

**SELECCIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO Y DISEÑO DE UN SISTEMA DE
CONTROL PARA LA FERMENTACIÓN ABE A PARTIR DE GLUCOSA
EMPLEANDO *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**

**Viviana María Fuciños Manrique
Andrea Katherine Pallares Pallares**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO – QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

SELECCIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO Y DISEÑO DE UN SISTEMA DE CONTROL PARA LA FERMENTACIÓN ABE A PARTIR DE GLUCOSA EMPLEANDO *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

**Viviana María Fuciños Manrique
Andrea Katherine Pallares Pallares**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:
Ingeniero Químico**

**Director
Ing. Qco. José Andrés Pérez Mendoza**

**Codirector
Ph. D Luis Javier López Giraldo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO – QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

AGRADECIMIENTOS

Las autoras del presente trabajo expresan sus agradecimientos a:

Dios, dueño de toda nuestra existencia y todos nuestros actos.

Nuestras familias, motores de nuestro esfuerzo.

La **Universidad Industrial de Santander**, por permitirnos formarnos como profesionales y como personas.

La **Escuela de Ingeniería Química** y todo el personal que labora en ella, por abrirnos sus puertas con tanto cariño, por todo el conocimiento impartido y por todos los valores enseñados.

Los **profesores José Andrés Pérez Mendoza** y **Luis Javier López Giraldo**, por su ayuda y acompañamiento incondicionales, por toda la paciencia y toda la comprensión.

Los **profesores Daniel Molina, Claudia Ortiz** y **Carlos Jesús Muvdi Nova**, por sus valiosos aportes.

Los técnicos del laboratorio de procesos, **Eduardo** y **Wilson**, y al ingeniero **Jesús**, por la ayuda prestada durante las pruebas experimentales

La estudiante de práctica **Yuliana Medina** y nuestra compañera **Andrea Calderón**.

Al **Grupo de Investigación en Microbiología y Bioquímica** y al **Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos CICTA** de la Universidad Industrial de Santander.

Quien a Dios tiene, nada le falta...

Sólo Dios Basta!

Santa Teresa de Jesús.

*A mi papi Javier y a mi mami Nohora, por siempre motivarme a seguir adelante,
por enseñarme a ser perseverante, por confiar en mí siempre... A los dos porque son los mejores
MAESTROS que he conocido en toda mi vida, por guiar tan correctamente cada uno de mis pasos, por
hacer de mí la persona que hoy soy...*

*A mis hermanos Karen, Migue y Juanda, por la alegría que la dan a mi vida, por motivarme todo el
tiempo a dar lo mejor de mí y a ser su mejor ejemplo...*

*A Nana y Aleja, mis acompañantes desde siempre, por ayudarme a comprobar que se puede encontrar una
prima, una hermana y una amiga, todo en una misma persona...*

A mis abuelos, tíos y primos, por demostrarme el verdadero y hermoso significado de la palabra familia...

*A Vivi, por cada uno de los buenos y malos momentos compartidos durante nuestro trabajo... Por todo el
apoyo brindado cuando más lo necesité y por hacer de esta experiencia algo que recordaré con gran cariño
siempre...*

*A mis amigos y compañeros del colegio y de la universidad, que han dejado invaluable aportes y
enseñanzas a mi vida...*

Andrea Katherine Pallares Pallares

*“...gloria y honra y paz
a todo el que hace lo bueno...”
Rom.2:10*

*A mi mami Marta y a mi papi Raúl, sus consejos, su tiempo, su ejemplo, todo cuanto soy es por ellos que
nunca han desfallecido en su lucha por hacer de mí una excelente persona.*

*A mi hermano Raúl, a quien admiro y amo. Por alcanzarlo y estar siempre con él llegue a la UIS y por él
me esfuerzo a ser cada día mejor.*

Para mis padres y mi hermano todo mi amor, mis triunfos, mi admiración y mi tiempo.

*A mi papá Pedro, mi papá Nazario, mi mamá Maruja y mi mamá Helena quienes me protegen y
acompañan diariamente.*

A mi novio Sergio por su paciencia, comprensión y apoyo constante.

*A mi mejor amiga Isabella que me enseñó que la amistad se convierte en hermandad cuando la distancia
fortalece el sentimiento.*

*A Andreita, quien estuvo siempre a mi lado en esta experiencia única en la vida, porque encontré una
maravillosa persona en los momentos difíciles y una gran aliada para compartir las alegrías.*

A mis amigos, que me entregan todos los días su apoyo incondicional.

Viviana María Fuciños Manrique

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	17
1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	19
1.1. BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN ACETONA-BUTANOL-ETANOL. .	19
1.2. CINÉTICA DEL PROCESO.	21
1.3. ESTRATEGIAS DE CONTROL.	23
1.3.1. Control por retroalimentación	23
1.3.2. Control por acción pre-calculada.....	24
1.3.3. Control por lógica difusa	25
1.3.4. Control por redes neuronales.....	25
1.4. CONTROL DE VARIABLES DETERMINANTES EN LA FERMENTACIÓN ABE.	25
1.4.1. Control de pH.....	26
1.4.2. Control de Temperatura	26
1.4.3. Control de Oxígeno Disuelto	26
2. METODOLOGÍA	27
1.1. Revisión Bibliográfica.	27
1.2. Selección de las estrategias de control de pH y Temperatura.	27
1.3. Desarrollo de pruebas experimentales.	28
1.3.1. Proceso Fermentativo.	28
1.3.2. Determinación de las concentraciones de glucosa, biomasa y metabolitos.....	29
1.4. Planteamiento de las dinámicas de pH y temperatura.	30
1.5. Planteamiento y ajuste del modelo cinético más adecuado.	32
1.6. Simulación de las estrategias de control de pH y temperatura.....	33
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	34
CONCLUSIONES	51
PROSPECTIVAS	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro comparativo de estrategias de control.	28
Tabla 2. Composición del medio de fermentación añadido al biorreactor.	29
Tabla 3. Características de los modelos base para el ajuste.	32
Tabla 4. Modelos utilizados en el procedimiento de ajuste.	33
Tabla 5. Criterios estadísticos empleados para la selección del modelo.	35
Tabla 6. Parámetros del modelo cinético ajustado.	39
Tabla 7. Formulas de ajuste para el método de relé.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica de la cepa <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 en la fermentación ABE, con glucosa como fuente de carbono.	20
Figura 2. Diagrama esquemático del desarrollo metodológico.	27
Figura 3. Comportamiento a través del tiempo de variables de la fermentación ABE.	36
Figura 4. Análisis de pH en lazo abierto sin perturbación del sistema (a) y ante una perturbación de 0.06 L/h en el flujo de la base (b).	40
Figura 5. Detalle Lazo Abierto con perturbación para el pH (0-3 h).	42
Figura 6. Análisis de temperatura en lazo abierto sin perturbación del sistema (a) y ante una perturbación de 5 L/h en el flujo de agua de enfriamiento (b).	43
Figura 7. Dinámica de glucosa en el medio de fermentación predicha por el modelo planteado, bajo las condiciones iniciales consideradas.	44
Figura 8. Esquema de General de Control.	45
Figura 9. Análisis Respuesta pH en Lazo Abierto y Cerrado.	47
Figura 10. Método de Relé.	48
Figura 11. Análisis respuesta Temperatura en Lazo Abierto y Cerrado.	49
Figura 12. Representación en el dominio del tiempo del sensor/transmisor (izquierda) y elemento final de control (derecha).	63
Figura 13. Representación en el tiempo del controlador PID.	64

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Imágenes del montaje de las pruebas experimentales.	58
ANEXO 2. Balance del ión hidrógeno en la fermentación ABE.	59
ANEXO 3. Representación en Simulink de los elementos que conforman los Lazos de Control.	63

NOMENCLATURA

- $[H^+]$ = Concentración de iones Hidrógeno [mmol/L]
 $[AAH]$ = Concentración de Ácido Acético [mmol/L]
 $[ABH]$ = Concentración de Ácido Butírico [mmol/L]
 $[ALH]$ = Concentración de Ácido Láctico [mmol/L]
 k_{dAA} = Constante de disociación del ácido acético
 k_{dAB} = Constante de disociación del ácido butírico
 k_{dAL} = Constante de disociación del ácido láctico
 C_A = Concentración de ácido alimentado [mmol/L]
 C_B = Concentración de base alimentado [mmol/L]
 F_A = Flujo de ácido [L/h]
 F_B = Flujo de base [L/h]
 V_R = Volumen de reacción [L]
 $[H_2PO_4^-]_0$ = Concentración de $H_2PO_4^-$ alimentada en la solución buffer [mmol/L]
 $[HPO_4^{2-}]_0$ = Concentración de HPO_4^{2-} alimentada en el buffer [mmol/L]
 kd_1 = Constante de disociación del H_3PO_4
 $\Delta\hat{H}_{rxn}$ = Calor liberado por la reacción [KJ/h]
 U = Coeficiente global de transferencia de calor [KJ/(h.K.m²)]
 A = Área de transferencia de calor [m²]
 T_C = Temperatura del agua de enfriamiento [K]
 T = Temperatura del reactor [K]
 F_f = Flujo de agua [L/h]
 V_C = Volumen de la chaqueta [L]
 n_i = Número de moles de la especie i
 Δh_{ci}° = Calor estándar de combustión de la especie i
 K_p = Ganancia proporcional del controlador [%/%]
 τ_I = Ganancia integral [horas]
 τ_D = Ganancia derivativa [horas]

RESUMEN

TITULO: SELECCIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO Y DISEÑO DE UN SISTEMA DE CONTROL PARA LA FERMENTACIÓN ABE A PARTIR DE GLUCOSA EMPLEANDO *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

AUTORES: Viviana María Fuciños Manrique, Andrea Katherine Pallares Pallares. **

PALABRAS CLAVES: Fermentación Acetona–Butanol–Etanol (ABE), *Clostridium acetobutylicum*, Modelo Cinético, Control pH, Control Temperatura.

Se estudiaron las dinámicas de pH y temperatura durante la fermentación ABE a escala laboratorio. Se ajustó un modelo matemático para describir el proceso y se diseñó un sistema de control para las variables mencionadas.

En la primera etapa se realizaron pruebas en un biorreactor BioFlo 110 de 5 litros, operando en discontinuo; el volumen de reacción fue de 2L. El biorreactor fue alimentado con 10%v/v de inóculo (*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824) y 40.15 g/L de glucosa. Mediante un análisis de la fenomenología del proceso y utilizando los datos obtenidos experimentalmente, se ajustó un modelo matemático para la descripción de la fermentación ABE. Durante la segunda etapa se determinó la estrategia de control por retroalimentación como la más adecuada, de acuerdo con los objetivos del proyecto. Así mismo, se analizó el sistema en lazo abierto y cerrado para corroborar la precisión y ajuste del modelo y diseño propuestos.

Entre los resultados se destaca el ajuste de un modelo para el proceso bajo estudio, el cual presenta una alta complejidad al considerar la interacción de todos los metabolitos (intermediarios y finales) y ofrece una adecuada predicción de todas las variables consideradas. Este hecho permitió sentar las bases para el diseño del sistema de control. Por otra parte, el análisis en lazo abierto y lazo cerrado corroboró la necesidad de controlar pH y temperatura. Evidenciando un comportamiento del proceso caracterizado por ser estable y no oscilatorio, que conllevó a recomendar la sintonización experimental del controlador de pH y a emplear el método de relé para sintonizar el controlador de temperatura.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físico Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ing. Qco. José Andrés Pérez Mendoza. Codirector: Ph.D. Luis Javier López Giraldo.

ABSTRACT

TITULO: SELECTION OF A MATHEMATICAL MODEL AND DESIGN OF A CONTROL SYSTEM FOR ABE FERMENTATION FROM GLUCOSE USING *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

AUTORES: Viviana María Fuciños Manrique, Andrea Katherine Pallares Pallares. **

PALABRAS CLAVES: Acetone–Butanol–Ethanol Fermentation, *Clostridium acetobutylicum*, Kinetic Model, pH Control, Temperature Control.

Dynamics of pH and temperature during ABE fermentation at bench scale were analyzed. A mathematical model of the process was adjusted and a control strategy for those variables was designed.

The selection of a mathematical model required laboratory data collection. For this purpose, a 5L bioreactor BioFlo 110 was used. Batch culture was carried out with a 2L working volume including an inoculum size of 10%v/v (*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824). The initial glucose concentration in the medium was 40,15 g/L. Phenomenological analysis in combination with experimental results made possible the adjust of a mathematical model for description of ABE fermentation. During the second phase of the work, feedback control strategy was founded like the best one, in order to achieve the objectives of the project. Likewise, open loop and close loop analysis was made in the system to support precision and adjust of the model and control design developed.

Among results, it is remarkable the adjustment of a modified model to describe the process under study, which has a high complexity by considering the interaction between all the metabolites (intermediates and final ones) and provides a good prediction of all considered variables. This laid the groundwork for control system design. Moreover, the analysis of open loop and closed loop corroborated the need to control pH and temperature. This showed a process' behavior characterized as stable and non oscillatory, which led it to recommend the experimental tuning of pH controller and to use feedback relay method for tuning temperature controller.

* Research Project

** Physical – Chemical Engineering College. Chemical Engineering Department. Advisors: Ing. Qco. José Andrés Pérez Mendoza and Ph.D. Luis Javier López Giraldo.

INTRODUCCIÓN

La fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) fue uno de los primeros procesos fermentativos desarrollados a gran escala. La producción de solventes (ABE), realizada con cepas del género *Clostridium*, se ubicó segunda en importancia de producción durante la primera mitad del siglo pasado, superada sólo por la fermentación del etanol [1,2]. No obstante, el crecimiento sin precedentes de la industria petroquímica a finales de 1950 y el incremento de los costos de materias primas para la fermentación, desencadenaron la desaparición casi por completo en 1960 de la obtención de solventes por esta vía [3].

