DOI: http://dx.doi.org/10.18273/revion.v30n1-2017006

Enfrentando el modelado de bioprocesos: una revisión de las metodologías de modelado

Facing bioprocess modeling: a review of the methodologies of modeling

Enfrentando a modelagem de bioprocesos: uma revisão de metodologias de modelagem

Fabián Alberto Ortega Quintana*; Hernán Alvarez; Héctor Antonio Botero Castro

Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Facultad de Minas. Grupo de Investigación en Procesos Dinámicos-Kalman. Carrera 80, No.65-223- Núcleo Robledo.

*faortegaqui@unal.edu.co, ingenierofabianortega@gmail.com

Fecha Recepción: 06 de mayo de 2016
Fecha Aceptación: 05 de diciiembre de 2016

Resumen
En este artículo se presenta una revisión detallada de las diferentes metodologías para el modelado de procesos, señalando sus deficiencias y limitaciones al aplicarlas al modelado de bioprocesos. Como resultado del análisis se encuentra que, al aplicar esas metodologías a los bioprocesos, todas fallan porque no consideran explícitamente la interacción existente entre el medio ambiente y el material celular, al menos de forma descriptiva. Se resalta que hasta ahora la forma de unir estos dos mundos ha sido a través de funciones puramente predictivas. Finalmente, se describen las tendencias en el modelado de bioprocesos, concluyéndose que el enfoque está orientado al planteamiento de modelos matemáticos de base fenomenológica, con rasgos descriptivos o explicativos, para representar la relación existente entre la célula y su medio ambiente.

Palabras clave: *bioproceso, fenomenología, empírico, explicativo, descriptivo, modelado.*

Abstract
This article presents a detailed review of different approaches for process modeling, indicating their deficiencies and limitations when applied to bioprocesses modeling. As a result of the analysis it is concluded that these methodologies fail in bioprocesses modeling because they do not explicitly take into account the interaction between environment and cellular material, at least descriptively. It is noted that so far the way to bring these two worlds has been through purely predictive functions. Finally, the trends in bioprocess model are described; concluding that the approach is oriented to phenomenological based mathematical models with descriptive or explanatory features, to represent the relationship between the cell and its environment.

Keywords: *bioprocess, phenomenology, empirical, explicative, descriptive, modeling.*

Resumo
Neste artigo apresenta-se uma revisão detalhada das diferentes metodologias para a modelagem de processos, assinalando suas deficiências e limitações ao aplicar à modelagem de bioprocessos. Como resultado da análise se encontra que ao aplicar essas metodologias de bioprocessos, todos falham porque não consideram explicitamente a interação existente entre o meio ambiente e o material celular, ao menos de forma descritiva. Ressalta-se que até agora a forma de unir estes dois mundos tem sido

Cita: Ortega Quintana FA, Álvarez H, Botero Castro HA. Enfrentando el modelado de bioprocesos: una revisión de las metodologías de modelado. rev.ion.2017;30(1):73-90.

através de funções puramente preditivas. Finalmente, descrevem-se as tendências na modelagem de bioprocessos, concluindo-se que o enfoque está orientado à proposta de modelos matemáticos de base fenomenológica, com características descritivas ou explicativas, para representar a relação entre a célula e seu meio ambiente.

Palabras-chave: *bioprocessos, fenomenologia, empírica, explicativo, descritiva, modelagem.*

Introducción

Los bioprocesos son una parte esencial de muchas industrias de alimentos, químicas y farmacéuticas. En los bioprocesos se usan células (microbianas, animales y vegetales) y componentes de células, tales como las enzimas, para manufacturar nuevos productos o destruir desechos peligrosos, entre otras labores. Por eso, puede decirse que un bioproceso consiste de un cultivo de células o el uso de componentes de células en un biorreactor, el cual es un proceso capaz de crear un ambiente de crecimiento o uso óptimo del material celular [1]. Desde la antigüedad, los bioprocesos han sido desarrollados para una enorme variedad de productos comerciales, desde materiales relativamente baratos tales como el alcohol industrial, las levaduras y los solventes orgánicos, hasta sustancias muy costosas como los antibióticos, las proteínas terapéuticas, las enzimas y las vacunas [2-3].

Debido a la enorme importancia de los bioprocesos en el mundo contemporáneo, se plantea la necesidad de mejorarlos, para lo cual se requieren modelos más elaborados que describan con un gran nivel de exactitud lo que está pasando en la célula como consecuencia de su interacción con el medio ambiente. Este esfuerzo se evidencia en el planteamiento de modelos estructurados que involucran a la célula como un ente con estructura interna; modelos segregados que consideran la diversidad de la población celular; modelos cibernéticos que consideran la presencia de múltiples sustratos en el medio y modelos que utilizan inteligencia artificial para el ajuste de parámetros cinéticos, entre otros [4-18]. Adicionalmente, se tienen modelos dinámicos del metabolismo de varios microorganismos, algunos casi completos y otros que están en construcción. Un ejemplo es el caso de la *Escherichia coli* [19], cuyo metabolismo es conocido casi en su totalidad [20]. En este sentido, la genómica, la transcriptómica y la proteómica han hecho un gran aporte a la ingeniería metabólica para el conocimiento de los mecanismos participantes del anabolismo y catabolismo celular que permiten la alteración específica de las rutas metabólicas [21]. A pesar de los grandes avances que el modelado de bioprocesos ha tenido, no existen reportes que expongan de manera analítica por qué las metodologías de modelado aplicadas a los bioprocesos fallan. Por lo tanto, este trabajo presenta una revisión detallada de las diferentes metodologías de modelado de procesos, recalcando sus deficiencias y limitaciones al aplicarlas a los bioprocesos. Para esto, se presenta un recuento sobre modelado en ingeniería y los tipos de modelos y una revisión y comparación de metodologías de modelado de procesos. Luego, se discute sobre el modelado de los bioprocesos. Posteriormente, se describen las tendencias del modelado de los bioprocesos y, por último, se presentan las conclusiones.

El Modelado en Ingeniería

En la industria de procesos hay un incremento en la demanda de modelos puesto que su uso es muy importante en el diseño, control, optimización, estimación de estados, detección de fallas e inclusive en la formación e instrucción del personal de la planta. Una gran ventaja de los modelos es que son una herramienta muy valiosa cuando se quiere observar el comportamiento de un sistema, pero no se quiere o no se puede experimentar con él. La disponibilidad de modelos buenos hace que las distintas actividades realizadas en la práctica industrial sean mejor evaluadas [9,22-24]. A continuación, se describe la clasificación de los modelos de acuerdo al conocimiento previo del proceso y de acuerdo con la cantidad de información adicional que brindan sobre el fenómeno. Dicha información adicional va más allá de los resultados obtenidos al resolver el modelo en una simulación.

Tipos de modelos

Los modelos se pueden clasificar de acuerdo al conocimiento previo sobre el proceso en tres tipos:

Fenomenológicos. También llamados de caja blanca, que están basados en fundamentos

teóricos que permiten explicar perfectamente el comportamiento de los procesos. Todo en dichos modelos proviene de leyes o principios básicos de la química, la física y la biología. Sus principios de formulación son la ley de conservación y la ley de causalidad (ley de gradiente). Algunas formulaciones para cantidades no conservativas, mediante términos adicionales, se convierten en ecuaciones conservativas, tales como ecuaciones de entropía y de cantidad de movimiento [25].

Empíricos. También llamados de caja negra, se construyen sólo a partir de datos experimentales para ajustar parámetros en una estructura matemática dada. Para su construcción, se apoyan en las herramientas de la estadística y el tratamiento de señales. Su baja complejidad computacional los hace atractivos para usos en línea en las tareas de optimización y control de procesos [26]. Sin embargo, estos modelos son altamente dependientes de los datos: si algo cambia en la operación del proceso modelado, debe obtenerse un nuevo conjunto de datos y un nuevo modelo.

Combinación de fenomenológicos y empíricos. También llamados de caja gris, que pueden ser semifísicos (estructura fenomenológica) o semiempíricos (estructura empírica). Los Modelos Semifísicos de Base Fenomenológica (MSBF) se llaman así porque la universalidad del principio de conservación le da a la estructura del modelo un fundamento fenomenológico fuerte y el carácter semifísico se da porque adiciona a la estructura dada por el fenómeno formulaciones empíricas para varios de sus parámetros [27-29].

Adicional a la anterior clasificación, los modelos también se pueden agrupar de acuerdo con la cantidad de información adicional que brindan sobre el fenómeno así [30-31]:

Explicativos. El contenido de información en el modelo es el mayor posible, puesto que explican todos y cada uno de los fenómenos presentes en el sistema. Normalmente, se basan en leyes y principios. En la investigación científica responden a la pregunta ¿Por qué y de qué forma ocurren determinados fenómenos en un proceso? La explicación usa todos los rasgos del proceso para construir el modelo. Nada se supone o se toma por analogía.

Descriptivos. Son aquellos que, sin explicar los fenómenos, sí realizan una definición de las características, componentes y condiciones en que se presentan y las distintas maneras en que puede manifestarse el fenómeno. La descripción completa los rasgos más relevantes del proceso con rasgos supuestos, para construir una hipótesis de operación creíble, desde la que se obtiene el modelo.

