

**AJUSTE DE PARÁMETROS Y SELECCIÓN DE MODELOS CINÉTICOS PARA
LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA UTILIZANDO
TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN MULTI OBJETIVO**

CARLOS ALBERTO MENDOZA PRADA

ÁLVARO ANDRÉS MURILLO ALARCÓN

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA**

2010

**AJUSTE DE PARÁMETROS Y SELECCIÓN DE MODELOS CINÉTICOS PARA
LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA UTILIZANDO
TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN MULTI OBJETIVO**

CARLOS ALBERTO MENDOZA PRADA

ÁLVARO ANDRÉS MURILLO ALARCÓN

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

DIRECTOR

CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA

INGENIERO QUÍMICO MSC.

CODIRECTOR

ARTURO GONZÁLEZ QUIROGA

INGENIERO QUÍMICO MSC.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO QUIMICAS

ESCUELA DE INGENIERIA QUÍMICA

BUCARAMANGA

2010

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a:

Arturo González Quiroga, Ingeniero Msc. del ICP, Codirector de este proyecto, por su permanente apoyo, sus valiosos consejos y aportes.

Crisóstomo Barajas Ferreira, Profesor de la Escuela de Ingeniería Química de la UIS, director de este proyecto, por su valiosa asesoría.

Nomenclatura

CBH	Exo-celobiohidrolasas
CBU	Unidad de celobiosa, la actividad de β -glucosidasa
CWR	Creeping Wild Ryegrass
EG	Endoglucanasas
FPU	Unidad de papel de filtro, unidad de la actividad de la celulasa.

Notación

C	Concentración de celulosa(g/mL)
E_{1b}	Concentración de celulasa adsorbida sobre CWR Pretratada (mg/mL)
E_{1bc}	Concentración de celulasa adsorbida sobre la celulosa contenida en el CWR pretratado (mg Proteína/mL)
E_{1fL}	Concentración de celulasa en solución cuando la lignina es sustrato (mg Proteína/mL)
E_{1T}	Concentración total de celulasa (mg Proteína/mL)
E_{2T}	Concentración total de β -glucosidasa (mg Proteína/mL)
G	Concentración de glucosa (mg/mL)
G_2	Concentración de celobiosa (mg/mL)
k_{ir}	Constantes de velocidad de reacción (mL/g.h) ($i=1$, celulosa a celobiosa; 2 , celulosa a glucosa; 3 , celobiosa a glucosa)
K_{iIG}	Constantes de inhibición para glucosa (mL/mg) ($i=1$, celulosa a celobiosa; 2 , celulosa a glucosa; 3 , celobiosa a glucosa)
K_{iIG2}	Constantes de inhibición para celobiosa (mL/mg) ($i=1$, celulosa a celobiosa; 2 , celulosa a glucosa)

K_M	Constante de saturación para el sustrato (celobiosa) (mg/ mL)
r_i	Velocidad de reacción (mg/mL/h)
SR	Reactividad del sustrato
t	tiempo transcurrido durante la hidrólisis enzimática (h)
	Relación del contenido de lignina expuesta a la enzima sobre la cantidad de enzima total en el CWR pretratado.

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN	16
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	18
2.1. Importancia del etanol de segunda generación	18
2.2. Materiales lignocelulósicos	18
2.3. Enzimas celulasas	19
2.4. Hidrólisis enzimática	20
2.4.1. <i>Cinética de las reacciones catalizadas por enzimas</i>	20
2.4.2. <i>Influencia de la inhibición por producto en las velocidades de hidrólisis</i>	21
2.5. Revisión: Modelamiento matemático de la hidrólisis enzimática	21
2.5.1. <i>Modelos cinéticos</i>	23
2.5.1.1. <i>Modelos cinéticos de hidrólisis enzimática de tres reacciones</i>	24
2.6. Estimación de parámetros	27
2.7. Métodos heurísticos	28
2.7.1. <i>Algoritmo pikaia</i>	28
2.7.2. <i>Algoritmo de recocido simulado (Simulated annealing—SA)</i>	28
2.7.3. <i>Algoritmo simplex</i>	28
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	29
3.1. Modelo cinético	30
3.1.1. <i>Análisis del modelo cinético</i>	30
3.2. Función objetivo	32
3.3. Optimización multiobjetivo	33
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	35
4.1. Análisis de sensibilidad	37
4.2. Análisis de Residuales	38
5. CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Metodología de Investigación.....	29
Figura 2	Individuo con mejor <i>fitness</i> de cada generación.....	35
Figura 3	Perfiles de concentración experimentales y estimados.....	37
Figura 4	Influencia de los parámetros obtenidos en el modelo.....	38
Figura 5	Distribución de los residuales de los perfiles estimados.....	38
Figura 6.	Distribución de los Residuales vs distribución normal.....	39
Figura 7	Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente.....	46
Figura 8	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima. La porción descendente de la curva se debe a la desnaturalización térmica.....	46
Figura 9	Representación doble recíproca que representa la inhibición competitiva.....	47
Figura 10	Representación doble recíproca que representa la inhibición no competitiva.....	47
Figura 11	Esquema de reacción para el modelamiento de hidrólisis enzimática de tres reacciones.....	48
Figura 12	Esquema de reacción para el modelamiento de hidrólisis enzimática de cuatro reacciones.....	48
Figura 13	Perfil De concentración de celobiosa estimado.....	49
Figura 14	Métodos de optimización.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Características de la biomasa antes y después del pretratamiento.....	19
Tabla 2	Resumen de los modelos para sustratos de la hidrólisis enzimática de la celulosa y lignocelulosa	22
Tabla 3	Modelo cinético de hidrólisis enzimática de una reacción.....	23
Tabla 4	Modelo cinético de la hidrólisis enzimática (Philippidis 1993).....	25
Tabla 5	Modelo cinético de la hidrólisis enzimática (Kadam et al 2004).....	26
Tabla 6	Modelo cinético de la hidrólisis enzimática (Zheng 2007).....	26
Tabla 7	Modelo cinético de la hidrólisis enzimática (Suma Peri y otros 2006).....	27
Tabla 8	Algoritmo Pikaia plan 1.....	33
Tabla 9	Algoritmo Pikaia-Simplex plan 2.....	33
Tabla 10	Algoritmo Simulated Annealing plan 3.....	34
Tabla 11	Algoritmo Pikaia- Simulated Annealing. plan 4.....	34
Tabla 12	Características del Computador.....	34
Tabla 13	Resultados aplicando plan 1.....	35
Tabla 14	Resultados aplicando plan 2.....	36
Tabla 15	Resultados aplicando plan 4.....	36
Tabla 16	Resultados aplicando plan 3.....	36

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	Figuras de Referencia.....	45
Anexo B	Códigos Implementados.....	51
	B.1. Runge Kutta Fehlberg—RK-F.....	52
	B.2. Programa Pikaia.....	56
	B.3. Simulated annealing.....	58
	B.4. Simplex.....	60

TITULO: AJUSTE DE PARÁMETROS Y SELECCIÓN DE MODELOS CINÉTICOS PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA UTILIZANDO TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN MULTI OBJETIVO*

Autores: MENDOZA PRADA, Carlos Alberto y MURILLO ALARCÓN, Álvaro Andrés**

Palabras clave: ajuste de parámetros, hidrólisis enzimática, optimización multiobjetivo.

Resumen

La hidrólisis enzimática es un método de conversión de materiales lignocelulósicos en azúcares fermentables. Actualmente existen diversos desafíos en el modelamiento de este proceso entre ellos están, una mejor comprensión de los mecanismos que envuelven el proceso y la identificación de los factores limitantes en la velocidad de hidrólisis. Dentro de las herramientas para evaluar las rutas de bioconversión están los modelos cinéticos predictivos que permitan simular el comportamiento del proceso en el rango de condiciones de interés

El presente trabajo profundiza en la discusión de estrategias de optimización multiobjetivo para ajustar los parámetros del modelo cinético utilizando métodos aproximados.

El trabajo se llevó a cabo en dos etapas, la primera consistió en una revisión del estado del arte en el modelamiento de la hidrólisis enzimática en la cual, se escogió el modelo cinético más apropiado para el diseño de reactores y se realizó su respectivo análisis, con el objeto de generar restricciones que disminuyan el número de grados de libertad y asegurar el optimo, pero sin perder generalidad en el procedimiento, válido con otro tipo de sustratos. La segunda etapa consistió en la optimización de todos los parámetros, para ello, fue necesario el uso de herramientas heurísticas y su configuración se realizó mediante experimentación en ensayos de prueba y error, esto es importante para asegurar el correcto funcionamiento del algoritmo y depende de la naturaleza del problema a tratar.

El estudio revela el buen ajuste presentado por los perfiles de celulosa y glucosa, sin embargo el modelo es deficiente al predecir el comportamiento de la celobiosa y se concluye que la estructura matemática que describe la celobiosa debe ser reestructurada.

*Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química.

Director: Msc. Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirector: Msc. Arturo González Quiroga.

TITLE: PARAMETER ESTIMATION OF KINETIC MODELS FOR THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS USING MULTI-OBJECTIVE OPTIMIZATION*

Authors: MENDOZA PRADA, Carlos Alberto and MURILLO ALARCÓN, Álvaro Andrés**

KeyWords: Parameter Estimation, Hydrolysis Enzymatic, Multi.Objective Optimization

Abstract

Enzymatic hydrolysis is a method of converting lignocellulosic materials into fermentable sugars. Currently there are several challenges in modeling this process they include a better understanding of the mechanisms that involve the process and the identification of the limiting factors in the rate of hydrolysis. Among the tools to evaluate the bioconversion routes are predictive kinetic models to simulate the behavior of the process in the range of conditions of interest

This paper focuses on the discussion of multi-objective optimization strategies to estimate the parameters of the kinetic model using approximate methods.

This work was carried out in two stages: the first consisted of a review of the state of the art in modeling of enzymatic hydrolysis which was chosen the most appropriate kinetic model for the design of reactors and their respective analysis was performed, in order to create restrictions that reduce the number of degrees of freedom and ensure the optimum, but without loss of generality in the proceedings, applies to other substrates. The second step was the optimization of all parameters, this required the use of heuristic tools and experimentation by trial and error tests to configure each algorithm; it is important to ensure the proper functioning of the algorithm and depends on nature of the problem treated.

This investigation shows that the model predicted hydrolysis behavior with reasonable accuracy, but the model is deficient in predicting the behavior of cellobiose and concludes that the mathematical structure that describes the cellobiose must be restructured.

* Undergraduate Thesis

** Faculty of Physic- chemical Engineering. School of Chemical Engineering.
Director: Msc. Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirector: Msc. Arturo González Quiroga.

1. INTRODUCCIÓN

La demanda cada vez mayor por combustibles ha conllevado a buscar fuentes de energía renovables entre los que se encuentran los biocombustibles. Hace más de tres décadas, el etanol producido a partir de materiales ricos en almidón o azúcares fermentables se mostró como solución de la primera crisis del petróleo alcanzando un estatus comercial como combustible para motores. Sin embargo, según algunos estudios como los realizados por Hill et al, (2006) y Benedetti et al, (2007), la sustitución de cultivos para dar paso a biocombustibles incrementan el precio de los alimentos. Como contraparte, las tecnologías en biocombustibles de procedencia lignocelulósica (materias primas no comestibles), denominados de segunda generación, están en fase de investigación, desarrollo y demostración, con producciones a escala piloto de menos del 0.1% de la producción mundial de biocombustibles y se estima que para alrededor del año 2020 podrían alcanzar el estatus comercial. [21]

Países como Brasil, Estados Unidos y la Unión Europea han venido implementando políticas que contribuyen al desarrollo acelerado de tecnologías para producción comercial de biocombustibles de segunda generación con biorefinerías integradas a tamaño de planta, que serán puestas en funcionamiento [9]. Para lograrlo, varios “cuellos de botella” deben ser resueltos tales como la logística para proveer materia prima en cantidades suficientes hasta la planta de producción, la integración con tecnologías de primera generación y la disminución del consumo energético de las operaciones de separación

Entre las herramientas necesarias para evaluar los procesos de bioconversión están los modelos cinéticos predictivos que permitan simular el comportamiento del proceso en el rango de condiciones de interés. ¿Qué tipo de modelo cinético es el más apropiado para el diseño de reactores de hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica? ¿Cuáles son los alcances y limitaciones de tales

modelos? ¿Cómo se debe realizar la optimización de parámetros? La respuesta de las anteriores preguntas llevó a la realización de la presente investigación.

