
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
MASTER EN INVESTIGACIÓN DE SISTEMA Y PROCESOS INDUSTRIALES



TRABAJO DE FIN DE MASTER

Tutor:
Alumna:

Dr. Cesar de Prada
Ing. Lessa Victoria Henao

Curso 2013-2014



TRABAJO DE FIN DE MASTER

“Modelado matemático y simulación para mejorar la producción de butanol en la fermentación ABE”

Tutor:
Alumna:

Dr. Cesar de Prada
Ing. Lessa Victoria Henao

Curso 2013-2014

Dedico este trabajo de fin de Master a la memoria de mis PADRES
María Celina Siso y Jorge Enrique Henao....
Quienes con su apoyo, tanto espiritual como físico,
Me dieron la fuerza para realizar este Master
tan lejos de casa...

Lessa Henao

RESUMEN

La fermentación ABE es un proceso biocatalítico que utiliza un microorganismo para procesar los hidratos de carbono y producir solventes como: la acetona, butanol y etanol. Tanto el *Clostridium acetobutylicum* como el *Clostridium beijerinckii* han demostrado ser bacterias útiles para la fermentación ABE y con ellas se han realizado esfuerzos para mejorar su producción, empleando diversos sustratos. Para ello se planeó obtener un modelo matemático de un proceso de fermentación ABE que actualmente se trabaja en la UVa, para simular y optimizar el proceso planteado. El modelo matemático del sistema por vía macromolecular (Modelo I) propuesto, no se ajusta al sistema propuesto debido a que no considera la inhibición del sustrato en la concentración de los productos, ni tampoco la inhibición que produce la concentración de butanol en los otros productos. Por tanto, se utilizó un segundo modelo (Modelo II) basado en el los trabajos de Shinto y otros en 2007, que desarrollaron con éxito el modelo cinético del comportamiento dinámico de los metabolitos (vía metabólica). Se estimaron los parámetros del Modelo II al sistema propuesto, optimizando el proceso de fermentación, y sujeto a ser usado para experimentos fermentativo ABE que maneje como bacteria el c. *acetobutylicum* y como sustrato la glucosa. Mediante la introducción de inhibición por sustrato, la inhibición del producto de butanol, la activación de butirato y teniendo en cuenta el cese de reacciones metabólicas en el caso de insuficiencia de energía después de agotamiento de la glucosa, del Modelo II se obtiene un resultado de minimización del error entre los datos experimentales y los calculados en el simulador. Después se realiza una optimización de la producción y el mejor valor de la concentración de butanol que se puede obtener es de 16 g/L para la 60 g/L de concentración inicial de glucosa.

Palabras clave: fermentación ABE, validación, Ecosimpro, *Clostridium acetobutylicum*, vía metabólica.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICES DE TABLAS	v
ÍNDICE DE GRAFICOS	vi
NOMENCLATURA	i
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO.....	3
1.1. La fermentación ABE	3
1.2. Microorganismo para la fermentación ABE	3
1.3. Vía metabólica de la fermentación ABE	5
1.4. Descripción del proceso de fermentación ABE en la investigación.....	6
CAPITULO II. MODELADO Y SIMULACIÓN	9
2.1. Modelación matemática de un proceso.....	9
2.1.1. Modelo matemático del sistema por vía macromolecular	11
2.1.2. Modelo matemático del sistema por vía metabólica	12
2.2. Optimización del proceso de fermentación	18
2.1.2. Función objetivo de la optimización.....	18
2.1.3. Uso de Ecosimpro para la optimización.....	19
CAPITULO III. ESTIMACIÓN DE PARAMETROS USANDO OPTIMIZACIÓN	23
3.1. Análisis de sensibilidad	23
3.2. Simulación de la fermentación ABE con el Modelo I.....	24
3.3. Simulación de la fermentación ABE con el Modelo II.....	30
CAPITULO IV. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS	36
CAPITULO V. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BUTANOL.....	39
CAPITULO VI. CONCLUSIONES	40
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
CAPÍTULO VII. ANEXOS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica en <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824T. Las enzimas involucradas se abrevian como PTA: Fosfoacetilasa; AK: Acetatoquinasa; CoAT: CoA transferasa; PTB: Fosfoacetilbutirilasa; BK: Butirato quinasa; BADH: Butiraldehído deshidrogenasa; BDH: Butanol Deshidrogenasa (Fuente: Jones y Woods,1986).	5
Figura 2. Esquema del proceso de fermentación en el Laboratorio.	7
Figura 3. Imagen del equipo de fermentación ABE automatizado.....	7
Figura 4. Descripción de las fases de la reacción en la fermentación en la curva de variación de pH.....	8
Figura 5. Representación del reactor por carga con las variables involucradas en la fermentación ABE.....	11
Figura 6. Muestra del cálculo discreto que se le realiza la función objetivo en función al tiempo de muestreo experimental.....	21
Figura 7. Ilustración de la herramienta de optimización en EcosimPro.	21
Figura 8. Ilustración del método de optimización utilizado en EcosimPro.	22
Figura 9. Datos experimentales de la glucosa a 30 g/L utilizando como bacteria el <i>c. acetobutylicum</i>	25
Figura 10. Datos experimentales de la glucosa a 60 g/L utilizando como bacteria el <i>c. acetobutylicum</i>	27
Figura 11. Imagen del código utilizado en Ecosimpro para optimizar el proceso con el modelo matemático por la vía macromolecular.	43
Figura 12. Imagen del código utilizado en Ecosimpro para optimizar el proceso con el modelo matemático por la vía metabólica.....	44

ÍNDICES DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de sustratos utilizados experimental con <i>C. beijerinckii</i> y con <i>C. acetobutylicum</i>	8
Tabla 2. Resultados de los parámetros cinéticos de los datos experimentales de 70.6mM de glucosa inicial, por Shinto y otros (2007).	18
Tabla 3. Valores de la sensibilidad de los parámetros del Modelo II.	31
Tabla 4. Parámetros más relevantes del análisis de sensibilidad al Modelo II.	32
Tabla 5. Resultado de las estimaciones de los parámetros del Modelo II.	34
Tabla 6. Resultado de las diferentes funciones objetivo (Jcosto) de las variables calculadas respecto a los datos experimentales, utilizando para ello el Modelo II con los parámetros estimados.	36
Tabla 7. Resultado de la optimización de la concentración final de butanol (Pb) para diferentes concentraciones iniciales de sustrato (Si).	39

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfica 1. Resultado de la optimización de parámetros con la glucosa a 30 g/L utilizando <i>c. acetobutylicum</i> con el modelo 1.	25
Gráfica 2. Comparación de las variables calculadas con los datos experimentales de la glucosa a 30 g/L utilizando <i>c. acetobutylicum</i> con el modelo 1.....	26
Gráfica 3. Resultado de la optimización de parámetros con la glucosa a 60 g/L utilizando <i>c. acetobutylicum</i> con el modelo 1.	26
Gráfica 4. Comparación de las variables calculadas con los datos experimentales de la glucosa a 60 g/L utilizando <i>c. acetobutylicum</i> con el modelo 1.....	27
Gráfica 5. Resultado de la optimización de parámetros con la glucosa a 80 g/L utilizando <i>c. acetobutylicum</i> con el modelo 1.	28
Gráfica 6. Comparación de las variables calculadas con los datos experimentales de la glucosa a 80 g/L utilizando <i>c. acetobutylicum</i> con el modelo 1.....	28
Gráfica 7. Variación de las variables de estado más importantes calculadas con el Modelo II utilizando los resultados de los parámetros de Shinto y otros en el 2007, y comparadas con los datos experimentales de la glucosa con concentración inicial de 80 g/L (<i>c. acetobutylicum</i>). S=sustrato, X=biomasa, Pa=acetona, Pb=butanol, Pe=etanol.....	30
Gráfica 8. Sensibilidad de algunas variables de estado respecto a modificaciones de la biomasa en el Modelo II.....	33
Gráfica 9. Sensibilidad de algunas variables de estado respecto a modificaciones del sustrato en el Modelo II.....	33
Gráfica 10. Comparación de las concentraciones calculadas con los parámetros estimados del Modelo II a una concentración inicial de 80 g/L de	

Glucosa (*c. acetobutylicum*) y los datos experimentales a la misma concentración..... 35

Gráfica 11. Comparación de las concentraciones calculadas con los parámetros estimados del Modelo II a una concentración inicial de 30 g/L de Glucosa (*c. acetobutylicum*) y los datos experimentales a la misma concentración..... 37

Gráfica 12. Comparación de las concentraciones calculadas con los parámetros estimados del Modelo II a una concentración inicial de 60 g/L de Glucosa (*c. acetobutylicum*) y los datos experimentales a la misma concentración..... 38

NOMENCLATURA

Símbolos	Definición	Unidades
Griegos		
μ	Velocidad específica de crecimiento	h^{-1}
μ_{max}	velocidad máxima de crecimiento microbiano	h^{-1}

Símbolos	Definición	Unidades
F	Factor de activación (on-off) de las ecuaciones cinéticas	Adim
Jcosto	Función objetivo del proceso	Adim
K _{aj}	Constante de activación, donde j es el número de la reacción correspondiente.	g/L
K _d	Velocidad específica de muerte	h^{-1}
K _d	Constante de muerte de lo microorganismo	g/L
K _{ijj}	Constante de inhibición, donde j es el número de la reacción correspondiente.	g/L
K _{isj}	Constante de inhibición por el sustrato, donde j es el número de la reacción correspondiente.	g/L
K _j	Constante de velocidad de la reacción, donde j es el número de la reacción correspondiente.	g/L
K _m	constante cinética de velocidad correspondiente al modelo	g/L
K _{mj}	Concentración metabólica, donde j es el número de la reacción correspondiente.	g/L
m	Masa total del tanque	g
m _e	Masa total a la entrada	g
m _s	Masa total a la salida	g
P	Concentración de producto	g/L
P _a	Concentración de producto acetona	g/L
P _b	Concentración de producto butanol	g/L
P _e	Concentración de producto etanol	g/L

NOMEMCLATURA (continuación)

Símbolos	Definición	Unidades
Paexp	Concentración de producto acetona experimental	g/L
Pbexp	Concentración de producto butanol experimental	g/L
Peexp	Concentración de producto etanol experimental	g/L
S	Concentración de sustrato	g/L
Sexp	Concentración de sustrato experimental	g/L
Si	Concentración inicial de sustrato	g/L
V	Volumen de operación de la fermentación	L
Vmaxj	Velocidad máxima de reacción, donde j es el número de la reacción correspondiente.	h ⁻¹
X	Concentración de biomasa	g/L
Xexp	Concentración de biomasa experimental	g/L
X _e	Composición del inoculo en la entrada	g/L
X _i	Concentración inicial de biomasa	g/L
X _s	Composición de la bacteria a la salida	g/L
y _{p/x}	Rendimiento del producto por biomasa consumida	g de producto/ g de biomasa
y _{pxa}	Rendimiento del producto-acetona por biomasa consumida	g de Acetona/ g de biomasa
y _{pxb}	Rendimiento del producto-butanol por biomasa consumida	g de butanol/ g de biomasa
y _{pxe}	Rendimiento del producto-etanol por biomasa consumida	g de etanol/ g de biomasa
y _{x/s}	Rendimiento de la biomasa por sustrato consumido	g de producto/ g de sustrato

INTRODUCCIÓN

A comienzos del siglo pasado, la fermentación ABE (acetona-butanol-etanol) fue uno de los primeros procesos biológicos que produjo solventes, pero los procesos basados en petróleo reemplazaron la fermentación con microorganismos.

En los últimos años, ha resurgido el interés en la producción fermentativa ABE como una alternativa al uso de combustibles fósiles, en donde varios investigadores han tratado de desarrollar cepas hiperproductoras de butanol, apoyándose con las herramientas de biología molecular, ingeniería de vías metabólicas, así como en la optimización del proceso de fermentación mediante la producción y extracción simultánea de butanol.

Tanto *Clostridium acetobutylicum* como *Clostridium beijerinckii* han demostrado ser bacterias útiles en fermentación ABE y con ellas se han realizado esfuerzos para mejorar su producción, empleando diversos sustratos.

Actualmente, un grupo de investigadores de la Universidad de Valladolid, trabajan con el tema de la fermentación ABE, en donde estudian diferentes sustratos y condiciones de operación para determinar la mayor eficiencia de la producción de butanol.

Debido al tiempo que conlleva cada prueba y el costo asociado de insumos, se plantea hacer uso de la tecnología existente, para simular el proceso de fermentación, con el fin de minimizar los tiempos de las pruebas y predecir una respuesta cercana a los resultados experimentalmente deseados.

Los modelos matemáticos permiten simular la dinámica de fermentación ABE, lo que pueden usarse para predecir algunas variables durante la fermentación, como la concentración de los productos final, sustratos y sus rendimientos. Un buen modelo debe incluir los componentes más importantes en la fermentación, entre ellos: sustrato, biomasa y producto, lo cual proveerán de bases sólidas para realizar la optimización del proceso.

Para simular el proceso de fermentación, se proponen validar los modelos dinámicos de fermentación a escala de laboratorio: un modelo basado en el

conocimiento balance de masa y un modelo empírico basado en los datos experimentales; un segundo modelo que por el análisis de flujo metabólico (AMF), que evalúa el papel de los pasos individuales en una red por la vía metabólica.

Por tanto, para este Trabajo de Fin de Master (TFM), se planea primero obtener un modelo matemático del proceso de fermentación ABE, para obtener una simulación dinámica utilizando el programa de *Ecosimpro* en la cual los investigadores (usuarios) puedan trabajar para estimar los resultados deseados en la fermentación para, posteriormente, realizar la optimización del proceso,

Los resultados experimentales obtenidos de la fermentación ABE, previamente a este trabajo, establecen el punto de partida para realizar experimentos posteriores con el simulador, que permitirán validar las curvas predictivas obtenidas y de este modo, optimizar el proceso para diferentes variables de entrada, lo cual contribuirá a alcanzar una mayor eficiencia en el proceso biotecnológico para la producción de butanol.

El objetivo de este TFM es "*Modelo matemático y simulación para mejorar la producción de butanol en la fermentación ABE*". Entre los objetivos específicos se encuentra los siguientes puntos:

1. Construir e implementar un modelo matemático del sistema de fermentación ABE a simular para posteriormente usarlo en la optimización.
2. Optimizar utilizando Ecosimpro y los datos experimentales del sistema, para estimar los parámetros de los modelos matemáticos planteados para los diferentes casos experimentales.
3. Validar los parámetros estimados del modelo matemático planteado.
4. Determinar la concentración final de butanol más óptima del sistema propuesto para una determinada concentración inicial de sustrato.

CAPÍTULO I. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

A continuación se describe de forma general la teoría del proceso de fermentación ABE y la descripción del proceso experimental que se lleva a cabo.

1.1. La fermentación ABE

La fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) es una de las fermentaciones más antiguas en la historia humana que se remonta a 1861 (Jones y Woods, 1986). La escasez prevista, junto con un aumento de la demanda y posteriormente, los crecientes precios de los combustibles fósiles proporcionan una buena y necesaria plataforma para el desarrollo de bio-productos químicos alternativos, algunos de los cuales pueden ser utilizados para las fuentes de energía renovables, como butanol (Setlhaku y otros, 2012).

La fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol) es un proceso biocatalítico que utiliza un microorganismo para procesar los hidratos de carbono (fructosa, sacarosa, glucosa, etc.) y generar productos finales de solventes como la acetona, butanol y etanol.

Este proceso de fermentación se puede llevar a cabo en reactores semi-continuos o por cargas (batch), pero esto dependerá del proceso que se desea llevar a cabo. En la práctica, esto significa que los tiempos de fermentación pueden variar considerablemente entre los tipos de sustratos y sus condiciones de operación.

La temperatura de fermentación, así como el tipo de microorganismo utilizado, son de gran relevancia al reproducir o alcanzar un alto rendimiento del producto deseado, por lo cual, en la producción es común usar refrigeración para controlar la temperatura en el proceso de fermentación.

1.2. Microorganismo para la fermentación ABE

La producción biológica del butanol ocurre naturalmente en algunas especies de microorganismos, como las bacterias *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium butyricum* o la arquea *Hyperthermus butylicus*. Sin embargo, el género más estudiado es el de *Clostridium* ya que son capaces de convertir

diversas fuentes de carbono, como la glucosa, galactosa, celobiosa, manosa, xilosa y arabinosa, en combustibles y químicos como el butanol, acetona y etanol (Wang y Chen, 2010).

