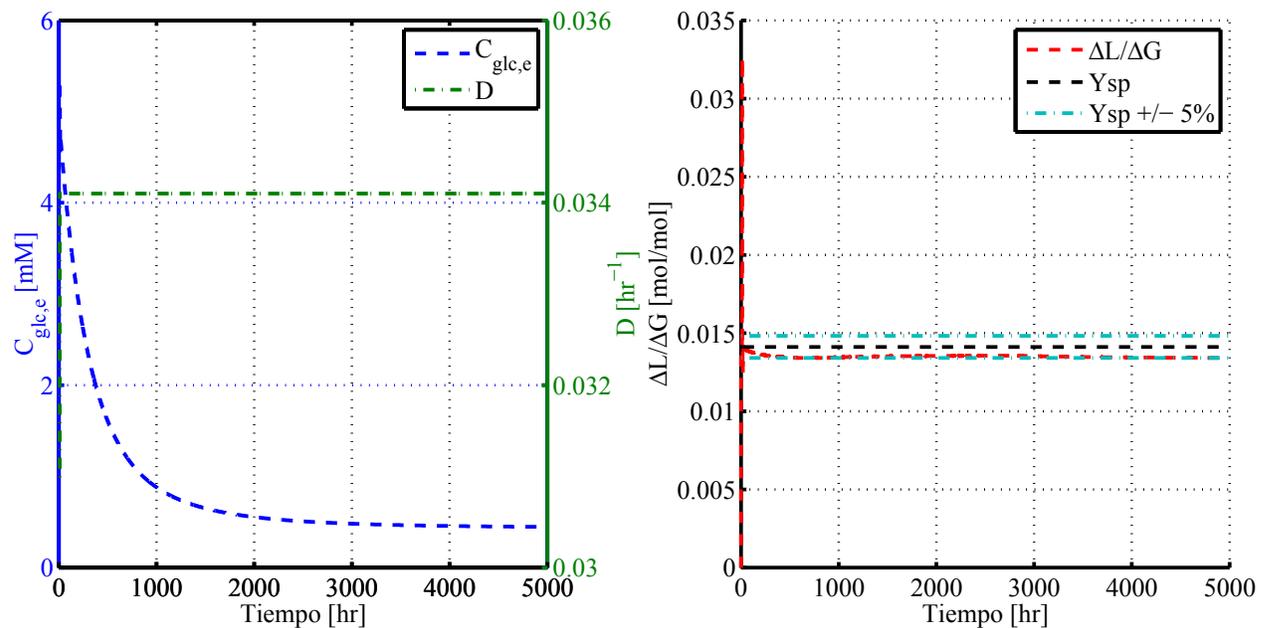


Figura 6.27: Respuesta del sistema frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular abierto.

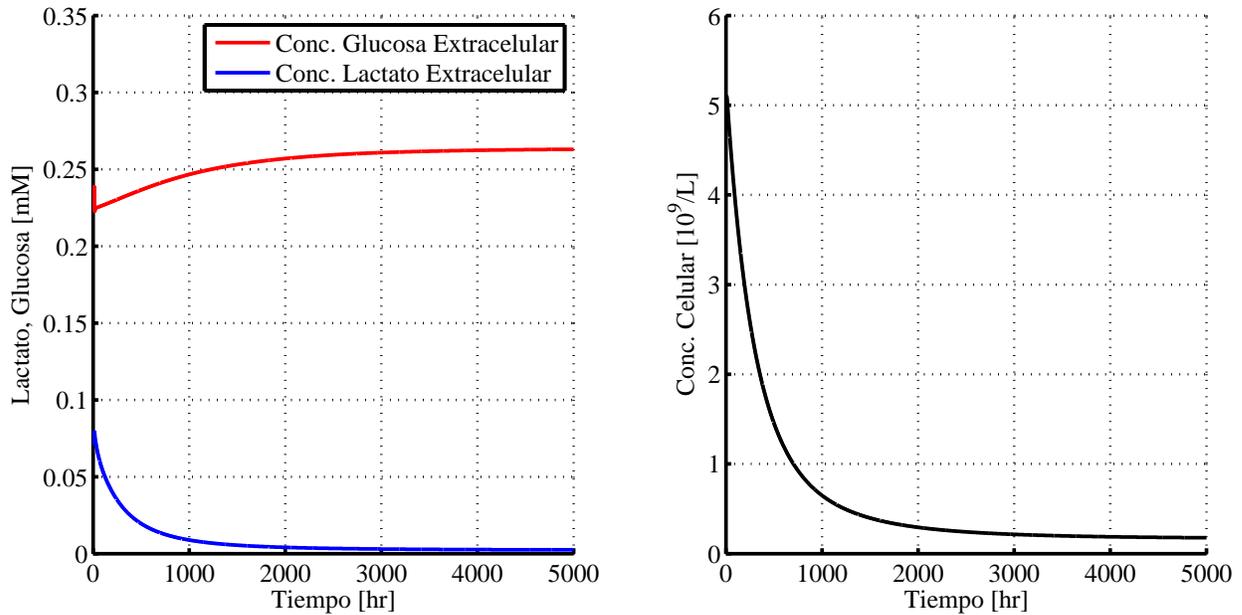


Figura 6.28: Concentraciones de glucosa y lactato extracelular y concentración celular simulada para la respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada.

Se tiene para la simulación del estado estacionario con el lazo de control cerrado que se tiene un offset de un 5% del set point y, como también se observó para el caso del controlador proporcional, se genera una acumulación de glucosa extra-celular y un lavado de las células y del lactato presentes en el bio-reactor producto de una leve acumulación de la glucosa residual.

Por otra parte, en la Figura 6.29 se observa una respuesta mucho más oscilatoria cuyo período de oscilación ronda las 13 horas y cuya amplitud máxima de oscilación alcanza los 0,43 [ $mol/mol$ ] al utilizar como referencia el set point. Se puede notar también que la oscilación de la respuesta de la Figura 6.29 es decreciente.

Al comparar la respuesta de la Figura 6.29 con la respuesta de la Figura 6.25 se observa la clara influencia del lazo de control de crecimiento celular al que se le puede asociar el aumento de la calidad oscilatoria de la respuesta de lazo cerrado y, por lo mismo, se requiere de un nuevo ajuste del parámetro  $\lambda$ .

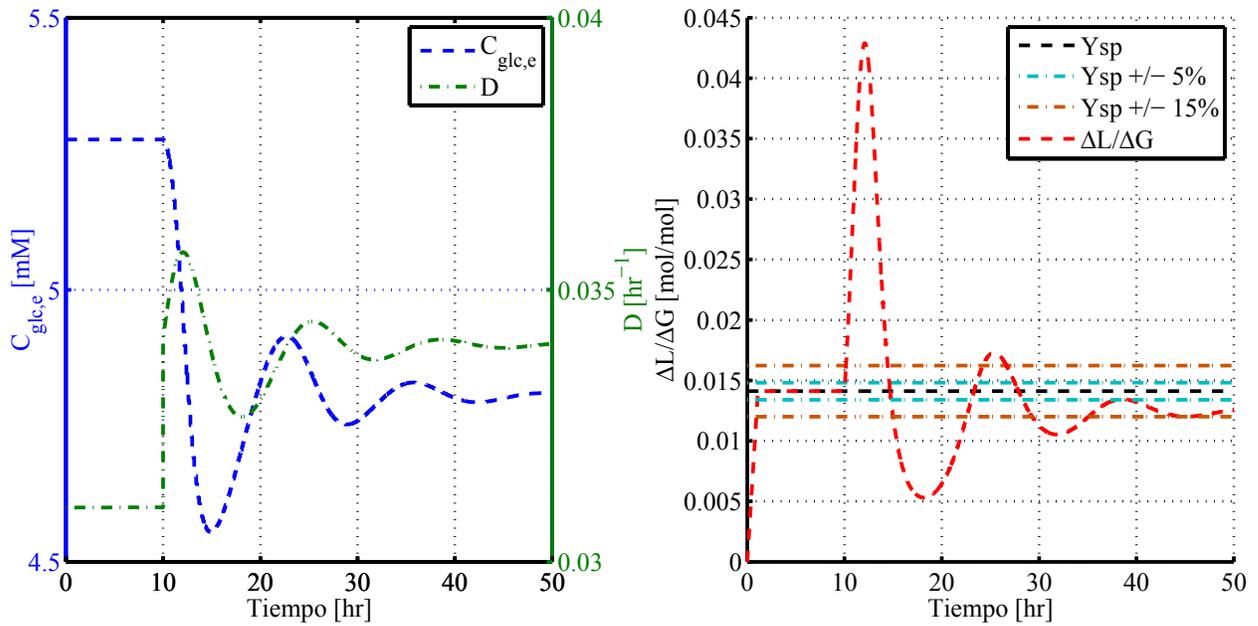


Figura 6.29: Respuesta del sistema frente a un escalón de un 10% de la tasa de crecimiento celular máxima,  $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

Se ajustó nuevamente el parámetro  $\lambda$  por medio de minimización del ITAE. El resultado obtenido fue  $3,93 \cdot 10^{-5}$  y se comparó también con valores logarítmicos cercanos para verificar que no constituyera un mínimo local del ITAE. Los resultados de la simulación de la respuesta optimizada del sistema con todos los lazos cerrados se encuentran en la Figura 6.30.

Tabla 6.5: Valores de ITAE para diferentes valores de  $\lambda$ . \*valor óptimo obtenido.

$\lambda$	ITAE
1	533,6
0,1	90,6
0,016	37,2
0,001	21,6
0,0001	20,1
$3,93 \cdot 10^{-5}$ *	20
$1 \cdot 10^{-5}$	68,5
$1 \cdot 10^{-6}$	844,8

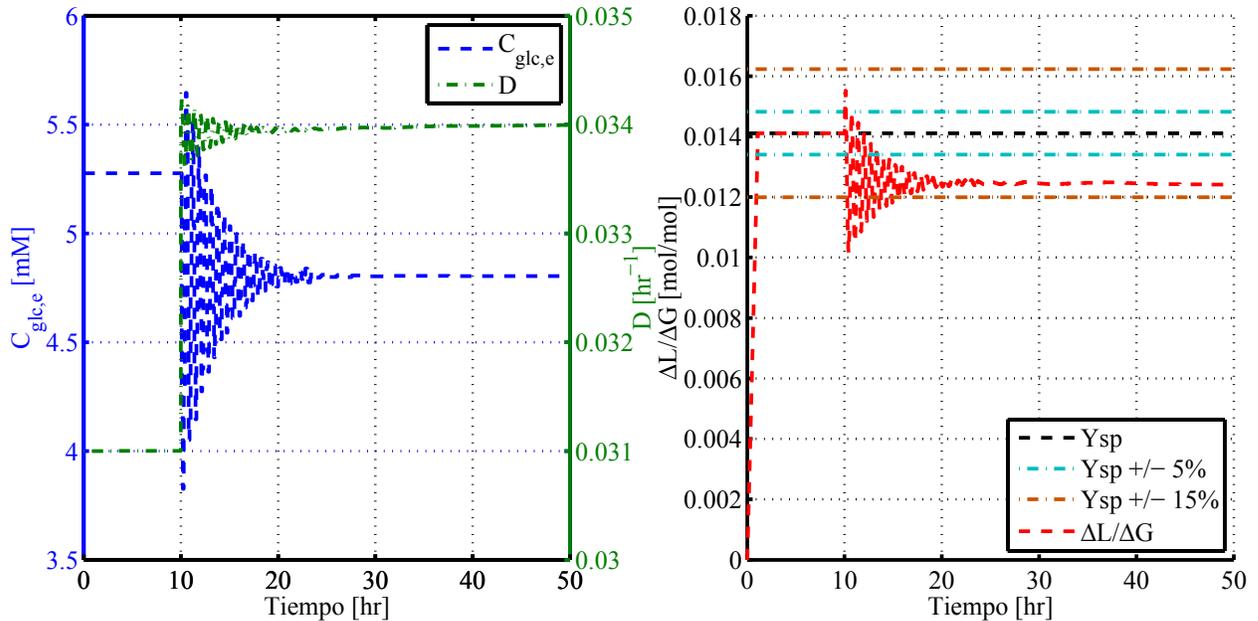


Figura 6.30: Respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% del parámetro  $\mu_{max}$  con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

Al comparar la nueva respuesta de la Figura 6.30 con la respuesta no óptima de la Figura 6.30 se observan cambios drásticos, principalmente a nivel de frecuencia de oscilación. Se tiene una reducción del período de oscilación de aproximadamente 15 horas a cerca de 1 hora lo que significa una reducción de casi un 93% que se puede notar a simple vista. Además de la respuesta con mayor frecuencia de oscilación, la respuesta de lazo cerrado posee una menor amplitud máxima de oscilación lo que demuestra una acción de control más agresiva que es probable que se deba a una mayor importancia del costo de operar fuera del set point debido a una reducción del costo de modificación de la variable manipulable producto de la reducción de  $\lambda$  de 0,016 a  $3,93 \cdot 10^{-5}$ .

Por otra parte, la nueva respuesta optimizada posee una diferencia con el set point de aproximadamente un 12%. La existencia del offset se debe a que el modelo de proceso del controlador basado en modelo depende de las variables manipulables ( $D$  y  $C_{glc,e}$ ) y de la variable de salida ( $\Delta L/\Delta G$ ). No se consideró el valor del parámetro  $\mu_{max}$  para el modelo debido a que es considerada una perturbación no medible y sería poco práctico ajustar un modelo a partir de una variable que no se podría medir en línea en el proceso. El efecto de la perturbación constante sobre la respuesta de lazo cerrado se puede constatar con la comparación de las Figuras 6.31 y 6.32; una variación del set point genera un offset muy leve y la perturbación seguida de  $\mu_{max}$  genera el offset observado en la Figura 6.30, y la variación del set point con una previa perturbación de  $\mu_{max}$  si posee offset.

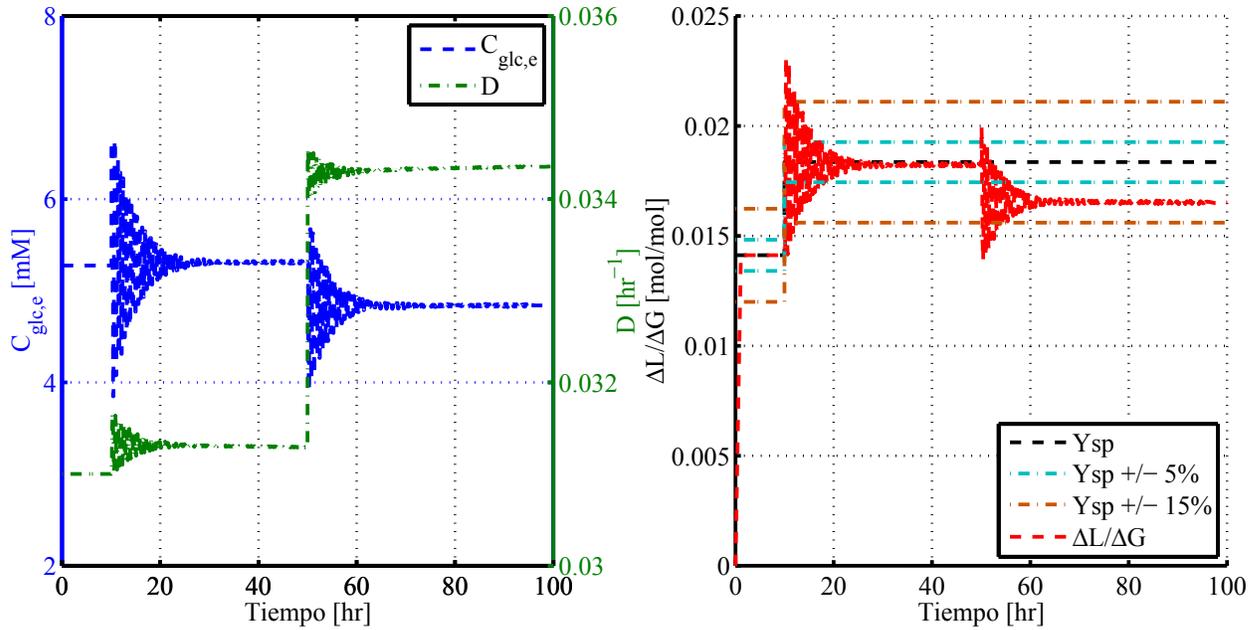


Figura 6.31: Respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 30% del offset seguido por un escalón de un 10% del parámetro  $\mu_{max}$  con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

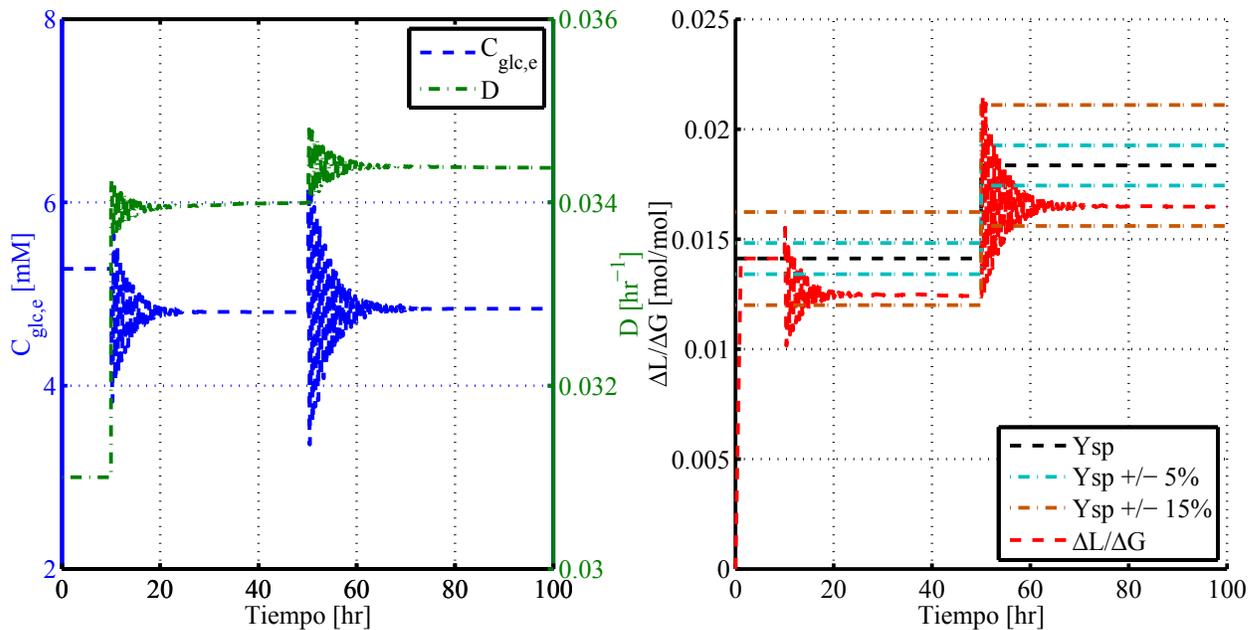


Figura 6.32: Respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% del parámetro  $\mu_{max}$  seguido por un escalón de un 10% del offset con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

### **6.5.3. Controlador basado en modelo no lineal**

Tal como se planteó en la descripción del controlador óptimo, el modelo de proceso puede ser una aproximación no lineal de la dinámica del proceso. Las aproximaciones no lineales incluyen modelos no lineales contruidos como conjuntos de modelos localmente lineales que poseen una función de distribución gaussiana como el planteado en el algoritmo LoLiMoT [65, 85], modelos no lineales autoregresivos de entrada exógena (NLARX) como las redes neuronales artificiales contruidos por medio de la identificación de sistemas en donde se utiliza la relación de mediciones de variables de entrada y de salida para ajustar una función de activación no lineal [86–89], y modelos no lineales autoregresivos de promedio variable y de entrada exógena (NARMAX), que poseen la forma de los modelos NLARX pero adiciona parámetros de ajuste para modelar mejor el efecto de ruidos y perturbaciones no medibles [76, 90].

La aplicación de técnicas de control basado en modelos no lineales incluye, entre otros, el control de procesos de polimerización [68], de formación de cristales [91], y especial énfasis ha habido en bio-procesos como el control de producción de biomasa [92], producción de penicilina [65], del proceso de fermentación de etanol para biocombustibles [57] y de producción de lipasa [64].

#### **Redes neuronales artificiales**

Dentro de los modelos comúnmente utilizados como modelos de proceso no lineal se encuentran las redes neuronales artificiales. La utilización reportada de redes neuronales en procesos biotecnológicos incluye el control de un bio-reactor para la fermentación de levadura [66, 93] y el control de un foto bio-reactor para algas [94].

Las redes neuronales artificiales son estructuras de procesamiento de señales cuya estructura básica tiene un número determinado de entradas, al menos una capa oculta donde el valor de las variables de entrada sirve de entrada para una función de activación no lineal, y una capa de salida en donde la información de las salidas de la capa de transferencia es alimentada a una función de distribución para obtener el valor de una o más variables de salida de la red neuronal completa. Cada capa, oculta y de salida, tiene un número determinado de nodos o neuronas que procesan un número determinado de valores de entrada. Un diagrama explicativo de la estructura básica de una red neuronal con su procesamiento se presenta en la Figura 6.33.

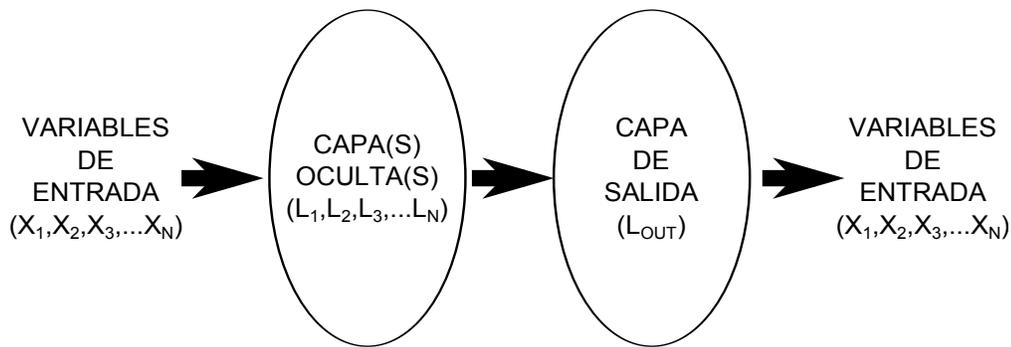


Figura 6.33: Estructura básica de una red neuronal.

Dependiendo del tipo de arquitectura las redes pueden catalogarse dentro de diferentes categorías:

- **Perceptrón multi-capas:** El perceptrón es la forma más básica de red neuronal cuyo modelo consiste en una serie de neuronas que poseen un peso de entrada y un sesgo. El peso de entrada es para dar una ponderación específica a cada entrada a la neurona y el sesgo es un valor constante que busca corregir cualquier offset con respecto al valor objetivo de salida. La característica principal del perceptrón multi-capas es que el flujo de información es secuencial, es decir que las entradas solamente se conectan con la primera capa oculta y las salidas de dicha capa oculta se conectan únicamente con una siguiente capa oculta o la capa de salida de manera que no existen flujos de información desviados directamente a una capa posterior. En la Figura 6.34 se muestra la estructura general de una red multi-capas perceptrón.
- **Perceptrón multi-capas ligada:** Tiene la misma estructura básica que el perceptrón multi-capas pero existe la posibilidad de que algunos flujos de información entren directamente a capas posteriores, sin la necesidad de pasar por la capa inmediatamente siguiente. La Figura 6.35 muestra una red perceptrón multi-capas ligada en donde se agregan las líneas punteadas que van desde las variables de entrada hacia la capa de salida directamente.
- **Red cascada completamente conectada:** El flujo en cascada de la información en la red cascada completamente conectada hace pasar la información de entrada al total de neuronas de la red y, además, cada salida de neurona es entrada de la neuronas siguientes. De manera gráfica, una red cascada completamente conectada se presenta en la Figura 6.36.

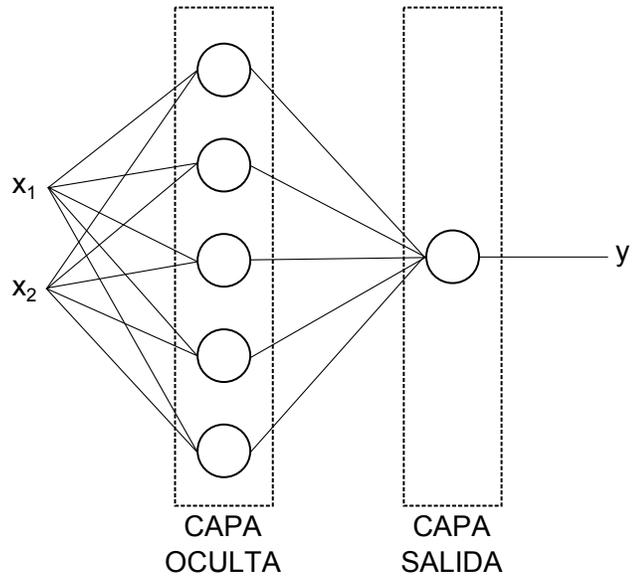


Figura 6.34: Red perceptrón multi-capa.

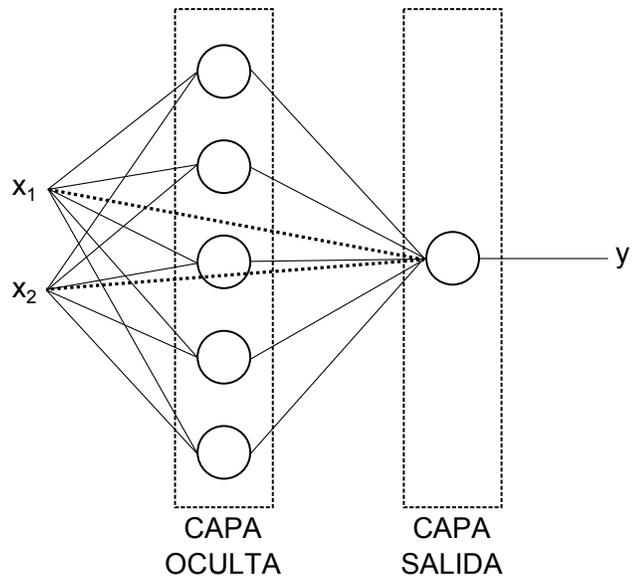


Figura 6.35: Red perceptrón multi-capa ligada.

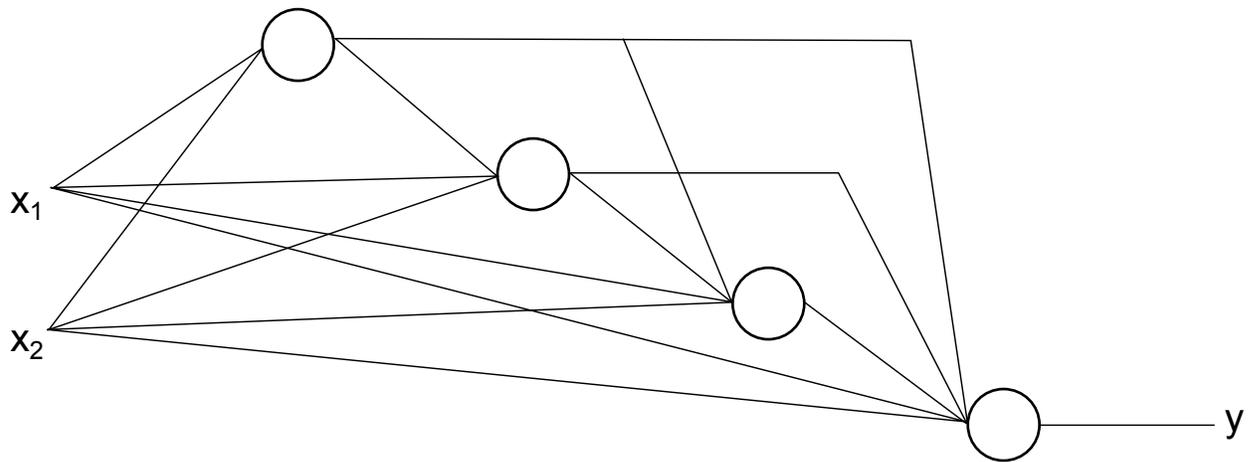


Figura 6.36: Red cascada completamente conectada.

Cada neurona ya sea de capa oculta o de la capa de salida posee una función de activación  $f$  que recibe la información de entrada  $\vec{x}$  ponderada por su peso  $\vec{w}$  y sumada a su sesgo  $\vec{b}$  de manera que la salida  $y = f(\vec{w} \cdot \vec{x} + \vec{b})$ .

El ajuste de los parámetros  $w$  y  $b$  de cada neurona es por medio de la misma identificación de sistemas descrita anteriormente en donde los valores de salida de la red son comparados con las salidas deseadas por medio de criterios de ajuste como el error cuadrático medio de la ecuación 5.2.

A pesar de presentar una metodología de ajuste muy similar al utilizado para ajustar el modelo ARX lineal de la sección anterior, las redes neuronales poseen una estructura más compleja lo que requiere de criterios de selección de la arquitectura de la red y también de la forma en que se ajustan los parámetros denominado “entrenamiento” de la red.

En primer lugar, el entrenamiento de una red neuronal está expuesto a someterse a lo que denomina un error de generalización en donde, debido al sobre ajuste de los parámetros de la red, la red es capaz únicamente de retratar la dinámica impuesta por los datos utilizados para la identificación de sistema y responde de manera pobre ante conjuntos de datos de origen independiente. Para evitar lo anterior es que se plantea la división del conjunto de muestra en tres grupos, un conjunto de entrenamiento con el cual se ajustan los parámetros, un conjunto de validación con el cuál se establece un rendimiento de la red frente a un conjunto de datos independientes y un conjunto de prueba que se utiliza para evaluar la red obtenida en algunos métodos de diseño de arquitectura. A fin de evitar el error de generalización se entrena la red hasta que el error de validación alcance un mínimo lo que coincide con el denominado el error mínimo de validación cruzada [69].

Usualmente se utiliza un gran conjunto de datos y se designa un porcentaje fijo para el tamaño de cada conjunto y se escogen de manera aleatoria las muestras hasta completar el porcentaje designado.

Por otra parte, la elección de la topología o arquitectura óptima lleva a otro problema de diseño. Si bien la minimización del error de validación cruzada permite obtener el ajuste óptimo para una determinada estructura de red neuronal, que dicha estructura contenga además un número óptimo de neuronas y de capas ocultas requiere de criterios de diseño adicionales.

Un método utilizado para la encontrar la arquitectura óptima de una red neuronal es el método OMP que entrega reglas heurísticas para calcular la cantidad máxima de capas ocultas y de neuronas que puede tener cada capa, como también un índice de comparación para establecer la topología óptima de red [88, 95].

El método OMP indica que el número de pesos de la red  $N_w$  debe cumplir con la siguiente relación

$$N_w \leq \frac{1}{10} \cdot N_t \cdot O$$

donde  $N_t$  es el tamaño del conjunto de entrenamiento (número de muestras) y  $O$  es el número de variables de salida de la red neuronal. Por otra parte, el número de pesos para una capa oculta es igual a:

$$N_w = I \cdot N_n + O \cdot N_n$$

donde  $N_n$  es el número de neuronas de la capa oculta e  $I$  es el número de variables de entrada de la red.

En cuánto al número de capas ocultas, de acuerdo al método OMP no pueden superar el número de variable de entrada y además se plantea la siguiente relación entre capas:

$$N_n^i \geq 3 \cdot N_n^{i+1}$$

donde  $N_n^i$  corresponde al número de neuronas de la capa oculta  $i$ .

Además de las reglas relacionadas con la construcción de la red neuronal, se establece un índice de rendimiento para comparar la variedad de posibilidades de arquitectura que se presenta en la

ecuación 6.19.

$$I_{rend} = R - (\min_{MSE^{cv}} + NMSE^{Prueba}) \quad (6.19)$$

donde  $I_{rend}$  es el índice de rendimiento de la red neuronal,  $R$  corresponde a la constante de correlación lineal entre las variables de salida medidas y las simuladas por la red,  $\min_{MSE^{cv}}$  es el error mínimo de validación cruzada y  $NMSE^{Prueba}$  es el error cuadrático medio normalizado del conjunto de prueba que se calcula mediante la ecuación 6.20.

$$NMSE^{Prueba} = \frac{MSE^{Prueba}}{Var(O)} \quad (6.20)$$

### Estimación de modelo no lineal

En la Tabla 6.6 se presenta un resumen con los parámetros a utilizar para la búsqueda de la arquitectura óptima de red y en la Figura 6.37 se presenta un diagrama con las variables y las capas que formarían parte de la red óptima.

Tabla 6.6: Parámetros de construcción de redes neuronales.