Puramente predictivos. Estos se limitan a realizar una representación que permite calcular los efectos de las relaciones entre las variables de interés del sistema, sin brindar ninguna descripción de los fenómenos involucrados. En el diseño de ingeniería responden a la pregunta ¿Cómo será el comportamiento del sistema modelado en circunstancias diferentes?

Para construir un modelo de cualquiera de los tipos descritos anteriormente se han planteado diferentes metodologías, las cuales han evolucionado a través del tiempo. A continuación, se muestra una comparación de las metodologías de modelado más referenciadas en la literatura de los procesos químicos. Todas estas metodologías intentan construir la estructura del modelo (relación entre sus términos), desde la fenomenología del proceso que se modela.

Metodologías de modelado de base fenomenológica

Existen varias propuestas de metodologías de modelado de procesos usando una base fenomenológica, las cuales difieren básicamente en el número de pasos a ejecutar, en la secuencia de ejecución de los pasos y en la forma de ejecución de cada paso. La Tabla 1 muestra una comparación de los principales autores que proponen las metodologías de modelado de procesos de mayor citación en la literatura científica. Esta comparación se basa en los siguientes pasos metodológicos que generalmente se siguen para el modelado [29]:

1. Elaborar una descripción verbal y un Diagrama de Flujo de Proceso (DFP) que se complementen. **2.** Fijar un nivel de detalle para el modelo y postular una hipótesis de modelado. **3.** Definir tantos Sistemas de Proceso (SdeP) sobre el proceso que se modelará como lo exija el nivel de detalle, y representar la relación de todos los SdeP en un Diagrama de Flujo en Bloque (DFB). **4.** Aplicar

el principio de conservación sobre cada uno de los SdeP y en ellos sobre todas las propiedades de interés, siempre en forma diferencial. **5.** Seleccionar entre las Ecuaciones Dinámicas de Balance (EDB) aquellas con información valiosa para cumplir con el objetivo del modelo. **6.** Definir para las EDB esenciales los parámetros, las variables y las constantes conocidas en cada SdeP. **7.** Hallar ecuaciones constitutivas que permitan calcular el mayor número de parámetros en cada SdeP. **8.** Verificar los grados de libertad del modelo. **9.** Obtener el modelo computacional o solución del modelo matemático. **10.** Validar el modelo para diferentes condiciones y evaluar su desempeño.

En la tarea de modelado a través de estas metodologías, el ingeniero se encuentra con una serie de obstáculos que podrían llevarlo al abandono o ralentización de dicha tarea.

Tabla 1. Comparación de autores que proponen metodologías de modelado de procesos

Referencia	Paso metodológico (la x indica que el paso se utiliza)									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
[32]	-	-	x	x	-	-	-	-	x	x
[33]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[34]	X	-	-	x	-	-	-	-	x	x
[35]	X	-	-	x	-	-	-	-	x	x
[36]	X	-	-	x	-	-	-	-	x	x
[37]	X	-	-	x	-	-	-	-	x	x
[38]	-	-	-	x	-	-	-	-	x	-
[39]	X	-	-	x	x	x	x	-	x	x
[40]	-	-	-	x	-	-	-	-	x	x
[22]	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-
[41]	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-
[42]	X	-	-	x	-	-	-	-	x	x
[43]	X	-	-	x	-	-	-	-	x	x
[44]	X	-	-	x	-	-	-	-	x	x
[45]	X	-	-	x	-	-	-	-	x	x
[46]	X	-	-	x	-	-	-	-	x	x
[47]	X	X	x	x	-	x	x	x	-	-
[29]	X	X	x	x	x	x	x	x	x	x
[28]	X	X	x	x	-	x	-	x	x	x
[27]	X	X	x	x	x	x	x	x	x	x
[48]	X	X	x	x	x	x	x	x	x	x

Las principales limitaciones de estas metodologías se describen a continuación:

- Se necesita tener suficiente experticia sobre el proceso, la cual no está al alcance de los que recién incursionan en esta tarea. Por ejemplo, en algunas referencias se habla de "identificación de los factores o mecanismos controlantes" [34,36,39,43], lo cual necesita ser ampliado o mejorado, debido a que identificar esos factores o mecanismos controlantes implica una experiencia y conocimiento amplio de la realidad que se pretende modelar. Al respecto, Epstein J [49] menciona 16 razones diferentes a la predicción que justifican la obtención de modelos. Varias de tales razones indican el uso del modelado como aporte a la comprensión y aprendizaje de un fenómeno.
- En algunos casos no hay un orden lógico de pasos. Por ejemplo, algunos autores sugieren el "uso de las leyes fundamentales para desarrollar modelos físicos (balances, ecuaciones constitutivas, chequear grados de libertad y formas adimensionales)" [34,36-37,42-43,45-46], con lo cual se deja al ingeniero en un punto muy amplio que llevaría a confundir el orden de las actividades.
- En algunas referencias no se deja claro de manera explícita la forma de desarrollar un modelo. Por ejemplo, referencias como Bastin G y Dochain D [33] plantean un modelo general de base fenomenológica para los bioprocesos y Bequette BW [22] ejemplifica muchos modelos de procesos afianzados en la industria, pero ninguna de las dos referencias explica de manera explícita el método utilizado para desarrollar un modelo. Dicha forma o método debe dejar claramente definidos todos los conceptos, componentes y herramientas involucrados en el desarrollo del modelo.
- Algunos textos dedican su aporte a la explicación de las leyes de conservación (materia, energía) pero luego se dedican a obtener modelos empíricos y a presentar su resolución matemática, perdiendo de vista la metodología para el planteamiento general de modelos semifísicos en los procesos referenciados [32,38,40-41,44].

Si bien existen limitaciones, también se han venido realizando mejoras en el planteamiento metodológico. Por ejemplo, Ribas M *et al.* [28] plantean "Fijar el nivel de detalle", lo cual hace referencia a la descripción de todos los supuestos en que se basa el modelo con el objetivo de reducirlo para que describa únicamente los fenómenos relevantes. Gómez C *et al.* [47] plantean un paso de "Definición de Sistemas de procesos", que consiste en la abstracción del proceso a la manera de uno o más sistemas, con lo cual se pueden aplicar al proceso todas las herramientas de

representación y análisis de sistemas matemáticos existentes.

En este sentido, la metodología para obtener modelos semifísicos de base fenomenológica mejor detallada hasta el momento ha sido propuesta por Alvarez H *et al.* [29] y adicionada en varias ocasiones con el fin de perfeccionarla y hacerla más sencilla para el usuario [27,48]. Esta metodología plantea, además de "Fijar el Nivel de detalle" y "Definir Sistemas de Procesos", que el elemento clave para lograr la sencillez en la propuesta metodológica es el uso de una o más abstracciones macroscópicas como base para la obtención del modelo. Se entiende por abstracción a la extracción de características relevantes de un fenómeno, de modo que se pueda describir mediante una analogía aplicable, bien porque se conoce el fenómeno estudiado o porque sin saberlo detalladamente, se puede aplicar una analogía para describirlo. Las limitaciones 1 y 2, descritas anteriormente, se pueden superar con esta metodología como se propone a continuación: Para la limitación 1, "identificación de los factores o mecanismos controlantes", se pueden seguir los siguientes pasos, que buscan llegar al mismo resultado, pero a través de tareas más sencillas y evidentes para un modelador no tan experto en el tema:

- Escoger el nivel de detalle que se quiere del modelo y postular una hipótesis de modelado.
- Definir el número de sistemas de procesos (SdeP) de acuerdo al nivel de detalle.
- Aplicar el principio de conservación sobre todos los SdeP.

  Para la limitación 2, "uso de las leyes fundamentales para desarrollar modelos físicos (balances, ecuaciones constitutivas, chequear grados de libertad y formas adimensionales)", se pueden seguir los siguientes pasos, luego de obtener los balances dinámicos de materia y energía:
- Seleccionar entre las ecuaciones dinámicas de balance (EDB) aquellas con información valiosa para cumplir con el objetivo del modelo.
- Definir para las EDB esenciales, los parámetros, las variables y las constantes conocidas en cada SdeP.
- Hallar ecuaciones constitutivas que permitan calcular el mayor número de parámetros en cada SdeP.

Estos pasos complementarios, como se dijo, ya están en el procedimiento de Alvarez H *et al*. [48]. Sin embargo, esta metodología no contiene la inclusión de la fenomenología para intentar al menos describir la comunicación de la célula con el medio. A continuación, se discute sobre el modelado de los bioprocesos y se explica por qué las metodologías arriba comparadas fallan al ser aplicadas al modelado de estos.

El Modelado de los bioprocesos

De acuerdo con lo planteado en la sección anterior, los modelos fenomenológicos y explicativos serían los requeridos para tener la capacidad de entender en su máxima expresión la naturaleza de los procesos. A pesar de ello, solo algunos bioprocesos enzimáticos tienen modelos de estas características, mientras que en los que intervienen microorganismos apenas se ha logrado plantear modelos combinados (fenomenológico y empíricos) de tipo descriptivos. Esto último se debe a que las metodologías de modelado resultan incompletas al aplicarlas a bioprocesos y por lo tanto no permiten describir la complejidad de los microorganismos y su relación con el entorno. Desafortunadamente, hay carencia de conocimiento de varios de los fenómenos involucrados en un bioproceso, lo cual hace que la mayoría de los modelos de bioprocesos sean empíricos y por lo tanto restringidos al espacio de los datos experimentales disponibles.