El proceso de fermentación ABE, utilizando *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, bacterias Clostridium principalmente, han sido un gran interés en la investigación debido a la posibilidad de butanol. Hasta la fecha, la producción de butanol fermentativa no es muy económica debido a los altos costos del sustrato, el metabolismo de los clostridios complejo, la producción ineficaz proceso y la energía intensiva de procesamiento aguas abajo. El desafío del sustrato puede abordarse mediante la investigación por sustratos no alimenticios, como por ejemplo lignocelulósica biomasa, desechos agrícolas y municipales (Setlhaku y otros, 2012).

Adicionalmente, la bacteria *C. beijerinckii* presenta mayor potencial para la producción industrial de solventes que *C. acetobutylicum*. Esto es debido a que la primera puede fermentar un mayor tipo de azúcares y presenta un mayor rango de pH óptimo para las fases de crecimiento y producción de solventes (Setlhaku y otros, 2012).

Las mejoras y los avances tanto en el proceso la tecnología y el rendimiento global de los microorganismos utilizado en la fermentación ABE podría resultar una marcada mejora de la competitividad económica en la producción de disolventes (Jones y Woods, 1986).

Los avances actuales en la tecnología del proceso se realizan para mejorar la fermentación, por lo que se destacan: (i) mejoras en el procesamiento de lignocelulosa y otras materias primas para producir fermentable azúcares; (ii) la mejora y optimización de control del proceso mediante la aplicación de monitoreo en línea y el uso de microprocesadores; (iii) el desarrollo de nuevos sistemas para la producción continua de disolventes; (iv) el desarrollo de métodos alternativos barato y eficaz de recuperación de disolventes; y (v) mejora de la utilización de subproductos. El interés en la renovación y las actividades de investigación es fundamental para la producción de la acetona y el butanol, para ser frente en la época de disminución las reservas de petróleo (Jones y Woods, 1986).

una inhibición por sustrato de la glucosa y de productos inhibición por butanol (Jones y Woods, 1986; Soni et al, 1987); éstos conducen a la baja productividad y el rendimiento de los disolventes. Por otro lado, Tashiro et al. (2004) demostraron experimentalmente la aceleración de la producción de butanol por la alimentación de butirato. Y tal como se describió, los clostridios productoras de ABE poseen complicados funciones metabólicas.

1.4. Descripción del proceso de fermentación ABE en la investigación

Actualmente, la fermentación ABE que se lleva a cabo por un grupo de trabajo del Dpto.de IQ en la Universidad de Valladolid (UVa), tiene como objetivo desarrollar un proceso eficiente, sostenible y económicamente viable para la producción de butanol a partir de los carbohidratos contenidos en la melaza, mediante fermentación anaerobia de los mismos con el fin último de producir un biocombustible a partir de un subproducto y por tanto incrementar el rendimiento, reduciendo costes de inversión y consumos, tanto de reactivos como de servicios.

El proceso de fermentación ABE se realiza por carga y se trabaja con diferentes sustratos como glucosa, sacarosa (proveniente de remolacha), melaza o una mezcla de xilosa-glucosa, pero en general se utiliza las siguientes condiciones independientes del tipo de sustrato en la investigación:

- ✓ Volumen de carga es de 1 L donde 0,9 L es medio (sustratos y otros) y 0,1L del inóculo (bacteria).
- ✓ En cada experiencia trabajan con dos tipos de bacterias individualmente: *C. beijerinckii* y *C. acetobutylicum*.
- ✓ Agitación de 200 rpm y de forma anaeróbica.
- ✓ Control de temperatura en el fermentador, 35 °C para el *C. beijerinckii* y para el *C. acetobutylicum* a 37°C.
- ✓ Control de pH a 4,5 para todas las experiencias con *C. acetobutylicum*.

El equipo fermentador que se utiliza es un reactor de mezclar completa, transparente con una capacidad de 2 L para el medio, y el proceso experimental presenta tres etapas experimentales (Figura 2). El paso inicial es la adición de la carga: sustrato e inóculo, posteriormente, en el segundo paso,

se controla automáticamente el pH (si se requiere) y la temperatura durante la fermentación, y finalmente, el tercer paso es el retiro del producto. Todo el proceso tiene un tiempo estimado de 100-170 horas, dependiendo de la tipo y concentración del sustrato.

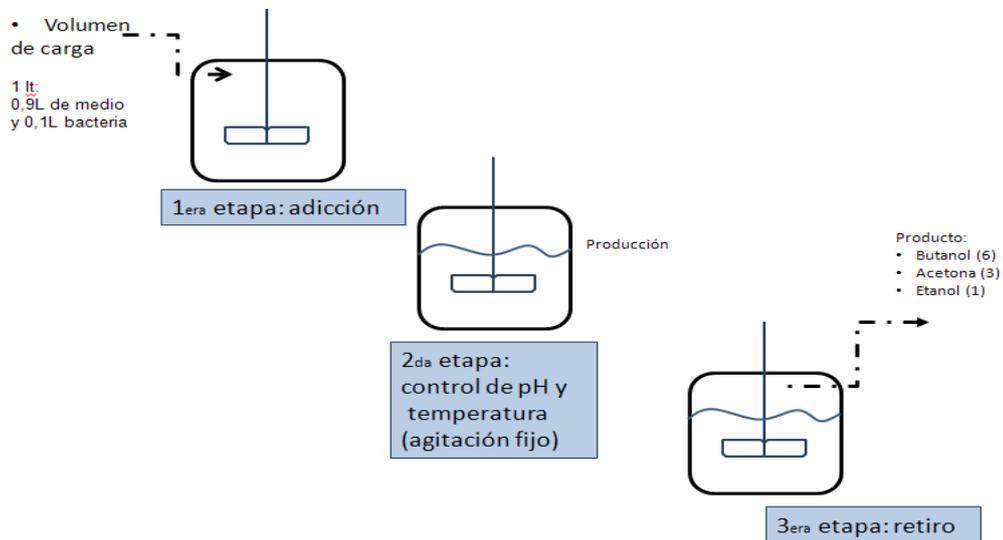


Figura 2. Esquema del proceso de fermentación en el Laboratorio.

En la Figura 3, se observa el equipo de fermentación que se compone principalmente por el reactor tubular (1), el sistema del controlador de pH y temperatura (2) y el sistema computarizado (3) como recolector de datos.

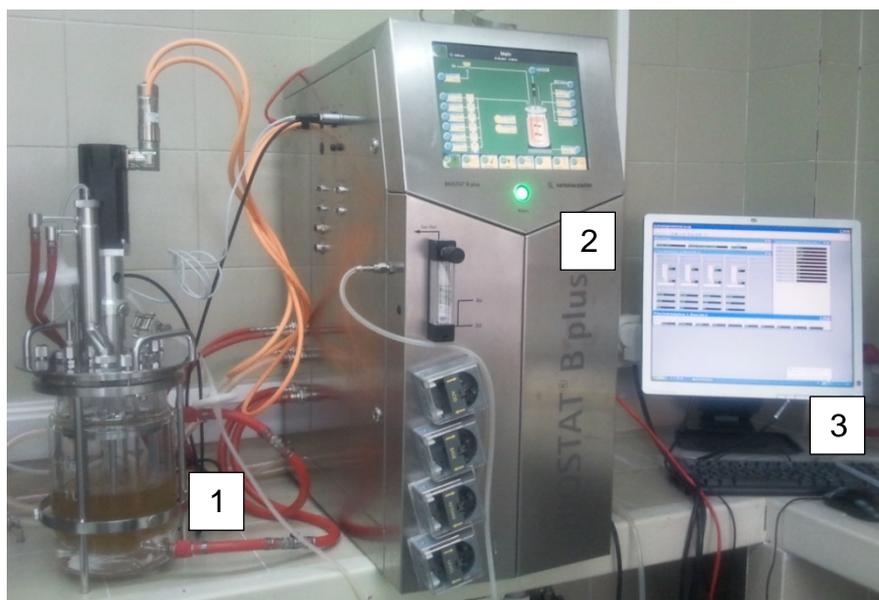


Figura 3. Imagen del equipo de fermentación ABE automatizado.

Las fases de la fermentación ABE, tal como se describe en la Figura 2, es de gran relevancia para el control y optimización de la fermentación. En el caso de la primera fase no se tiene un control del pH por el crecimiento exponencial y producción de ácido acético, butírico y láctico. Sin embargo, en la segunda etapa se requiere un control del pH de 4.5 (para *C. acetobutylicum*), por ser una fase estacionaria del cultivo bacteriano y la producción de acetona, butanol y etanol en una proporción característica de 3:6:1.

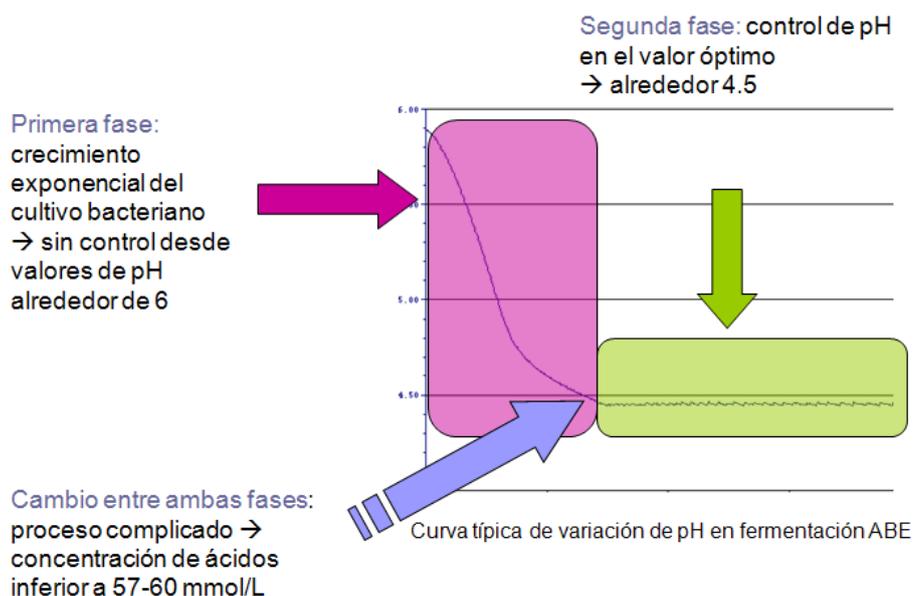


Figura 4. Descripción de las fases de la reacción en la fermentación en la curva de variación de pH.

Actualmente, el cultivo por carga experimental se realiza con diferentes sustratos y concentraciones, en la siguiente tabla se muestran que tipo de sustrato y sus concentraciones se trabajan actualmente en el estudio de la fermentación ABE de la UVa:

Tabla 1. Tipos de sustratos utilizados experimental con *C. beijerinckii* y con *C. acetobutylicum*.

Sustratos	Concentración (g/L)	Microorganismo	
		<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. beijerinckii</i>
Glucosa	30	X	X
	40	-	X
	60	X	X
	80	X	-
Sacarosa	30	X	X
	60	X	X
Glucosa-Xilosa	20	-	X
Melaza	60	X	X

CAPITULO II. MODELADO Y SIMULACIÓN

Los avances de la computación han permitido el desarrollo de modelos matemáticos cada vez más detallados y precisos que serán utilizados en el diseño, optimización, control y/o simulación de procesos de una forma rápida y económica. En el presente capítulo se describe los modelos matemáticos empleados en la simulación, así como uso del programa Ecosimpro en la optimización del proceso experimental.

2.1. Modelación matemática de un proceso

Desde el punto de vista de ingeniería de procesos, los modelos matemáticos se clasifican en tres grandes categorías (Ribas y otros, 2011).

- Modelos fenomenológicos o de caja blanca, modelo obtenido mediante un estudio teórico del proceso; sus principios de formulación son las ecuaciones de conservación (materia, energía y/o entropía), leyes generales y ecuaciones constitutivas. El grado de complejidad del mismo es función directa del grado de detalle utilizado y constituye el núcleo fundamental de los modelos utilizados por los ingenieros.
- Modelos empíricos, se construyen mediante experimentación y observación, haciendo luego uso de datos experimentales para ajustar los parámetros en una estructura matemática dada.
- Modelos semifísicos o de caja gris, son una combinación de los dos tipos anteriores, donde algunas características del proceso están descritas mediante correlaciones empíricas particulares para la condición dada. Estos modelos se emplean fundamentalmente cuando el conocimiento fenomenológico resulta insuficiente para describir la situación física real del sistema que se modela.

En la actualidad los modelos semifísicos han demostrado gran utilidad por su capacidad de extrapolar los resultados a diferentes escalas y regímenes de operación; si todos los elementos relevantes están presentes en el modelo, y si estos se mantienen dentro del rango de validez (Ribas y otros, 2011).

Por lo general, en los procesos químicos las propiedades posibles de balancear son la materia y la energía. Las ecuaciones de balances deben ser completadas con ecuaciones constitutivas para los parámetros del modelo que pueden expresar diferentes condiciones cinéticas o fenómenos de transporte del proceso. Estas ecuaciones generalmente se obtienen de manera empírica mediante experimentación (Ribas y otros, 2011).

Fundamentalmente las variables a modelar en una fermentación son la biomasa, el sustrato y el producto, pero adicionalmente se incluye el oxígeno y el calor. Las ecuaciones resultantes son llamadas ecuaciones de estado del modelo y describen la dependencia del tiempo de las variables del sistema. Como se observa, es necesario contar con información sobre la entrada y salida del sistema en estudio y sobre su consumo o producción dentro del sistema.

El crecimiento microbiano puede ser modelado con diferentes niveles de complejidad; molecular o enzimático, macromolecular o de componentes celulares, celular y de poblaciones. De acuerdo al nivel de complejidad que se desee, estos modelos se clasifican en (Ribas y otros, 2011):

- Modelos estructurados, se caracterizan por utilizar los contenidos de la célula en proteínas, enzimas y/o ácidos nucleicos, así como la masa celular o concentración molar para expresar la cinética.
- Modelos de sistemas de enzimas, se caracterizan por incluir información sobre la ruta metabólica. También pueden importar la regulación enzimática, inducción, inhibición, etc.
- Modelos no estructurados, se ignoran los cambios en la composición de la biomasa y por lo tanto el estado fisiológico de una población de microorganismos se representa por su velocidad específica de crecimiento.

En este trabajo para estudiar el crecimiento microbiano se modeló matemáticamente a nivel macromolecular del fermentador, y a nivel enzimático (vía metabólica). A continuación se describe los siguientes modelos matemáticos utilizados:

2.1.1. Modelo matemático del sistema por vía macromolecular

Los modelos dinámicos para las fermentaciones, la concentración de biomasa, sustrato y producto son variables dependientes del tiempo que permiten evaluar el rendimiento de la fermentación. Se propone entonces la utilización de modelos matemáticos que sirvan de herramientas para la simulación de procesos fermentativos por carga, con el fin de obtener información detallada del comportamiento del reactor en cualquier instante de tiempo.

El modelo matemático propuesto para describir el proceso tiene en cuenta una entrada y una salida en el biorreactor, comportándose como un sistema por carga (ver Figura 5).

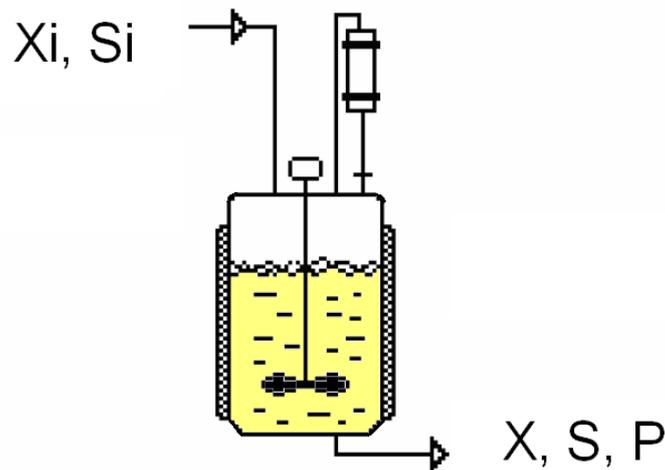


Figura 5. Representación del reactor por carga con las variables involucradas en la fermentación ABE.