El interés cada vez mayor de los últimos años en el uso de materias primas renovables y/o derivadas de desechos para la elaboración de productos químicos, así como las técnicas moleculares aplicadas a los microorganismos solventogénicos, han contribuido a mejorar la viabilidad y competitividad de la vía fermentativa en la producción de solventes [4-6]. Los avances tecnológicos en los sistemas de fermentación, separación y purificación, así como la evidente problemática de los combustibles de origen fósil condujeron a una renovación del interés en la investigación de este tipo de procesos [2,4].

El presente trabajo de investigación comprende dos actividades principales. La primera consiste en el ajuste de un modelo matemático para la fermentación ABE, con base en herramientas estadísticas que evalúan su capacidad de predicción de los datos experimentales. La segunda actividad está relacionada con el control de las variables determinantes del proceso (pH y temperatura), mediante el diseño de los controladores y su evaluación preliminar a través de simulación. Lo anterior, debido a que la producción de butanol a partir de bacterias requiere un control riguroso para evitar los efectos de inhibición característicos del proceso y obtener el crecimiento adecuado y reproducción de los microorganismos [7].

Este trabajo hace parte del proyecto de áreas estratégicas “Escalamiento de los Procesos de Producción de Bio–alcoholes y Procesamiento de Subproductos Provenientes de la Producción de Biocombustibles por Vía Fermentativa” código 5452, financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander, con la participación del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología y el Centro de Investigación en Ciencias y Tecnología de los Alimentos –CICTA–.

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

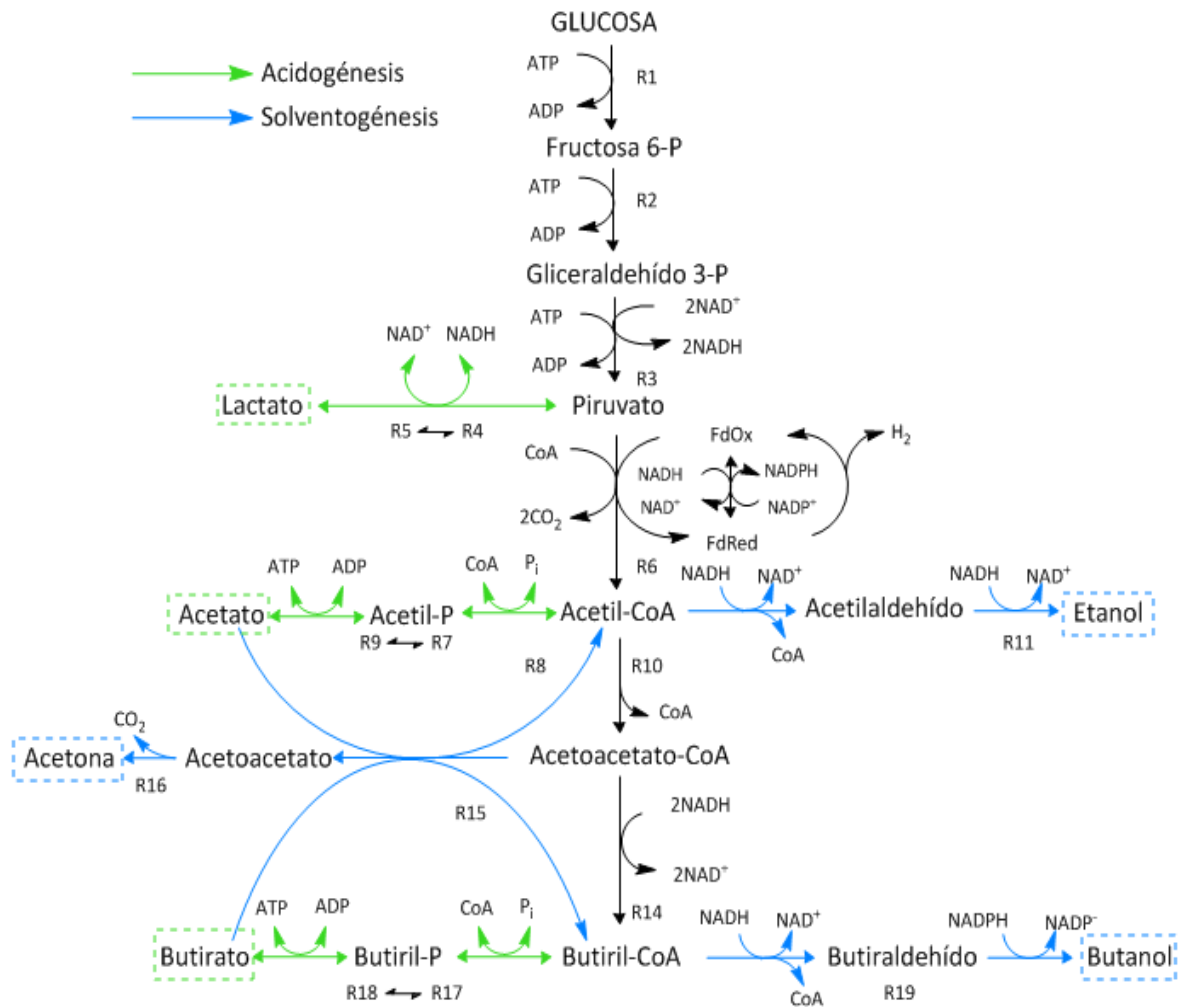
1.1. BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN ACETONA-BUTANOL-ETANOL.

La fermentación acetona – butanol – etanol (ABE) posee dos etapas significativas (acidogénesis y solventogénesis) relacionadas con el consumo de energía [8], cuyas principales características se exponen a continuación.

- **Acidogénesis:** Las células crecen exponencialmente y es notoria la producción de ácidos orgánicos (butírico y acético), hidrógeno y dióxido de carbono; no es significativa la formación de solventes (ver figura 1). Esta parte de la fermentación se caracteriza por una disminución en el pH del medio de fermentación y por la formación de moléculas de Adenosín Trifosfato (ATP) [8,9].
- **Solventogénesis:** Las células alcanzan la fase estacionaria de su crecimiento y los solventes (butanol, acetona y etanol) son producidos a partir del ininterrumpido consumo de glucosa y la reasimilación de los ácidos (ver figura 1). Dicha reasimilación normalmente conduce a un incremento del pH en el medio [8,9].

El paso de la fase acidogénica a la solventogénica depende fuertemente del pH del medio y de la concentración de metabolitos, específicamente de los ácidos acético y butírico. Cuando las condiciones son favorables para el crecimiento, las células toman el camino de la producción de ácidos para generar la máxima cantidad de energía. El crecimiento continúa hasta que la disminución del pH y el incremento en la concentración de ácidos conducen a una disminución tanto del metabolismo como del crecimiento celular [10,11]. Bajo las anteriores condiciones, las especies productoras de solventes hacen el cambio hacia la obtención de estos, aparentemente como un mecanismo de defensa contra la intoxicación del sistema a las concentraciones inhibitorias de los ácidos orgánicos. Dicho cambio permite que la actividad metabólica celular prosiga [12,13].

Figura 1. Ruta metabólica de la cepa *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 en la fermentación ABE, con glucosa como fuente de carbono.



Fuente: Autores.

1.1.1. Efecto de las variables sobre la fermentación ABE.

- **El pH:** Ha sido reconocido como factor determinante en los resultados de la fermentación ABE [1]. Generalmente, el intervalo de pH durante el cual se presenta la formación de solventes varía dependiendo de la cepa y las condiciones del medio elegidas en cada caso. Se ha reportado que la cepa *C. acetobutylicum* ATCC 824 produce buenos niveles de solventes a pH entre 4.3 y 5.5 [11].

- **El oxígeno:** Las bacterias del género *Clostridium* son estrictamente anaerobias [5,14]. La exposición de las células a concentraciones de oxígeno suficientemente altas ocasiona una disminución en la velocidad de consumo de sustrato y en el poder de producción de butirato. No obstante, exposiciones breves al oxígeno producen un efecto inhibitorio rápidamente reversible [15].
- **La concentración de ácidos:** El incremento de la concentración de ácidos en el sistema se ve reflejado en una disminución de la tasa de crecimiento específico. A pesar que, el crecimiento celular se detiene por completo, el consumo de sustrato y el metabolismo efectuado por las células continúan [10,16].
- **La concentración de solventes:** El nivel inhibitorio de concentración de solventes es 20 g/L [17,18], límite por encima del cual el metabolismo celular se detiene. De los tres solventes producidos, el butanol es el más tóxico, y es el único obtenido en cantidades inhibitorias durante la fermentación. Se ha reportado que la producción de solventes termina cuando la concentración de butanol alcanza alrededor de 13 g/L [1,17-19].

1.2. CINÉTICA DEL PROCESO.

A pesar de los múltiples estudios que confirman que las cepas *Clostridium* conducen satisfactoriamente la fermentación ABE, aún existen falencias que impiden el cambio de escalad el proceso a nivel industrial. Básicamente, los inconvenientes se concentran en los modelos que se han propuesto para simular la cinética de conversión de sustrato, crecimiento celular y producción de butanol [1,9]. El conocimiento de la cinética enzimática del proceso, haciendo énfasis en la ruta metabólica seguida por los microorganismos en la producción de butanol, constituye la clave para el cambio de escala. A continuación se citan algunas de las investigaciones que se han efectuado respecto al tema.

- **1986**, Schoutens y colaboradores [20]: desarrollaron un modelo para describir la producción continua de butanol e isopropanol a partir de glucosa con células inmovilizadas de *C. beijerinckii*. El modelo considera un término cinético lineal de inhibición por butanol y supone que la biomasa se distribuye homogéneamente en el soporte.
- **1988**, Yerushalmi y colaboradores [21]: describieron la fermentación ABE con *C. acetobutylicum* teniendo en cuenta, además de los parámetros cinéticos, parámetros fisiológicos tales como la permeabilidad de la membrana celular y el número de sitios activos de ésta para el transporte del sustrato.
- **1994**, Xiaoping Yang y George T. Sao [22]: plantearon una expresión para la cinética del crecimiento celular, considerando que la expresión de Monod podía utilizarse para tal fin si se le incluían términos de inhibición por producto y de influencia del pH sobre el sistema. Los efectos de inhibición fueron expresados en términos de la velocidad máxima de crecimiento celular.
- **2007**, Shinto y colaboradores [9]: desarrollaron un modelo cinético para la fermentación ABE con *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4, basándose en la ruta metabólica seguida por *C. acetobutylicum* ATCC 824 con glucosa como fuente de carbono. El esquema de reacción fue representado teniendo en cuenta los balances de masa y las ecuaciones para la velocidad en términos de cinética enzimática. El comportamiento dinámico de los metabolitos fue ajustado con la introducción de términos de inhibición por sustrato, inhibición por butanol, activación de butirato y considerando el cese de las reacciones metabólicas en el caso de insuficiencia de energía luego del consumo total del sustrato (glucosa). El crecimiento celular fue expresado con un término cinético tipo Michaelis–Menten de inhibición no competitiva por parte del butanol.

- **2011**, Napoli y colaboradores [23]: expresaron el crecimiento de *C. acetobutylicum* para la fase acidogénica de la fermentación ABE (fase de crecimiento celular exponencial) como una función de los productos de la fermentación y del pH, por el carácter inhibitorio de estos sobre el crecimiento específico (μ). El efecto del pH se vio reflejado en la velocidad máxima de crecimiento celular. La expresión formulada por los autores incluye el efecto de los iones hidrógeno. Conjuntamente posee un término que toma en cuenta el pH intracelular de la cepa y la diferencia que se establece entre el pH óptimo y el pH del medio fermentativo. La cinética de crecimiento bajo condiciones acidogénicas fue descrita como un modelo interactivo de inhibición por múltiples productos (ecuación tipo Luong). Los autores consideraron como inhibidores tanto los ácidos débiles producidos (butírico y acético) como los tres solventes obtenidos (butanol, acetona y etanol).

1.3. ESTRATEGIAS DE CONTROL.

1.3.1. Control por retroalimentación. Se basa en la comparación del valor medido de la variable a controlar con su valor deseado. En función de la diferencia obtenida se modifica la variable manipulada. De esta manera se tiene control sobre todas las perturbaciones que actúen sobre el sistema.

El hecho que la acción correctiva se ejecute sobre el cambio de la variable controlada representa la principal ventaja del control por retroalimentación. Sin embargo, la perturbación debe presentarse sobre dicha variable antes de ser detectada. Para procesos con bajos tiempos muertos (o ausencia de estos) esta estrategia de control presenta alta precisión y alta velocidad en alcanzar los valores deseados. Por otro lado, el empleo de un modelo matemático aumenta la certidumbre sobre la acción correctiva, evitando cambios mayores al momento de implementar el lazo de control. El circuito de control por retroalimentación es ampliamente usado a nivel industrial, debido a que presenta mayor economía frente a otros tipos de control avanzados [24,25].

1.3.1.1. Controlador On-Off. Es la forma más simple de control por retroalimentación. En el sistema, el elemento final de control posee dos posiciones fijas (encendido/apagado). Es relativamente sencillo y barato, por lo cual es empleado tanto a nivel industrial como doméstico [25].

