

**Determinación de condiciones de máxima productividad de biocombustibles por
Clostridium beijerinckii en cultivo continuo usando análisis de bifurcación.**

**Determination of maximum productivity conditions for biofuel production by *Clostridium
beijerinckii* in continuous culture using bifurcation analysis.**

Velázquez-Sánchez², H. I., López-Pérez, P. A¹., Aguilar-López, R^{2*}.

¹ Escuela Superior de Apan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Apan-Calpulalpan, Km.8., Chimalpa Tlalayote s/n Colonia Chimalpa, Apan, 43900 Hgo. México.

²Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, CP. 07360, Ciudad de México, Distrito Federal.

*e-mail: raguilar@cinvestav.mx

Resumen

En el presente trabajo se hace una propuesta de la aplicabilidad del análisis dinámico de sistemas en el campo de las fuentes alternativas de energía, particularmente en el área de los biocombustibles. Se realizaron simulaciones de un sistema de fermentación en continuo de *Clostridium beijerinckii* para la producción de biocombustibles ABE (acetona, butanol y etanol) tomando como base un modelo cinético propuesto por el grupo de trabajo. Dicho modelo se aplicó al análisis de un sistema de fermentación reportado en literatura en el cual la productividad del sistema a 45 g/L de sustrato, 2 g/L de butirato como precursor metabólico y tasa de dilución de 0.025 h⁻¹ fue de 1.25 g/L de ABE. Mediante un análisis de bifurcación considerando a la tasa de dilución (D), concentración de sustrato y de un precursor metabólico en la corriente de alimentación al reactor como parámetros de estudio se establecieron condiciones que permiten obtener una producción teórica de biocombustibles máxima, equivalente a 2 g/L de ABE a D = 0.03 h⁻¹, glucosa = 75 g/L y butirato = 1.5 g/L respectivamente, donde las concentraciones propuestas representan el límite máximo dentro del cual el sistema puede consumir el sustrato en su totalidad sin promover la acumulación del mismo dentro del reactor, demostrando ser estables con respecto al tiempo en base a resultados de análisis de valores propios. También se observó que la operación del reactor a tasas de dilución menores presenta multiplicidad de estados estacionarios, los cuales pueden impactar de manera negativa en la productividad del sistema. Este tipo de estudios proveen herramientas informáticas de análisis aplicadas a sistemas de producción que permiten generar condiciones de operación que ayuden a abatir costos y elevar la eficiencia del sistema en cuestión.

Palabras clave: Bifurcación, biocombustibles, *Clostridium*, continuo, productividad.

Abstract

In this paper the authors showcase a proposal to the applicability of system dynamic analysis in the field of alternative energy sources, particularly in the area of biofuels. Simulations of a continuous fermentation system of *Clostridium beijerinckii* for ABE (acetone, butanol and ethanol) biofuel production based on a kinetic model proposed by the research group were conducted. This model was applied to the analysis of a fermentation system reported in literature in which the productivity of a system working at a glucose concentration equal to 45 g/L and 2g/L of butyrate as metabolic precursor on a dilution rate of 0.025 h^{-1} was 1.25 g/L of ABE. Applying a bifurcation analysis considering the dilution rate (D) and substrate and a metabolic precursor concentration in the feed stream to the reactor as the target parameters there were established conditions which allow a maximum theoretical yield of biofuels, equivalent to 2 g/L of ABE at $D = 0.03 \text{ h}^{-1}$, glucose = 75 g/L and butyrate = 1.5 g/L respectively, where these concentrations represent the maximum range within which the system can consume the substrate in its entirety without promoting its accumulation within the reactor, also proving to be stable over time based on the results of eigenvalue studies. It was also found that the operation of the reactor at lower dilution rates can lead to multiple steady states, which may negatively impact the productivity of the system. Such studies provide analysis tools applied to production systems that can generate operating conditions to help reduce costs and increase the efficiency of said system.

Keywords: Bifurcation, biofuels, *Clostridium*, continuous, productivity.

Introducción

El estudio de fuentes alternativas de energía ha sido una constante dentro de la primera década del Siglo XXI, esto debido a la inminente necesidad de encontrar combustibles que puedan satisfacer la demanda energética global una vez que las reservas petroleras mundiales se agoten (Demirbas, 2009).

Dentro de estas fuentes se han destacado los biocombustibles, los cuales pueden ser definidos como cualquier sustancia o producto derivado del metabolismo de los seres vivos que pueda ser aprovechado como carburante (Naik *et al.*, 2010). En este grupo podemos encontrar a los denominados de primera generación, que son obtenidos a partir de procesos fermentativos clásicos y que incluyen como un conocido ejemplo al etanol; sin embargo y a pesar de que se cuenta con procesos industriales de producción de etanol a nivel industrial su alta demanda de azúcares simples principalmente obtenidos a partir de cultivos utilizados históricamente como fuente de alimento pueden repercutir negativamente en el ámbito social dentro de los países donde se producen (Demirbas, 2009). Sin mencionar que el etanol ha demostrado ser incapaz de sustituir al 100 % el uso de combustibles fósiles dentro de los motores de combustión interna sin que estos sufran modificaciones estructurales importantes.