La reacción llevada a cabo en el reactor se puede expresar de la forma:



De donde (S) es sustrato, (X) biomasa y (P) concentración de producto. El balance de materia global para el sistema de la Figura 5 viene dado por:

$$\text{Entra} - \text{Sale} + \text{Genera} = \text{Acumula} \quad (1)$$

Considerando que el sistema presentado tiene solo una entrada y una salida y asumiendo volumen de reacción constante, el balance para las variables según la ecuación (1) toma la forma:

Balance General de masa

$$\frac{dm}{dt} = 0 = m_e - m_s \quad (2)$$

- **Balance de masa de la biomasa**

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - Kd) \cdot x \quad (3)$$

- **Balance de masa del sustrato**

$$\frac{d(S.V)}{dt} = -\mu \cdot x \cdot \frac{V}{y_{xs}} \quad (4)$$

- **Balance de masa por producto**

$$\frac{d(P)}{dt} = \mu \cdot x \cdot y_{px} \quad (5)$$

De investigaciones en procesos fermentativos han resultado un alto número de diferentes ecuaciones que describen el crecimiento microbiano. La más famosa de ellas es la expresión propuesta por Monod. Aunque cada uno de estos modelos puede ser descrito por una ecuación flexible, en general de tres parámetros, la falta de consistencia con los datos experimentales ha conducido a desarrollar ecuaciones alternas como las propuestas por Teissier, Moser, Haldane y Hinshelwood, entre otras, sin embargo, en este modelo matemático se trabaja con la ecuación de Contáis (ecuación 6).

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_m \cdot X + S} \quad (6)$$

Dicho modelo matemático a nivel macromolecular descrito se le llamara **Modelo I**, con la idea de diferenciarlo en el presente trabajo con el modelo matemático que se realiza por la vía metabólica, llamándola como **Modelo II**.

2.1.2. Modelo matemático del sistema por vía metabólica

El modelado vía metabólica es uno de los enfoques científicos más exitosos para simular un proceso de fermentación. El análisis de flujo metabólico (AMF, por sus siglas en ingles), es un método sistemático desarrollado para evaluar el papel de los pasos individuales en una red vía metabólica, que da un gran aporte en la ingeniería metabólica (Vallino y Stephanopoulos, 1993). Usando

AMF, muchos estudios recientemente se han llevado a cabo para analizar las rutas metabólicas y para optimizar procesos de cultivo (Shimizu y otros, 1999).

El AMF se basa en un modelo estequiométrico donde el flujo metabólico a un estado de equilibrio y no proporciona ninguna información de variante temporal o tiempo, que es imposible para simular el comportamiento dinámico de los metabolitos. Pero un modelo de simulación cinética de las rutas metabólicas que describe el comportamiento dinámico de los metabolitos es eficiente para la creación del diseño óptimo de biorreactores y estrategias de operación en desarrollo con el esfuerzo mínimo. Además, el análisis de sensibilidad por el modelo de simulación cinética podría revelar que vías tienen impacto en la alta producción de productos deseados.

El desarrollo de un modelo de este tipo es difícil debido a los muchos parámetros cinéticos que se necesitan para estimar el modelo. Por otra parte, esto se vuelve aún más difícil porque no hay modelos de simulación cinética que incluyan las complicadas vías metabólicas que se han desarrollado en varios microorganismos.

Dado que la vía metabólica implicada en la producción ABE es bastante complicado, muy pocos modelos se han publicado que describan esta vía. Papoutsakis (1984), desarrolló un modelo estequiométrico para esta vía; que podría usarse para calcular o estimar las velocidades de las reacciones que ocurren dentro la vía en varias clostridios productores de ABE. Desai et al. (1999) analizaron las vías de formación de los ácido en el metabolismo de *C. acetobutylicum* ATCC824^T usando AMF.

Sin embargo, de Shinto y otros en 2007, desarrollaron con éxito una simulación con el modelo cinético que describe el comportamiento dinámico de los metabolitos en la producción ABE. El modelo de simulación se basó en las vías metabólicas de *C. acetobutylicum* ATCC824^T (Jones y Woods, 1986) (Figura 1). Las ecuaciones de velocidad de cada reacción metabólica se puede representar de la siguiente manera:

$$r_1 = \frac{V_{max1} \cdot [Glucosa] \cdot [Biomasa]}{K_{m1} + [Glucosa]} \cdot F \quad (7)$$

$$r_2 = \frac{V_{max2} \cdot [F6P] \cdot [Biomasa]}{K_{m2} + [F6P]} \cdot F \quad (8)$$

$$r_3 = \frac{V_{max3} \cdot [G3P] \cdot [Biomasa]}{K_{m3} + [G3P]} \cdot F \quad (9)$$

$$r_4 = \frac{V_{max4} \cdot [Lactato] \cdot [Biomasa]}{K_{m4} + [Lactato]} \cdot F \quad (10)$$

$$r_5 = \frac{V_{max5} \cdot [Piruvato] \cdot [Biomasa]}{K_{m5} + [Piruvato]} \cdot F \quad (11)$$

$$r_6 = \frac{V_{max6} \cdot [Piruvato] \cdot [Biomasa]}{K_{m6} + [Piruvato]} \cdot F \quad (12)$$

$$r_7 = \frac{V_{max7} \cdot [Acetato] \cdot [Biomasa]}{K_{m7} + [Acetato]} \cdot F \quad (13)$$

$$r_8 = V_{max8} \cdot \left(\frac{1}{1 + K_{m8A} / [Acetato]} \right) \times \left(\frac{1}{1 + K_{m8B} / [AACoA]} \right) \cdot [Biomasa] \quad (14)$$

$$r_9 = \frac{V_{max9} \cdot [ACoA] \cdot [Biomasa]}{K_{m9} + [ACoA]} \cdot F \quad (15)$$

$$r_{10} = \frac{V_{max10} \cdot [ACoA] \cdot [Biomasa]}{K_{m10} + [ACoA]} \quad (16)$$

$$r_{11} = \frac{V_{max11} \cdot [ACoA] \cdot [Biomasa]}{K_{m11} + [ACoA]} \cdot F \quad (17)$$

$$r_{12} = \frac{V_{max12} \cdot [ACoA] \cdot [Biomasa]}{K_{m11}(1 + [Butanol]/K_{ii12}) + [ACoA](1 + [Butanol]/K_{ii12})} \quad (18)$$

$$r_{13} = K_{13} \cdot [Glucosa] \quad (19)$$

$$r_{14} = \frac{V_{max14} \cdot [AACoA] \cdot [Biomasa]}{K_{m14} + [AACoA]} \cdot F \quad (20)$$

$$r_{15} = V_{max15} \cdot \left(\frac{1}{1 + K_{m15A}/[Butirato]} \right) \cdot \left(\frac{1}{1 + K_{m15B}/[AACoA]} \right) \cdot [Biomasa] \quad (21)$$

$$r_{16} = \frac{V_{max16} \cdot [AcetoAcetato] \cdot [Biomasa]}{K_{m16} + [AcetoAcetato]} \quad (22)$$

$$r_{17} = \frac{V_{max17} \cdot [Butirato] \cdot [Biomasa]}{K_{m17} + [Butirato]} \cdot F \quad (23)$$

$$r_{18} = \frac{V_{max18} \cdot [BCoA] \cdot [Biomasa]}{K_{m18} + [BCoA]} \cdot F \quad (24)$$

$$r_{19} = \frac{V_{max19} \cdot [BCoA] \cdot [Biomasa]}{K_{m19} + [BCoA]} \cdot F \quad (25)$$

Para reproducir los perfiles de concentración de cada metabolito, los balances generales son:

$$\frac{d[Glucosa]}{dt} = -r_1 \quad (26)$$

$$\frac{d[F6P]}{dt} = r_1 - r_2 \quad (27)$$

$$\frac{d[G3P]}{dt} = r_2 - r_3 \quad (28)$$

$$\frac{d[Piruvato]}{dt} = r_3 + r_4 - r_5 - r_6 \quad (29)$$

$$\frac{d[Lactato]}{dt} = r_5 - r_4 \quad (30)$$

$$\frac{d[ACoA]}{dt} = r_6 + r_7 + r_8 - r_9 - r_{10} - r_{11} - r_{12} \quad (31)$$

$$\frac{d[Biomasa]}{dt} = r_{12} - r_{13} \quad (32)$$

$$\frac{d[Acetato]}{dt} = r_9 - r_7 - r_8 \quad (33)$$

$$\frac{d[Etanol]}{dt} = r_{11} \quad (34)$$

$$\frac{d[AACoA]}{dt} = r_{10} - r_8 - r_{14} - r_{15} \quad (35)$$

$$\frac{d[Acetoacetato]}{dt} = r_8 + r_{15} - r_{16} \quad (36)$$

$$\frac{d[BCoA]}{dt} = r_{14} + r_{15} + r_{17} - r_{18} - r_{19} \quad (37)$$

$$\frac{d[Butirato]}{dt} = r_{18} - r_{15} - r_{17} \quad (38)$$

$$\frac{d[Acetona]}{dt} = r_{16} \quad (39)$$

$$\frac{d[CO_2]}{dt} = r_6 + r_{16} \quad (40)$$

$$\frac{d[Butanol]}{dt} = r_{19} \quad (41)$$

La velocidad de la ecuación r_{13} en la ecuación 32, indica la reacción de muerte celular.

Adicionalmente, se tiene que tomar en cuenta que el butanol inhibe la utilización de glucosa y la producción de butanol en el cultivo de ABE (Jones y Woods, 1986), además que un aumento de la glucosa inicial varía también la concentración de los resultados por la inhibición de la glucosa. También, Tashiro y otros (2004), han demostrado experimentalmente la aceleración de la producción de butanol por la alimentación de butirato.

Por lo tanto, Shinto y otros, introdujeron condiciones con inhibición y activación, donde sustituyeron las ecuaciones r_1 , r_{17} , y r_{19} por lo siguiente:

$$r_1 = \frac{V_{max1} \cdot [Glucosa] \cdot [Biomasa]}{K_{m1} (1 + [Glucosa]/K_{is1}) + [Glucosa] (1 + [Butanol]/K_{ii1})} \cdot F \quad (42)$$

$$r_{17} = \frac{V_{max17} \cdot [Butirato] \cdot [Biomasa]}{K_{m17}(1 + K_{a17}/[Butirato]) + [Butirato]} \cdot F \quad (43)$$

$$r_{19} = \frac{V_{max19} \cdot [BCoA] \cdot [Biomasa]}{K_{m19}(1 + [Glucosa]/K_{a19}) + [BCoA](1 + [Butanol]/K_{ii19})} \cdot F \quad (44)$$

En la ecuación de velocidad de r_1 (ecuación 42) fue desarrollado mediante la combinación de la inhibición por sustrato por la glucosa y no competitivo con la inhibición por butanol. La ecuación de velocidad de r_{17} (ecuación 43) fue desarrollada usando la activación específica por butirato. En la ecuación de r_{19} (ecuación 44) fue también desarrollado mediante la combinación de la inhibición no competitiva por butanol y activación específica por butirato.

Dado que muchas reacciones metabólicas en la producción de ABE se producen en la presencia de ATP o NADH, estas reacciones pueden terminar cuando existe una insuficiencia de energía, es decir, después del agotamiento de la glucosa. Considerando este caso, existe un mecanismo es encendido y apagado (F) se introdujo en el Modelo II.

En este mecanismo, asumimos que F puede tener un valor de 1 o 0, y dependerá de la concentración de glucosa en el caldo. Por tanto, cuando la concentración de glucosa sea mayor de 1.00 g/L, F tiene valor de 1 y cuando la concentración este por debajo 1.00 g/L, F valdrá 0. Este mecanismo de encendido y apagado se introdujo en las ecuaciones: (7)-(13), (15), (17), (20), (23)-(25), (42)-(44), que son las reacciones metabólicas que van acompañadas con ATP, ADP, NADH, o NAD.

Para el desarrollo de este modelo matemático y estimar los parámetros, se tomó como punto de partida los resultados de los parámetros cinéticos obtenidos por Shinto y otros en 2007 (ver Tabla 2), para determinar los parámetros del sistema de fermentación propuesto. Adicionalmente, se consideró manejar los datos experimentales de glucosa con una concentración inicial de 80 g/L (*c. acetabutylicum*) por la semejanza con los resultados al propuesto por dichos investigadores.

Tabla 2. Resultados de los parámetros cinéticos de los datos experimentales de 70.6mM de glucosa inicial, por Shinto y otros (2007).

Reacción	Ka (h ⁻¹)	Vmax ^a (h ⁻¹)	Km ^a (g/L)	Kis ^b (g/L)	Kii ^b (g/L)	Ka ^b (g/L)	KmA ^a (g/L)	KmB ^b (g/L)
<i>r</i> ₁		3.2	46	55.6	67.5			
<i>r</i> ₂		40	10					
<i>r</i> ₃		120	26.5					
<i>r</i> ₄		7.5	177					
<i>r</i> ₅		9.7	500					
<i>r</i> ₆		180	1.5					
<i>r</i> ₇		0.3	50					
<i>r</i> ₈		19					40	70
<i>r</i> ₉		26.5	51					
<i>r</i> ₁₀		20	1					
<i>r</i> ₁₁		7.45	30					
<i>r</i> ₁₂		8.1	1.1		23			
<i>r</i> ₁₃	0.017							
<i>r</i> ₁₄		10	5.2					
<i>r</i> ₁₅		80					15	50
<i>r</i> ₁₆		12	10					
<i>r</i> ₁₇		35	4.9			2.2		
<i>r</i> ₁₈		100	6.1					
<i>r</i> ₁₉		3.15	5		67.5	2.2		

2.2. Optimización del proceso de fermentación

Para el proceso de fermentación ABE en estudio, es de gran importancia realizar una optimización del proceso, con el fin de representar resultados óptimos para el usuario durante la simulación del proceso.

2.1.2. Función objetivo de la optimización

En los problemas de optimización de sistemas dinámicos se desea optimizar una función objetivo (*J*_{costo}) que es función de unas variables de decisión y de las variables de estado del proceso, que a su vez evolucionan en el tiempo. La optimización, también denominada programación matemática, sirve para encontrar la respuesta que proporciona el mejor resultado, la que logra

mayores ganancias, mayor producción o la que logra el menor costo de un proceso determinado.

La función objetivo a minimizar se calculará para unos valores determinados de las variables de decisión mediante la simulación del modelo. Las variables de decisión a optimizar y la función objetivo son distintas dependiendo del tipo de problema de optimización dinámica de que se trate.

En los modelos matemáticos utilizados en este trabajo, la función de costo se basó en minimizar el error de los valores de las variables calculadas menos los valores de los datos experimentales, en cada determinado tiempo utilizando una función discreta (ver ecuación 45 y 46).

$$J_{\text{costoGlobal}} = \sum_{i=1}^j J_{\text{variable1}} + J_{\text{variable2}} + J_{\text{variable3}} + \dots + J_{\text{variablej}} \quad (45)$$

$$J_{\text{variablei}} = (Variable_{\text{calculada}} - Variable_{\text{experimental}})^2 \quad (46)$$

En algunos casos debido a la complejidad de los cálculos a optimizar, y con el objetivo de minimizar el tiempo de respuesta, se normalizaron las variables usando el promedio experimental de dichas variables (ecuación 47).

$$J_{\text{variablei}} = \left(\frac{(Variable_{\text{calculada}} - Variable_{\text{experimental}})}{\overline{Variable_{\text{experimental}}}} \right)^2 \quad (47)$$

2.1.3. Uso de Ecosimpro para la optimización

Para las diferentes optimizaciones del trabajo propuesto, se utilizó EcosimPro® que es una herramienta de modelado y simulación de sistemas dinámicos., en donde los modelos deben ser representado por ecuaciones algebraicas diferenciales y eventos discretos.

El programa se encarga internamente de extraer las ecuaciones del modelo final, transformarlas simbólicamente, y además de detectar (si existiera) los problemas de exceso de variables, para finalmente resolver automáticamente lazos algebraicos lineales y no lineales (Jorrín y otros, 2007). El entorno de modelado y simulación que emplea EcosimPro® presenta muchas cualidades

que le confieren una gran versatilidad y potencia, pero en general no garantiza que el óptimo hallado sea el global (Gómez y Prada, 2007).

La estructura que se aplicó en el programa para la ejecución las diferentes optimizaciones se describe a continuación (ver ejemplo en Anexos):

- **USE** → se indica que carpeta requiere para ejecutar el programa. En este caso, se utilizó **MATH** (carpeta matemática).
- **COMPONENT** → Se indica y se declara las diferentes variables y constantes que se requiere para el cálculo matemático, estructurado de la siguiente forma y orden:
(información)
END COMPONENT
 - **DATA** →Aquí se indica los valores de las variables que se mantienen constantes en el modelo utilizado.
 - **DECLS UNIT** →Se declara las variables del problema
 - **DISCRETE** → En este apartado se coloca el modelo matemático para eventos discretos, para ayudar al usuario para modelar las piezas. Consta de eventos que deben ser detectadas
 - **CONTINUOUS** → En esta parte se coloca el modelo matemático con el que se desea trabajar en el programa.