La hipótesis de esta investigación está centrada en que con la inclusión de restricciones obtenidas del comportamiento matemático del modelo cinético y de observaciones experimentales, al modelo propuesto por Zheng *et al.* (2009) se puede obtener un modelo cinético robusto y confiable para ser usado en el diseño de reactores y la optimización del proceso de bioconversión. El *set* de parámetros del modelo cinético se obtiene por medio de optimización multiobjetivo que combina métodos de búsqueda global y local para aumentar la probabilidad de obtener el mejor *set* de parámetros.

El presente trabajo revisa el estado del arte del modelamiento de la cinética de la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica con énfasis en modelos cinéticos potencialmente útiles para diseño de reactores. Además, se profundiza en la discusión de estrategias de optimización multiobjetivo para ajustar los parámetros del modelo cinético. La investigación muestra que el modelo implementado es deficiente al predecir el perfil de concentración de celobiosa. Este inconveniente podría ser resuelto incluyendo la inhibición por xilosa u otros oligosacáridos intermedios. Asimismo se podría mejorar el modelo reestructurando la ecuación cinética de la celobiosa, re-estimando el parámetro de la constante de velocidad de hidrólisis el cual se mostro como no significativo.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Importancia del etanol de segunda generación

El interés por combustibles alternativos ha estado asociado a los precios del petróleo, puesto que una de sus grandes desventajas son los altos costos de producción, que requieren de nuevas políticas para su viabilidad. Los biocombustibles de primera generación son aquellos que compiten directamente con la producción de alimentos y posiblemente afecten sus precios ^[20, 21], así como no contribuyen en la reducción de gases de efecto invernadero.

Por otra parte, los biocombustibles de segunda generación, es decir aquellos cuya biomasa procede de materiales lignocelulósicos (no comestibles) y que utilizan una ruta bioquímica (hidrólisis enzimática) no sólo poseen altos grados de conversión sino que podrían proveer combustibles más económicos ^[21]. Sin embargo aún existen limitaciones relacionadas con el pretratamiento del sustrato para mejorar la accesibilidad de las enzimas, así como los altos precios de las enzimas y un mejor entendimiento de los mecanismos que envuelven la interacción sustrato-producto-enzima.

2.2. Materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos son el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis ^[8]. La estructura física de los materiales lignocelulósicos consiste de tres constituyentes separados: celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa y la hemicelulosa son polisacáridos, mientras que la lignina es esencialmente un polímero tridimensional de unidades fenil-propano, el cual forma una barrera física para la degradación heterogénea por enzimas celulasas ^[11]. La celulosa presente en materiales lignocelulósicos está compuesta de componentes cristalinos y amorfos, cada uno de ellos muestra diferente digestibilidad ante el ataque enzimático ^[11]. La hemicelulosa está compuesta de polisacáridos de cadena corta y enlaces de celulosa y lignina ^[8, 11]. La presencia

de lignina protege la celulosa de ataques químicos y ataques biológicos además da rigidez estructural y mantiene las fibras de polisacáridos juntas. La lignina constituye entre 20-35 % de la estructura de la madera. Los tres constituyentes están todos presentes en variables cantidades dependiendo de la naturaleza del material lignocelulósico [11].

En este trabajo se tomaron perfiles experimentales obtenidos por Zheng, (2007). En el trabajo mencionado, se pretrató el sustrato para facilitar la accesibilidad de las enzimas celulasa, posteriormente se sometió el sustrato pretratado a la acción de enzimas celulasa. Se cuantificaron los perfiles de celulosa, glucosa y celobiosa.

Tabla 1. Características de la biomasa antes y después del pretratamiento

Sustrato	Sólidos (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina y cenizas (%)
No tratado	100.0	34.0	20.6	31.8
Tratado	54.4	53.2	0.6	37.9

Fuente: Zheng (2007) 47p.

El pretratamiento es necesario para alterar la estructura de la biomasa lignocelulósica, para remover la lignina y/o recuperar azúcares de la hemicelulosa y para hacer a la celulosa más accesible a las enzimas.

2.3. Enzimas celulasas

Las celulasas son un grupo de enzimas que contribuyen a la degradación de celulosa para formar glucosa [11]. La naturaleza del sistema de la enzima celulítica empleada determina el modo de acción de la celulasa, la actividad de cada componente de la enzima, la acción sinérgica entre los componentes de la enzima y el efecto inhibitorio sobre la acción de la enzima por la reacción intermedia y productos [11].

Las enzimas celulasas son un complejo formado por varios tipos de enzima con diferentes modos de acción. En general, las celulasas secretadas por hongos consisten en tres clases de componentes mayoritarios [11][18][19].

- 1,4- -D-glucano glucanohidrolasas (Endoglucanasas)
- 1,4- -D-glucano celobiohidrolasas (Exoglucanasas)
- -D-glucósido glucohidrolasas (-Glucosidasas)

La eficiencia de la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos no depende solamente de la presencia de todos los componentes de la celulasa sino más importante aún, sobre la apropiada relación de los diferentes componentes [11].

2.4. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es un método de conversión de lignocelulosa en azúcares fermentables. Depende de varios factores, tales como: las características estructurales de la biomasa, la temperatura (figura 8) de hidrólisis, el pH, las concentraciones de la enzima, el sustrato y los productos, y las relacionadas con el mecanismo y las interacciones de las enzimas celulíticas [18, 19].

Los desafíos en el modelamiento del proceso de hidrólisis de la celulosa son

- Un mayor entendimiento de las variables concernientes a la enzima y el sustrato (concentración del sustrato, grado de polimerización, accesibilidad, capacidad de adsorción, distribución de tamaño de las cadenas, cristalinidad; concentración de la enzima, composición de la celulosa, concentración de la celulosa adsorbida, sinergismo) [4].
- Identificar factores limitantes de la velocidad [4].

2.4.1. Cinética de las reacciones catalizadas por enzimas

Las enzimas muestran un rasgo característico, que no se observa en las reacciones no enzimáticas y es la saturación del sustrato [15] (Ver figura 7).

A una concentración de sustrato baja, la velocidad inicial de la reacción es proporcional a la concentración del sustrato y la reacción muestra un comportamiento de primer orden respecto al sustrato. Sin embargo, a medida que

la concentración de sustrato aumenta, la velocidad inicial de la reacción disminuye y deja de ser aproximadamente proporcional a la concentración de sustrato; en esta zona el orden de reacción es mixto. Con un aumento posterior de la concentración del sustrato la velocidad de la reacción llega a ser esencialmente independiente de la concentración del sustrato y se aproxima asintóticamente a una velocidad constante. En este intervalo de concentraciones del sustrato la reacción es esencialmente de orden cero con respecto al sustrato, y se dice entonces que la enzima se halla saturada con su sustrato. Todas las enzimas muestran el efecto de saturación, pero varían ampliamente con respecto a la concentración de sustrato que se necesita para que se manifieste ^[15].

2.4.2. Influencia de la inhibición por producto en las velocidades de hidrólisis

Las enzimas celulolíticas son inhibidas por celobiosa, glucosa o por ambas. El patrón de esta inhibición ha sido objeto de estudio por un largo tiempo, con diferentes puntos de vista ^{[1][2]}. Se ha sugerido que la inhibición competitiva es dominante, otros argumentan que la inhibición no competitiva fue observada, mientras que algunos reportan una combinación de ambas ^[1].

En una reacción homogénea, un inhibidor competitivo reduce la capacidad de unión del sustrato y aumenta la K_M aparente debido a que el complejo enzima-inhibidor se forma a través de la interacción directa entre la enzima y el inhibidor ^[1, 2] (figura 9). En la inhibición no competitiva el inhibidor puede combinarse con la enzima libre o con el complejo enzima sustrato, interfiriendo en la acción de ambos. Los inhibidores no competitivos se unen a un centro de la enzima distinta al centro activo, a menudo para deformar la enzima, de modo que no pueda formarse el complejo ^[1, 15] (figura 10).

2.5. Revisión: Modelamiento matemático de la hidrólisis enzimática

En la tabla 1 se muestran los principales factores de incidencia en la cinética enzimática que han sido incorporados a los modelos propuestos.

Tabla 2. Resumen de los modelos para sustratos de la hidrólisis enzimática de la celulosa y lignocelulosa

Esquema de Reacción		Adsorción sobre Celulosa	Adsorción sobre Lignina	Sustrato		Desactivación de la Enzima	[C] de Oligosacáridos	Sustrato Pretratado
				Reactividad	Amorfo-Cristalina			
Una reacción	Holtzapfle et al. (1984)	+	-	-	-	-	-	Floculo de Solka
	Nakao et al. (1990)	-	-	-	-	-	-	Pulpa de Madera
Dos reacciones	Dwivedi and Ghose	+	-	-	-	-	-	Bagaso de la
	Wald et al. (1984)	+	-	-	+	+	-	Cascarilla de Arroz
	Borchert and	+	-	-	+	+	-	Cascarilla de Trigo
	Gusakov et al. (1992)	+	+	-	-	+	-	celo-lignina
	South et al. (1995)	+	+	+	-	-	-	Madera
Tres reacciones	Philippidis (1993)	+	+	-	-	+	-	----
	Kadam et al. (2004)	+	-	+	-	-	+	Bagaso de Caña
	Drissen et al. (2007)	+	-	+	-	+	-	Trigo
	Zheng et al. (2007)	+	+	+	-	-	-	Ballico
cuatro reacciones	Suma Peri (2006)	+	-	-	+	-	+	Algodón

Fuente: Tomado y modificado de González Quiroga Arturo (2009)

Nota: [C] Concentración, + incluye, - no incluye

La mayoría de los modelos propuestos a la fecha para el diseño de sistemas de reacción son modelos semi-mecanísticos. Aunque estos modelos no incorporan el efecto detallado en las características del sustrato (cristalinidad, grado de polimerización etc.) y de las múltiples actividades enzimáticas sobre la hidrólisis, ellos son muy útiles en un contexto de ejercicios motivados por la inclusión de una mínima información necesaria para describir los propósitos, especialmente en el diseño de reactores ^[25].

2.5.1. Modelos cinéticos

De acuerdo a la literatura la hidrólisis enzimática es un sistema que puede ser descrito por tres reacciones^[14, 19, 25] (figura 11) **I)** una reacción heterogénea catalizada por enzimas endoglucanasas (EG) y celobiohidrolasas (CBH) para la producción de glucosa a partir de celulosa, **II)** una reacción heterogénea catalizada por enzimas (EG) y (CBH) para la producción de celobiosa a partir de celulosa y, **III)** una reacción homogénea catalizada por enzimas α -glucosidasas (BG) para la producción de glucosa a partir de celobiosa^[12]. Sin embargo, existen modelos de cuatro reacciones que incluso consideran: **IV)** una reacción heterogénea para la producción de oligosacáridos solubles catalizados por enzimas (EG) y (CBH) a partir de celulosa^[18] (figura 12)

Si no se considera la pérdida de movilidad de la enzima y el proceso de adsorción es simplificado y no hay acumulación de celobiosa, el rendimiento de glucosa puede ser predicho con un modelo de una reacción aparente.

Tabla 3. Modelo cinético de hidrólisis enzimática de una reacción

Modelo cinético	Balance de masa	Reacciones
Nakao <i>et al.</i> 1990	$\frac{dG}{dt} = 1,111r$	$r = \frac{\mu_{mG}(G^{inf} - G)}{k_{mG} \left[1 + \frac{G}{k_{inh}} \right] + 0,9(G^{inf} - G)}$

Fuente: Nakao, K *et al.* (1990)

Donde la glucosa (G) es producida a partir de un sustrato hipotético ($S^h = G^{inf} - G$) la concentración inicial corresponde a la concentración de glucosa producida (G^{inf}), asumiendo un mecanismo de Michaelis-Menten con una inhibición competitiva por glucosa. μ_{mG} , k_{mG} y k_{inh} son la constante de velocidad aparente, la constante de Michaelis-Menten aparente y la constante de inhibición aparente, respectivamente. La constante 0,9 es la relación del peso molecular de la unidad de la glucosa en celulosa a la de glucosa. k_{mG} , k_{inh} son asumidas como características al sistema de reacción mientras μ_{mG} es asumida como dependiente

de la relación enzima/sustrato y fijada como una función de la concentración ^[12]. Puede observarse que la μ_{mG} resulta del agrupamiento de la constante de velocidad y la concentración de la enzima ^[12].