Con la introducción de nuevas propuestas de obtención de biocombustibles se ha realizado investigación pertinente a los llamados de segunda generación, los cuales pretenden utilizar fuentes de carbono provenientes de residuos agroindustriales o silvícolas para su transformación en una amplia gama de compuestos que puedan ser aprovechados como sustitutos viables en la infraestructura ya existente. Uno de los compuestos que surge como gran candidato para cubrir

esas demandas es el butanol, el cual presenta propiedades fisicoquímicas muy similares a las de gasolinas empleadas actualmente (Lee *et al.*, 2008).

La fermentación es denominada ABE por las siglas de sus principales productos, que son acetona, butanol y etanol, y fue descrita como la ruta bioquímica principal del género bacteriano *Clostridium*, que está compuesto de bacilos Gram-positivos nativos de ecosistemas terrestres y abundantes en el suelo. De manera tradicional el butanol se ha producido en cultivos en lote, donde se alimenta generalmente entre 50 y 60 g/L de sustrato en forma de melaza o hidrolizados de almidón. El medio se esteriliza por el método de calor húmedo a 121 °C y una vez que baja su temperatura hasta los 36 °C este se inocula con bacterias de la especie *Clostridium acetobutylicum* y se da pie a la fermentación (Zheng *et. al.*, 2009). Aunado a su versatilidad se suma la mayor resistencia natural que presentan muchas de sus cepas frente a su exposición a solventes, ya que pueden soportar fermentaciones con un contenido de butanol superior a los 15 g/L y llegando a límites superiores de 21 g/L (Ezeji, *et. al.*, 2007). Este proceso dura en promedio 72 horas, dentro de las cuales se obtienen comúnmente entre 20 o 25 g/L de compuestos ABE, esto se debe a que los microorganismos son altamente sensibles a la presencia del butanol en el medio, ya que este tiene la capacidad de desestabilizar la membrana y pared de las bacterias y con ello afecta la viabilidad de las mismas a una concentración mayor a los 10 g/L (Jones y Woods, 1986). Por ello es muy difícil obtener rendimientos de producción de solventes superiores a los 0.3 g/g o productividades que superen los 0.5 g/L h (Qureshi y Ezeji, 2008).

Una especie que ha despertado interés en los últimos años es *C. beijerinckii*, que no sólo tiene la capacidad de fermentar glucosa, sino también una amplia gama de poli y disacáridos, por lo que

se puede utilizar en procesos para la obtención de biocombustibles cuyo objetivo es utilizar una gama más amplia de fuentes de carbono como los residuos agroindustriales (Ezeji *et al.*, 2007).

Una de las primeras aproximaciones al establecimiento de estrategias de diseño de bioprocesos es la del modelado cinético, en el cual se plantea un juego de ecuaciones matemáticas que tienen como objeto tratar de reproducir el comportamiento fenomenológico de los sistemas biológicos sometidos a una amplia gama de condiciones de operación Tabla 1.

Tabla 1. Compilación de los trabajos más importantes sobre modelado cinético del género *Clostridium*.

Autores	Aportación
Schoutens, <i>et. al.</i> , 1986	Modelo cinético para un sistema en continuo de células inmovilizadas de <i>C. beijerinckii</i> . Incluye término de inhibición lineal por butanol.
Yerushalmi, <i>et. al.</i> , 1988	Plantean para el balance de materia en un sistema de <i>C. acetobutylicum</i> la inferencia de parámetros fisiológicos como la permeabilidad de membrana y número de sitios de transporte de materia.
Xiaoping y Sao, 1994	Incorporan a su término cinético una ecuación de Monod con términos de inhibición por producto y por cambio en el pH.
Shinto, <i>et. al.</i> , 2007	Proponen un modelo cinético estructurado, el cual es aplicado para <i>C. acetobutylicum</i> con glucosa como fuente de carbono. Se utiliza un enfoque bioquímico al modelar la velocidad de reacción enzimática de cada uno de los nodos metabólicos usando estructuras tipo Michaelis-Menten.
Napoli, <i>et. al.</i> , 2011	Modelo para la fase acidogénica de la fermentación por <i>C. acetobutylicum</i> . Consideran el efecto inhibitorio del potencial de iones hidrógeno y la concentración de ácidos y solventes con una ecuación tipo Luong.

No obstante el proceso de simulación tradicional no permite identificar si efectivamente las condiciones que generan los mejores rendimientos en el proceso son realmente alcanzables o si son lo suficientemente robustas para resistir perturbaciones en el transcurso de la fermentación sin sufrir caídas drásticas en dicha productividad (Mayank *et al.*, 2012). Es por ello que se hace necesario recurrir a análisis matemáticos más complejos que puedan reportar si realmente el

proceso es operacionalmente estable o requiere de la aplicación de un sistema de control que minimice la fluctuación de las variables de interés en el mismo. Se puede entender como análisis de bifurcación a la acción de generar todos los valores posibles en estado estacionario de un sistema tomando como referencia un parámetro del mismo sobre el cual se realizará el estudio (Namjoshi *et al.*, 2003). La finalidad de la aplicación de este estudio dentro del análisis dinámico de los procesos de fermentación es encontrar el juego de variables operativas que permitan obtener los mayores rendimientos con el menor costo posible.