1.3.1.2. Controlador PID. Es el más empleado en la industria de la fermentación [25,26]; ha sido utilizado satisfactoriamente a nivel industrial desde 1940. En la actualidad es ampliamente usado en una extensa gama de aplicaciones. Su estructura simple le ha permitido ser diseñado e implementado con relativa facilidad y alta eficacia. Se encuentra constituido por tres términos (Eq.1): Proporcional, Integral y Derivativo. El primero es un factor de ganancia que incide proporcionalmente al error a través de la variable manipulada. El segundo término corrige el valor del error en estado estacionario. Y el último término tiene como propósito anticiparse ante la presencia del error y su acción puede interpretarse como proporcional al error que se producirá (se emplea la serie de Taylor para la predicción del error) [26].

$$mv(t) = \underbrace{K_p e(t)}_P + K_I \underbrace{\int_0^t e(t) dt}_I + K_D \underbrace{\frac{de(t)}{dt}}_D \quad (1)$$

1.3.2. Control por acción pre-calculada. A partir del modelo matemático del proceso, predice el comportamiento en un futuro de dicho sistema y con ello, se adelanta a la perturbación. Es expresado en el dominio del tiempo permitiéndole ser una técnica flexible y abierta. Exige un alto costo computacional por lo cual es difícil su aplicación en procesos rápidos. Así mismo emplea un algoritmo de optimización. De aquí, que sea necesario el uso de computadores o controladores lógicos programables (PLC) para su implementación [24].

1.3.3. Control por lógica difusa. Estrategia de control avanzada basada en reglas, por lo cual es posible relacionar una variable de entrada con una de salida sin demandar conocimiento de la interacción de todas las variables del proceso. Sin embargo, requiere mayor simulación y afinación para la puesta en marcha. La implementación para labor de aprendizaje es ineficiente puesto que pierde inteligibilidad y consistencia cuando se realizan modificaciones individuales sobre las reglas. Por consiguiente, no es flexible a cambios estructurales o perturbaciones en el sistema [27].

1.3.4. Control por redes neuronales. Son modelos que intentan reproducir el funcionamiento del cerebro humano. Debido a su fundamento son capaces de entrenarse a través de la experiencia. Eficiente ante dinámicas no lineales y control de múltiples variables. No obstante, en comparación con técnicas de control clásicas, necesita más tiempo y datos de diseño. Además, demanda un alto costo económico y computacional para su implementación. La modificación de esta técnica es compleja [27].

1.4. CONTROL DE VARIABLES DETERMINANTES EN LA FERMENTACIÓN ABE.

Los agentes biológicos (células, enzimas, anticuerpos) son muy sensibles a las variaciones en las condiciones de operación de los sistemas en que trabajan. De manera que, la producción de compuestos químicos a partir de estos requiere la implementación de sistemas de control con el objetivo de proveer un ambiente cercano al óptimo. Garantizando el entorno adecuado es posible obtener el correcto crecimiento, reproducción y ruta metabólica de dichos agentes. La temperatura, el pH y el oxígeno disuelto son los parámetros más comúnmente medidos y controlados en la industria de los bioprocesos [28].

1.4.1. Control de pH. La naturaleza no lineal de esta variable dificulta su control. Por ello a través del tiempo se han estudiado diferentes estrategias de control entre clásicas y avanzadas [29]. A pesar de eso, a nivel industrial se busca economía, rapidez de respuesta, precisión y fácil implementación. El control por retroalimentación con controlador PID ha sido ampliamente utilizado desde nivel laboratorio hasta escala industrial [30]. Diferentes estudios se han realizado sobre este tema, donde se resaltan las ventajas de los controladores PID por su fácil sintonización y eficacia en el control del pH, en comparación con otras estrategias de control. Estas últimas aumentan cuando se consideran bioprocesos donde las perturbaciones son difíciles de cuantificar [26,31-33].

1.4.2. Control de Temperatura. Es una variable de control de amplio estudio [34]. Se ha considerado la aplicación de diversas estrategias de control entre las que sobresale el uso del control por retroalimentación con controlador PI. Debido a su fácil sintonización, economía y sencillez, es una estrategia de control aprovechada en todo tipo de campo de acción. Los bioprocesos no son la excepción en el uso de los controladores PI para proveer una temperatura favorable de crecimiento, reproducción y operación a los agentes biológicos [7,35].

1.4.3. Control de Oxígeno Disuelto. En sistemas anaerobios es de gran importancia. La condición de anaerobiosis es un factor crítico para obtener el producto deseado. En bioprocesos que posean una tolerancia mínima al porcentaje de oxígeno disuelto, es recomendable el uso de estrategias de control sencillas que eviten tiempos extensos de sintonización [33,36]. El control por retroalimentación con controlador On/Off es un excelente ejemplo de este tipo de estrategias de control.

2. METODOLOGÍA

A continuación se presenta un esquema general de las seis etapas consideradas en este trabajo.

Figura 2. Diagrama esquemático del desarrollo metodológico.



Fuente: Autores.

1.1. Revisión Bibliográfica.

Con el fin de adquirir las bases teóricas necesarias para el desarrollo del proyecto, en la primera fase se efectuó la búsqueda de información relacionada con la fermentación ABE (cinética, variables influyentes y condiciones de operación). Así mismo, se indagó acerca del control implementado en este tipo de procesos.

1.2. Selección de las estrategias de control de pH y Temperatura.

En la segunda fase se respondió a la pregunta: ¿Cuál estrategia de control es más adecuada para la fermentación ABE? Para tal fin fueron establecidos ciertos criterios de selección (Tabla 1). Dichos criterios consideran como factor principal la implementación del diseño con fines de aprendizaje.

Tabla 1. Cuadro comparativo de estrategias de control [24-35].

Estrategias de Control	Retroalimentación	Acción Pre-Calculada	Lógica Difusa	Redes Neuronales
Criterios de Selección				
Coste Computacional	Bajo	Medio	Alto	Alto
Flexibilidad después de puesta en marcha	Alto	Alto	Bajo	Bajo
Tiempo puesta en marcha	Bajo	Medio	Alto	Alto
Adaptabilidad a cambios	Varía según sintonización	Varía según sintonización	Bajo	Requiere tiempo de entrenamiento
Cantidad de datos de diseño	Bajo	Bajo	Alto	Alto
Representación del Conocimiento	Dependencia al Modelo	Dependencia al Modelo	Alto	Bajo
Entrenabilidad	Nula	Nula	Nula	Alta
Precisión en sistemas no lineales	Bajo	Bajo	Alto	Alto
Robustez	Bajo	Medio	Alto	Alto
Tolerancia a fallas	Bajo	Bajo	Medio	Alto

Fuente: Autores.

1.3. Desarrollo de pruebas experimentales.

La tercera etapa comprendió el trabajo en el laboratorio que posteriormente permitió el planteamiento y ajuste del modelo cinético y las dinámicas de pH y temperatura. Imágenes del montaje experimental pueden observarse en el Anexo 1.

1.3.1. Proceso Fermentativo.

La producción fermentativa de solventes se efectuó con la cepa *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824TM, empleando glucosa grado industrial como fuente de carbono. Un biorreactor BioFlo 110 de 5 litros (New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, N.J.) fue utilizado para la ejecución de los experimentos. El volumen de la fase líquida en el reactor se fijó en 2 litros. El modo de operación fue discontinuo. El fermentador fue cargado con una solución de glucosa (40g/L) y el medio de fermentación, cuya composición (en g/L) se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición del medio de fermentación añadido al biorreactor.

Compuesto	Concentración [g/L]
Extracto de levadura	5
KH_2PO_4	0.75
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.75
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
NaCl	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
L(+) – Cisteína	0.5

Fuente: Autores.

Antes de iniciar la fermentación, el biorreactor fue esterilizado en una autoclave a 121°C y 1 atm durante 15 minutos aproximadamente. Después de ser esterilizado, al fermentador se agregó 10% (v/v) de inóculo, el cual fue suministrado por el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander.

La fermentación se realizó durante 36 horas. A través de todo el proceso fermentativo la temperatura se mantuvo a 37°C por medio de una chaqueta de calentamiento. Las condiciones estrictas de anaerobiosis se garantizaron en el biorreactor con burbujeo de nitrógeno puro. La medición de pH se efectuó cada hora. Se tomaron muestras del medio cada tres horas para medir la concentración de sustrato, células y metabolitos.

1.3.2. Determinación de las concentraciones de glucosa, biomasa y metabolitos.

El análisis de las muestras retiradas del biorreactor proporcionó información de las concentraciones de biomasa, glucosa y demás metabolitos en el medio. Las técnicas para su determinación se resumen a continuación.

Glucosa: En el caso de la glucosa, se aplicó la prueba enzimática de la glucosa oxidasa.

Biomasa: El método empleado fue el de peso seco. Una curva de calibración de concentración de biomasa fue realizada mediante diluciones seriadas de células resuspendidas, midiendo la densidad óptica de éstas a 600 nm y correlacionando el valor obtenido con la concentración del peso seco¹.

Metabolitos de la fermentación: La concentración de los metabolitos solubles en la fase líquida fue establecida después de la eliminación de las células por centrifugado. Los análisis fueron desarrollados por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) siguiendo la metodología propuesta por Pajuelo y colaboradores¹. El equipo de HPLC empleado está equipado con una columna supelcogel C-610H (dimensiones 300 x 7.8mm) y un detector de índice de refracción. Para el análisis, la fase móvil (ácido sulfúrico 0,5 mM) fue bombeada isocráticamente durante 30 min a una velocidad de flujo de 0.8mL/min y una temperatura de 30°C. A cada uno de los metabolitos se le realizó su respectiva curva de calibración.

1.4. Planteamiento de las dinámicas de pH y temperatura.

Para conocer el comportamiento del sistema a controlar se hizo necesario el planteamiento de las dinámicas de pH y temperatura.

1.4.1. Dinámica de pH.

El modelamiento de la dinámica de pH se realizó mediante un balance de hidrógeno. Dicho balance representa las contribuciones de los metabolitos ácidos (Figura 1) y del buffer; en la dinámica se incluyeron además los términos del ácido y/o base alimentados para su control (Eq.2).

¹: PAJUELO, M., MEYNIAL – SALLES, I., MENDES, F., ANDRADE, J., VASCONCELOS, I., SOUCAILLE, P. 2005. "Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3 – propanediol from glycerol". *Metabolic Engineering*. Vol. 7, No. 5 y 6, p. 329 – 336.

En este caso, se despreció la contribución del agua porque presenta un valor de disociación bajo respecto a las otras constantes de disociación presentes.

$$\frac{d[H^+]}{dt} = \frac{\frac{d[AAH]/dt}{1+[H^+]/k_{dAA}} + \frac{d[ABH]/dt}{1+[H^+]/k_{dAB}} + \frac{d[ALH]/dt}{1+[H^+]/k_{dAL}} + \frac{C_{AF_A}(t)}{V_R} - \frac{C_{BF_B}(t)}{V_R}}{\left(1 + \frac{[AAH]}{k_{dAA}(1+[H^+]/k_{dAA})^2} + \frac{[ABH]}{k_{dAB}(1+[H^+]/k_{dAB})^2} + \frac{[ALH]}{k_{dAL}(1+[H^+]/k_{dAL})^2} + \frac{([H_2PO_4^-]_0 + [HPO_4^{2-}]_0)}{kd_1(1+[H^+]/kd_1)^2} \right)} \quad (2)$$

En el Anexo 2 se presenta el análisis y tratamiento matemático detallado del balance de hidrógeno.

1.4.2. Dinámica de Temperatura.

A través del balance de energía del sistema se representó el comportamiento dinámico de esta variable (Eq.3).

$$\frac{dE}{dt} = \sum_{\text{CORRIENTES DE ENTRADA}} (\widehat{M}h) - \sum_{\text{CORRIENTES DE SALIDA}} (\widehat{M}h) - \widehat{Q} + \widehat{W}_s \quad (3)$$

El biorreactor batch cuenta con un sistema de calentamiento y enfriamiento compuesto por una chaqueta. Consecuentemente, el balance de energía puede ser expresado matemáticamente como se muestra en las ecuaciones 4a-b.

$$\mathbf{a.} \frac{dE(t)}{dt} = -\Delta\widehat{H}_{rxn}(t) - (UA[T_c(t) - T(t)]) \quad (4a)$$

$$\mathbf{b.} \frac{dT_c(t)}{dt} = \frac{F_f}{V_c} (T_{ce} - T_c(t)) + \frac{UA}{V_c \rho_c c_{p_c}} [T_c(t) - T(t)] \quad (4b)$$

El calor de reacción se calculó utilizando los calores de combustión [36] (Eq.5).

$$\Delta H^\circ_{rxn} = (n\Delta h^\circ_c)_{\text{Sustrato}} + (n\Delta h^\circ_c)_{\text{F.Nitrógeno}} - (n\Delta h^\circ_c)_{\text{Biomasa}} - (n\Delta h^\circ_c)_{\text{Productos}} \quad (5)$$

1.5. Planteamiento y ajuste del modelo cinético más adecuado.

Uno de los pasos más importantes en el diseño del sistema de control es la obtención de un modelo matemático. Éste debe representar tan exactamente como sea posible el comportamiento del proceso a controlar. Por tal razón, una vez obtenidos experimentalmente los perfiles de concentración (sustrato, biomasa y metabolitos) se procedió a la elección de las ecuaciones cinéticas que describieran más adecuadamente su comportamiento.

Tres modelos fueron preseleccionados por su capacidad de expresar la fenomenología del proceso. Su estudio permitió establecer el punto de partida para el procedimiento de ajuste. La tabla 3 presenta las principales características de las ecuaciones cinéticas planteadas por cada modelo base. Así mismo, señala los términos de inhibición sobre el crecimiento celular que incluye cada uno de ellos.

Tabla 3. Características de los modelos base para el ajuste.

Características del modelo Autor (es)	Ecuaciones Cinéticas	Inhibición del Crecimiento Celular		
		Sustrato	Productos	pH
Napoli y col. [23]	--	X	X ⁽¹⁾	X
Xiaoping Yang [22]	Michaelis Menten		X ⁽²⁾	X
Shinto y col. [9]	A partir de la ruta metabólica		X ⁽³⁾	

(1) Acetato, Butirato, Butanol, Etanol y Acetona; (2) Acetato, Butirato y Butanol; (3) Sólo Butanol.

Fuente: Autores.