Nombre Parámetro	Valor
Número de Entradas	3 ( $C_{glc,e}(t-1)$ , $D(t-1)$ y $\Delta L/\Delta G(t-1)$ )
Tamaño Vector de Entrenamiento	7.140
Número de Salidas	1 ( $\Delta L/\Delta G(t)$ )
Número de Capas Ocultas	1 o 2
Número Máximo de Neuronas Primera Capa	178
Número Máximo de Neuronas Segunda Capa	59

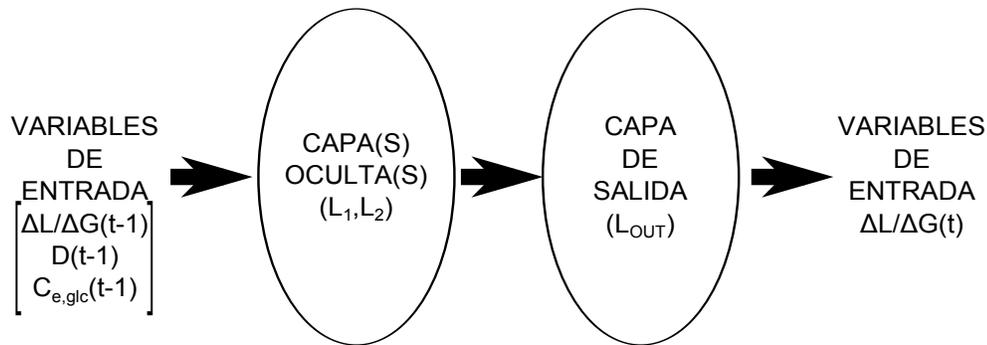


Figura 6.37: Estructura básica de la red neuronal a construir.

La forma de encontrar la arquitectura óptima fue creando diversas arquitecturas utilizando las

restricciones de la Tabla 6.6 y comparándolas. Los datos utilizados para el entrenamiento, validación y prueba de la red neuronal se presentan en la Figura 6.38 y la forma de construcción del conjunto de datos fue simulando patrones de una duración de 45 horas (tiempo requerido para alcanzar un 95 % del estado estacionario) durante 1200 horas, para luego escalar los resultados a fin de que todos tuvieran una magnitud similar. El escalamiento fue debido a que se ha observado que el aprendizaje de una red neuronal empeora cuando el conjunto de datos no es de magnitud similar [88]. El entrenamiento se realizó utilizando el algoritmo de Levenberg-Marquardt que es un tipo de retropropagación que es de uso común en el entrenamiento de redes neuronales [96] y el valor  $\Delta L/\Delta G(t-1)$  se obtuvo por retro-alimentación considerando una estructura en serie y paralela que permitió un planteamiento de alimentación anticipada (feedforward) [97].

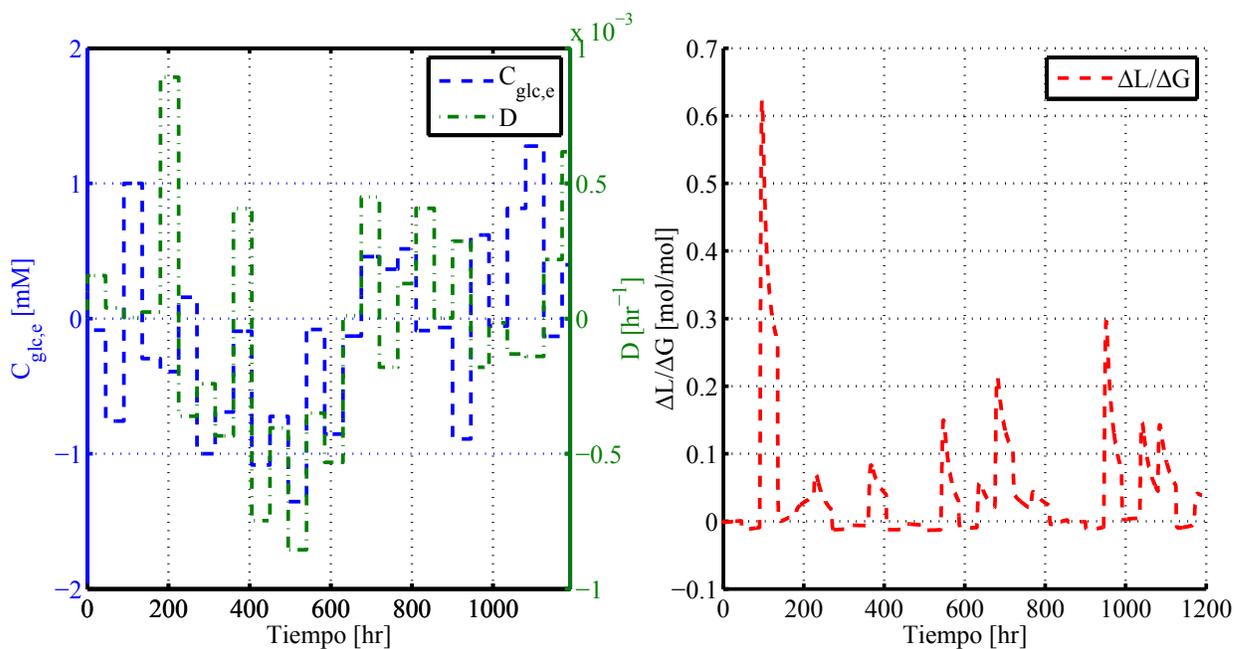


Figura 6.38: Conjunto de datos utilizados para la identificación de sistemas con red neuronal (datos no escalados).

Los resultados del índice de rendimiento de algunas arquitecturas se presentan en la Tablas 6.7 y 6.8, y la simulación de los datos de entrenamiento con la red de 24 neuronas, cuyo rendimiento fue el mejor, se muestra en la Figura 6.39.

Tabla 6.7: Rendimiento de algunas redes neuronales de una única capa oculta.

Número de Neuronas de Primera Capa	$I_{rend}$
4	0,9963
<b>24</b>	<b>0,9964</b>
56	0,9962
80	0,996
164	0,982

Tabla 6.8: Rendimiento de algunas redes neuronales con dos capas ocultas.

Número de Neuronas de Primera Capa	Número de Neuronas de Segunda Capa	$I_{rend}$
12	4	0,9963
117	14	0,9962
117	24	0,9961
162	24	0,9945

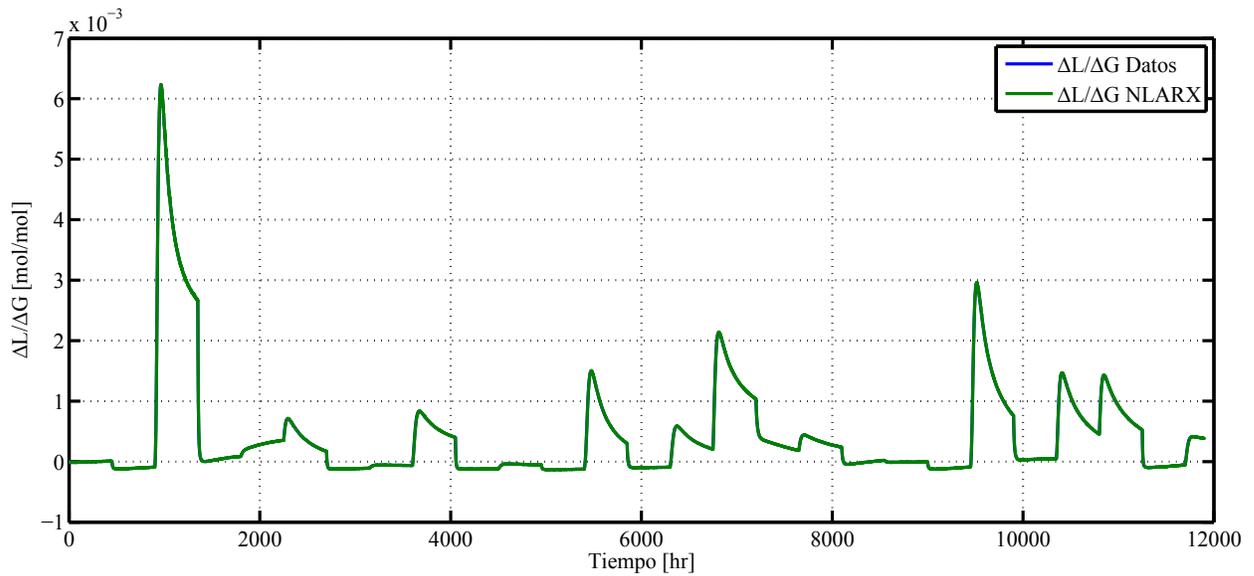


Figura 6.39: Simulación de conjunto de muestra utilizado para el entrenamiento de la red neuronal óptima con red neuronal de 1 capa oculta con 24 neuronas (datos escalados).

Se observa de los resultados presentados en las Tablas 6.7 y 6.8 que capas de menor número de neuronas tienen un mayor  $I_{rend}$  lo que coincide con que, a mayor complejidad de una red, es más fácil para ésta incurrir en errores de generalización [98]. Lo mismo es aplicable en las redes de dos capas ocultas, aunque con el efecto específico de que a mayor número de neuronas en la primera capa oculta hay una baja en  $I_{rend}$ , al igual que para un aumento en la segunda capa.

Finalmente, la red óptima resultante tiene la forma presentada en la Figura 6.40.

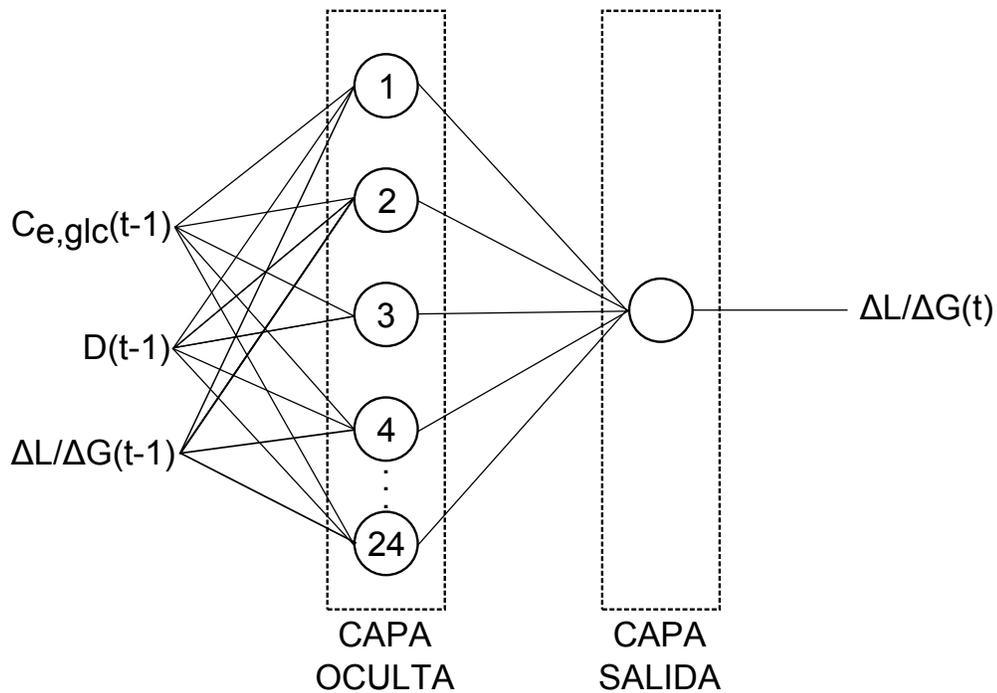


Figura 6.40: Estructura de la red neuronal óptima.

### Diseño de controlador basado en modelo no lineal

Con la red definida se procedió a la simulación del lazo de control óptimo. La metodología de diseño utilizado fue el mismo que para el caso del control óptimo lineal de manera que el ajuste de parámetros del controlador se enfocó en el parámetro  $\lambda$ , manteniendo el restante de los parámetros de diseño iguales a los fijados para el modelo basado en modelo lineal.

El ajuste de  $\lambda$  se hizo, al igual que para el caso lineal, por medio de la minimización del ITAE por un intervalo de 40 horas utilizando el algoritmo de programación cuadrática secuencial y sujeto a restricciones sobre el valor de  $\lambda$  [83]. Se descartó el método simplex de Nelder-Meads porque como resultado de una estimación manual, el valor óptimo debía estar muy cerca de zero de manera que un método sin restricciones podría dar como resultado un valor negativo de  $\lambda$ .

El resultado de la minimización del ITAE con el lazo de control de crecimiento celular abierto dió como resultado  $\lambda = 5$ , el cual fue comparado con valores de diferente orden de magnitud constatándose que posee un menor valor de ITAE incluso cuando es comparado con valores de  $\lambda = 5$  muy pequeños. Debido a las magnitudes observadas de variación de la variable manipulable, es posible que con un valor de  $\lambda = 5$  el componente relacionado con el cambio de la variable manipulable sea la que tenga mayor relevancia en la optimización de la función objetivo.

Tabla 6.9: Valores de ITAE para diferentes valores de  $\lambda$ . \*valor óptimo obtenido.

$\lambda$	ITAE
50	112,021
5*	111,659
1	116,222
0,1	125,802
0,01	124,914
0,001	125,194
$1 \cdot 10^{-4}$	125,237
$1 \cdot 10^{-5}$	125,232

Los resultados de la simulación de la respuesta de control hasta alcanzar el estado estacionario se muestran en las Figuras 6.41 y 6.42, en donde el sistema controlado no es retenido en un estado metabólico alterado, a pesar de los esfuerzos realizados por el controlador basado en modelo no lineal, y vuelve a su estado metabólico basal. Al igual que su símil lineal, se tiene una acumulación de glucosa residual y un lavado de células pero no se observa un lavado de lactato extra-celular puesto que la concentración de glucosa alimentada no fue reducido lo suficiente por lo que el cultivo celular no varió sus tasas de consumo de glucosa ni de producción de lactato resultando en una tasa de producción mayor al coeficiente de dilución, lo que impidió su lavado.

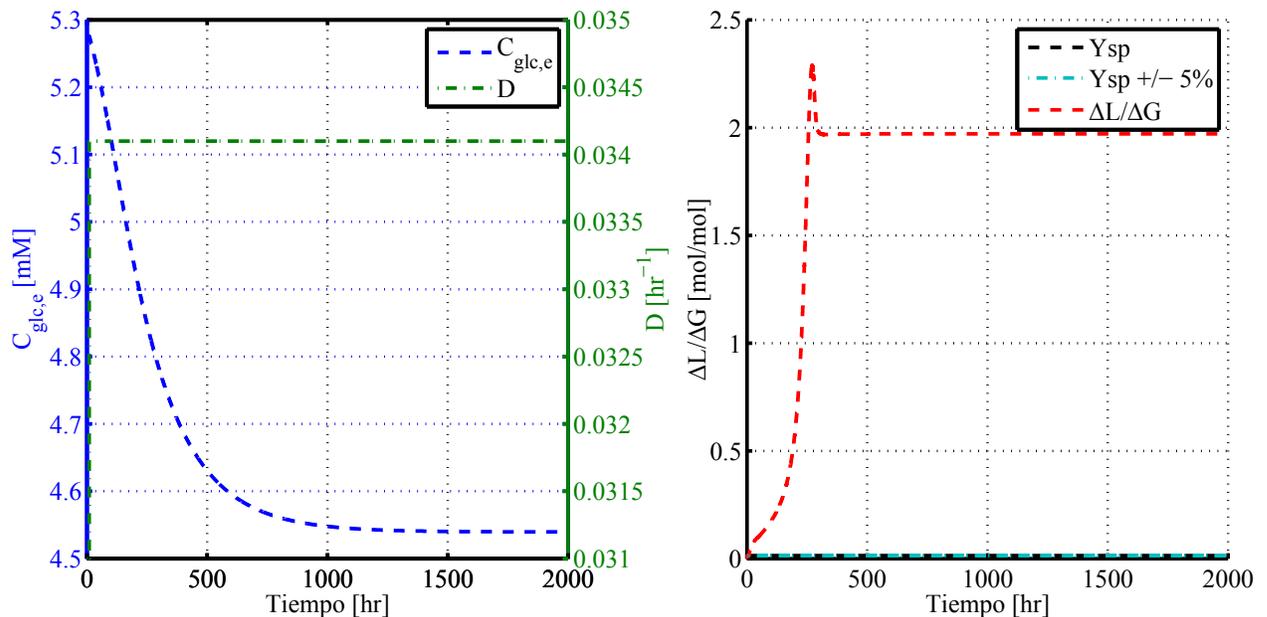


Figura 6.41: Respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada con la inclusión del lazo de control basado en modelo no lineal de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular abierto.

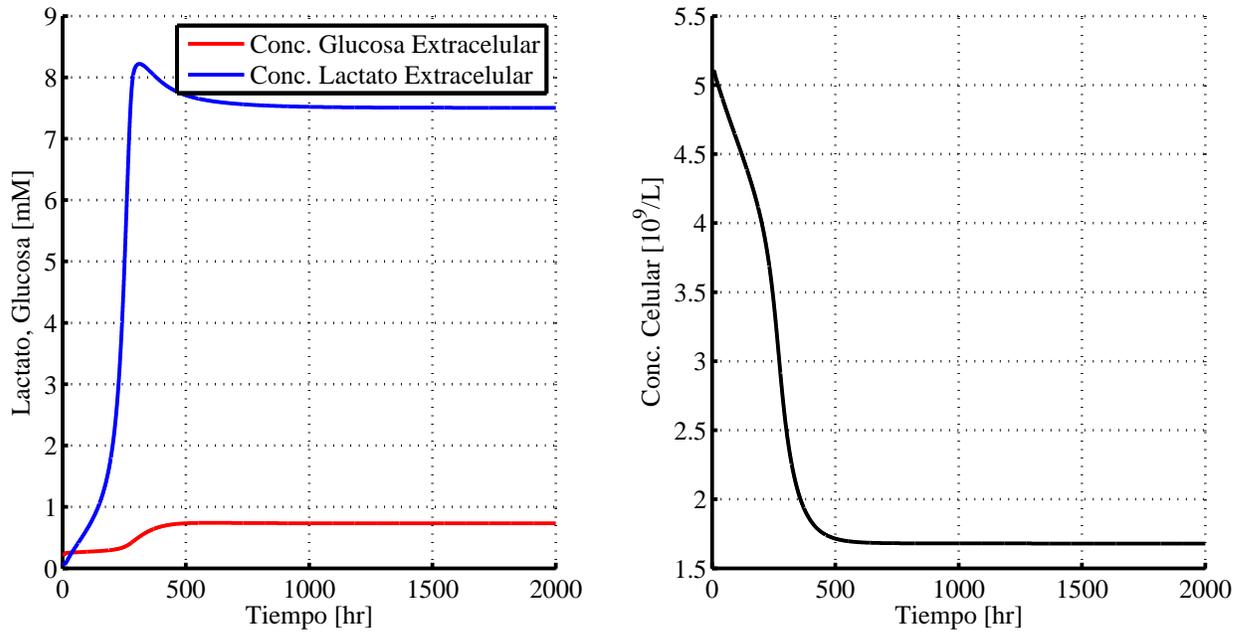


Figura 6.42: Concentraciones de glucosa y lactato extracelular y concentración celular simulada para la respuesta del sistema optimizado frente a un escalón de un 10% de la concentración de glucosa de entrada.

La simulación del lazo de control de la concentración de glucosa con el lazo de crecimiento celular abierto y cerrado se muestra en las Figuras 6.43 y 6.45, respectivamente.

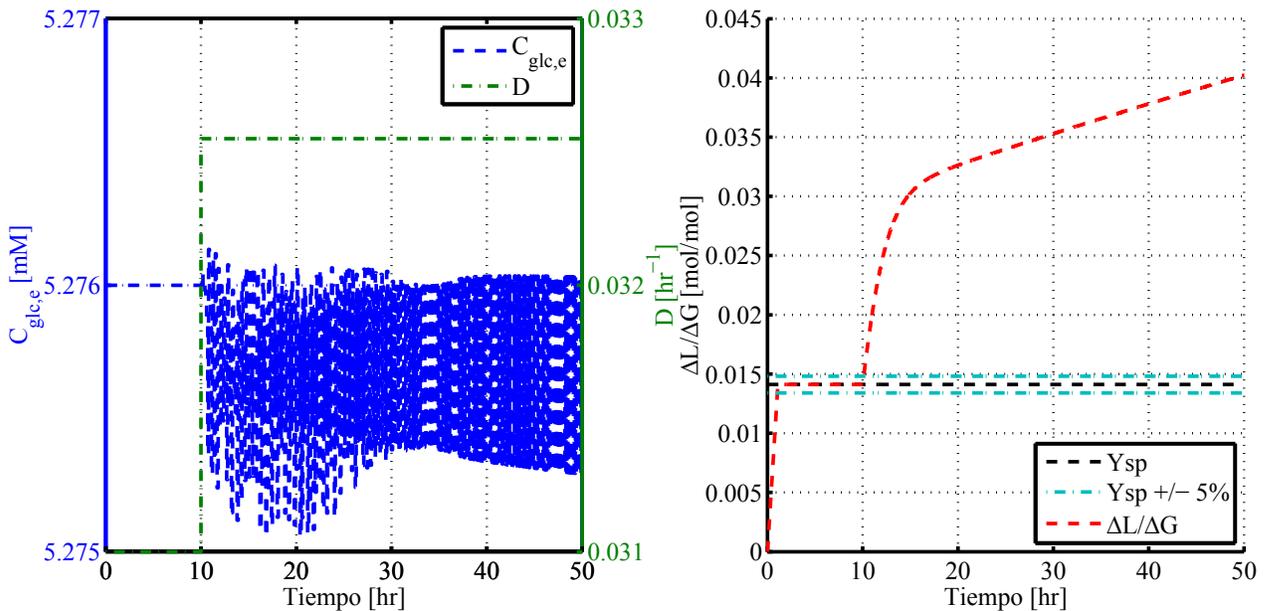


Figura 6.43: Respuesta optimizada del sistema frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución.

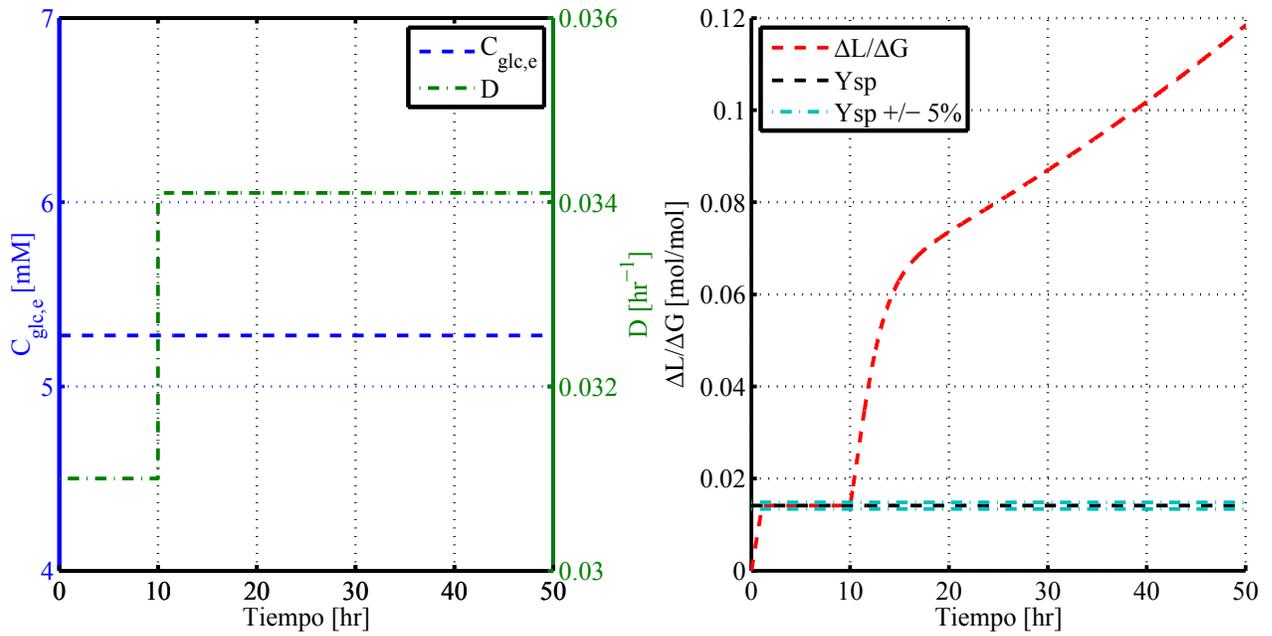


Figura 6.44: Respuesta de lazo abierto del sistema frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución.

Como se pudo observar en la Figura 6.41, el cultivo celular vuelve a su estado metabólico basal una vez alcanzado su estado estacionario lo que indicaría una muy baja incidencia de la acción de control en las primeras horas. Sin embargo, la comparación de la Figura 6.43 con la respuesta del sistema de lazo abierto frente a la misma perturbación que se muestra en la Figura 6.44 demuestra una acción de control leve de parte del controlador basado en modelo no lineal. Es la respuesta a la acción de control la que permite al sistema mantener una razón  $\Delta L/\Delta G$  menor a 0,045 [mol/mol] luego de 50 horas de cultivo en vez de casi 0,12 [mol/mol] que se observa para la respuesta de lazo abierto. El cambio de respuesta mencionado antes se debe a una disminución de la concentración de glucosa promedio alimentada, que en el caso del lazo abierto se mantiene en los 5,276 [mM] iniciales mientras que para el controlador basado en modelo no lineal dicha concentración oscila en torno a un valor cercano a 5,2755 [mM] que, si bien no es gran variación, genera un efecto notorio en la variable de salida.

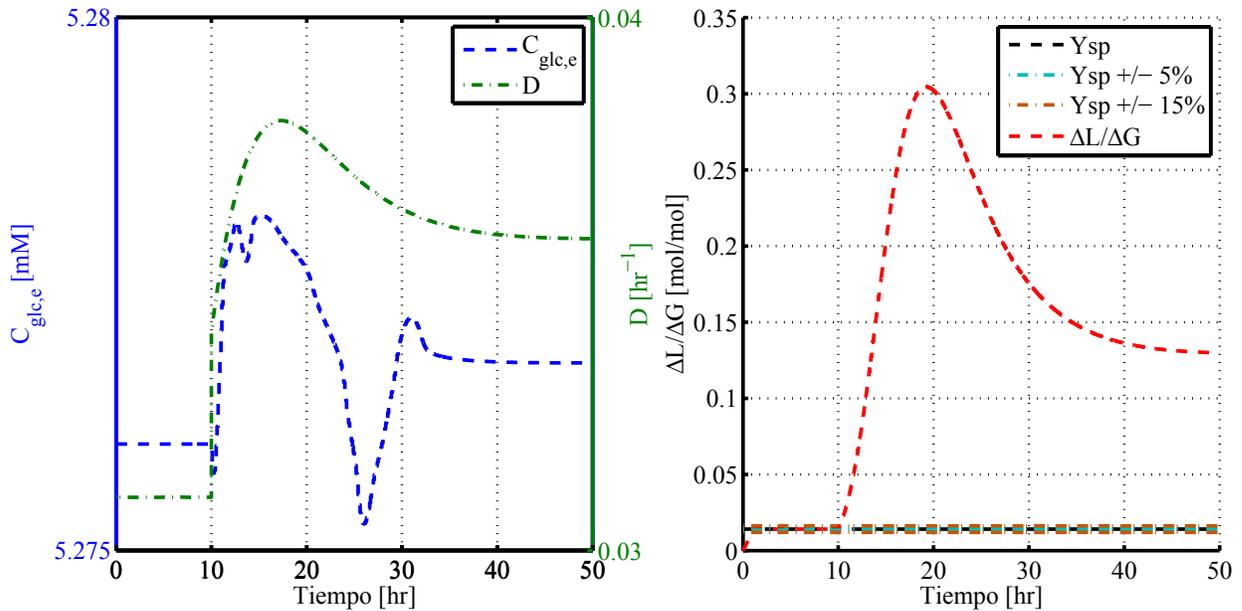


Figura 6.45: Respuesta del sistema frente a un escalón de un 10% de la tasa de crecimiento celular máxima,  $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

La Figura 6.45, que muestra la respuesta del sistema con los lazos de control de concentración de glucosa y de crecimiento celular cerrados presenta una variación poco esperada en la curva de concentración de glucosa de entrada pues posee aumentos en dicha concentración por sobre el valor inicial de 5,276 [mM] cuando la curva de la razón  $\Delta L/\Delta G$  se encuentra por sobre el set point. Los incrementos de la concentración de glucosa por sobre el valor inicial cuando el sistema muestra diferencias positivas de la razón  $\Delta L/\Delta G$  frente a su set point debido a que, tal como se ha observado para los otros controladores, se espera que la acción de control sea variar negativamente la concentración de glucosa cuando la razón  $\Delta L/\Delta G$  se encuentra sobre el set point.

Por otra parte, la comparación de las respuestas con y sin el lazo de control de crecimiento incorporado muestran la alta incidencia de este lazo sobre la variable de salida  $\Delta L/\Delta G$ . Al comparar directamente las Figuras 6.43 y 6.45 se tiene que para la curva de  $\Delta L/\Delta G$ , si bien alcanza valores mayores de la razón  $\Delta L/\Delta G$  dentro del intervalo de tiempo simulado, se estabiliza con  $\Delta L/\Delta G$  menor a 0,15 [mol/mol] y se puede considerar que no vuelve a su estado metabólico basal.

La minimización del ITAE con el lazo de control de crecimiento celular cerrado se presenta en la Figura 6.46 en donde el valor de  $\lambda$  obtenido fue de 0,00628, acorde con lo corroborado en la Tabla 6.9.

Tabla 6.10: Valores de ITAE para diferentes valores de  $\lambda$ . \*valor óptimo obtenido.

$\lambda$	ITAE
1	1.840,3
0,1	1.502
0,01	161,074
0,00628*	145,218
0,001	165,043
0,0001	166,336

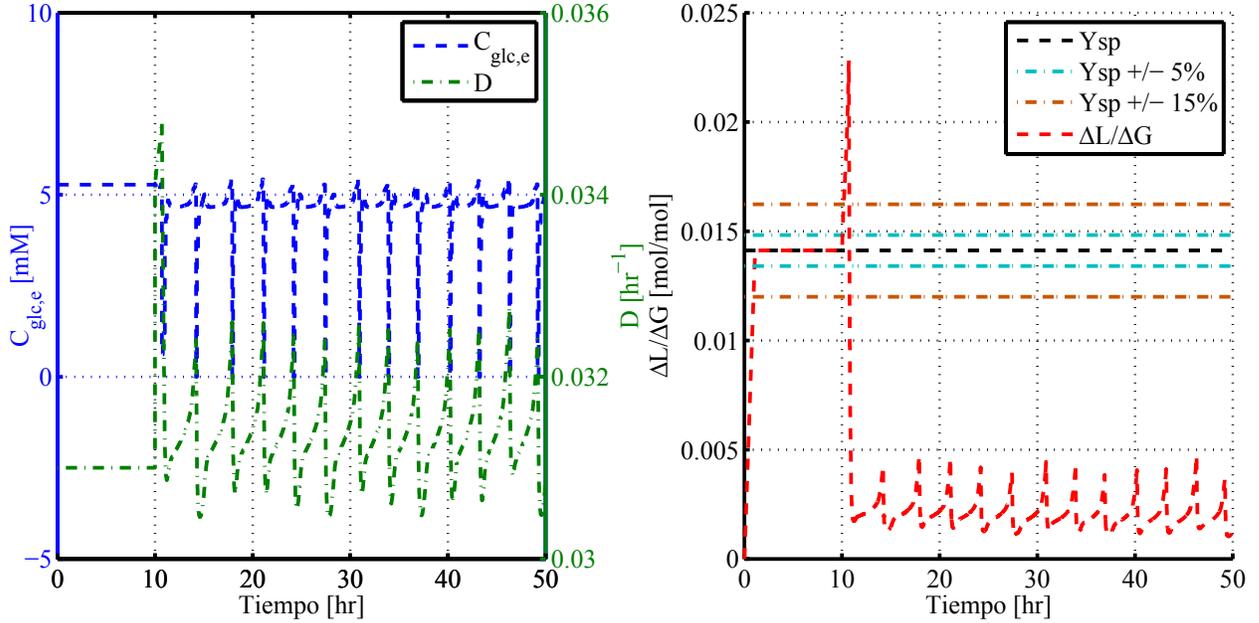


Figura 6.46: Respuesta del sistema frente a un escalón de un 10% de la tasa de crecimiento celular máxima,  $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

Para la Figura 6.46 nuevamente se observa una respuesta que no parece volver al estado metabólico basal. Sin embargo, se tiene una respuesta oscilatoria de las curvas de la razón  $\Delta L/\Delta G$ , el coeficiente de dilución y la concentración de glucosa de entrada. Se observa un primer monte que alcanza aproximadamente 0,23 [mol/mol] que corresponde al efecto inmediato de la perturbación. El aumento brusco de  $\Delta L/\Delta G$  hasta 0,23 [mol/mol] es luego controlado y los demás valores de  $\Delta L/\Delta G$  de la curva poseen valores muy inferiores al set point que oscilan alrededor de los 0,0025 [mol/mol]. Cabe destacar respecto a esto último que se asume altamente improbable lograr razones de  $\Delta L/\Delta G$  que oscilan alrededor de los 0,0025 [mol/mol] debido a que no existe registro en la literatura de que se hayan alcanzado razones de dicha magnitud.

La comparación de las Figuras 6.46 y 6.45 muestra que la respuesta simulada con el valor

óptimo de  $\lambda$  aumenta su frecuencia de oscilación y posee una respuesta inversa. Además, la comparación corrobora la optimización efectiva de la respuesta de control pues la diferencia de los valores de la curva de  $\Delta L/\Delta G$  para el caso optimizado efectivamente son menores a los observados para el caso sin optimizar lo que corrobora lo observado en la Tabla 6.10.

## 6.6. Análisis de robustez de controladores

A fin de analizar la robustez de los controladores proporcional y basado en modelo lineal se simuló la respuesta del sistema, con ambos lazos de control cerrados, frente a perturbaciones de un 5, 15, 20 y 30% en  $\mu_{max}$ .