Para el desarrollo de este trabajo también es importante definir mediante criterios numéricos si los parámetros de operación resultantes de la estrategia propuesta pueden ser aplicados a los sistemas modelo sin comprometer su desempeño debido a la generación de zonas de trabajo inestables o que representen un escenario de incertidumbre; por tanto se considera que el análisis de valores propios es una herramienta versátil que permite conocer la robustez que ofrece el modelo de la planta en condiciones de estado estacionario, con lo cual se puede discernir entre puntos de equilibrio estables y aquellos que pueden ser más susceptibles a perturbaciones (Aguilar-López *et al.*, 2010).

Es por ello que el objetivo del presente trabajo es explorar el comportamiento dinámico de un modelo cinético para la producción de butanol como biocombustible en base a fermentaciones por bacterias de la especie *Clostridium beijerinckii* y evaluar la aplicabilidad de las técnicas de análisis dinámico antes mencionadas como herramientas para la determinación de regiones operativas de interés industrial en este tipo de sistemas, con la finalidad de aportar una metodología eficaz y económica para su posible optimización.

Métodos experimentales

Caso de estudio

Para evaluar la dinámica del sistema biológico elegido como caso de estudio se recurrió a la realización de simulaciones numéricas del mismo tomando como base un modelo cinético propuesto (Velázquez-Sánchez *et al*, 2013). Dicho modelo cinético se construye empleando el enfoque clásico de balances de materia y consta de 7 ecuaciones diferenciales ordinarias que predicen el comportamiento de la concentración de sustrato, biomasa, butanol, acetona, etanol, butirato y acetato respectivamente. La validación e identificación paramétrica de dicho modelo se realizó considerando un conjunto de datos experimentales, obtenidos de literatura, de fermentaciones en lote a diferentes concentraciones iniciales de sustrato, presentando un índice de correlación global $R^2 = 0.99046$.

Metodología

El modelo cinético se extrapoló a operación en continuo considerando condiciones de operación reportadas por Chang (2010), quien utiliza una concentración de alimentación de sustrato de 45 g/L, un inóculo inicial de 0.25 g/L y 2g/L de butirato como precursor metabólico de la ruta ABE a una tasa de dilución de 0.01 h^{-1} . Dichas condiciones de operación fueron simuladas en el software MATLAB® R2011a, resolviendo el conjunto de ecuaciones diferenciales que componen el modelo cinético elegido por medio de la librería ODESolver.

Con todas las consideraciones anteriormente planteadas se procedió a generar la siguiente batería de ecuaciones diferenciales que comprenden el modelo cinético no estructurado actual:

Expresiones cinéticas:

$$\mu_X = \mu_{maxX} \left(\frac{Sg}{K_{Sg} + Sg} \right) \left(1 - \frac{But}{K_{but}} \right) \quad (1)$$

$$\mu_{But} = \mu_{maxBut} \left(\frac{Sg}{K_{Sg} + Sg} \right) \left(\frac{Sb}{K_{Sb} + Sb} \right) \quad (2)$$

$$\mu_{Sb} = \mu_{maxSb} \left(\frac{Sg}{K_{Sg} + Sg} \right) \quad (3)$$

$$\mu_{Ace} = \mu_{maxAce} \left(\frac{Sb}{K_{Sb} + Sb} \right) \left(\frac{Act}{K_{SAct} + Act} \right) \quad (4)$$

$$\mu_{Et} = \mu_{maxEt} \left(\frac{Sg}{K_{Se} + Sg} \right) \quad (5)$$

Balances de materia:

Concentración de glucosa, g L⁻¹

$$\frac{dSg}{dt} = (D * (Sga - Sg)) - \left(\frac{X \cdot \mu_X}{Y_{\frac{X}{Sg}}} + \frac{But \cdot \mu_b}{Y_{\frac{But}{Sg}}} + \frac{Ace \cdot \mu_{Ace}}{Y_{\frac{Ace}{Sg}}} + \frac{Et \cdot \mu_{Et}}{Y_{\frac{Et}{Sg}}} \right) \quad (6)$$

Concentración de biomasa, g L⁻¹

$$\frac{dX}{dt} = (D * -X) + (\mu_X - Kd)X \quad (7)$$

Concentración de butanol, g L⁻¹

$$\frac{dBut}{dt} = (D * -But) + X \cdot \mu_{But} \left(\frac{Y_{But}}{X} \right) \quad (8)$$

Concentración de butirato, g L⁻¹

$$\frac{dSb}{dt} = (D * (Sba - Sb)) + X \cdot \mu_{Sb} \left(\frac{Y_{Sb}}{X} \right) - \frac{X \cdot \mu_{But} \left(\frac{Y_{But}}{X} \right)}{Y_{But/Sb}} \quad (9)$$

Concentración de acetato, g L⁻¹

$$\frac{dAct}{dt} = (D * -Act) + X \cdot \mu_X \left(\frac{Y_{Act}}{X} \right) \quad (10)$$

Concentración de acetona, g L⁻¹

$$\frac{dAce}{dt} = (D * -Ace) + X \cdot \mu_{Ace} \left(\frac{Y_{Ace}}{X} \right) \quad (11)$$

Concentración de etanol, g L⁻¹

$$\frac{dEt}{dt} = (D * -Et) + X \cdot \mu_{Et} \left(\frac{Y_{Et}}{X} \right) \quad (12)$$