2.5.1.1. Modelos cinéticos de hidrólisis enzimática de tres reacciones

De acuerdo a Philippidis (1993) son tres, los principales factores que influyen en la cinética de hidrólisis enzimática ^[19]

- *Calidad y concentración de sustrato celulósico.* Las características estructurales del sustrato influyen la susceptibilidad de la biomasa lignocelulósica para la degradación enzimática.
- *Calidad y concentración del sistema de enzimas celulosa y α -Glucosidasa.* La calidad de las enzimas afectan la actividad de sus componentes, los cuales hidrolizan celulosa.
- *El modo de interacción entre el sustrato, la enzima, y el organismo fermentativo.* La interacción enzima sustrato regula el grado de adsorción sobre el sustrato, y por lo tanto la velocidad de su reacción heterogénea.

Los modelos de tres reacciones utilizan ciertas consideraciones para facilitar su desarrollo y la estimación de los parámetros como son ^[11, 18, 19]:

- Debido a que la adsorción de celulosa es considerada rápida y tanto la celobiosa, glucosa y el etanol son moléculas pequeñas con una alta difusividad; no son consideradas limitaciones de transferencia de masa.
- Seguida a la adsorción, la celulosa escinde la celulosa (C) principalmente a cadenas cortas de oligosacáridos, así como la celobiosa (G_2) y glucosa (G). Sin embargo, porque la concentración de macromoléculas intermedias insolubles no pueden ser fácilmente determinados experimentalmente, el esquema de reacción es aún más simplificado por la consideración de una conversión directa de celulosa a celobiosa y glucosa.

Durante la hidrólisis, ambas enzimas están sujetas a la inhibición por producto. Estudios detallados han mostrado que la celulasa es inhibida por celobiosa, glucosa y etanol, mientras que la α -Glucosidasa es inhibida por glucosa [2][12][18][19].

La cantidad de celulasa adsorbida sobre las partículas de biomasa es una función del área efectiva de la celulosa (A_e), la cual es considerada proporcional a la concentración de la celulosa (C) y es determinada por cinética de adsorción en equilibrio [19].

El modelo propuesto por Philippidis (1993) para el proceso simultáneo de sacarificación y fermentación da cuenta además, de el decaimiento en la movilidad de la enzima y es representado por el término exponencial dependiente del tiempo ($e^{-\lambda t}$). La parte de fermentación puede ser descrita por (r_4) y la producción de masa celular (X) [19].

Tabla 4. Modelo cinético de la hidrólisis enzimática (Philippidis 1993)

Modelo	Balace de masa	Reacciones
Philippidis 1993	$\frac{dC}{dt} = -r_1 - r_3$ $\frac{dG_2}{dt} = 1,056r_1 - r_2$ $\frac{dG}{dt} = -1,111r_3 - 1,053r_2 - \frac{r_X}{Y_{XG}}$ $\frac{dX}{dt} = r_X = \mu_M \frac{G}{K_G + G} \frac{K_E}{K_E + E} X$ $E - E_0 =$ $0,511(1 - 1,559Y_{XG})[(G_0 - G)$ $+ 1,053(B_0 - B)$ $+ 1,111(C_0 - C)]$	$r_1 = \frac{k_1 * C * e^{-\lambda t} e_t e_c^*}{1 + \frac{G_2}{K_{1G_2}} + \frac{G}{K_{1G}}} \frac{K_{1E}}{K_{1E} + E} (1 - K_{1L}L)$ $r_2 = \frac{k_2 * G_2 * e_t e_g^*}{K_M \left(1 + \frac{G}{K_{2G}}\right) + G_2} (1 - K_{2L}L)$ $r_3 = \frac{k_3 * C * e^{-\lambda t} e_t e_c^*}{1 + \frac{G_2}{K_{1G_2}} + \frac{G}{K_{1G}}} \frac{K_{1E}}{K_{1E} + E} (1 - K_{1L}L)$

Fuente: Philippidis (1993)

Kadam *et al.* (2004) por otra parte, modeló el decaimiento en la velocidad de hidrólisis como función de la conversión y agregó el efecto inhibitorio por xilosa [14].

Tabla 5. Modelo cinético de la hidrólisis enzimática (Kadam *et al.* 2004)

Modelo cinético	Balace de masa	Reacciones
Kadam <i>et al.</i> 2004	$\frac{dC}{dt} = -r_1 - r_2$ $\frac{dG_2}{dt} = 1,056r_1 - r_3$ $\frac{dG}{dt} = 1,1116r_2 + 1,053r_3$ $E_{1T} = E_{1f} + E_{1b}$ $E_{2T} = E_{2f} + E_{2b}$	$r_1 = \frac{k_{1r} * E_{1b} * SR * C}{1 + \frac{G_2}{K_{11G2}} + \frac{G}{K_{11G}} + \frac{X}{K_{11X}}}$ $r_2 = \frac{k_{2r} * (E_{1b} + E_{2b}) * SR * C}{1 + \frac{G_2}{K_{21G2}} + \frac{G}{K_{21G}} + \frac{X}{K_{21X}}}$ $r_3 = \frac{k_{3r} * E_{2f} * G_2}{K_M \left(1 + \frac{G}{K_{31G}} + \frac{X}{K_{31X}} \right) + G_2}$

Fuente: Kadam *et al.* (2004)

Con una dependencia de la temperatura: $k_{ir(T2)} = k_{ir(T1)} * e^{\frac{-E_{ai}}{R \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)}}$

$$30^\circ\text{C} \leq T \leq 55^\circ\text{C}$$

Zheng (2007) basado en el modelo de kadam *et al.* (2004), modeló el proceso de adsorción de la enzima mediante una isoterma de langmuir.

Tabla 6. Modelo cinético de la hidrólisis enzimática (Zheng 2007)

Modelo cinético	Balace de masa	Reacciones
Zheng 2007	$\frac{dC}{dt} = -r_1 - r_2$ $\frac{dG_2}{dt} = 1,056r_1 - r_3$ $\frac{dG}{dt} = 1,1116r_2 + 1,053r_3$ $E_{1T} = E_{1f} + E_{1b}$ $E_{2T} = E_{2f} + E_{2b}$	$r_1 = \frac{k_{1r} * E_{1bc} * SR * C}{1 + \frac{G_2}{K_{11G2}} + \frac{G}{K_{11G}}}$ $r_2 = \frac{k_{2r} * E_{1bc} * SR * C}{1 + \frac{G_2}{K_{21G2}} + \frac{G}{K_{21G}}}$ $r_3 = \frac{k_{3r} * E_{2fL} * G_2}{K_M \left(1 + \frac{G}{K_{31G}} \right) + G_2}$

Fuente: Zheng (2007)

En donde la hidrólisis de celobiosa a glucosa (catálisis homogénea) es descrita por una expresión de Michaelis-Menten que incluye la inhibición por glucosa en - Glucosidasa [14,19, 25].

Los parámetros que pertenecen a la velocidad de hidrólisis de biomasa por el complejo de la enzima celulasa (k_1, k_2, k_3) son dependientes de la naturaleza del sustrato y la enzima. Como resultado necesitan ser determinados para cada sustrato y enzima de interés [19].

Por otro lado, los parámetros asociados con los efectos inhibitorios de celobiosa, glucosa y etanol sobre celulasa y α -Glucosidasa deberían ser en gran parte independientes de la naturaleza del sustrato empleado, y por tanto más universal para una enzima en particular [2][19].

Por otra parte el modelo propuesto por Suma Peri *et al.* 2006 considera además el rol negativo que tienen los oligosacáridos insolubles en la hidrólisis enzimática.

Tabla 7. Modelo cinético de la hidrólisis enzimática (Suma Peri *et al.* 2006)

Modelo cinético	Balance de masa	Reacciones
Suma Peri <i>et al.</i> 2006	$\frac{dC}{dt} = -r_1 - r_3$ $\frac{dG_2}{dt} = r_1 - r_2$ $\frac{dO}{dt} = r_3 - r_4$ $\frac{dG}{dt} = r_2 + r_4$	$r_1 = \frac{k_{1r} * C * E}{(K_C + C) \left[1 + \frac{G_2}{K_{IG2}} + \frac{O}{K_{OI}} + \frac{G^3}{K_{GIn}^3} \right] * (E + K_E)}$ $r_2 = \frac{k_{2r} * G_2 * E}{[K_M \left[1 + \frac{G}{K_{IG}} \right] + G_2] (E + K_E)}$ $r_3 = \frac{k_{3r} * C * E}{(K_C + C) \left[1 + \frac{G_2}{K_{IG2}} + \frac{O}{K_{OI}} + \frac{G^3}{K_{GIn}^3} \right] (E + K_E)}$ $r_4 = \frac{k_{4r} * O * E}{[K_O \left[1 + \frac{G}{K_{IG}} \right] + O] (E + K_E)}$

Fuente: Peri Suma (2006)

2.6. Estimación de parámetros

En general el problema a resolver en estimación de parámetros es el siguiente: “Dada una estructura del modelo y un conjunto de puntos medibles, el problema es encontrar los parámetros desconocidos del modelo así que los valores

calculados por el modelo coinciden con los datos de una manera óptima (por ejemplo minimizando la suma de los cuadrados de los errores)” [10].

La optimización es un proceso colectivo para encontrar el conjunto de condiciones requeridas para alcanzar los mejores resultados a partir de una situación dada.

2.7. Métodos heurísticos

Son herramientas de cálculo aproximadas que con frecuencia, simulan algún proceso natural [3, 17]. (Ver clasificación figura 14)

2.7.1. Algoritmo pikaia

Es una subrutina con propósito general basada en la optimización de un algoritmo genético [6]. Utiliza una distribución uniforme para generar una población inicial a cada uno de los n -parámetros normalizados a evaluar y un mecanismo estocástico de muestreo para seleccionar a los padres en cada iteración. Incorpora un operador de cruzamiento conocido como operador de cruce monopunto y un operador de mutación el cual contribuye a la diversidad de los individuos [3][7].

2.7.2. Algoritmo de recocido simulado (Simulated annealing—SA)

Es un algoritmo de aproximación a la solución óptima, fundado en una analogía del comportamiento de sistemas termodinámicos simples. Es un algoritmo de escalado de colinas estocástico (se elige a un sucesor de acuerdo a cierta distribución de probabilidad, el sucesor podría ser peor) [23].

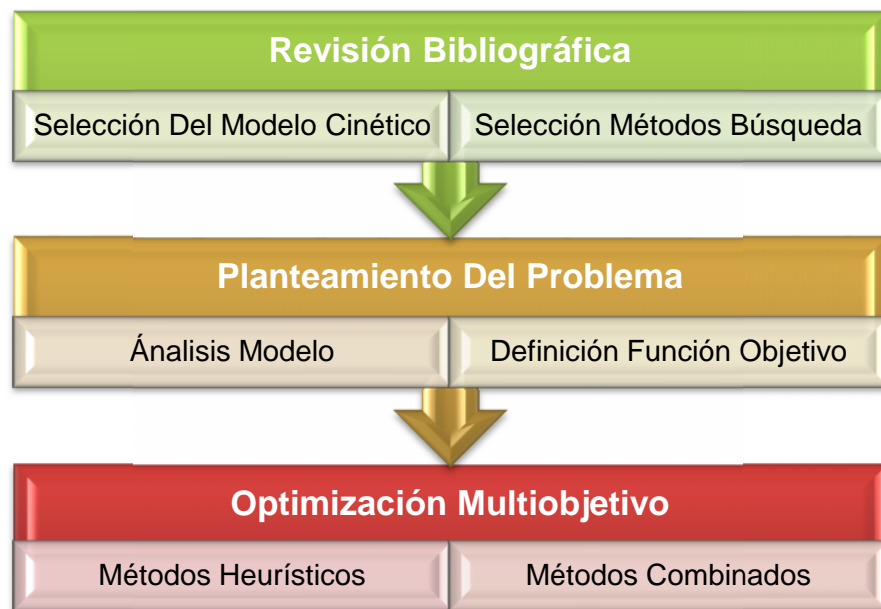
2.7.3. Algoritmo simplex

Es un algoritmo de búsqueda local, cuyo problema a resolver se podría resumir en: generar $n+1$ puntos equidistantes, un poliedro regular denominado simplex, luego generar un nuevo simplex seleccionando el vértice con el peor valor de la función objetivo y proyectándolo una distancia determinada a través de un punto equidistante denominado centroide [22].

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Se realizó una valoración de los modelos propuestos por los diferentes autores enfocados al diseño de reactores. De manera general, la metodología aplicada en la elaboración del presente trabajo puede describirse de acuerdo al siguiente diagrama:

Figura 1. Metodología de investigación



En la escogencia del modelo a optimizar, los criterios tomados en cuenta son los siguientes:

- *Complejidad del Modelo.* El modelo debe describir los perfiles de concentración de los productos en el mayor grado posible, para ello debe incluir aquellos aspectos que tengan el mayor impacto en la cinética de hidrólisis enzimática.
- *Portabilidad a diferentes sustratos.* El modelo debe permitir ser utilizado sin importar el sistema enzima- sustrato que se utilice. Además todos los parámetros en él, deben indicar en lo posible su significado físico.