Adicionalmente, para que la función objetivo se calculará justo en los tiempos de los datos experimentales, se aplicó el método DISCRETE (discreto) que utiliza el programa (ver Figura 6), y de esta manera ajustar los parámetros en los diferentes modelos matemáticos.

```

DISCRETE

  WHEN (sample == TRUE) THEN

    -- Subtotales del índice de coste
    JSexp      += coef[1]*((S - Sexp)/Promedio_Sexp)**2
    JXexp      += coef[2]*((X - Xexp)/Promedio_Xexp)**2
    JPaexp     += coef[3]*((Pa - Paexp)/Promedio_Paexp)**2
    JPeexp     += coef[4]*((Pe - Peexp)/Promedio_Peexp)**2
    JPbexp     += coef[5]*((Pb - Pbexp)/Promedio_Pbexp)**2
    JLactatoEXP += coef[6]*((Lactato - LactatoEXP)/Promedio_LactatoEXP)**2
    JAcetatoEXP += coef[7]*((Acetato - AcetatoEXP)/Promedio_AcetatoEXP)**2
    JButiratoEXP += coef[8]*((Butirato - ButiratoEXP)/Promedio_ButiratoEXP)**2

    --- Índice de coste general
    Jcosto = JXexp + JSexp + JPbexp+ JButiratoEXP + JPaexp + JPeexp + JLactatoEXP + JAcetatoEXP

    sample = FALSE
    sample = TRUE AFTER (timemuestra[k+1]-timemuestra[k])

    k = k+1

  END WHEN

```

Figura 6. Muestra del cálculo discreto que se le realiza la función objetivo en función al tiempo de muestreo experimental.

Para realizar la optimización de los parámetros requeridos tanto para el Modelo 1 como para el Modelo 2, se utilizó la herramienta dinámica de “optimización” de EcosimPro (ver Figura 7), en el cual se manejó el modelo matemático basado en algoritmo genético (PBCA) con un tamaño de población (NP) de 500 (ver Figura 8). Los datos y/o información que fueron modificados según el tipo de optimización aplicada son: el tiempo de simulación, la función objetivo que se aplicaba, los parámetros a optimizar (que incluye la semilla o valor inicial y el rango de estimación), los valores iniciales de las variables a calcular y finalmente, las restricciones del problema.

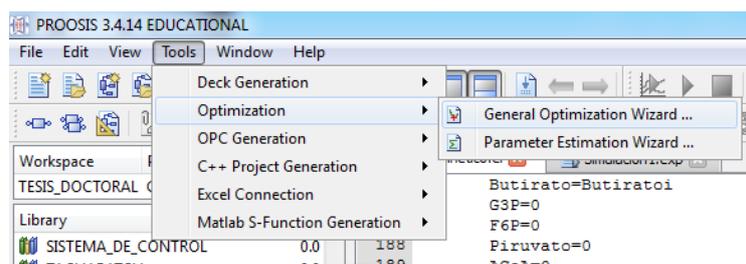


Figura 7. Ilustración de la herramienta de optimización en EcosimPro.

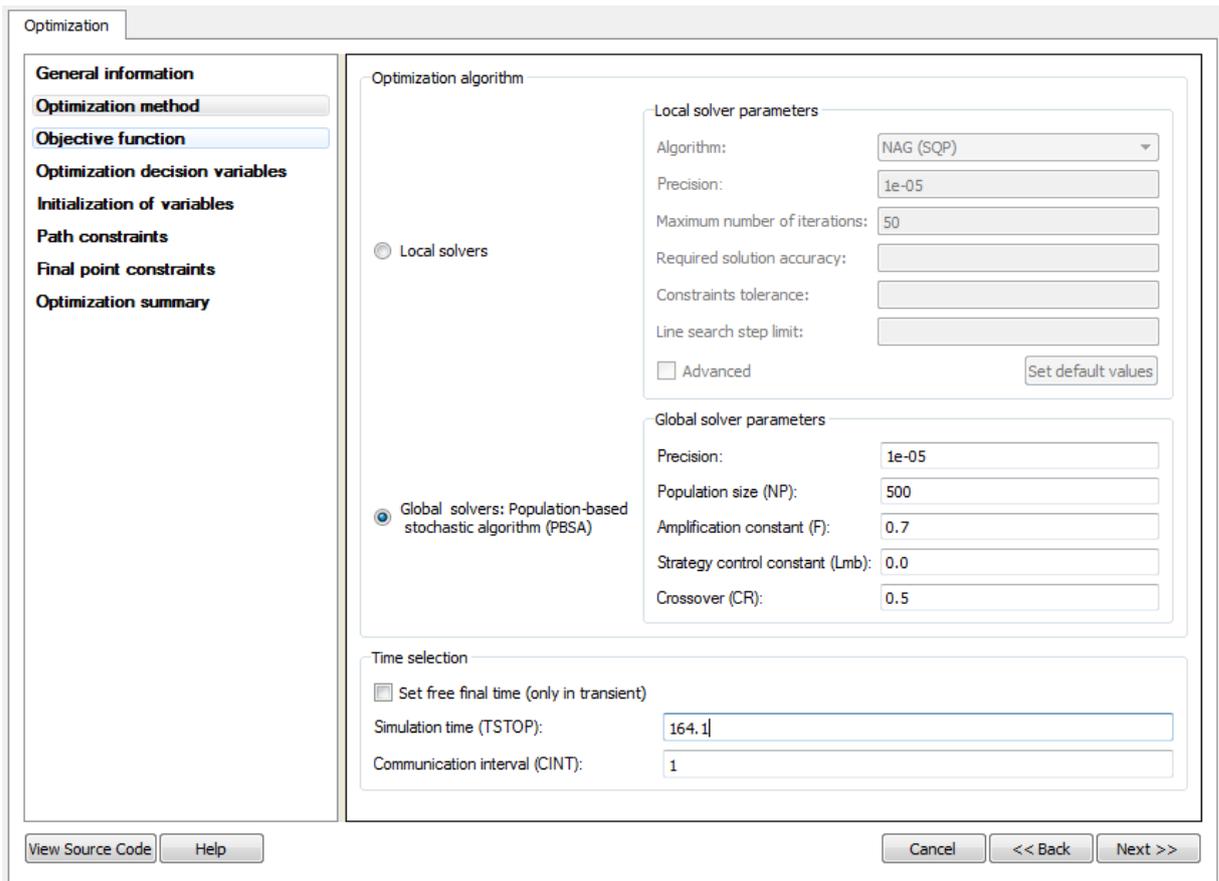


Figura 8. Ilustración del método de optimización utilizado en EcosimPro.

Cada optimización realizada presentaba resultados en tiempo diferente (entre 15 min algunos hasta 8 horas siendo los más complejos), y se debía a diferentes causas: la cantidad de parámetros a calcular, el valor inicial que se indicaba en cada parámetros (sí era muy bajo o muy algo), los rango de cálculo de cada parámetro estimado, etc., por lo cual, la estimación de los parámetros fue una tarea compleja según el tiempo de espera y validez de los resultados a obtener.

CAPITULO III. ESTIMACIÓN DE PARAMETROS USANDO OPTIMIZACIÓN

En este capítulo se describe como se obtienen las diferentes estimaciones de los parámetros en los dos tipos de modelo matemático planteado para el sistema de fermentación ABE, utilizando el simulador Ecosimpro.

3.1. Análisis de sensibilidad

Para realizar una optimización eficaz y rápida, se generó información adicional sobre el comportamiento de la solución por cambios en los parámetros del modelo, lo que usualmente se conoce como *análisis de sensibilidad*. En pocas palabras, esta fase consiste en determinar la influencia de cambios en el valor de cada parámetro en la solución, lo que lleva a determinar cuáles son significativos y deben incluirse en la estimación de parámetros, mientras que otros pueden dejarse constantes al no influir en la solución, haciendo más simple la solución matemática.

Si se considera J_{costo} como la función objetivo (ecuación 48), en donde y_m es la variable manipulada que varía en función distintos parámetros, entonces la sensibilidad de la salida i del modelo respecto al parámetro j en relación a un experimento dado, es función del tiempo (ecuación 50).

$$J_{costo} = \sum_{t=1}^N [y(t) - y_{m(p,u,t)}]^2 \quad (48)$$

$$y_{m(p,u,t)} = g(x(t), u(t)) \quad (49)$$

$$S_{ij}(t) = \frac{\partial y_{mi}(t)}{\partial P_j} \quad (50)$$

Adicionalmente se puede ver como la sensibilidad del índice J respecto al parámetro j en relación a un experimento dado (ecuación 51).

$$\frac{\partial J_{costo}}{\partial P_j} \quad (51)$$

Por tanto, la norma de cada columna j de la matriz de sensibilidades da una idea de la importancia del parámetro P_j en el valor de las salidas (ecuación 52).

$$\begin{bmatrix} S_{11} & S_{12} & \dots & S_{1d} \\ S_{21} & S_{22} & \dots & S_{2d} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ S_{m1} & S_{m2} & \dots & S_{md} \end{bmatrix} \quad (52)$$

Realizar un análisis de sensibilidad del modelo matemático propuesto, ayudan a visualizar los parámetros o constantes que requieran mayor atención para hacer ajustar y disminuir el error respecto al resultado deseado. A continuación se describe los diferentes cálculos que se realizaron para el estimar los valores de los parámetros de los modelos propuestos (Modelo I y Modelo II), utilizando para ello el análisis de sensibilidad de los datos experimentales sobre el sistema propuesto.

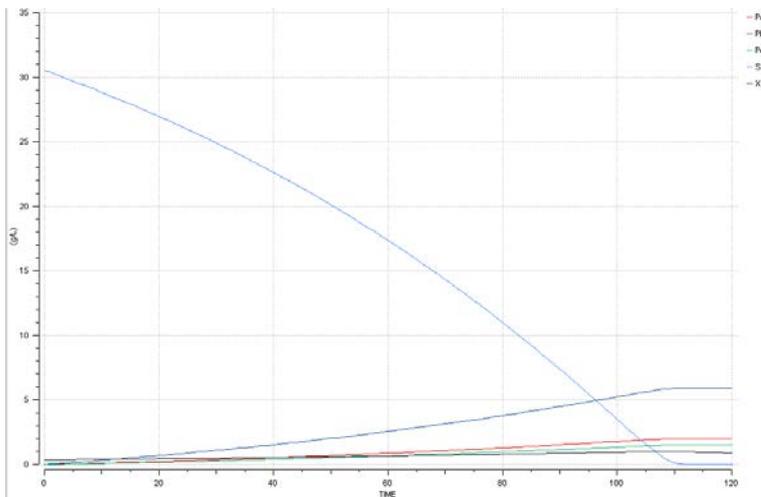
3.2. Simulación de la fermentación ABE con el Modelo I

El modelo matemático empleado en el sistema a nivel macromolecular (Modelo I), tal como se describió en el punto 2.1.1, presenta tres diferentes constantes como K_m , K_d y μ_{max} , de valores desconocidos.

Para estimar los dichos parámetros se consideró que el valor varía según el tipo de bacteria utilizada en el proceso, el tipo de sustrato así como la variación de temperatura y pH aplicada durante el proceso. Por tanto, se trató de calcular las constantes mencionadas, según los datos experimentales suministrados, por cada tipo de bacteria y sustrato (ver modelo de cálculo del Modelo I en Anexos, Figura 12).

Los datos experimentales de la glucosa utilizando fue con la bacteria *c. acetobutylicum* y para concentraciones iniciales de 30, 60 y 80 g/L, para evaluar el modelo y estimar en principio los valores de las constantes. A continuación se indica los resultados que se obtuvo para cada concentración inicial:

- **Concentración de 30 g/L para Glucosa (*c. acetobutylicum*).**



$$K_d = 0.0124 \text{ h}^{-1}$$

$$K_m = 0.3129 \text{ g/L}$$

$$\mu_{\max} = 0.0225 \text{ h}^{-1}$$

$$y_{p_{xa}} = 1.32$$

$$y_{p_{xb}} = 3.88$$

$$y_{p_{xe}} = 1$$

$$y_{x_s} = 0.05$$

Gráfica 1. Resultado de la optimización de parámetros con la glucosa a 30 g/L utilizando *c. acetobutylicum* con el modelo 1.

En el Gráfica 1 se observa el comportamiento que genera la optimización para estimar los parámetros, cuando se trabaja con glucosa a dicha concentración (30 g/L), que observándolo con la Figura 9, se observa que tiene el mismo comportamiento experimental.

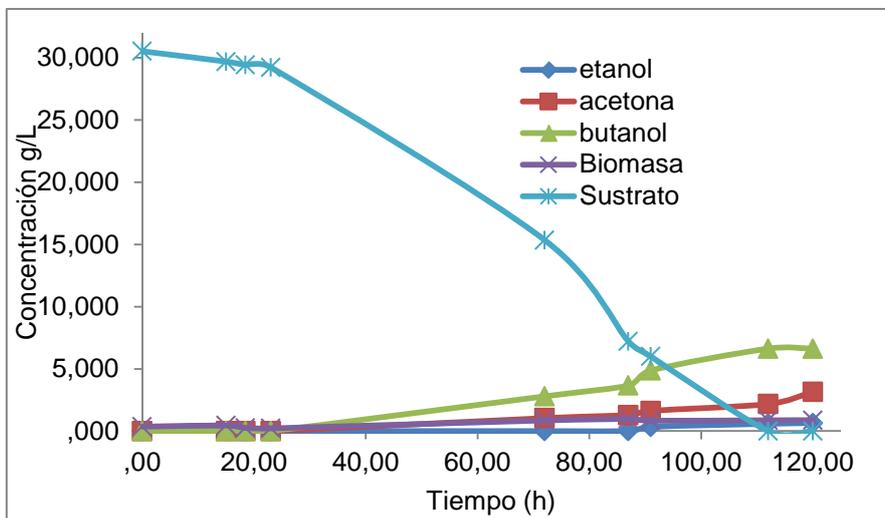
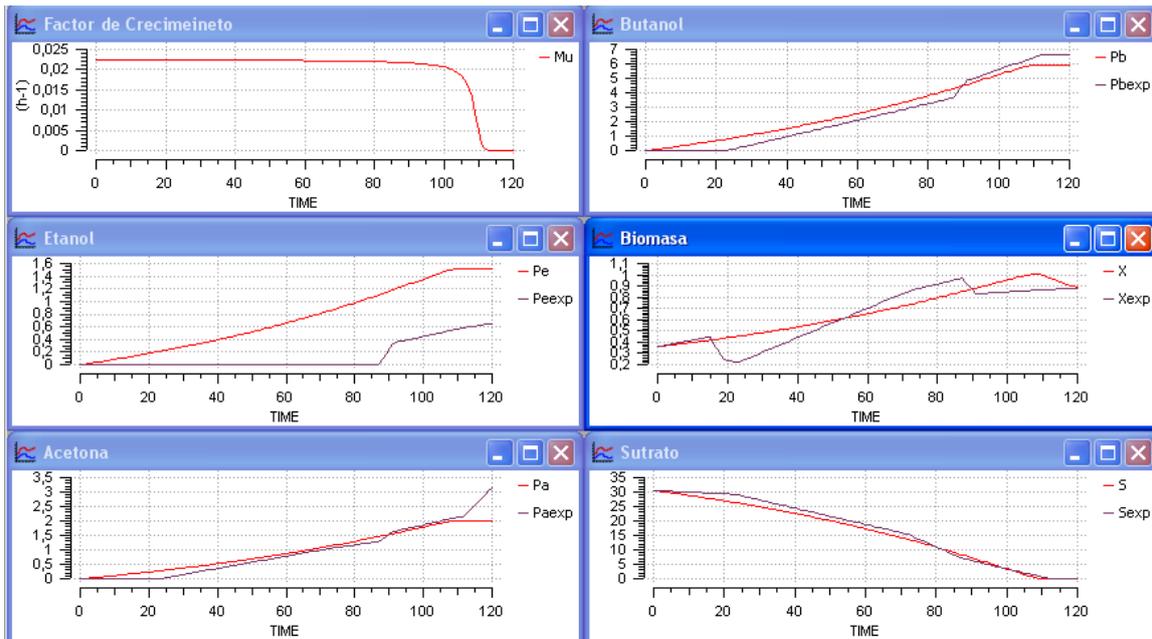


Figura 9. Datos experimentales de la glucosa a 30 g/L utilizando como bacteria el *c. acetobutylicum*.