Se debe señalar que el presente modelo hace uso del término de velocidad de dilución (D) con la finalidad de validarlo tanto en cultivos operados por lote, donde el valor de $D = 0$, como en cultivos desarrollados bajo condiciones continuas. El ajuste paramétrico del modelo propuesto se llevó a cabo por el método Simplex y el coeficiente de correlación global fue obtenido por el método de mínimos cuadrados, siendo este último valor calculado como 0.9904 para la operación por lotes. Los parámetros para su simulación son: K_{But} 13.3803 g L⁻¹, K_d 0.0040 h⁻¹, K_{Sb} 0.0296 g L⁻¹, K_{Sbsg} 1.0219 g L⁻¹, K_{Sg} 0.9477 g L⁻¹, μ_{maxAce} 0.0004 h⁻¹, μ_{maxBut} 0.0196 h⁻¹, μ_{maxSb} 0.0058

h^{-1} , μ_{maxX} 0.0270 h^{-1} , $Y_{Ace/Sg}$ 0.2597 g/g, $Y_{But/S b}$ 0.0361 g/g, $Y_{But/S g}$ 0.3352 g/g, $Y_{Et/S g}$ 0.1005 g/g, $Y_{Ace/X}$ 0.0053 g/g, $Y_{Act/X}$ 0.7493 g/g, $Y_{But/X}$ 0.1130 g/g, $Y_{Et/X}$ 2.5189 g/g, $Y_{S b/X}$ 0.4887 g/g, $Y_{X/S g}$ 0.0249 g/g.

Con el modelo ajustado para su uso en sistemas en continuo se realizó un análisis *in silico* utilizando el software MATLAB® R2011a mediante el conjunto de comandos de la plataforma Matcont 5p0 con la finalidad de establecer en primer lugar las condiciones finales del sistema en estado estacionario, mismas que sirven como punto de partida para llevar a cabo el análisis de bifurcación.

Para encontrar las condiciones óptimas de operación del sistema se procedió en primer lugar a ejecutar el estudio de bifurcación tomando como parámetro variable a la tasa de dilución, una vez encontrado el punto de mayor productividad de biocombustibles dentro del barrido de condiciones de equilibrio a las diferentes tasas evaluadas se realizó el mismo análisis considerando ahora como variable de estudio la concentración de sustrato (glucosa) en la corriente de alimentación del reactor para determinar la mínima necesaria para mantener constante la concentración máxima de biocombustibles a la salida del reactor. Finalmente se realizó un tercer estudio donde se mantuvieron constantes la tasa de dilución y la concentración de glucosa en la corriente de alimentación y se propuso a la concentración del precursor metabólico en la corriente de entrada como el nuevo parámetro de bifurcación, con lo cual se pretendió encontrar la cantidad mínima necesaria para estabilizar la producción de biocombustible en su nivel teórico máximo.

Como actividad final se determinó la viabilidad práctica de la aplicación de las condiciones de operación resultantes del estudio presentado en este trabajo se realizó un análisis de valores propios con respecto a la tasa de dilución aplicada al fermentador a valores menores a la tasa de

lavado del mismo para evitar proponer condiciones que requieran de un sistema estricto de control para estabilizar el sistema, lo cual derivaría en el aumento en el costo neto de producción.

Resultados y Discusión

Resumen de resultados

Los resultados de las simulaciones utilizando los parámetros indicados por Chang (2010) se muestran en la Figura 1. Este análisis fue necesario para establecer la magnitud de las variables de estado del sistema en estado estacionario, mismos que sirven como punto de partida para el análisis de bifurcación.

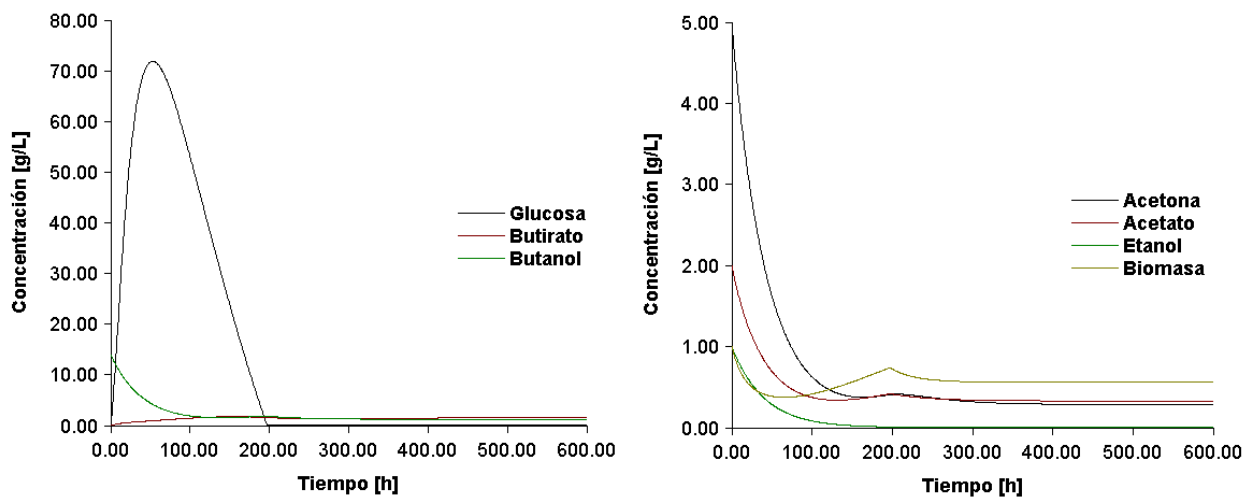


Figura 1. Cinética en continuo de una fermentación de *Clostridium beijerinckii* para la producción de biocombustibles bajo condiciones reportadas por Chang (2010).