### 6.6.1. Controlador proporcional

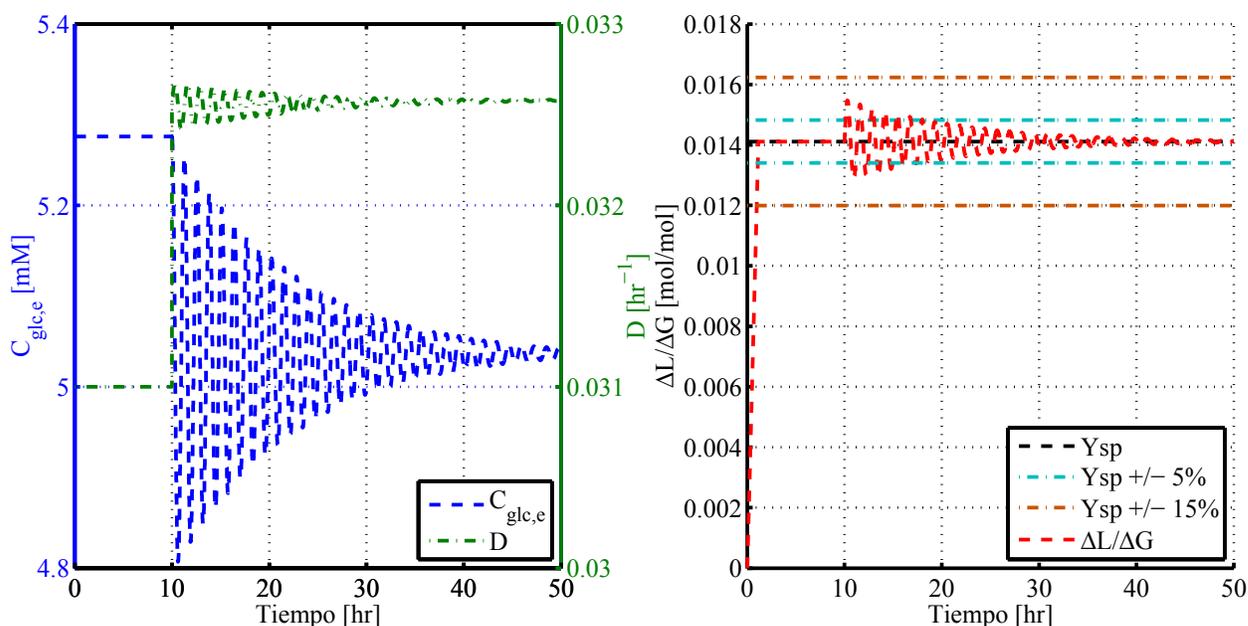


Figura 6.47: Respuesta del sistema frente a un escalón de un 5% de la tasa de crecimiento celular máxima,  $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

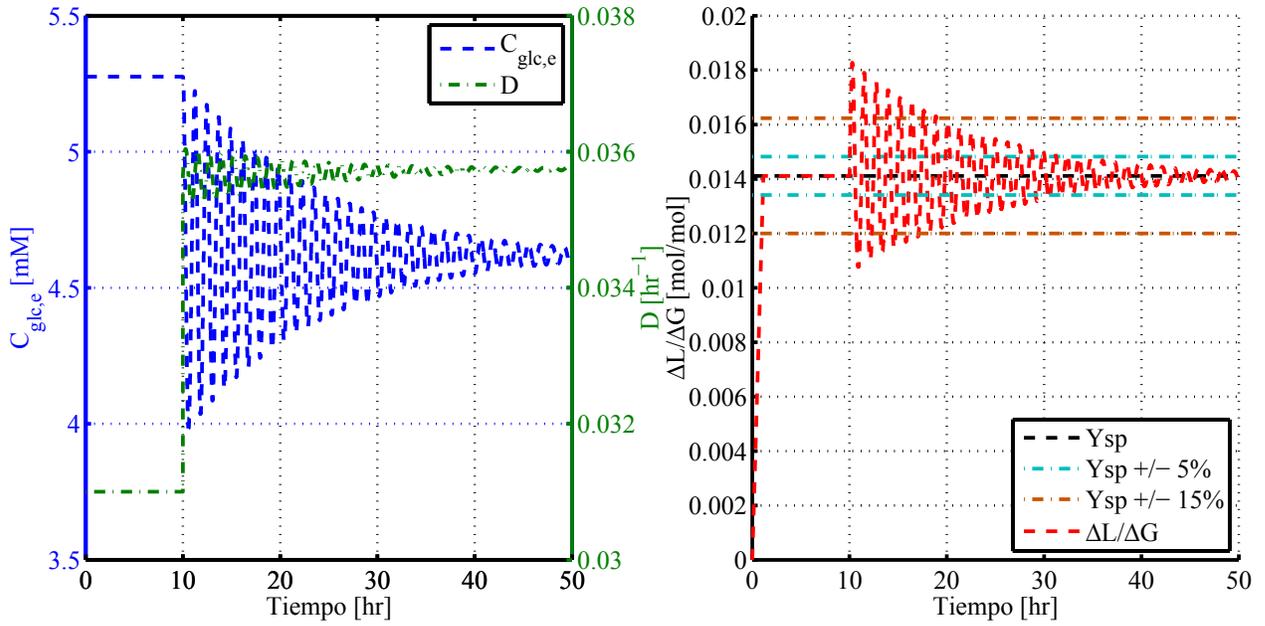


Figura 6.48: Respuesta del sistema frente a un escalón de un 15% de la tasa de crecimiento celular máxima,  $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

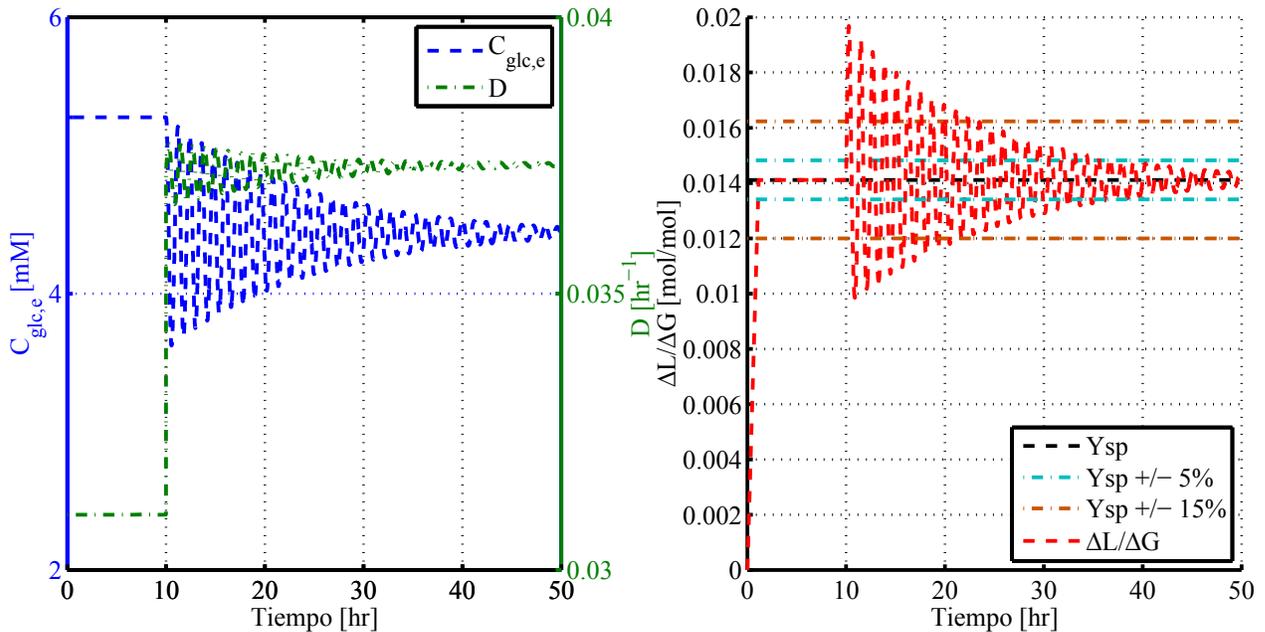


Figura 6.49: Respuesta del sistema frente a un escalón de un 20% de la tasa de crecimiento celular máxima,  $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

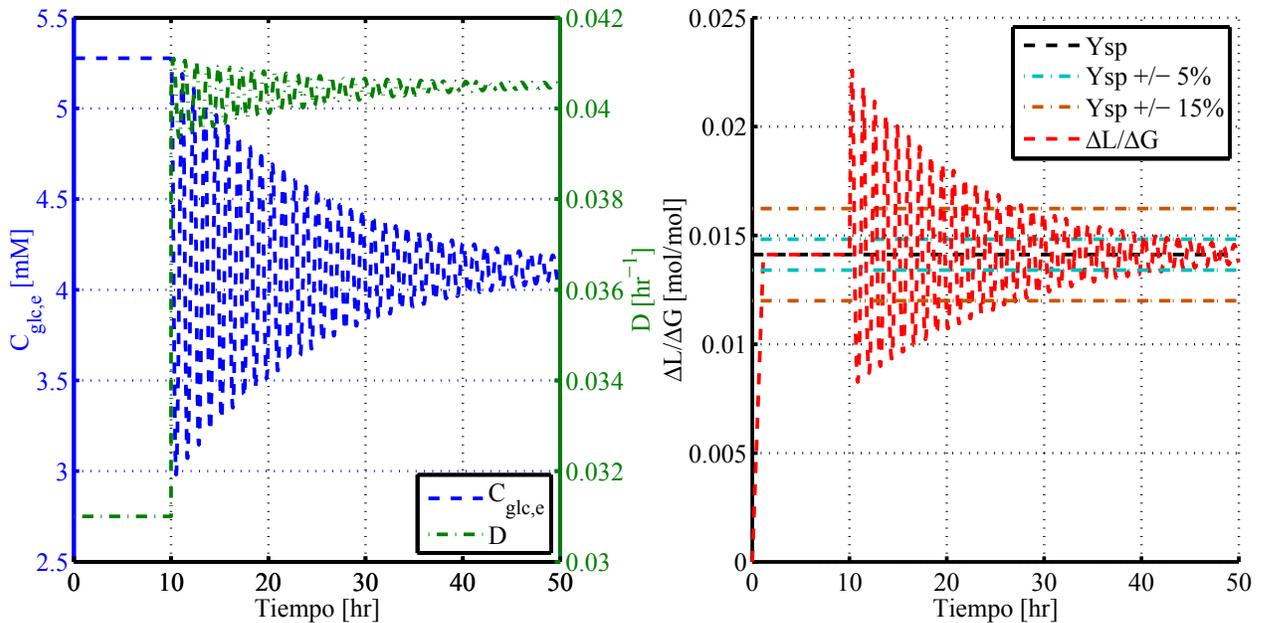


Figura 6.50: Respuesta del sistema frente a un escalón de un 30% de la tasa de crecimiento celular máxima,  $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

De las Figuras 6.48, 6.49 y 6.50 se tiene que los resultados de la simulación para el controlador proporcional permiten observar una robustez esperable de un controlador clásico en donde un aumento de la perturbación genera un aumento en el tiempo de respuesta y el rango de variación de la variable manipulable sin generar una dinámica diferente al observado para el caso de diseño (10% de aumento de  $\mu_{max}$ ) a excepción del tiempo que se demora el controlador en alcanzar el estado estacionario, que aumenta con una mayor perturbación de  $\mu_{max}$ . Es esperable un mayor tiempo de respuesta para perturbaciones mayores al 10% debido a que la carga de la perturbación es mayor al utilizado para el ajuste de la ganancia del controlador por lo que el controlador se demora más en estabilizar el sistema dentro de la banda establecida, como también es esperado un menor tiempo de respuesta para la perturbación de un 5% de la Figura 6.47 debido a la necesidad de un rango más acotado de concentraciones para la misma finalidad.

### 6.6.2. Controlador basado en modelo lineal

La simulación de los casos antes señalados para el lazo de control basado en modelo también generó resultados esperables que se muestran en las Figuras 6.51, 6.52 y 6.53. Se observó que a mayor perturbación, mayor era el offset de la respuesta regulada siendo dicho offset generado por la presencia de una perturbación no medible que el modelo de proceso no es capaz de representar

debido a que solamente contempla como variables de entrada  $\Delta L/\Delta G(t-1)$ ,  $D(t-1)$  y  $C_{glc,e}(t-1)$ .

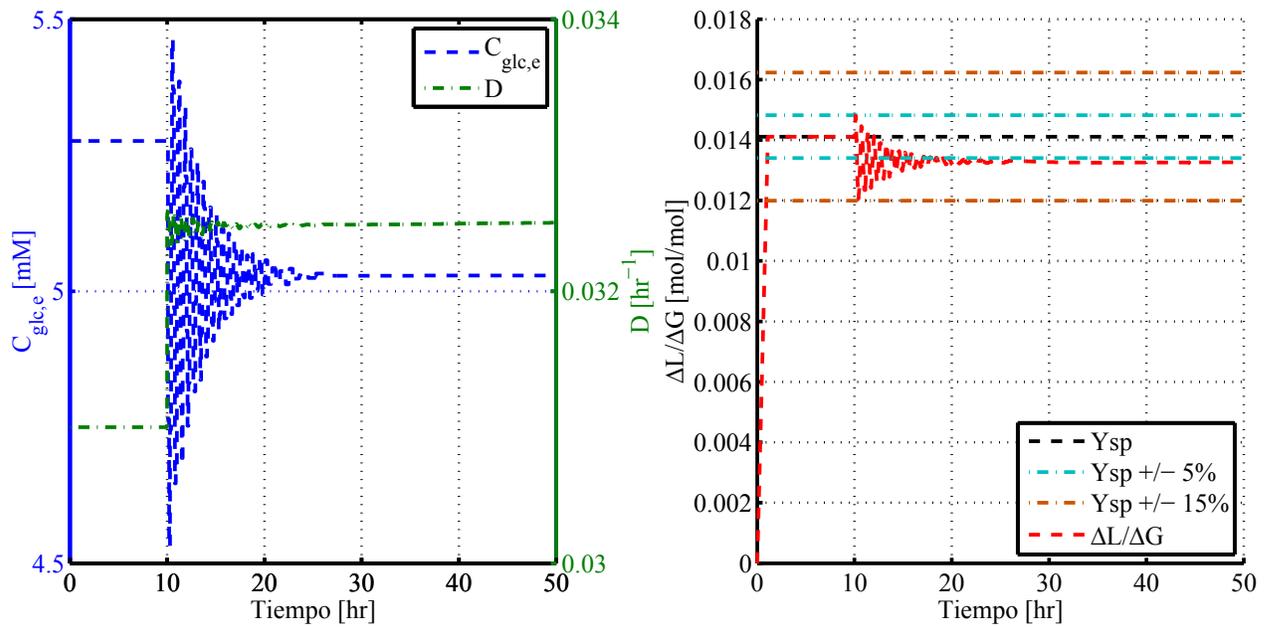


Figura 6.51: Respuesta del sistema frente a un escalón de un 5% de la tasa de crecimiento celular máxima,  $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

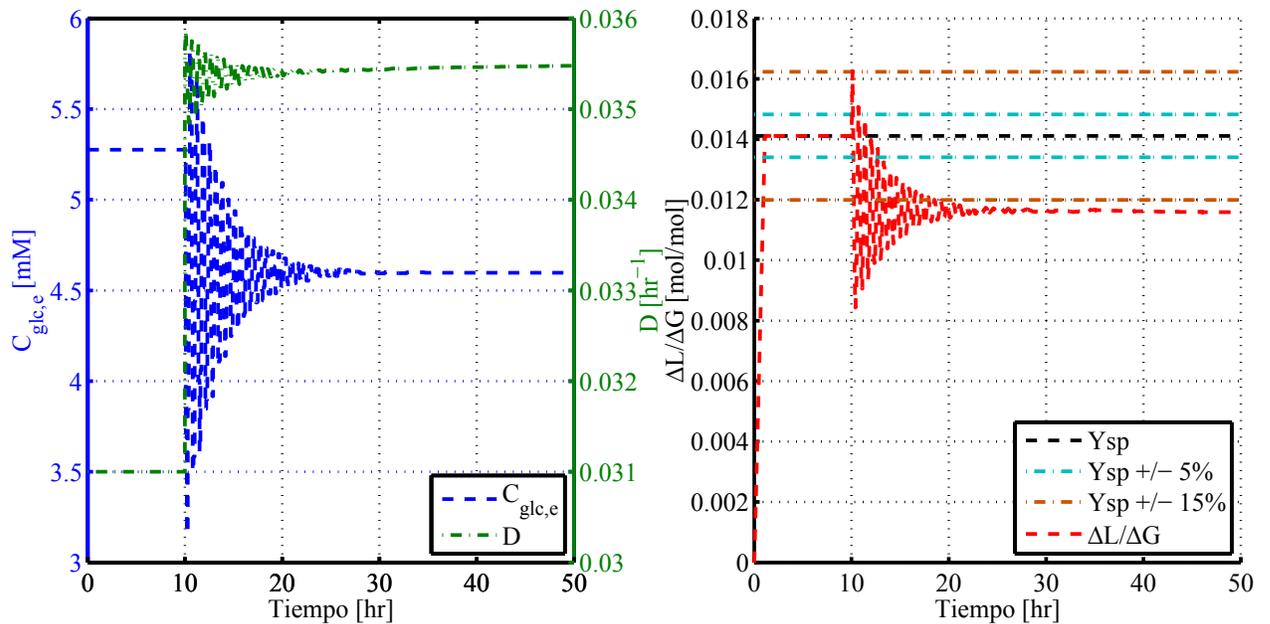


Figura 6.52: Respuesta del sistema frente a un escalón de un 15% de la tasa de crecimiento celular máxima,  $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

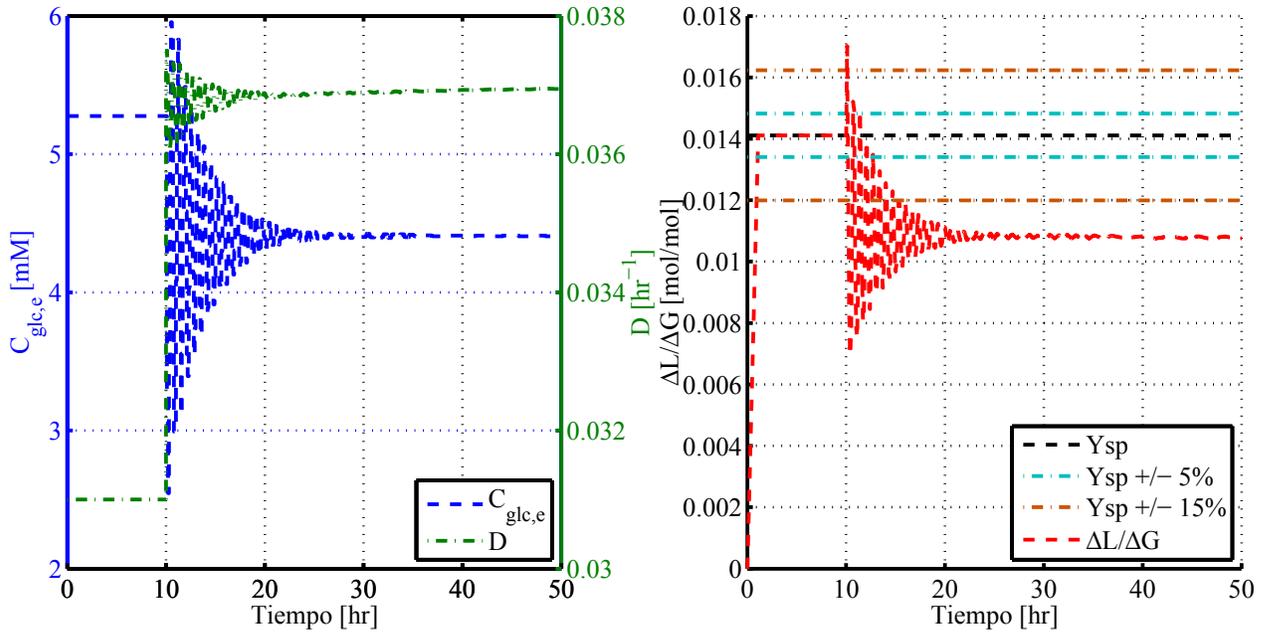


Figura 6.53: Respuesta del sistema frente a un escalón de un 20% de la tasa de crecimiento celular máxima,  $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

Las perturbaciones de 5%, 15% y 20% generan un offset de un 6%, 16% y 23%, respectivamente, con lo que se puede apreciar una proporcionalidad directa entre ambas variables que, sumado al un 12% de offset observado para una perturbación de un 10%, sigue una tendencia lineal que se muestra en la Figura 6.54, con un coeficiente de correlación lineal de 0,9902.

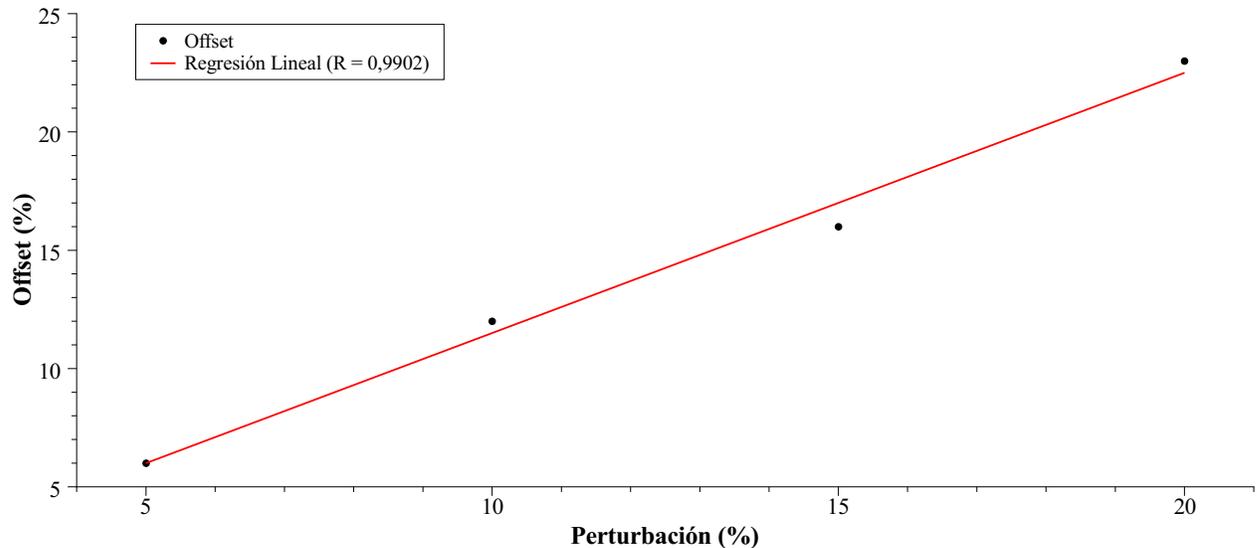


Figura 6.54: Dependencia del offset de la magnitud de la perturbación de la tasa máxima de crecimiento celular  $\mu_{max}$ .

Además de observar una dependencia del offset con respecto a la magnitud de la perturbación constante, se notó que la magnitud de dicha perturbación no afecta mayormente el tiempo que demora la respuesta de control en alcanzar el estado estacionario.

## 6.7. Análisis de sensibilidad de controladores

Con la intención de analizar la versatilidad de los controladores proporcional y basado en modelo lineal se simuló la respuesta de control de ambos controladores bajos diferentes contextos. Las condiciones simuladas fueron las siguientes:

- Baja disponibilidad de concentraciones de glucosa: Se simuló la respuesta de ambos controladores bajo la premisa de que para regular la concentración de glucosa de entrada existen únicamente 5 recipientes con 5 medios con concentraciones diferentes de glucosa: 5,276 [mM], 4,776 [mM], 4,276 [mM], 3,776 [mM], 3,276 [mM] y 0 [mM], que corresponde a contar con además de la concentración inicial de 5,276 [mM], utilizado para las simulaciones anteriores, 4 concentraciones reducidos en 0,5 [mM] respecto a su antecesor partiendo desde dicha concentración inicial y un medio libre de glucosa (0 [mM]). Además se supuso la existencia de todas las mezclas isovolumétricas posibles de las concentraciones anteriores de manera de tener 4 concentraciones adicionales disponibles: 5,076 [mM], 4,576 [mM], 4,076 [mM] y 3,576 [mM]. La finalidad de la simulación anterior es analizar la respuesta de los controladores frente a un montaje experimental común en donde se cuenta únicamente con bombas peristálticas (ON/OFF) desde los recipientes al bio-reactor.
- Aumento de los intervalos de muestreo: Se simuló la respuesta del controlador basado en modelo lineal frente a un cambio en los intervalos de muestreo. Se simuló la respuesta frente a la variación del cambio de un intervalo de muestreo de 0,1 [hr] a 1 [hr] sin modificación de los parámetros ya ajustados. También se simuló la discretización del controlador proporcional utilizando intervalos similares de control.
- Aumento de los intervalos de muestreo y restricciones impuestas en las concentraciones de glucosa de entrada: Se simuló la respuesta del controlador basado en modelo lineal frente a un cambio simultáneo en los intervalos de muestreo y las concentraciones de glucosa disponibles.

### 6.7.1. Restricción de concentraciones de glucosa

Para la simulación de las restricciones impuestas sobre la concentración de glucosa sobre la respuesta del controlador proporcional se procedió a la discretización de éste para mantener constante la concentración de glucosa durante intervalos de muestreo pequeños.

La acción de control proporcional de la concentración de glucosa se puede escribir como:

$$C_{glc,e}(t) = K_c \cdot (\Delta L / \Delta G_{SetPoint} - \Delta L / \Delta G(t-1)) + C_{glc,e}(t-1) + c_s \quad (6.21)$$

Cuando el valor de  $\Delta L / \Delta G(t-1)$  es igual a  $\Delta L / \Delta G_{SetPoint}$  se espera que la acción de control sea nula, es decir que  $C_{glc,e}(t) - C_{glc,e}(t-1)$  sea igual a cero. De esta manera,  $c_s$  debe ser igual a cero para cumplir con esta premisa. Ahora bien, al enfrentarse a un escenario en donde se acota el número de muestreos durante un intervalo de tiempo se debe utilizar una discretización del controlador proporcional que consiste en el mismo planteamiento pero de forma discreta, es decir:

$$C_{glc,e}(nT) = \begin{cases} K_c \cdot (\Delta L / \Delta G_{SetPoint} - \Delta L / \Delta G(t-1)) + C_{glc,e}((n-1)T) & t = nT \\ C_{glc,e}(nT-1) \end{cases}$$

en donde  $C_{glc,e}(nT)$  es la concentración de glucosa de entrada en el instante  $t = nT$ ,  $K_c$  corresponde a la ganancia del controlador proporcional,  $T$  es el intervalo de muestreo del controlador discreto, y  $n$  es el número del intervalo. El intervalo de muestreo escogido fue de 0,004 [hr] y fue elegido utilizando como base que el intervalo de muestreo debe ser inferior a un 10% del tiempo que demora la respuesta de lazo abierto del sistema, frente a un escalón unitario en la variable manipulable, en alcanzar un 63,2% de su estado estacionario para captar la respuesta de lazo abierto del sistema [99]. El sistema se demora 0,05 [hr] en alcanzar el 63,2% de su estado estacionario frente a un escalón unitario en la concentración de glucosa de entrada por lo que el intervalo de muestreo  $T$  debe ser menor que 0,005 [hr]. La discretización del controlador proporcional fue con el fin de evaluar el comportamiento del controlador continuo forzado a tener una respuesta restringida por los tiempos muertos de muestreo y de cálculo de  $\Delta L / \Delta G$ . Debido a que no fue posible simular la respuesta sin restricciones sobre la concentración de glucosa alimentada del controlador discreto debido a que se alcanzaban valores negativos de concentración de glucosa, producto de la alta ganancia  $K_c$ , se simuló la respuesta de control con las restricciones impuestas sobre la concentración de glucosa de entrada para el controlador basado en modelo de manera de no tener concentracio-

nes negativas ni superiores a la concentración de saturación de glucosa en agua. El resultado de la simulación de la respuesta de control de la aproximación discreta comparado con la respuesta del controlador proporcional continuo frente a un escalón de un 10% del coeficiente de dilución se presenta en la Figura 6.55 y la comparación de su respuesta con la observada para el controlador proporcional continuo se muestra en la Figura 6.57.

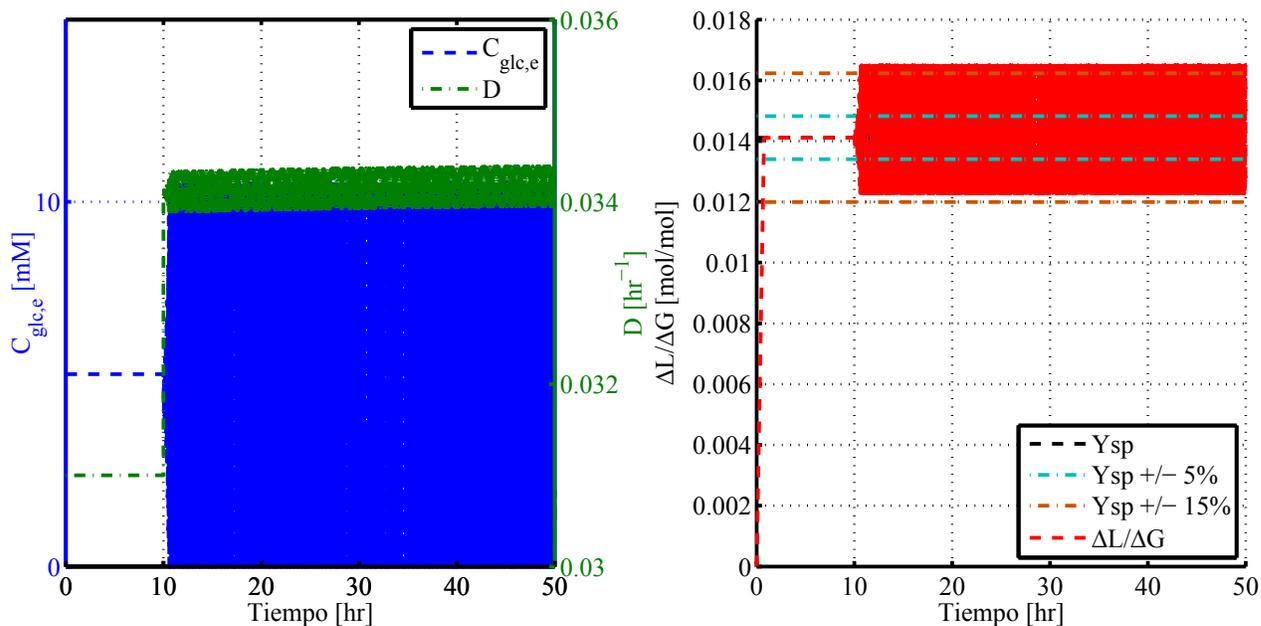


Figura 6.55: Respuesta del controlador proporcional discreto utilizando un intervalo de muestreo de 0,004 [hr], frente a una perturbación de un 10% de  $\mu_{max}$ .

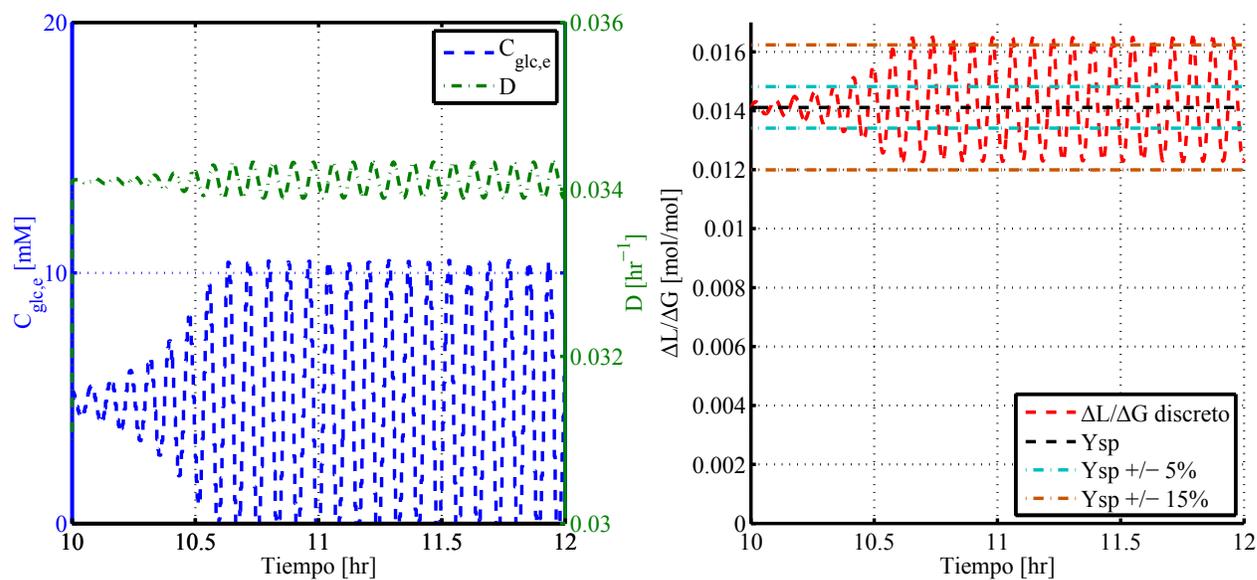


Figura 6.56: Acercamiento de respuesta del controlador proporcional discreto utilizando un intervalo de muestreo de 0,004 [hr], frente a una perturbación de un 10% de  $\mu_{max}$ .