De acuerdo con la información presentada por la literatura para la cinética del proceso bajo estudio, fueron establecidas posibles modificaciones sobre los modelos base. Dichos cambios se efectuaron con el fin de obtener sistemas con mayor robustez, desde el punto de vista fenomenológico. La tabla 4 presenta las acciones realizadas y los 5 modelos obtenidos finalmente. Estos fueron utilizados para el ajuste y análisis de los perfiles de concentración de la fermentación ABE.

El ajuste de cada modelo a los datos experimentales y la estimación de los parámetros se realizaron a través del proceso iterativo del algoritmo de Nelder-Mead para la optimización de sistemas no lineales [37] (utilizando el software de procesamiento matemático MATLAB 7.0.4). Con el fin de obtener una estimación eficiente, debieron introducirse estimaciones iniciales de los valores de los parámetros que fuesen cercanas a los valores reales. Para dicha determinación se empleó la técnica de mínimos cuadrados lineales.

Tabla 4. Modelos utilizados en el procedimiento de ajuste.

No. Modelo	Modelo Base	Modificaciones
1	Modelo Napoli y col.	----
2	Modelo Xiaoping Yang	----
3		Inclusión Balance Lactato
4	Modelo Shinto y col.	Inclusión Balance de Hidrógeno y Término para $\mu_{m\acute{a}x}$ en función del pH
5		Inclusión Balance de Hidrógeno y Término para μ en función del pH y la concentración de productos

Fuente: Autores.

Se evaluó la capacidad de ajuste de cada modelo según los siguientes criterios: Coeficiente de Correlación Ajustado ($\overline{R^2}$), Varianza (σ^2) y Error Cuadrado Medio (ECM). El análisis de estos tres indicadores estadísticos permitió seleccionar un modelo adecuado desde el punto de vista matemático y fenomenológico para describir el proceso fermentativo bajo estudio.

1.6. Simulación de las estrategias de control de pH y temperatura.

Para la simulación en lazo abierto y lazo cerrado se empleó la herramienta Simulink del software de procesamiento matemático MATLAB 7.0.4. En la sintonización de los controladores PID (para pH) y PI (para temperatura) se aplicó el método de oscilación de Ziegler-Nichols [24].

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los criterios de selección de la estrategia de control (Tabla 1) conllevaron al desarrollo de dos lazos de control por separado para cada variable (pH y T). Un exhaustivo análisis de los mismos permitió determinar que la estrategia de control por retroalimentación empleando controladores PID y PI es la más apropiada para el control del pH y temperatura, respectivamente. Esta técnica mostró tener una mejor relación entre efectividad y practicidad. Al contrario de técnicas como control por lógica difusa y redes neuronales que dificultan la modificación de parámetros o cambios estructurales del proceso, una vez implementado el sistema de control. Se descartó la técnica de acción pre-calculada debido al carácter intrínseco de las perturbaciones del sistema y la dificultad para ser medidas.

El uso de una estrategia de control por retroalimentación presenta falencias en aspectos como la precisión, el tiempo de respuesta y la tolerancia a fallas en comparación con las técnicas de control moderno. Sin embargo, las características y escala del proceso bajo estudio permiten que su aplicación sea factible.

La estrategia de control elegida requiere un modelo matemático que describa adecuadamente el comportamiento de las variables a controlar. Lo anterior se logró gracias al procedimiento de ajuste llevado a cabo con los modelos propuestos en la metodología. Esta actividad demandó una gran dosis de trabajo humano y computacional dada la complejidad de los sistemas de ecuaciones, que se reflejaba en el alto grado de interdependencia presentado por las variables.

En la tabla 5 se presentan los valores de los criterios estadísticos seleccionados para evaluar la capacidad de ajuste de los modelos propuestos. Se analizaron especialmente dos variables de respuesta (productividad de butanol y pH) contra los datos experimentales, dada la importancia de éstas en el proceso. No

obstante, la selección final también consideró el comportamiento predicho de todas las especies de la fermentación.

Tabla 5. Criterios estadísticos empleados para la selección del modelo.

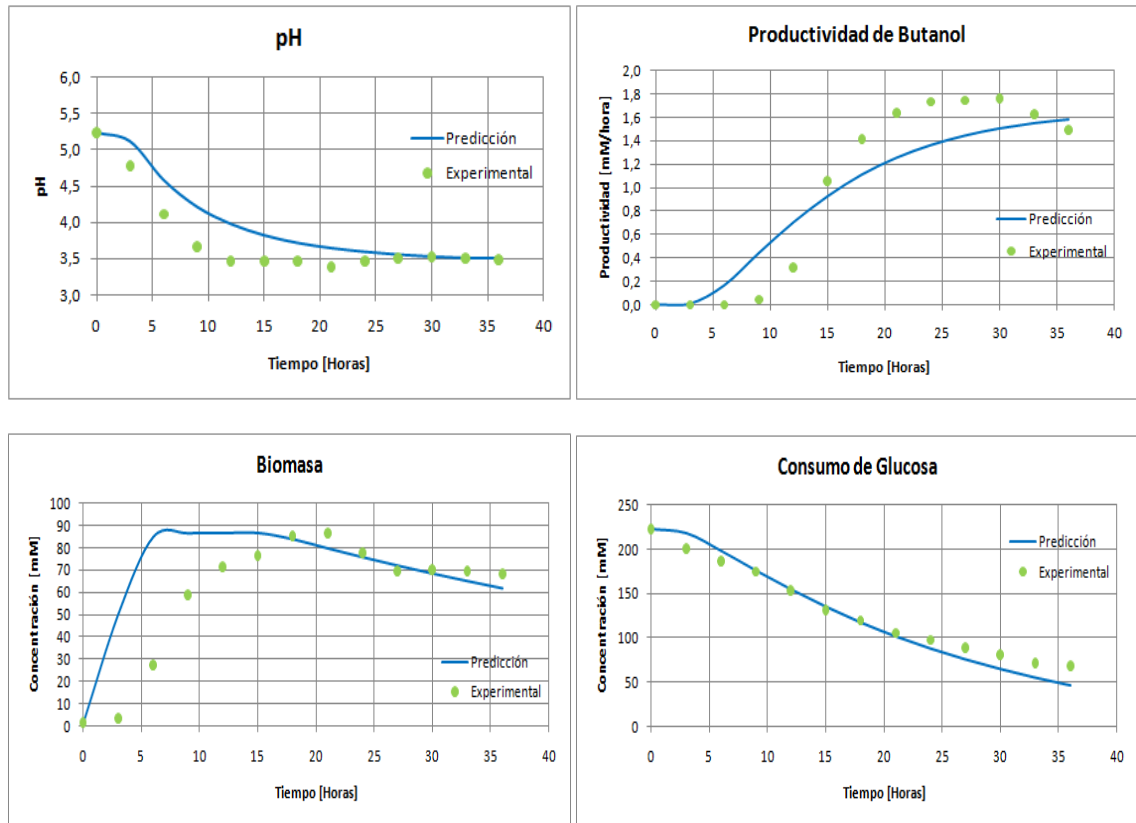
Modelo	Error Cuadrado Medio (ECM)		Coeficiente de Correlación Ajustado (\bar{R}^2)		Varianza(σ^2)	
	Productividad Butanol	pH	Productividad Butanol	pH	Productividad Butanol	pH
1	0.0067590	0.4289501	0.4355897	0.7800961	0.0001252	0.0079435
2	0.0399190	3.1964030	0.2281571	0.2463716	0.0009283	0.0743350
3	0.0062668	1.2024583	0.4236796	0.2540428	0.0001182	0.0226879
4	2.1072102	0.5268661	0.5170535	0.8148035	0.0658503	0.0164646
5	0.8859412	1.2033200	0.7634795	0.7312286	0.0340747	0.0462815

Fuente: Autores.

Los criterios estadísticos fueron contrastados para los cinco modelos considerados. El coeficiente de correlación ajustado presentó valores adecuados para las dos variables de respuesta (y en general para todas las variables) predichas por el modelo No. 5. En este caso, la variabilidad total de la productividad del butanol y del pH fue explicada por el modelo en un 76.3% y 73.1% respectivamente. La variabilidad con respecto a la media fue en general reducida. Siendo favorecido el modelo No.1 al presentar los menores valores de este criterio estadístico de selección, para ambas variables de respuesta.

Cuando se analizó la predicción efectuada para cada especie el modelo No. 5 presentó los mejores resultados. Hecho que conllevó a su elección. En la figura 3 se muestra el comportamiento a través del tiempo (experimental y predicho) del pH, la productividad de butanol, la glucosa y la biomasa. En las gráficas puede observarse el nivel de correspondencia alcanzado con el modelo elegido y ajustado. Durante la simulación se utilizaron las mismas condiciones iniciales de las pruebas experimentales; los valores fueron: glucosa, 222.973 mmol/L; biomasa, 1.3783 mmol/L; pH, 5.23.

Figura 3. Comportamiento a través del tiempo de variables de la fermentación ABE.



Fuente: Autores.

A continuación se hace una descripción del modelo final escogido y las modificaciones efectuadas sobre éste. Las transformaciones realizadas sobre el modelo base permitieron obtener uno más completo, matemáticamente ajustado y acorde con la fenomenología reportada por la literatura para este proceso.

En términos generales, el modelo propuesto es un sistema de 17 ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas que, al ser resueltas simultáneamente, predicen el comportamiento de todas las especies durante la fermentación.

- **16 ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas** (EDOs) propuestas por Shinto y col. [9] para la cinética del proceso. Con base en la revisión bibliográfica y

el conocimiento adquirido de la naturaleza del proceso, se efectuaron cambios sobre la ecuación de biomasa planteada por los autores. Cabe recordar que estos expresaron el crecimiento celular con un término cinético tipo Michaelis – Menten de inhibición no competitiva por parte del butanol.

Existe vasta información en la literatura que afirma la existencia de más efectos inhibitorios sobre la velocidad específica de crecimiento celular, además del butanol [1,10,11,13,16]. Por tal motivo, se procedió a encontrar una ecuación para la velocidad de crecimiento celular que representara más adecuadamente la dependencia de ésta respecto a otras variables. Se incluyó entonces en el modelo propuesto la expresión planteada por Napoli y col para **la velocidad específica de crecimiento celular (μ)** [23], función de los productos finales de la fermentación y del pH del medio.

La ecuación de crecimiento celular seleccionada también fue sometida a ciertas modificaciones, relacionadas con los metabolitos inhibidores. Según la literatura, ni la acetona ni el etanol alcanzan niveles tóxicos para el crecimiento celular en una fermentación batch habitual; sólo el butirato, el acetato y el butanol llegan a tener efecto sobre la reproducción de células [1,11,22]. Por esta razón, los términos inhibitorios de la acetona y el etanol fueron omitidos de la expresión utilizada, permaneciendo en ella los tres productos restantes. Los valores críticos de concentración de inhibidores requeridos por la ecuación fueron tomados de la literatura para la cepa *C. acetobutylicum* ATCC 824 [1,10,19,22].

- **1 ecuación diferencial ordinaria**, planteada por los autores del presente trabajo, que representa la dinámica de los iones hidrógeno a lo largo de la fermentación (Ecuación 2). El balance de hidrógeno desarrollado toma en cuenta el efecto de los ácidos débiles presentes, la solución buffer alimentada y el ácido y la base fuertes utilizados para el control del pH. Es útil y necesario para anticipar

la variación de la velocidad máxima de crecimiento específico en función de los iones hidrógeno presentes (y por ende, del pH). El modelo cinético definitivo se muestra a continuación.

$$\mu = \frac{\overline{\mu}_{m\acute{a}x}}{\left(1 + \frac{H^+}{K_H} + \frac{K_{OH}}{H^+}\right)} \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{10^{(pH_{opt} - pH)}}{10^{1.5}}\right) \left(1 - \frac{C_{aa}}{C_{maa}}\right)^{naa} \left(1 - \frac{C_{ab}}{C_{mab}}\right)^{nab} \left(1 - \frac{C_b}{C_{mb}}\right)^{nb}$$

$$R_1 = \frac{V_{m\acute{a}x1}[Glucosa][Biomasa]}{K_{m1}(1 + [Glucosa]/K_{is1}) + [Glucosa](1 + [Butanol]/K_{ii1})} \times F$$

$$R_8 = V_{m\acute{a}x8} \left(\frac{1}{1 + (K_{m8A}/[Acetato])}\right) \left(\frac{1}{1 + (K_{m8B}/[AACoA])}\right) \times [Biomasa]$$

$$R_2 = \frac{V_{m\acute{a}x2}[F6P][Biomasa]}{K_{m2} + [F6P]} \times F$$

$$R_{10} = \frac{V_{m\acute{a}x10}[ACoA][Biomasa]}{K_{m10} + [ACoA]}$$

$$R_3 = \frac{V_{m\acute{a}x3}[G3P][Biomasa]}{K_{m3} + [G3P]} \times F$$

$$R_{11} = \frac{V_{m\acute{a}x11}[ACoA][Biomasa]}{K_{m11} + [ACoA]} \times F$$

$$R_4 = \frac{V_{m\acute{a}x4}[Lactato][Biomasa]}{K_{m4} + [Lactato]} \times F$$

$$R_{12} = \mu[Biomasa]$$

$$R_{13} = k_{13}[Biomasa]$$

$$R_5 = \frac{V_{m\acute{a}x5}[Piruvato][Biomasa]}{K_{m5} + [Piruvato]} \times F$$

$$R_{14} = \frac{V_{m\acute{a}x14}[AACoA][Biomasa]}{K_{m14} + [AACoA]} \times F$$

$$R_6 = \frac{V_{m\acute{a}x6}[Piruvato][Biomasa]}{K_{m6} + [Piruvato]} \times F$$

$$R_{16} = \frac{V_{m\acute{a}x16}[Acetoacetato][Biomasa]}{K_{m16} + [Acetoacetato]}$$