La Figura 2 muestra el comportamiento dinámico del sistema dentro de la región de operación acotada entre tasas de dilución mayores a 0 (operación en lote) y menores a 0.0375 aproximadamente, siendo este último valor el correspondiente a la tasa de lavado del reactor.

Es evidente que el uso de condiciones de mínimo flujo de entrada y salida de material al reactor no solo es poco productivo *per se*, sino que también propicia la inestabilidad del mismo al generar un ambiente en el cual hay presencia de multiplicidad de estados estacionarios en 3 de las 7 variables de este, al menos en el intervalo comprendido entre $0 < D < 0.005 \text{ h}^{-1}$.

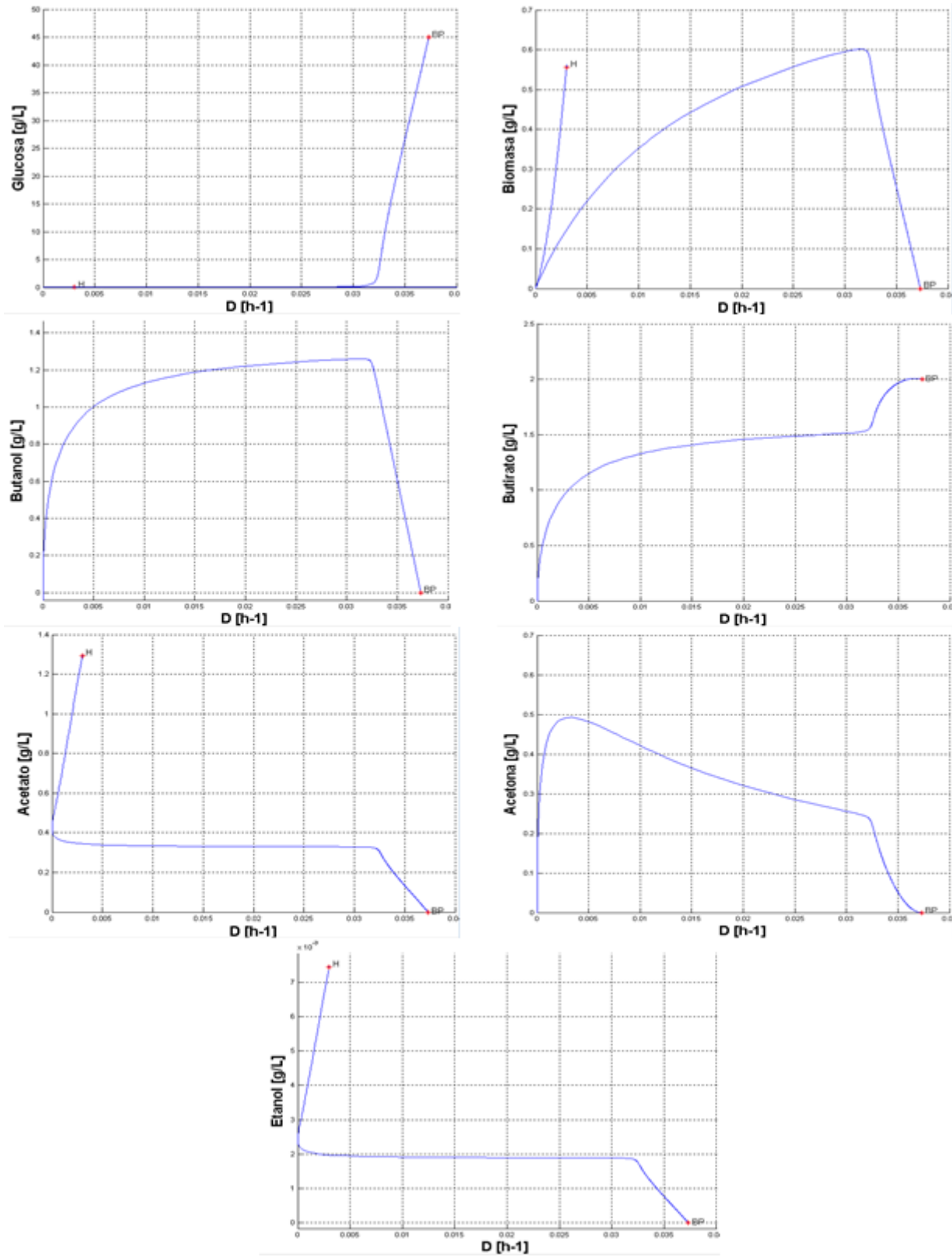


Figura 2. Diagramas de bifurcación del sistema de fermentación en continuo de *Clostridium beijerinckii* utilizando la tasa de dilución D como parámetro de bifurcación.