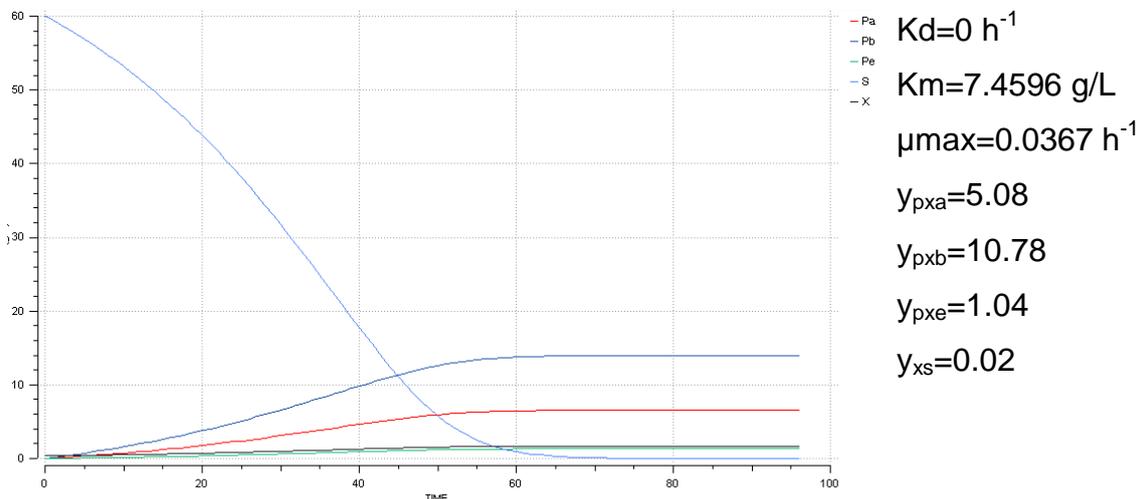
Pero comparando las variables calculadas con los valores experimentales como se observa en la Gráfica 2, se aprecia la diferencia en las curvas de los productos y la biomasa, como del resultado final.



Gráfica 2. Comparación de las variables calculadas con los datos experimentales de la glucosa a 30 g/L utilizando *c. acetobutylicum* con el modelo 1.

Teniendo dichos resultados, igual se procedió a estimar los parámetros utilizando otras datos experimentales que varían solo en la concentración inicial para ver si se obtenía los mismos resultados.

- **Concentración de 60 g/L para Glucosa (*c. acetobutylicum*).**



Gráfica 3. Resultado de la optimización de parámetros con la glucosa a 60 g/L utilizando *c. acetobutylicum* con el modelo 1.

Igual que en caso anterior, el comportamiento de las variables calculadas obtenidas (ver Gráfica 3) presentan un resultado muy parecido a los datos experimentales suministrados (Figura 10).

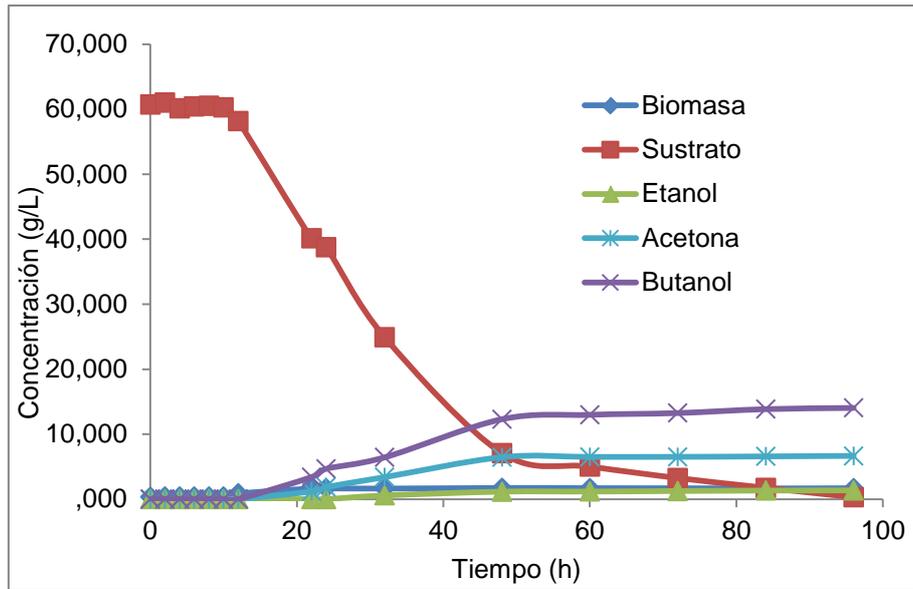
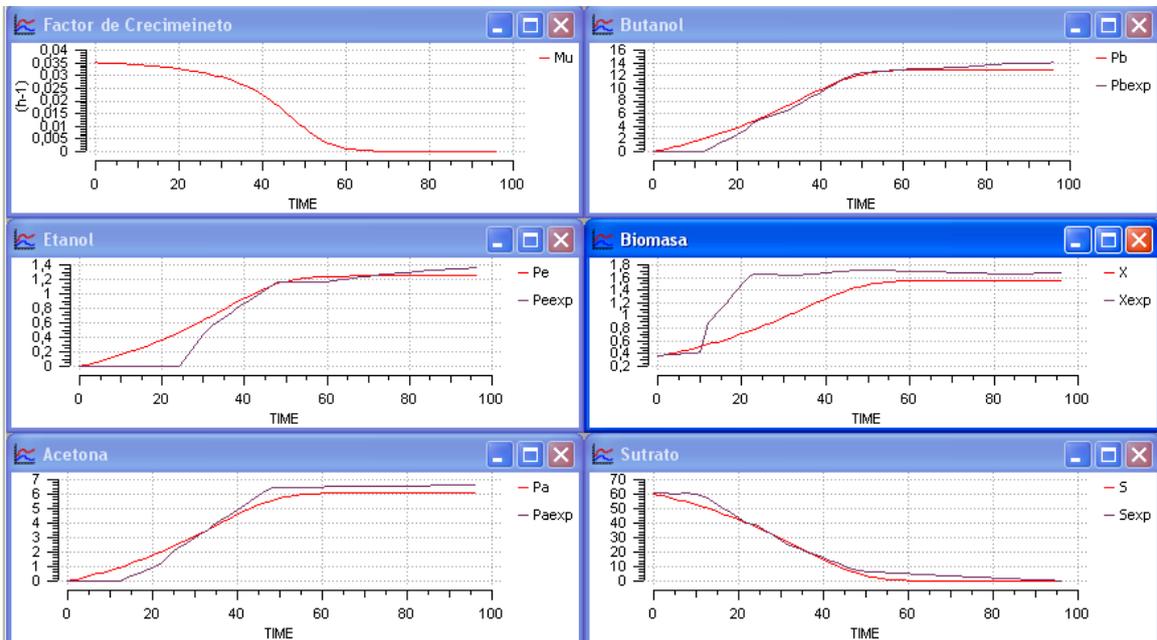


Figura 10. Datos experimentales de la glucosa a 60 g/L utilizando como bacteria el *c. acetobutylicum*.

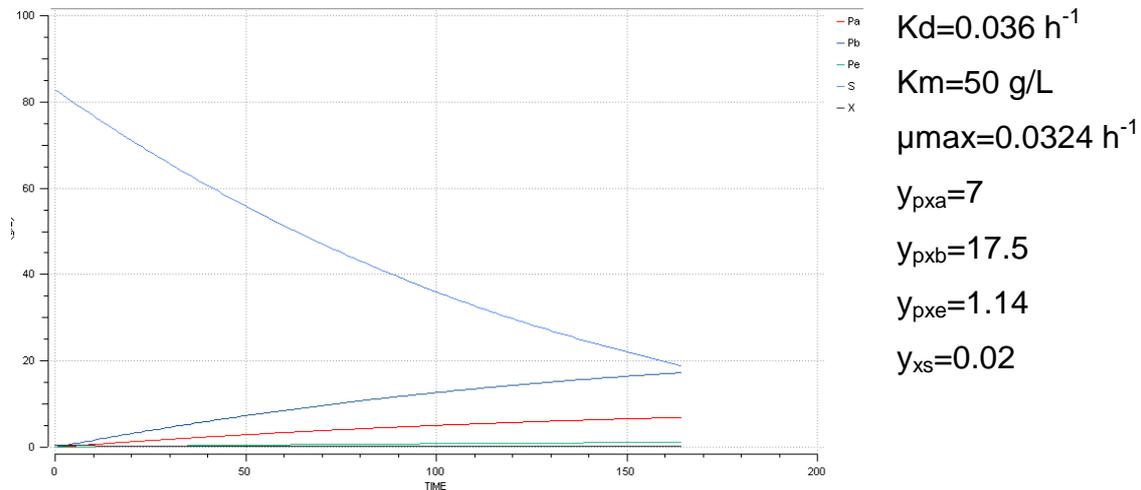
Sin embargo, tal como se observa en la Gráfica 4, la estimación calculada de las variables tiene unas variaciones en algunas curvas, y se aprecia más en la curva de la biomasa.



Gráfica 4. Comparación de las variables calculadas con los datos experimentales de la glucosa a 60 g/L utilizando *c. acetobutylicum* con el modelo 1.

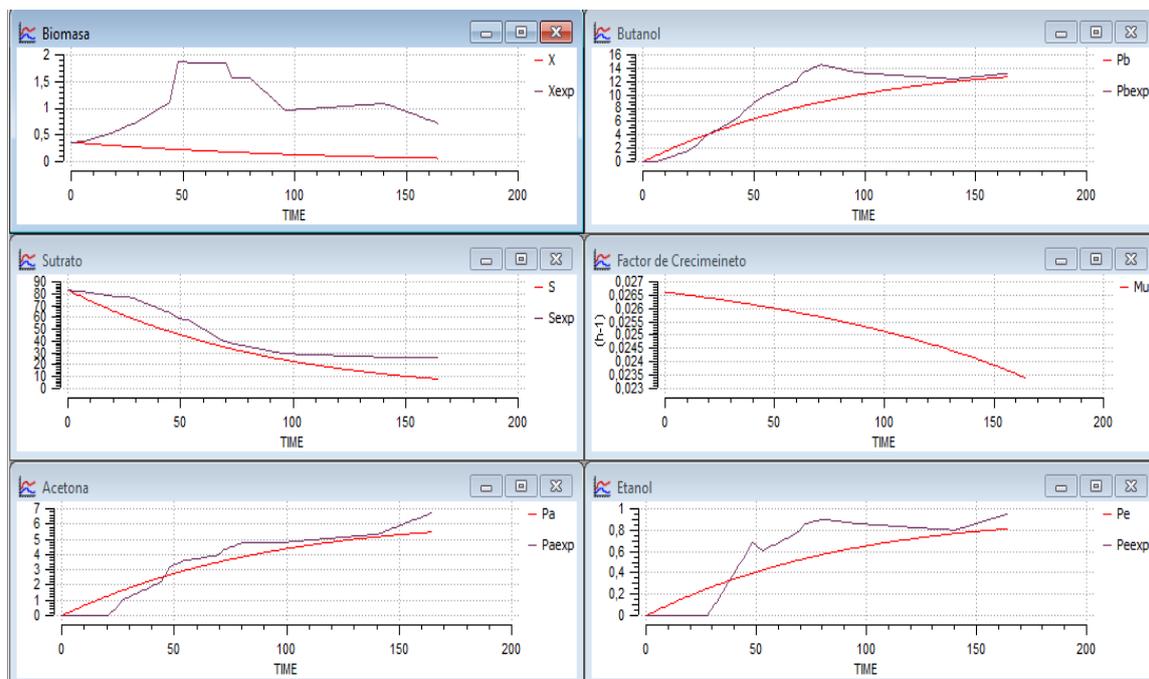
Del mismo modo se procedió con los datos experimentales de 80 g/L de concentración inicial.

- **Concentración de 80 g/L para Glucosa (*c. acetobutylicum*).**



Gráfica 5. Resultado de la optimización de parámetros con la glucosa a 80 g/L utilizando *c. acetobutylicum* con el modelo 1.

Se observa en la Gráfica 5, como difiere también los resultados de los parámetros con los anteriores resultados de glucosa a diferentes concentraciones iniciales. El comportamiento de la curva calculada para la biomasa (ver Gráfica 6), tiene diferencia notable con el comportamiento de la variable experimental, lo cual se ve influenciado también por el ajuste de las demás curvas de las variables, debido a la relación que tiene la biomasa para el cálculo de los productos.



Gráfica 6. Comparación de las variables calculadas con los datos experimentales de la glucosa a 80 g/L utilizando *c. acetobutylicum* con el modelo 1.

Por tanto, se concluye que el Modelo 1 no modela la fermentación ABE, debido a que presenta errores en el cálculo de las variables tal como se observó en las diferentes simulaciones realizadas.

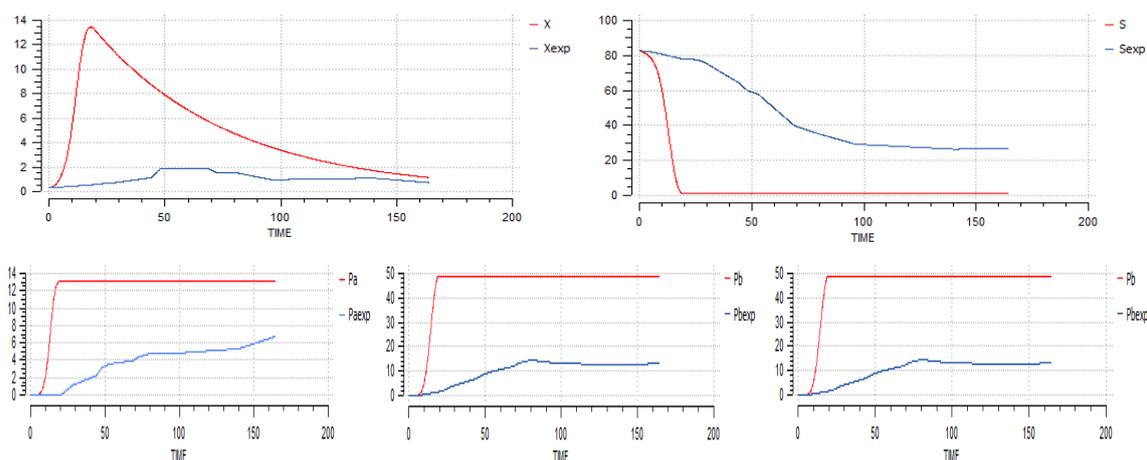
La variación de las variables calculadas con los datos experimentales, se debe a que no se considera en el modelo matemático la inhibición del sustrato en la concentración de los productos, ni tampoco la inhibición que produce la concentración de butanol en el sistema.

Se requiere ajustar el modelo matemático macromolecular (Modelo I), donde se considere dichas inhibiciones y muy probablemente el modelo de crecimiento microbiano dado que no se identifica como el modelo de Contáis.

3.3. Simulación de la fermentación ABE con el Modelo II

Para la estimación de los distintos parámetros del modelo II, se optimizó las variables de estado con los datos experimentales de la glucosa con una concentración inicial de 80 g/L y utilizando la bacteria *c. acetobutylicum* en la fermentación (ver modelo de cálculo en la Figura 12, en anexos).

En la Gráfica 7, se aprecia la diferencia del cálculo de las variables realizado con el Modelo II a una concentración inicial de 80 g/L de glucosa, en donde se utilizó los valores de los parámetros estimados por Shinto en el 2007 (ver Tabla 2). Por tanto, se requiere ajustar el Modelo II que presenta 36 ecuaciones (entre las reacciones cinéticas y el cálculo de las variables de estado), y los 45 parámetros a estimar, para ajustar al modelo experimental.



Gráfica 7. Variación de las variables de estado más importantes calculadas con el Modelo II utilizando los resultados de los parámetros de Shinto y otros en el 2007, y comparadas con los datos experimentales de la glucosa con concentración inicial de 80 g/L (*c. acetobutylicum*).
S=sustrato, X=biomasa, Pa=acetona, Pb=butanol, Pe=etanol.

Debido a la complejidad del cálculo matemático, se realizó el análisis de sensibilidad al Modelo II con los valores de los parámetros de la Tabla 2 como puntos de partida, y se determinó los parámetros que requieren mayor ajuste para obtener la identificación del sistema deseado.