Particularidades de los bioprocesos

Cuando se abordan los bioprocesos, desde el punto de vista científico, se encuentra que son más complejos que los procesos químicos. Desde luego, ambos poseen tratamientos ingenieriles comunes, pero existen diferencias muy marcadas entre ellos como:

- La alta complejidad de la mezcla reaccionante: para los procesos donde se utilizan microorganismos, el medio de cultivo debe tener los requisitos mínimos nutricionales para que exista crecimiento celular y producción de metabolitos primarios y secundarios. Para cumplir con estos requisitos, el medio normalmente se compone de múltiples sustratos (fuentes de carbono y nitrógeno), sales orgánicas e inorgánicas, reguladores de pH, antiespumantes, oxígeno disuelto, y como producto del metabolismo aparecen alcoholes, ácidos, lípidos, proteínas, etc. Esta composición es la responsable de la complejidad del medio, lo cual modifica la hidrodinámica del sistema, afectando el metabolismo celular. Por ejemplo, en los biorreactores tipo columnas de burbujeo,

se presenta un mejoramiento de la transferencia de masa por el efecto turbulento de las burbujas de aire en el medio, pero simultáneamente se están produciendo sustancias (polímeros, proteínas, ácidos grasos, etc.) que disminuyen la transferencia de masa. En las plantas de tratamiento de aguas residuales, un problema frecuente es la variabilidad que presenta el coeficiente de transferencia de masa para el oxígeno, al pasar del aire burbujeado al agua, lo cual altera la velocidad de crecimiento de las células que degradan el material orgánico. Dicha variabilidad es causada, entre otras cosas, por el aumento de la tensión superficial entre el agua y las burbujas de aire por efecto de los ácidos grasos y proteínas provenientes de los desechos [42,50].

- El incremento en la masa de microorganismos paralelo a la realización de la transformación bioquímica: en muchos bioprocesos, se presentan simultáneamente el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos de interés industrial. Esto afecta el rendimiento de producción debido a que parte de los reactivos (nutrientes) es transformada en material biológico, crecimiento que no es deseado en muchos bioprocesos. Paralelo a los eventos de crecimiento microbiano y producción de metabolitos se libera calor de reacción, el cual debe ser retirado por un fluido de servicio. Si el bioproceso se lleva a cabo en tanques agitados o en columnas de burbujeo, la agitación ayuda a aumentar los coeficientes de transferencia de calor y, por lo tanto, mejora el retiro del calor de la reacción. No obstante, la agitación debe respetar ciertos principios biológicos e hidrodinámicos, debido a que velocidades altas de agitación producen estrés hidrodinámico en algunos microorganismos. Este estrés es responsable de los daños letales o sub-letales en las células, produciendo la muerte del microorganismo o alteraciones metabólicas en el cultivo [51].

- La capacidad de los microorganismos de sintetizar sus propios catalizadores (enzimas): este hecho es una ventaja frente a los procesos químicos, ya que al tener fuentes *in situ* del catalizador se reducen los costos de producción. Adicionalmente, estos catalizadores poseen alta especificidad sobre algunos sustratos, lo cual disminuye el riesgo de tener reacciones parásitas que reducen la productividad y que inducen a la aparición de productos no deseados. Por ejemplo, esto ocurre en la producción de α-amilasas por *Aspergillus oryzae* en un proceso de fermentación sumergida [52].

- Los comportamientos suaves y exigentes en regulación precisa de temperatura y pH para el óptimo funcionamiento de las enzimas y del crecimiento de los microorganismos: los componentes que forman los seres vivos y las enzimas son muy sensibles a los cambios de temperatura y de pH. Por ejemplo, las proteínas poseen un rango óptimo de estabilidad respecto a estas variables, y su sensibilidad es tal que cuando ocurren pequeños cambios en el proceso, se modifica la configuración espacial de la proteína y pierden su actividad, afectando así al metabolismo celular responsable del crecimiento y a la actividad de las enzimas por cambios en el sitio activo [53].

- La dificultad del mantenimiento de la transformación bioquímica requerida (estabilidad de producción): como resultado de la producción de metabolitos y de las perturbaciones que pueden afectar a un bioproceso, ocurren inhibiciones del crecimiento de los microorganismos, reacciones secundarias entre productos y sustratos e inclusive cambios inesperados en el metabolismo celular que afectan el rendimiento del bioproceso. Por ejemplo, el crecimiento de levaduras es inhibido por el etanol producido por el microorganismo [54].

- Las concentraciones relativamente bajas de sustrato y productos: los microorganismos son muy sensibles a las altas concentraciones de algunos compuestos que pueden causar aumento de la presión osmótica, teniéndose como consecuencia la turgencia y/o lisis de la célula. Conocer este hecho, implica que en la mayoría de bioprocesos se utilicen concentraciones bajas de sustratos mientras se vigila que no se alcancen ciertas concentraciones límites de producto, todo con el fin de evitar inhibiciones por bloqueos en las reacciones metabólicas. Adicionalmente, con estas concentraciones bajas de sustrato los coeficientes de transferencia de masa son muy pequeños al igual que las velocidades de reacción, lo cual influye negativamente en el

rendimiento de los bioprocesos. Por ejemplo, Arroyo-López F *et al.* [55] reportaron que la velocidad de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* disminuye cuando el medio tiene concentración de azúcar entre 200 y 300g/L.

Para superar la dificultad mencionada en el punto 1 se utilizan diferentes diseños de aireación (mecánicos, difusión e híbridos) y se adicionan agentes químicos para evitar grandes variaciones en la tensión superficial. Todas estas mejoras hacen más complejos los modelos matemáticos. Para superar la dificultad mencionada en el punto 2, la ingeniería genética ha realizado modificaciones en microorganismos de gran interés industrial. Estas modificaciones pueden ralentizar el crecimiento de microorganismos mientras se enfoca el metabolismo a la producción o pueden dotar al microorganismo de características genotípicas de resistencia ante las adversidades del medio. Estas modificaciones repercuten en los modelos obtenidos por la ingeniería metabólica, que por tanto deben ser corregidos. Con relación a las dificultades mencionadas en los puntos 3, 4 y 5, se busca tener modelos que sean muy confiables debido a la alta exigencia del control de los bioprocesos. En este sentido, una de las estrategias con alta probabilidad de éxito es el Control Predictivo basado en Modelo (MPC), el cual exige un buen modelo guía. Por último, y no menos importante, para sobreponerse a la dificultad mencionada en el punto 6, se utilizan combinaciones de reactores dispuestos en paralelo y en serie para aumentar la productividad a pesar de las bajas concentraciones utilizadas, lo cual hace que los modelos matemáticos sean aún más complejos. En conclusión, mejorar las dificultades arriba mencionadas a través de las diversas estrategias existentes implica más complejidad en los modelos de bioprocesos.

Uno de los objetivos que se plantean los investigadores de modelado en los bioprocesos es que los modelos sean de naturaleza descriptiva, y ojalá explicativa. Pero las anteriores diferencias de los bioprocesos típicos con los procesos químicos hacen que la tarea de modelado sea difícil, a pesar de que se han hecho avances al respecto. A continuación, se discutirá sobre las dificultades que se presentan en el modelado de los bioprocesos.

Dificultades en la obtención de modelos para bioprocesos.

Si analizamos el campo de los procesos químicos, el modelamiento de éstos está resuelto en términos metodológicos [27,39,45-46,]. Sin embargo, no existe una metodología de modelado aplicada a procesos biológicos que considere explícitamente la interacción existente entre el medio ambiente y el material celular. Dicha interacción natural no ha sido completamente descrita y mucho menos explotada para el diseño, optimización y control de los mismos. Varios modelos conceptuales y matemáticos se han formulado con el objeto de explicar y replicar el comportamiento que muestran los procesos biológicos [5,8,17,33,35,42-43,]. Estos modelos se han clasificado según las consideraciones asumidas respecto de la estructura de las células o de la distribución de la población celular, consideraciones ya mencionadas como características de los modelos de los bioprocesos. A pesar de estos avances, los bioprocesos siguen siendo difíciles de modelar y esto se debe en primer lugar a la complejidad del comportamiento de los microorganismos. A diferencia de reactores con productos químicos sin vida, los microorganismos tienen características asociadas con el tipo de célula: procariota (sin membrana nuclear), eucariota (con membrana que define al núcleo), o células con membranas de alta complejidad estructural. Además, los microorganismos tienen la posibilidad de formar partes filamentosas, esporas o cápsulas, con gran cantidad de reacciones bioquímicas que intervienen en la actividad celular en sí misma.

El segundo aspecto que dificulta el modelado de bioprocesos es la falta de una relación matemática explícita que al menos describa la interacción de las variables ambientales y las variables internas o propias del material celular, ya que hasta ahora la forma de unir estos dos mundos ha sido a través del empirismo [17,42]. Para ilustrar la problemática presentada en la modelación de bioprocesos basta con analizar la siguiente situación: en Schügerl y Bellgardt [17] se describe el modelado del proceso de obtención de Penicilina por Bajpai R y Reuß M [56] y por otra parte se explica el modelo de biosíntesis de la Penicilina obtenido por Jørgensen H *et al.* [57]. Una situación semejante sucede con el proceso de obtención de etanol a partir de fermentación de glucosa con

Saccharomices cerevisiae, en el cual se conoce su ruta metabólica [58-59] y se tienen modelos para el medioambiente [47]. Sin embargo, del análisis de estas investigaciones surge la pregunta ¿Por qué no existe una relación matemática explícita, al menos descriptiva, entre las variables medioambientales y las variables de la célula en la producción de penicilina y etanol, si ya se conoce toda la explicación de sus rutas metabólicas y además se sabe modelar el medioambiente? Es ahí donde existe una línea de trabajo abierta, que busca expresar matemáticamente desde las analogías físico-químicas una descripción de los mecanismos por los cuales la célula establece comunicación con el medio en el que vive. Tal formulación matemática de esos fenómenos dará mayor interpretabilidad a los modelos semifísicos de base fenomenológica aplicados a bioprocesos, puesto que ya no se tendrán que representar las cinéticas propias del microorganismo con términos empíricos como Monod.