El modelo cinético fue codificado y resuelto usando el compilador COMPAQ VISUAL FORTRAN. Tres métodos de búsqueda se emplearon, el primero de ellos un algoritmo evolutivo de búsqueda global llamado *PIKAIA 1.0* de código libre¹.

Se empleó además un algoritmo probabilístico pero basado no en una población (como es el caso de *Pikaia 1.0*) sino en una solución, haciendo analogía del proceso de enfriamiento en los metales, llamado *Simulated Annealing—SA*) con un código de acceso público².

Finalmente, se utilizó un algoritmo de búsqueda local, (*Método no lineal Simplex*) con el objeto de mejorar las soluciones en la vecindad próxima de la función objetivo. La integración se realizó mediante un algoritmo de Runge Kutta Fehlberg (ver anexo B y los códigos implementados).

Los datos utilizados para la optimización de los parámetros del modelo fueron obtenidos de acuerdo al trabajo publicado por Zheng (2007).

3.1. Modelo cinético

Como modelo cinético a optimizar se optó por un modelo de tres reacciones ya que describe bastante bien los perfiles de concentración de los productos sin exceder en su complejidad. De los tres modelos presentados anteriormente el decaimiento en la velocidad de hidrólisis como función de la conversión es más apropiada, modelo de Kadam *et al.* (2004) y Zheng (2007), mientras que el uso de tan solo dos constantes de inhibición Philippidis (1993) que afecten las dos reacciones heterogéneas es más adecuado.

3.1.1. Análisis del modelo cinético

Una constante de inhibición es un indicador del efecto inhibitorio que tiene una sustancia, en este caso un producto sobre la enzima. Si el valor de la constante es muy pequeño, del orden de 10^1 o menor, tendrá un gran impacto en la cinética

¹ Disponible en: <http://www.hao.ucar.edu/modeling/pikaia/pikaia.php>

² Disponible en: <http://e-groups.unb.br/iq/kleber/GSA/>

enzimática. A medida que el valor de la constante aumenta el efecto inhibitorio será moderado o débil. De acuerdo a Philippidis (1993) y Andri *et al.* (2010), la celobiosa exhibe un fuerte efecto inhibitorio sobre las celulasas mientras la glucosa muestra un efecto moderado. Sin embargo, la glucosa tiene un efecto de inhibición más fuerte sobre α -glucosidasa. De acuerdo a lo anterior se formula, con fines de ajuste de parámetros, por primera vez en este trabajo que:

$$K_{IG2} < K_{IG}$$

Del comportamiento del perfil de concentración de la celobiosa obtenemos:

$$\frac{dG_2}{dt} = 0$$

$$k_{1r} = \frac{(k_{3r} * E_{2fL} * G_2) * \left(1 + \frac{G}{K_{IG}}\right)}{\left[K_M * \left(1 + \frac{G}{K_{3IG}}\right) + G_2\right] * (E_{1bc} * SR * C)}$$

Donde:

$$SR = \frac{C}{C_0} = 1,007 \frac{C}{C_0}$$

G_2 , G y C son las concentraciones de celobiosa, glucosa y celulosa respectivamente donde la derivada es cero y el perfil presenta un máximo.

Generalmente la concentración de la enzima α -glucosidasa es lo suficientemente alta como para mitigar el efecto inhibitorio de celobiosa por lo cual, esta es hidrolizada rápidamente. Se tiene entonces la siguiente condición:

$$\frac{dG_2}{dt} > \frac{dG}{dt}$$

Cuando $t \rightarrow 0$

Desarrollando la desigualdad se obtiene:

$$\frac{K_{1r}}{1,056} > K_{2r} > 0$$

Es importante señalar que en la ejecución de los algoritmos, algunas evaluaciones de los parámetros pueden contener valores nulos con lo cual es recomendable renombrar las variables a expresiones que no incluyan división por cero.

3.2. Función objetivo

Una de las etapas críticas en el proceso de optimización y ajuste de parámetros tiene lugar en la formulación y definición de la función objetivo. La recomendación según Peter Englezos & Nicolas Karlogerakis es básicamente dirigirse a los datos y graficarlos, observando regiones donde las curvas presentan fluctuaciones que posiblemente no corresponda a la naturaleza del problema sino factores externos (*outliers*), por lo tanto, es aconsejable aproximar los datos a algún polinomio para facilitar su desarrollo.

El problema planteado puede ser representado como una función de \mathbf{x} el vector que representa las concentraciones de celulosa, celobiosa y glucosa y \mathbf{k} el vector que representa los parámetros.

$$F = f(\mathbf{x}, \mathbf{k}) \quad \text{Sujeto a} \quad \mathbf{k} > 0$$

De acuerdo a lo anterior, Se define la función objetivo en base a minimizar la suma de los cuadrados de los errores en el tiempo n , buscando la máxima correlación de los datos.

$$F_{obj} = \sum_{n=1}^{10} (ABS(G_n^{EXP} - G_n) + ABS(G2_n^{EXP} - G2_n))^2$$

Donde F_{obj} es el valor de la función objetivo, G_n^{EXP} , $G2_n^{EXP}$ representan la concentración de glucosa y celobiosa medidas experimentalmente, y los términos G_n y $G2_n$ son los valores estimados por integración.

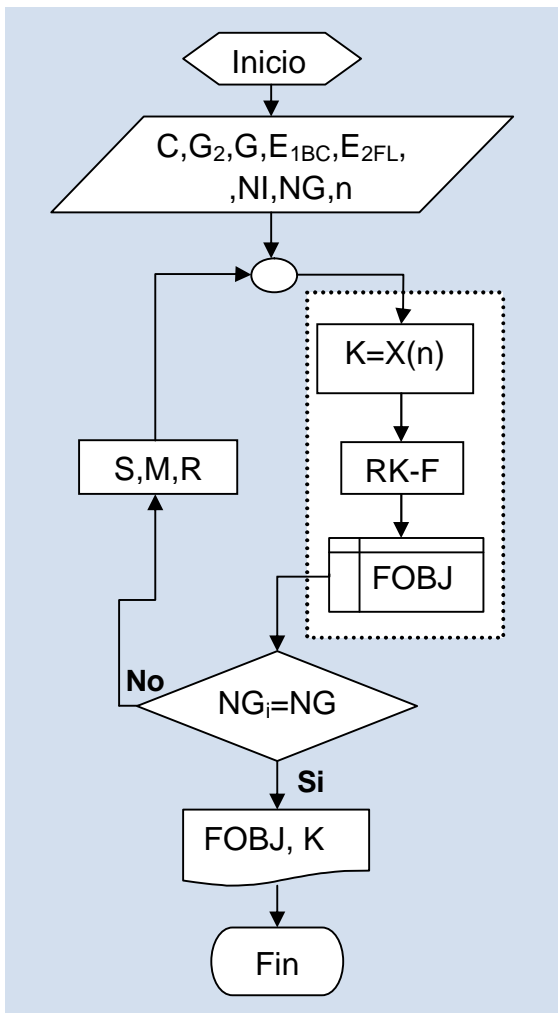
3.3. Optimización multiobjetivo

La estructura de programación adaptada al modelo cinético es descrita a continuación:

El proceso S.M.R descrito, hace referencia a los operadores del AG Selección/Mutación/Reproducción.

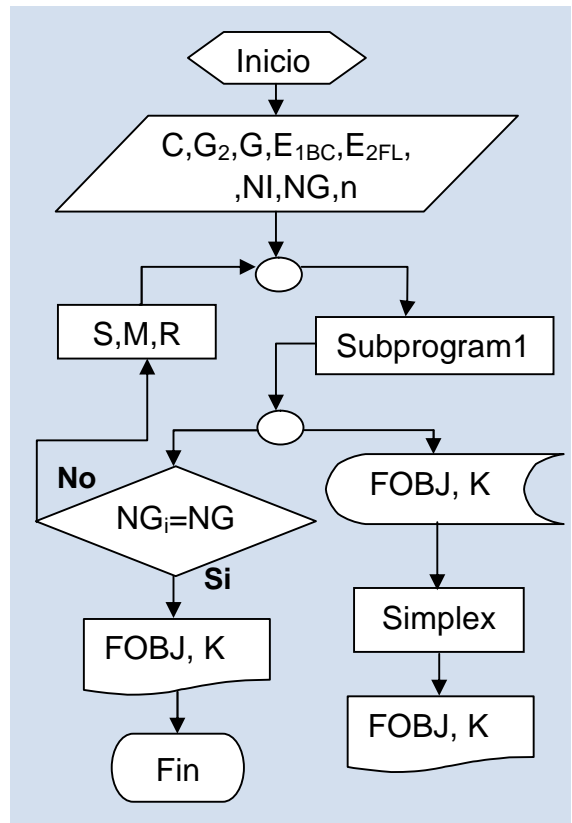
NI=100 NG= 1000 n=6

Tabla 8. Algoritmo Pikaia plan 1



NI=100 NG=300 n=6

Tabla 9. Algoritmo Pikaia-Simplex plan 2



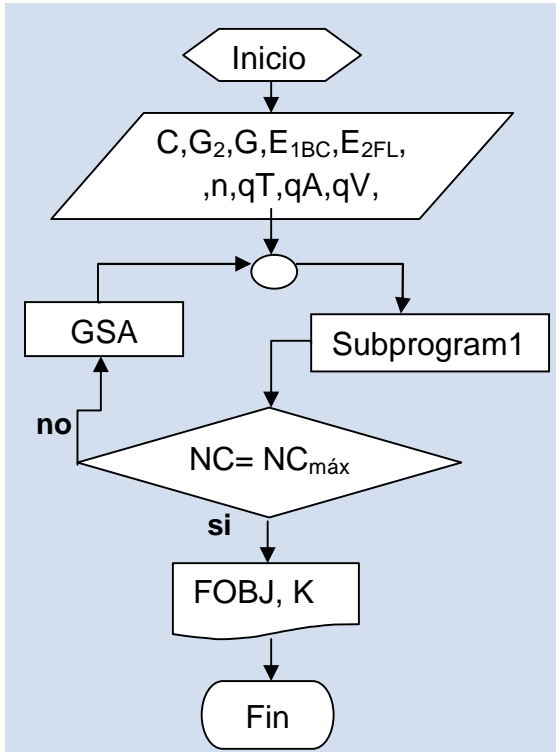
Los parámetros internos del algoritmo SA. se configuraron a ensayos de prueba y error. Los mejores resultados obedecen a la siguiente configuración.

qA=1,5 qT=1,3 qV=1,2

NC_{máx}=máx número bucles=1,5x10⁶

GSA: subrutina de búsqueda

Tabla 10. Algoritmo SA. plan 3



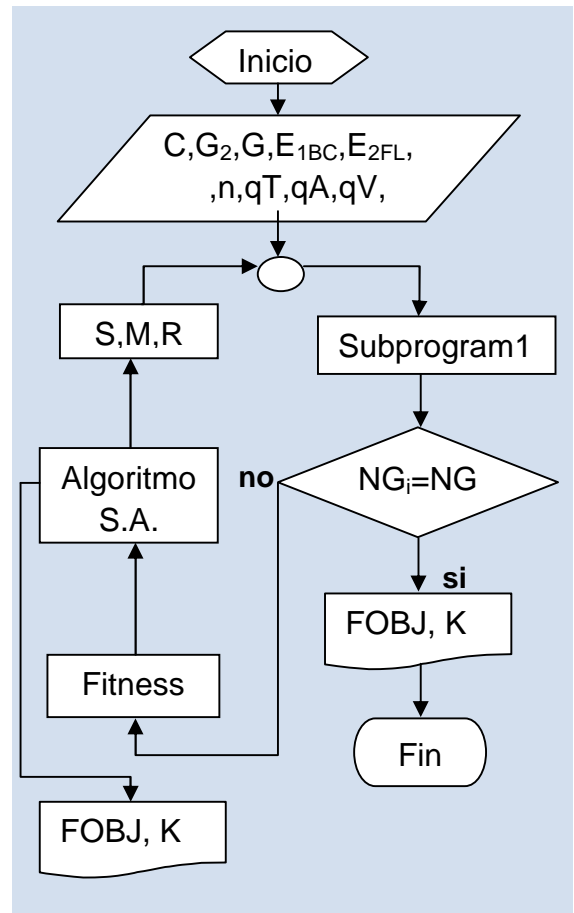
Se evaluó el desempeño del algoritmo de recocido simulado SA. como subrutina de cálculo en el algoritmo evolutivo, actuando como operador de reproducción en los individuos mejor adaptados de cada generación.