En el modelo matemático propuesto (Modelo II), los parámetros de importancia son las concentraciones del Sustrato (S), Biomasa (X) y los diferentes productos: butanol (Pb), Etanol (Pe) y acetona (Pa). Considerando esto, en la Tabla 3, se observa los valores de sensibilidad relativa, que se obtuvo en el análisis para determinar cuáles de los diferentes parámetros requieren ser estimados con mayor precisión. En función de estos resultados, se consideró

los valores de sensibilidad alto (mayores de 100) que son los que requieren mayor modificación para ajustar el modelo.

Tabla 3. Valores de la sensibilidad de los parámetros del Modelo II.

<i>Valor de sensibilidad</i>	<i>Parámetro</i>	<i>Valor de sensibilidad</i>	<i>Parámetro</i>
0.1195	Ka19	19.3318	Vmax3
0.4210	Km8a	19.5656	Km2
0.4265	Km8b	19.6006	Km14
0.4273	Vmax8	19.7886	Vmax2
2.0043	Kii19	20.1725	Vmax14
2.6809	Km7	23.8620	Km6
2.7113	Vmax7	23.9191	Vmax6
7.8614	Km15a	33.6930	Km17
8.0727	Km11	56.6944	Kis1
8.0776	Vmax11	60.2006	Km18
9.1309	Ka17	66.8878	Km19
9.7457	Km9	73.1815	Vmax17
9.7492	Vmax9	74.3681	Vmax18
10.5217	Km16	84.3440	Kii12
10.5954	Vmax16	84.5938	Vmax19
11.9586	Km15b	165.3950	Km1
11.9942	Vmax15	303.1460	Vmax1
12.9064	Km4	342.4520	Km10
12.9720	Vmax4	348.8310	Vmax10
15.1863	Km5	351.5950	Km12
15.2642	Vmax5	355.9580	Vmax12
16.0836	Kii1	403.6630	K13
19.2596	Km3		

En la Tabla 4, se muestran los parámetros más influyentes en las variables de estado, y por tanto, sus parámetros son los valores que deben conocerse con mayor precisión. En primer lugar, están los relacionados con la biomasa dado que las mayorías de las variables de estados, depende de dicha concentración. Adicionalmente, la biomasa se ve afectada significativamente por la ecuación r_{12} , y además por la concentración del sustrato y del butanol, así como estas mismas dependan también de la concentración de biomasa, por lo que están entrelazadas en el cálculo de ajuste. Adicionalmente, la concentración de butanol afecta a la mayoría de las concentraciones a calcular, y está se ve muy influenciado por la variación de la concentración del butirato debido a la segunda fase de la fermentación ABE (solventogénesis).

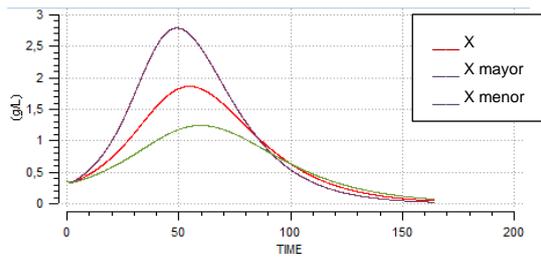
Tabla 4. Parámetros más relevantes del análisis de sensibilidad al Modelo II.

VARIABLES DE ESTADO	PARÁMETROS
Biomasa (X)	K13 Km12 Kii12 Vmax12
Sustrato (S)	Km1 Vmax1
Butanol	Km19 Vmax19
Butirato	Km17 Km18 Vmax17 Vmax18
ACoA	Km10 Vmax10

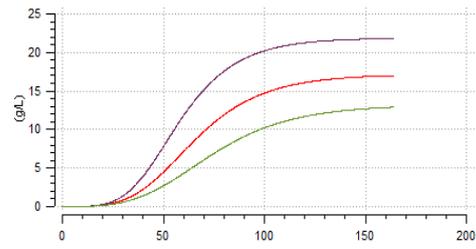
En la Gráfica 8, se observa la variación de las concentraciones de las variables más importantes a estudiar (sustrato y los productos ABE) al modificar la los parámetros que dependen de la biomasa (K13, Km12, Kii12, Vmax12),. Si se aumenta la concentración de la biomasa, cambia el comportamiento del sustrato disminuyendo, y los productos como el butanol aumentan en concentración.

El mismo análisis se realizó variando parámetros que afectan a la concentración del sustrato solamente (ver Gráfica 9), Km1 o Vmax1, lo cual afecta la concentración de la biomasa disminuyendo (si se aumenta el sustrato) y la concentración de los productos, como el butanol, también disminuyen.

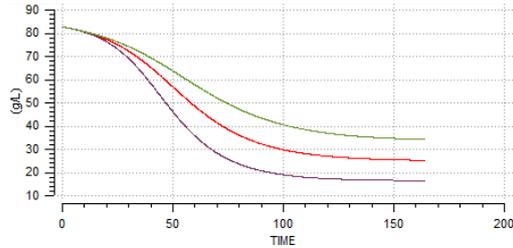
Por tanto, debido a este análisis, se tiene que la concentración de la biomasa es inversamente proporcional a la concentración del sustrato y directamente proporcional a los productos. Y del mismo modo, la concentración del sustrato es inversamente proporcional tanto a la biomasa como a la concentración de los productos.



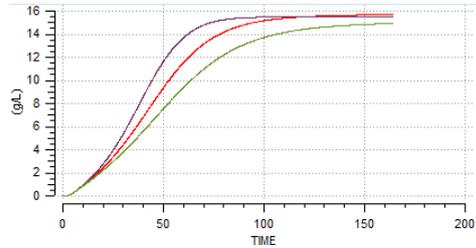
Variación de la biomasa



Variación del butanol

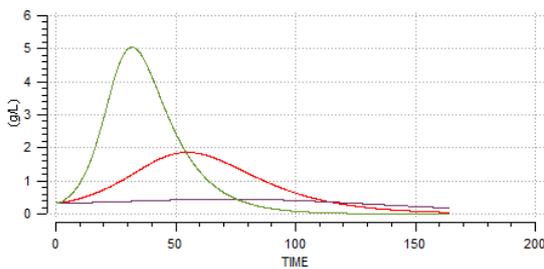


Variación del sustrato

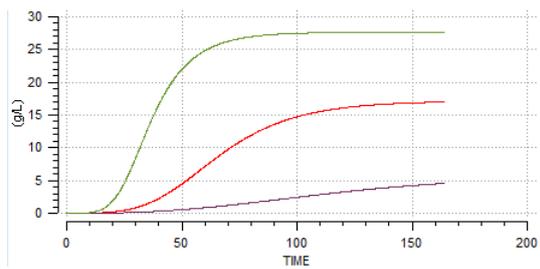


Variación del butirato

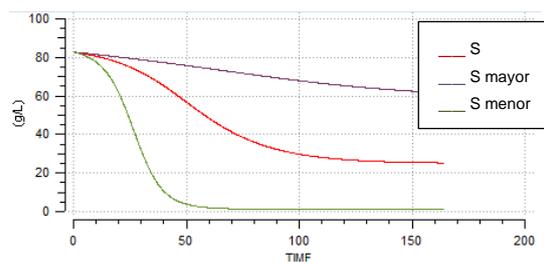
Gráfica 8. Sensibilidad de algunas variables de estado respecto a modificaciones de la biomasa en el Modelo II.



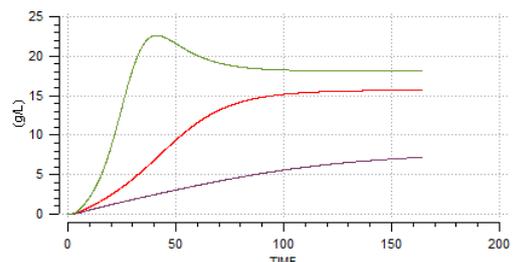
Variación de la biomasa



Variación del butanol



Variación del sustrato



Variación del butirato

Gráfica 9. Sensibilidad de algunas variables de estado respecto a modificaciones del sustrato en el Modelo II.

Se realizaron varias optimizaciones y ajuste para llegar al mejor ajuste posible de los parámetros. Para ello, inicialmente se realizaron pruebas individuales por parámetros para ir ajustando los valores uno a uno, dado la complejidad del

cálculo para el programa, dado que se tardaba mucho tiempo en dar respuesta o daba error a nivel matemático por el rango de cálculo.

Finalmente, haber justado por separado los parámetros de las variables más representativas (sustrato, biomas y butanol), hizo posible poder ajustar en conjunto los diferentes parámetros del Modelo II. En dicho cálculo, el ajuste se hizo para que estimara todos los parámetros del modelo considerando minimizar los errores (función objetivo, Jcosto) de las variables de estado: biomasa, sustrato, butanol, etanol, acetona, butirato, acetato y lactato.

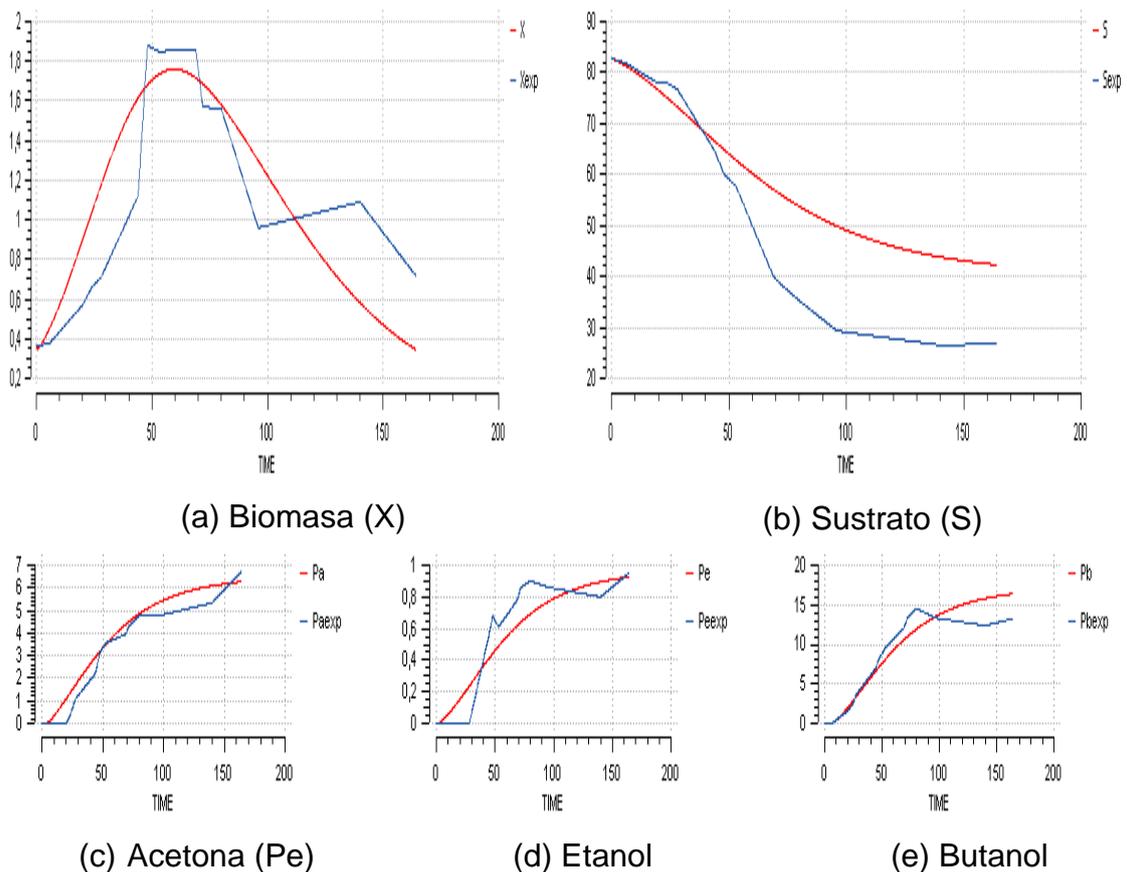
A continuación se muestra en la Tabla 5 los diferentes valores que se estimaron de los parámetros del Modelo II obtenido con los cálculos realizados con Ecosimpro y los datos experimentales de la glucosa a 80 g/l de concentración inicial. En dicha tabla se observa las velocidades máximas de las reacciones involucradas, además de las constantes de metabolismo de cada reacción cinética.

Tabla 5. Resultado de las estimaciones de los parámetros del Modelo II.

Velocidades máximas de las reacciones (h⁻¹)	Constantes del metabolismo de cada reacción cinética (g/L)
Vmax1=0.623	K13=0.0912
Vmax2=40	Km1=0.9
Vmax3=120	Kis1=480
Vmax4=9	Kii1=4.7
Vmax5=9.7	Kii12=16.7
Vmax6=180	Kii19=40
Vmax7=0.3	Ka17=2.2
Vmax8=69.4	Ka19=0.01
Vmax9=26.5	Km2=10
Vmax10=20	Km3=26.5
Vmax11=7.45	Km4=177
Vmax12=0.1489	Km5=0.7
Vmax14=10	Km6=1.5
Vmax15=100	Km7=50
Vmax16=29.193	Km9=51
Vmax17=60.345	Km10=3.2235
Vmax18=75	Km11=30
Vmax19=9.8309	Km12=0.001
	Km14=5.2
	Km16=0.0004
	Km17=4.9
	Km18=6.5
	Km19=4.5
	Km8a=0.03
	Km8b=1
	Km15a=0.8837
	Km15b=55

En la Gráfica 10 se observa los resultados de las diferentes variables de estado (línea roja): biomasa, sustrato, butanol, etanol, acetona, etc.; calculados con los parámetros finales del Modelo II, y comparados con el comportamiento de los datos experimentales (línea azul).

En dichas graficas se observa que se requiere mayor ajuste en el cálculo del sustrato y/o de la biomasa dado la diferencia existente entre el calculado y el que genera los datos experimentales. Sin embargo, se considera como el mejor ajuste debido a la variabilidad de los datos experimentales de la biomasa, que hizo complejo el mejor ajuste de los parámetros. Adicionalmente, el resultado que arroja el modelo para el cálculo de los productos, tiene una diferencia muy baja al momento de estimar el resultado.



Gráfica 10. Comparación de las concentraciones calculadas con los parámetros estimados del Modelo II a una concentración inicial de 80 g/L de Glucosa (*c. acetobutylicum*) y los datos experimentales a la misma concentración.

CAPITULO IV. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

En el presente capítulo se describe la validación que se realizó a las estimaciones de los parámetros, resultante de la optimización de los datos experimentales con el Modelo II.

Debido a que se estimaron los parámetros del Modelo II, con los datos experimentales de la glucosa a 80 g/L y utilizando como bacteria el *c. acetobutylicum*, de trato de validar los parámetros con otros resultados de datos experimentales obtenido con el mismo sustrato (glucosa) y la misma concentración inicial. Pero los datos suministrados para este TFM, son un resultado experimental por cada concentración inicial de sustrato: 80, 60 y 30 g/L con glucosa, respectivamente. Por tanto, se validó los parámetros estimados con los datos experimentales donde varía solo la concentración inicial de sustrato: 30 g/L y 60 g/L.

A continuación, en la Tabla 6 se presenta los resultados obtenidos al calcular las diferentes variables con el Modelo II, las diferencias existentes entre los valores calculados y los resultados experimentales (Jcosto individuales y general), para cada concentración inicial de sustrato.

Tabla 6. Resultado de las diferentes funciones objetivo (Jcosto) de las variables calculadas respecto a los datos experimentales, utilizando para ello el Modelo II con los parámetros estimados.