Se aprecia que la mayor concentración de butanol en la corriente de salida del fermentador se alcanza al operar el sistema a una tasa de dilución estimada de 0.032 h^{-1} , sin embargo también es evidente que mantener al reactor trabajando bajo ese estado implica un alto riesgo de pérdida de productividad, considerando que un aumento súbito de la tasa de dilución abatiría la concentración de producto sensiblemente. Considerando lo expresado anteriormente se eligió la tasa $D = 0.03 \text{ h}^{-1}$ como el ideal para mantener la productividad del reactor y con ello conferirle cierta robustez al sistema.

Una vez identificada la tasa de dilución D , en la cual el sistema exhibe su máxima producción de butanol se procedió a realizar un nuevo análisis de bifurcación ahora considerando a la concentración de sustrato en la alimentación al reactor (S_g) como parámetro base. Los resultados de dicho experimento se plasman en la Figura 3, que se presenta a continuación.

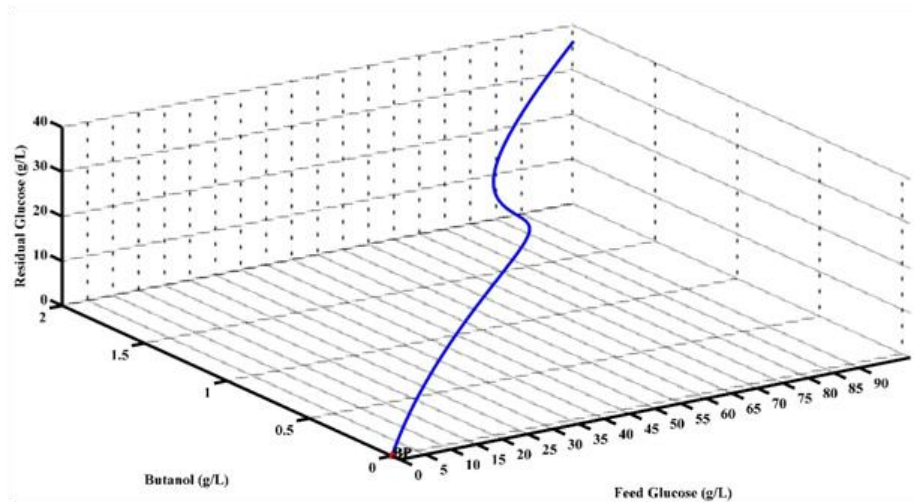


Figura 3. Análisis de bifurcación del sistema de fermentación en continuo utilizando *Clostridium beijerinckii* considerando al sustrato (S_g) como parámetro de bifurcación.

Los criterios de selección de la concentración de sustrato a alimentar (S_g) fueron que se mantuviera la máxima productividad de biocombustible y que la cantidad de sustrato residual en el reactor fuese lo más cercana posible a 0, con lo cual se puede garantizar que este se aprovecha

de la mejor manera posible dentro del sistema; el valor propuesto para la operación del fermentador es de 75 g/L tomando en consideración la dinámica plasmada en dicha Figura 3.

De manera similar al experimento anterior se procedió a realizar el estudio de la concentración mínima necesaria del precursor metabólico que se requiere para mantener al reactor trabajando en la región de máxima concentración del producto de interés, ya que se sabe por el trabajo de Chang (2010) que la incorporación de butirato en la corriente de entrada al reactor permite una mejor conversión del sustrato a butanol. Los resultados de este nuevo análisis de bifurcación considerando la concentración de butirato en la alimentación al reactor (S_b) se presentan en la Figura 4.

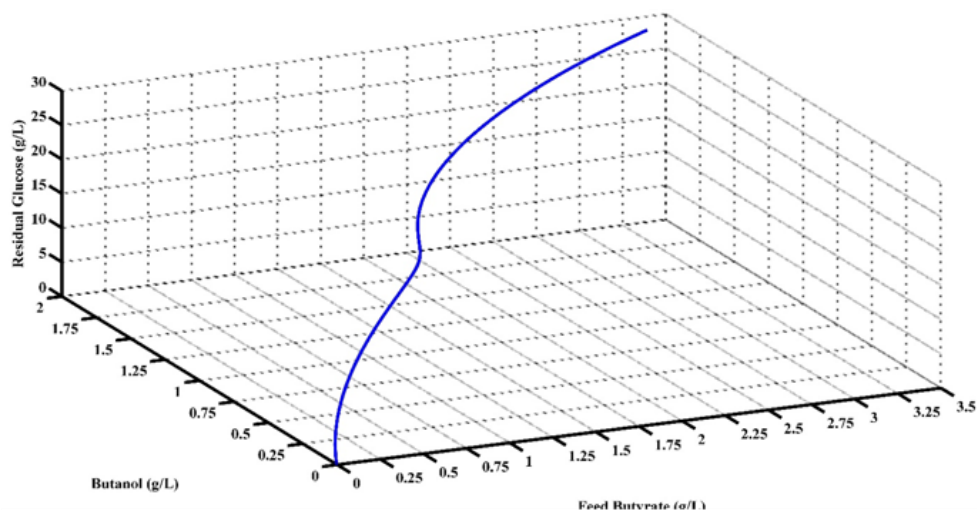


Figura 4. Análisis de bifurcación del sistema de fermentación en continuo utilizando Clostridium beijerinckii considerando al butirato (S_b) como parámetro de bifurcación.