$$R_7 = \frac{V_{m\acute{a}x7}[Acetato][Biomasa]}{K_{m7} + [Acetato]} \times F$$

$$R_{17} = \frac{V_{m\acute{a}x17}[Butirato][Biomasa]}{K_{m17}(1 + K_{a17}/[Butirato]) + [Butirato]} \times F$$

$$R_9 = \frac{V_{m\acute{a}x9}[ACoA][Biomasa]}{K_{m9} + [ACoA]} \times F$$

$$R_{18} = \frac{V_{m\acute{a}x18}[BCoA][Biomasa]}{K_{m18} + [BCoA]}$$

$$R_{15} = V_{m\acute{a}x15} \left(\frac{1}{1 + (K_{m15A}/[Butirato])}\right) \left(\frac{1}{1 + (K_{m15B}/[AACoA])}\right) \times [Biomasa]$$

$$R_{19} = \frac{V_{m\acute{a}x19}[BCoA][Biomasa]}{K_{m19}(1 + K_{a19}/[Butirato]) + [BCoA](1 + [Butanol]/K_{ii19})} \times F$$

$$\frac{d[Glucosa]}{dt} = -R_1$$

$$\frac{d[Piruvato]}{dt} = R_3 + R_4 - R_5 - R_6$$

$$\frac{d[F6P]}{dt} = R_1 - R_2$$

$$\frac{d[Lactato]}{dt} = R_5 - R_4$$

$$\frac{d[G3P]}{dt} = R_2 - R_3$$

$$\frac{d[ACoA]}{dt} = R_6 + R_7 + R_8 - R_9 - R_{10} - R_{11} - R_{12}$$

$$\frac{d[Biomasa]}{dt} = R_{12} - R_{13}$$

$$\frac{d[Acetato]}{dt} = R_9 - R_7 - R_8$$

$$\frac{d[Etanol]}{dt} = R_{11}$$

$$\frac{d[AACoA]}{dt} = R_{10} - R_8 - R_{14} - R_{15}$$

$$\frac{d[Acetoacetato]}{dt} = R_8 + R_{15} - R_{16}$$

$$\frac{d[BCoA]}{dt} = R_{14} + R_{15} + R_{17} - R_{18} - R_{19}$$

$$\frac{d[Butirato]}{dt} = R_{18} - R_{15} - R_{17}$$

$$\frac{d[Acetona]}{dt} = R_{16}$$

$$\frac{d[CO_2]}{dt} = R_6 + R_{16}$$

$$\frac{d[Butanol]}{dt} = R_{19}$$

Donde R_j representa la velocidad de formación o consumo de las distintas especies presentadas en la ruta metabólica (Figura1). La tabla 6 muestra los parámetros ajustados del modelo cinético propuesto. La complejidad del modelo puede verse como una desventaja. No obstante, el hecho que el modelo sea capaz de predecir el comportamiento tanto de los productos intermediarios como de los metabolitos finales, hace posible un mejor conocimiento del proceso. Dando la posibilidad de futuros estudios, encaminados a la determinación de las especies que más inciden sobre la cantidad final de solventes producidos (butanol especialmente).

Tabla 6. Parámetros del modelo cinético ajustado.

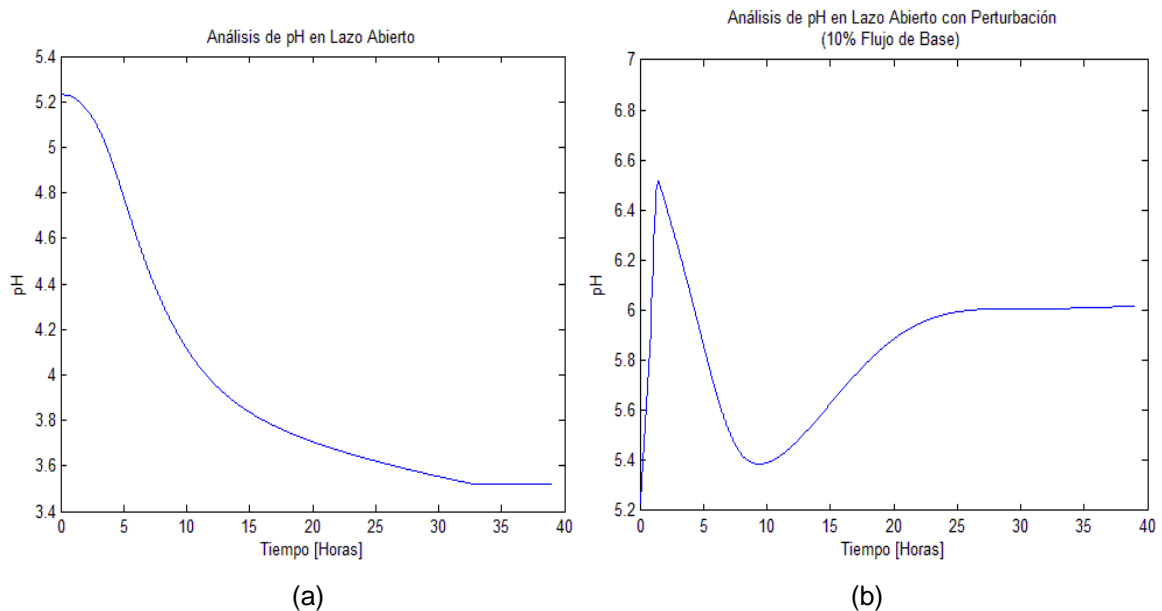
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
$\bar{\mu}_{m\acute{a}x}$	1.5	K_{is1}	1.75	$V_{m\acute{a}x8}$	3	K_{m15B}	9
K_H	3.33e-4	K_{ii1}	4.5	K_{m8A}	60	$V_{m\acute{a}x16}$	100
K_{OH}	5.04e-7	$V_{m\acute{a}x2}$	18	K_{m8B}	77.25	K_{m16}	200
K_S	1.5	K_{m2}	10	$V_{m\acute{a}x9}$	22.8	$V_{m\acute{a}x17}$	5
pH_{opt}	4.9	$V_{m\acute{a}x3}$	30	K_{m9}	0.05	K_{m17}	30
C_{maa}	199.83	K_{m3}	26.5	$V_{m\acute{a}x10}$	20	K_{a17}	2,2
naa	47.124	$V_{m\acute{a}x4}$	0.001	K_{m10}	1	$V_{m\acute{a}x18}$	200
C_{mab}	124.84	K_{m4}	200	$V_{m\acute{a}x11}$	31.8	K_{m18}	0.5
nab	1.805	$V_{m\acute{a}x5}$	98.5	K_{m11}	27	$V_{m\acute{a}x19}$	7.75
C_{mb}	222.61	K_{m5}	3	k_{13}	0 – 0.017	K_{m19}	2
nb	10.861	$V_{m\acute{a}x6}$	180	$V_{m\acute{a}x14}$	40	K_{a19}	2.2
F	1 – 0	K_{m6}	0.1	K_{m14}	15	K_{ii19}	379.44
$V_{m\acute{a}x1}$	1.15	$V_{m\acute{a}x7}$	2	$V_{m\acute{a}x15}$	9.5		
K_{m1}	20.5	K_{m7}	25	K_{m15A}	15		

Fuente: Autores.

El biorreactor por lotes modelado no puede operar sin la existencia de un lazo de control para la temperatura y el pH. Con el objetivo de demostrar la veracidad de este enunciado, se presentan a continuación los resultados obtenidos de la simulación en lazo abierto. En ellos se pueden observar dos escenarios diferentes (con y sin perturbación) para cada variable.

En la figura 4a se presenta el comportamiento del pH sin perturbaciones externas. Éste disminuye sin ninguna restricción alcanzando la estabilidad a las 33 horas. El último valor tomado por la variable se encuentra por debajo del valor crítico de inhibición ($\text{pH}=4$). Además presenta una diferencia de 1.38 con respecto al valor deseado en el sistema ($\text{pH}=4.9$). De esta manera, las productividades de los metabolitos se verán afectadas, corroborando la necesidad de controlar esta variable.

Figura 4. Análisis de pH en lazo abierto sin perturbación del sistema **(a)** y ante una perturbación de 0.06 L/h en el flujo de la base **(b)**.



Fuente: Autores.

Para el segundo escenario se perturbó el sistema con un flujo de base de 0.06L/h (Concentración: 150mM). En la figura 4b se puede observar la respuesta del pH ante esta perturbación. Como era de esperarse, el incremento de este flujo ocasionó un aumento en la variable respuesta, que alcanzó un valor de aproximadamente 6.5 durante las primeras horas. Dicho valor corresponde a un sobrepaso de 1.6 con respecto al *set point*, hecho que deberá evitarse en el esquema de control. Posteriormente se presentó una disminución del pH, que llegó a un valor mínimo en la hora 9 aproximadamente. Después de un último incremento la variable respuesta se estabilizó en un valor de pH=6.0 (1.1 por encima del punto de control), alrededor de las 27 horas.

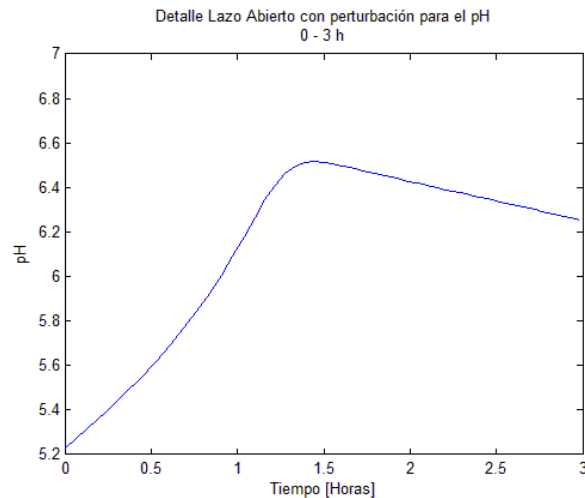
La naturaleza del proceso considerado explica adecuadamente lo observado en la figura 4b. En un principio, no se registra la aparición de ácidos débiles en el medio, hecho que permite el incremento del pH durante la etapa inicial. La continua producción de ácidos durante la fermentación tiene como efecto principal una disminución en el valor del pH, sustrayéndole efecto a la base añadida. Una vez iniciada la solventogénesis, la reasimilación de los ácidos y la producción de solventes ocasionan un nuevo incremento en la variable respuesta, que finalmente se estabiliza. Es notable el hecho que la adición de base en el sistema ocasiona que éste alcance su estabilidad varias horas antes que cuando no es sometido a perturbación alguna, lo que fortalece la necesidad del control.

El comportamiento presentado por el sistema ante la perturbación, en comparación con aquel presentado sin esta, es aceptable. Lo anterior, debido a dos factores significativos: el valor final alcanzado y el tiempo de estabilización. El primero viene a ser más del doble del punto alcanzado en un primer momento, lo cual es completamente congruente con la dinámica del sistema (el efecto de la base durante la fermentación conlleva a un aumento del pH). De lo anterior, se deduce que no se necesitarán grandes cantidades de base para controlar el proceso, dato significativo para la posterior elección del elemento final de control.

El segundo factor se reduce en un 20%, lo cual indica la posibilidad de obtener un tiempo de estabilización más corto una vez programado el esquema de control.

Para obtener información más detallada sobre el punto máximo presentado por el pH durante el análisis de lazo abierto con perturbación (figura 4b), se muestra una ampliación entre la hora 0 y 3 (figura 5). Esto permite verificar la ausencia de errores en la dinámica planteada puesto que el cambio debe ser paulatino.

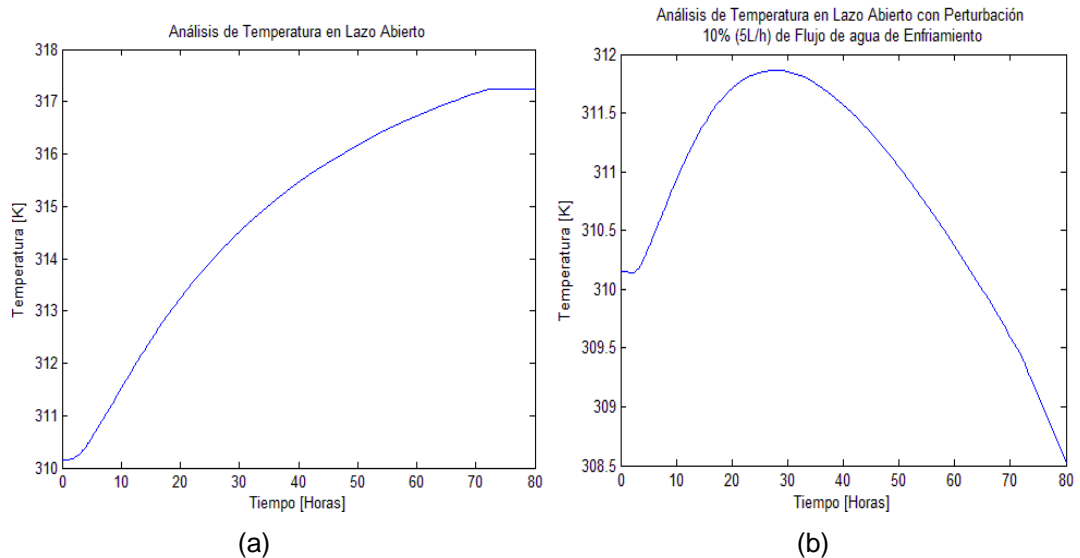
Figura 5. Detalle Lazo Abierto con perturbación para el pH (0-3 h).



Fuente: Autores.