Modelos matemáticos de bioprocesos

La historia de los modelos en bioprocesos comienza en 1905, con la ecuación propuesta por Frederick Blackman para la velocidad específica de crecimiento [60]. En 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten desarrollaron la teoría del complejo enzima-sustrato (cuyo concepto había sido introducido en 1894 por Emil Fisher) y propusieron una ecuación de velocidad que explica el comportamiento cinético de las enzimas [61]. En 1942, basándose en los trabajos de Michaelis y Menten, Jacques Monod desarrolla una ecuación cinética para el crecimiento que relaciona la concentración de sustrato con la velocidad de crecimiento del microorganismo [62]. Para este mismo año, Georges Teissier también publica su modelo exponencial de velocidad de crecimiento [63]. Posteriormente, se han desarrollado una gran cantidad de modelos para la velocidad de crecimiento, aplicables a una gran variedad de procesos biotecnológicos los cuales en su mayoría tienen como base a los tres modelos precursores ya mencionados [3,33,64].

Los modelos en bioprocesos planteados en la actualidad tienen dos características destacables. Primero, un modelo puede ser estructurado o no estructurado dependiendo de si se describen las características internas de la célula o sus partes (reacciones metabólicas, procesos celulares, etc.) o si considera la célula como una entidad sin estructura interna. Segundo, un modelo puede ser segregado o no segregado en función de si se considera o no la heterogeneidad de la población celular, por ejemplo, la posición en el ciclo celular que las diferencia entre células jóvenes, células en reproducción y células en fase de senescencia. La elección entre las opciones que brindan estas características depende del objetivo del modelo [7,17].

El modelado de los procesos biológicos tiene numerosas vertientes, cada una buscando la manera más provechosa de explicar o describir los procesos de acuerdo al interés de estudio que se tenga. Dentro de las características que se destacan en las diferentes investigaciones llevadas a cabo por estas vertientes se tienen: i) modelado del metabolismo celular por la ingeniería metabólica, ii) obtención de modelos de caja gris de todo el bioproceso, iii) modelado de caja gris con reducción para escalado de bioprocesos, y iv) modelado para estimar los valores de los parámetros cinéticos [4-6,8-16,18,55,65-70].

A continuación, se describe el desarrollo que han tenido los modelos de bioprocesos teniendo en cuenta la clasificación de acuerdo al conocimiento previo sobre el proceso.

El empirismo en el modelado de bioprocesos.

Dochain D [71] enuncia claramente la principal característica existente en el modelado de bioprocesos: “El modelado de procesos bioquímicos es un ejercicio delicado. Contrario a la física, donde hay leyes que han sido conocidas por el hombre durante siglos (la ley de Ohm, la ley de los gases ideales, la segunda ley de Newton, los principios de la termodinámica, etc.) la mayoría de los modelos en biología dependen de leyes empíricas. Como no es posible basarlos sólo en el conocimiento disponible (y validado), es muy importante ser capaz de caracterizar la confiabilidad de las leyes utilizadas en la construcción del modelo”.

En la literatura científica abunda la utilización de modelos empíricos para resolver los problemas presentados en los bioprocesos, problemas que están relacionados con la obtención de una expresión que relacione a la célula con su medio ambiente. La Tabla 2 muestra la bibliografía de referencia de los principales modelos empíricos planteados en bioprocesos para la velocidad específica de crecimiento del microorganismo. La gran mayoría de estos modelos empíricos se basan en plantear una ecuación que permita predecir los valores de la velocidad de

crecimiento específica de los microorganismos y su dependencia con respecto a algunas variables de proceso, tales como concentración de sustrato, concentración de biomasa, concentración de producto, concentración de oxígeno disuelto, pH, temperatura e intensidad de luz.

Adicional a los modelos enunciados por la Tabla 2, también se encuentran modelos que predicen

Tabla 2. Referencia bibliográfica de modelos empíricos de velocidad de crecimiento específica.

Dependencia de la velocidad de crecimiento específica con respecto a :	Referencia bibliográfica
Concentración de sustrato	[24,54,72-83]. El modelo de Haldane es referenciado en Andrews JF [84].
Concentración de biomasa	[85-86]
Concentración de sustrato y concentración de biomasa	[87-90]
Concentración de producto	[91-97]
Concentración de sustrato y concentración de producto	[78,92,98-102]
Concentración de sustrato y concentración de oxígeno disuelto	[103-104]
Concentración de sustrato, concentración de oxígeno disuelto y concentración de producto	[23]
Concentración de sustrato y concentración de metabolito inhibitorio	[89]
pH	[105]
Temperatura y pH	[106]
Concentración de sustrato y pH	[105,107]
Temperatura	[108-109]
Temperatura y concentración de biomasa	[110]
Intensidad de luz y concentración de biomasa	[111]

la cinética de formación de producto [112-113]. Todos estos modelos tratan de aproximar, aunque de manera empírica y puramente predictiva, la relación matemática entre el medio ambiente y el material celular.

Si bien las ecuaciones constitutivas en bioprocesos para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ) son empíricas, éstas han hecho que la utilización de los modelos matemáticos obtenidos haya mejorado las actividades de escalado, optimización, diseño de estimadores y control de procesos. Sin embargo, esto no ha sido suficiente puesto que dichas formulaciones matemáticas empíricas para la velocidad específica de crecimiento no son ni siquiera descriptivas de lo que está sucediendo. Inclusive, existen modelos totalmente empíricos que por su uso generalizado han sido confundidos y referenciados como modelos fenomenológicos, lo cual fue advertido por Grady C *et al.* [114]. Tal es el caso de la ya mencionada ecuación de Monod para la velocidad de crecimiento, tratada por Button D [115], la cual sigue siendo empírica, a pesar de varios esfuerzos por darle base fenomenológica [76].

La fenomenología en el modelado de bioprocesos. A lo largo de la historia del modelado de los bioprocesos, los investigadores realizaron intentos para demostrar las bases fenomenológicas de algunas ecuaciones empíricas muy utilizadas. A continuación, se describen algunas investigaciones al respecto.

Konak A [76] intentó demostrar que las ecuaciones de Monod y de Teissier tenían una base fenomenológica, pero a pesar de obtener un modelo general para predecir la velocidad de crecimiento específica, el modelo resultó ser de naturaleza empírica debido a que en su demostración matemática fue asumida la ley de potencia para la función de la fuerza impulsora ($\mu_{max} - \mu$). Merchuk J y Asenjo J [116] intentaron interpretar el significado de las variaciones extremadamente grandes de los valores de la constante de Monod sobre la base de la transferencia de masa. El modelo obtenido está en función de variables conocidas, pero el modelo se transforma en empírico debido a las suposiciones para el cálculo del coeficiente convectivo de transferencia de masa (h_s), el cual se halla de forma empírica. Se pierde el rasgo

explicativo cuando se calcula h_s basado en la suposición de que éste puede ser considerado proporcional a la raíz cuadrada de la difusividad del sustrato y esta difusividad fue tomada del trabajo de Schwartzemberg H y Chao R [117], transformándose en un intento interpretativo de la constante K_s de Monod.

Button D [115] planteó que la relación entre la velocidad de consumo de sustrato a una concentración particular y la afinidad específica puede ser modelada a partir de la tasa de colisión entre dos partículas. En ese trabajo se mostró que la afinidad específica es una buena medida de la habilidad de la célula para escoger el sustrato y que las constantes de saturación pequeñas son usualmente asociadas con afinidades grandes. Pese a que representa un buen intento por explicar la afinidad de la célula por el sustrato, la demostración matemática realizada para tal fin está basada en la ecuación de Monod.

Liu Y [118] planteó un modelo general para el crecimiento microbiano apoyado en la termodinámica, basado en el supuesto analógico del sitio activo de las enzimas aplicado a la pared celular [115]. Se plantea que las células tienen sólo un número limitado de sitios de toma de sustrato. Este modelo general muestra indirectamente y bajo ciertas suposiciones, que la constante de Monod (K_s) tiene características de la termodinámica del no equilibrio, además afirma que K_s por sí sola no describe la muy referenciada constante de afinidad del par sustrato-célula, ya que la magnitud de n (constante del modelo general de Liu) también determina la velocidad de reacción del sustrato y subsecuentemente la afinidad del sustrato por la célula. El modelo de Liu parece ofrecer una base teórica del modelo empírico de Moser y explica que es un índice gobernado por los cambios en la energía libre de Gibbs generados por el proceso de crecimiento microbiano. Ese crecimiento está estrechamente relacionado al par especie bacteriana-sustrato presente en un cultivo bacteriano, por lo tanto, cualquier factor que influya sobre la interacción entre bacteria y sustrato también alterará el valor de K_n. Finalmente, Liu Y [118] concluye que el modelo de Monod es estrictamente empírico.