En la Figura 6.55 se observa que la respuesta de control discretizado posee una alta frecuencia de oscilación. Además, la concentración de alimentación de glucosa toma el valor de 0 en muchos intervalos lo que significa que es posible que en dichos intervalos el controlador esté operando de manera sub-óptima pues podrían tratarse de intervalos en donde la acción de control requiere de una alimentación negativa de glucosa, lo que no es factible. En la Figura 6.56 se tiene un acercamiento de la respuesta de la Figura 6.55 que muestra las dos primeras horas de la respuesta a la perturbación.

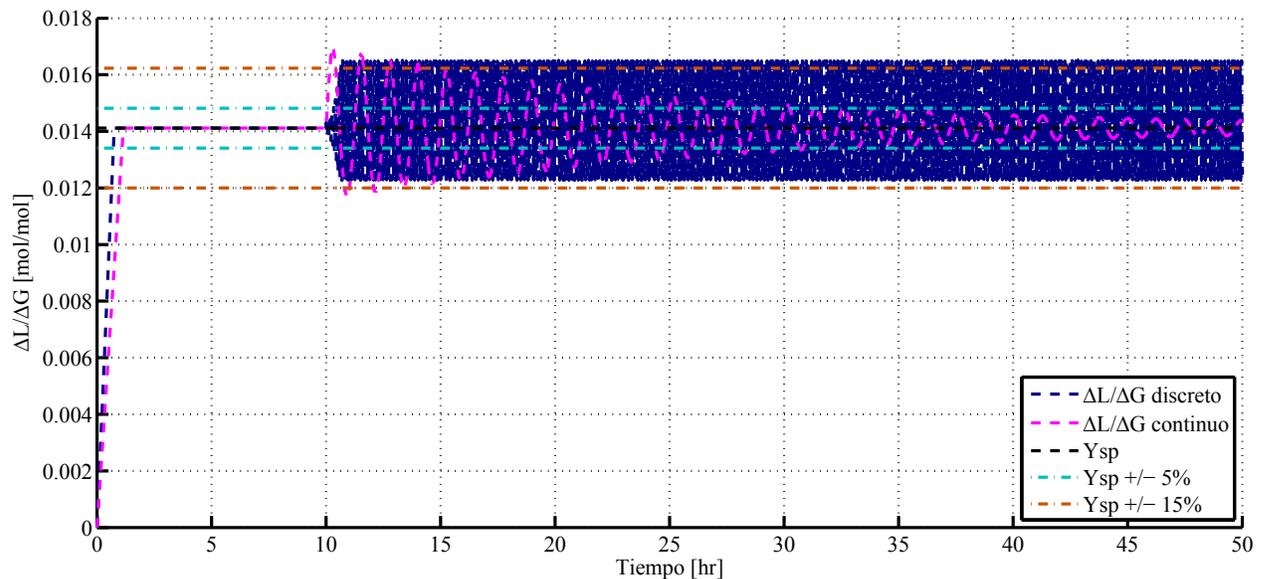


Figura 6.57: Comparación de dinámica de variable de salida del controlador proporcional con su aproximación discreta utilizando un intervalo de muestreo de 0,004 [hr], frente a una perturbación de un 10 % de  $\mu_{max}$ .

La comparación de la Figura 6.57 muestra que la respuesta discreta se aleja bastante de la observada para el caso continuo del controlador proporcional. Además de la mayor frecuencia de oscilación se tiene también una mayor amplitud de oscilación que no decae en todo el intervalo de tiempo simulado.

En cuanto a la sensibilidad del controlador basado en modelo lineal, la restricción de las concentraciones de glucosa disponibles generó una respuesta con una mayor oscilación producto del carácter sub-óptimo de las concentraciones alimentadas. La gran amplitud de oscilación que es producto del carácter binario que puede tener la concentración en determinados rangos. El carácter binario se refiere a que en un rango determinado la concentración de glucosa puede adoptar máximo 2 concentraciones distintas y genera un aumento en la amplitud de oscilación y una mayor

frecuencia de oscilación debido a que al reactor se alimenta una concentración de glucosa que no es la óptima al bio-reactor, ya sea inferior al límite superior o superior al límite inferior del rango binario, esto provoca que se alimente glucosa en exceso o menor al requerido de manera que la razón  $\Delta L/\Delta G$  oscila con una mayor amplitud al observado para los casos sin restricción. Por otra parte, la respuesta de la Figura 6.58 aparentemente oscila en torno al valor estacionario observado para la respuesta del sistema sin restricciones sobre la concentración de glucosa alimentada, el cual tiene un offset de aproximadamente un 12 %.

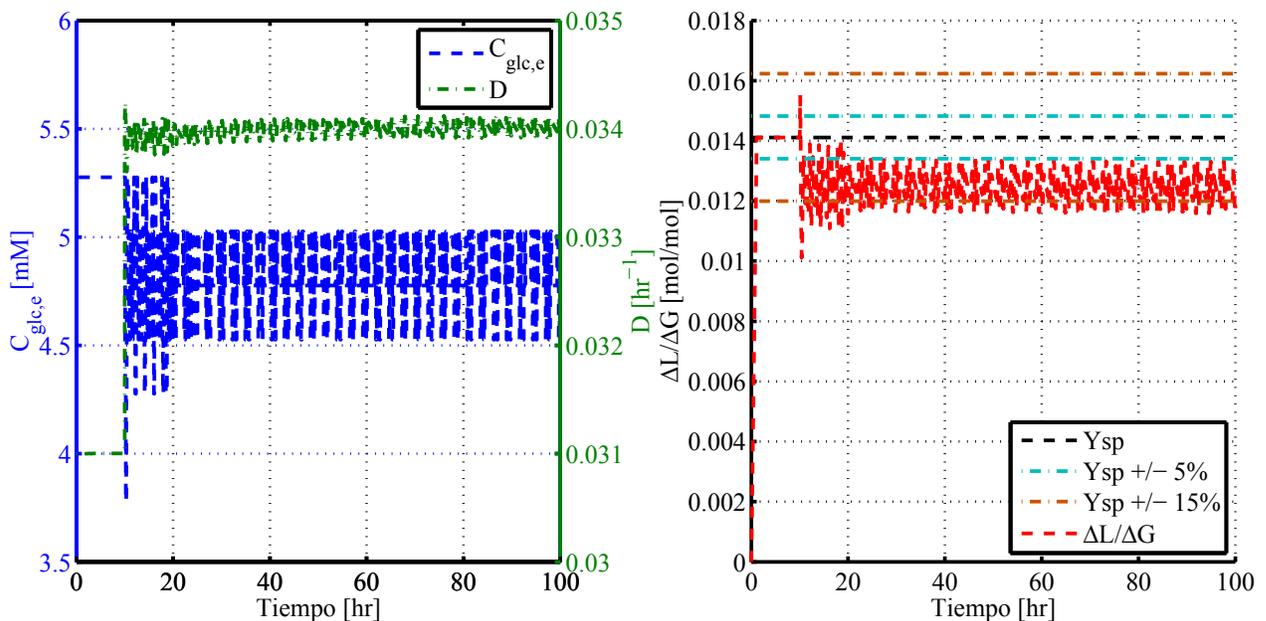


Figura 6.58: Respuesta del controlador basado en modelo lineal frente a una perturbación de un 10% de  $\mu_{max}$  con una alimentación de concentraciones restringidas de glucosa.

Para el caso del controlador proporcional, cuya respuesta simulada se muestra en la Figura 6.59 y cuyo acercamiento se puede apreciar en la Figura 6.60, se observa una respuesta también de una alta frecuencia de oscilación y de una amplitud de oscilación similar a lo largo de toda la simulación. Al comparar la respuesta de la Figura 6.55 con la de la Figura 6.59 se observa una frecuencia de oscilación similar con una reducción de la amplitud de oscilación para el caso con restricciones sobre la concentración de glucosa de entrada. La existencia de una menor amplitud de oscilación, que repercute en que la repuesta de control se mantenga en el interior de la banda de un 5% del set point, es lo más destacable y puede considerarse un resultado esperable frente a las condiciones de operación; se observó para el caso sin restricciones que la acción de control genera una alta frecuencia de oscilación de la variable manipulable, así como una amplitud de oscilación

aparentemente constante, lo que para el caso de la respuesta de control con restricciones sobre la variable manipulable se repite pero dentro de un rango más acotado de operación, esto genera una restricción del rango de valores de  $\Delta L/\Delta G$ .

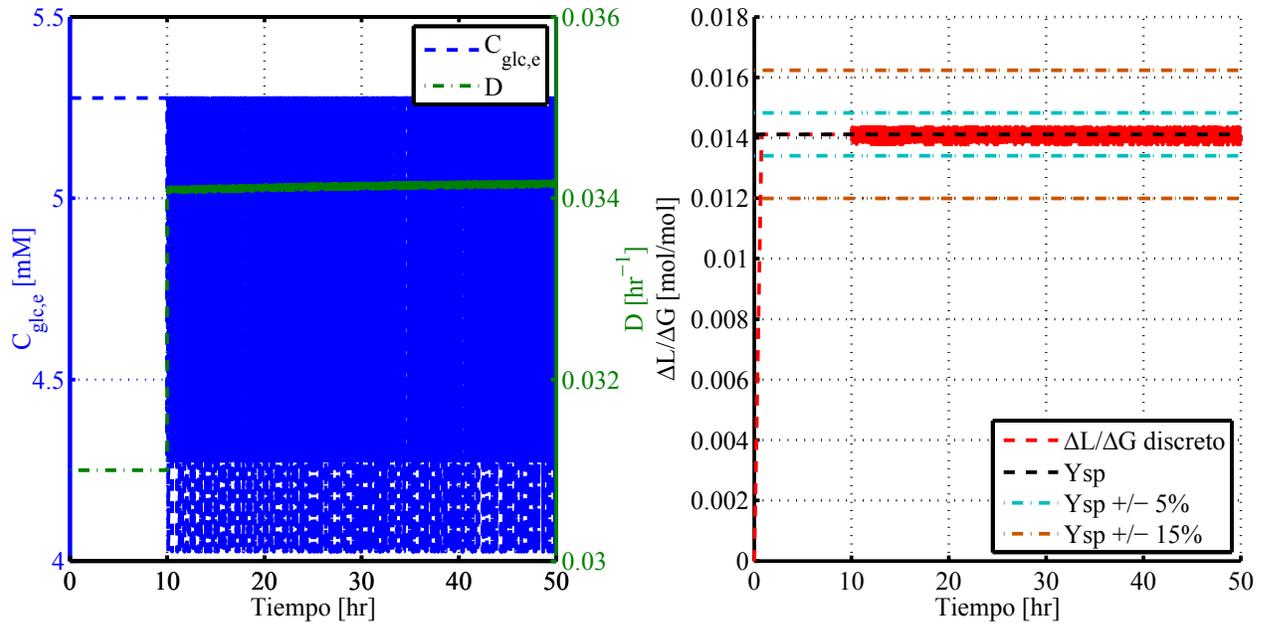


Figura 6.59: Respuesta del controlador proporcional discreto con un intervalo de muestreo de 0,004 [hr], frente a una perturbación de un 10% de  $\mu_{max}$  con una alimentación de concentraciones restringidas de glucosa.

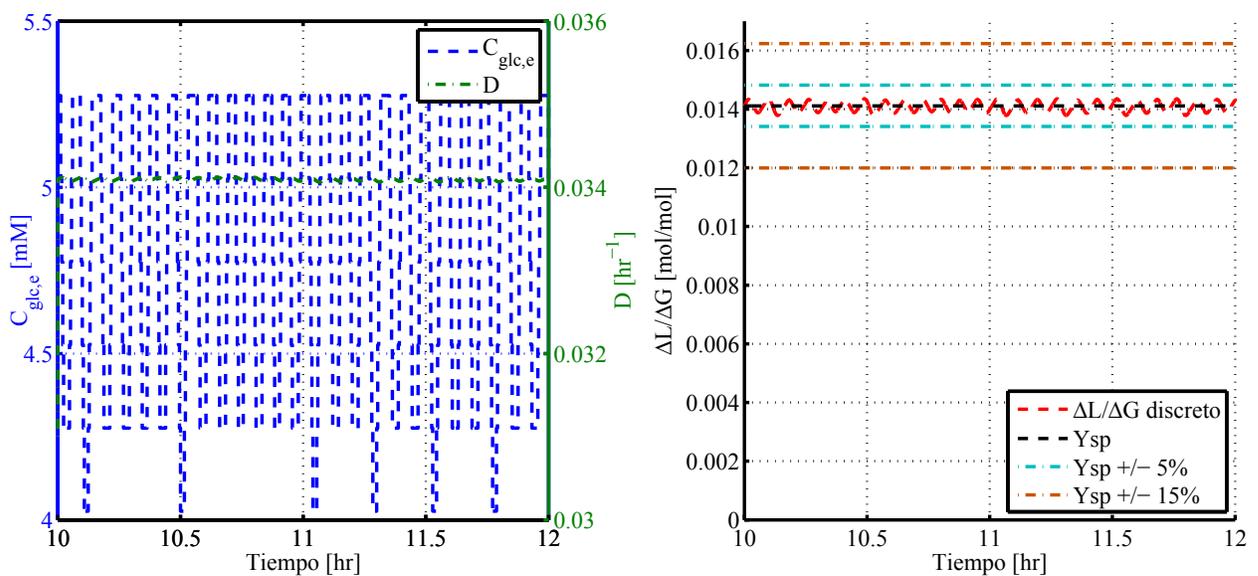


Figura 6.60: Acercamiento de respuesta del controlador proporcional discreto con un intervalo de muestreo de 0,004 [hr], frente a una perturbación de un 10% de  $\mu_{max}$  con una alimentación de concentraciones restringidas de glucosa.

La comparación de las dinámicas de las respuestas de las Figuras 6.58 y 6.59 muestra un mejor rendimiento del controlador proporcional en comparación al controlador controlador basado en modelo lineal al lograrse una estabilización más cercano al set point establecido. Sin embargo, como se señaló antes, ambas respuestas poseen una alta frecuencia de oscilación lo que sugiere otro potencial problema de implementación del controlador, el requerimiento de un actuador robusto y preciso, capaz de realizar de realizar cambios en las condiciones de operación con una alta frecuencia.

La simulación de la aproximación discreta permitió analizar la dinámica de control de una solución práctica implementable que consiste en el uso intermitente del controlador proporcional, es decir, la adaptación del controlador por medio de la alimentación discreta de información. Sin embargo, la necesidad de imponer restricciones para simular y comparar la respuesta de control frente a la misma perturbación genera una pérdida de representatividad del controlador discreto de su par continuo. La falta de representatividad se observa claramente luego de la comparación expuesta en la Figura 6.57.

### **6.7.2. Aumento de intervalo de muestreo**

El objetivo de analizar el comportamiento de los controladores proporcional y basado en modelo lineal frente a un cambio en el intervalo de muestreo es para simular la versatilidad del controlador basado en modelo lineal bajo condiciones de operación restringidas que caen fuera de las condiciones simuladas al momento de ajustar los controladores. Para esto se escogió la simulación de un aumento del intervalo de muestreo.

Debido a que el controlador proporcional diseñado corresponde a un controlador continuo cuya discretización requiere de intervalos de muestreo pequeños inferiores a 0,005 [hr] para poder operar sin variación de la ganancia, no es factible simular la respuesta de control para un intervalo de muestreo de 1 [hr]. Las razones por las que no se puede simular es por infactibilidades numéricas que se traducen en casos no aplicables a la realidad; al aumentar el tiempo de muestreo el valor de la concentración de glucosa de entrada puede adoptar valores negativos debido al alto valor de la ganancia del controlador lo que, por el planteamiento del sistema, no puede resolverse numéricamente. Esto sumado al hecho de que una concentración de glucosa negativa significa un retiro selectivo de concentración de glucosa lo que es un caso totalmente desapegado de la realidad experimental. Ahora bien, los equipos de muestreo en línea de glucosa y lactato como el TRACE

C2 de TRACE Analytics, CLS-1322-02 de GlucCell® y YSI 2900 Biochemistry Analyzer de YSI® poseen tiempos muertos por análisis de 0,033, 0,033 y 0,01 [hr], respectivamente, los cuales superan la cota superior del intervalo de muestreo que es de 0,005 [hr] y es por ello que se comparó y analizó la respuesta de lazo cerrado del controlador proporcional discreto, con un intervalo de muestreo de 0,033 [hr], con la respuesta observada para el controlador proporcional continuo frente a una perturbación de un 10% del coeficiente  $\mu_{max}$ . A través de esta comparación de controlador proporcional discreto y continuo que se muestra en la Figura 6.61 se observó que un aumento del intervalo de muestreo, sujeto a las restricciones para evitar que la concentración de glucosa de entrada sea negativa y que supera su concentración de saturación en agua, genera una mayor amplitud de oscilación y una baja en el rendimiento observado para su símil continuo.

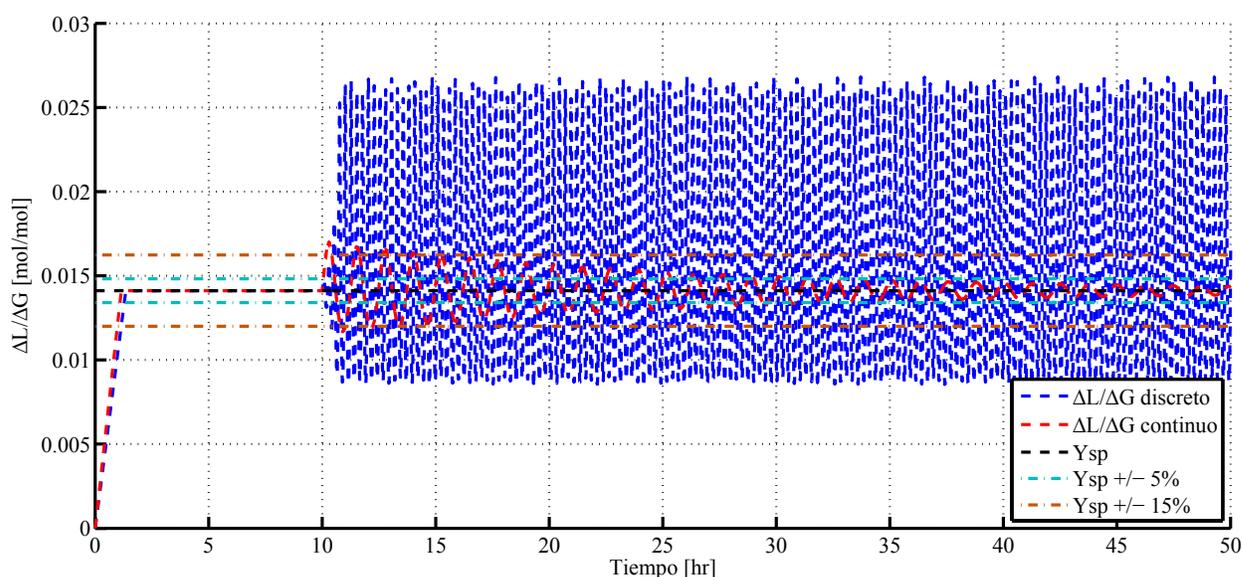


Figura 6.61: Comparación de dinámica de variable de salida del controlador proporcional con su aproximación discreta utilizando un intervalo de muestreo de 0,033 [hr], frente a una perturbación de un 10% del coeficiente de dilución.

Por otra parte, para el controlador basado en modelo lineal, se aumentó el intervalo de muestreo de 0,1 [hr] a 1 [hr] que se puede considerar un caso hipotético factible que se puede asociar con una restricción de los tiempos muertos de operación.

Los resultados de la simulación de un aumento en el intervalo de muestreo se presentan en la Figura 6.62 en donde se observa un mayor tiempo tiempo de respuesta, alcanzando aproximadamente 24 horas. Además, existe una variación del tamaño y el signo del offset; con un intervalo de muestreo de 0,1 [hr] el offset ronda un 12% negativo y con un intervalo de muestreo de 1 [hr] este

alcanza un offset cercano a un 5% positivo.

La prolongación del intervalo de muestreo también da cabida a una acción de control menos agresivo; una menor agresividad de la acción de control generó una menor oscilación de la concentración de glucosa residual que también incide en la tasa de crecimiento celular que, a su vez, incide en el coeficiente de dilución pues una respuesta menos oscilatoria del coeficiente de dilución depende directamente de la dinámica de la tasa de crecimiento celular. Sin embargo, la menor agresividad de la respuesta de control también incide en la amplitud máxima de oscilación con respecto a su valor estacionario que se nota claramente en que la máxima razón  $\Delta L/\Delta G$  que se puede apreciar es 0,0559 [mol/mol] que corresponde a un incremento en casi un 70% en comparación a su respuesta sin ampliación del intervalo de muestreo.

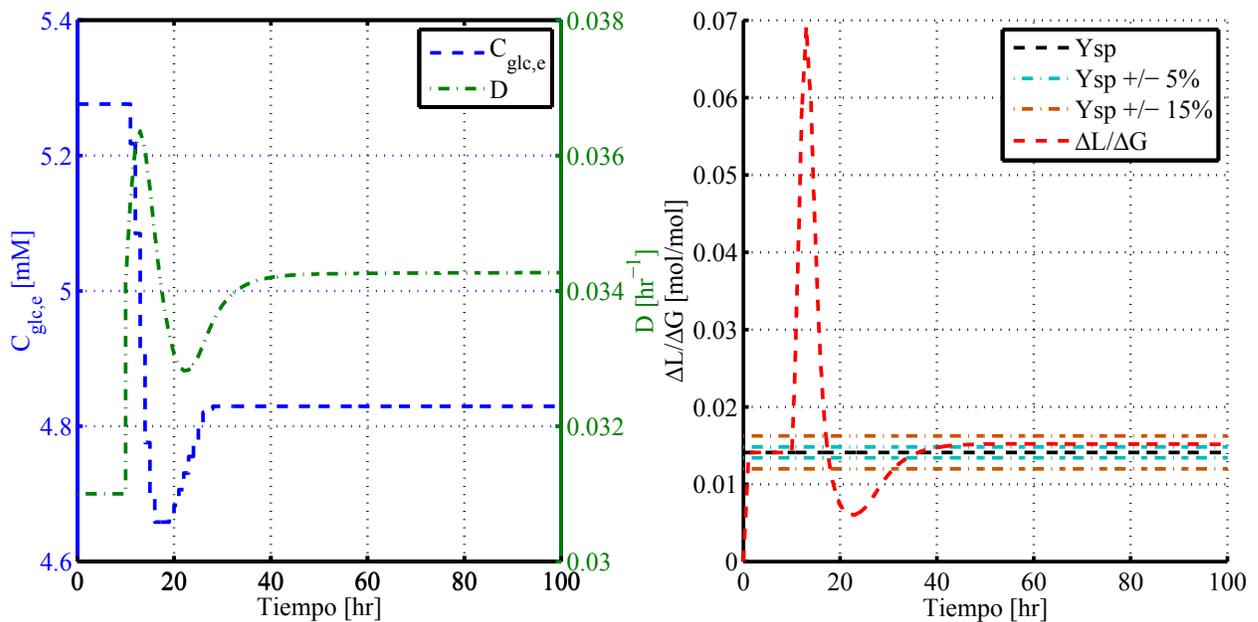


Figura 6.62: Respuesta del controlador basado en modelo lineal de la Figura 6.30, con el intervalo de muestreo modificado a 1 [hr], frente a un escalón de un 10% de la tasa de crecimiento celular máxima,  $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

### 6.7.3. Aumento de intervalo de muestreo y restricción de concentraciones de glucosa

A fin de verificar la incidencia de simultáneamente restringir las concentraciones de glucosa disponible y de aumentar el tiempo de muestreo del controlador basado en modelo lineal se simuló la respuesta de control del mismo frente a un escalón de un 10% de  $\mu_{max}$ . El resultado obtenido

no presenta la oscilación que posee la respuesta con un menor tiempo de muestreo y posee una dinámica similar al observado para el caso en que el intervalo de muestreo es 1 [hr] con una diferencia notoria al comparar el valor del estado estacionario. Como se planteó antes, una restricción de la concentración de glucosa da cabida a la alimentación de concentraciones sub-óptimas, caso presente en la simulación de la Figura 6.63. Se puede notar de la Figura 6.62 que, a partir de aproximadamente las 13 horas de simulación, la concentración de glucosa alimentada posee una dinámica creciente que ocurre a concentraciones superiores a 4,8 [mM] y, dado que existe una restricción sobre las concentraciones disponibles, la dinámica observada en la Figura 6.63 es constante e igual a 4,776 [mM]. La alimentación sub-óptima de glucosa es la que genera una diferencia en el signo y magnitud del off-set principalmente porque una menor concentración que la óptima requerida por el cultivo genera una menor disponibilidad de glucosa residual y, por la función reguladora, una menor tasa de producción de lactato para el consumo de glucosa del cultivo, es decir, menor  $\Delta L/\Delta G$ .

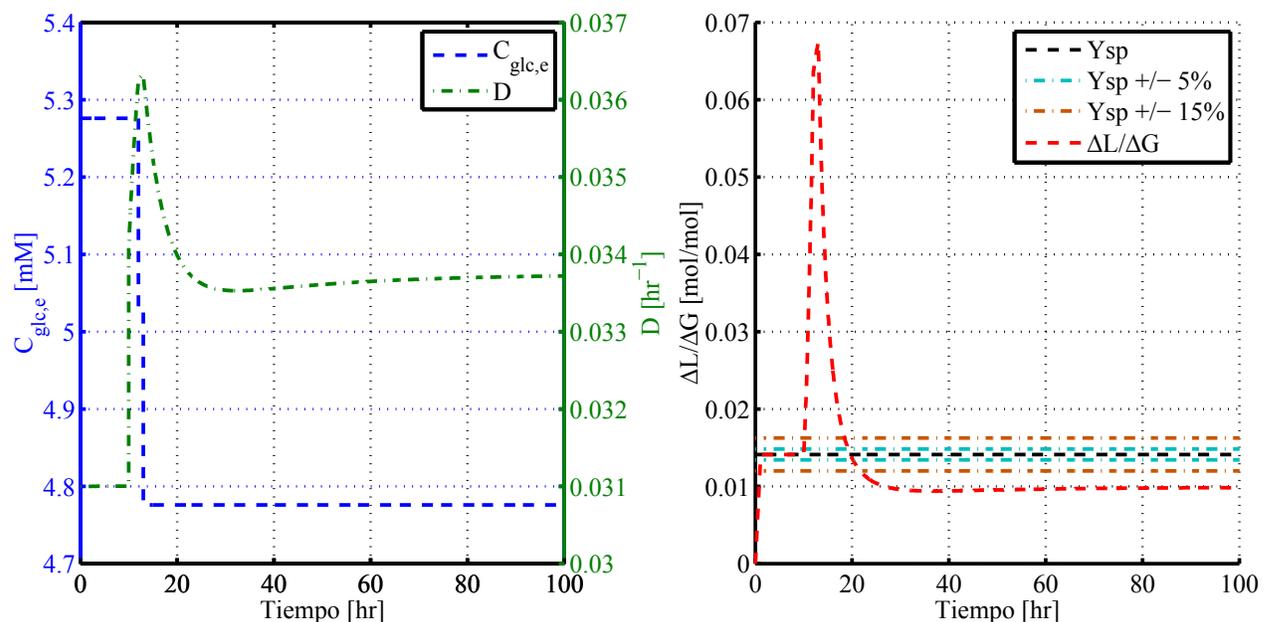


Figura 6.63: Respuesta del controlador basado en modelo lineal de la Figura 6.30, con el intervalo de muestreo modificado a 1 [hr] y restricciones sobre la concentración de glucosa disponible, frente a un escalón de un 10% de la tasa de crecimiento celular máxima,  $\mu_{max}$ , con la inclusión del lazo de control óptimo de la concentración de glucosa de entrada con el lazo de control de crecimiento celular cerrado.

Al igual que para el caso del aumento del tiempo de muestreo, no fue factible simular la aproximación discreta del controlador proporcional debido a la ganancia de ésta.

## 6.8. Discusiones

Luego de simular las respuestas con lazos de control proporcional y basado en modelo lineal se observó un tiempo de respuesta del controlador proporcional de aproximadamente 17 horas mientras que el controlador basado en modelo no alcanzó un estado estacionario dentro de la banda estipulada de un 5% del set point debido a la existencia de un offset negativo de un 12%. Por otra parte, el tiempo de estabilización ( $t_{95\%}$ , tiempo de demora en alcanzar un 95% del estado estacionario) de los controladores proporcional y basado en modelo son de 17 horas y de 8 horas, respectivamente, lo que significa una reducción de más de un 50% al utilizar un controlador basado en modelo lineal. De los resultados anteriormente expuestos queda claro que el rendimiento del controlador proporcional, en lo que concierne al problema de regulación de control, es muy superior al controlador basado en modelo lineal. No es posible una comparación de tiempos de respuesta con el controlador basado en modelo lineal debido a que el controlador de modelo basado en modelo lineal no alcanza un estado estacionario de  $\Delta L/\Delta G$  dentro de la banda fijada pero cabe destacar que el tiempo de estabilización del controlador basado en modelo lineal es mucho menor al observado para el controlador proporcional lo que permite suponer que, de lograr una respuesta del controlador basado en modelo libre de offset, tendría un tiempo de respuesta inferior al controlador proporcional.

Una posibilidad para superar los problemas de offset del controlador basado en modelo lineal es la inclusión de la tasa de crecimiento celular,  $\mu$  en el modelo de proceso. Sin embargo, al ampliar el número de variables del cual depende el modelo de proceso se hace inevitable una mayor dificultad para rescatar la respuesta metabólica, esto porque el modelo se tendría que ajustar a diversos patrones nuevos debido a que la tasa  $\mu$  es una función no lineal que depende de la concentración de glucosa, de lactato, y de los parámetros  $\mu_{max}$ ,  $K_{glc}^S$  y  $K_{lac}^I$ .

La comparación de las dinámicas observadas entre los controladores proporcional y basado en modelo lineal muestra una clara similitud, ambas respuestas de control poseen una dinámica altamente oscilatoria que sería difícil de lograr a nivel industrial debido a la precisión de los requerimientos de concentración de glucosa alimentada y a la alta frecuencia de cambio de la variable manipulable; sobre todo el perfil del controlador basado en modelo lineal, serían difíciles de obtener a nivel industrial los perfiles de glucosa de ambos controladores debido a la gran precisión de los valores y la gran variedad de las concentraciones requeridas. Los perfiles de concentración

de glucosa alimentada simuladas requieren de una fuente capaz de generar medios de alimentación con cualquier concentración de glucosa, algo que es improbable de lograr a escala industrial debido a que comúnmente se dispone únicamente de una cantidad finita de medios con diferentes concentraciones cuya alimentación es regulada por medio de bombas ON/OFF.

Además, las respuestas simuladas indican que la implementación de cualquiera de ambos controladores requeriría de un actuador robusto que no sea fácilmente desgastado por la alta frecuencia de cambios en la variable manipulable y/o de un lazo de control adicional sobre el actuador para obtener valores precisos de concentraciones de glucosa, dicho actuador tendría mayor exigencia en el caso del controlador basado en modelo lineal debido a la mayor frecuencia de oscilación que éste presenta. Esto bajo la premisa de que a nivel industrial existe un equipo capaz de generar cualquier dilución de glucosa.

Ahora bien, el estudio de restricciones sobre la concentración de glucosa alimentada y el aumento del intervalo de muestreo pone de manifiesto una clara ventaja del controlador basado en modelo lineal por sobre el controlador proporcional en lo que respecta la implementación de dichos controladores. Los análisis que se llevaron a cabo permitieron observar los problemas que surgen al alimentar un controlador continuo de información discreta y la carencia de versatilidad que poseen éstos frente a limitaciones prácticas como la restricción de las concentraciones de alimentación disponibles.

Es por los puntos antes señalados que el controlador basado en modelo lineal es un controlador de mayor viabilidad con miras a la implementación. Sin embargo, posee una gran debilidad frente a perturbaciones no medibles constantes pues existe una relación prácticamente lineal entre el offset de la respuesta de control y la magnitud de la perturbación no medible analizada.

En cuanto a las medidas de mitigación de posibles problemas de implementación que podrían surgir producto de limitaciones operacionales que pueden existir, las respuestas de las Figuras 6.58 y 6.59 muestran que la alimentación de una concentración sub-óptima genera una mayor amplitud de oscilación de la respuesta de control lo que, en términos prácticos, únicamente solucionaría un potencial problema de disponibilidad de concentraciones pero no evita posibles problemas de desgaste del actuador. Sin embargo, de la simulación del controlador basado en modelo lineal con una modificación del intervalo de muestreo, sí se puede lograr una respuesta de control menos agresiva sin modificación de los parámetros del controlador, lo que permite suponer que dicha solución tiene mejor aplicación práctica frente a los problemas de oscilación observados aunque a

costa del offset del estado estacionario; para el controlador basado en modelo lineal la restricción de las concentraciones de glucosa disponible redujo la frecuencia de oscilación a 1,4 oscilaciones por cada hora aproximadamente a 0,02 oscilaciones por hora, se aumentó el offset de un 12 % a cerca de un 29 %.