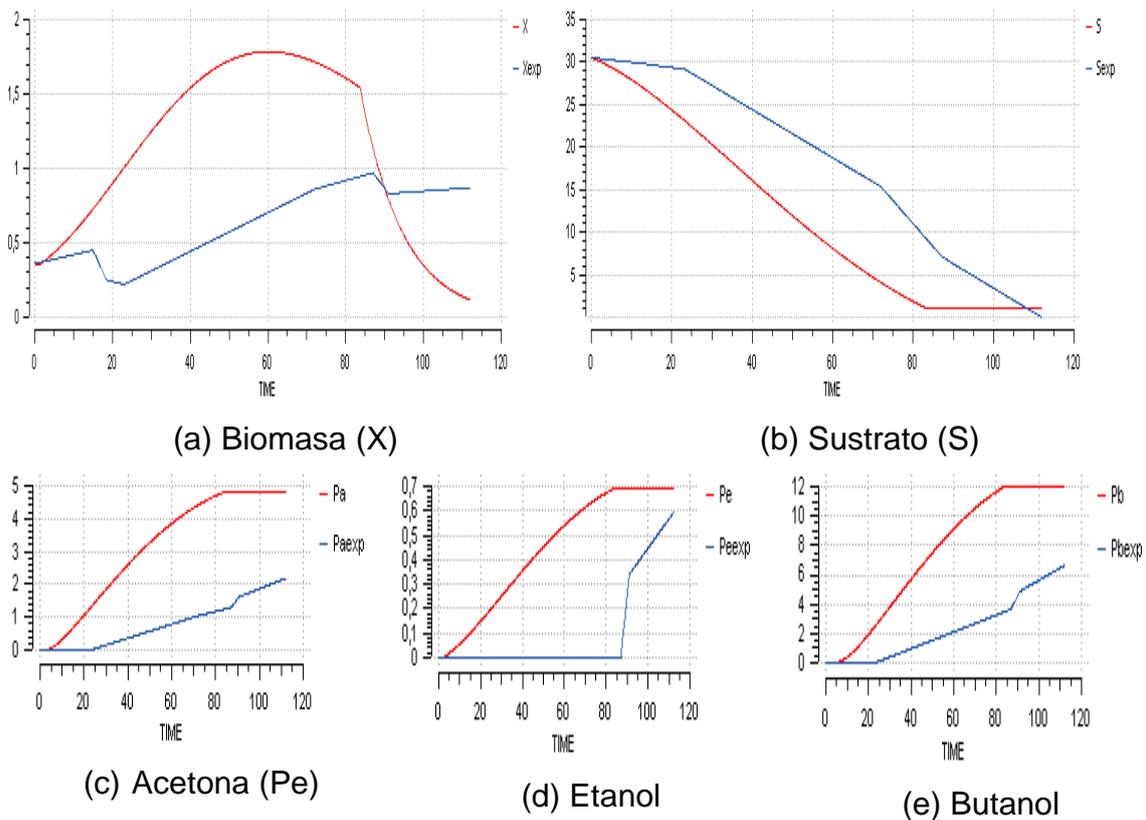
J costo de las diferentes variables	Concentraciones iniciales de glucosa (Si) (g/L)		
	30	60	80
Sustrato (S)	0.11	0.29	0.65
Biomasa (X)	0.86	0.07	1.11
Acetona(producto, Pa)	4.90	0.28	0.52
Etanol (producto, Pe)	4.08	0.68	0.63
Butanol (producto, Pb)	3.74	0.13	1.36
J costo general	17.25	12.51	4.27

En dicha tabla, existe poca diferencia en la estimación del valor de las concentraciones para la concentración inicial de 80 g/L en glucosa, y es debido a los datos experimentales con que se estimó los parámetros del Modelo II. En donde se aprecia una diferencia bastante alta es en el cálculo de la

concentración de los productos para una concentración inicial de sustrato de 30 g/L ($J_{\text{costo general}}=17,25$).

Mediante la introducción de inhibición por sustrato, la inhibición del producto de butanol, la activación de butirato y teniendo en cuenta el cese de reacciones metabólicas en el caso de insuficiencia de energía después de agotamiento de la glucosa, el Modelo II un resultado de $J_{\text{costo general}}$ (mínimo error) es de 4-12, entre los datos experimentales y los calculados en el simulador.

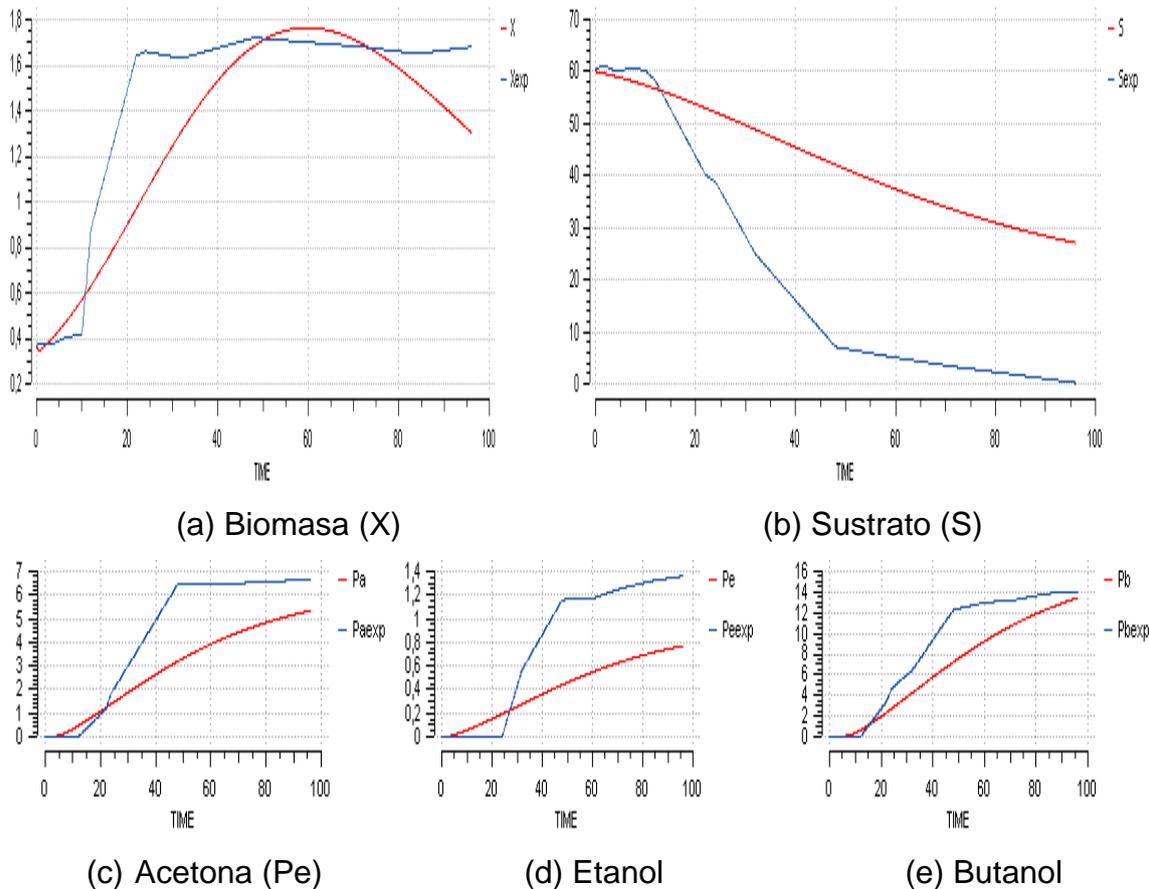
A continuación se muestra en la Gráfica 11, como se observa la diferencia existente entre las concentraciones de las distintas variables calculadas con el modelo II (línea azul) y los datos experimentales (línea roja), para una concentración inicial de glucosa a 30 g/L.



Gráfica 11. Comparación de las concentraciones calculadas con los parámetros estimados del Modelo II a una concentración inicial de 30 g/L de Glucosa (*c. acetobutylicum*) y los datos experimentales a la misma concentración.

Se observa, notablemente la diferencia existente en la gráfica de los productos: butanol, etanol y acetona, que de alguna manera se ve influenciado porque la biomasa se está calculando con un comportamiento distinto al arrojado experimentalmente.

En la gráfica siguiente (Gráfica 12), donde se aprecia los resultados de cálculo utilizando como concentración inicial de sustrato de 60 g/L, se observa que el resultado experimental es diferente (línea azul) en comparación al caso anterior (sustrato inicial de 30 g/L), y no existe mucha diferencia en el cálculo de la concentración de biomasa, pero si para la concentración del sustrato, que igualmente tienen influencia en el cálculo de las concentraciones de los productos.



Gráfica 12. Comparación de las concentraciones calculadas con los parámetros estimados del Modelo II a una concentración inicial de 60 g/L de Glucosa (*c. acetobutylicum*) y los datos experimentales a la misma concentración.

Debido a los resultados obtenidos se debe considerar validar a futuro, mejor los parámetros estimados con datos experimentales con la misma concentración inicial de glucosa con la que se realizaron los cálculos de optimización de los parámetros del Modelo II. Sin embargo, los resultados obtenidos con el Modelo II de las diferentes concentraciones de los productos se consideran aceptables dentro del rango de exactitud con los resultados de las concentraciones de los productos calculados con los datos experimentales.

CAPITULO V. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BUTANOL

A continuación, en este capítulo se describe la optimización que se realizó para mejorar la producción de butanol en la fermentación ABE para el sistema planteado en este trabajo.

Para realizar este cálculo se determinó como función de costo o función objetivo el cálculo de la concentración de butanol (Pb) al final del batch, y se utilizó como modelo matemático, el Modelo II con los parámetros estimados tal como se describió en capítulos anteriores. En la Tabla 7, se observa como la concentración de Pb obtenida es igual para los casos de 60 o 80 g/L de glucosa inicial, y en el caso de 30 g/L la concentración es menor.

Tabla 7. Resultado de la optimización de la concentración final de butanol (Pb) para diferentes concentraciones iniciales de sustrato (Si).

Concentración inicial de sustrato, Si (g/L)	30	60	80
Concentración de butanol, Pb (g/L)	11,77	16.35	16,38

En función de estos resultados, el mejor sistema para obtener un mayor rendimiento de butanol (16 g/L) es con una concentración inicial de glucosa del 60 g/L. Sin embargo, debido a la diferencia existente en obtener entre 11 g/L a 16 g/L de butanol, respecto a la concentración inicial, se recomienda manejar una concentración inicial de 30 g/L de glucosa por el bajo consumo de sustrato, para una concentración final similar si se manejara inicialmente 60 u 80 g/L de glucosa, sin contar el hecho que se ahorra en tiempo, debido a que el proceso culmina más rápido que con mayor cantidad de concentración inicial de sustrato.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados en el presente trabajo final de master (TFM), se presentan las conclusiones más resaltantes, en la producción de butanol de la fermentación ABE:

1. El modelo matemático del sistema por vía macromolecular (Modelo I), no representa el modelado del sistema de fermentación ABE, porque no considera la inhibición del sustrato en la concentración de los productos, ni tampoco la inhibición que produce la concentración de butanol en el sistema.
2. El modelo matemático por la vía metabólica (Modelo II) propuesto, modela el comportamiento dinámico de la fermentación ABE del sistema propuesto.
3. El modelado de las rutas metabólicas (Modelo II) es útil para el análisis del sistema y la optimización de los procesos de fermentación.
4. El Modelo II, está sujeto a ser usado para experimentos fermentativo ABE que maneje como bacteria el *c. acetobutylicum* y como sustrato la glucosa.
5. Las estimaciones de los parámetros del Modelo II ajustados al sistema propuesto de Fermentación ABE, son los que se presentan en la tabla 5.
6. Mediante la introducción de inhibición por sustrato, la inhibición del producto de butanol, la activación de butirato y teniendo en cuenta el cese de reacciones metabólicas en el caso de insuficiencia de energía después de agotamiento de la glucosa, el Modelo II presenta un resultado de Jcosto general entre 4-12.
7. La mejor optimización de la concentración de butanol que se puede obtener es de 16 g/L para 60 g/L de concentración inicial de glucosa.

CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aros N., Cifuentes M. y Mardones J. (2011), “*Modelación, simulación y control de procesos de fermentación*”. Revista chilena de ingeniería, vol. 19 No 2, 2011, pp. 210-218.
- Gómez E. y Prada C. (2007). “*Optimización dinámica en ecosimpro[®] aplicación a la estimación de parámetros y validación de modelos*”. Universidad de Valladolid.
- Jaramillo J. y Cardona C. (2010). “*Análisis de la producción de biobutanol en la fermentación acetobutilica con clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4 ATCC13564*”. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. Carrera 27 N.º 64-60.
- Jones, D.T. y Woods, D.R. (1986). “*Acetone–butanol fermentation revisited*”. Microbiol. Rev. 50, 484–524.
- Jorrín A., García D., Prada C. y Cristea S. (2007). “*Asistente de optimización y linealización para la herramienta de modelado y simulación ecosimpro*”. Universidad de Valladolid.
- Pauline, Doran (1998). “*Principios de ingeniería de los bioprocesos*”. Edición Acribia S.A. Saragoza España
- Ribas M, Hurtado R. y Garrido N.(2011). “*Metodología para la modelación matemática de procesos de fermentación alcohólica*”. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. ISSN (Versión impresa): 0138-6204. Cuba
- Ribas M., Hurtado R., Garrido N., Domenech F., Sabadí R. (2011). “*Metodología para la modelación matemática de procesos. Caso de estudio, fermentación alcohólica*”. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, La Habana, Cuba
- Setlhaku M., Brunberg S., Villa E., Wichmann R. (2012). “*Improvement in the bioreactor specific productivity by coupling continuous reactor with repeated fed-batch reactor for acetone–butanol–ethanol production*”.

Laboratory of Biochemical Engineering, Department of Biochemical and Chemical Engineering, TU Dortmund, Emil-Figge-Strasse. 66, Dortmund 44227, Germany.

- Shinto H., Tashiro Y., Yamashita M. y otros (2007). "*Kinetic modeling and sensitivity analysis of acetone–butanol–ethanol production*". Journal of Biotechnology 131 (2007) 45–56.
- Trejos V., Alzate J. y Gomez M. (2008), "*Descripción matemática y análisis de estabilidad de procesos fermentativos*". Universidad Nacional de Colombia.
- Wang L. y Chen H. (2010). "*Acetone-butanol-ethanol Fermentation and Isoflavone Extraction Using Kudzu Roots*". Biotechnology and Bioprocess Engineering 16: 739-745 (2011). DOI 10.1007/s12257-010-0347-x.
- Xiaoping Yangt y George T. Tsao (1994). "*Modelación Matemática de inhibición cinética en acetona-butanol fermentación por el Clostridium acetobutylicum*". Biotechnol. Prog., IO, 532-538

CAPÍTULO VII. ANEXOS

Anexo 1.

```
USE MATH
COMPONENT modeloinicial
----Glucosa 80 g/L. C.A.
DATA
REAL Si=82.79      "Concentración de Sustrato a la entrada (g/L)"
REAL Xi=0.36       "Concentración de biomasa a la entrada(g/L)"
REAL Pia=0         "Concentración de acetona(producto) a la entrada(g/L)"
REAL Pib=0         "Concentración de butanol(producto) a la entrada(g/L)"
REAL Pie=0         "Concentración de etanol(producto) a la entrada(g/L)"

REAL Mumax = 0.1864 "Velocidad de crecimiento máxima para la C. acetobutylicum(h-1)"
REAL Km = 0.979     "Constante cinética de velocidad correspondiente C. acetobutylicum (g/L)"
REAL Kd = 0.1524    "Velocidad específica de muerte (h-1)"

-- Los rendimientos finales, se colocan los experimentales como paráida
REAL Yxs=0.22      "Rendimiento de Gramos de biomasa / gramos de sustrato (g/g)"
REAL Ypax=0.5      "Rendimiento de Gramos de acetona / gramos de biomasa (g/g)"
REAL Ypxb=1.38     "Rendimiento de Gramos de butano / gramos de biomasa (g/g)"
REAL Ypax=0.09     "Rendimiento de Gramos de etanol / gramos de biomasa (g/g)"
REAL timuestra[15]={0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164,200}

----datos experimental del sustrato en g/L
TABLE ID tabla_Sexp =({ 0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164}, { 82.79,81.89,77.86,77.87,76.79,64
--datos experimental de la biomasa en g/L
TABLE ID tabla_Xexp =({ 0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164}, { 0.36,0.38,0.57,0.66,0.71,1.12,1.1
--datos experimental de los productos en g/L
TABLE ID tabla_Paexp =({ 0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164}, { 0.00,0.00,0.00,0.48,1.11,2.20,3
TABLE ID tabla_Peexp =({ 0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164}, { 0.00,0.00,0.00,0.00,0.00,0.53,0
TABLE ID tabla_Pbexp =({ 0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164}, { 0.00,0.00,1.59,2.36,3.78,6.89,8

-- Coeficiente que activa la función de coste
REAL coef[5] = 1

DECLS

REAL S      "Concentración de Sustrato a la salida (g/L)"
REAL X      "Concentración de biomasa a la salida (g/L)"
REAL Pa     "Concentración de acetona a la salida (g/L)"
REAL Pe     "Concentración de etanol a la salida (g/L)"
REAL Pb     "Concentración de butanol a la salida (g/L)"
REAL Mu     "Velocidad de crecimiento microbiano por modelo Contain(h-1)"

--- Datos para la optimización
DISCR REAL Jcosto "Función de costo general para la optimización"
DISCR REAL JXexp "Función de costo del sustrato experimental para la optimización"
DISCR REAL JPaxp "Función de costo de la biomasa experimental para la optimización"
DISCR REAL JPaxb "Función de costo del producto-acetona experimental para la optimización"
DISCR REAL JPeexp "Función de costo del producto-etanol experimental para la optimización"
DISCR REAL JPbexp "Función de costo del producto-butanol experimental para la optimización"

INTEGER k
BOOLEAN sample

---Datos experimentales
REAL Sexp
REAL Xexp
REAL Paexp
REAL Peexp
REAL Pbexp

INIT
S=Xi      "--Concentración de Sustrato a la salida (g/L)"
X=Xi      "--Concentración de biomasa a la salida (g/L)"
Pa=Pia    "--Concentración de acetona a la salida (g/L)"
Pe=Pie    "--Concentración de etanol a la salida (g/L)"
Pb=Pib    "--Concentración de butanol a la salida (g/L)"
k=1
Jcosto = 0
sample = TRUE

DISCRETE
WHEN (sample == TRUE) THEN
-- Subcálculos del índice de coste
JXexp += coef[1]*(S - Sexp)**2
JPaxp += coef[2]*((X - Xexp)**2
JPaxb += coef[3]*((Pa - Paexp)**2
JPeexp += coef[4]*((Pe - Peexp)**2
JPbexp += coef[5]*((Pb - Pbexp)**2

--- Índice de coste general
Jcosto = JXexp + JPaxp + JPaxb + JPeexp + JPbexp
sample = FALSE
sample = TRUE AFTER (timuestra[k+1]-timuestra[k])
k = k+1
END WHEN

CONTINUOS
--- Modelo cinético
Mu=Mumax*S/(X*Km+S)
--Balance de Masa
--Biomasa
X'=(Mu-Kd)*X
--Sustrato
S'=-Mu*X/Yxs
--Productos:
--Acetona
Pa'=-Mu*X*Ypax
--Butanol
Pb'=-Mu*X*Ypxb
--Etanol
Pe'=-Mu*X*Ypax

---Datos experimentales, tablas
Sexp = linearInterpID(tabla_Sexp,TIME)
Xexp = linearInterpID(tabla_Xexp,TIME)
Paexp = linearInterpID(tabla_Paexp,TIME)
Peexp = linearInterpID(tabla_Peexp,TIME)
Pbexp = linearInterpID(tabla_Pbexp,TIME)

END COMPONENT
```