Por otro lado, los procesos donde intervienen enzimas son una parte de los bioprocesos que poseen gran contenido fenomenológico dentro de sus modelos. Los métodos de modelado modernos ahora pueden dar comprensión única detallada de las reacciones catalizadas por enzimas, incluyendo el análisis de los mecanismos y la identificación de los determinantes de la especificidad y de la eficiencia catalítica. Como ejemplo se tienen los trabajos de Lok M *et al.* [53], Gofferjé G *et al.* [119], Vega R y Zuniga M [120], Mulholland A [121].

A pesar de los intentos por explicar los fenómenos que intervienen en los bioprocesos, previamente mencionados, aún hay situaciones por resolver que impiden la obtención de un modelo riguroso. Desde luego, estas dificultades han hecho que el modelado se aborde desde el punto de vista de mezclar el empirismo con la fenomenología a través de los modelos semifísicos de base fenomenológica, tratados a continuación.

Los Modelos Semifísicos de Base Fenomenológica (MSBF) en el modelado de bioprocesos. La utilización de Modelos Semifísicos de Base Fenomenológica (MSBF) con características de parámetros concentrados, los cuales relacionan las variables más significativas del medio ambiente del proceso (estados), ha sido una constante en las últimas décadas de investigación en los bioprocesos. Algunas investigaciones que plantean este tipo de modelo son: Ortega F *et al.* [122], Melgarejo R *et al.* [123], Geng X *et al.* [124], Kythreotou N *et al.* [125], Akpa J [126], Roeva O *et al.* [127], Atehortúa P *et al.* [128], Lokshina L *et al.* [129], Bajpai R y Reuß M [56]. Es importante anotar que estos modelos han hecho posible la mejora en las tareas de optimización y control de los bioprocesos respectivos. Bastin G y Dochain D [33] plantearon un modelo dinámico general en el espacio de estado para la descripción de procesos biotecnológicos en biorreactores de tanque agitado, modelo que escrito en forma matricial es:

$$\frac{d\xi}{dt} = K\varphi(\xi,t) - D\xi - Q(\xi) + F \qquad (1)$$

Donde: D es la tasa de dilución; F es el vector de los flujos másicos de entrada en el biorreactor de los componentes; ξ es el vector de concentración de los componentes en el biorreactor; $\varphi(\xi,t)$ es el vector de velocidades de reacción; K es la matriz de coeficientes de rendimiento, compuesta por elementos K_{ij} (i reacciones y j compuestos) estrictamente constantes positivas de coeficientes de rendimientos, sin dimensiones, y con signo menos (-) cuando ξ_i es un reactante y signo más (+) cuando ξ_i es un producto de la reacción; $Q(\xi)$ es el vector de los flujos másicos de salida de

los componentes ξ_i en forma gaseosa desde el biorreactor.

La Ecuación 1 expresa en una sola forma matemática compacta los dos fenómenos físicos principales (las cinéticas y las dinámicas de transporte) que ocurren y están en interacción íntima en un biorreactor. El término $K\varphi(\xi, t)$ describe las cinéticas de las reacciones bioquímicas y microbiológicas involucradas en el proceso, y los términos $D\xi$, $Q(\xi)$ y F describen las dinámicas de transporte de los componentes a través del biorreactor. Sin embargo, este modelo genérico deja en libertad al usuario para que la matriz de los coeficientes de rendimiento K se modele como mejor resulte. Obviamente, y ante la ausencia de una forma descriptiva de las relaciones entre el medio ambiente y material biológico, dichos submodelos para los términos de K serán empíricos y por lo tanto el modelo general será un modelo semifísico de base fenomenológica. Por ejemplo, el modelo más utilizado para el coeficiente de rendimiento, más conocido como la velocidad de crecimiento específico del microorganismo, es el modelo de Monod:

$$\mu_{(S)} = \frac{\mu^* S}{K_M + S} \quad (2)$$

Donde: μ^*es la velocidad de crecimiento máximo; K_M es la constante de saturación; S es la concentración de sustrato.
En caso de existir inhibición por sustrato es utilizada la "ley de Haldane", también empírica:

$$\mu_{(S)} = \frac{\mu_0 S}{K_M + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (3)$$

Donde: $K_I$es el parámetro de inhibición, y

$$\mu_0 = \mu^* \left(1 + \sqrt{\frac{K_M}{K_I}} \right) \quad (4)$$

Si la inhibición de sustrato es despreciable, la ley de Haldane se reduce a la ley de Monod [33].
Como se observa, la deficiencia que persiste en los MSBF es que la relación célula-medio ambiente es empírica, lo que ni siquiera permite una descripción que vincule a la fisiología de la célula con las transferencias de materia y energía que ocurren. Sin embargo, los MSBF han sido una herramienta fuerte en el modelado de bioprocesos, situación que puede mejorar si se plantean buenas hipótesis de modelado, lo cual se basa en una o más abstracciones de los fenómenos que ocurren realmente, como si fueran fenómenos preestablecidos y conocidos, fácilmente vinculados a los reales, pero más simples que los reales. Tal aproximación desde las abstracciones debería conducir con éxito a una descripción matemática de la relación célula-medio que evite la aproximación empírica a los coeficientes asociados con los procesos celulares.

Tendencias del modelado en bioprocesos

A través de la historia, los ingenieros de procesos se han enfrentado a diversos paradigmas. El primero de ellos es la mirada que se tiene de los procesos como sistemas análogos que comparten unidades de transformación similares o conjunto de operaciones unitarias. En dichas operaciones, suceden fenómenos cuyo comportamiento general es independiente de la naturaleza específica de las sustancias en proceso. El segundo paradigma es la búsqueda de la explicación a escala molecular para los fenómenos macroscópicos observados en las operaciones unitarias. El tercer paradigma es la explicación de la relación entre el comportamiento molecular, las interacciones moleculares, los fenómenos a nivel de la microescala que se dan en el fluido, y el comportamiento macroscópico de las operaciones unitarias. En la actualidad, los ingenieros de bioprocesos han planteado un cuarto paradigma: en cada unidad de biorreacción o de bioseparación, para efectos de su análisis, modelación y diseño, se puede ver como una población de micro-unidades de transformación (células, microorganismos) confinadas en un macro-equipo mecánico. La premisa del cuarto paradigma conduce al estudio de la interrelación entre el medio ambiente y la célula [130]. En tal sentido, las áreas de investigación actuales en el modelado de bioprocesos buscan:

- La integración de los modelos metabólicos con los modelos del entorno o medio ambiente en que viven los microorganismos. Esta haría el puente necesario entre la ingeniería metabólica y la ingeniería de procesos, con lo cual se avanzaría hacía una ingeniería global de los bioprocesos.
- La comprensión básica de la fisiología celular y de su regulación, que constituye la base de la ingeniería metabólica a través de la obtención de mapas y modelos metabólicos completos. Por ejemplo, Machado D *et al*.

[131] diseñaron y optimizaron una ruta para la producción de curcumina en *Escherichia coli*. Dicha ruta fue modelada *in silico* e insertada en la reconstrucción cinética disponible del metabolismo central de carbono de la *Escherichia coli* propuesto por Chassagnole C *et al.* [132]. Usuda Y *et al.* [133], usando un modelo de metabolismo central del carbono disponible, modelaron los procesos metabólico y regulatorio envueltos en la producción de glutamato en *Escherichia coli*.

- La descripción y explicación de bioprocesos a través de los modelos semifísicos de base fenomenológica con facilidad de implementar en el escalado y el control automático: Gómez C *et al.* [47] construyeron un modelo semifísico de base fenomenológica para un proceso de fermentación y Atehortúa P *et al.* [128] completaron un modelo cinético para el crecimiento del *Bacillus thuringiensis*. Con ambos modelos se pueden implementar fácilmente estrategias de control y escalado del bioproceso. Aunque estos dos modelos describen bien los bioprocesos involucrados, no dejan explícitamente indicada la relación célula-medio.
- La obtención de modelos a través de la aplicación de elementos análogos entre lo conocido y los bioprocesos: el trabajo de Roche R *et al.* [134], formula un modelo global del músculo cardíaco basado en la idealización de la célula cardiaca como un sistema de dos tanques interconectados completamente agitados. Dicho modelo puede ser utilizado para analizar el efecto de fármacos y tratamientos de patologías cardíacas. Umulis D *et al.* [135] construyeron un modelo fisiológico para predecir las concentraciones de etanol y de acetaldehído en la sangre del cuerpo humano. El modelo asume que el conjunto de órganos que forman el sistema regulador de etanol en la sangre del cuerpo humano funcionan como reactores de tanque agitado y reactores de flujo pistón.
- La utilización de la micro-fluídica para la obtención de modelos: con esta visión se avanza en la biología molecular en las áreas de análisis de ADN, análisis enzimáticos y la proteómica [136-137]. Por ejemplo, Leclerc K *et al.* [138] modelaron, con aplicación de CFD (*Computational Fluids Dynamic*), el comportamiento dinámico de cultivos de fibroblastos de ratón y células vivas hepatocarcinomas en un microchip. Los resultados arrojaron que la CFD es una herramienta poderosa para la optimización del diseño de microchips para cultivos celulares.
- La combinación entre los modelos obtenidos de los principios de conservación y las redes neuronales o modelos borrosos para ajustar los parámetros cinéticos. Aunque esos modelos representan bien los bioprocesos involucrados, no poseen una base explicativa de lo que sucede en la relación célula-medio [5-6,9-10,13,15-16].
- La obtención de modelos de bioprocesos usando la metodología de Bond Graph [68-70] y los modelos cibernéticos que se han desarrollado para predecir el crecimiento celular cuando se encuentran diferentes sustratos [18].