NI=80 NG=120 n=6

qA=1,5 qT=1,3 qV=1,2

NC_{máx}=máx número bucles=1,0x10³

Tabla 11. Algoritmo Pikaia-SA. plan 4



En cada una de las estrategias empleadas se utilizó un equipo de cómputo con las siguientes características:

Tabla 12. Características del pc

Procesador	AMD Athlon 64 X2 5400 GHz +2.86GHz
Memoria RAM	2GB

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

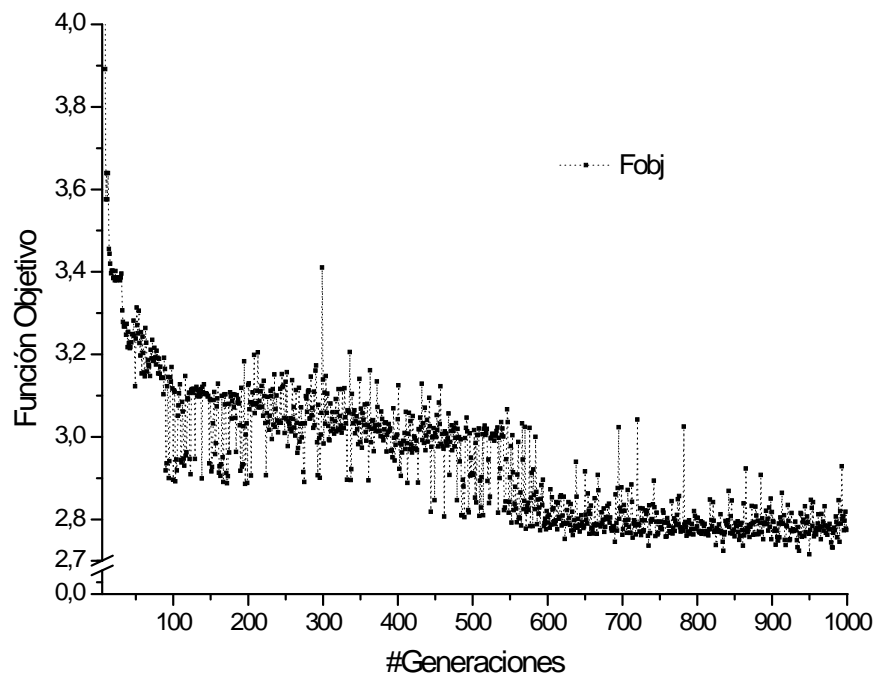
A continuación se presentan los resultados de las diferentes estrategias de búsqueda programadas.

Tabla 13. Resultados aplicando plan 1

Algoritmo	Parámetros							
	FOBJ	K1r	KIG2	KIG	K2r	K3r	K3M	K3IG
Pikaia	2,71504	19,22888	0,041234	0,06457	0,62221	641,27	49,963	1,75439

Tiempo de cómputo 5 horas.

Figura 2. Individuo con mejor adaptación de cada generación



Se observa que algunos individuos presentan peores soluciones con respecto al mejor individuo de la generación anterior, lo cual es atribuido al porcentaje de mutación empleado, que rompe las correlaciones entre genes que se hayan

formado, produciendo individuos con peor adaptación. Sin embargo evita que el algoritmo se estanque en soluciones locales.

Tabla 14. Resultados aplicando plan 2

Algoritmo	Parámetros							
	FOBJ	K1r	KIG2	KIG	K2r	K3r	K3M	K3IG
Pikaia Simplex	2,717941	8,293447	0,100336	0,154238	0,03393	260,2903	23,9667	2,27591

Tiempo de cómputo 46 horas. A pesar de un incremento significativo en la ejecución del algoritmo, la solución no mejoro con respecto al plan1.

Tabla 15. Resultados aplicando plan 4

Algoritmo	Parámetros							
	FOBJ	K1r	KIG2	KIG	K2r	K3r	K3M	K3IG
Pikaia-SA.	2,785724	38,61484	0,022445	0,033331	0,00067	523,1657	9,78178	0,37563

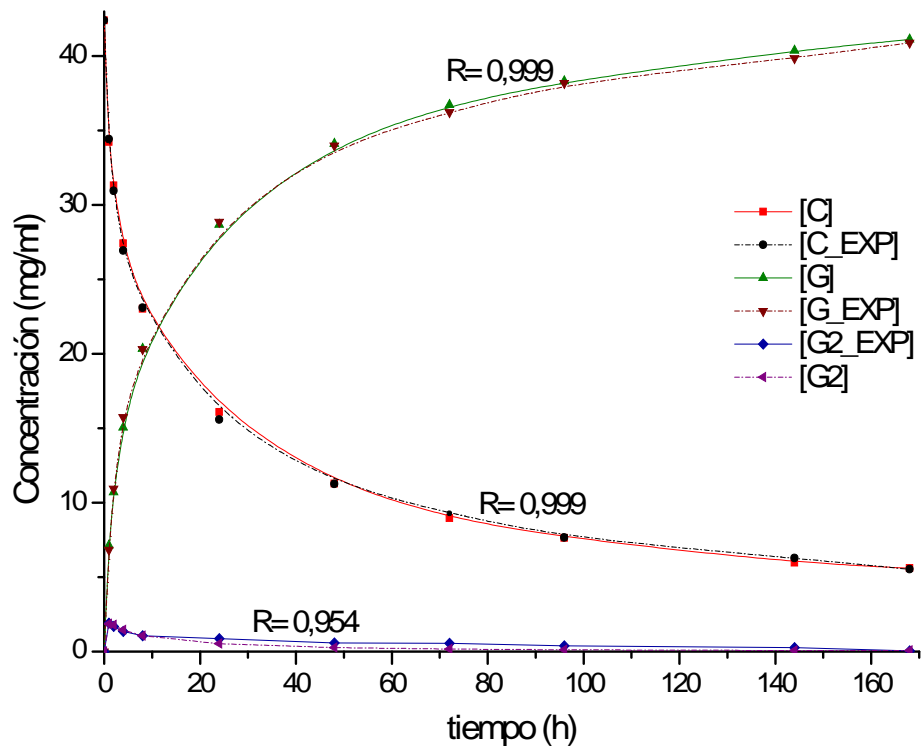
Tiempo de cómputo 10 horas. La razón de emplear una menor población y un menor número de generaciones, se basaba en que el algoritmo de recocido simulado, dirigiría a una mayor velocidad cada una de las soluciones entregadas por el Algoritmo evolutivo. Sin embargo, los resultados no son más satisfactorios.

Tabla 16. Resultados aplicando plan 3

Algoritmo	Parámetros							
	FOBJ	K1r	KIG2	KIG	K2r	K3r	K3M	K3IG
SA	2,6829	0,9068	1,4762	1,4764	0,0001	56,5391	0,3437	0,1274

Tiempo de cómputo 1 hora. Los mejores resultados en un tiempo aceptable se obtuvieron con la configuración del algoritmo de recocido simulado, indicando así que esta estrategia, para este tipo de problemas es la más eficiente.

Figura 3. Perfiles de concentración experimentales y estimados



De acuerdo al gráfico los perfiles de celulosa y glucosa muestran buen ajuste. Por otro lado el perfil de celobiosa ajustado, subestima las concentraciones en tiempos posteriores a 20 horas (figura 13). La causa probablemente se asocia a otros factores fenomenológicos que no considera el modelo.

4.1. Análisis de sensibilidad

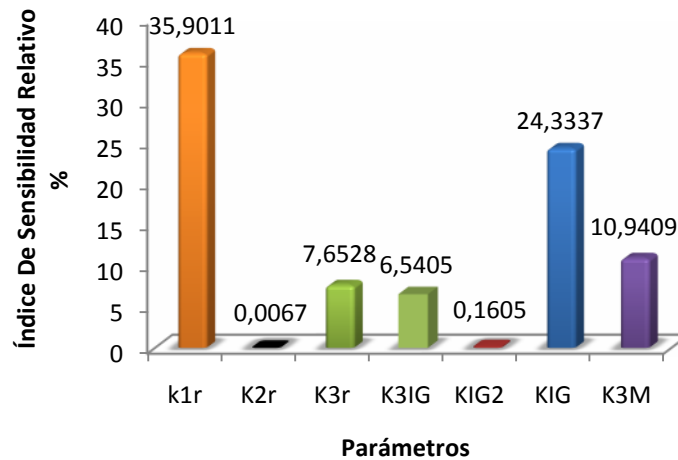
Se define la siguiente función como índice de sensibilidad relativo

$$F(x, t, k_j) = \left| \frac{F(k + \Delta k e_j) - F(k)}{F(k)} \right| \times 100\%$$

Donde, $F(x, t, k_j)$ representa el cambio porcentual de la función objetivo en el tiempo t como consecuencia de una variación Δk del parámetro k_j . e_j es el j -ésimo

vector unitario. La variación de k_j , se estableció en un 10%. El índice de sensibilidad se determinó para cada parámetro de manera independiente.

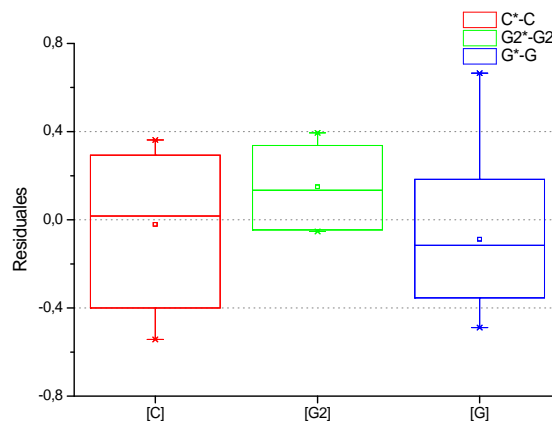
Figura 4. Influencia de los parámetros obtenidos en el modelo



Los resultados muestran que el parámetro con mayor influencia en el modelo optimizado es K_{1r} , lo cual muestra la importancia de la restricción impuesta, dada por el comportamiento del perfil de celobiosa. Por otra parte, el parámetro K_{2r} es quien aporta menos información al sistema con un índice de sensibilidad porcentual inferior al 0,01% lo cual indica que debe ser reestructurado.

4.2. Análisis de Residuales

Figura 5. Distribución de los residuales de los perfiles estimados

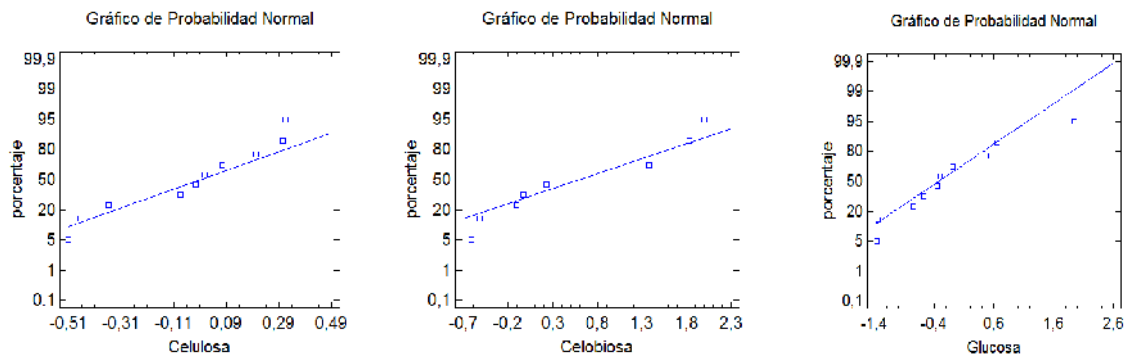


Se observa un ajuste aceptable en los perfiles de glucosa y celulosa. No obstante, el perfil de celobiosa exhibe una distribución sesgada y por tanto un mal ajuste. Este resultado de hecho, confirma que uno de los parámetros de la ecuación de velocidad de hidrólisis (celulosa a celobiosa) no aporta mayor información al sistema y como consecuencia es dudosa la capacidad del modelo para hacer extrapolaciones fuera de los datos de ajuste.

El residual estandarizado se define como la diferencia del residual y la desviación estándar

$$\frac{Y - \hat{Y}}{\sigma}$$

Figura 6. Distribución de los Residuales vs distribución normal



De acuerdo a la dispersión de los residuales, ninguna curva se ajusta a una distribución normal además en las tres curvas, los residuales están más lejos en el límite superior mostrando un comportamiento atípico.