Es de particular interés la dinámica del sistema expresada en la Figura 4, ya que se puede apreciar que la concentración de butirato en la alimentación al sistema tiene un efecto importante en la capacidad del sistema para producir los compuestos de interés.

Se hace notorio que la incorporación de butirato por parte de la bacteria y su posterior transformación a butanol sigue una tendencia lineal con eficiencias relativas butirato/butanol cercanas al 100 % a concentraciones menores a 1.75 g/L, mientras que a títulos superiores este metabolito disminuye su efecto global en el sistema y propicia la acumulación de sustrato residual en el fermentador. Por tanto se eligió fijar la concentración de este a 1.5 g/L para maximizar su efecto coadyuvante sin generar pérdidas debidas a una baja asimilación de nutrientes por parte del cultivo en cuestión.

Para determinar la robustez del sistema trabajando a las nuevas condiciones de operación propuestas de $D = 0.03 \text{ h}^{-1}$, $S_g = 75 \text{ g/L}$ y $S_b = 1.5 \text{ g/L}$ se realizó un análisis de valores propios considerando el primer criterio de Lyapunov (Anexo).

Tabla 2. Análisis de valores propios para sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias según el 1er criterio de Lyapunov.

Tipo de valor propio	Estabilidad	Tipo de oscilación	Notación
Todos reales +	Inestable	No presente	Nodo Inestable
Todos reales -	Estable	No presente	Nodo Estable
Reales + y -	Inestable	No presente	Punto Silla (Inestable)
+a + bi	Inestable	No amortiguada	Espiral Inestable
-a + bi	Estable	Amortiguada	Espiral Estable
0 + bi	Inestable	No amortiguada	Círculo

Con ello se procedió a construir un cuadro de valores propios para cada variable de estado del sistema para identificar si la región de operación propuesta bajo el régimen de alimentación sugerido realmente permite que el sistema alcance un estado estacionario que tienda a mantenerse constante con respecto al tiempo.

Tabla3. Resultado del análisis de valores propios para cada estado del sistema de fermentación en continuo de *Clostridium beijerinckii* bajo las condiciones propuestas

Estado	$\lambda (a + bi)$
Glucosa	-0.5 + 0
Biomasa	-0.055 + 0
Butanol	-0.034 + 0.15
Butirato	-0.034 - 0.015
Acetato	-0.031 + 0
Acetona	-0.03 + 0
Etanol	-0.025 + 0

En el Cuadro 2 se aprecia que el sistema puede considerarse estable al presentar todos sus valores propios en la zona de los reales negativos, con lo que se puede garantizar que el estado estacionario calculado donde se manifiesta la máxima concentración de biocombustibles será alcanzado de manera espontánea por el reactor y que dicha condición se puede mantener constante sin la necesidad de forzar al sistema con la implementación de estrategias de control externo.

Conclusión

Se pudo corroborar que la operación del sistema objeto de estudio en continuo a tasas de dilución cercanas a la región de cultivo en lote propicia que se manifiesten condiciones de multiplicidad de estados estacionarios, los cuales supondrían la necesidad de establecer mecanismos de control adecuados para mantener su viabilidad.

Además de esto se hizo posible establecer las condiciones operativas que permiten obtener los mayores rendimientos de conversión de sustrato a productos, el menor costo de materia prima y la máxima productividad de biocombustibles haciendo uso del análisis de bifurcación, con lo cual destacamos su aplicabilidad.

Las condiciones operativas propuestas indican que un sistema de fermentación con *Clostridium beijerinckii* operado de manera continua expresa su máxima eficiencia a tasa de dilución $D = 0.03 \text{ h}^{-1}$, con una concentración de sustrato en la alimentación $S_g = 75 \text{ g/L}$ y una adición de butirato como precursor metabólico $S_b = 1.5 \text{ g/L}$, además que la implementación de estas tienen como consecuencia la estabilización del sistema en un punto de estado estacionario robusto. En este escenario se obtiene una concentración a la salida de 2 g/L de ABE, los cuales pueden ser empleados como biocombustible.

Por lo obtenido en las diversas simulaciones realizadas en este trabajo se puede destacar que la extrapolación de procesos biológicos de sistemas en lote a reacciones en continuo debe depender no solo de la cantidad de producto de interés que se plantea obtener, sino también de la factibilidad técnica y económica del proceso operado bajo ese régimen. Con esos criterios en mente se hace evidente la utilidad del análisis dinámico de sistemas biológicos dentro de las etapas de diseño, control y optimización de los mismos.

Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar sus estudios de Maestría en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

Referencias

- Demirbas, A. "Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review", *Applied Energy*, Vol. 86, 2009.