En el caso de la temperatura, se presenta su comportamiento ante ausencia de perturbaciones en la figura 6a. Debido a la ausencia de control sobre esta variable, el calor liberado por la reacción hace que la temperatura de trabajo deseada (310K) se incremente hasta en 7K. Igualmente se observa que la variable alcanza su máximo valor aproximadamente en la hora 72. A partir de dicha hora el sistema permanece estable. La invariabilidad presentada se debe a la ausencia de pérdidas de calor (modelo de reactor adiabático), que no fueron consideradas en el modelo planteado por falta de datos experimentales que hicieran posible su simulación.

Figura 6. Análisis de temperatura en lazo abierto sin perturbación del sistema (a) y ante una perturbación de 5 L/h en el flujo de agua de enfriamiento (b).



Fuente: Autores.

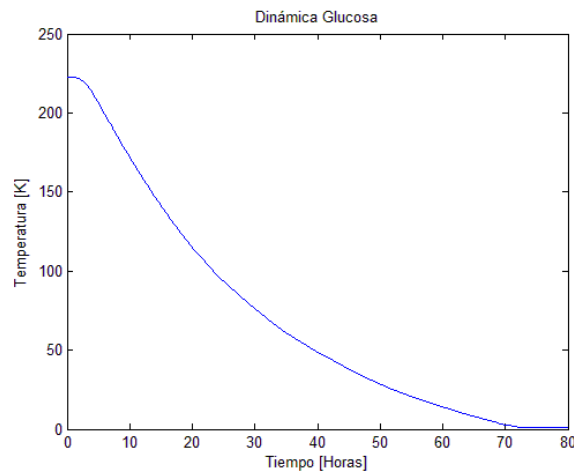
Las bacterias utilizadas en el presente proceso (al igual que todos los microorganismos) son susceptibles a los cambios de temperatura; se ha demostrado que esta variable está directamente relacionada con la productividad final de solventes [1]. El hecho anteriormente expuesto demuestra la importancia de controlar esta variable.

El segundo escenario de la temperatura (en lazo abierto con perturbación) fue observado después de perturbar el sistema con un flujo de agua de enfriamiento de 5 L/h (figura 6b). Se presentó un comportamiento prácticamente constante durante las primeras 2 horas de fermentación, seguido por el aumento de la temperatura hasta alcanzar un valor máximo cercano a los 312K a las 30 horas. En ese momento se observó una caída paulatina de la variable, que tomó valores inferiores al *set point* del proceso a partir de las 60 horas aproximadamente.

La caída de temperatura ante la presencia de la perturbación, encuentra su explicación en el comportamiento seguido por la glucosa (Figura 7) y los

metabolitos según el modelo propuesto. Las velocidades de consumo de sustrato y de aparición de metabolitos disminuyen a medida que transcurre el tiempo. Lo anterior tiene como efecto la disminución del calor liberado por la reacción hasta cuando todo el sustrato es consumido (hora 72). En ese momento la reacción se detiene y el calor deja de liberarse. Bajo estas nuevas condiciones, y aún en presencia del flujo de agua de enfriamiento, la temperatura del sistema disminuye.

Figura 7. Dinámica de glucosa en el medio de fermentación predicha por el modelo planteado, bajo las condiciones iniciales consideradas.

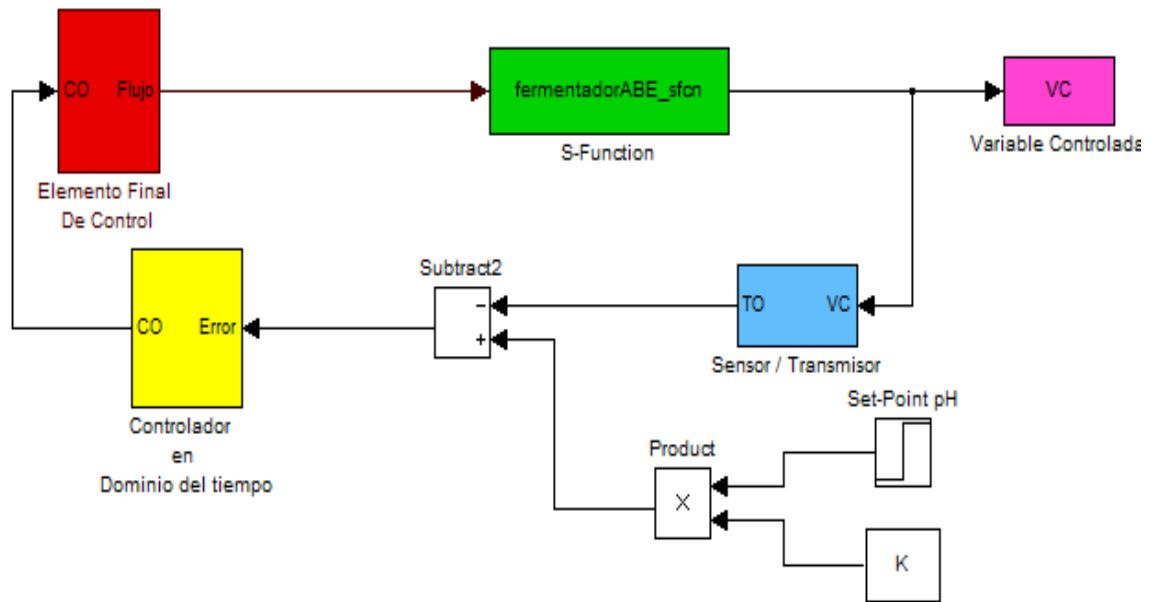


Fuente: Autores.

La comparación del análisis en lazo abierto en presencia y ausencia de perturbación permitió obtener datos acerca del flujo de agua de refrigeración necesario para el control de temperatura. Hecho significativo durante la elección del elemento final de control considerado en el esquema de lazo cerrado.

El lazo cerrado se simuló en el dominio del tiempo empleando el bloque S-function de Simulink. El esquema general del lazo de control programado se presenta en la figura 8. La representación de los elementos del lazo en el dominio del tiempo es mostrada con más detalle en el Anexo 3.

Figura 8. Esquema de General de Control.



Fuente: Autores.

A continuación se presentan las características de los elementos del lazo de control que se consideraron durante la simulación. Estos fueron seleccionados dado que cumplieron con las especificaciones que demanda el sistema.

Sensor:

- **pH:** Se tomó como referencia un sensor de pH/ORP 2750 marca Signet [38,39], que proporciona una salida de lazo de 4 a 20 mA, con los siguientes límites de funcionamiento: pH: 0 – 14; ORP: $\pm 2000\text{mV}$. Tiempo de respuesta: < 6 segundos.
- **Temperatura:** Se tomó como referencia un sensor termo-resistencia Pt 100 marca BÜRKERT [40], que proporciona una señal de salida de 4 a 20 mA, posee un rango de medición de 0 a 150°C y un tiempo característico de 1 segundo.

Elemento final de control:

- **pH:** Fue considerada una bomba peristáltica marca LAMBDA [41], que permite establecer variaciones en el caudal entre 0 y 100% (caudal mínimo: 0 L/h; caudal

máximo: 0.6 L/h). Este hecho hace el control de pH más preciso que la típica variación on/off de las bombas con velocidad fija. Posee además un integrador electrónico de caudal que permite conocer de forma precisa cuanta base o ácido han sido adicionados en un lapso de tiempo.

- **Temperatura:** Se eligió una válvula de control de globo marca BÜRKERT [42], 2/2 vías, con diseño en acero inoxidable para medios hasta +180°C, DN 13-50. Combinable con sistemas de control continuo. Para su selección se tuvo en cuenta un delta máximo de presión en la válvula de 10psia y debe trabajar con valores de apertura entre 10 – 90% (caudal mínimo: 0 L/h; caudal máximo: 50 L/h).

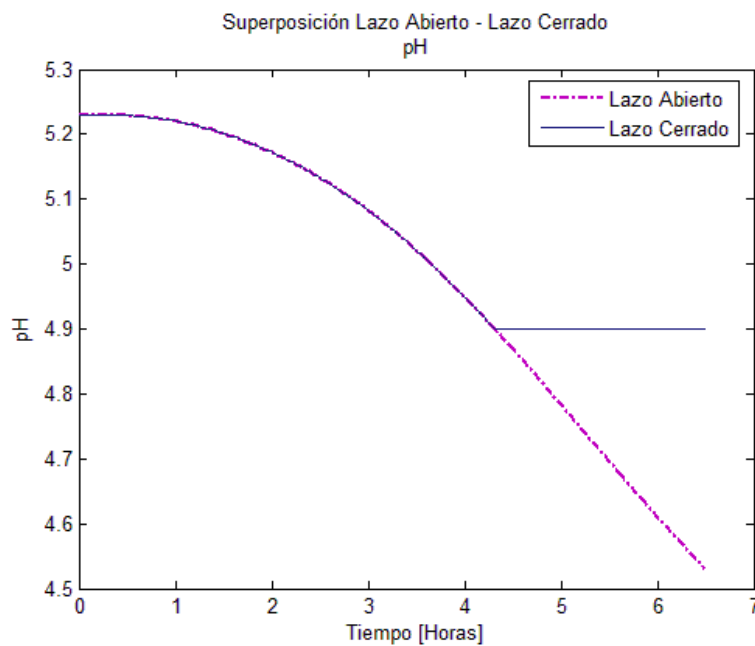
Para la selección del controlador se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos del análisis en lazo cerrado para pH y temperatura. Los métodos convencionales de Ziegler-Nichols no pudieron ser empleados en la sintonización de los controladores. En el caso del método en lazo abierto, es posible que existan polos dominantes complejos conjugados en el modelo, y en consecuencia la respuesta al escalón unitario no fue como la requerida (Forma de S). Por otra parte, la carencia de una ganancia crítica en el proceso (característico de procesos estables y no oscilatorios) no permitió la aplicación del método en lazo cerrado [43,44].

Lo anterior llevó a realizar una sintonización por medio del método de relé. Los resultados obtenidos de ésta deben ser considerados una primera aproximación de los parámetros del controlador. En el caso del pH no se obtuvieron buenos resultados por medio de dicha técnica, por lo cual se tomaron los máximos valores de un controlador PID comercial para la simulación (dichos parámetros se resumen más adelante).

El análisis de lazo cerrado del pH permitió llegar a una respuesta adecuada dentro de las limitaciones del sistema. Así mismo, evidenció que la respuesta del pH no varía con respecto a la presentada en lazo abierto hasta que se alcanzan valores

inferiores al *set point*. La figura 9 corrobora lo anteriormente planteado, dado que los comportamientos en lazo abierto y lazo cerrado se superponen antes del momento mencionado. El cambio en el punto de control no es abrupto como se observa en la figura, el problema se encuentra en el tamaño de paso que emplea el método numérico para resolver el modelo, el cual no permite mostrar con mayor detalle ese momento.

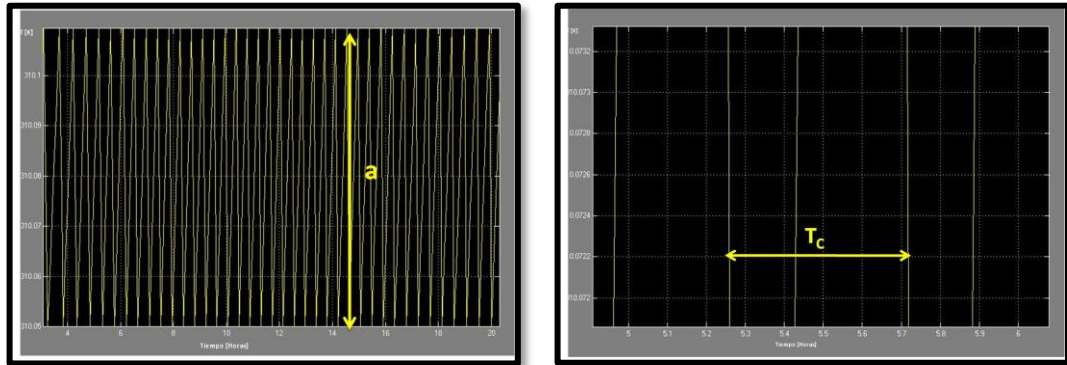
Figura 9. Análisis Respuesta pH en Lazo Abierto y Cerrado.



Fuente: Autores.

Para el control de temperatura se realizó la sintonización por el método de relé [45]. El sistema se forzó indirectamente a entrar en oscilación perpetua (lo cual no se logró con el controlador proporcional en el método de Ziegler-Nichols), por medio de un relé con histéresis. Se registró la salida (Temperatura del fermentador) hasta observar el ciclo límite y se tomó el registro de la amplitud y el periodo de dicho ciclo (figura 10).

Figura 10. Método de Relé.



Fuente: Autores

Características del relé:

$d = 50$ (Amplitud de la señal de salida del controlador).

$\varepsilon = 0.05K$ (Error con respecto al punto de control).

La ganancia crítica se calculó de la siguiente manera:

$$K_c = \frac{4 \cdot d}{\pi \cdot a} = 1273.24$$

A continuación se aplicó la fórmula para controladores PI (tabla 6) y se calculó la ganancia del controlador proporcional e integral.

Tabla 7. Formulas de ajuste para el método de relé.