5. CONCLUSIONES

- El modelo cinético es deficiente al tratar de describir el comportamiento de la celobiosa. A pesar de haber utilizado varias estrategias de optimización, algunas con mejores resultados que otras, se hace evidente en considerar alguna otra estructura matemática que describa el perfil de celobiosa.
- El parámetro k_{2r} (constante de velocidad de hidrólisis de celulosa a celobiosa) no aporta mayor información al sistema, lo cual indica que este parámetro debería ser redefinido o su modelamiento reestructurado ya que sería la causa del mal ajuste que presenta el perfil estimado de la celobiosa.
- La optimización de los parámetros utilizando algoritmos heurísticos dependerá de cómo se defina la función objetivo, la adecuada elección de los datos (ya sea mediante un suavizado por aproximación a algún polinomio) y de la naturaleza del problema, así que es necesario considerar diferentes estrategias, cada una, con distintas filosofías de búsqueda para alcanzar el óptimo aunque probablemente el óptimo no sea posible.

BIBLIOGRAFÍA

1. ANDRI , Pavle, MEYER, Anne S., JENSEN, Peter A., DAM-JOHANSEN, Kim. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocelluloses hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology Advances* No 28. 2010. 308-312p.
2. ANDRI , Pavle, MEYER, Anne S., JENSEN, Peter A., DAM-JOHANSEN, Kim. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors. *Biotechnology Advances* No 28. 2010. 408-409p.
3. ARAUJO, Lourdes. *Algoritmos Evolutivos: un enfoque práctico*. Primera Edición. Editorial Alfaomega. 2009.19-20p.
4. BANSAL, Pradbuddh, Hall, Mélanie, REALFF, Matthew J., LEE, Jay H. BOMMARIUS, andreas S. . Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances* No 27. 2010. 834p
5. BENEDETTI OIB, R, Rathmann, AD, Padula, GP, Steinhorst. Usage competition between oilseeds and biofuels: impact assessment on the Brazilian food production. In: 17th annual world food and agribusiness forum and symposium – IFAMA, Parma; 2007.
6. BURDEN L, Richard y Douglas Faires, J.. *Análisis numérico*. séptima edición. 282-287p

7. CHARBONNEAU, Paul y KNAPP, Barry. A user's guide to Pikaia 1.0. 1995. 11-18p.
8. CUERVO, Laura, FOLCH, Jorge Luis, QUIROZ, Rosa Estela. Lignocelulosa Como Fuente De Azucres Para La Producción De Etanol. Volumen 13 Numero 3. Revista De La Sociedad Mexicana De Biotecnología Y Bioingeniería A.C. 2009. 12p.
9. European Commission. Biofuels in the European Union: a vision for 2030 and beyond. Final report of the biofuels research advisory council. Disponible en: <<http://www.biofuelstp.eu/downloads/2061rep.pdf>> [citado el 10 de octubre 2010].
10. ENGLEZOS, Peter y KALOGERAKIS, Nicolas. Applied parameter estimation for chemical engineers. 2001. 3,132,133p
11. GAN, Q. . ALLEN, S. J. . TAYLOR, G. . Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview, an experimental study and mathematical modeling. Process Biochemistry, Vol. 38, No 7. 2003. 1003-1004p,1005-1008p
12. GONZÁLEZ Quiroga, Arturo. Modelagem, simulação e Análise de Reactores Contínuos Para a Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana. Tesis de maestría. 2009. 23,40p
13. HILL, Jason. NELSON, Erik. TILMAN, David. POLASKY, Stephen. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and

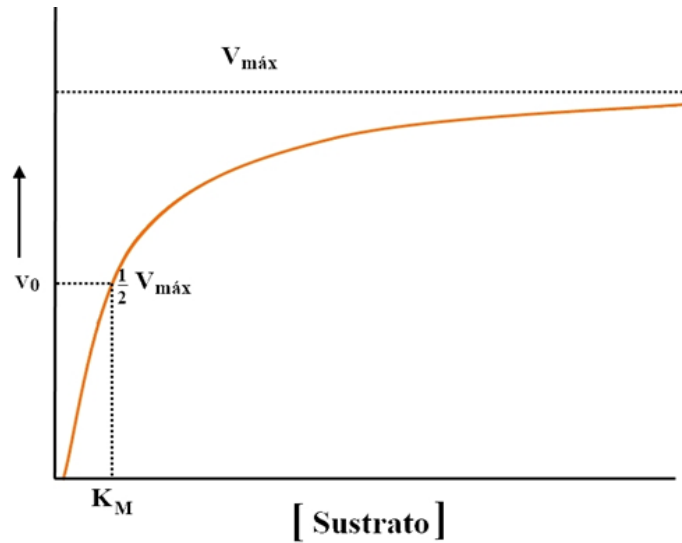
ethanol biofuels. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006. 103(30):11206–10

14. KADAM, Kiran L. RYDHOLM, Eric C. McMILLAN, James D. Development and validation of kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biotechnology progress*, Vol 20. 2004. 699-700p
15. LEHNINGER L., Albert. *Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular*. segunda edición. 1978. 195-203p
16. NAKAO, K., FUKUNAGA, K., YASUDA Y., KIMURA, M.. Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics with Continuous Irradiation of Supersonic Wave. 1990. 805p
17. PÉREZ LÓPEZ, Jesús Ramón. *Contribución A Los Métodos De Optimización Basados En Procesos Naturales Y Su Aplicación A La Medida De Antenas En Campo Próximo*. Universidad De Cantabria. Tesis doctoral. 2005. 1-3p
18. PERI, Suma. *Kinetic Investigation And Modeling Of Cellulase Enzyme Using Non-Crystalline Cellulose And Cello-Oligosaccharides*. Tesis de maestría. 2006. 11,12,49,50p
19. PHILIPPIDIS P, George. *Cellulose bioconversion technology. Handbook on bioethanol*. 1993. 256-261,264-271p
20. RATHMANN, Régis, SZKLO, Alexandre, SCHAEFFER, Roberto. Land use competition for production of food and liquid biofuels: An analysis of the arguments in the current debate. *Renewable energy* vol. 35. 2010. 14-16p

21. SIMS E.H.; Ralph, MABEE, Warren, SADDLER, Jack N., TAYLOR, Michael. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioreosurce Technology*. *Bioreosurce Technology* vol. 101. 2010. 1570-1580p
22. SCENNA, Nicolas Jose *et al.* Modelado, simulación y optimización de procesos químicos. 461-462p
23. VÁZQUEZ, Mariano. Recocido Simulado: un nuevo algoritmo para la optimización de estructuras. 1994. 1-8p
24. ZHENG, Yi, PAN, Zhongli, ZHANG, Ruihong, JENKINS, Bryan M.. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. *Biotechnology and Bioengineering*. vol 102. 2009.
25. ZHENG, Yi. Kinetic Modeling Of Enzymatic Saccharification And Particleboard Characteristics Of Saline Biomass. Tesis doctoral 2007. 167-170, 184-186, 320p

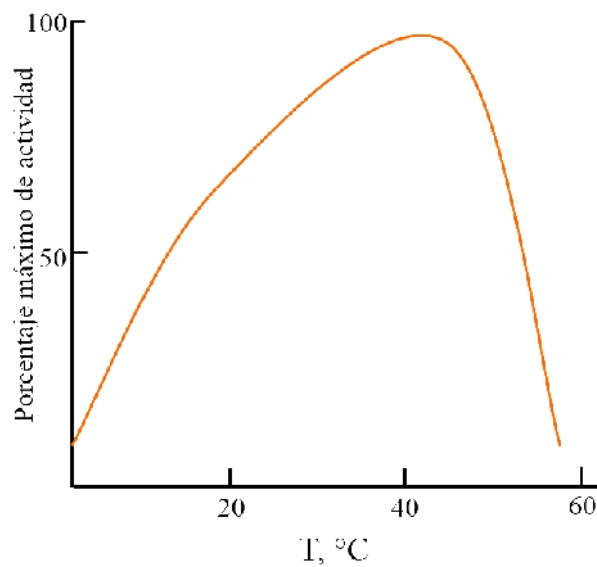
ANEXO A
Figuras De Referencia

Figura 7. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente.



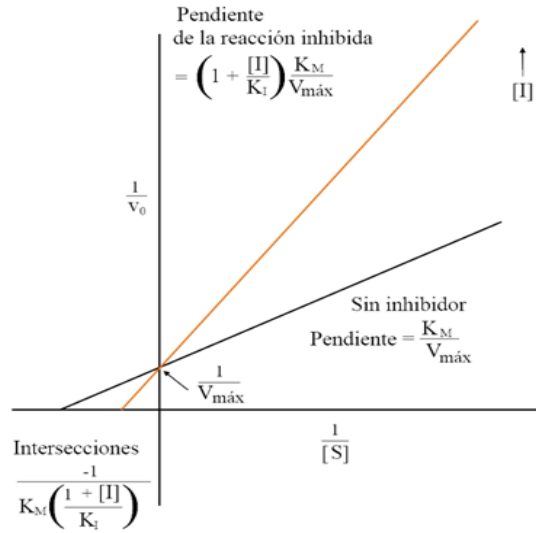
Fuente: Lehninger L (1978) 195p

Figura 8. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima. La porción descendente de la curva se debe a la desnaturalización térmica.



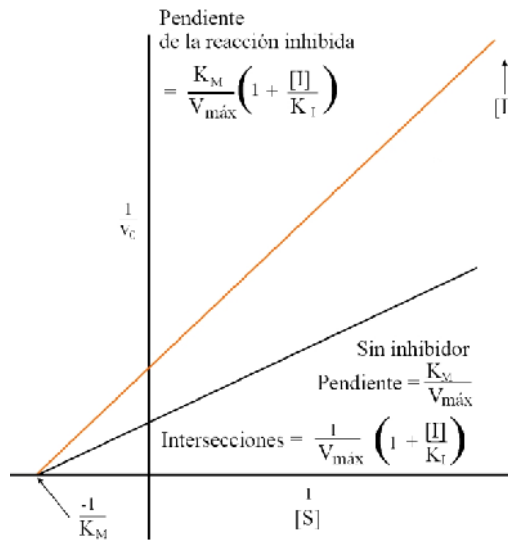
Fuente: Lehninger L (1978) 203p

Figura 9. Representación doble recíproca que representa la inhibición competitiva



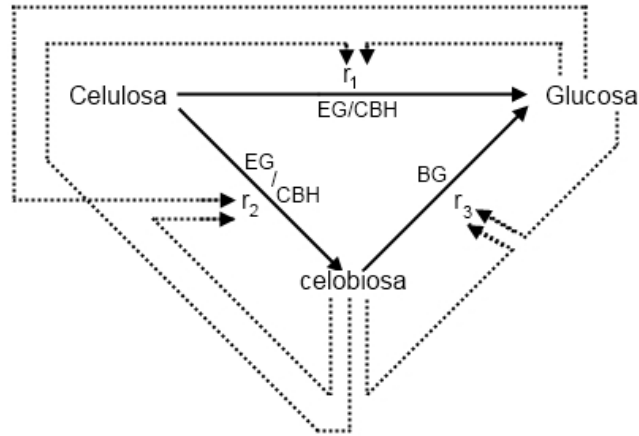
Fuente: Lehninger L (1978) 205p

Figura 10. Representación doble recíproca que representa la inhibición no competitiva



Fuente: Lehninger L (1978) 205p

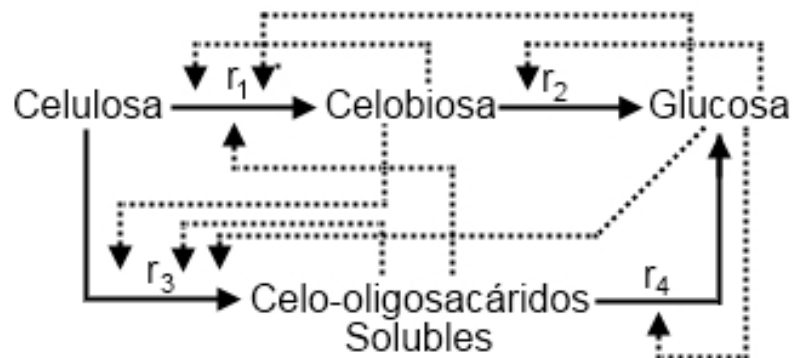
Figura 11. Esquema de reacción para el modelamiento de hidrólisis enzimática de tres reacciones