En definitiva, en los bioprocesos interaccionan dos mundos: la célula y su medio ambiente. En la actualidad existen áreas que están trabajando arduamente para obtener modelos matemáticos que representen lo mejor de cada lado. La ingeniería metabólica modela el metabolismo celular recibiendo aportes importantes por las ciencias “ómicas” (transcriptómica, genómica, metabolómica, proteómica) y la ingeniería de procesos (transferencia de calor, mecánica de fluidos y reología, transferencia de masa, cinética de reacciones, operaciones unitarias y termodinámica) modela al medio ambiente. A pesar de los esfuerzos planteados por cada una de estas áreas, no existe una comunicación vía formulaciones matemáticas que no sean empíricas, que permita relacionar estos dos mundos.

Conclusiones

Se presentó una revisión detallada de las particularidades de los bioprocesos y su dificultad para modelarlos, lo cual se debe en primer lugar a la complejidad de los microorganismos y la complejidad de su metabolismo, y en segundo lugar a la falta de una relación matemática explícita que al menos describa la interacción de las variables ambientales y las variables del interior del material celular.

Se realizó un análisis de la literatura científica más referenciada sobre metodologías de modelado en procesos y se encontró que al aplicarlas a los bioprocesos, todas fallan en la integración entre la ingeniería metabólica y la ingeniería de procesos. Esto porque ninguna considera explícitamente la

interacción existente entre el medio ambiente y el material celular, al menos de forma descriptiva. Dicha relación afecta directamente todas las cinéticas, las que hasta ahora han sido formuladas a través de relaciones empíricas. A pesar de los avances en el modelado de bioprocesos, el empirismo sigue estando en la mayoría de los modelos que se realizan en la industria con fines de control y optimización.

Por último, se realizó una descripción de los objetivos que en la actualidad persiguen las áreas de investigación del modelado de bioprocesos. Dichos objetivos están sujetos al cuarto paradigma de la ingeniería de procesos, el cual busca la aproximación más fidedigna de los modelos matemáticos al representar la relación existente entre la célula y su medio ambiente.

Referencias bibliográficas

[1] Zaid A, Hughes H, Porceddu E, Nicholas F. Glossary of Biotechnology and Genetic Engineering. Italia: Editorial Food and Agriculture's Organization of the United Nations (FAO); 2001.

[2] Doran P. Bioprocess Engineering Principles. 2 ed. Reino Unido: Editorial Academic Press; 2012.

[3] Dutta R. Fundamentals of Biochemical Engineering. India: Editorial Springer-Ane Books; 2008.

[4] Almquist J, Cvijovic M, Hatzimanikatis V, Nielsen J, Jirstrand M. Minireview: Kinetic models in industrial biotechnology-Improving cell factory performance. Metab. Eng. 2014;24:38-60.

[5] Gao J, Wang L, Feng E, Xiu Z. Modeling and identification of microbial batch fermentation using fuzzy expert system. Appl. Math. Model. 2013;37(16-17):8079-90.

[6] López-Rosales L, Gallardo-Rodríguez J, Sánchez-Mirón A, Contreras-Gómez A, García-Camacho F, Molina-Grima E. Modelling of multi-nutrient interactions in growth of the dinoflagellate microalga Protoceratium reticulatum using artificial neural networks. Bioresource Technol. 2013;146:682-8.

[7] Díaz JM. Ingeniería de bioprocesos. España: Editorial Paraninfo S.A.; 2012.

[8] Dodic' J, Vucurovic D, Dodic' S, Grahovac J, Popov S, Nedeljkovic N. Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. Appl. Energ. 2012;99:192-7.

[9] Setoodeh P, Jahanmiri A, Eslamloueyan R. Hybrid neural modeling framework for simulation and optimization of diauxie-involved fed-batch fermentative succinate production. Chem. Eng. Sci. 2012;81:57-76.

[10] Gueguim E, Oloke J, Lateef A, Adesiyan M. Modeling and optimization of biogas production on saw dust and other co-substrates using Artificial Neural network and Genetic Algorithm. Renew. Energ. 2012;46:276-81.

[11] Peres J, Oliveira R, Feyo de Azevedo S. Bioprocess hybrid parametric/nonparametric modeling based on the concept of mixture of experts. Biochem. Eng. J. 2008;39(1):190-206.

[12] Ccopa E, Mantovaneli I, Da Costa A, Filho R. Hybrid modeling for continuous production of bioethanol. Comput. Aided Chem. Eng. 2006;21:613-8.

[13] Chang J, Lee J, Chang A. Neural-network rate-function modeling of submerged cultivation of *Monascus anka*. Biochem. Eng. J. 2006;32(2):119-26.

[14] Dutta J, Dutta P, Banerjee R. Modeling and optimization of protease production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. using a genetic algorithm. Process Biochem. 2005;40(2):879-84.

[15] Chen B, Woodley J. Wavelet shrinkage data processing for neural networks in bioprocess modeling. Comput. Chem. Eng. 2002;26(11):1611-20.

[16] Horiuchi J. Fuzzy modeling and control of biological processes. J. Biosci. Bioeng. 2002;94(6):574-8.

[17] Schügerl H, Bellgardt K. Bioreaction Engineering. Modeling and control. Alemania: Editorial Springer; 2000.

[18] Varner J, Ramkrishna D. The non-linear analysis of cybernetic models. Guidelines for model formulation. J. Biotechnol. 1999;71(1-3):67-104.

[19] Peskov K, Mogilevskaya E, Demin O. Kinetic modeling of central carbon metabolism in *Escherichia coli*. FEBS J. 2012;279:3374-85.

[20] Luo Y, Zhang T, Wu H. The transport and mediation mechanism of the common sugars in *Escherichia coli*. Biotechnol. Adv. 2014;32(5):905-19.

[21] Smolke C. The metabolic pathway engineering handbook. USA: Editorial CRC Press Taylor and Francis group LLC; 2009.

[22] Bequette BW. Process Control. Modeling, design and simulation. USA: Editorial Prentice Hall; 2003.
[23] Williams D, Yousefpour P, Swanick B. On-line adaptative control of a fermentation process. Contr. Theor. Appl. (IEEE Proceedings D). 1984;131(4):117-24.
[24] Takamatsu T, Shioya S, Kurome H. Dynamics and control of a mixed culture in activated sludge process. En: Modelling and Control of Biotechnical Processes. Halme A, Editor. Finlandia: Editorial Pergamon Press; 1983.p. 103-10.
[25] Rodrigues A, Minceva M. Modelling and simulation in chemical engineering: Tools for process innovation. Comput. Chem. Eng.. 2005;29(6):1167-83.
[26] Ljung L. System identification: Theory for the user. USA: Editorial Prentice-Hall; 1987.
[27] Alvarez H. Introducción al diseño simultáneo de proceso y control. La controlabilidad de estado como restricción. España: Editorial académica española; 2012.
[28] Ribas M, Hurtado R, Garrido N, Domenech F, Sabadi R. Metodología para la modelación matemática de procesos. Caso de estudio, la fermentación alcohólica. ICIDCA. 2011;45(1):37-47.
[29] Alvarez H, Lamanna R, Vega P, Revollar S. Metodología para la obtención de modelos semifísicos de base fenomenológica aplicada a una sulfitadora de jugo de caña de azúcar. Rev. Iberoam. Automática e Informática Ind. 2009;6(3):10-20.
[30] Gómez L, Amicarelli A, Alvarez H, di Sciascio F. El rol de los modelos en el diseño de equipos de procesos y sistemas de control. En: Universidad del Tolima, editor. VI Congreso Nacional de la Asociación Colombiana de Automática, ACA'2004; 2004 nov 1-3; Ibagué, Colombia. Ibagué: Universidad del Tolima; 2004. p. 1-6.
[31] Concari S. Las teorías y modelos en la explicación científica: Implicadas para la enseñanza de las ciencias. Cienc. Educ. 2001;7:85-94.
[32] Murthy DN, Rodin EY. A comparative evaluation of books on mathematical modeling. Math. Model. 1987;9(1):17-28.
[33] Bastin G, Dochain D. On-line estimation and adaptative control of bioreactors. Holanda: Editorial Elsevier; 1990.
[34] Marlin T. Process control: designing process and control systems for dynamic performance. USA: Editorial McGraw-Hill; 1995.
[35] Haefner J. Modeling biological system. USA: Editorial Springer; 1996.
[36] Woods R, Lawrence K. Modeling and simulation of dynamic systems. USA: Editorial Prentice Hall, Inc.; 1997.
[37] Luyben W. Process modeling, simulation, and control for chemical engineering. USA: Editorial McGraw-Hill; 1999.
[38] Basmadjian D. The art of modeling in science and engineering. USA: Editorial Chapman & Hall/ CRC; 1999.
[39] Hangos K, Cameron I. Process modeling and model analysis. Reino Unido: Editorial Academic Press; 2001.
[40] Tijskens L, Hertog L, Nicolaï B. Food Process Modeling. Inglaterra: Editorial CRC Press LLC; 2001.
[41] McKellar R, Lu X. Modeling Microbial Responses in Food. USA: CRC Press LLC; 2004.
[42] Heinzle E, Biwer A, Cooney C. Development of Sustainable Bioprocess modeling and Assessment. Inglaterra: Editorial Wiley; 2006.
[43] Sablani S, Datta A, Shafiur M, Mujumdar A. Handbook of food and bioprocess modeling techniques. USA: Editorial CRC Press; 2006.
[44] Çengel Y. Transferencia de Calor y Masa. México: Editorial McGraw-Hill; 2007.
[45] Ingham J, Dunn E, Heinzle J, Prenosil J, Snape B. Chemical Engineering Dynamics. Alemania: Editorial WILEY-VCH; 2007.
[46] Dobre T, Sánchez J. Chemical Engineering. Modelling, simulation and similitude. Alemania: Editorial Wiley-VCH; 2007.
[47] Gómez C, Calderón Y, Alvarez H. Construcción de modelos semifísicos de base fenomenológica. Caso proceso de fermentación. Rev. Bio. Agro. 2008;6(2):28-39.
[48] Alvarez H, Gómez L, Botero H. Abstracciones Macroscópicas de la Fenomenología para el Modelado de Procesos. En: Martínez C, Bello L, Martínez R, Rosero D, editores. XXVII Congreso Interamericano y colombiano de Ingeniería Química; 2014 oct 6-8; Cartagena, Colombia. Cartagena: CIIQ editor; 2014. p. 23.
[49] Epstein JM. Why model? (sitio en Internet). Department of Sociology, University of Surrey. Disponible en: http://jasss.soc.surrey ac.uk/11/4/12.html. Acceso el 19 de junio 2015.
[50] Atkinson B. Reactores bioquímicos. España: Editorial Reverté S.A.; 2002.
[51] Trujillo M, Valdez N. El estrés hidrodinámico:

Muerte y daño celular en cultivos agitados. Rev. Latinoam. Microbiol. 2006;48(3-4):269-80.

[52] Sundar R, Liji T, Rajila C, Suganyadevi P. Amylase production by *Aspergillus niger* under submerged fermentation using *Ipomoea batatas*. Int. J. Appl. Biol. Pharmaceut. Technol. 2012;3(2):175-82.

[53] Lok M, Krycer J, Burchfield J, James D, Kuncic Z. A generalised enzyme kinetic model for predicting the behaviour of complex biochemical systems. FEBS Open Bio.. 2015;5:226-39.

[54] Hoppe G, Hansford G. Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth. Biotechnol. Lett. 1982;4(1):39-44.

[55] Arroyo-López F, Orlić S, Querol A, Barrio E. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. Int. J. Food Microbiol. 2009;131(2-3):120-27.

[56] Bajpai R, Reuß M. A mechanistic model for penicillin production. J. Chem. Technol. Biotechnol. *1980;30(1):332-44.*

[57] Jørgensen H, Nielsen J, Villadsen J, Møllgardt H. Analysis of the penicillin V biosynthesis during fed-batch cultivations with a high yielding strain of *Penicillium chrysogenum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995;43(1):123-30.

[58] Kosaric N, Vardar-Sukan F. Microbiology and Biochemistry of Ethanol Formation. En: The Biotechnology of ethanol: Classical and future applications. Roehr M, Editor. Alemania: Editorial WILEY-VCH; 2001. p. 89-106.

[59] Teusink B, Passarge J, Reijenga C, Esgalhado E, Van der Weijden C, Schepper M, *et al*. Can yeast glycolysis be understood in terms of *in vitro* kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. Eur. J. Biochem. 2000;267(17):5313-29.

[60] Blackman F. Optima and limiting factors. Ann. Bot. 1905;19(2):281-95.

[61] Michaelis L, Menten M. Die kinetic invertinwirkung. Biochem. Zeitsch. 1913;49:333-69.

[62] Monod J. Recherches sur la croissance des Cultures Bactériennes. Francia: Editorial Hermann & Cie.; 1942.

[63] Teissier G. Croissance des populations bacteriennes et quantite d'aliment disponible. Rev. Sci. Extrait. 1942;320(8):209-31.

[64] Bailey J, Ollis D. Biochemical Engineering Fundamentals. USA: Editorial McGraw-Hill; 1986.

[65] Tiana Y, Kasperski A, Sund K, Chen L. Theoretical approach to modelling and analysis of the bioprocess with product inhibition and impulse effect. Biosystems. 2011;104:77-86.

[66] Sun K, Tian Y, Chen L, Kasperski A. Universal modelling and qualitative analysis of an impulsive bioprocess. Comput. Chem. Eng. 2011;35(3):492-501.

[67] Sun K, Kasperski A, Tian Y, Chen L. Modelling of the *Corynebacterium glutamicum* biosynthesis under aerobic fermentation conditions. Chem. Eng. Sci. 2011;66(18):4101-10.

[68] Roman M, Selistenau D, Bobasu E, Sedrescu D. Bond Graph modeling of a Baker's yeast bioprocess. En: Zhou M, editor. The 2010 International Conference on Modelling, Identification and Control (ICMIC); 2010 jul 17-19; Okayama, Japón. Okayama: IEEE Digital Lybrary; 2010. p. 82-7.

[69] Roman M, Selisteanu D, Bobasu E, Petre E. Application of Bond Graph modeling on a fed-batch alcoholic fermentation bioprocess. En: Miclea L, Stoian I, editors. IEEE International Conference on Automation Quality and Testing Robotics (AQTR); 2010 may 28-30; Cluj-Napoca, Rumania. Cluj-Napoca: IEEE Digital Lybrary; 2010. p. 1-6.

[70] Roman M, Selisteanu D, Petre E, Ionete C, Popescu D. Modeling and estimation strategies for a Fed-batch prototype Bioprocess. En: Meng M, editor. IEEE International Conference on Automation and Logistics (ICAL); 2010 ago 16-20; Hong Kong y Macau, China. Hong Kong y Macau: IEEE Digital Lybrary; 2010. p. 103-8.

[71] Dochain D. Automatic control of bioprocesses. USA: Editorial John Wiley & Sons, Inc.; 2008.

[72] Moser H. The dynamics of bacterial populations in the chemostat. USA: Editorial Carnegie Institution Publication; 1958.

[73] Powell EO. (1967). The growth rate of microorganisms as a function of substrate concentration. En: Microbial Physiology and Continuous Culture Proceedings of the Third International Symposium. Powell O, Evans C, Strange R, Tempest D, Editores. Inglaterra: Her Majesty's Stationary Office; 1967. p. 34-55.

[74] Shehata T, Marr A. Effect of nutrient concentration on the growth of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1971;107(1):210-6.

[75] Jost J, Drake J, Frederickson A, Tsuchiya H. Interactions of *Tetrahymena pyroformis, Escherichia coli, Azobacter vinelandii* and glucose in a minimal medium. J. Bacteriol. 1973;113(2):834-40.
[76] Konak A. Derivation of a Generalized Monod equation and its application. J. Appl. Chem. Biotechnol. 1974;24(8):453-5.
[77] Wayman M, Tseng M. Inhibition-threshold substrate concentrations. Biotechnol. Bioeng. 1976;18(3):383-7.
[78] Aborhey S, Williamson D. Modelling of lactic acid production by *Streptococcus cremoris HP.* J. Gen. Appl. Microbiol. 1977;23(1):7-21.
[79] Chen YR, Hashimoto AG. Kinetics of methane fermentation. En: USDOE, editor. Symposium on biotechnology in energy production and Conservation; 1978 may 10-12; Gatlinburg, USA. Gatlinburg: Science and Education Administration, Clay Center editor; 1978. p. 1-27.
[80] Kargi F, Schuler M. Generalized differential specific rate equation for microbial growth. Biotechnol. Bioeng. 1979;21(10):1871-5.
[81] Sokol W, Howell J. Kinetics of phenol oxidation by washed cells. Biotechnol. Bioeng. 1981;23(9), 2039-49.
[82] Mattiason B, Mandenius CF, Axelsson J, Hagander P. Control of baker's yeast production based on ethanol measurements. En: N.N editor. Proc. 3rd European Congress on Biotechnology. 1984 ene 15; Munich, Alemania. Munich: Verlag Chemie editor; 1984. p. 629-36.
[83] Ming F, Howell J, Canovas-Diaz M. Mathematical simulation of anaerobic stratified biofilm processes. En: Computer Applications in Fermentation Technology: Modelling and Control of Biotechnological Processes. Fish NM, Fox R, Thornhill N, Editores. Holanda: Editorial Springer; 1988. p. 69-77.
[84] Andrews JF. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substance. Biotechnol. Bioeng. 1968;10(6):707-23.
[85] Hinshelwood C. Chemical Kinetics of the Bacterial cell. Inglaterra: Oxford, Univ. Press.; 1946.
[86] Kono T, Asai T. Kinetics of fermentation processes. Biotechnol. Bioeng. 1969;11(3):293-321.
[87] Contois D. Kinetics of bacterial growth relationship between population density and specific growth rate of continuos cultures. J. Gen. Microbiol. 1959;21:40-50.
[88] Nihtilä M, Virkkunnen J. Practical identifiability of growth and substrate consumption models. Biotechnol. Bioeng. 1977;19(12):1831-50.
[89] Kishimoto M, Sawano T, Yoshida T, Taguchi T. (1983). Optimization of a fed-batch culture by statistical data analysis. En: Modelling and Control of Biotechnical Processes. Halme A, Editor. Finlandia: Editorial Pergamon Press; 1983. p. 161-8.
[90] Staniskis J, Levisaukas D. An adaptative control algorithm for fed-batch culture. Biotechnol. Bioeng. 1984;26(5):419-25.
[91] Holzberg I, Finn R, Steinkraus K. A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. Biotechnol. Bioeng. 1967;9(3):413-27.
[92] Aiba S, Shoda M, Nagatani M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng. 1968;10(6):845-64.
[93] Jerusalimski N, Engambervediev N. Continuous cultivation of Microorganisms. USA: Editorial Academic Press; 1969.
[94] La Motta E. Kinetics of continuous growth cultures using the logistic growth curve. Biotechnol. Bioeng. 1976;18(7):1029-32.
[95] Ghose T, Tyagi R. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate: II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. Biotechnol. Bioeng. 1979;21(8):1387-1400.
[96] Levenspiel O. The Monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations. Biotechnol. Bioeng. 1980;22(8):1671-87.
[97] Hägglund T. Incubation time prediction in yoghurt manufacturing. En: Modelling and Control of Biotechnical Processes. Halme A, Editor. Finlandia: Editorial Pergamon Press; 1983. p. 307-11.
[98] Bazua C, Wilke C. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. 1977;7:105-18.
[99] Moulin G, Boze H, Galzy P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotechnol. Bioeng. 1980;22(11):2375-81.
[100] Jin C, Chiang H, Wang S. Steady-state analysis of the enhancement in ethanol productivity of a continuous fermentation process employing a protein-phospholipid complex as a protecting agent. Enzyme Microb. Tech. 1981;3(3):249-57.