Figura 11. Imagen del código utilizado en Ecosimpro para optimizar el proceso con el modelo matemático por la vía macromolecular.

Anexo 2.

```

USE MATH
COMPONENTY ModeloCinetico
DATA
---Glucosa, C.A., 80 g/L
--Datos iniciales
REAL Si=82.79 "Concentración de Sustrato a la entrada (g/L)"
REAL Xi=0.36 "Concentración de biomasa a la entrada(g/L)"
REAL Pia=0 "Concentración de acetona(producto) a la entrada(g/L)"
REAL Pib=0 "Concentración de butanol(producto) a la entrada(g/L)"
REAL Pie=0 "Concentración de etanol(producto) a la entrada(g/L)"
REAL Lactato=0 "Concentración de lactato a la entrada(g/L)"
REAL Acetato=0 "Concentración de acetato a la entrada(g/L)"
REAL Butirato=0 "Concentración de butirato a la entrada(g/L)"
---Constantes del modelo cinetico
--Velocidades de reacción máximas
REAL Vmax1=1.1905 "velocidad de reacción máxima de r1 (h-1)"
REAL Vmax2=40 "velocidad de reacción máxima de r2 (h-1)"
REAL Vmax3=120 "velocidad de reacción máxima de r3 (h-1)"
REAL Vmax4=9 "velocidad de reacción máxima de r4 (h-1)"
REAL Vmax5=9.7 "velocidad de reacción máxima de r5 (h-1)"
REAL Vmax6=180 "velocidad de reacción máxima de r6 (h-1)"
REAL Vmax7=0.3 "velocidad de reacción máxima de r7 (h-1)"
REAL Vmax8=19 "velocidad de reacción máxima de r8 (h-1)"
REAL Vmax9=26.5 "velocidad de reacción máxima de r9 (h-1)"
REAL Vmax10=20 "velocidad de reacción máxima de r10 (h-1)"
REAL Vmax11=10.6917 "velocidad de reacción máxima de r11 (h-1)"
REAL Vmax12=10.9564 "velocidad de reacción máxima de r12 (h-1)"
REAL Vmax14=10 "velocidad de reacción máxima de r14 (h-1)"
REAL Vmax15=80 "velocidad de reacción máxima de r15 (h-1)"
REAL Vmax16=8 "velocidad de reacción máxima de r16 (h-1)"
REAL Vmax17=35 "velocidad de reacción máxima de r17 (h-1)"
REAL Vmax18=100 "velocidad de reacción máxima de r18 (h-1)"
REAL Vmax19=0.5339 "velocidad de reacción máxima de r19 (h-1)"
--Constantes del metabolismo en cada reacción cinetica
REAL Km13=0.1 "Constante de velocidad de reacción en r13 (h-1)"
REAL Km1=51.2368 "Concentración del metabolismo de r1 (g/L)"
REAL Km13=10 "Constante de inhibición por el sustrato en r1 (g/L)"
REAL Km11=30 "Constante de inhibición por inhibidor en r1 (g/L)"
REAL Km112=12 "Constante de inhibición por inhibidor en r12 (g/L)"
REAL Km119=16 "Constante de inhibición por inhibidor en r19 (g/L)"
REAL Km17=2.2 "Constante de activación para el activador en r17 (g/L)"
REAL Km19=0 "Constante de activación para el activador en r19 (g/L)"
REAL Km2=10 "concentración del metabolismo de r2 (g/L)"
REAL Km3=26.5 "concentración del metabolismo de r3 (g/L)"
REAL Km4=177 "concentración del metabolismo de r4 (g/L)"
REAL Km5=0.7 "concentración del metabolismo de r5 (g/L)"
REAL Km6=1.5 "concentración del metabolismo de r6 (g/L)"
REAL Km7=50 "concentración del metabolismo de r7 (g/L)"
REAL Km9=31 "concentración del metabolismo de r9 (g/L)"
REAL Km10=1 "concentración del metabolismo de r10 (g/L)"
REAL Km11=18.8458 "concentración del metabolismo de r11 (g/L)"
REAL Km12=1.29 "concentración del metabolismo de r12 (g/L)"
REAL Km14=5.2 "concentración del metabolismo de r14 (g/L)"
REAL Km16=12.6 "concentración del metabolismo de r16 (g/L)"
REAL Km17=4.9 "concentración del metabolismo de r17 (g/L)"
REAL Km18=6.1 "concentración del metabolismo de r18 (g/L)"
REAL Km19=2 "concentración del metabolismo de r19 (g/L)"
REAL Km20=40 "concentración del metabolismo de r20 (g/L)"
REAL Km20b=70 "concentración del metabolismo de r20 B (g/L)"
REAL Km15a=15 "concentración del metabolismo de r15 A (g/L)"
REAL Km15b=50 "concentración del metabolismo de r15 B (g/L)"
--DATOS EXPERIMENTALES
REAL t[muestra[15]]=(0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164,200)
---datos experimental del sustrato en g/L
TABLE 1D tabla_Sexp =({ 0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164}, { 82.79,81.89,77.86,77.07,76.79,64.60,59.99,57.72,
REAL Promedio_Sexp=55.42
---datos experimental de la biomasa en g/L
TABLE 1D tabla_Xexp =({ 0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164}, { 0.36,0.38,0.57,0.66,0.71,1.12,1.88,1.85,1.86,1.5'
TABLE 1D tabla_Pexp =({ 0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164}, { 0.00,0.00,0.00,0.00,0.00,0.53,0.68,0.61,0.78,
REAL Promedio_Pexp=0.5
TABLE 1D tabla_LactatoEXP =({ 0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164}, { 0.00,0.00,0.00,0.00,0.37,0.46,0.56,0.56,
REAL Promedio_LactatoEXP=0.14
TABLE 1D tabla_AcetatoEXP =({ 0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164}, {0.00,0.00,1.20,1.35,1.17,0.57,0.59,0.57,0.
REAL Promedio_AcetatoEXP=0.64
TABLE 1D tabla_ButiratoEXP =({ 0,6,20,24,28,44,48,53,69,72,80,96,140,164}, {0.00,0.59,2.69,1.32,0.47,0.00,0.00,0.00,
REAL Promedio_ButiratoEXP=0.36
-- Coeficiente que activa la función de coste en la optimización
REAL coef[8] = 1
DECLS
REAL S "Concentración de Sustrato a la salida (g/L)"
REAL X "Concentración de biomasa a la salida (g/L)"
REAL Pa "Concentración de acetona a la salida (g/L)"
REAL Pe "Concentración de etanol a la salida (g/L)"
REAL Pb "Concentración de butanol a la salida (g/L)"
REAL Lactato "Concentración del ácido láctico a la salida (g/L)"
REAL Acetato "Concentración del ácido acético a la salida (g/L)"

```

Figura 12. Imagen del código utilizado en Ecosimpro para optimizar el proceso con el modelo matemático por la vía metabólica.

```

REAL Butirato      "Concentración del ácido butírico a la salida (g/L)"
REAL G3P          "Concentración de 3-fosfato de gliceraldehído (g/L)"
REAL F6P          "Concentración de 6-fosfato de fructosa (g/L)"
REAL Piruvato     "Concentración de piruvato (g/L)"
REAL ACoA        "Concentración de la acetil-CoA (g/L)"
REAL BCoA        "Concentración de butiril-CoA reductasa (g/L)"
REAL AACoA       "Concentración de acetosacetal-CoA (g/L)"
REAL AA          "Concentración de acetosacetato (g/L)"

--Velocidades de reacción
REAL r1
REAL r2
REAL r3
REAL r4
REAL r5
REAL r6
REAL r7
REAL r8
REAL r9
REAL r10
REAL r11
REAL r12
REAL r13
REAL r14
REAL r15
REAL r16
REAL r17
REAL r18
---- Datos para la optimización
DISCR REAL Jcosto      "Función de costo general para la optimización"
DISCR REAL JSexp     "Función de costo del sustrato experimental para la optimización"
DISCR REAL JXexp     "Función de costo de la biomasa experimental para la optimización"
DISCR REAL JFaexp    "Función de costo del producto-acetona experimental para la optimización"
DISCR REAL JFeexp    "Función de costo del producto-etanol experimental para la optimización"
DISCR REAL JFbexp    "Función de costo del producto-butanol experimental para la optimización"
DISCR REAL JLactatoEXP "Función de costo del Lactato experimental para la optimización"
DISCR REAL JAcetatoEXP "Función de costo del Acetato experimental para la optimización"
DISCR REAL JButiratoEXP "Función de costo del Butirato experimental para la optimización"
INTEGER k
BOOLEAN sample

---Datos experimentales
REAL Sexp
REAL Xexp
REAL Faexp
REAL Feexp
REAL Fbexp
REAL LactatoEXP
REAL AcetatoEXP
REAL ButiratoEXP
REAL F      "Factor de conmutación de mecanismo de encendido-apagado (adim)"

INIT
S=S1      "--Concentración de Sustrato a la salida (g/L)"
X=X1      "--Concentración de biomasa a la salida (g/L)"
Fa=Fa1    "--Concentración de acetona a la salida (g/L)"
Fe=Fe1    "--Concentración de etanol a la salida (g/L)"
Fb=Fb1    "--Concentración de butanol a la salida (g/L)"
--Otras concentraciones
Lactato=Lactato1
Acetato=Acetato1
Butirato=Butirato1
G3P=0
F6P=0
Piruvato=0
ACoA=0
BCoA=0
AACoA=0
AA=0

--Valores iniciales para la optimización
k=1
Jcosto = 0
sample = TRUE

DISCRETE
WHEN (sample == TRUE) THEN
-- Subtítulos del índice de coste
JXexp    += coef[1]*((S - Sexp)/Promedio_Sexp)**2
JXexp    += coef[2]*((X - Xexp)/Promedio_Xexp)**2
JFaexp   += coef[3]*((Fa - Faexp)/Promedio_Faexp)**2
JFeexp   += coef[4]*((Fe - Feexp)/Promedio_Feexp)**2
JFbexp   += coef[5]*((Fb - Fbexp)/Promedio_Fbexp)**2
JLactatoEXP += coef[6]*((Lactato - LactatoEXP)/Promedio_LactatoEXP)**2
JAcetatoEXP += coef[7]*((Acetato - AcetatoEXP)/Promedio_AcetatoEXP)**2
JButiratoEXP += coef[8]*((Butirato - ButiratoEXP)/Promedio_ButiratoEXP)**2

--- Índice de coste general
Jcosto = JXexp+ JFbexp + JFaexp + JFeexp
----+ JSexp + JLactatoEXP + JAcetatoEXP + JButiratoEXP

sample = FALSE
sample = TRUE AFTER (timemuestr[k+1]-timemuestr[k])
k = k+1

END WHEN

CONTINUOUS
-- Ecuaciones cinéticas
--r1=Vmax1*X*S^3/(Km1+S)
r1=Vmax1*X*S^3/(Km1*(1+S/KiS1)+S*(1+Pb/Ki11))
r2=Vmax2*F6P*X^E/(Km2+F6P)
r3=Vmax3*G3P*X^E/(Km3+G3P)
r4=Vmax4*Lactato*X^E/(Km4+Lactato)
r5=Vmax5*Piruvato*X^E/(Km5+Piruvato)
r6=Vmax6*Piruvato*X^E/(Km6+Piruvato)
r7=Vmax7*Acetato*X^E/(Km7+Acetato)
r8=Vmax8*(1/(1+(Km8a/Acetato)))*(1/(1+(Km8b/AACoA)))
r9=Vmax9*ACoA*X^E/(Km9+ACoA)
r10=Vmax10*ACoA*X/(Km10+ACoA)
r11=Vmax11*ACoA*X^E/(Km11+ACoA)
r12=Vmax12*ACoA*X/(Km12*(1+Pb/Ki112))+ACoA*(1+Pb/Ki112)
r13=X*r13
r14=Vmax14*AACoA*X^E/(Km14+AACoA)
r15=Vmax15*(1/(1+(Km15a/Butirato)))*(1/(1+(Km15b/AACoA)))*X
r16=Vmax16*AA*X/(Km16+AA)
--r17=Vmax17*Butirato*X^E/(Km17+Butirato)
r17=Vmax17*Butirato*X^E/(Km17*(1+Ka17/Butirato)+Butirato)
r18=Vmax18*BCoA*X^E/(Km18+BCoA)

```

Figura 12. Imagen del código utilizado en Ecosimpro para optimizar el proceso con el modelo matemático por la vía metabólica (continuación).

```

--r19=Vmax19*BCoA*X*F/(Km19+BCoA)
r19=Vmax19*X*BCoA*F/(Km19*(1+Ka19/Butirato)+BCoA*(1+Pb/Ki119))

---- Concentraciones
S'=-r1
X'=r12-r13
Pb'=r19
Fe'=r11
Pa'=r16
Lactato'=r3-r4
Acetato'=r9-r7-r8
Butirato'=r18-r15-r17

GSP'=r2-r3
FEP'=r1-r2
Picuvato'=r3+r4-r5-r6
ACoA'=r6+r7+r8-r9-r10-r11-r12
BCoA'=r14+r15+r17-r18-r19
AACoA'=r10-r8-r14-r15
AA'=r8+r15-r16

--Datos experimentales, tablas
Sexp = linearInterpID(tabla_Sexp,TIME)
Xexp = linearInterpID(tabla_Xexp,TIME)
Paexp = linearInterpID(tabla_Paexp,TIME)
Feexp = linearInterpID(tabla_Feexp,TIME)
Pbexp = linearInterpID(tabla_Pbexp,TIME)
LactatoEXP = linearInterpID(tabla_LactatoEXP,TIME)
AcetatoEXP = linearInterpID(tabla_AcetatoEXP,TIME)
ButiratoEXP = linearInterpID(tabla_ButiratoEXP,TIME)

F = IF (S <= 1) 0
ELSE 1
END COMPONENT

```

Figura 12. Imagen del código utilizado en Ecosimpro para optimizar el proceso con el modelo matemático por la vía metabólica (continuación).