Fuente: Zheng, Yi (2007) 182p

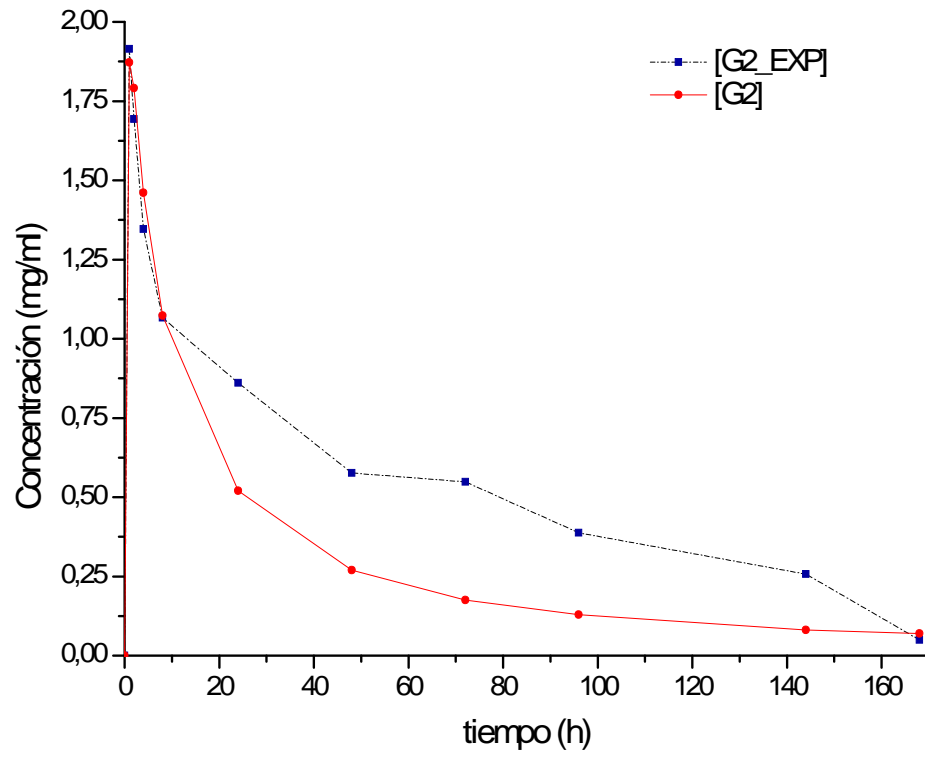
Las enzimas que envuelven a r_1 y r_2 son celulasas (EG y CBH); la enzima que envuelve a r_3 es la β -Glucosidasa. Las líneas solidas con flechas indican la ruta de reacción mientras que las líneas punteadas muestran la inhibición de azucares sobre las correspondientes enzimas.

Figura 12. Esquema de reacción para el modelamiento de hidrólisis enzimática de cuatro reacciones



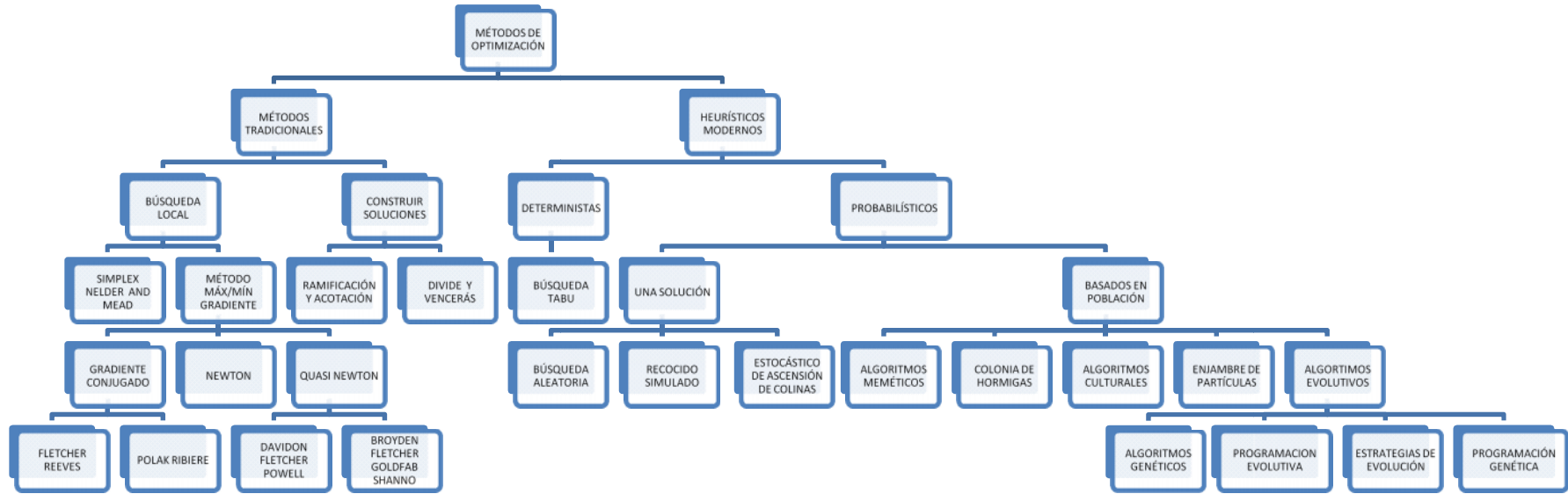
Fuente: Peri suma (2006) 49p

Figura 13. Perfil De concentración de celobiosa estimado



Fuente: Los autores

Figura 14. Métodos de optimización



Fuente: Pérez López, Jesús Ramón (2005) 2p

Anexo B
Códigos Implementados

B.1. Runge Kutta Fehlberg—RK-F

```
MODULE RK
! NE = NUMERO DE VARIABLES
INTEGER NE,NG,NI
PARAMETER (NE=3)
PARAMETER (NI=100)
PARAMETER (NG=1000)
REAL E1BC,E2FL,K1r,KIG2,KIG,K2r,K3r,K3M,K3IG,ALFA,SR,h
REAL ERROR_G2(10) , ERROR
REAL Y1(10), Y2(10), Y3(10), fobj, YT(10,3)
! Matriz Funcion Objetivo, Longitud Numero De Individuos X Numero De Generaciones
! REAL VFOBJ(#generaciones,#individuos+1 SI 1),VECT(#generaciones,1)
REAL VFOBJ(NG,NI),VECT(NG,1),MINFOBJ,K1IGPRIME, FUNOBJ
INTEGER CC,LL,MM,i
REAL KIGPRIME, KIG2PRIME, K3IGPRIME, FOBJS,XRESP
END MODULE

PROGRAM FEHLBERG
Use RK
Implicit None
INTEGER BAND,ii,jj,kk
REAL Y(NE),DYDT(NE)
REAL tdata(11),C_EXP(11),G2_EXP(11),G_EXP(11)

! Variables Runge Kutta Fehlberg
REAL t,hmax,hmin
REAL K1(NE),K2(NE),K3(NE),K4(NE),K5(NE),K6(NE)
REAL Z(NE),R(NE),TOL,RES,DELTA,TEND

! Subrutina De Las Ecuaciones Diferenciales
EXTERNAL DEV

!DATOS EXPERIMENTALES
DATA tdata/0.0,1.0,2.0,4.0,8.0,24.0,48.0,72.0,96.0,144.0,168.0/
DATA C_EXP/42.40,34.43,30.94,26.94,23.10,15.59,11.26,9.27,7.65,6.27,5.53/
DATA G2_EXP/0.00,1.9149,1.6938,1.3460,1.0667,0.8611,0.5765,0.5488,0.3871,0.2570,0.0500/
DATA G_EXP/0.00,6.84,10.95,15.76,20.32,28.88,33.99,36.23,38.20,39.87,40.91/

!CONDICIONES INICIALES
E1BC = 1.19
E2FL = 0.88
ALFA = 1.007

! Parametros CINETICOS A Evaluar. Nota: Cuando se utiliza el algoritmo Pikaia los
! parámetros son evaluados de acuerdo a la siguiente configuración. En el caso de utilizar el
! algoritmo SA o simplex la configuración deberá ser X() y P() respectivamente.
K3IGPRIME = X(1)*100 ! X(1) / P(1)
KIG2PRIME = X(2)*100 ! X(2) / P(2)
KIGPRIME = X(3)*100 ! X(3) / P(3)
K3r = X(4)*1000 ! X(4) / P(4)
K3M = X(5)*100 ! X(5) / P(5)
```

```

IF (K3M .EQ. 0.0) THEN
K3M=1E-32
END IF

```

```

! Restricciones Del Sistema
! Cuando dG2/dt=0 EN t=tmáx

```

```

k1r=((k3r*E2FL*G2_EXP(2))*(1+KIG2PRIME*G2_EXP(2)+KIGPRIME*G_EXP(2)))/((K3M*(1+K3IG
PRIME*G_EXP(2))+G2_EXP(2))*(1.056*E1BC*C_EXP(2)*(1.007*C_EXP(2)/C_EXP(1))))

```

```

! Restricción #2
! Cuando LIM t tiende a cero dG2/dt > dG/dt

```

```

K2r = X(6)*(K1r/1.056)      ! X(6) / P(6)

```

```

!TAMAÑO DE PASO
      hmax=0.05
      hmin=1E-6
      TOL=1E-4

```

```

t=0.0

```

```

DO jj=1,10
      h=hmax
      BAND =1

      SR      =      ALFA*C_EXP(jj+1)/C_EXP(1)
      Y(1)    =      C_EXP(jj)
      Y(2)    =      G2_EXP(jj)
      Y(3)    =      G_EXP(jj)
      !TEND VALOR ESPERADO DE t
      TEND    =      tdata(jj+1)

```

```

! Bucle Interno
DO WHILE (BAND .EQ. 1 )

```

```

      CALL DEV(t,Y,DYDT)
      DO ii=1,NE
      K1(ii) = h*DYDT(ii)
      END DO

```

```

      CALL DEV((t+0.25*h),(Y+0.25*K1),DYDT)
      DO ii=1,NE
      K2(ii) = h*DYDT(ii)
      END DO

```

```

      CALL DEV((t+(3.0/8.0)*h),(Y +(3.0/32.0)*K1+(9.0/32.0)*K2),DYDT)
      DO ii=1,NE
      K3(ii) = h*DYDT(ii)
      END DO

```

```

      CALL DEV((t+(12.0/13.0)*h),(Y +(1932.0/2197.0)*K1- (7200.0/2197.0)*K2 +
(7296.0/2197.0)*K3),DYDT)

```

```

DO ii=1,NE
K4(ii) = h*DYDT(ii)
END DO

CALL DEV((t+h),(Y +(439.0/216.0)*K1-8.0*K2+(3680.0/513.0)*K3-
(845.0/4104.0)*K4),DYDT)
DO ii=1,NE
K5(ii) = h*DYDT(ii)
END DO

CALL DEV((t+0.5*h),(Y - (8.0/27.0)*K1+2.0*K2-(3544.0/2565.0)*K3+(1859.0/4104.0)*K4-
(11.0/40.0)*K5),DYDT)
DO ii=1,NE
K6(ii) = h*DYDT(ii)
END DO

R(1)=(1.0/h)*ABS((1.0/360.0)*K1(1)-(128.0/4275.0)*K3(1)-(2197.0/75240.0)*K4(1) +
(1.0/50.0)*K5(1) + (2.0/55.0)*K6(1))
R(2)=(1.0/h)*ABS((1.0/360.0)*K1(2)-(128.0/4275.0)*K3(2)-(2197.0/75240.0)*K4(2) +
(1.0/50.0)*K5(2) + (2.0/55.0)*K6(2))
R(3)=(1.0/h)*ABS((1.0/360.0)*K1(3)-(128.0/4275.0)*K3(3)-(2197.0/75240.0)*K4(3) +
(1.0/50.0)*K5(3) + (2.0/55.0)*K6(3))

RES=MAXVAL(R)

SENTENCIA_3: IF (RES .LE. TOL) THEN

!Aproximacion Aceptada
t=t+h

Y(1) = Y(1) + (25.0/216.0)*K1(1) + (1408.0/2565.0)*K3(1)+(2197.0/4104.0)*K4(1)-(1.0/5.0)*K5(1)
Y(2) = Y(2) + (25.0/216.0)*K1(2) + (1408.0/2565.0)*K3(2)+(2197.0/4104.0)*K4(2)-(1.0/5.0)*K5(2)
Y(3) = Y(3) + (25.0/216.0)*K1(3) + (1408.0/2565.0)*K3(3)+(2197.0/4104.0)*K4(3)-(1.0/5.0)*K5(3)

! SALIDA (t,Y,h)

ELSE

DELTA=0.84*(TOL/RES)**(0.25)

SENTENCIA_5: IF (DELTA .LE. 0.1) THEN
h=0.1*h
ELSE IF (DELTA .GE. 4.0) THEN
h=4*h
ELSE
h= DELTA*h
END IF SENTENCIA_5

SENTENCIA_6: IF (h .GT. hmax) THEN
h=hmax
ELSE IF (h .LT. hmin) THEN
BAND=0
END IF SENTENCIA_6