La comparación del controlador de modelo basado en modelo lineal con su homólogo no lineal vislumbra una aparente superioridad por parte del controlador lineal para el problema planteado en la presente tesis. Los resultados obtenidos para el controlador no lineal dejan en evidencia una gran incidencia del modelo de proceso en la respuesta del controlador lo que correspondería a un problema de implementación del controlador y no a una desventaja absoluta del controlador basado en modelo no lineal frente a su par lineal. El pobre desempeño del modelo de proceso no lineal utilizado queda al descubierto al hacer la comparación de ambos controladores basados en modelo frente a la perturbación medible del coeficiente de dilución, variable estipulada en ambos modelos de proceso.

El pobre desempeño del modelo de proceso no lineal en comparación al modelo de proceso lineal sorprende en vista de la gran exactitud con que la red neuronal escogida capta los datos utilizados para su entrenamiento y validación (ver Figura 6.39) y más aún al comparar el desempeño del ajuste del modelo lineal a los datos utilizados para su ajuste (ver Figura 6.24). Sin embargo, es lo anterior que otorga una alta probabilidad de que ocurrió un error de sobre ajuste del modelo no lineal.

Cabe destacar que existen múltiples factores que inciden en la calidad de la respuesta del controlador basado en modelo no lineal, entre dichos factores están los parámetros de ajuste del controlador  $\lambda$ ,  $Q$ ,  $N_p$  y  $N_c$ , los parámetros de construcción de la red neuronal como el intervalo de muestreo, los datos utilizados para el ajuste de los parámetros de red, la función de activación de la capa de salida y la arquitectura de la red, y los parámetros propios del controlador como es la función objetivo. Si bien la mayoría de los parámetros anteriores pueden obtenerse de manera simple y justificada, el hecho de que exista tal cantidad de parámetros a ajustar aumenta significativamente las fuentes de error en comparación con un controlador más simple como es el controlador proporcional y da cabida para que el controlador basado en modelo no lineal sea un controlador difícil de ajustar para el caso del problema de regulación planteado en la presente tesis.

No obstante existe la posibilidad de modificar las metodologías y suposiciones realizadas para la estimación de los parámetros del controlador basado en modelo no lineal y lograr resultados

diferentes. Ejemplos de lo anterior serían realizar un nuevo ajuste de parámetros de red con la modificación de la función de activación de la capa de salida de la red neuronal o utilizar un conjunto diferente de datos con intervalos de muestreo más largos y/o con una mayor duración de los patrones estipulados para que, con la identificación de sistemas, el modelo de procesos tenga una precisión enfocada hacia captar el estado estacionario más que los valores transientes de las dinámicas incluidas dentro del muestreo.

Por otra parte, los problemas de offset exhibidos producto de una mala implementación de modelo de proceso permiten suponer que el modelo de proceso del controlador basado en modelo lineal presentaría, con una alta probabilidad, problemas de implementación a escala industrial. La predicción de problemas de implementación del controlador basado en modelo lineal se debe a que, si bien las respuestas simuladas utilizan como referencia del proceso real un cultivo celular simulado por medio del modelo metabólico simplificado, que es representativo de datos experimentales provenientes de la literatura, dicho modelo no es exento de errores de ajuste por lo que podría generarse una propagación de errores al momento de implementar el controlador basado en modelo lineal. Sin embargo, sería posible la utilización del modelo metabólico simplificado para representar el proceso real como modelo de proceso en un controlador basado en modelo, lo que factiblemente reduciría el error de implementación del modelo de proceso pues considera todas las variables de entrada, salida y perturbaciones medibles y no medibles. Ahora bien, la simulación de los lazos de control considerando el modelo metabólico simplificado como referencia de un cultivo real permitió estudiar las distintas ventajas y desventajas de los diferentes controladores, así como los problemas de implementación que podrían existir.

Para el ajuste del parámetro  $\lambda$  se realizaron los análisis pertinentes, a través del cálculo y comparación del ITAE para valores de diferente orden de magnitud cercanos a los óptimos encontrados, para descartar posibles fuentes de errores de optimización producto de la existencia de mínimos locales. Sin embargo, los análisis realizados solamente sirven como perspectiva de una vecindad del óptimo encontrado lo que descarta ciertas fuentes de error pero no anulan la probabilidad de la existencia de un mínimo global del ITAE que difiere del óptimo encontrado.

El análisis de las respuestas de los diferentes controladores diseñados con el lazo de crecimiento celular cerrado confirma una fuerte incidencia de este último. A pesar de la diferencia clara a nivel de tiempos de respuesta y de offsets, todos los controladores poseen una respuesta sub-amortiguada ( $\zeta < 1$ ), fácilmente identificable por la existencia de una respuesta oscilatoria. Las altas frecuencia de

oscilación observadas, producto del cierre de todos los lazos de control, permite suponer posibles problemas de implementación de cualquiera de los controladores descritos en conjunto con un control perfecto del crecimiento celular.

Tanto para el controlador proporcional como el basado en modelo lineal se observaron resultados esperables relacionados con la dinámica de la respuesta de control. Para el caso del controlador proporcional, la comparación de la respuesta de lazo cerrado para dos ganancias de control diferentes demostró que una mayor ganancia genera una acción de control más agresiva que repercute en la oscilación que presenta la respuesta de control pues si bien se observó una menor amplitud máxima de oscilación para el caso de mayor ganancia, éste presentó un mayor tiempo de estabilización producto de una mayor frecuencia de oscilación. Por otra parte, para el controlador basado en modelo lineal fue posible apreciar que una reducción de costo de variación de la variable manipulable,  $\lambda$ , genera una mayor frecuencia de oscilación junto con una disminución del tiempo de estabilización.

La minimización de ITAE fue una elección viable al momento de escoger un método matemática para optimizar la respuesta de control del sistema pero luego del análisis de los tiempos de respuesta de los controladores se observa un tramo considerable en que el controlador mantiene un valor de  $\Delta L/\Delta G$  estable con lo que queda en evidencia la posibilidad de reducir el intervalo de tiempo utilizado para la minimización del ITAE para lograr tiempos de respuesta menores. A pesar de lo anterior, el intervalo de optimización se escogió en base a requerimientos experimentales comunes y por tanto son válidos para un estudio de comparación de diferentes controladores.

Ahora bien, el análisis de las respuestas de lazo cerrado y del criterio de minimización del ITAE también permiten suponer que hay una alta probabilidad de que la fuente de tan alta frecuencia de oscilación sea producto de la sobre-exigencia al controlador de lograr tiempos de respuesta acotados, siendo una posible solución a dicho problema la utilización de otras metodologías de ajuste como el criterio de minimización del IAE.

# Capítulo 7

## Conclusiones

La complejidad del problema abarcado en la presente tesis posee varias aristas. Por una parte se encuentra el problema de plantear un modelo matemático capaz de representar la dinámica de un cultivo celular bajo diferentes condiciones de cultivo. La tarea de ajustar modelos a curvas experimentales independientes de las utilizadas originalmente para dichos modelos requiere de la comprensión del modelo lo que incluye conocer la línea celular en la cual se basó y las fuentes de las diferentes cinéticas que se recopilan para la construcción del modelo. Encontrar un recopilación de cinéticas probadas para una misma línea celular es algo casi imposible por lo que recurrir a modelos ajustados para diferentes líneas celulares se torna inevitable.

De la simplificación del modelo inicial, si bien se puede considerar como un enfoque reduccionista del problema que se aborda y que puede provocar pérdidas de generalidad, la comprensión de los criterios teóricos asociados permite llegar a buen resultado. En el caso específico del modelo simplificado utilizado en la presente tesis, el modelo sin regulación se validó para los mismos casos de simulación que para el modelo inicial y se realizaron los mismos análisis de estabilidad que culminaron con los mismos resultados. De esta manera puede considerarse que el modelo simplificado es una fiel representación del sistema biológico planteado.

Por otra parte, un modelo metabólico de alta complejidad permite analizar el comportamiento de metabolitos específicos pero, para fines prácticos, como el diseño de controladores, no es un requerimiento estricto. Un modelo simplificado capaz de relacionar correctamente las variables de entrada y de salida de un sistema determinado es deseable para el diseño de controladores debido al significativo ahorro computacional que genera y a que evita problemas de incertidumbre de modelo que hacen recurrir a modelos de caja negra o generalizaciones burdas.

Los resultados de la simulación de los cultivos alterados demuestran que el modelo de regula-

ción permitió al modelo metabólico captar la respuesta metabólica alterada. Los modelos metabólicos comúnmente se encuentran validados para una única condición de operación lo que requiere de parámetros dinámicos capaces de adaptarse a diferentes condiciones de cultivo. Esto se pudo constatar por medio de la estabilidad del sistema frente a perturbaciones en las condiciones de cultivo, el modelo de parámetros estáticos planteado inicialmente no fue capaz de alcanzar más de un estado estacionario lo que imposibilitó la capacidad de retratar la dinámica del fenómeno de la variación del estado metabólico con un único juego de parámetros. La correcta interpretación de los análisis del nivel de expresión génica presentados en [15] permitió suponer que el fenómeno de regulación del estado metabólico, si bien no es una mutación génica del cultivo celular pues posee es reversible, si puede estar relacionado con una variación de la concentración de enzimas. Por otra parte, los resultados experimentales que revelan la dependencia de la tasa de producción de lactato de la concentración residual de glucosa, sumado a que dicha dependencia es continua, corroboran experimentalmente que los criterios utilizados para el planteamiento del modelo de regulación son válidos.

De esta manera, se obtuvo como uno de los resultados principales de la presente tesis un modelo metabólico capaz de representar la multiplicidad de estados estacionarios del fenómeno de variación del estado metabólico. La inclusión del modelo de regulación en el modelo metabólico simplificado permitió representar cualitativamente y cuantitativamente un cultivo celular de estado metabólico alterado, algo inédito y de gran utilidad para la simulación de cultivos celulares animales que presentan variabilidad en sus condiciones de cultivo. La obtención de un modelo metabólico capaz de simular la respuesta metabólica de un cultivo de células CHO bajo diferentes condiciones de cultivo significa además un importante ahorro en costos asociados a la recopilación de datos experimentales y permite estudiar diferentes respuestas simuladas sin la necesidad de un montaje experimental y personal especializado.

Los principales resultados de las simulaciones de la presente tesis permiten concluir que las metodologías de ajuste de parámetros, tanto para los modelos metabólicos estudiados como para los controladores diseñados, fueron válidamente escogidos. Los resultados de ajuste obtenidos son comparables con los marcos teóricos establecidos y fueron debidamente corroborados por medio de estudios estadísticos. Sumado a lo anterior, las metodologías de ajuste presentados en la presente tesis también pueden ser utilizados para ajustar el modelo metabólico resultante para simular líneas celulares animales de diferentes especies, e incluso se puede utilizar el modelo metabólico obtenido

como base de estudio para otras líneas celulares pues es una fuente asertiva de cinéticas enzimáticas.

La comparación de los controladores diseñados establecen que el controlador proporcional es el que mejor se atiene a los criterios de diseño clásicos que integran el tiempo de respuesta y la capacidad de lograr una estabilización dentro de la banda de control establecido en marco al problema de regulación, así como presentar la robustez necesaria frente a perturbaciones de diferente magnitud.

El tiempo de respuesta del controlador proporcional fue de cerca de 17 horas mientras que el controlador basado en modelo lineal no fue capaz de estabilizarse dentro de la banda establecida con respecto al set point pues posee un offset negativo de un 12 % para una perturbación de un 10 % de la tasa máxima de crecimiento celular,  $\mu$ . Sin embargo, se observó que el controlador basado en modelo lineal posee un tiempo de estabilización menor al 50 % del tiempo de estabilización del controlador proporcional lo que supone que, de solucionar los problemas de implementación que generan offset, el controlador basado en modelo lineal tendría un tiempo de respuesta inferior a las 17 horas del controlador proporcional.

En cuanto a la robustez de los controladores más destacados, el controlador proporcional mostró una nula variación del offset frente a un aumento de magnitud de la perturbación estudiada mientras que para el controlador basado en modelo lineal se encontró una relación lineal, entre la magnitud de perturbación y la magnitud del offset, con un coeficiente de correlación  $R^2$  de 0,9902.

De la comparación de la respuesta de los controladores bajo restricciones factibles se concluye que el controlador basado en modelo lineal tiene la versatilidad suficiente para adaptarse a posibles restricciones en la concentración de glucosa alimentada pues presenta una menor sensibilidad frente a dicha restricción lo que repercute a nivel de amplitud de oscilación de la respuesta de control. Además, el estudio de factibilidad de un aumento del intervalo de muestreo señala que el controlador basado en modelo puede ser utilizado en conjunto con equipos de medición que restringen el intervalo de muestreo a valores al menos 2 veces mayor a la cota máxima aceptable para una discretización del controlador proporcional.

Se puede concluir respecto a las posibles implementaciones de los controladores diseñados que las simulaciones indican una respuesta de control de alta frecuencia de oscilación producto de la interacción de los lazos de control estipulados. Ahora, si bien para el ajuste de los controladores simulados existe una compensación entre el tiempo de respuesta y dicha frecuencia de oscilación, darle mayor relevancia a una respuesta de menor oscilación no incurre en tiempos de respuesta

fuera de tiempos de cultivo comúnmente observados. Por lo tanto, el análisis del equilibrio entre el tiempo de respuesta del controlador y la frecuencia de oscilación que afectará al actuador debe ser tomado en consideración y analizado considerando el objetivo operacional del bio-proceso si es que se implementara uno de los lazos de control descritos en la presente tesis.

De esta manera, se presenta una dualidad en el ámbito de la comparación en donde se pueden valorar los resultados simulados y su atención a los criterios de diseño o la versatilidad requerida para solucionar los posibles problemas de implementación que podrían existir. En vista de la existencia de la anterior dualidad se considera como resultado favorable el grado de implementación del controlador por lo que el controlador basado en modelo lineal sería la mejor opción frente al problema específico de la regulación del estado metabólico de cultivos celulares animales.

Además de los resultados de la comparación de los controladores proporcional y basado en modelo lineal, el mal rendimiento del controlador basado en modelo no lineal mostró fuertes indicadores de los problemas que puede traer una mala implementación del controlador basado en modelo. La dependencia de la predicción de una representación del proceso a controlar otorga gran importancia a la elección de dicha representación pues el grado de representatividad afectará directamente el desempeño global del controlador. Por otra parte, puede considerarse inesperado el mal rendimiento del controlador basado en modelo no lineal debido a que se ajusta con un coeficiente  $R^2$  sobre 0,99, que es un 50% superior a lo observado para el controlador basado en modelo lineal. Aún así, el ITAE mínimo para la respuesta de lazo cerrado del controlador basado en modelo lineal es 20, un 13,78% del valor del ITAE mínimo obtenido para la respuesta de lazo cerrado del controlador basado en modelo no lineal. Son los factores anteriores los que permiten suponer que es muy factible que el pobre desempeño del controlador basado en modelo no lineal se debe a un error de generalización del modelo de proceso.

Posibles mejoras de los resultados expuestos serían por medio de la modificación de algunas metodologías de ajuste, específicamente para el ajuste de los parámetros de los controladores simulados. Si bien las metodologías escogidas fueron adecuadas para el fin de simular y analizar las respuestas de control, sería posible obtener leves mejoras en los tiempos de estabilización de los controladores de usarse un intervalo más acotado para la minimización del ITAE.

Como recomendación de línea de trabajo futuro sería la resolución de los problemas de rendimiento de los controladores basados en modelos. Por una parte, la solución de los problemas de offset que presenta el controlador basado en modelo lineal es algo que podría resolverse conside-

rando un adecuado análisis del problema y los factores que inciden en ella, antecedentes que han sido parcialmente expuestos en la presente tesis. Por otra parte, los problemas de rendimiento del controlador basado en modelo no lineal podrían requerir de la construcción de un nuevo modelo de proceso utilizando un conjunto de datos de entrenamiento de mayor envergadura para poder abarcar un espectro mayor de condiciones de operación y su efecto sobre la razón  $\Delta L/\Delta G$ .

# Glosario

## Abreviaciones de enzimas

- 6PGD: 6-fosfogluconato deshidrogenasa
- A: Sistema A de transporte de aminoácidos
- ACON: Aconitasa
- ALDO: Aldolasa
- ASC: Sistema ASC de transporte de aminoácidos
- ATA: Alanina Transaminasa
- BSL(N): Biosíntesis de lípidos (nucleótidos)
- CS: Citrato sintasa
- EN: Enolasa
- EP: Ribulosa fosfato epimerasa
- FUMH: Fumarasa
- G6PD: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
- GlcTr: Transportador de glucosa
- GPI: Gliceraldehido fosfato isomerasa
- GSHOX: Oxidación de glutatona
- GSSGR: Glutatona reductasa
- HK: Hexoquinasa
- IDH: Isocitrato deshidrogenasa
- KGDH:  $\alpha$ -ketoglutarato deshidrogenasa
- L: Sistema L de transporte de aminoácidos
- LDH: Lactato deshidrogenasa

MCT: Transportador monocarboxilato  
MDH: Malato deshidrogenasa  
N: Transportador neutral de aminoácidos  
PDHC: Complejo piruvato deshidrogenasa  
PFK: Fosfofructoquinasa  
PGI: Glucosa 6-fosfato isomerasa  
PGK: Fosfoglicerato quinasa  
PGM: Fosfoglicerato mutasa  
PK: Piruvato quinasa  
PRPPS: Fosforibosilpirofosfato sintetasa  
RN: Regeneración de NAD  
RPI: Ribosa fosfato isomerasa  
SCS: Succinil CoA Sintetasa  
SDH: Succinato deshidrogenasa  
TA: Transaldolasa  
TCT: Transportador de tricarboxilato  
TK1: Transketolasa 1  
TK2: Transketolasa 2  
TPI: Triosefosfato Isomerasa  
X: Sistema ácido  $X^-$  de transporte de aminoácidos  
Y: Sistema básico  $Y^+$  de transporte de aminoácidos

### **Abreviaciones para especies**

1,3P2G: 1,3-bifosfoglicerato  
2,3P2G: 2,3-bifosfoglicerato  
2PG: 2-fosfoglicerato  
3PG: 3-fosfoglicerato  
6PGlcL: 6-fosfoglucono-lactona

$\alpha$ KG:  $\alpha$ -ketoglutarato  
AC: Acetato  
AcCoA: Acetyl coenzima A  
AcLipAH: Acetil lipoato coenzima A  
Acon: Aconitato  
ADP: Adenosina difosfato  
ALA: Alanina  
ALDE: Aldehido  
AMP: Adenosina monofosfato  
ARG: Arginina  
ASN: Asparagina  
ASP: Ácido aspártico  
ATP: Adenosina trifosfato  
BPG: bi-fosfoglicerato  
CIT: Citrato  
CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono  
CoA: Coenzima A  
CYS: Cisteína  
DHAP: Dihidroxiacetona-fosfato  
E4P: Eritrosa 4-fosfato  
ETOH: Etanol  
F6P: Fructosa 6-fosfato  
FAD(H): Flavina adenina dinucleótido (reduced)  
FBP: Fructosa bifosfato  
FUM: Fumarato  
G3P: Glicerol 3-fosfato  
G6P: Glucosa 6-fosfato  
GAP: Gliceraldehído 3-fosfato

GBP: Glucosa 1,6-bifosfato  
GLC: Glucosa  
GLN: Glutamina  
GLU: Ácido glutámico  
GLY: Glicina  
Glyc: Glicerol  
GSH(GSSG): Red(ox) glutationa  
H<sup>+</sup> Protón  
HIS: Histidina  
ICIT: Isocitrato  
ILE: Isoleucina  
LAC: Lactato  
LEU: Leucina  
LipA(H): Lipoato coenzima A (forma reducida)  
LYS: Lisina  
Mal: Malato  
MET: Metionina  
Mg: Magnesio  
NAD(P): Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)  
NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato), forma reducida  
O<sub>2</sub>: Oxígeno  
OAA: Oxaloacetato  
P<sub>i</sub>: Fosfato  
PEP: Fosfoenol piruvato  
PHE: Fenilalanina  
PRO: Prolina  
PRPP: Fosforibosil pirofosfato  
PYR: Piruvato

R5P: Ribosa 5-fosfato

Ru5P: Ribulosa 5-fosfato

SER: Serina

SH7P: Sedoheptulosa 7-fosfato

SUC: Succinato

SCoA: Succinil coenzima A

THR: Treonina

TPP(H): Tiamina pirofosfato (forma reducida)

TRP: Triptofan

TYR: Tirosina

VAL: Valina

Xyl5P: Xilulosa 5-fosfato

# Referencias

- [1] B. T. P. Practice, “Bio - biotechnology industry organization,” in *Technology, talent and capital: State bioscience initiatives 2008*, 2008.
- [2] K. Aggarwal, F. Jing, L. Maranga, and J. Liu, “Bioprocess optimization for cell culture based influenza vaccine production,” *Vaccine*, vol. 29, pp. 3320–3328, 2011.
- [3] C. Conesa, M. Calvo, and L. Sánchez, “Recombinant human lactoferrin: A valuable protein for pharmaceutical products and functional foods,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, pp. 831–838, 2010.
- [4] J. Gao, V. M. Gorenflo, J. M. Scharer, and H. M. Budman, “Dynamic metabolic modeling for a mab bioprocess.,” *Biotechnol. Progr.*, vol. 23, no. 1, pp. 168–181, 2007.
- [5] R. Harun, M. Singh, G. M. Forde, and M. K. D. and, “Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products,” *Renew. Sust. Energ. Rev.*, vol. 14, pp. 1037–1047, 2010.
- [6] A. Provost, G. Bastin, S. N. Agathos, and Y. Schneider, “Metabolic design of macroscopic bioreaction models: application to chinese hamster ovary cells,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 29, pp. 349–366, 2006.
- [7] C.-F. Mandenius and A. Brundin, “Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology,” *Biotechnol. Progr.*, vol. 24(6), pp. 1191–1203, 2008.
- [8] J. Strnad, M. Brinc, V. Spudic, N. Jelnicar, L. Mirnik, B. Carman, and Z. Kravanja, “Optimization of cultivation conditions in spin tubes for cho cells producing erythropoietin,” *Computer Aided Chemical Engineering*, vol. 28, pp. 235–240, 2010.
- [9] W. Zhou and W. Hu, “On-line characterization of a hybridoma cell culture process.,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 44, pp. 170–177, Jun 1994.

- [10] S. J. Qin and T. A. Badgwell, "A survey of industrial model predictive control technology," *Control Eng. Pract.*, vol. 11, pp. 733–764, 2003.
- [11] NC-ICBMB and E. C. Webb, eds., *Nomenclature 1992: Recommendations of the NCIUBMB on the nomenclature and classification of enzymes*. Academic Press, 1992.
- [12] A. Gambhir, R. Korke, J. Lee, P.-C. Fu, A. Europa, and W.-S. Hu, "Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 95, no. 4, pp. 317–327, 2003.
- [13] H. J. Cruz, J. L. Moreira, and M. J. Carrondo, "Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of bhk cells.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 66, no. 2, pp. 104–113, 1999.
- [14] H. R. Zielke, P. T. Ozand, J. T. Tildon, D. A. Sevdalian, and M. Cornblath, "Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts.," *J Cell Physiol*, vol. 95, pp. 41–48, Apr 1978.
- [15] R. Korke, M. de Leon Gatti, A. L. Y. Lau, J. W. E. Lim, T. K. Seow, M. C. M. Chung, and W.-S. Hu, "Large scale gene expression profiling of metabolic shift of mammalian cells in culture.," *J. Biotechnol.*, vol. 107, pp. 1–17, Jan 2004.
- [16] C. Kontoravdi, D. Wong, C. Lam, Y. Lea, M. Yap, E. Pistikopoulos, and A. Mantalaris, "Modeling amino acid metabolism in mammalian cells - toward the development of a model library," *Biotechnol. Prog.*, vol. 23, pp. 1261–1269, 2007.
- [17] C. Mechorsen, N. Jensen, B. Christensen, K. Vaever Jokumsen, and J. Villadsen, "Dynamics of pyruvate metabolism in lactococcus lactis," *Biotechnol Bioeng*, vol. 74, pp. 271–279, 2001.
- [18] R. P. Nolan and K. Lee, "Dynamic model of cho cell metabolism," *Metabolic Engineering*, vol. 13, pp. 108–124, 2011.
- [19] A. Provost and G. Bastin, "Dynamic metabolic modelling under the balanced growth condition," *Journal of Process Control*, vol. 14, pp. 717–728, 2004.
- [20] M. J. Herrgard, N. Swainston, P. Dobson, W. B. Dunn, K. Y. Arga, M. Arvas, N. Blüthgen, S. Borger, R. Costenoble, M. Heinemann, M. Hucka, N. L. Novère, P. Li, W. Liebermeister,

- M. L. Mo, A. P. Oliveira, D. Petranovic, S. Pettifer, E. Simeonidis, K. Smallbone, I. Spasic, D. Weichart, R. Brent, D. S. Broomhead, H. V. Westerhoff, B. Kirdar, M. Penttilä, E. Klipp, B. o Palsson, U. Sauer, S. G. Oliver, P. Mendes, J. Nielsen, and D. B. Kell, “A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 26(10), pp. 1155–1160, 2008.
- [21] Z. P. Gerdtzen, *Modeling, analysis and theoretical exploration of the metabolism of mammalian cells in culture*. PhD thesis, Department of Chemical Engineering and Materials Science, University of Minnesota, 2005.
- [22] S. Cha, “A simple method for derivation of rate equations for enzyme-catalyzed reactions under the rapid equilibrium assumption or combined assumptions of equilibrium and steady state.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 243, pp. 820–825, Feb 1968.
- [23] L. Michaelis and M. Menten, “Kinetik der invertinwirkung,” *Biochem. Z.*, vol. 49, pp. 333–369, 1913.
- [24] H. R. Zielke, C. L. Zielke, and P. T. Ozand, “Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells.,” *Fed Proc*, vol. 43, pp. 121–125, Jan 1984.
- [25] A. F. Europa, A. Gambhir, P. C. Fu, and W. S. Hu, “Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells.,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 67, pp. 25–34, Jan 2000.
- [26] W. Hu, *Cellular Bioprocess Technology*. University of Minnesota, 2009.
- [27] P. J. Mulquiney and P. W. Kuchel, “Model of 2,3-biphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: equations and parameter refinement,” *Biochem. J.*, vol. 342, pp. 581–596, 1999.
- [28] M. Schauer, R. Heinrich, and S. Rapoport, “Mathematical modelling of glycolysis and adenine nucleotide metabolism of human erythrocytes. i. reaction-kinetic statements, analysis of in vivo state and determination of starting conditions for in vitro experiments,” *Acta. Biol. Med. Ger.*, vol. 40(12), pp. 1659–1682, 1981.

- [29] M. Otto, R. Heinrich, B. Kühn, and G. Jacobasch, "A mathematical model for the influence of fructose 6-phosphate, atp, potassium, ammonium and magnesium on the phosphofructokinase from rat erythrocytes," *Eur. J. Biochem.*, vol. 49(1), pp. 169–178, 1974.
- [30] H.-G. Holzhütter, G. Jacobasch, and A. Bisdorff, "Mathematical modelling of metabolic pathways affected by an enzyme deficiency," *Eur. J. Biochem.*, vol. 149(1), pp. 101–111, 1985.
- [31] D. R. Thorburn and P. W. Kuchel, "Regulation of the human-erythrocyte hexose-monophosphate shunt under conditions of oxidative stress," *Eur. J. Biochem.*, vol. 150(2), pp. 371–386, 1985.
- [32] J. C. Lagarias, J. A. Reeds, M. H. Wright, and P. E. Wright, "Convergence properties of the nelder-mead simplex method in low dimensions," *Siam. J. Optim.*, vol. 9, pp. 112–147, 1998.
- [33] H. A. David and J. L. Gunnink, "The paired t test under artificial pairing," *Am. Stat.*, vol. 51(1), pp. 9–12, 1997.
- [34] R. A. Fisher, J. H. Bennett, and F. Yates, *Statistical methods, experimental design, and scientific inference: A re-issue of statistical methods for research workers, the design of experiments, and statistical methods And scientific inference*. Oxford University Press, 1990.
- [35] C. A. Wilkens, "Análisis comparativo del metabolismo de lactato para células cho en glucosa y galactosa," Master's thesis, Universidad de Chile, 2011.
- [36] A. Carruthers, J. DeZutter, A. Ganguly, and S. U. Devaskar, "Will the original glucose transporter isoform please stand up!," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 297, pp. E836–E848, 2009.
- [37] M. J. Lambeth and M. J. Kushmerick, "A computational model for glycogenolysis in skeletal muscle," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 30, pp. 808–827, 2002.
- [38] R. C. Poole and A. P. Halestrap, "Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 264, pp. C761–C782, 1993.

- [39] H. Katagiri, T. Asano, H. Ishihara, K. Tsukuda, J. L. Lin, K. Inukai, M. Kikuchi, Y. Yazaki, and Y. Oka, "Replacement of intracellular c-terminal domain of glut1 glucose transporter with that of glut2 increases v<sub>max</sub> and k<sub>m</sub> of transport activity.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, pp. 22550–22555, Nov 1992.
- [40] E. Wertheimer, S. Sasson, E. Cerasi, and Y. Ben-Neriah, "The ubiquitous glucose transporter glut-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, pp. 2525–2529, Mar 1991.
- [41] J. Lee, *Manipulation of mammalian cell metabolism via process control and genetic engineering*. PhD thesis, Department of Chemical Engineering and Materials Science, University of Minnesota, 2005.
- [42] U. Alon, *An introduction to systems biology: Design principles of biological circuits*. Chapman & Hall/CRC, 2007.
- [43] J. Neermann and R. Wagner, "Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells," *J. Cell. Phys.*, vol. 166(1), pp. 152–169, 1996.
- [44] G. Ackers, A. Johnson, and M. Shea, "Quantitative model for gene regulation by lambda phage repressor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 79, pp. 1129–113, 1982.
- [45] T. Akutsu, S. Miyano, and S. Kuhara, "Identification of genetic networks from a small number of gene expression patterns under the boolean network model," in *Pacific Symposium on Biocomputing*, 1999.
- [46] T. Akutsu, S. Miyano, and S. Kuhara, "Inferring qualitative relations in genetic networks and metabolic pathways," *Bioinformatics*, vol. 16, pp. 727–734, 2000.
- [47] T. Chen, H. He, and G. Church, "Modeling gene expression with equations," in *Pacific Symposium on Biocomputing*, 1999.
- [48] K. Y. Rani and V. R. Rao, "Control of fermenters - a review," *Bioprocess Eng.*, vol. 21, pp. 77–88, 1999.

- [49] P. B. Sistu and B. W. Bequette, "A comparison of nonlinear control techniques for continuous stirred tank reactors," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 47, pp. 2553–2558, 1992.
- [50] S. Zulkeflee and N. Aziz, "Control implementation in bioprocess system: A review," in *International Conference on Control, Instrumentation and Mechatronics Engineering*, 2007.
- [51] B. A. Ogunnaike and W. H. Ray, *Process dynamics, modeling, and control*. Oxford University Press, USA, 1994.
- [52] G. Stephanopoulos, *Chemical process control: An introduction to theory and practice*. Prent, 1984.
- [53] M. A. Henson and D. E. Seborg, "Nonlinear control strategies for continuous fermenters," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 47(4), pp. 821–835, 1992.
- [54] M. A. Henson, "Nonlinear model predictive control: current status and future directions," *Comput. Chem. Eng.*, vol. 23, pp. 187–202, 1998.
- [55] G.-Y. Zhu, A. Zamamiri, M. A. Henson, and M. A. Hjortso, "Model predictive control of continuous yeast bioreactors using cell population balance models," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 55, pp. 6155–6167, 2000.
- [56] S. Ramaswamy, T. J. Cutright, and H. K. Qammar, "Control of a continuous bioreactor using model predictive control," *Process Biochem.*, vol. 40, pp. 2763–2770, 2005.
- [57] J. Bartee, P. Noll, C. Axelrud, C. Schweiger, and B. Sayyar-Rodsari, "Industrial application of nonlinear model predictive control technology for fuel ethanol fermentation process," in *American control conference*, 2009.
- [58] D. Dochain and G. Bastin, "Adaptive identification and control algorithms for nonlinear bacterial growth systems," *Auto*, vol. 20, pp. 621–634, 1984.
- [59] T. Takagi and M. Sugeno, "Fuzzy identification of systems and its applications to modeling and control," vol. 15, pp. 0100–0116, 1985.
- [60] S. Soyguder, M. Karakose, and H. Alli, "Design and simulation of self-tuning pid-type fuzzy adaptive control for an expert hvac system," *Expert Syst. Appl.*, vol. 36, pp. 4566–4573, 2009.