	P	PI	PID
K_p	$0.5 \cdot K_c$	$0.45 \cdot K_c$	$0.6 \cdot K_c$
τ_I	-	$0.833 \cdot T_c$	$0.5 \cdot T_c$
τ_D	-	-	$0.125 \cdot T_c$

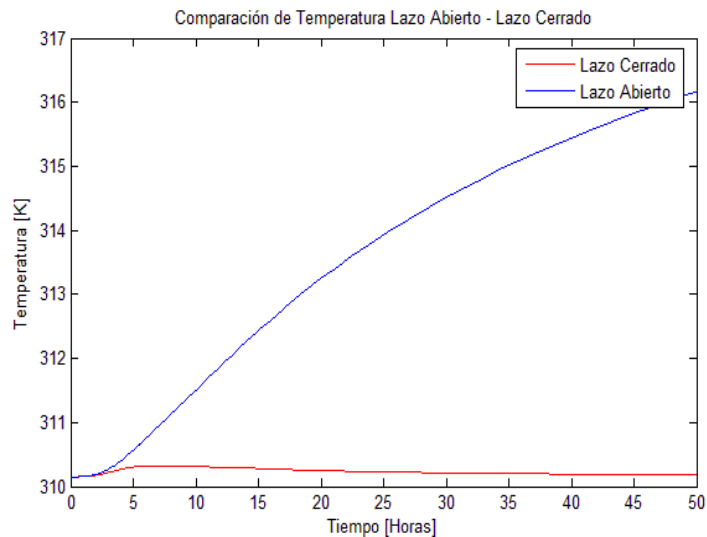
Fuente: Autores

$$K_p = 0.45 \cdot 1273.24 = 572.96 \frac{\%}{\%}$$

$$\tau_I = 0.833 \cdot 0.45 = 0.375h$$

El análisis en lazo cerrado de temperatura permitió corroborar la eficacia del lazo propuesto al compararlo con el resultado obtenido en lazo abierto (figura 11). El error presentado por el lazo de control es de 0.17 unidades con respecto al punto del control (310.15K). Así mismo, presenta una diferencia de 6K con respecto al máximo valor de temperatura presentado en el análisis en lazo abierto. Evidenciándose de esta manera, la necesidad y eficacia de un lazo de control por retroalimentación con controlador PI para el control de la temperatura.

Figura 11. Análisis respuesta Temperatura en Lazo Abierto y Cerrado.



Fuente: Autores

Controlador:

- **pH:** Se eligió como referencia un controlador marca BÜRKERT tipo 1150 [46], cuya estructura de controlador *feedback* es capaz de adaptarse a una amplia variedad de procesos. Sus parámetros fueron utilizados durante la simulación del lazo cerrado de pH, y se muestran a continuación:

PID	
K_p	0 – 9999 in%/unit
τ_I	0 – 9999 seg
τ_D	0 – 9999 seg

- **Temperatura:** Se escogió un controlador PI con una ganancia proporcional de 572.96 %/% y una ganancia integral de 0.375 horas. A nivel comercial pueden encontrarse controladores que cumplan estas especificaciones, ejemplo de ello es el 8620 mxControl marca BÜRKERT [47]. El cual maneja ganancias proporcionales entre 0.001 – 9999 in%/unit e integrales entre 0.1 – 9999 segundos.

El presente trabajo no incluye un lazo de control para la cantidad de oxígeno disuelto, la cual es una variable determinante en el proceso, dadas las condiciones anaerobias que éste requiere. El control no pudo realizarse debido a la carencia de datos experimentales que relacionaran la cantidad de oxígeno en el caldo con el flujo de nitrógeno necesario para eliminarlo del sistema.

CONCLUSIONES

Se propuso un nuevo modelo cinético para la fermentación ABE con *C. acetobutylicum* ATCC 824 a partir de glucosa que incluye gran parte de la fenomenología del proceso, en especial lo relacionado con la inhibición del crecimiento celular. El modelo obtenido predice de forma aceptable el comportamiento de las especies consumidas y producidas durante el proceso, bajo las condiciones iniciales consideradas; los parámetros encontrados pueden verse como una aproximación inicial de los valores reales del sistema.

El análisis de la respuesta transitoria y en lazo cerrado corroboró la necesidad de implementar un sistema de control para las variables temperatura y pH. Esta última presentó el caso más significativo, al exhibir una disminución hasta valores inferiores del pH crítico tolerado por la cepa. En el caso de la temperatura, ésta describió el carácter exotérmico de la reacción bajo estudio, sobrepasando el valor óptimo (37°C) a los 40 (aprox.) minutos de haber empezado la fermentación.

Aproximadamente entre un 70-80% de la efectividad de un sistema de control por retroalimentación se encuentra en el modelo planteado para el proceso. Gracias al adecuado ajuste obtenido por éste, los lazos de control diseñado para pH y temperatura cumplieron adecuadamente las especificaciones (sistema multipropósito, eficacia, tiempo estabilización y confiabilidad) del proyecto. Por esa razón, el diseño propuesto puede ser considerado como una apropiada base para el desarrollo del sistema de control final a implementar en el biorreactor.

PROSPECTIVAS

El modelo seleccionado en este estudio es la mejor aproximación encontrada para los perfiles de producción de la fermentación ABE, en el intervalo de condiciones expuestas. Su ajuste fue realizado a través de un método no lineal de mediano nivel de complejidad. Se recomienda realizar una optimización de los parámetros para el empleo del modelo en futuras aplicaciones. Para lo anterior, será necesario ampliar el intervalo de condiciones iniciales consideradas y realizar un número mayor de corridas experimentales.

En la literatura se registra la inhibición y muerte de las bacterias a altas concentraciones de oxígeno. Así mismo, se expresa la necesidad e importancia del aseguramiento de las condiciones anaerobias. Sin embargo, no se encontró una expresión matemática de relación entre la concentración de oxígeno disuelto y la producción de solventes. Para posteriores estudios se aconseja realizar un seguimiento al comportamiento del oxígeno disuelto y el efecto que produce sobre el crecimiento celular.

Aunque el diseño del sistema de control propuesto en este estudio tenga fines multipropósito, se advierte sobre sus falencias en el tiempo de respuesta y precisión si la implementación del control se espera realizar a una escalar mayor, donde el tiempo muerto pueda ser significativo. Se recomienda un estudio a profundidad sobre el control de pH y la posible mejora del diseño con la acción conjunta de estrategias de control automático de procesos (ej. Retroalimentada – Pre calculada).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] JONES, D., WOODS, D. 1986. "Acetone–Butanol Fermentation Revisited". *Microbiological Reviews*. Vol. 50, No. 4, p. 484–524.
- [2] LIU, Z., YING, Y., LI, F., MA, C., XU, P. 2010. "Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Vol. 37, No.5, p. 495–501.
- [3] DÜRRE, P. 1998. "New insights and novel developments in clostridial Acetone/Butanol/Isopropanol fermentation". *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 49, No. 6, p. 639–648.
- [4] NAPOLI, F., OLIVIERI, G., MARZOCELLA, A., SALATINO, P. 2009. "Bioenergy II: An assessment of the kinetics of butanol production by *Clostridium acetobutylicum*". *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. Vol. 7, A45.
- [5] PAPOUTSAKIS, E. 2008. "Engineering solventogenic clostridia". *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 19, No. 5, p. 420–429.
- [6] EZEJI, T., QURESHI, N., BLASCHEK, H. 2004. "Acetone Butanol Ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed – batch technique and product inhibition by gas stripping". *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 63, No. 6, p. 653–658.
- [7] PINTO, A., BASTOS, C., WOLF, M., MAUGERI, F., PIRES, D., DE FRANCESCHI, D., MACIEL, R. 2010. "Dynamics and control strategies for a butanol fermentation process". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 160, No. 8, p. 2424–2448.
- [8] TASHIRO, Y., TAKEDA, K., KOBAYASHI, G., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A., YOSHINO, S. 2004. "High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*N-14 in fed-batch culture with ph-stat continuous butyric acid and glucose feeding method". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 98, No. 4, p. 263–268.

- [9] SHINTO, H., TASHIRO, Y., YAMASHITA, M., KOBAYASHI, G., SEKIGUCHI, T., HANAI, T., KURIYA, Y., OKAMOTO, M., SONOMOTO, K. 2007. "Kinetic modeling and sensitivity analysis of Acetone-Butanol-Ethanol production". *Journal of Biotechnology*. Vol. 131, No. 1, p. 45–56.
- [10] HERRERO, A. 1983. "End-product inhibition in anaerobic fermentations". *Trends in Biotechnology*. Vol. 1, No. 2, p. 49–53.
- [11] MONOT, F., ENGASSER, J., PETITDEMANGE, H. 1984. "Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*". *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 19, No. 6, p. 422–426.
- [12] HARTMANIS, M., KLASON, T., GATENBECK, S. 1984. "Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*". *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 20, No. 1, p. 66–71.
- [13] BAHL, H., ANDERSCH, W., KONSTANTIN B., GOTTSCHALK, G. 1982. "Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture". *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 14, No. 1, p. 17–20.
- [14] BEREZINA, O., SINEOKY, S., VELIKODVORSKAYA, G., SCHWARZ W., ZVERLOV, V. 2008. "Extracellular glycosyl hydrolase activity of the *Clostridium* strains producing acetone, butanol and ethanol". *Applied Biochemistry and Microbiology*. Vol. 44, No. 1, p. 41–47.
- [15] O'BRIEN, R., MORRIS, J. 1971. "Oxygen and the growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*". *Journal of General Microbiology*. Vol. 68, p. 307–318.
- [16] HERRERO, A., GÓMEZ, R., SNEDECOR, B., TOLMAN, C., ROBERTS, M. 1985. "Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids: A mechanism based on uncoupling by weak acids". *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 22, No. 1, p. 53–62.
- [17] QURESHI, N., BLASCHEK, H. 2001. "Recent advances in ABE fermentation: hyper butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Vol. 27, No. 5, p. 287–291.

- [18] LEE, S., CHO, M., PARK, C., CHUNG, Y., KIM, J., SANG, B., UM, Y. 2008. "Continuous butanol production using suspended and immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with supplementary butyrate". *Energy & Fuels*. Vol. 22, No. 5, p. 3459–3464.
- [19] YANG, X. "A novel extractive fermentation for the production of acetone – butanol by *Clostridium acetobutylicum*". Estados Unidos, 1990. Tesis Doctoral. Purdue University. Graduate School.
- [20] SCHOUTENS, G., VAN BEELEN P., LUYBEN, K. 1986. "A simple model for the continuous production of butanol by immobilized *Clostridia*. I: *Clostridium beijerinckii* on glucose". *The Chemical Engineering Journal*. Vol. 32, No. 3, p. 51–56.
- [21] YERUSHALMI, L., VOLESKY, B., VOTRUBA, J. 1988. "Fermentation process diagnosis using a mathematical model". *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 29, No. 2 y 3, p. 186–197.
- [22] YANG, X., TSAO, G. 1994. "Mathematical modeling of inhibition kinetics in acetone – butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*". *Biotechnology Progress*. Vol. 10, No. 5, p. 532–538.
- [23] NAPOLI, F., OLIVIERI, G., RUSSO, M., MARZOCHELLA, A., SALATINO, P. 2011. "Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum*– Assessment of acidogenesis kinetics". *Bioresource Technology*. Vol. 102, No. 2, p. 1608–1614.
- [24] SMITH, C., CORRIPIO, A. 2006. Control Automático de Procesos: Teoría y Práctica. México: Limusa Noriega Editores. Capítulo 1.
- [25] OGATA, K. 1998. Ingeniería de Control Moderna. 3ª edición. México: Prentice Hall. Capítulos 1 y 5.
- [26] IBRAHIM, R., MURRAY-SMITH, D. 2007. "Design, implementation and performance evaluation of a fuzzy control system for a pH neutralization process pilot plant". *International Conference on Intelligent and Advanced Systems, ICIAS 2007*. No. 4658536, p. 1001–1006.

- [27] CORNELIUS T. LEONDES. 1998. Fuzzy Logic and Expert System Applications. USA: Academic Press. p. 6–21, 123–124.
- [28] KOMIVES, C., PARKER, R. 2003. “Bioreactor state estimation and control”. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 14, No. 5, p. 468–474.
- [29] ZULKEFLEE, S., AZIZ, N. 2007. “Control implementation in bioprocess system: A review”. *International Conference on Control, Instrumentation and Mechatronics Engineering, CIM’07*. No. 15577, p. 798–804.
- [30] ALFORD, J. 2006. “Bioprocess control: Advanced and challenges”. *Computers and Chemical Engineering*. Vol. 30, No. 10 y 12, p. 1464–1475.
- [31] VALARMATHI, K., DEVARAJ, D., RADHAKRISHNAN, T. 2005. “Particle swarm optimization based PI controller tuning for fermentation process”. 2005. International Conference on Computational Intelligence for Modeling, Control and Automation and International Conference on Intelligent Agents, Web Technologies and Internet Commerce (CIMCA-IAWTIC’05). Vol. 2, p. 1043–1048.
- [32] KARIM, M., TRAUGH, G. 1987. “Data acquisition and control of a continuous fermentation unit”. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Vol. 2, No. 5, p. 305–317.
- [33] LEE, J., LEE, S., PARK, S., MIDDELBERG, A. 1999. “Control of fed – batch fermentations”. *Biotechnology Advances*. Vol.17, No. 1, p. 29–48.
- [34] MARTÍNEZ, G., RODRIGUEZ, C. Diseño y construcción de un biodigestor anaerobio de lecho fijo para operación en continuo a escala piloto con control de temperatura y pH. Bucaramanga, 2007. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.
- [35] RAMIREZ, F., MACIEJOWSKI, J. 2007. “Optimal beer fermentation”. *Journal of the Institute of Brewing & Distilling*. Vol. 113, No. 3, p. 325–333.
- [36] DORAN, P. 1998. Principios de Ingeniería de los Bioprocesos. España: Editorial Acribia, S. A. Capítulos 5 y 6.
- [37] NELDER, J., MEAD, R. 1965. "A Simplex Method for Function Minimization". *Computer Journal*. Vol.7, p. 308 – 313.

[38] George Fischer Signet LLC – 2750 DryLoc[®] pH–ORP Sensor. Última consulta: 08/04/2011.

<http://www.gfsignet.com/go/index.cfm?uuid=A653611119993E1D3474D3A3F7CC718B>.

[39] George Fischer Signet LLC – 2750 DryLoc[®], electrónica del sensor pH–ORP. Última consulta: 08/04/2011.

http://www.us.piping.georgefischer.com/go/0EFE8C5D19993E1D3490809D5CFF1548?action=GF_DocumentDownload&doc_uuid=0EFE8C5D19993E1D3490809D5CFF1548.