```

END IF SENTENCIA_3

```
IF ((t+h) .GT. TEND) THEN
h= TEND-t
END IF
```

```
IF (t .GE. TEND) THEN
BAND =0
END IF
```

END DO

!ALMACENAMIENTO DE LAS SOLUCIONES Y1,Y2,Y3

```
Y1(jj) = Y(1)
Y2(jj) = Y(2)
Y3(jj) = Y(3)
```

END DO

! Cálculo Del Error Entre Soluciones Y Datos Experimentales En Un Tiempo t

```
DO kk=1,10
ERROR_G2(kk)= (ABS(G2_EXP(kk+1) - Y2(kk)) + ABS(G_EXP(kk+1) - Y3(kk)))**2
END DO
```

```
ERROR = SUM(ERROR_G2)
```

!MATRIZ DATOS RESPUESTA RUNGE-KUTTA

```
OPEN(UNIT=1, FILE='INTEGRACION.txt', STATUS='REPLACE')
WRITE(1,((10X,A3),(13X,A3),(13X,A3),(10X,A24)))" [C] ", "[G2] ", "[G]"
```

```
DO i=1,10
YT(i,1)=Y1(i)
YT(i,2)=Y2(i)
YT(i,3)=Y3(i)
```

```
WRITE(1, "(3(F16.6))") YT(i,1:3)
END DO
```

```
WRITE(1, "(/ (2X,A11))") "ERROR"
WRITE(1, "(F16.6)") ERROR
```

END PROGRAM FEHLBERG

! Ecuaciones De Balance De Masa En Función De Las Concentraciones

SUBROUTINE DEV(t,Y,DYDT)

Use RK

Implicit None

REAL dydt(NE),Y(NE)

REAL t

```
DYDT(1) = -(K1r*E1BC*SR*Y(1))/(1+(Y(2)/K1IG2)+(Y(3)/K1IG)) -
(K2r*E1BC*SR*Y(1))/(1+Y(2)/K2IG2+(Y(3)/K2IG))
```

```
DYDT(2) = 1.056*((K1r*E1BC*SR*Y(1))/(1+(Y(2)/K1IG2)+(Y(3)/K1IG))) -
(K3r*E2FL*Y(2))/(K3M*(1+(Y(3)/K3IG))+Y(2))
```

```
DYDT(3) = (1.053*1.056)*((K2r*E1BC*SR*Y(1))/(1+Y(2)/K2IG2+(Y(3)/K2IG))) +
1.053*((K3r*E2FL*Y(2))/(K3M*(1+(Y(3)/K3IG))+Y(2)))
```

```
RETURN
END SUBROUTINE DEV
```

B.2. Programa Pikaia

```
PROGRAM xpkaia
```

```
USE RK
```

```
! Code converted using TO_F90 by Alan Miller
```

```
! Date: 2001-07-09 Time: 20:44:01
```

```
USE Genetic_Algorithm
```

```
IMPLICIT NONE
```

```
INTEGER :: seed, STATUS
```

```
INTEGER, PARAMETER :: n = 6 ! Número de parámetros a evaluar
```

```
REAL :: ctrl(12), x(n), f
```

```
INTERFACE
```

```
FUNCTION HEML(n, x) RESULT(fn_val)
```

```
IMPLICIT NONE
```

```
INTEGER, INTENT(IN) :: n
```

```
REAL, INTENT(IN) :: x(:)
```

```
REAL :: fn_val
```

```
END FUNCTION HEML
```

```
END INTERFACE
```

```
! (HEML función objetivo a optimizar)
```

```
! Primero, initialize the random-number generator
```

```
WRITE (*, '(A)', ADVANCE='NO') ' NUMERO DE SEMILLAS ALEATORIAS (I*4)? '
```

```
READ (*,*) seed
```

```
CALL rninit(seed)
```

```
! Set control variables (use defaults)
```

```
ctrl(1:12) = -1
```

```
ctrl(2) = 50
```

```
! Set control variables (user defined)
```

```
ctrl( 1) = NI !number of individuals in a population (default is 100)
```

```
ctrl( 2) = NG !5000 !number of generations over which solution is to evolve (default is 500)
```

```
ctrl( 4) = 0.85 !crossover probability; must be <= 1.0 (default is 0.85)
```

```
ctrl( 5) = 2 !mutation mode; 1/2=steady/variable (default is 2)
```

```
ctrl( 6) = 0.005 !initial mutation rate; should be small (default is 0.005)
```

```
!(Note: the mutation rate is the probability that any one
```

```
!gene locus will mutate in any one generation.)
```

```
ctrl( 7) = 0.0005 !minimum mutation rate; must be >= 0.0 (default is 0.0005)
```

```

ctrl( 8) = 0.05 !maximum mutation rate; must be <= 1.0 (default is 0.25)
ctrl(10) = 2   !reproduction plan; 1/2/3=Full generational
              !replacement/Steady-state-replace-random/Steady-
              !state-replace-worst (default is 3)

```

```

! Now call pikaia
CALL pikaia(HEML,n,ctrl,x,f,STATUS)

```

```

! Print the results
DO MM=1,NG
VECT(MM,1)= MINVAL(VFOBJ(MM,1:NI))
END DO

```

```

OPEN(UNIT=2, FILE='RESULT.txt', STATUS='REPLACE')
WRITE(2,"(2X,A5)"FOBJ"
WRITE(2,"(F10.6)"VECT

```

```

OPEN(UNIT=3, FILE='PARAMTEROS.txt', STATUS='REPLACE')
WRITE(3,"(2(9X,A5),2(12X,A5),4(10X,A5))"FOBJ",K1r,"X(1)","X(2)","X(3)","X(4)","X(5)","X(6)"
WRITE(3,'(9F16.6)'1/f,K1r,X

```

```

WRITE (*,*) ' status: ', STATUS
WRITE (*,*) '   x: ', x
WRITE (*,*) '   f: ', f

```

```

STOP

```

```

5000 FORMAT (' ctrl: ', 6F9.5 / t11, 6F9.5)
END PROGRAM xpkaiia

```

```

FUNCTION HEML(n,x) RESULT(fn_val)
Use RK
IMPLICIT NONE
! Input:
INTEGER, INTENT(IN) :: n
REAL, INTENT(IN)    :: x(:)
! Output
REAL                :: fn_val
! Local

```

```

!*****

```

! PROGRAM FEHLBERG utiliza el mismo código que RK-F a partir de declaración de variables hasta cálculo del error, seguido, las siguientes líneas son escritas.

```

fobj          = fobj  + ERROR
fn_val        = 1.0/fobj

```

```

IF (CC .GT. 2) THEN

```

```

LL=LL+1      ! indica el individuo a evaluar

```

```

IF (LL .EQ. (NI+1)) THEN
LL=1
END IF

```

```

VFOBJ(CC,LL)=fobj
IF (LL .EQ. 1 ) THEN
MINFOBJ= MINVAL(VFOBJ((CC),1:(NI)))      ! matriz de las mejores soluciones
END IF
IF(FOBJ.LT. MINFOBJ) THEN
!MATRIZ DATOS RESPUESTA RUNGE-KUTTA
OPEN(UNIT=1, FILE='INTEGRACION.txt', STATUS='REPLACE')
WRITE(1,"((10X,A3),(13X,A3),(13X,A3),(10X,A24))") "[C]", "[G2]", "[G]", "#GENERACIONES/#INDIVI
DUO"
DO i=1,10
YT(i,1)=Y1(i)
YT(i,2)=Y2(i)
YT(i,3)=Y3(i)
WRITE(1,"(3(F16.6))") YT(i,1:3)
END DO
WRITE(1,"/(2X,A11))") "FOBJ"
WRITE(1,"((F16.6),(43X,I4),(9X,I3)//)") FOBJ,CC,LL
OPEN(UNIT=4, FILE='PARAMETROS2.txt', STATUS='REPLACE')
WRITE(4,"(8(X,A10),(2X,A24))") "FOBJ", "K1r", "KIG2", "KIG", "K2r", "K3r", "K3M", "K3IG", "#GENERACI
ONES/#INDIVIDUO"
WRITE(4,"(8(X,F10.6),(6X,I4),(9X,I3)//)")
FOBJ,K1r,(1.0/KIG2PRIME),(1.0/KIGPRIME),K2r,K3r,K3M,(1.0/K3IGPRIME),CC,LL
END IF
END IF
¡END PROGRAM FEHLBERG esta línea no se escribe
!*****
RETURN
END FUNCTION HEML

```

B.3. Simulated annealing

```

Use RK
IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
PARAMETER (MaxDim=500)
COMMON /Xvector/ X_t(Maxdim), X_0(Maxdim), X_Min(Maxdim)
COMMON /Par1/ qV1,qV2,qA1,qT1,D,exp1,exp2,Coef,Tqt,To,ToScale
COMMON /Par2/ qA,qV,qT
COMMON /Par3/ NDimension,NStopMax,NRAN
common /datos/ R(1000), fexp(1000), npontos

```

```
NRAN = 33
```



```

!RESTRICCION EXTERNA
IF (K3IGPRIME .LE. 0.0 .OR. KIG2PRIME .LE. 0.0 .OR. KIGPRIME .LE. 0.0 .OR. K3r .LE. 0.0 .OR.
K3M .LE. 0.0 .OR. K2r .LE. 0.0) THEN
ERROR = 100*ERROR
END IF

IF (KIG2PRIME .LT. KIGPRIME .OR. K2r .GT. (K1r/1.056)) THEN
ERROR=ERROR*100
END IF

IF (K3IGPRIME .GT. 100.0 .OR. KIG2PRIME .GT. 100.0 .OR. KIGPRIME .GT. 100. .OR. K3r .GT.
1000.0 .OR. K3M .GT. 100.0) THEN
ERROR = 100*ERROR
END IF

FOBJ          =      FOBJ + ERROR
func = FOBJ

¡END PROGRAM FEHLBERG esta línea no se escribe
*****

RETURN
END

```

B.4. SIMPLEX

```

PROGRAM tminim
Implicit None
DOUBLE PRECISION :: object, p(6), simp, step(3), stopcr, var(3),FOBJS
INTEGER          :: ier, iprint, iquad, maxf, nloop, nop
LOGICAL          :: first

! remember to declare the user's subroutine as EXTERNAL.
EXTERNAL objfun

p(1)  =      Valor_1d0      ¡Valor_: Suposición inicial en búsqueda local
p(2)  =      Valor_2d0
p(3)  =      Valor_3d0
p(4)  =      Valor_4d0
p(5)  =      Valor_5d0
p(6)  =      Valor_6d0

step = 0.05D0 ! Tamaño de paso del simplex
nop = 6      ! Número de parámetros

! Set max. no. of function evaluations = 250, print every 10.
maxf = 1000
iprint = 1
! Set value for stopping criterion. Stopping occurs when the
! standard deviation of the values of the objective function at
! the points of the current simplex < stopcr.

```

```

stopcr = 1.d-08
nloop = 6

! Fit a quadratic surface to be sure a minimum has been found.
iquad = 1

! As function value is being evaluated in double precision, it
! should be accurate to about 15 decimals. If we set simp = 1.d-6,
! we should get about 9 dec. digits accuracy in fitting the surface.

simp = 1.d-6    ! Criterio de parada

! Now call MINIM to do the work.

first = .true.
DO
  CALL minim(p, step, nop, object, maxf, iprint, stopcr, nloop, iquad, simp, var, objfun, ier,FOBJS)

! If ier > 0, try a few more function evaluations.

  IF (ier .EQ. 0)      EXIT
  IF (.NOT. first)    STOP
  first = .false.
  maxf = 1000
END DO

! Successful termination.

WRITE(*, 900) object, p
900 FORMAT(' Success !/' Objective function = ', f12.6/ ' at: ', 5f12.6)

10 CONTINUE

END PROGRAM tminim

SUBROUTINE objfun(p, func)

! This is the subroutine which the user must write.
! Remember that we are minimizing the negative of the function we
! really want to maximize.
Use RK
Implicit None

DOUBLE PRECISION, INTENT(IN) :: p(6)
DOUBLE PRECISION, INTENT(OUT) :: func

! PROGRAM FEHLBERG utiliza el mismo código que RK-F a partir de declaración de variables hasta
! cálculo del error, seguido, las siguientes líneas son escritas
fobj      =      fobj + ERROR
func=fobj
¡END PROGRAM FEHLBERG
*****
RETURN
END SUBROUTINE objfun

```