[101] Sevely Y, Pourciel J, Rauzy G, Bovée J. Modelling, identification and control of the alcohol fermentation in a cascade reactor. En: Akashi H, Editor. Proc. 8th IFAC World Congress; 1981; Kyoto, Japón. Reino Unido: Pergamon Press editor; 1982. p 177-84.

[102] Dourado A, Calvet J. Static optimization of the ethanol production in a cascade reactor. En: Modelling and Control of Biotechnical Processes. Halme A, Editor. Finlandia: Editorial Pergamon Press; 1983. p. 177-85.

[103] Peringer P, Blachere H, Corrieu G, Lane A. A generalized mathematical model for the growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. 1974;16(4):431-54.

[104] Olsson G. State of the art in sewage treatment plant control. AIChe Symp. 1976;72:52-76.

[105] Andreyeva L, Biryukov V. Analysis of mathematical models of the effect of pH on fermentation processes and their use for calculating optimal fermentation conditions. Biotechnol. Bioeng. Symp. 1973;0(4-1):61-76.

[106] Cheruy A, Durand A. Optimization of erythromycin biosynthesis by controlling pH and temperature: theoretical aspects and practical applications. Biotechnol. Bioeng. Symp. 1979;9:303-20.

[107] Jackson J, Edwards V. Kinetics of substrate inhibition of exponential yeast growth. Biotechnol. Bioeng.. 1975;17(7):943-64.

[108] Topiwala H, Sinclair C. Temperature relationship in continuous culture. Biotechnol. Bioeng. 1971;13(6):795-813.

[109] Hashimoto A. Methane from cattle waste: effects of temperature, hydraulic retention time and influent substrate concentration on kinetic parameter (K). Biotechnol. Bioeng. 1982;24(9):2039-52.

[110] Constantinides A, Spencer J, Gaden E. Optimization of batch fermentation processes. I. Development of mathematical models for batch penicillin fermentations. Biotechnol. Bioeng. 1970;12(5):803-30.

[111] Tamiya H, Hase E, Shibata K, Mituya A, Sasa T. Kinetics of growth of Chorella, with special reference to its dependence on quantity of available light and on temperature. En: Algae Culture: From Laboratory to Pilot Plant, Growth of algae in mass culture. Burlew JS, Editor. USA: Carnegie Inst. Washington DC; 1953. p. 205-32.

[112] Luedeking R, Piret E. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng. 1959;1(4):393-412.

[113] Moser A. Bioprocess Technology, Kinetics and Reactors. USA: Editorial Springer Verlag; 1988.

[114] Grady C, Daigger G, Lim H. Biological Wastewater Treatment. USA: Editorial Marcel Dekker; 1999.

[115] Button D. Nutrient uptake by microorganism according to kinetic parameters from theory as related to cytoarchitecture. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998;62(3):636-45.

[116] Merchuk J, Asenjo J. The Monod equation and mass transfer. Biotechnol. Bioeng. 1994;45(1):91-4.

[117] Schwartzemberg H, Chao R. Solute diffusivities in leaching processes. Food Technol. 1982;36(2):73-86.

[118] Liu Y. A simple thermodynamic approach for derivation of a general Monod equation for microbial growth. Biochem. Eng. J. 2006;31(1):102-5.

[119] Gofferjé G, Stäbler A, Herfellner T, Schweiggert-Weisz U, Flöter E. Kinetics of enzymatic esterification of glycerol and free fatty acids incrude Jatropha oil by immobilized lipase from *Rhizomu cormiehei*. J. Mol. Catal. B Enzym. 2014;107:1-7.

[120] Vega R, Zuniga M. A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructo oligosaccharides from sucrose. Biochem. Eng. J. 2014;82:158-65.

[121] Mulholland A. Modelling enzyme reaction mechanism, specificity and catalysis. Drug Discov. Today. 2005;10(20):1393-1402.

[122] Ortega F, Pérez O, López E. Modelo Semifísico de Base Fenomenológica del Proceso de Fermentación Alcohólica. Inf. Tecnol. 2016:27(1):21-32.

[123] Melgarejo R, Castillo C, Dutta A, Bény G, Torres D, Gutiérrez M, *et al*. Mathematical model of a three phase partitioning bioreactor for conversion of ketones using whole cells. Chem. Eng. J. 2015;260:765-75.

[124] Geng X, Boufadel M, Personna Y, Lee K, Tsao D, Demicco E. BIOB: A mathematical model for the biodegradation of low solubility hydrocarbons. Mar. Pollut. Bull. 2014;83(1):138-47.

[125] Kythreotou N, Florides G, Tassou S. A review of simple to scientific models for anaerobic digestion. Renew. Energ. 2014;71:701-14.

[126] Akpa J. Modeling of a bioreactor for the fermentation of palmwine by S*accaharomyces cerevisiae* (yeast) and lactobacillus (bacteria). Am. J. Sci. Ind. Res. 2012;3(4):231-40.

[127] Roeva O, Pencheva T, Tzonkoc S, Arndt M, Hitzmann B, Kleist S, *et al.* Multiple model approach to modelling of *Escherichia coli* fed-bacth cultivation extracelular production of bacterial phytase. Electr. J. Biotechnol. 2007;10(4):592-603.

[128] Atehortúa P, Alvarez H, Orduz S. Modeling of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* in an intermittent fed batch culture with total cell retention. Bioprocess Biosyst. Eng. 2007;30(6):447-56.

[129] Lokshina L, Vavilin V, Kettunen R, Rintala J, Holliger C, Nozhevnikova A. Evaluation of kinetic coefficients using integrated Monod and Haldane models for low-temperature acetoclastic methanogenesis. Water Res. 2001;35(12):2913-22.

[130] Lagowski J. Viewpoints: Chemist on Chemistry. Chemical Education: Past, Present, and Future. J. Chem. Edu. 1998;75:425-36.

[131] Machado D, Rodrigues L, Rocha I. A kinetic model for curcumin production in *Escherichia coli.* Biosystems. 2014;125:16-21.

[132] Chassagnole C, Noisommit N, Schmid J, Mauch K, Reuss M. Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng. 2002;79(1):53-73.

[133] Usuda Y, Nishio Y, Iwatani S, Van Dien S, Imaizumi A, Shimbo K, *et al*. Dynamic modeling of *Escherichia coli* metabolic and regulatory systems for amino-acid production. J. Biotechnol. 2010;147(1):17-30.

[134] Roche R, Lamanna R, Delgado M, Rocaries F, Hamam Y, Pecker F. Simulation of a cardiac cell. Part I: An electro-chemical model. Rev. Fac. Ing. UCV. 2009;24(1):71-87.

[135] Umulis D, Gürmen N, Singh P, Fogler H. A physiologically based model for ethanol and acetaldehyde metabolism in human beings. Alcohol. 2005;35(1):3-12.

[136] Huang M, Fan S, Xing W, Liu C. Microfluidic cell culture system studies and computational fluid dynamics. Math. Comput. Model. 2010;52(11-12):2036-42.

[137] Shah P, Vedarethinam I, Kwasny S, Andresen L, Dimaki M, Skov S, *et al*. Microfluidic bioreactors for culture of non-adherent cells. Sensor. Actuat. B-Chem. 2011;156(2):1002-8.

[138] Leclerc K, Kirat E, Griscom L. *In situ* micropatterning technique by cell crushing for co-cultures inside microfluidic biochips. Biomed. Microdev. 2008;10(2):169-77.