- Naik, S., Goud, V., Rout, P. y Dalai, A. “Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 14, 2010.
- Pablo A. López-Pérez, Rafael Maya-Yescas, Vicente Peña-Caballero, Rigel Valentín Gomez-Acata, Ricardo Aguilar-López, Software sensors design for a model of a simultaneous saccharification and fermentation of starch to ethanol, *Fuel-elsevier*, Vol.110, Pag.219-226, 2013.
- Lee, S., Park, J., Jang, S., Nielsen, L., Kim, J. y Jung, K. “Fermentative butanol production by Clostridia”, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 101, 2008.
- Zverlov, V., Berezina, O., Velikodvorskaya, G. y Schwarz, W. “Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: Use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery”, *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 71, 2006.
- Ezeji, T., Qureshi, N. and Blaschek, H. P. (2007). “Butanol Production From Agricultural Residues: Impact of Degradation Products on *Clostridium beijerinckii* Growth and Butanol Fermentation”, *Biotechnology and Bioengineering* 97-6, 1460-1469.
- Schoutens, G. H., Nieuwenhuizen, M. C. H., and Kossen, N. W. F. (1985). *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 21, 282–286
- Shinto, H., Tashiro, Y., Yamashita, M., Kobayashi G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Kuriya, Y., Okamoto, M. and Sonomoto, K. (2007). Kinetic modeling and sensitivity analysis of acetone–butanol– ethanol production. *Journal of Biotechnology*, 131, 45-56.
- Napoli, F., Olivieri, G., Russo, M.E., Marzocchella, A., Salatino, P., 2011, Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* – Assessment of acidogenesis kinetics. *Bioresour. Technol.*, 102, 1608-1614

- Mayank, R., Ranjan, A. y Moholkar, V. “Mathematical models of ABE fermentation: review and analysis”, *Critical Reviews on Biotechnology*, Early Online, 2012.
- Namjosi, A., Kienle, A. y Ramkrishna, D. “Steady-state multiplicity on bioreactors: bifurcation analysis of cybernetic models”, *Chemical Engineering Science*, Vol. 58, 2003.
- Aguilar-López, R., Peña-Caballero, V. y Neria-González, M. I. “Control of a Class of Sulfate Reducing Chemostat Via Feedback Polynomial Injection”, *Journal of Applied Research and Technology*, 2010.
- Velázquez-Sánchez, H., Montes-Horcasitas, M. y Aguilar-López, R. “Developmnet of a phenomenological kinetic model for butanol production using *Clostridium beijerinckii*”, *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 2013 (En prensa).
- Chang, W. “Acetone-butanol-ethanol fermentation by engineered *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium tyrobutyricum*”, Tesis, *The Ohio State University*, 2010.
- Ricardo Aguilar-López, Pablo Antonio López Pérez, Fernando Cuevas Ortíz, Esquemas de control para procesos industriales. Diseño e implementación en bioprocesos, ACADÉMICA LEMANA-ESPAÑOLA.

Anexo

Criterios de estabilidad (Aguilar-López *et al*, 2011)

Uno de los métodos más utilizados, para sistemas no lineales, es el de Lyapunov. En 1892, A. M. Lyapunov presentó dos métodos (llamados el primero y el segundo) para determinar la estabilidad de los sistemas dinámicos descritos mediante ecuaciones diferenciales ordinarias. El primer método se compone de todos los procedimientos en los cuales se usa la forma explícita de la solución de las ecuaciones diferenciales para su análisis. En cambio, el segundo método no requiere de las soluciones de las ecuaciones diferenciales. Es decir, mediante el segundo método de Lyapunov, se determina la estabilidad de un sistema sin resolver las ecuaciones de estado. Esto ofrece una gran ventaja porque, por lo general, es muy difícil despejar las ecuaciones de estado no lineales y/o variantes con el tiempo.

Aunque el segundo método de Lyapunov, cuando se aplica al análisis de estabilidad de los sistemas no lineales, requiere de mucha experiencia e ingenio, contesta la pregunta de la estabilidad de los sistemas no lineales cuando otros métodos fracasan.

Estabilidad en el sentido de Lyapunov.

A continuación, representaremos una bola cerrada con radio k a partir de un estado de equilibrio x_e , como

$$\|x - x_e\| \leq k$$

Donde $\|x - x_e\|$ se denomina norma euclidiana, y se define mediante

$$\|x - x_e\| = \left[(x_1 - x_{1e})^2 + (x_2 - x_{2e})^2 + \dots + (x_n - x_{ne})^2 \right]^{1/2}$$

Suponga que $s(\delta)$ está formada por todos los puntos tales que

$$\|x_0 - x_e\| \leq \delta$$

y suponga que $s(\varepsilon)$ está formada por todos los puntos tales que

$$\|\phi(t; x_0, t_0) - x_e\| \leq \varepsilon \forall \text{ toda } t \geq t_0$$

Se dice que un estado de equilibrio x_e es estable en el sentido de Lyapunov si, en correspondencia con cada $s(\varepsilon)$, existe una $s(\delta)$ tal que las trayectorias que empiezan en $s(\delta)$ no se alejan de $s(\varepsilon)$ conforme t se incrementa indefinidamente.

El número real δ depende de ε y, en general, también depende de t_0 . Si δ no depende de t_0 , se dice que el estado de equilibrio es uniformemente estable.

Lo que hemos planteado aquí es que primero seleccionamos la región $s(\varepsilon)$ y, para cada

$s(\varepsilon)$, debe existir una región $s(\delta)$ tal que las trayectorias que empiezan dentro de $s(\delta)$ y no se apartan de $s(\varepsilon)$ conforme t se incrementan indefinidamente.

Así sea x_e , y considerando la matriz jacobina J calculada en el punto de equilibrio a partir de la versión lineal del sistema no lineal, los valores correspondientes a esa matriz de pendientes del signo de la parte real del valor propio se pueden clasificar en tres grupos:

$\lambda < 0$ Estable
 $\lambda > 0$ Inestable
 $\lambda = 0$ Central