[40] BÜRKERT TST001 Resistance Thermometer Pt100. Última consulta: 08/04/2011.

http://www.burkert.es/products_data/datasheets/DSTST001-Standard-EU-EN.pdf.

[41] LAMBDA Laboratory Instruments. Bombas Peristálticas Preciflow – Multiflow – Hiflow – Maxiflow. Última consulta: 08/04/2011.

<http://www.lambda-instruments.com/pdf/spain/LAMBDA-Bombas-peristalticas.pdf>.

[42] BÜRKERT 23012/2-way Globe Control Valve with stainless steel design for media up to +180°C, DN 13-50. Última consulta: 08/04/2011.

http://www.burkert.es/products_data/datasheets/DS2301-2301-8802-GD-EU-EN.pdf.

[43] WANG, Y. and SHAO, H. 2000. “Optimal tuning for PI controller”. *Automatica*. Vol 36, No. 1, p. 147–152.

[44] KRISTIANSSON, B. LENNARTSON, B. 2006. “Evaluation and simple tuning of PID controllers with high – frequency robustness”. *Journal of Process Control*. Vol. 16, No. 2, p. 91–102.

[45] DESARMO, M. “Process identification based on a new relay feedback experiment”. Canada, 1998. Tesis de Maestría. University of Toronto. Graduate Department of Chemical Engineering & Applied Chemistry.

[46] BÜRKERT 1150 Multi-channel process and program controller. Última consulta: 08/04/2011.

http://www.burkert.es/products_data/datasheets/DS1150-Standard-EU-EN.pdf

[47] BÜRKERT mxControl Type 8620. Última consulta: 08/04/2011.

http://www.burkert.es/products_data/manuals/MA8620-Standard-EU-EN.pdf.

ANEXOS

ANEXO 1. Imágenes del montaje de las pruebas experimentales.



Montaje experimental para la fermentación ABE. 1) Sensor de Oxígeno; 2) Sensor de pH; 3) Sensor de Temperatura.



Caldo de la fermentación al principio y al final de la misma.

ANEXO 2. Balance del ión hidrógeno en la fermentación ABE.

Durante la fermentación ABE con *Clostridium acetobutylicum* se presentan varios equilibrios de disociación simultáneos: ácido acético, ácido butírico, ácido láctico, agua, solución buffer (H_3PO_4). En el caldo de fermentación, la concentración total de iones hidrógeno es la sumatoria de las contribuciones de cada uno de los equilibrios. Para este caso se asumió que los componentes constituyentes del buffer de fosfato, el acetato, el lactato y el butirato son consumidos en una cantidad muy pequeña por la célula [19]. Con base en lo anterior, se planteó la siguiente ecuación para la concentración total de $[H^+]$:

$$[H^+]_T = [H^+]_{AA} + [H^+]_{AB} + [H^+]_{AL} + [H^+]_{H_2O} + [H^+]_{Buffer}$$

Donde:

$[H^+]_{AA}$ = Contribución por la disociación del ácido acético.

$[H^+]_{AB}$ = Contribución por la disociación del ácido butírico.

$[H^+]_{AL}$ = Contribución por la disociación del ácido láctico.

$[H^+]_{H_2O}$ = Contribución por la disociación del agua.

$[H^+]_{Buffer}$ = Contribución por la disociación del ácido fosfórico del buffer.

- **Contribución por la disociación del agua.**

La disociación del agua se expresa como:

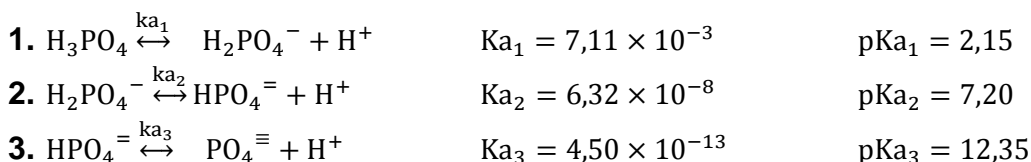


El aporte de iones hidrógeno por la disociación del agua queda:

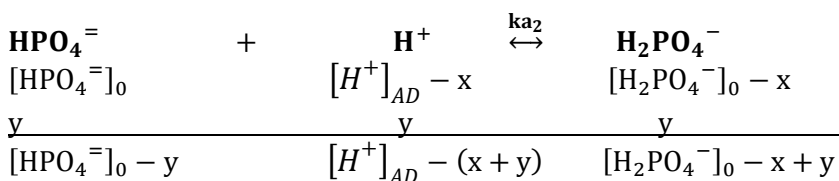
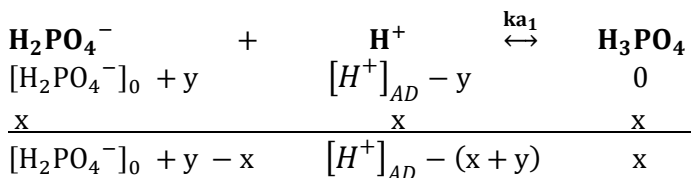
$$[H^+]_{H_2O} = \frac{k_{dHOH}}{[H^+]_T}$$

• **Contribución por la disociación del ácido fosfórico del buffer.**

El H_3PO_4 es un ácido triprótico, es decir, tiene tres protones potenciales para donar. Puede sufrir de una, dos o tres disociaciones. Los tres protones suelen ser donados consecutivamente, según los equilibrios que se muestran a continuación:



Teniendo presentes los valores que toma el pH en el proceso analizado ($\text{pH} < 6.0$) y considerando los valores de pKa obtenidos para cada equilibrio, se decidió no considerar el tercero de estos. Los iones hidrógeno aportados por los dos equilibrios restantes se obtuvieron de la siguiente manera:



Donde:

$[\text{H}_2\text{PO}_4^-]_0$ = Moles de H_2PO_4^- añadidas en el buffer.

$[\text{HPO}_4^{=}]_0$ = Moles de $\text{HPO}_4^{=}$ añadidas en el buffer.

$[\text{H}^+]_{AD}$ = Contribución de iones hidrógeno de los ácidos débiles.

x = Moles de H_3PO_4 que se forman en el equilibrio 1.

y = Moles de H_2PO_4^- que se forman en el equilibrio 2.

De las expresiones anteriores se obtiene que $[H^+]_{Buffer} = -(x + y)$

De tal manera que $[H^+]_T = -(x + y) + [H^+]_{\text{Ácidos Débiles}}$

Además,

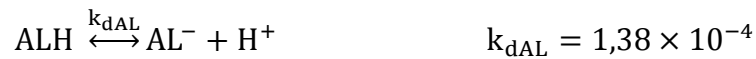
$$ka_1 = \frac{[H^+]_T([H_2PO_4^-]_0 + y - x)}{x} \quad ka_2 = \frac{[H^+]_T([HPO_4^{=}]_0 - y)}{[H_2PO_4^-]_0 + y - x}$$

Por lo cual la contribución del buffer a la concentración total de hidrógeno es:

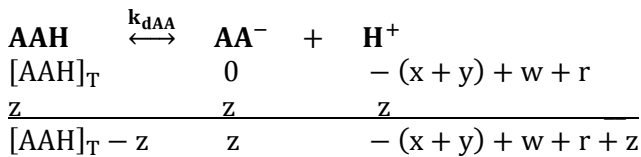
$$[H^+]_{Buffer} = - \left(\frac{[H^+]_T^3 ([H_2PO_4^-]_0 + 2[HPO_4^{=}]_0) + [H^+]_T^2 ka_1 ([H_2PO_4^-]_0 + 3[HPO_4^{=}]_0) + [H^+]_T ka_1 (ka_2 [H_2PO_4^-]_0 + ka_1 [HPO_4^{=}]_0) - ka_1^2 ka_2 [H_2PO_4^-]_0}{([H^+]_T + ka_1)([H^+]_T([H^+]_T + ka_1) + ka_1 ka_2)} \right)$$

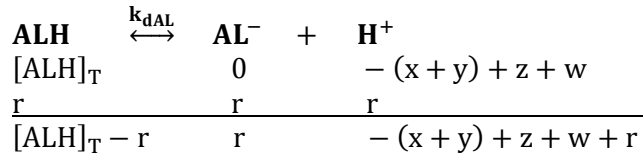
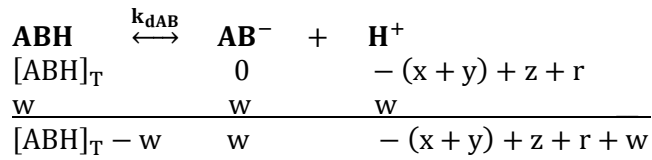
• **Contribución por la disociación de los ácidos acético, butírico y láctico.**

Las reacciones de disociación de estos tres ácidos débiles en agua pueden expresarse como:



Sus aportes a la concentración total de iones hidrógeno se dedujeron como se muestra a continuación.





Donde:

$[\text{AAH}]_T$ = Moles totales de ácido acético.

$[\text{ABH}]_T$ = Moles totales de ácido butírico.

$[\text{ALH}]_T$ = Moles totales de ácido láctico.

z = Moles de hidrógeno que aporta el AAH.

w = Moles de hidrógeno que aporta el ABH.

r = Moles de hidrógeno que aporta el ALH.

De las expresiones anteriores se obtiene $[H^+]_{\text{Ácidos Débiles}} = z + w + r$

Las constantes de disociación ácida quedan

$$k_{dAA} = \frac{z[H^+]_T}{[\text{AAH}]_T - z} \quad k_{dAB} = \frac{w[H^+]_T}{[\text{ABH}]_T - w} \quad k_{dAL} = \frac{r[H^+]_T}{[\text{ALH}]_T - r}$$

Y el aporte de los ácidos débiles a la concentración total de iones hidrógeno es:

$$[H^+]_{\text{Ácidos Débiles}} = \frac{[\text{AAH}]_T k_{dAA}}{[H^+]_T + k_{dAA}} + \frac{[\text{ABH}]_T k_{dAB}}{[H^+]_T + k_{dAB}} + \frac{[\text{ALH}]_T k_{dAL}}{[H^+]_T + k_{dAL}}$$

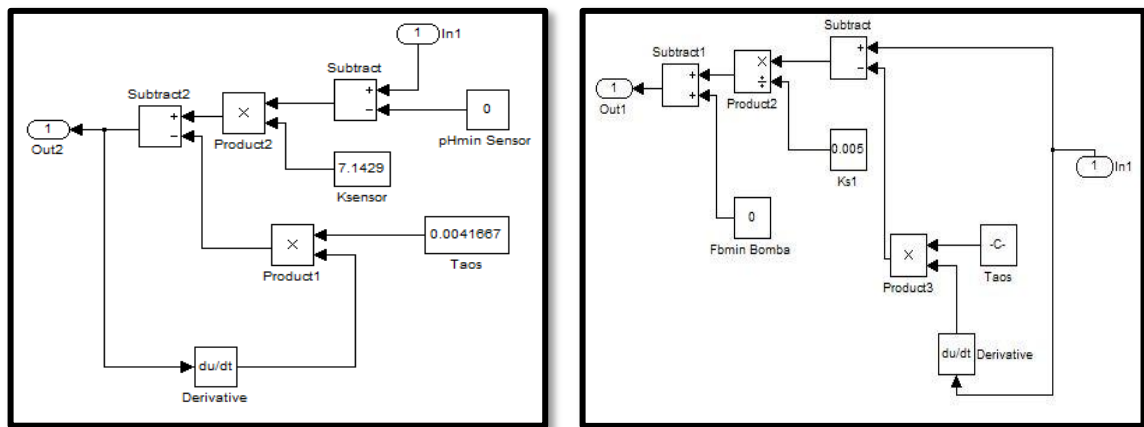
ANEXO 3. Representación en Simulink de los elementos que conforman los Lazos de Control.

Durante el análisis en lazo cerrado del sistema, los sensores/transmisores y los elementos finales de control se programaron en base a los existentes en el laboratorio de bioprocesos. En la figura 12 se presentan un esquema de dichos elementos. El comportamiento en el dominio del tiempo de los sensores/transmisores y elementos finales de control se construyó a partir de la ecuación mostrada a continuación.

$$\tau_s \cdot \frac{dSS}{dt} + SS(t) = K_s(SE(t) - SE_{MIN})$$

Donde SS es señal de salida, SE es señal de entrada, τ_s es la constante de tiempo y K_s es la ganancia calculada.

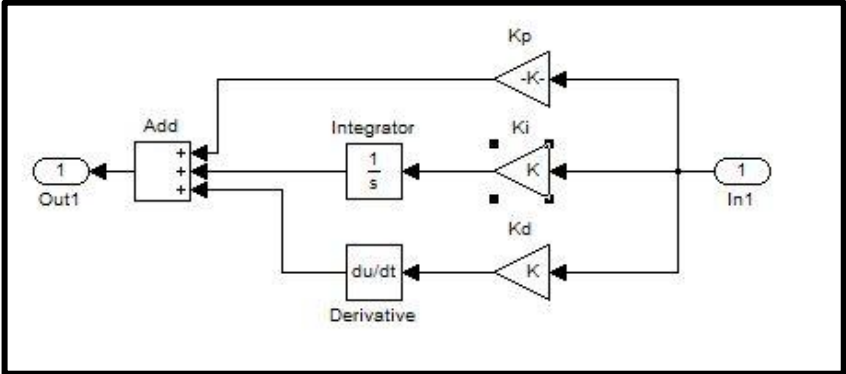
Figura 12. Representación en el dominio del tiempo del sensor/transmisor (izquierda) y elemento final de control (derecha).



Fuente: Autores.

Los controladores también fueron representados en el dominio del tiempo, tal como se muestra en la figura 13.

Figura 13. Representación en el tiempo del controlador PID.



Fuente: Autores.