- [61] P. Scherer, K. Lehmann, O. Schmidt, and B. Demirel, "Application of a fuzzy logic control system for continuous anaerobic digestion of low buffered, acidic energy crops as mono-substrate," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 102, pp. 736–748, 2009.
- [62] M. J. Fuente, C. Robles, O. Casado, S. Syafie, and F. Tadeo, "Fuzzy control of a neutralization pro," *Eng. Appl. Artif. Intel.*, vol. 19, pp. 905–914, 2006.
- [63] D. Q. Mayne, J. B. Rawlings, C. V. Rao, and P. O. M. Scokaert, "Constrained model predictive control: Stability and optimality," *Autom.*, vol. 36, pp. 789–814, 2000.
- [64] D. Sendrescu, D. Popescu, E. Petre, E. Bobasu, and D. Selisteanu, "Nonlinear model predictive control of a lipase production bioprocess," in *Carpathian Control Conference (ICCC), 2011 12th International*, 2011.
- [65] A. Ashoori, B. Moshiri, A. Khaki-Sedigh, and M. R. Bakhtiari, "Optimal control of a non-linear fed-batch fermentation process using model predictive approach," *Journal of Process Control*, vol. 19, pp. 1162–1173, 2009.
- [66] A. U. M. Kiran and A. K. Jana, "Control of continuous fed-batch fermentation process using neural network based model predictive controller," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 32, pp. 801–808, 2009.
- [67] H. Peng, T. Ozaki, Y. Toyoda, H. Shioya, K. Nakano, V. Haggan-Ozaki, and M. Mori, "Rbf-arx model-based nonlinear system modeling and predictive control with application to a nox decomposition process," *Control Eng. Pract.*, vol. 12, no. 2, pp. 191–203, 2004.
- [68] M. A.-H. Ali, B. Betlem, G. Weickert, and B. Roffel, "Non-linear model based control of a propylene polymerization reactor," *Chem. Eng. Process.*, vol. 46, no. 6, pp. 554–564, 2007.
- [69] J. S. Almeida, "Predictive non-linear modeling of complex data by artificial neural networks," *Curr. Opin. Biotech.*, vol. 13, pp. 72–76, 2002.
- [70] J. C. Atuonwu, Y. Cao, G. P. Rangaiah, and M. O. Tadé, "Identification and predictive control of a multistage evaporator," *Control Eng. Pract.*, vol. 18, pp. 1418–1428, 2010.
- [71] K. R. Muske and J. B. Rawlings, "Model predictive control with linear models," *AIChE J.*, vol. 39, pp. 262–287, 1993.

- [72] J. K. Huusom, N. K. Poulsen, S. B. Jørgensen, and J. B. Jørgensen, *20th European Symposium on Computer Aided Process Engineering*. Elsevier, 2010.
- [73] J. Yu, A. Jadbabaie, J. Primbs, and Y. Huang, “Comparison of nonlinear control design techniques on a model of the caltech ducted fan,” *Automatica*, vol. 37, pp. 1971–1978, 2001.
- [74] K. Kristinsson and G. A. Dumont, “System identification and control using genetic algorithms,” *IEEE T. Syst. Man Cyb.*, vol. 22(5), pp. 1033–1046, 1992.
- [75] S. Chen, S. Billings, and P. Grant, “Non-linear system identification using neural networks,” *Int. J. Control*, vol. 51(6), pp. 1191–1214, 1990.
- [76] A. Rahrooh and S. Shepard, “Identification of nonlinear systems using narmax model,” *Non-linear Anal-Theor.*, vol. 71(12), pp. e1198–e1202, 2009.
- [77] J. I. Garriga and M. Soroush, “Model predictive control tuning methods: A review,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 49, pp. 3505–3515, 2010.
- [78] A. R. McIntosh, S. L. Shah, and D. G. Fisher, “Analysis and tuning of adaptive generalized predictive control,” *Can. J. Chem. Eng.*, vol. 69, pp. 97–110, 1991.
- [79] K. Y. Rani and H. Unbehauen, “Study of predictive controller tuning methods,” *Automatica*, vol. 33, pp. 2243–2248, 1997.
- [80] P. Banerjee and S. L. Shah, “Tuning guidelines for robust generalized predictive control,” in *Proceedings of the 31st IEEE conference on decision and control*, 1992.
- [81] D. W. Clarke, C. Mohtadi, and P. S. Tuffs, “Generalized predictive control - part ii. extensions and interpretations,” *Automatica*, vol. 23, pp. 149–160, 1987.
- [82] D. W. Clarke and C. Mohtadi, “Properties of generalized predictive control,” *Automatica*, vol. 25, pp. 859–875, 1989.
- [83] J. Nocedal and S. J. Wright, *Numerical optimization*. Springer, 1999.
- [84] L. A. Alves, J. B. A. e Silva, and M. Giuliatti, “Solubility of d-glucose in water and ethanol/water mixtures,” *J. Chem. Eng. Data*, vol. 52, pp. 2166–2170, 2007.

- [85] B. L. Widjiantoro, T. H. Liong, Y. Y. Nazaruddin, and B. Spa, "Lolimot based model predictive control," *Jurnal Teknologi*, vol. 17(1), pp. 37–44, 2003.
- [86] J. H. Pérez-Cruz, A. Y. Alanis, J. de Jesús Rubio, and J. Pacheco, "System identification using multilayer differential neural networks: A new result," *Journal of Applied Mathematics*, vol. 2012, pp. 1–20, 2012.
- [87] S. Piché, B. Sayyar-Rodsari, D. Johnson, and M. Gerules, "Nonlinear model predictive control using neural networks," *IEEE Contr. Syst. Mag.*, vol. 20, pp. 53–62, 2000.
- [88] S. Curteanu, F. Leon, R. Furtuna, E. N. Dragoi, and Nec, "Comparison between different methods for developing neural network topology applied to a complex polymerization process," in *The 2010 International Joint Conference on Neural Networks (IJCNN)*, 2010.
- [89] W.-X. Zhao, H.-F. Chen, and W. X. Zheng, "Recursive identification for nonlinear arx systems based on stochastic approximation algorithm," *IEEE T. Automat. Contr.*, vol. 55(6), pp. 1287–1299, 2010.
- [90] J. S.-H. Tsai, C.-T. Wang, S.-M. G. Chi-Chieh Kuang a, L.-S. Shieh, and C.-W. Chen, "A narmax model-based state-space self-tuning control for nonlinear stochastic hybrid systems," *Appl. Math. Model.*, vol. 34, pp. 3030–3054, 2010.
- [91] J. Winkler, "Non-linear model-based control of the czochralski process i: Motivation, modeling and feedback controller design," *J. Cryst. Growth*, vol. 312, pp. 1005–1018, 2010.
- [92] T. K. Radhakrishnan, S. Sundaram, and M. Chidambaran, "Non-linear control of continuous bioreactors," *Bioprocess E*, vol. 20, pp. 173–178, 1999.
- [93] Z. K. Nagy, "Model based control of a yeast fermentation bioreactor using optimally designed artificial neural networks," *Chem. Eng. J.*, vol. 127, pp. 95–109, 2007.
- [94] D. Hu, H. Liub, C. Yangb, and E. Hua, "The design and optimization for light-algae bioreactor controller based on artificial neural network-model predictive control," *Acta Astronaut.*, vol. 63, pp. 1067–1075, 2008.
- [95] R. Furtuna, S. Curteanu, and M. Cazacu, "Optimization methodology applied to feed-forward artificial neural network parameters," *Int. J. Quantum Chem.*, vol. 111, pp. 539–553, 2011.

- [96] M. T. Hagan and M. B. Menhaj, "Training feedforward networks with the marquardt algorithm," *IEEE T. Neural Networ.*, vol. 5, pp. 989–993, 1994.
- [97] K. S. Narendra, "Gradient methods for the optimization of dynamical systems containing neural networks," *IEEE T. Neural Networ.*, vol. 2, pp. 252–262, 1991.
- [98] B. M. Wilamowski, "Neural network architectures and learning algorithms: How not to be frustrated with neural networks," *IEEE In*, vol. 12, pp. 56–63, 2009.
- [99] R. E. Kalman and J. E. Bertram, "General synthesis procedure for computer control of single-loop and multi-loop systems," *AIEE Trans.*, vol. 77 (part 2), p. 602, 1958.
- [100] A. Kotyk and A. Kleinzeller, "Affinity of the yeast membrane carrier for glucose and its role in the pasteur effect," *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 135(1), pp. 106–111, 1967.
- [101] G. I. Bell, C. F. Burant, J. Takeda, and G. W. Gould, "Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters.," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, pp. 19161–19164, Sep 1993.
- [102] G. Gerber, H. Preissler, R. Heinrich, and S. M. Rapoport, "Hexokinase of human erythrocytes," *Eur. J. Biochem.*, vol. 45(1), pp. 39–52, 1974.
- [103] L. M. McIntyre, D. R. Thorburn, W. A. Bubb, and P. W. Kuchel, "Comparison of computer simulations of the f-type and l-type non-oxidative hexose monophosphate shunts with 31p-nmr experimental data from human erythrocytes," *Eur. J. Biochem.*, vol. 180(2), pp. 399–420, 1989.
- [104] G. Hammes and P. Schimmel, *Rapid reactions and transient states*. Academi, 1970.
- [105] M. Dixon, *Enzymes*. Academic Press, 1979.
- [106] A. Fersht, *Enzyme structure and mechanism*. W. H. Freeman and Company, 1985.
- [107] G.-G. Chang, S.-M. Huang, and S.-H. Chiou, "Kineticmechanism of the endogenous lactate dehydrogenase activity of duck epsilon-crystallin," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 284(2), pp. 285–291, 1991.
- [108] R. Denton and A. Halestrap, "Regulation of pyruvate metabolism in mammalian tissues," *Essays Biochem.*, vol. 15, pp. 37–77, 1979.

- [109] F. Palmieri, F. Bisaccia, L. Capobianco, V. Dolce, G. Fiermonte, V. Lacobazzi, C. Indiveri, and P. L., "Mitochondrial metabolite transporters," *Biochem. Biophys. Acta.*, vol. 1275(1-2), pp. 127–132, 1996.
- [110] J. C. W. Hildyard and A. P. Halestrap, "Identification of the mitochondrial pyruvate carrier in *saccharomyces cerevisiae*," *Biochem. J.*, vol. 374(Pt 3), pp. 607–611, 2003.
- [111] X. Wang, A. J. Levi, and A. P. Halestrap, "Substrate and inhibitor specificities of the monocarboxylate transporters of single rat heart cells," *Am. J. Physiol.*, vol. 47(10), pp. H476–484, 1996.
- [112] T. Wood, *The pentose phosphate pathway*. Academic Press, 1985.
- [113] H. Inui, K. Miyatake, Y. Nakano, and S. Kitaoka, "Pyruvate: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from *euglena gracilis*: The kinetic properties of the enzyme," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 274(2), pp. 434–442, 1989.
- [114] S. Liu, X. Gong, X. Yan, T. Peng, J. C. Baker, L. Li, P. M. Robben, S. Ravindran, L. A. Andersson, A. B. Cole, and T. E. Roche, "Reaction mechanism for mammalian pyruvate dehydrogenase using natural lipoyl domain substrates," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 386(2), pp. 123–135, 2001.
- [115] A.-P. Zeng, J. Modak, and W.-D. Deckwer, "Nonlinear dynamics of eucaryotic pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: Decarboxylation rate, oscillations, and multiplicity," *Biotechnol. Prog.*, vol. 18(6), pp. 1265–1276, 2002.
- [116] S. Cortassa, M. A. Aon, E. Marbán, R. L. Winslow, and B. O'Rourke, "An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics," *Biophys. J.*, vol. 84(4), pp. 2734–2755, 2003.

# Apéndices

## A . Ecuaciones de balances de masa utilizadas para el modelo metabólico de una célula animal en cultivo [21]

### A .1. Glicólisis

Concentración de glucosa citoplasmática

$$\frac{dC_{GLC}^c}{dt} = r_{perm} - r_{HK} \quad (7.1)$$

Concentración de glucosa 6-fosfato citoplasmática

$$\frac{dC_{G6P}^c}{dt} = r_{HK} - r_{PGI} - r_{G6PD} \quad (7.2)$$

Concentración de fructosa 6-fosfato citoplasmática

$$\frac{dC_{F6P}^c}{dt} = r_{PGI} - r_{PFK} + r_{TA} + r_{TK2} \quad (7.3)$$

Concentración de fructosa 1,6-bifosfato citoplasmática

$$\frac{dC_{FBP}^c}{dt} = r_{PFK} - r_{ALD} \quad (7.4)$$

Concentración de dihidroxiacetona fosfato citoplasmática

$$\frac{dC_{DHAP}^c}{dt} = r_{ALD} - r_{TPI} - C_{Lipidos}(V_{citoplasma} + V_{mitocondria}) \frac{0,02}{5} \quad (7.5)$$

Concentración de gliceraldehído 3-fosfato citoplasmático

$$\frac{dC_{GAP}^c}{dt} = r_{ALD} + r_{TPI} - r_{GAPD} + r_{TK1} - r_{TA} + r_{TK2} \quad (7.6)$$

**Concentración de 1,3-bifosfoglicerato citoplasmático**

$$\frac{dC_{13P2G}^c}{dt} = r_{GAPD} - r_{PGK} \quad (7.7)$$

**Concentración de 3-fosfoglicerato citoplasmático**

$$\frac{dC_{3PG}^c}{dt} = r_{PGK} - r_{PGM} - C_{Lipidos}(V_{citoplasma} + V_{mitocondria}) \frac{0,02}{5} \quad (7.8)$$

**Concentración de 2-fosfoglicerato citoplasmático**

$$\frac{dC_{2PG}^c}{dt} = r_{PGM} - r_{EN} \quad (7.9)$$

**Concentración de fosfoenol piruvato citoplasmático**

$$\frac{dC_{PEP}^c}{dt} = r_{EN} - r_{PK} \quad (7.10)$$

**Concentración de adenosin trifosfato citoplasmático**

$$\frac{dC_{ATP}^c}{dt} = 0 \quad (7.11)$$

**Concentración de adenosin monofosfato citoplasmático**

$$\frac{dC_{AMP}^c}{dt} = 0 \quad (7.12)$$

**Concentración de piruvato citoplasmático**

$$\frac{dC_{PYR}^c}{dt} = r_{PK} - r_{LDH} - r_{TCT} \quad (7.13)$$

**Concentración de lactato citoplasmático**

$$\frac{dC_{LAC}^c}{dt} = r_{LDH} - r_{MCT} \quad (7.14)$$

**Concentración de nicotinamida adenin dinucleotido (fosfato)**

$$\frac{dC_{NAD}^c}{dt} = r_{LDH} - r_{GAPD} + 1000C_{NADH}^c \quad (7.15)$$

### Concentración de lactato extra-celular

$$\frac{dC_{LAC}^c}{dt} = CxRr_{MCT} \quad (7.16)$$

## A .2. Pentosa fosfato

### Concentración de 6-fosfogluconato citoplasmático

$$\frac{dC_{6GP}^c}{dt} = r_{G6PD} - r_{6PGD} \quad (7.17)$$

### Concentración de nicotinamida adenina dinucleotido (fosfato) citoplasmático

$$\frac{dC_{NADP}^c}{dt} = 0 \quad (7.18)$$

### Concentración de glutatión red(ox) citoplasmático

$$\frac{dC_{GSH}^c}{dt} = r_{GSSGR} - r_{GSHOX} \quad (7.19)$$

### Concentración de ribulosa 5-fosfato citoplasmático

$$\frac{dC_{RUSP}^c}{dt} = r_{6GPD} - r_{EP} - r_{RPI} \quad (7.20)$$

### Concentración de xilulosa 5-fosfato citoplasmático

$$\frac{dC_{XYL5P}^c}{dt} = r_{EP} - r_{TK1} - r_{TK2} \quad (7.21)$$

### Concentración de ribosa 5-fosfato citoplasmático

$$\frac{dC_{R5P}^c}{dt} = r_{RPI} - r_{EP} - r_{TK1} - 0.02C_{Nucleotidos}(V_{citoplasma} + V_{mitocondria}) \quad (7.22)$$

### Concentración de sedoheptulosa 7-fosfato citoplasmático

$$\frac{dC_{SH7P}^c}{dt} = r_{TK1} - r_{TA} \quad (7.23)$$

### Concentración de eritrosa 4-fosfato citoplasmático

$$\frac{dC_{E4P}^c}{dt} = r_{TA} - r_{TK2} \quad (7.24)$$

### A .3. Ciclo TCA

#### Concentración de piruvato mitocondrial

$$\frac{dC_{PYR}^m}{dt} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{TCT} - r_{PDHC} - r_{ATA} + r_{SER} \quad (7.25)$$

#### Concentración de acetil CoA mitocondrial

$$\frac{dC_{ACCOA}^m}{dt} = r_{PDHC} - r_{CS} - C_{Lipidos} (V_{citoplasma} + V_{mitocondria}) \frac{0,06}{5} + r_{LYS} + r_{LEU} \quad (7.26)$$

#### Concentración de isocitrato mitocondrial

$$\frac{dC_{ICIT}^m}{dt} = r_{ACON} - r_{IDH} \quad (7.27)$$

#### Concentración de alfa-ketoglutarato mitocondrial

$$\frac{dC_{\alpha KG}^m}{dt} = r_{IDH} - r_{KGDH} + r_{ATA} + r_{GLU} + r_{GLN} + r_{ARG} \quad (7.28)$$

#### Concentración de succinil coenzima A mitocondrial

$$\frac{dC_{SCO A}^m}{dt} = r_{KGDH} - r_{SCS} + r_{THR} \quad (7.29)$$

#### Concentración de succinato mitocondrial

$$\frac{dC_{SUC}^m}{dt} = r_{SCS} - r_{SDH} \quad (7.30)$$

#### Concentración de flavina adenina dinucleótido reducida

$$\frac{dC_{FADH}}{dt} = 0 \quad (7.31)$$

#### Concentración de fumarato mitocondrial

$$\frac{dC_{FUM}^m}{dt} = r_{SDH} - r_{FUMH} \quad (7.32)$$

#### Concentración de malato mitocondrial

$$\frac{dC_{MAL}^m}{dt} = r_{FUMH} - r_{MDH} \quad (7.33)$$

### Concentración de oxaloacetato mitocondrial

$$\frac{dC_{OAA}^m}{dt} = r_{MDH} - r_{CS} + r_{ASN} + r_{ASP} \quad (7.34)$$

## A .4. Transporte y metabolismo de amino ácidos

### Concentración de serina citoplasmática

$$\frac{dC_{SER}^c}{dt} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{SER}^A + \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{SER}^{ASC} - r_{SER} \quad (7.35)$$

### Concentración de alanina citoplasmática

$$\frac{dC_{ALA}^c}{dt} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{ALA}^A + \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{ALA}^{ASC} - r_{ATA} \quad (7.36)$$

### Concentración de glutamina citoplasmática

$$\frac{dC_{GLN}^c}{dt} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{GLN}^A + \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{GLN}^{ASC} + \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{GLN}^N + \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{GLN}^L - r_{GLN} - r_{ATA} \quad (7.37)$$

### Concentración de threonina citoplasmática

$$\frac{dC_{THR}^c}{dt} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{THR}^{ASC} - r_{THR} \quad (7.38)$$

### Concentración de asparagina citoplasmática

$$\frac{dC_{ASN}^c}{dt} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{ASN}^N - r_{ASN} \quad (7.39)$$

### Concentración de leucina citoplasmática

$$\frac{dC_{LEU}^c}{dt} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{LEU}^L - r_{LEU} \quad (7.40)$$

### Concentración de arginina citoplasmática

$$\frac{dC_{ARG}^c}{dt} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{ARG}^Y - r_{ARG} \quad (7.41)$$

### Concentración de lisina citoplasmática

$$\frac{dC_{LYS}^c}{dt} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{LYS}^Y - r_{LYS} \quad (7.42)$$

### Concentración de ácido glutámico citoplasmática

$$\frac{dC_{GLU}^c}{dt} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{GLU}^X - r_{GLU} \quad (7.43)$$

### Concentración de ácido aspártico citoplasmática

$$\frac{dC_{ASP}^c}{dt} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{ASP}^X - r_{ASP} \quad (7.44)$$

## B . Velocidades de reacción y parámetros para el modelo metabólico de una célula animal

Transporte de glucosa [39, 100, 101]:

$$r_{perm} = \frac{(k_{perm}^{max} C_{GLC}^e - k_{perm2}^{max} C_{GLC}^c)}{1 + \frac{C_{GLC}^e}{K_{GLC}} + \frac{C_{GLC}^c}{K_{GLC}}}$$

$$k_{perm}^{max} = 7,27[1/hr]$$

$$k_{perm2}^{max} = 0,727[1/hr]$$

$$K_{GLC} = 1,50[mM]$$

Hexoquinasa [102]:

$$r_{HK} = k_{HK}^{max} \frac{C_{MgATP}^c C_{GLC}^c}{K_{MgATP}^{HK} K_{MgATPGLC}^{HK}} \frac{1}{N_{HK}}$$

$$N_{HK} = 1 + \frac{C_{GLC}^c}{K_{GLC}^{HK}} + \frac{C_{MgATP}^c}{K_{MgATP}^{HK}} + \frac{C_{MgATP}^c C_{GLC}^c}{K_{MgATP}^{HK} K_{MgATPGLC}^{HK}} + \frac{C_{G6P}^c}{K_{G6P}^{HK}} + \frac{C_{GLC}^c C_{G6P}^c}{K_{GLC}^{HK} K_{G6P}^{HK}}$$

$$k_{HK}^{max} = 1,93 \cdot 10^2[mM/hr]$$

$$K_{MgATP}^{HK} = 1,76[mM]$$

$$K_{MgATPGLC}^{HK} = 5,10 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{G6P}^{HK} = 3,34 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{GLC}^{HK} = 4,00 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{GLCG6P}^{HK} = 6,90 \cdot 10^{-2} [mM]$$

Glucosa 6-fosfato isomerasa [27, 103]:

$$r_{PGI} = \frac{k_{PGI}^f \frac{C_{G6P}^c}{K_{PGI}^f} - k_{PGI}^r \frac{C_{F6P}^c}{K_{PGI}^r}}{1 + \frac{C_{G6P}^c}{K_{PGI}^f} + \frac{C_{F6P}^c}{K_{PGI}^r}}$$

$$k_{PGI}^f = 11,16 \cdot 10^2 [mM/hr]$$

$$k_{PGI}^r = 9,28 \cdot 10^2 [mM/hr]$$

$$K_{PGI}^f = 1,82 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{PGI}^r = 7,14 \cdot 10^{-2} [mM]$$

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa [31]:

$$r_{G6PD} = \frac{k_{G6PD}^f C_{NADP}^c C_{G6P}^c - k_{G6PD}^r C_{6PG}^c C_{NADPH}^c}{D_{G6PD}}$$

$$N_{G6PD}^1 = k_{G6PD}^1 k_{G6PD}^3 k_{G6PD}^5 k_{G6PD}^7 k_{G6PD}^9$$

$$N_{G6PD}^2 = k_{G6PD}^2 k_{G6PD}^4 k_{G6PD}^6 k_{G6PD}^8 k_{G6PD}^{10}$$

$$\begin{aligned} D_{G6PD} = & D_{G6PD}^1 + D_{G6PD}^2 C_{NADP}^c + D_{G6PD}^3 C_{G6P}^c + D_{G6PD}^4 C_{6PG}^c \\ & + D_{G6PD}^5 C_{NADPH}^c + D_{G6PD}^6 C_{NADP}^c C_{G6P}^c + D_{G6PD}^7 C_{NADP}^c C_{6PG}^c \\ & + D_{G6PD}^8 C_{G6P}^c C_{NADPH}^c + D_{G6PD}^9 C_{6PG}^c C_{NADPH}^c \\ & + D_{G6PD}^{10} C_{NADP}^c C_{G6P}^c C_{6PG}^c + D_{G6PD}^{11} C_{G6P}^c C_{6PG}^c C_{NADPH}^c \end{aligned}$$

$$k_{G6PD}^f = 4,39 \cdot 10^{20} [1/mM - hr]$$

$$k_{G6PD}^r = 7,48 \cdot 10^{19} [1/mM - hr]$$

$$D_{G6PD}^1 = 1,45 \cdot 10^{15}[-]$$

$$D_{G6PD}^2 = 1,83 \cdot 10^{20}[1/mM]$$

$$D_{G6PD}^3 = 4,29 \cdot 10^{19}[1/mM]$$

$$D_{G6PD}^4 = 5,74 \cdot 10^{17}[1/mM]$$

$$D_{G6PD}^5 = 2,04 \cdot 10^{20}[1/mM]$$

$$D_{G6PD}^6 = 6,84 \cdot 10^{24}[1/mM^2]$$

$$D_{G6PD}^7 = 7,26 \cdot 10^{22}[1/mM^2]$$

$$D_{G6PD}^8 = 6,01 \cdot 10^{24}[1/mM^2]$$

$$D_{G6PD}^9 = 5,01 \cdot 10^{24}[1/mM^2]$$

$$D_{G6PD}^{10} = 8,65 \cdot 10^{27}[1/mM^3]$$

$$D_{G6PD}^{11} = 1,10 \cdot 10^{29}[1/mM^3]$$

Fosfofructoquinasa [29]:

$$r_{PFK} = \frac{k_{PFK}^{max} \frac{C_{F6P}^c}{K_{F6P}^{PFK}} \frac{C_{MgATP}^c}{K_{MgATP}^{PFK}}}{\left(1 + \frac{C_{F6P}^c}{K_{F6P}^{PFK}}\right) \left(1 + \frac{C_{MgATP}^c}{K_{MgATP}^{PFK}}\right)} N_{PFK}$$

$$N_{PFK} = 1 + L_{PFK} \frac{\left(1 + \frac{C_{ATP}^c}{K_{ATP}^{PFK}}\right)^4 \left(1 + \frac{C_{Mg}^c}{K_{Mg}^{PFK}}\right)^4}{\left(1 + \frac{C_{F6P}^c}{K_{F6P}^{PFK}}\right)^4 \left(1 + \frac{C_{AMP}^c}{K_{AMP}^{PFK}}\right)^4}$$

$$k_{PFK}^{max} = 2,5 \cdot 10^2[1/mM - hr]$$

$$K_{F6P}^{PFK} = 0,1[mM]$$

$$K_{MgATP}^{PFK} = 6,8 \cdot 10^{-2}[mM]$$

$$L_{PFK} = 1,07 \cdot 10^{-3}[-]$$

$$K_{ATP}^{PFK} = 0,01[mM]$$

$$K_{AMP}^{PFK} = 3,30 \cdot 10^{-2}[mM]$$

$$K_{Mg}^{PFK} = 0,44[mM]$$

Transaldolasa [103]:

$$r_{TA} = \frac{k_{TA}^f C_{SH7P}^c C_{GAP}^c - k_{TA}^r C_{E4P}^c C_{F6P}^c}{D_{TA}}$$

$$D_{TA} = D_{TA}^1 C_{SH7P}^c + D_{TA}^2 C_{GAP}^c + D_{TA}^3 C_{E4P}^c + D_{TA}^4 C_{F6P}^c + D_{TA}^5 C_{SH7P}^c C_{GAP}^c \\ + D_{TA}^6 C_{E4P}^c C_{F6P}^c + D_{TA}^7 C_{GAP}^c C_{F6P}^c + D_{TA}^8 C_{SH7P}^c C_{E4P}^c$$

$$k_{TA}^f = 9,12 \cdot 10^{18} [1/mM - hr]$$

$$k_{TA}^r = 2,51 \cdot 10^{19} [1/mM - hr]$$

$$D_{TA}^1 = 3,40 \cdot 10^{16} [1/mM]$$

$$D_{TA}^2 = 2,39 \cdot 10^{16} [1/mM]$$

$$D_{TA}^3 = 1,64 \cdot 10^{17} [1/mM]$$

$$D_{TA}^4 = 1,36 \cdot 10^{16} [1/mM]$$

$$D_{TA}^5 = 4,41 \cdot 10^{17} [1/mM^2]$$

$$D_{TA}^6 = 3,92 \cdot 10^{17} [1/mM^2]$$

$$D_{TA}^7 = 1,11 \cdot 10^{17} [1/mM^2]$$

$$D_{TA}^8 = 2,11 \cdot 10^{18} [1/mM^2]$$

Transketolasa 2 [103]:

$$r_{TK2} = \frac{k_{TK2}^f C_{xyl5p}^c C_{E4P}^c - k_{TK2}^r C_{GAP}^c C_{F6P}^c}{D_{TK2}}$$

$$D_{TK2} = D_{TK2}^1 C_{xyl5p}^c + D_{TK2}^2 C_{E4P}^c + D_{TK2}^3 C_{GAP}^c + D_{TK2}^4 C_{F6P}^c + D_{TK2}^5 C_{xyl5p}^c C_{E4P}^c \\ + D_{TK2}^6 C_{GAP}^c C_{F6P}^c + D_{TK2}^7 C_{E4P}^c C_{F6P}^c + D_{TK2}^8 C_{xyl5p}^c C_{GAP}^c$$

$$k_{TK2}^f = 3,64 \cdot 10^{19} [1/mM - hr]$$

$$k_{TK2}^r = 1,23 \cdot 10^{18} [1/mM - hr]$$

$$D_{TK2}^1 = 7,35 \cdot 10^{16} [1/mM]$$

$$D_{TK2}^2 = 3,01 \cdot 10^{17} [1/mM]$$

$$D_{TK2}^3 = 5,96 \cdot 10^{16} [1/mM]$$

$$D_{TK2}^4 = 1,25 \cdot 10^{16} [1/mM]$$

$$D_{TK2}^5 = 1,67 \cdot 10^{18} [1/mM^2]$$

$$D_{TK2}^6 = 3,31 \cdot 10^{16} [1/mM^2]$$

$$D_{TK2}^7 = 1,60 \cdot 10^{17} [1/mM^2]$$

$$D_{TK2}^8 = 3,38 \cdot 10^{17} [1/mM^2]$$

Aldolasa [28, 103]:

$$r_{ALD} = \frac{k_{ALD}^f C_{FBP}^c - k_{ALD}^r C_{GAP}^c C_{DHAP}^c}{D_{ALD}}$$

$$D_{ALD} = D_{ALD}^1 + D_{ALD}^2 C_{FBP}^c + D_{ALD}^3 C_{GAP}^c + D_{ALD}^4 C_{DHAP}^c + D_{ALD}^5 C_{FBP}^c C_{GAP}^c + D_{ALD}^6 C_{DHAP}^c C_{GAP}^c$$

$$k_{ALD}^f = 2,46 \cdot 10^{16} [1/hr]$$

$$k_{ALD}^r = 2,89 \cdot 10^{17} [1/mM - hr]$$

$$D_{ALD}^1 = 1,94 \cdot 10^{12} [-]$$

$$D_{ALD}^2 = 2,73 \cdot 10^{14} [1/mM]$$

$$D_{ALD}^3 = 3,38 \cdot 10^{13} [1/mM]$$

$$D_{ALD}^4 = 1,77 \cdot 10^{14} [1/mM]$$

$$D_{ALD}^5 = 1,55 \cdot 10^{15} [1/mM^2]$$

$$D_{ALD}^6 = 9,31 \cdot 10^{14} [1/mM^2]$$

Triosefosfato isomerasa [103]:

$$r_{TPI} = \frac{k_{TPI}^f \frac{C_{DHAP}^c}{K_{TPI}^f} + k_{TPI}^r \frac{C_{GAP}^c}{K_{TPI}^r}}{1 + \frac{C_{DHAP}^c}{K_{TPI}^f} + \frac{C_{GAP}^c}{K_{TPI}^r}}$$

$$k_{TPI}^f = 59,96 \cdot 10^3 [mM/hr]$$

$$k_{TPI}^r = 54,15 \cdot 10^2 [mM/hr]$$

$$K_{TPI}^f = 8,38 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{TPI}^r = 4,30 \cdot 10^{-1} [mM]$$

Gliceraldehido fosfato isomerasa [21]:

$$r_{GAPD} = k_{GAPD}^f P_i C_{GAP}^c C_{NAD}^c - k_{GAPD}^r C_{13P2G}^c C_{NADH}^c$$

$$k_{GAPD}^f = 1,1 \cdot 10^4 [1/mM - hr]$$

$$k_{GAPD}^r = 3,5 \cdot 10^4 [1/mM - hr]$$

$$P_i = 0,94 [-]$$

Transketolasa 1 [103]:

$$r_{TK1} = E_{TK1} \frac{N_{TK1}^1 C_{xyl5p}^c C_{R5P}^c - N_{TK1}^2 C_{GAP}^c C_{SH7P}^c}{D_{TK1}}$$

$$D_{TK1} = D_{TK1}^1 C_{xyl5p}^c + D_{TK1}^2 C_{R5P}^c + D_{TK1}^3 C_{GAP}^c + D_{TK1}^4 C_{SH7P}^c + D_{TK1}^5 C_{xyl5p}^c C_{R5P}^c \\ + D_{TK1}^6 C_{GAP}^c C_{SH7P}^c + D_{TK1}^7 C_{R5P}^c C_{SH7P}^c + D_{TK1}^8 C_{xyl5p}^c C_{GAP}^c$$

$$k_{TK1}^f = 5,32 \cdot 10^{18} [1/mM - hr]$$

$$k_{TK1}^r = 2,58 \cdot 10^{18} [1/mM - hr]$$

$$D_{TK1}^1 = 7,35 \cdot 10^{16} [1/mM]$$

$$D_{TK1}^2 = 4,40 \cdot 10^{16} [1/mM]$$

$$D_{TK1}^3 = 5,96 \cdot 10^{16} [1/mM]$$

$$D_{TK1}^4 = 2,63 \cdot 10^{16} [1/mM]$$

$$D_{TK1}^5 = 2,44 \cdot 10^{17} [1/mM^2]$$

$$D_{TK1}^6 = 6,94 \cdot 10^{16} [1/mM^2]$$

$$D_{TK1}^7 = 4,92 \cdot 10^{16} [1/mM^2]$$

$$D_{TK1}^8 = 3,38 \cdot 10^{17} [1/mM^2]$$

Fosfoglicerato quinasa [28]:

$$r_{PGK} = k_{PGK}^f C_{13P2G}^c C_{ADP}^c - k_{PGK}^r C_{3PG}^c C_{ATP}^c$$

$$k_{PGK}^f = 1,00 \cdot 10^5 [1/mM - hr]$$

$$k_{PGK}^r = 5,56 \cdot 10^1 [1/mM - hr]$$

Fosfoglicerato mutasa [28]:

$$r_{PGM} = (k_{PGM}^f C_{3PG}^c - k_{PGM}^r C_{2PG}^c)$$

$$k_{PGM}^f = 1,00 \cdot 10^5 [1/hr]$$

$$k_{PGM}^r = 6,80 \cdot 10^5 [1/hr]$$

Enolasa [28]:

$$r_{EN} = (k_{EN}^f C_{2PG}^c - k_{EN}^r C_{PEP}^c)$$

$$k_{EN}^f = 1,00 \cdot 10^1 [1/hr]$$

$$k_{EN}^r = 5,90 \cdot 10^4 [1/hr]$$

Piruvato quinasa [30]:

$$r_{PK} = k_{PK}^{max} \frac{\frac{C_{PEP}^c}{K_{PEP}^{PK}} \frac{C_{MgADP}^c}{K_{MgADP}^{PK}}}{1 + \frac{C_{PEP}^c}{K_{PEP}^{PK}} + \frac{C_{MgADP}^c}{K_{MgADP}^{PK}}} \frac{1}{N_{PK}}$$

$$N_{PK} = 1 + L_{PK} \frac{(1 + \frac{C_{ATP}^c}{K_{ATP}^{PK}})^4 (1 + \frac{C_{PEP}^c}{K_{PEP}^{PK}})^4}{(1 + \frac{C_{F6P}^c}{K_{F6P}^{PK}})^4}$$

$$k_{PK}^{max} = 2,50 \cdot 10^2 [mM/hr]$$

$$K_{PEP}^{PK} = 2,25 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{MgADP}^{PK} = 4,74 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$L_{PK} = 19[-]$$

$$K_{ATP}^{PK} = 3,39[mM]$$

$$K_{F6P}^{PK} = 5,00 \cdot 10^{-3}[mM]$$

Lactato deshidrogenasa [104–107]:

$$r_{LDH} = \frac{k_{LDH}^f C_{NADH}^c C_{PYR}^c - k_{LDH}^r C_{NAD}^c C_{LAC}^c}{D_{LDH}}$$

$$D_{LDH} = k_{LDH}^1 + k_{LDH}^2 C_{NADH}^c + k_{LDH}^3 C_{PYR}^c + k_{LDH}^4 C_{NADH}^c C_{PYR}^c + k_{LDH}^5 C_{LAC}^c \\ + k_{LDH}^6 C_{NAD}^c + k_{LDH}^7 C_{NAD}^c C_{LAC}^c + k_{LDH}^8 C_{NADH}^c C_{LAC}^c + k_{LDH}^9 C_{PYR}^c C_{NAD}^c$$

$$k_{LDH}^f = 2,00 \cdot 10^5 [1/mM - hr]$$

$$k_{LDH}^r = 1,85 \cdot 10^4 [1/mM - hr]$$

$$k_{LDH}^1 = 0,40[mM]$$

$$k_{LDH}^2 = 1,00[mM]$$

$$k_{LDH}^3 = 1,00[mM]$$

$$k_{LDH}^4 = 1,00 \cdot 10^2[mM]$$

$$k_{LDH}^5 = 1,00 \cdot 10^2[mM]$$

$$k_{LDH}^6 = 1,00[mM]$$

$$k_{LDH}^7 = 1,00 \cdot 10^2[mM]$$

$$k_{LDH}^8 = 1,70 \cdot 10^4[mM]$$

$$k_{LDH}^9 = 5,00 \cdot 10^1[mM]$$

Transportador de tricarboxilato [38, 108–110]:

$$r_{TCT} = k_{TCT} \frac{C_{PYR}^c}{K_{PYR}^{TCT} + C_{PYR}^c}$$

$$k_{TCT} = 19,62 \cdot 10^{-1}[mM/hr]$$

$$K_{PYR}^{TCT} = 2,00 \cdot 10^{-2}[mM]$$

Transportador de monocarboxilato [38, 104, 106, 111]:

$$r_{MCT} = \frac{k_{MCT}^f \frac{C_{LAC}^c}{K_{MCT}^f} - k_{MCT}^r \frac{C_{LAC}^c}{K_{MCT}^r}}{1 + \frac{C_{LAC}^c}{K_{MCT}^f} + \frac{C_{LAC}^c}{K_{MCT}^r}}$$

$$k_{MCT}^f = 1,00 \cdot 10^2 [mM/hr]$$

$$k_{MCT}^r = 1,00 [mM/hr]$$

$$K_{MCT}^f = 5,00 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{MCT}^r = 5,00 [mM]$$

6-fosfogluconate deshidrogenasa [31]:

$$r_{6PGD} = \frac{k_{6PGD}^f C_{NADP}^c C_{6PG}^c - k_{6PGD}^r C_{CO2}^c C_{RU5P}^c C_{NADPH}^c}{D_{6PGD}}$$

$$\begin{aligned} D_{6PGD} = & D_{6PGD}^1 + D_{6PGD}^2 C_{NADP}^c + D_{6PGD}^3 C_{6PG}^c + D_{6PGD}^4 C_{CO2}^c \\ & + D_{6PGD}^5 C_{NADPH}^c + D_{6PGD}^6 C_{NADP}^c C_{6PG}^c + D_{6PGD}^7 C_{NADP}^c C_{CO2}^c \\ & + D_{6PGD}^8 C_{6PG}^c C_{NADPH}^c + D_{6PGD}^9 C_{CO2}^c C_{RU5P}^c \\ & + D_{6PGD}^{10} C_{CO2}^c C_{NADPH}^c + D_{6PGD}^{11} C_{RU5P}^c C_{NADPH}^c \\ & + D_{6PGD}^{12} C_{NADPH}^c C_{6PG}^c C_{CO2}^c + D_{6PGD}^{13} C_{NADP}^c C_{6PG}^c C_{RU5P}^c \\ & + D_{6PGD}^{14} C_{NADP}^c C_{CO2}^c C_{RU5P}^c + D_{6PGD}^{15} C_{6PG}^c C_{RU5P}^c C_{NADPH}^c \\ & + D_{6PGD}^{16} C_{CO2}^c C_{RU5P}^c C_{NADPH}^c + D_{6PGD}^{17} C_{NADP}^c C_{6PG}^c C_{CO2}^c C_{RU5P}^c \\ & + D_{6PGD}^{18} C_{6PG}^c C_{CO2}^c C_{RU5P}^c C_{NADPH}^c \end{aligned}$$

$$k_{6PGD}^f = 1,83 \cdot 10^{19} [1/mM \cdot hr]$$

$$k_{6PGD}^r = 1,08 \cdot 10^{19} [1/mM \cdot hr]$$

$$D_{6PGD}^1 = 1,69 \cdot 10^{15} [-]$$

$$D_{6PGD}^2 = 4,95 \cdot 10^{18} [1/mM]$$

$$D_{6PGD}^3 = 7,26 \cdot 10^{18} [1/mM]$$

$$D_{6PGD}^4 = 3,45 \cdot 10^{15} [1/mM]$$

$$D_{6PGD}^5 = 5,58 \cdot 10^{19} [1/mM]$$

$$D_{6PGD}^6 = 2,44 \cdot 10^{23} [1/mM^2]$$

$$D_{6PGD}^7 = 1,01 \cdot 10^{19} [1/mM^2]$$

$$D_{6PGD}^8 = 2,40 \cdot 10^{23} [1/mM^2]$$

$$D_{6PGD}^9 = 5,18 \cdot 10^{18} [1/mM^2]$$

$$D_{6PGD}^{10} = 1,14 \cdot 10^{20} [1/mM^2]$$

$$D_{6PGD}^{11} = 3,14 \cdot 10^{22} [1/mM^2]$$

$$D_{6PGD}^{12} = 1,01 \cdot 10^{24} [1/mM^3]$$

$$D_{6PGD}^{13} = 1,63 \cdot 10^{25} [1/mM^3]$$

$$D_{6PGD}^{14} = 1,52 \cdot 10^{26} [1/mM^3]$$

$$D_{6PGD}^{15} = 1,35 \cdot 10^{26} [1/mM^3]$$

$$D_{6PGD}^{16} = 1,84 \cdot 10^{24} [1/mM^3]$$

$$D_{6PGD}^{17} = 1,52 \cdot 10^{27} [1/mM^4]$$

$$D_{6PGD}^{18} = 1,25 \cdot 10^{28} [1/mM^4]$$

Oxidación de glutationa [31]:

$$r_{GSHOX} = \frac{k_{GSHOX} C_{GSH}^c}{2}$$

$$k_{GSHOX} = 0,26 [1/hr]$$

Glutationa reductasa [31]:

$$r_{GSSGR} = \frac{k_{GSSGR}^f C_{NADPH}^c C_{GSSG}^c - k_{GSSGR}^r C_{GSH}^c {}^2 C_{NADP}^c}{D_{GSSGR}}$$

$$N_{GSSGR}^1 = k_{GSSGR}^1 k_{GSSGR}^3 k_{GSSGR}^5 k_{GSSGR}^7 k_{GSSGR}^9 k_{GSSGR}^{11}$$

$$N_{GSSGR}^2 = k_{GSSGR}^2 k_{GSSGR}^4 k_{GSSGR}^6 k_{GSSGR}^8 k_{GSSGR}^{10} k_{GSSGR}^{12}$$

$$\begin{aligned} D_{GSSGR} = & D_{GSSGR}^1 + D_{GSSGR}^2 C_{NADPH}^c + D_{GSSGR}^3 C_{GSSG}^c + D_{GSSGR}^4 C_{GSH}^c \\ & + D_{GSSGR}^5 C_{NADP}^c + D_{GSSGR}^6 C_{NADPH}^c C_{GSSG}^c + D_{GSSGR}^7 C_{NADPH}^c C_{GSH}^c \\ & + D_{GSSGR}^8 C_{GSSG}^c C_{NADP}^c + D_{GSSGR}^9 C_{GSH}^c {}^2 \\ & + D_{GSSGR}^{10} C_{GSH}^c C_{NADP}^c + D_{GSSGR}^{11} C_{GSH}^c C_{NADP}^c \\ & + D_{GSSGR}^{12} C_{NADPH}^c C_{GSSG}^c C_{GSH}^c + D_{GSSGR}^{13} C_{NADPH}^c C_{GSSG}^c C_{GSH}^c \\ & + D_{GSSGR}^{14} C_{NADPH}^c C_{GSH}^c {}^2 + D_{GSSGR}^{15} C_{GSSG}^c C_{GSH}^c C_{NADP}^c \\ & + D_{GSSGR}^{16} C_{GSH}^c {}^2 C_{NADP}^c + D_{GSSGR}^{17} C_{NADPH}^c C_{GSSG}^c C_{GSH}^c {}^2 \\ & + D_{GSSGR}^{18} C_{GSSG}^c C_{GSH}^c {}^2 C_{NADP}^c \end{aligned}$$

$$k_{GSSGR}^f = 6,02 \cdot 10^{27} [1/mM \cdot hr]$$

$$k_{GSSGR}^r = 1,15 \cdot 10^{26} [1/mM \cdot hr]$$

$$D_{GSSGR}^1 = 2,86 \cdot 10^{22} [-]$$

$$D_{GSSGR}^2 = 4,77 \cdot 10^{27} [1/mM]$$

$$D_{GSSGR}^3 = 5,67 \cdot 10^{26} [1/mM]$$

$$D_{GSSGR}^4 = 1,29 \cdot 10^{21} [1/mM]$$

$$D_{GSSGR}^5 = 4,09 \cdot 10^{26} [1/mM]$$

$$D_{GSSGR}^6 = 6,65 \cdot 10^{31} [1/mM^2]$$

$$D_{GSSGR}^7 = 2,14 \cdot 10^{26} [1/mM^2]$$

$$D_{GSSGR}^8 = 8,10 \cdot 10^{30} [1/mM^2]$$

$$D_{GSSGR}^9 = 9,18 \cdot 10^{24} [1/mM^2]$$

$$D_{GSSGR}^{10} = 1,84 \cdot 10^{25} [1/mM^2]$$

$$D^1 1_{GSSGR} = 2,04 \cdot 10^{28} [1/mM^2]$$

$$D^1 2_{GSSGR} = 5,38 \cdot 10^{30} [1/mM^3]$$

$$D^1 3_{GSSGR} = 3,44 \cdot 10^{32} [1/mM^3]$$

$$D^1 4_{GSSGR} = 1,53 \cdot 10^{30} [1/mM^3]$$

$$D^1 5_{GSSGR} = 4,05 \cdot 10^{32} [1/mM^3]$$

$$D^1 6_{GSSGR} = 2,95 \cdot 10^{30} [1/mM^3]$$

$$D^1 7_{GSSGR} = 3,85 \cdot 10^{34} [1/mM^4]$$

$$D^1 8_{GSSGR} = 4,53 \cdot 10^{34} [1/mM^4]$$

Ribulosa fosfato epimerasa [103, 112]:

$$r_{EP} = \frac{k_{EP}^f \frac{C_{RU5P}^c}{K_{EP}^f} - k_{EP}^r \frac{C_{xy15P}^c}{K_{EP}^r}}{1 + \frac{C_{RU5P}^c}{K_{EP}^f} + \frac{C_{xy15P}^c}{K_{EP}^r}}$$

$$k_{EP}^f = 46,42 \cdot 10^2 [mM/hr]$$

$$k_{EP}^r = 66,67 \cdot 10^2 [mM/hr]$$

$$K_{EP}^f = 1,90 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{EP}^r = 5,00 \cdot 10^{-1} [mM]$$

Ribulosa fosfato isomerasa [103, 112]:

$$r_{RPI} = \frac{k_{RPI}^f \frac{C_{RU5P}^c}{K_{RPI}^f} - k_{RPI}^r \frac{C_{R5P}^c}{K_{RPI}^r}}{1 + \frac{C_{RU5P}^c}{K_{RPI}^f} + \frac{C_{R5P}^c}{K_{RPI}^r}}$$

$$k_{RPI}^f = 17,04 \cdot 10^2 [mM/hr]$$

$$k_{RPI}^r = 72,56 \cdot 10^1 [mM/hr]$$

$$K_{RPI}^f = 7,80 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{RPI}^r = 2,20 [mM]$$

Complejo de piruvato deshidrogenasa [108, 113–115]:

$$r_{PDHC} = k_{PDHC}^{max} \frac{\left(\frac{C_{PYR}^m}{K_{PYR}^{PDHC}}\right) \left(\frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} \frac{C_{CoA}^c}{K_{CoA}^{PDHC}}\right) \left(\frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} \frac{C_{NADP}^c}{K_{NADP}^{PDHC}}\right)}{\left(1 + \frac{C_{PYR}^m}{K_{PYR}^{PDHC}}\right) \left(1 + \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} \frac{C_{CoA}^c}{K_{CoA}^{PDHC}}\right) \left(1 + \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} \frac{C_{NADP}^c}{K_{NADP}^{PDHC}}\right)}$$

$$k_{PDHC}^{max} = 45 [mM/hr]$$

$$K_{PYR}^{PDHC} = 2,00 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{CoA}^{PDHC} = 6,60 \cdot 10^{-3} [mM]$$

$$K_{NADP}^{PDHC} = 3,00 \cdot 10^{-2} [mM]$$

Alanina transaminasa [21]:

$$r_{ATA} = k_{ATA} (C_{PYR}^m C_{GLU}^c - \frac{C_{\alpha KG}^m C_{ALA}^c}{K_{Eq}^{ATA}})$$

$$k_{ATA} = 10 [1/mM \cdot hr]$$

$$K_{Eq}^{ATA} = 20 [mM]$$

Transporte de serina [21]:

$$r_{SER} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} (r_{SER}^A + r_{SER}^{ASC})$$

$$r_{SER}^A = k_A^{max} \frac{C_{SER}^e}{\frac{C_{SER}^e}{K_{SER}^A} + \left(1 + \frac{C_{ALA}^e}{K_{ALA}^A} + \frac{C_{ALA}^c}{K_{ALA}^A} + \frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^A}\right)}$$

$$r_{SER}^{ASC} = k_{ASC}^{max} \frac{C_{SER}^e}{\frac{C_{SER}^e}{K_{SER}^{ASC}} + \left(1 + \frac{C_{THR}^e}{K_{THR}^{ASC}} + \frac{C_{ALA}^e}{K_{ALA}^{ASC}} + \frac{C_{ALA}^c}{K_{ALA}^{ASC}} + \frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^{ASC}}\right)}$$

$$k_A^{max} = 4,23 \cdot 10^{-2} [1/hr]$$

$$K_{SER}^A = 0,73 [mM]$$

$$K_{ALA}^A = 0,60 [mM]$$

$$K_{GLN}^A = 1,66 [mM]$$

$$k_{ASC}^{max} = 1,11[1/hr]$$

$$K_{SER}^{ASC} = 17,75 \cdot 10^{-1}[mM]$$

$$K_{ALA}^{ASC} = 0,10[mM]$$

$$K_{THR}^{ASC} = 0,22[mM]$$

$$K_{GLN}^{ASC} = 0,05[mM]$$

Citrato sintasa [116]:

$$r_{CS} = k_{CS} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_{ACCOA}^{CS}}{C_{ACCOA}^m} + \frac{K_{OAA}^{CS}}{C_{OAA}^m} + \frac{K_{ACCOA}^{CS}}{C_{ACCOA}^m} \frac{K_{OAA}^{CS}}{C_{OAA}^m}\right)}$$

$$k_{CS} = 4,61 \cdot 10^3[mM/hr]$$

$$K_{ACCOA}^{CS} = 1,26 \cdot 10^{-2}[mM/hr]$$

$$K_{OAA}^{CS} = 6,40 \cdot 10^{-4}[mM/hr]$$

Transporte de lisina [21]:

$$r_{LYS} = k_Y^{max} \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} \frac{C_{LYS}^e}{\frac{C_{LYS}^e}{K_{LYS}^Y} + \left(1 + \frac{C_{ARG}^e}{K_{ARG}^Y}\right)}$$

$$k_Y^{max} = 31,92 \cdot 10^{-2}[1/hr]$$

$$K_{LYS}^Y = 0,21[mM]$$

$$K_{ARG}^Y = 1,12[mM]$$

Transporte de leusina [21]:

$$r_{LEU} = k_L^{max} \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} \frac{C_{LEU}^e}{\frac{C_{LEU}^e}{K_{LEU}^L} + \left(1 + \frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^L}\right)}$$

$$k_L^{max} = 19,56 \cdot 10^{-2}[1/hr]$$

$$K_{LEU}^L = 0,77[mM]$$

$$K_{GLN}^L = 16,54 \cdot 10^{-1}[mM]$$

Acontinasa [116]:

$$r_{ACON} = \frac{k_{ACON}}{C_{CIT}^m - \frac{C_{ICIT}^m}{K_{ACON}^E}}$$

$$k_{ACON} = 4,50 \cdot 10^4[1/hr]$$

$$K_{ACON}^E = 2,22[mM]$$

Isocitrato deshidrogenasa [116]:

$$r_{IDH} = \frac{k_{IDH}}{D_{IDH}}$$

$$D_{IDH} = \left(1 + \frac{C_H^m}{K_{H1}^{IDH}} + \frac{K_{H2}^{IDH}}{C_H^m}\right) + \frac{\left(\frac{K_{ICIT}^{IDH}}{C_{ICIT}^m}\right)^3}{\left(1 + \frac{C_{ADP}^c}{K_{ADP}^{IDH}} \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}}\right) \left(1 + \frac{C_{ACA}^m}{K_{ACA}^{IDH}}\right)}$$

$$+ \frac{K_{NAD}^{IDH}}{C_{NAD}^m \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}}} \left(1 + \frac{C_{NADH}^m}{K_{NADH}^{IDH}} \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}}\right)$$

$$+ \frac{\left(\frac{K_{ICIT}^{IDH}}{C_{ICIT}^m}\right)^3}{\left(1 + \frac{C_{ADP}^c}{K_{ADP}^{IDH}} \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}}\right) \left(1 + \frac{C_{ACA}^m}{K_{ACA}^{IDH}}\right)} \frac{K_{NAD}^{IDH}}{C_{NAD}^m \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}}} \left(1 + \frac{C_{NADH}^c}{K_{NADH}^{IDH}} \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}}\right)$$

$$k_{IDH} = 63,96 \cdot 10^2[mM/hr]$$

$$K_{H1}^{IDH} = 8,10 \cdot 10^{-5}[mM]$$

$$K_{ICIT}^{IDH} = 1,52[mM]$$

$$K_{ACA}^{IDH} = 1,41 \cdot 10^{-3}[mM]$$

$$K_{ADP}^{IDH} = 6,20 \cdot 10^{-2}[mM]$$

$$K_{NAD}^{IDH} = 9,23 \cdot 10^{-1}[mM]$$

$$K_{NADH}^{IDH} = 0,19[mM]$$

Alfa-ketoglutarato deshidrogenasa [116]:

$$r_{KGDH} = \frac{k_{KGDH}}{D_{KGDH}}$$

$$D_{KGDH} = 1 + \frac{\left(\frac{K_{\alpha KG}^{KGDH}}{C_{\alpha KG}^m}\right)^3}{\left(1 + \frac{C_{Mg}^m}{K_{Mg}^{KGDH}}\right)\left(1 + \frac{C_{AM}^m}{K_{ACA}^{KGDH}}\right)} + \frac{\frac{K_{NAD}^{KGDH}}{C_{NAD}^m}}{\left(1 + \frac{C_{Mg}^m}{K_{Mg}^{KGDH}}\right)\left(1 + \frac{C_{AM}^m}{K_{ACA}^{KGDH}}\right)}$$

$$k_{KGDH} = 0,9 \cdot 10^4 [mM/hr]$$

$$K_{\alpha KG}^{KGDH} = 1,94 [mM]$$

$$K_{Mg}^{KGDH} = 3,08 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{ACA}^{KGDH} = 1,27 \cdot 10^{-3} [mM]$$

$$K_{NAD}^{KGDH} = 3,87 \cdot 10^1 [mM]$$

Alanina transaminasa [21]:

$$r_{ATA} = k_{ATA} \left( C_{PYR}^m C_{GLU}^c - \frac{C_{\alpha KG}^m C_{ALA}^c}{K_{Eq}^{ATA}} \right)$$

$$k_{ATA} = 10 [mM/hr]$$

$$K_{Eq}^{ATA} = 20 [mM]$$

Transporte de ácido glutámico [21]:

$$r_{GLU} = k_X^{max} \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} \frac{C_{GLU}^e}{\frac{C_{GLU}^e}{K_{GLU}^X} + \left(1 + \frac{C_{ASP}^e}{K_{ASP}^X}\right)}$$

$$k_X^{max} = 24,43 \cdot 10^{-2} [1/hr]$$

$$K_{GLU}^X = 1,05 [mM]$$

$$K_{ASP}^X = 3,45 \cdot 10^{-2} [mM]$$

Transporte de glutamina [21]:

$$\begin{aligned}
 r_{GLN} = & \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} \left( k_A^{max} \frac{C_{GLN}^e}{\frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^A} + \left( 1 + \frac{C_{ALA}^e}{K_{ALA}^A} + \frac{C_{ALA}^c}{K_{ALA}^A} + \frac{C_{SER}^e}{K_{SER}^A} \right)} \right. \\
 & + k_{ASC}^{max} \frac{C_{GLN}^e}{\frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^{ASC}} + \left( 1 + \frac{C_{THR}^e}{K_{THR}^{ASC}} + \frac{C_{ALA}^e}{K_{ALA}^{ASC}} + \frac{C_{ALA}^c}{K_{ALA}^{ASC}} + \frac{C_{SER}^e}{K_{SER}^{ASC}} \right)} \\
 & + k_N^{max} \frac{C_{GLN}^e}{\frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^N} + \left( 1 + \frac{C_{ASN}^e}{K_{ASN}^N} \right)} \\
 & \left. + k_L^{max} \frac{C_{GLN}^e}{\frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^L} + \left( 1 + \frac{C_{LEU}^e}{K_{LEU}^L} \right)} \right)
 \end{aligned}$$

$$k_A^{max} = 4,23 \cdot 10^{-2} [1/hr]$$

$$K_{GLN}^A = 1,66 [mM]$$

$$K_{ALA}^A = 0,60 [mM]$$

$$K_{SER}^A = 0,73 [mM]$$

$$k_{ASC}^{max} = 1,11 [1/hr]$$

$$K_{THR}^{ASC} = 0,22 [mM]$$

$$K_{GLN}^{ASC} = 0,05 [mM]$$

$$K_{SER}^{ASC} = 17,75 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{ALA}^{ASC} = 0,10 [mM]$$

$$k_N^{max} = 8,98 \cdot 10^{-2} [1/hr]$$

$$K_{GLN}^N = 9,25 [mM]$$

$$K_{ASN}^N = 8 [mM]$$

Transporte de arginina [21]:

$$r_{ARG} = k_Y^{max} \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} \frac{C_{ARG}^e}{\frac{C_{ARG}^e}{K_{ARG}^Y} + \left( 1 + \frac{C_{LYS}^e}{K_{LYS}^Y} \right)}$$

$$k_Y^{max} = 31,92 \cdot 10^{-2} [1/hr]$$

$$K_{ARG}^Y = 1,12[mM]$$

$$K_{LYS}^Y = 0,21[mM]$$

Succinil CoA sintetasa [116]:

$$r_{SCS} = k_{SCS} \left( C_{SCoA}^m C_{ADP}^c \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} - C_{SUC}^m C_{ATP}^c \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} \frac{C_{CoA}^c}{K_{SCS}^e} \right)$$

$$k_{SCS} = 45,72 \cdot 10^1 [1/mM \cdot hr]$$

$$K_{SCS}^e = 31,15 \cdot 10^{-1} [1/mM]$$

Transporte de treonina [21]:

$$r_{THR} = k_{ASC}^{max} \frac{C_{THR}^e}{\frac{C_{THR}^e}{K_{THR}^{ASC}} + \left( 1 + \frac{C_{ALA}^e}{K_{ALA}^{ASC}} + \frac{C_{SER}^e}{K_{SER}^{ASC}} + \frac{C_{GLN}^c}{K_{GLN}^{ASC}} \right)}$$

$$k_{ASC}^{max} = 1,11 [1/hr]$$

$$K_{THR}^{ASC} = 0,22 [mM]$$

$$K_{GLN}^{ASC} = 0,05 [mM]$$

$$K_{SER}^{ASC} = 17,75 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{ALA}^{ASC} = 0,10 [mM]$$

Succinato deshidrogenasa [116]:

$$r_{SDH} = \frac{k_{SDH}}{\left( 1 + \frac{K_{SUC}^{SDH}}{C_{SUC}^m} \left( 1 + \frac{C_{OAA}^m}{K_{OAA}^{SDH}} \right) \left( 1 + \frac{C_{FUM}^m}{K_{FUM}^{SDH}} \right) \right)}$$

$$k_{SDH} = 1,80 \cdot 10^5 [mM/hr]$$

$$K_{SUC}^{SDH} = 3,00 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{OAA}^{SDH} = 1,50 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{FUM}^{SDH} = 1,30 [mM]$$

Fumarasa [116]:

$$r_{FUMH} = k_{FUMH} \left( C_{FUM}^m - \frac{C_{MAL}^m}{K_{FUMH}^e} \right)$$

$$k_{FUMH} = 3,60 \cdot 10^3 [1/hr]$$

$$K_{FUMH}^e = 0,5 [mM]$$

Malato deshidrogenasa [116]:

$$r_{MDH} = \frac{k_{MDH} f_a^{MDH} f_i^{MDH}}{\left(1 + \frac{K_{MAL}^{MDH}}{C_{MAL}^m} \left(1 + \frac{C_{OAA}^m}{K_{OAA}^{MDH}}\right) + \frac{K_{NAD}^{MDH}}{C_{NAD}^m \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}}} + \frac{K_{MAL}^{MDH}}{C_{MAL}^m} \left(1 + \frac{C_{OAA}^m}{K_{OAsA}^{MDH}}\right) \frac{K_{NAD}^{MDH}}{C_{NAD}^m \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}}}\right)}$$

$$f_a^{MDH} = \frac{1}{\left(1 + \frac{C_H^m}{k_1^{MDH}} + \frac{C_H^m}{k_1^{MDH} k_2^{MDH}}\right)} + k_{Offset}^{MDH}$$

$$f_i^{MDH} = \left(\frac{1}{\left(1 + \frac{k_3^{MDH}}{C_H^m} + \frac{k_3^{MDH} k_4^{MDH}}{C_H^m}\right)}\right)^2$$

$$k_{MDH} = 1,54 \cdot 10^4 [mM/hr]$$

$$K_{MAL}^{MDH} = 14,93 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{OAA}^{MDH} = 3,10 \cdot 10^{-3} [mM]$$

$$K_{NAD}^{MDH} = 22,44 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$k_1^{MDH} = 11,31 \cdot 10^{-6} [mM]$$

$$k_2^{MDH} = 26,70 [mM]$$

$$k_{Offset}^{MDH} = 3,99 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$k_3^{MDH} = 6,68 \cdot 10^{-9} [mM]$$

$$k_4^{MDH} = 5,62 \cdot 10^{-6} [mM]$$

Transporte de asparagina [21]:

$$r_{ASN} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} k_N^{\max} \frac{C_{ASN}^e}{\left(\frac{C_{ASN}^e}{K_{ASN}^N} + \left(1 + \frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^N}\right)\right)}$$

$$k_N^{max} = 8,98 \cdot 10^{-2} [1/hr]$$

$$K_{ASN}^N = 9,25 [mM]$$

$$K_{GLN}^N = 8 [mM]$$

Transporte de ácido aspártico [21]:

$$r_{ASP} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} k_X^{max} \frac{C_{ASP}^e}{\left( \frac{C_{ASP}^e}{K_{ASP}^X} + \left( 1 + \frac{C_{GLU}^e}{K_{GLU}^X} \right) \right)}$$

$$k_X^{max} = 24,43 \cdot 10^{-2} [1/hr]$$

$$K_{ASP}^X = 3,45 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{GLU}^X = 1,05 [mM]$$

Transporte de alanina [21]:

$$r_{ALA}^A = k_A^{max} \frac{C_{ALA}^e - C_{ALA}^c}{\left( \left( \frac{C_{ALA}^e}{K_{ALA}^A} + \frac{C_{ALA}^c}{K_{ALA}^A} \right) + \left( 1 + \frac{C_{SER}^e}{K_{SER}^A} + \frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^A} \right) \right)}$$

$$r_{ALA}^{ASC} = k_{ASC}^{max} \frac{C_{ALA}^e - C_{ALA}^c}{\left( \left( \frac{C_{ALA}^e}{K_{ALA}^{ASC}} + \frac{C_{ALA}^c}{K_{ALA}^{ASC}} \right) + \left( 1 + \frac{C_{THR}^e}{K_{THR}^{ASC}} + \frac{C_{SER}^e}{K_{SER}^{ASC}} + \frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^{ASC}} \right) \right)}$$

$$k_A^{max} = 4,23 \cdot 10^{-2} [1/hr]$$

$$K_{GLN}^A = 1,66 [mM]$$

$$K_{ALA}^A = 0,60 [mM]$$

$$K_{SER}^A = 0,73 [mM]$$

$$k_{ASC}^{max} = 1,11 [1/hr]$$

$$K_{THR}^{ASC} = 0,22 [mM]$$

$$K_{GLN}^{ASC} = 0,05 [mM]$$

$$K_{SER}^{ASC} = 17,75 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{ALA}^{ASC} = 0,10 [mM]$$

$$k_N^{max} = 8,98 \cdot 10^{-2} [1/hr]$$

$$K_{ASN}^N = 9,25[mM]$$

$$K_{GLN}^N = 8[mM]$$

Transporte de glutamina [21]:

$$r_{GLN} = \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} \frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} r_{GLN}^A + r_{GLN}^{ASC} + r_{GLN}^N + r_{GLN}^L$$

$$r_{GLN}^A = k_A^{max} \frac{C_{GLN}^e}{\frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^A} + \left(1 + \frac{C_{ALA}^e}{K_{ALA}^A} + \frac{C_{ALA}^c}{K_{ALA}^A} + \frac{C_{SER}^e}{K_{SER}^A}\right)}$$

$$r_{GLN}^{ASC} = k_{ASC}^{max} \frac{C_{GLN}^e}{\frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^{ASC}} + \left(1 + \frac{C_{THR}^e}{K_{THR}^{ASC}} + \frac{C_{ALA}^e}{K_{ALA}^{ASC}} + \frac{C_{ALA}^c}{K_{ALA}^{ASC}} + \frac{C_{SER}^e}{K_{SER}^{ASC}}\right)}$$

$$r_{GLN}^N = k_N^{max} \frac{C_{GLN}^e}{\frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^N} + \left(1 + \frac{C_{ASN}^e}{K_{ASN}^N}\right)}$$

$$r_{GLN}^L = k_L^{max} \frac{C_{GLN}^e}{\frac{C_{GLN}^e}{K_{GLN}^L} + \left(1 + \frac{C_{LEU}^e}{K_{LEU}^L}\right)}$$

$$k_A^{max} = 4,23 \cdot 10^{-2}[1/hr]$$

$$K_{GLN}^A = 1,66[mM]$$

$$K_{ALA}^A = 0,60[mM]$$

$$K_{SER}^A = 0,73[mM]$$

$$k_{ASC}^{max} = 1,11[1/hr]$$

$$K_{THR}^{ASC} = 0,22[mM]$$

$$K_{GLN}^{ASC} = 0,05[mM]$$

$$K_{SER}^{ASC} = 17,75 \cdot 10^{-1}[mM]$$

$$K_{ALA}^{ASC} = 0,10[mM]$$

$$k_N^{max} = 8,98 \cdot 10^{-2}[1/hr]$$

$$K_{ASN}^N = 9,25[mM]$$

$$K_{GLN}^N = 8[mM]$$

$$k_L^{max} = 19,56 \cdot 10^{-2}[1/hr]$$

$$K_{LEU}^L = 0,77[mM]$$

$$K_{GLN}^L = 16,54 \cdot 10^{-1}[mM]$$

## C . Parámetros de simulación

### Modelo completo

#### Concentración de cofactores y restricciones impuestas [21]

Concentración de magnesio intra-celular

$$C_{Mg} = 0,7[mM]$$

Concentración de fosfato intra-celular

$$C_{Pi} = 0,94[mM]$$

Concentración de dióxido de carbono intra-celular

$$C_{CO_2} = 0,2[mM]$$

Concentración de flavina adenina dinucleótido intra-celular

$$C_{FAD} = 5,83 \cdot 10^{-2} - C_{FADH}[mM]$$

Concentración de flavina adenina dinucleótido (reducida) intra-celular

$$C_{FADH} = 4,83 \cdot 10^{-2}[mM]$$

Concentración de nicotinamida adenina dinucleótido (reducida) citoplasmática

$$C_{NADH}^c = 5,9 \cdot 10^{-2} - C_{NAD}[mM]$$

Concentración de nicotinamida adenina dinucleótido (reducida) mitocondrial

$$C_{NADH}^m = 3 \cdot 10^{-4}[mM]$$

Concentración de nicotinamida adenina dinucleótido mitocondrial

$$C_{NAD}^m = 5,83 \cdot 10^{-2} - C_{NADH}^m [mM]$$

Concentración de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida) intra-celular

$$C_{NADPH} = 5 \cdot 10^{-4} - C_{NADP} [mM]$$

Concentración de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato intra-celular

$$C_{NADPH} = 3 \cdot 10^{-4} [mM]$$

Concentración de glutatona oxidada intra-celular

$$C_{GSSG} = 3,15 - C_{GSH} [mM]$$

Concentración de adenosin difosfato citoplasmática

$$C_{ADP}^c = 2 - C_{ATP}^c - C_{AMP}^c [mM]$$

Concentración de magnesio presente en la producción de ATP

$$C_{MgATP}^c = \frac{C_{Mg} C_{ATP}^c}{0,081} [mM]$$

Concentración de magnesio presente en la producción de ADP

$$C_{MgADP}^c = \frac{C_{Mg} C_{ADP}^c}{0,81} [mM]$$

Concentración de coenzima A intra-celular

$$C_{CoA} = 0,2 [mM]$$

Concentración de citrato mitocondrial

$$C_{CIT}^m = 10 - C_{ICIT}^m - C_{AKG}^m - C_{SCOA}^m - C_{SUC}^m - C_{FUM}^m - C_{MAL}^m - C_{OAA}^m [mM]$$

Concentración de calcio mitocondrial

$$C_{Ca}^m = 1 \cdot 10^{-4} [mM]$$

Concentración intra-celular de protones

$$C_{H^+} = 2,5 \cdot 10^{-5} [mM]$$

## Propiedades celulares

**Parámetros de crecimiento** Coeficiente máximo de crecimiento celular

$$\mu_{max} = 0,073 [hr^{-1}]$$

Coeficiente de inhibición de crecimiento por lactato [26]

$$K_{glc}^I = 14 [mM]$$

**Parámetros de volumen** Volumen celular [26]

$$V_{celula} = 4,189 \cdot 10^{-15} [L]$$

Razón volumen citoplasmático y mitocondrial [21]

$$\frac{V_{citoplasma}}{V_{mitocondria}} = 3.998 [-]$$

## Modelo simplificado

### Concentración de cofactores y restricciones impuestas [35]

Concentración de adenosin trifosfato citoplasmático

$$C_{ATP}^c = 0,8 [mM]$$

Concentración de adenosin monofosfato citoplasmático

$$C_{ATP}^c = 0,4 [mM]$$

Concentración de adenosin difosfato citoplasmático

$$C_{ADP}^c = 2 - C_{ATP}^c - C_{AMP}^c [mM]$$

Concentración de glutamato citoplasmático

$$C_{GLU}^c = 0,15[mM]$$

Concentración de  $\alpha$ -ketoglutamato citoplasmático

$$C_{\alpha KG}^c = 0,03[mM]$$

Concentración de nicotinamida adenin dinucleótido citoplasmático

$$C_{NAD}^c = 3,2 \cdot 10^{-4}[mM]$$

Concentración de nicotinamida adenin dinucleótido (reducido) citoplasmático

$$C_{NADH}^c = 6,1 \cdot 10^{-1}[mM]$$

## Propiedades celulares

**Parámetros de crecimiento** Coeficiente máximo de crecimiento celular

$$\mu_{max} = 0,075[hr^{-1}]$$

Coeficiente de inhibición de crecimiento por lactato [26]

$$K_{glc}^I = 14[mM]$$

**Parámetros de volumen** Volumen celular [26]

$$V_{celula} = 4,189 \cdot 10^{-15}[L]$$

Volumen citoplasmático [35]

$$V_{citoplasma} = 0,75 \cdot V_{celula}[L]$$

## D. Códigos MATLAB

### Sistema bio-reactor

#### Sistema global

```
1 function dCCdt=sistema10(t,CC,P)
2 % Modelo diferencial para sistema bioquimico reactor - celula
3 %
4 % SUPUESTOS
5 % =====
6 % 0.- Reactor CSTR con mezclado perfecto.
7 % 1.- Volumen de líquido en el reactor se mantiene constante mediante
8 % control sobre los flujos de salida y entrada.
9 % 2.- Volumen de las células es despreciable y no afecta el volumen de
10 % líquido en el reactor.
11 % 3.- Sin crecimiento celular.
12 %
13 % ARGUMENTOS Y SALIDA
14 % =====
15 % t      : tiempo [hr]
16 % CC     : Vector de variables [concentraciones celulares] [mM] [volumen
17 % del reactor] [lt] [concentraciones reactor] [mM] [concentracion celular]
18 % [No. de celulas]
19 % P      : Parametros (constantes cinéticas, volumen de la célula ...
20 %          [Vcell], constante cinética de reacción metabólica [k], flujo de ...
21 %          entrada [Fin], flujo de salida [Fout], concentración de entrada ...
22 %          [Cglcin])
23 %
24 % dCCdt  : Vector de diferenciales de salida [mM/hr]
25 %
26 % CHANGELOG
27 % =====
28 % Version 1.0 [2010/07/12]
29 % Modelo inicial
30 %
31 %
32 % Damián Baeza F.
33 % damian.baeza@gmail.com
34 %% Variables del sistema
35
36 global dLdGt dCCdT suma suma1 old_CC oldtie
37
38 Ccglc = CC(1);
39 Ccg6p = CC(2);
40 Ccpyr = CC(3);
41 Cclac = CC(4);
42 Ccala = CC(5);
43 Cglcin = CC(6);
44 Ceglc = CC(7);
45 Celac = CC(8);
46 Ceala = CC(9);
47 V = CC(10);
48 XV = CC(11);
```

```

45
46 if isempty(suma)
47     suma = 0;
48 end
49 if isempty(suma1)
50     suma1 = 0;
51 end
52 if isempty(dLdGt)
53     dLdGt = 0;
54 end
55 if isempty(dCCdT)
56     dCCdT = [zeros(1,12)];
57 end
58 if isempty(old_CC)
59     old_CC = CC;
60 end
61 if isempty(olddtie)
62     oldtie = 0;
63 end
64
65 fldh = Ponderator(Ceglc,P.nglc);
66
67 P.LDH = fldh;
68
69 %% Ecuaciones diferenciales
70
71 dcelldt = diffCC_2(t,CC,P);
72 dreactordt = creactor10(t,CC,P);
73 dVdt = vreactor10(t,CC,P);
74 dXdt = xcelula10(t,CC,P);
75
76 dCCdt = [dcelldt; dreactordt; dVdt; dXdt];
77
78 DCCDt = [dcelldt(1); dcelldt(3:4); dreactordt(2:3); dVdt; dXdt];
79
80 %% Estado estacionario
81
82 if norm(DCCDt) < 1e-4
83     suma = suma + 1;
84 else suma = 0;
85 end
86
87 if oldtie < t
88     Var_CC = norm(abs(CC - old_CC));
89     oldtie = t;
90     old_CC = CC;
91     if Var_CC < 1e-4
92         suma1 = suma1 + 1;
93     else suma1 = 0;
94     end
95 end
96
97 if suma == 10 || suma1 == 10
98     disp('Estado estacionario alcanzado')
99     t
100 end

```

```

101
102 clc
103 disp('completado (%):')
104 disp(t/P.tfin*100)
105
106 dCCdT = [dCCdT;t dCCdt'];

```

## Metabolismo celular

```

1 function dCCdt=diffCC_2(t,CC,P)
2
3 %% Variables
4
5 global RR DLDG CumGlc CumLac Glucosa Lactato conta Gluc dLdGt tiempo ...
   old_t i intcount suma old_Celac old_cum_glc old_cum_lac cum_glc ...
   cum_lac old_V old_X oldt old_Ceglc newCeglc new_Celac new_XV GlcIn ...
   GlcIn2 old_Fin old_Fin2 old_Fout
6
7 Ccglc = CC(1);
8 Ccg6p = CC(2);
9 Ccpyr = CC(3);
10 Cclac = CC(4);
11 Ccala = CC(5);
12 Cglcin = CC(6);
13 Ceglc = CC(7);
14 Celac = CC(8);
15 Ceala = CC(9);
16 V = CC(10);
17 XV = CC(11);
18
19 if isempty(RR)
20     RR = [];
21 end
22
23 %% Variables persistentes
24
25 if isempty(old_t)
26     old_t = 0;
27 end
28 if isempty(Gluc)
29     Gluc = 0;
30 end
31 if isempty(tiempo)
32     tiempo = 0;
33 end
34 if isempty(old_Ceglc)
35     old_Ceglc = Ceglc;
36 end
37 if isempty(old_V)
38     old_V = V;
39 end
40 if isempty(i)

```

```

41     i = [];
42 end
43 if isempty(intcount)
44     intcount = 0;
45 end
46 if isempty(suma)
47     suma = 0;
48 end
49 if isempty(newCeglc)
50     newCeglc = Ceglc;
51 end
52 if isempty(old_Celac)
53     old_Celac = 0;
54 end
55 if isempty(new_Celac)
56     new_Celac = 0;
57 end
58 if isempty(old_X)
59     old_X = XV/P.Vcell/10^9;
60 end
61 if isempty(new_XV)
62     new_XV = XV;
63 end
64 if isempty(old_cum_lac)
65     old_cum_lac = 0;
66 end
67 if isempty(old_cum_glc)
68     old_cum_glc = 0;
69 end
70 if isempty(cum_lac)
71     cum_lac = 0;
72 end
73 if isempty(cum_glc)
74     cum_glc = 0;
75 end
76 if isempty(old_Fin)
77     old_Fin = 0;
78 end
79 if isempty(old_Fin2)
80     old_Fin2 = 0;
81 end
82 if isempty(old_Fout)
83     old_Fout = 0;
84 end
85 if isempty(CumLac)
86     CumLac = [t cum_lac];
87 end
88 if isempty(CumGlc)
89     CumGlc = [t cum_glc];
90 end
91 if isempty(Lactato)
92     Lactato = [t Celac];
93 end
94 if isempty(Glucosa)
95     Glucosa = [t Ceglc];
96 end

```

```

97 if isempty(olddt)
98     olddt = t;
99 end
100 if isempty(DLDG)
101     DLDG = [0 0];
102 end
103 if isempty(conta)
104     conta = t;
105 end
106 if isempty(GlcIn)
107     GlcIn = 0;
108 end
109 if isempty(GlcIn2)
110     GlcIn2 = 0;
111 end
112
113 %% Supuestos
114 Vsn = V;
115
116 %% Velocidades
117
118 %Alanina Transaminasa
119 rata = P.ATA.*(P.kalatr.*(Ceala - Ccala)./(1 + Ceala/P.Kala + ...
    Ccala/P.Kala));
120
121 %Glicolisis
122 %Transporte de Glucosa (SC mod)
123 rperm = P.Glc.*((P.kfperm.*Ceglc - P.krperm.*Ccglc)./(1 + Ceglc./P.Kglc ...
    + Ccglc./P.Kglc));
124
125 %Hexoquinasa (E)
126 E0hk = 0.0722; % [mM]
127 vfmaxhk = 72E5; % [1/hr]
128 vrmmaxhk = 60; % [1/hr]
129 KhkMgATP = 6.3*10^-2; % [mM]
130 KihkMgATP = 6.3*10^-2; % [mM]
131 KhkMgADP = 2.3*10^-1; % [mM]
132 KihkMgADP = 2.3*10^-1; % [mM]
133 Khkg6p = 4*10^-2; % [mM]
134 Kihkg6p = 6.7; % [mM]
135 Khkglc = 1*10^-1; % [mM]
136 Kihkglc = 1*10^-1; % [mM]
137
138 rhk = P.HK.*(E0hk.*((vfmaxhk.*P.CcATP.*Ccglc/(Kihkglc*KhkMgATP) - ...
    vrmmaxhk.*P.CcADP.*Cc6p/(Khkg6p*KihkMgADP))./(1 + Ccglc/Kihkglc + ...
    P.CcATP/KihkMgATP + Cc6p/Kihkg6p + ...
    (P.CcATP/Kihkglc).*(Ccglc/KhkMgATP) + ...
    (P.CcATP/Khkg6p).*(Cc6p/KihkMgATP))));
139
140 %fosfofructo quinasa (E)
141 kpfk = 6.7514e+004; % [mM]
142 Kpfkf6p = 0.18; % [mM]
143 Kpfkf6p2 = 20; % [mM]
144 Kpfkatp = 0.08; % [mM]
145 Kpfkatp2 = 0.25; % [mM]
146 Kpfkfbp = 4.02; % [mM]

```

```

147 Kpfkfbp2 = 4.02; % [mM]
148 Kpfkadp = 2.71; % [mM]
149 Kpfkadp2 = 2.71; % [mM]
150 Kpfkiafp = 0.87; % [mM]
151 Kpfkaamp = 0.06; % [mM]
152 d = 0.01; % []
153 e = 0.01; % []
154 L0 = 13; % []
155
156 Delta = (1 + Ccg6p/Kpfkf6p).*(1 + P.CcATP/Kpfkafp) + P.CcADP/Kpfkadp + ...
          ((Ccpyr/2)/Kpfkfbp).*(1 + P.CcADP/Kpfkadp);
157 Delta2 = (1 + Ccg6p/Kpfkf6p2).*(1 + P.CcATP/Kpfkafp2) + P.CcADP/Kpfkadp2 ...
           + ((Ccpyr/2)/Kpfkfbp2).*(1 + P.CcADP/Kpfkadp2);
158 alfa = (Kpfkf6p*Kpfkafp)./(Kpfkf6p2*Kpfkafp2);
159 L = L0*((1 + P.CcATP./Kpfkiafp)/(1 + d.*P.CcATP./Kpfkiafp)).*((1 + ...
          e.*P.CcAMP./Kpfkaamp)./(1 + P.CcAMP./Kpfkaamp))^4;
160 krpfk = ((kfpfk.*Kpfkadp.*Kpfkfbp)./(Kpfkafp.*Kpfkf6p));
161
162 rpfk = P.PFK.*(((kfpfk.*(P.CcATP.*Ccg6p)./(Kpfkafp.*Kpfkf6p) - ...
          krpfk.*(P.CcADP.*Ccpyr/2)./(Kpfkadp.*Kpfkfbp))./(Delta)).*(1 + ...
          alfa.*L.*(Delta2/Delta)^3)./(1 + L.*(Delta2/Delta)^4));
163
164 %Lactato dehidrogenasa (Em)
165 vfmaldh = 5.1036e+008; % [mM/hr]
166 Kldhpyr = 0.6; % [mM]
167 Kldhnadh = 0.008; % [mM]
168 Kldhlac = 17; % [mM]
169 Kldhnad = 0.253; % [mM]
170 Kldheq = 2;
171
172 vrmaldh = ((vfmaldh.*Kldhlac.*Kldhnad)./(Kldhpyr.*Kldhnadh.*Kldheq));
173
174 rldh = P.kldh.*P.LDH.*((vfmaldh.*P.CcNADH.*Ccpyr./((Kldhpyr.*Kldhnadh) - ...
          vrmaldh.*P.CcNAD.*Cclac./((Kldhlac.*Kldhnad))./(1 + Ccpyr./Kldhpyr + ...
          P.CcNADH/Kldhpyr + Ccpyr.*P.CcNADH./((Kldhpyr.*Kldhpyr) + ...
          Cclac/Kldhlac + P.CcNAD./Kldhnad + ...
          Cclac.*P.CcNAD./((Kldhlac.*Kldhnad))));
175
176 %Transportador de Monocarboxilato (LO)
177 rmct = P.MCT.*((P.kfmct.*Cclac./P.Kfmct - P.krmct.*Celac./P.Krmct)./(1 + ...
          Cclac./P.Kfmct + Celac./P.Krmct));
178
179 %Alanina aminotransferasa
180 kfalaat = 0.0341*10^9/P.Vcito; % [mM/hr]*1000*1000
181 Keq = 1/6.5; % []
182 Kalaatak = 0.4; % [mM]
183 Kalaatiak = 0.4; % [mM]
184 Kalaatala = 2.80*10; % [mM]
185 Kalaatiala = 2.80*10; % [mM]
186 Kalaatglu = 2.50*10; % [mM]
187 Kalaatiglu = 2.50*10; % [mM]
188 Kalaatipyr = 3.00*10^-1; % [mM]
189
190 rf = kfalaat.*Ccala.*P.Ccakg./((Kalaatak.*Ccala + Kalaatala.*P.Ccakg + ...
          Kalaatiala.*Kalaatak.*P.Ccglu./Kalaatiglu + ...
          Kalaatala.*Kalaatiak.*Ccpyr./Kalaatipyr + Ccala.*P.Ccakg + ...

```

```

        Kalaatala.*P.Ccakg.*Ccpyr./Kalaatipyr + ...
        Kalaatglu.*Ccala.*P.Ccglu./Kalaatiglu);
191 Tau = Ccpyr.*P.Ccglu./(P.Ccakg.*Ccala);
192
193 ralaat = P.ALAAT.*rf.*(1 - Tau./Keq);
194
195 %Ciclo TCA
196
197 TCA = 19.76E-2; % [mM/hr]
198 Ktct = P.TCT.*0.02;
199 ktct = P.TCT.*1.962.*10^0;
200
201 rtca = ktct.*(Ccpyr/(Ktct + Ccpyr));%P.TCT.*TCA.*Vsn./(3*P.Vcito);
202
203
204 %% Ecuaciones
205
206 dCcglc_dt = P.perm.*rperm - rhk;
207 dCcgp_dt = rhk - rpfk;
208 dCcpyr_dt = 2*rpfk - rldh + ralaat - rtca;
209 dCclac_dt = rldh - rmct;
210 dCcala_dt = - ralaat + rata;
211
212 dCCdt = [dCcglc_dt dCcgp_dt dCcpyr_dt dCclac_dt dCcala_dt]';
213
214 %% dL/dG
215
216 if oldt < t
217     cum_glc = old_cum_glc + (old_Ceglc*old_V - Ceglc*V) + ...
                old_Fin*GlcIn*(t - oldt) + old_Fin2*GlcIn2*(t - oldt) - ...
                old_Fout*old_Ceglc*(t - oldt);
218     cum_lac = old_cum_lac + (Celac*V - old_Celac*old_V) + ...
                old_Fout*old_Celac*(t - oldt);
219     CumGlc = [CumGlc; t cum_glc];
220     CumLac = [CumLac; t cum_lac];
221     Gluc = vectorspace(CumGlc(:,1), CumGlc(:,2), P.spa, P.ns);
222     Lact = vectorspace(CumLac(:,1), CumLac(:,2), P.spa, P.ns);
223     if Gluc ≠ 0
224         qglc = dNaturalSPLINE(Gluc(:,1), Gluc(:,2), t);
225         qlac = dNaturalSPLINE(Lact(:,1), Lact(:,2), t);
226         dLdGt = qlac/qglc;
227         DLDG = [DLDG;t dLdGt];
228     end
229     old_Ceglc = Ceglc;
230     old_Celac = Celac;
231     old_cum_glc = cum_glc;
232     old_cum_lac = cum_lac;
233     old_V = V;
234     oldt = t;
235     GlcIn = Cglcin;
236     GlcIn2 = P.Cglcin2;
237     old_Fin = P.Fin;
238     old_Fin2 = P.Fin2;
239     old_Fout = P.Fout;
240 end
241

```

```

242 %% cambio de variables persistentes
243
244 Glucosa = [Glucosa; t Ceglc];
245 Lactato = [Lactato; t Celac];
246 conta = [conta; t];
247
248 %%
249 RR = [RR; t rperm rhk rpfk rldh ralaat rtca rmct rata];

```

## Volumen reactor

```

1 function dCCdt=vreactor10(t,CC,P)
2 % Modelo diferencial para sistema bioquimico reactor - celula
3 %
4 % SUPUESTOS
5 % =====
6 % 0.- Reactor CSTR con mezclado perfecto.
7 % 1.- Volumen de líquido en el reactor se mantiene constante mediante
8 % control sobre los flujos de salida y entrada.
9 % 2.- Volumen de las células es despreciable y no afecta el volumen de
10 % líquido en el reactor.
11 % 3.- Sin crecimiento celular.
12 %
13 % ARGUMENTOS Y SALIDA
14 % =====
15 % t      : tiempo [hr]
16 % CC     : Vector de variables [concentraciones celulares] [mM] [volumen
17 % del reactor] [lt] [concentraciones reactor] [mM] [concentracion celular]
18 % [No. de celulas]
19 % P     : Parametros (constantes cinéticas, volumen de la célula ...
20 % [Vcell], constante cinética de reacción metabólica [k], flujo de ...
21 % entrada [Fin], flujo de salida [Fout], concentración de entrada ...
22 % [Cglcin])
23 %
24 % dCCdt  : Vector de diferenciales de salida [mM/hr]
25 %
26 % CHANGELOG
27 % =====
28 % Version 1.0 [2010/07/12]
29 % Modelo inicial
30 %
31 % Damián Baeza F.
32 %% Variables del sistema
33
34 Ccglc = CC(1);
35 Ccg6p = CC(2);
36 Ccpyr = CC(3);
37 Cclac = CC(4);
38 Ccala = CC(5);
39 Cglcin = CC(6);
40 Ceglc = CC(7);
41 Celac = CC(8);

```

```

39 Ceala = CC(9);
40 V = CC(10);
41 XV = CC(11);
42
43 %% Ecuaciones diferenciales
44 fS = Ceglc/(P.Kxglc + Ceglc);
45 fI = P.Kxlac/(Celac + P.Kxlac);
46 D = P.Fout/V;
47
48 dVdt = P.Fin + P.Fin2 - P.Fout;
49
50 dCCdt = [dVdt]';

```

## Densidad celular del cultivo

```

1 function dCCdt=xcelula10(t,CC,P)
2 % Modelo diferencial para sistema bioquimico reactor - celula
3 %
4 % SUPUESTOS
5 % =====
6 % 0.- Reactor CSTR con mezclado perfecto.
7 % 1.- Volumen de líquido en el reactor se mantiene constante mediante
8 % control sobre los flujos de salida y entrada.
9 % 2.- Volumen de las células es despreciable y no afecta el volumen de
10 % líquido en el reactor.
11 % 3.- Sin crecimiento celular.
12 %
13 % ARGUMENTOS Y SALIDA
14 % =====
15 % t      : tiempo [hr]
16 % CC     : Vector de variables [concentraciones celulares] [mM] [volumen
17 % del reactor] [lt] [concentraciones reactor] [mM] [concentracion celular]
18 % [No. de celulas]
19 % P      : Parametros (constantes cinéticas, volumen de la célula ...
20 % [Vcell], constante cinética de reacción metabólica [k], flujo de ...
21 % entrada [Fin], flujo de salida [Fout], concentración de entrada ...
22 % [Cglcin])
23 %
24 % dCCdt  : Vector de diferenciales de salida [mM/hr]
25 %
26 % CHANGELOG
27 % =====
28 % Version 1.0 [2010/07/12]
29 % Modelo inicial
30 %
31 %
32 % Damián Baeza F.
33 % damian.baeza@gmail.com
34 %% Variables del sistema
35
36 global MU oldti
37
38 Ccglc = CC(1);

```

```

35 Ccg6p = CC(2);
36 Ccpyr = CC(3);
37 Cclac = CC(4);
38 Ccala = CC(5);
39 Cglcin = CC(6);
40 Ceglc = CC(7);
41 Celac = CC(8);
42 Ceala = CC(9);
43 V = CC(10);
44 XV = CC(11);
45
46 if isempty(MU)
47     MU = [t 0.031];
48 end
49 if isempty(olddti)
50     olddti = t;
51 end
52
53 %% Ecuaciones diferenciales
54
55 fS = Ceglc/(P.Kxglc + Ceglc);
56 fI = P.Kxlac/(Celac + P.Kxlac);
57
58 if olddti < t
59     MU = [MU; t P.mumax.*fS.*fI];
60     olddti = t;
61 end
62
63 dXVdt = (P.mumax.*fS.*fI - P.Fout/V).*XV;
64
65 dCCdt = [dXVdt]';

```

## Concentración de glucosa/lactato/alanina extracelular

```

1 function dCCdt=creactor10(t,CC,P)
2 % Modelo diferencial para un reactor continuo
3 %
4 % SUPUESTOS
5 % =====
6 % 0.- Reactor CSTR con mezclado perfecto.
7 % 1.- Volumen de líquido en el reactor se mantiene constante mediante
8 % control sobre los flujos de salida y entrada.
9 % 2.- Volumen de las células es despreciable y no afecta el volumen de
10 % líquido en el reactor.
11 % 3.- Sin crecimiento celular.
12 %
13 % ARGUMENTOS Y SALIDA
14 % =====
15 % t      : tiempo [hr]
16 % CC     : Vector de variables [concentraciones celulares] [mM] [volumen
17 % del reactor] [lt] [concentraciones reactor] [mM] [concentracion celular]
18 % [No. de celulas]

```

```

19 % P      : Parametros (constantes cinéticas, volumen de la célula ...
      [Vcell], constante cinética de reacción metabólica [k], flujo de ...
      entrada [Fin], flujo de salida [Fout], concentración de entrada ...
      [Cglcin])
20 %
21 % dCCdt  : Vector de diferenciales de salida [mM/hr]
22 %
23 % CHANGELOG
24 % =====
25 % Version 1.0 [2010/07/12]
26 %      Modelo inicial
27 %
28 % Damián Baeza F.
29 % damian.baeza@gmail.com
30 %% Variables del sistema
31
32 global dLdGt
33
34 Ccglc = CC(1);
35 Ccg6p = CC(2);
36 Ccpyr = CC(3);
37 Cclac = CC(4);
38 Ccala = CC(5);
39 Cglcin = CC(6);
40 Ceglc = CC(7);
41 Celac = CC(8);
42 Ceala = CC(9);
43 V = CC(10);
44 XV = CC(11);
45
46 %% velocidades de transporte de glucosa y lactato
47 % Velocidad de transporte de glucosa [mM/hr]
48 rperm = P.Glc.*((P.kfperm.*Ceglc - P.krperm.*Ccglc)/(1 + Ceglc./P.Kglc ...
      + Ccglc./P.Kglc));
49 % Velocidad de transporte de lactato [mM/hr]
50 rmct = P.MCT.*((P.kfmct.*Cclac./P.Kfmct - P.krmct.*Celac./P.Krmct )/(1 ...
      + Cclac./P.Kfmct + Celac./P.Krmct));
51 % Velocidad de transporte de alanina [mM/hr]
52 rata = P.ATA.*(P.kalatr.*(Ceala - Ccala)/(1 + Ceala/P.Kala + ...
      Ccala/P.Kala));
53
54 %% Balances de masa para el reactor
55
56 SetPoint = P.Ysp;
57 c = controladorglc(t, dLdGt, SetPoint, P);
58 dCglcin_dt = c;
59
60 dCeglc_dt = P.Fin./V.*Cglcin + P.Fin2./V.*P.Cglcin2 - P.Fout./V.*Ceglc - ...
      P.perm.*rperm.*XV; %
61
62 dCelac_dt = - P.Fout./V.*Celac + rmct.*XV; %
63
64 dCeala_dt = - P.Fout./V.*Ceala - rata.*XV; %
65
66 %% Vector diferencial
67 dCCdt = [dCglcin_dt dCeglc_dt dCelac_dt dCeala_dt]';

```

## Funciones adicionales

### Función de regulación

```
1 function fldh = Ponderator(Ceglc,nglc)
2
3 %% Funcion de Hill
4
5 %ldh
6 beta = 1;
7 Kglc = 1.24;
8
9 %% Calculo estimador
10 fldh = (beta*((Ceglc)^nglc/(Kglc^nglc + (Ceglc)^nglc));
```

### Función *dNaturalSPLINE.mat*

```
1 function dyi = dNaturalSPLINE(x, y, xi)
2 % NATURALSPLINE One dimensional interpolation
3 %
4 % YI = NATURALSPLINE(X, Y, XI) applies the natural spline
5 % interpolation to find YI, the values of the underlying
6 % function Y at the points in the vector XI. The vector
7 % X specifies the points at which the data Y is given.
8 %
9 % (c) by N. Mostoufi & A. Constantinides
10 % January 1, 1999
11
12 % Initialization
13 % nargin: number of inputs supplied
14 if nargin < 3
15     error('Invalid number of inputs.')
```

```
16 end
17
18 x = (x(:).'); % Make sure it's a file vector
19 y = (y(:).'); % Make sure it's a file vector
20 xi = (xi(:).'); % Make sure it's a file vector
21 nx = length(x);
22 ny = length(y);
23 if nx ≠ ny
24     error('X and Y vectors are not the same size.');
```

```
25 end
26
27 lxi = length(xi);
28 % Location the required number of base points
29 for m = 1 : lxi
30     d = xi(m) - x;
31     % Locating xi
32     [dm, loc(m)] = min(abs(d));
33     % locating the first base point
```

```

34     if d(loc(m)) < 0 || loc(m) == nx
35         loc(m) = loc(m) - 1;
36     end
37     if loc(m) < 1;
38         loc(m) = 1;
39     end
40 end
41
42 dx = diff(x);
43 dy = diff(y);
44 yox = dy./dx;
45 % Matrix of coefficients
46 A = 2*diag(x(3:nx)-x(1:nx-2)) + ...
47     [zeros(nx-2,1) [diag(dx(2:nx-2)); zeros(1,nx-3)]] + ...
48     [zeros(1,nx-2); [diag(dx(2:nx-2)) zeros(nx-3,1)]];
49 % Vector of constants
50 c = 6*(yox(2:nx-1) - yox(1:nx-2));
51 % Solution of the set of linear equations
52 y2 = [0; inv(A)*c'; 0]; % interpolation
53 dyi = (1/2)*((xi - x(loc+1)).^2./(x(loc) - x(loc+1))).*y2(loc)' ...
54     + (1/2)*((xi - x(loc)).^2./(x(loc+1) - x(loc))).*y2(loc+1)' ...
55     - (1/6)*((x(loc) - x(loc+1)).*(y2(loc)' - y2(loc+1)')) + (y(loc) - ...
        y(loc+1))./(x(loc) - x(loc+1));

```

### **Función de creación de vector para *dNaturalSPLINE.mat***

```

1  function VS = vectorspace(x, y, SPA, NS)
2
3  m = numel(x);
4  n = numel(y);
5
6  if m ≠ n
7      disp('vectores x e y no son del mismo largo')
8  end
9
10 VS = zeros(NS,2);
11
12 j = 1;
13
14 mini = min(x);
15 maxi = max(x);
16 lastin = maxi;
17 dista = lastin - SPA;
18
19 if (maxi - mini) < NS*SPA
20     VS = 0;
21     % disp('vector de largo insuficiente')
22 else
23 VS(1,:) = [x(m) y(m)];
24     for i = 1:m
25         if j == NS
26             break

```

```
27     elseif abs(x(m+1-i) - dista) < 1e-3
28         VS(j+1,:) = [x(m+1-i) y(m+1-i)];
29         j = j + 1;
30         lastin = x(m+1-i);
31         dista = lastin - SPA;
32     elseif dista > x(m+1-i)
33         VS(j+1,:) = [x(m+1-i) y(m+1-i)];
34         j = j + 1;
35         lastin = x(m+1-i);
36         dista = lastin - SPA;
37     end
38 end
39 end
40
41 return
```