

ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE UN SISTEMA DE FERMENTACIÓN  
ACETONA-BUTANOL-ETANOL (ABE) A PARTIR DE GLUCOSA  
EMPLEANDO *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

LAURA JOHANA CASTELLANOS SUÁREZ

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

2013

ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE UN SISTEMA DE FERMENTACIÓN  
ACETONA-BUTANOL-ETANOL (ABE) A PARTIR DE GLUCOSA  
EMPLEANDO *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

LAURA JOHANA CASTELLANOS SUÁREZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de  
ingeniero químico

Director

Ph.D. Luis Javier López Giraldo

Codirector(es)

Ph. D. Luis Gerónimo Matallana Pérez

Ing. Qco. José Andrés Pérez Mendoza

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

2013

## DEDICATORIA

A Jehová Dios, por permitirme culminar este trabajo, por ser mi fortaleza, mi paz en tiempo de angustia y mi refugio. Por ser un padre amoroso y proveedor de bendiciones y de todas las cosas buenas que existen en mi vida.

A mis padres, por su apoyo y amor incondicional durante toda mi vida; por su entrega, paciencia y sacrificio. Por hacer de mis sueños los suyos y por anteponer mis prioridades y metas a las propias, en tantas oportunidades.

A mis amigos por estar en los momentos que he necesitado de alguien para continuar, por su apoyo y por su invaluable amistad.

A todas las personas que de una u otra forma hicieron parte de mi formación y son los responsables de los resultados de este trabajo con su dedicación.

*Pero todos los que se refugian en ti se regocijarán;  
hasta tiempo indefinido clamarán gozosamente.*

*Y tú obstruirás el acceso a ellos,  
y los que aman tu nombre se alborozarán en ti.*

*Porque tú mismo bendecirás al justo,  
oh Jehová; como con un escudo grande,  
con aprobación lo cercarás.*

*Salmo. 5:11,12*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Ciertamente alabaré el nombre de Dios con canción,  
y lo engrandeceré, sí, con acción de gracias.*

*Salmo 69:30*

Al doctor Luis Javier López Giraldo por ser el orientador principal de este proyecto, por dedicar su tiempo y energías en el desarrollo de éste y por creer en mí para llevarlo a cabo.

Al doctor Luis Gerónimo Matallana Pérez por su tiempo, su dedicación, sus enseñanzas y sus valiosos aportes, sin ellos no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Al ingeniero químico José Andrés Pérez Mendoza, por sus enseñanzas sobre bioprocesos las cuales generaron mi interés por trabajar en ésta área.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	14
1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA.....	24
1.1. SELECCIÓN DEL MODELO .....	24
1.2. MODELOS Y PARÁMETROS CINÉTICOS.....	24
1.3. DETERMINACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS PUNTOS ESTACIONARIOS.....	27
1.4. ANÁLISIS DE ESTABILIDAD Y DIAGRAMAS DE BIFURCACIÓN.....	28
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	29
2.1. DETERMINACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS PUNTOS ESTACIONARIOS.....	29
2.2. ANÁLISIS DE ESTABILIDAD Y DIAGRAMAS DE BIFURCACIÓN..	30
2.3. DIAGRAMAS DE BIFURCACIÓN.....	30
2.4. DILUCIÓN COMO PARÁMETRO DE BIFURCACIÓN.....	31
2.5. SUSTRATO DE ALIMENTACIÓN COMO PARÁMETRO DE BIFURCACIÓN .....	38
3. CONCLUSIONES.....	44
4. RECOMENDACIONES.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
ANEXOS .....	56

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagramas de bifurcación para biorreactor sin resina empleando como parámetro la velocidad de dilución.	34
Figura 2. Diagramas de bifurcación para biorreactor con resina empleando como parámetro de bifurcación el Flujo alimentación.	38
Figura 3. Diagramas de bifurcación para biorreactor sin resina empleando como parámetro la Concentración sustrato alimentación.	41
Figura 4. Diagrama esquemático de los biorreactores.	56
Figura 5. Diagramas dinámicos del modelo sin adición de resina.	67
Figura 6. Diagramas dinámicos del modelo con adición de resina.	70
Figura 7. Diagramas de bifurcación modelo cinético sin resina, dilución como parámetro de bifurcación.	74
Figura 8. Diagramas de bifurcación modelo cinético sin resina, Sustrato alimentación como parámetro de bifurcación.	76
Figura 9. Diagramas de bifurcación modelo cinético con resina, Flujo volumétrico alimentación como parámetro de bifurcación.	78
Figura 10. Diagramas de bifurcación modelo cinético con resina, Concentración sustrato alimentación como parámetro de bifurcación.	80
Figura 11. Representación esquemática del posible mecanismo de adsorción de la resina PVP.	82

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales propiedades Físico químicas de combustibles.	15
Tabla 2. Puntos de bifurcación comunes en sistemas continuos.	22
Tabla 3. Parámetros cinéticos del conjunto de ecuaciones dinámicas correspondientes a los modelos cinéticos.	27
Tabla 4. Condiciones iniciales y concentración de butanol en estado estacionario. Modelo sin resina.	29
Tabla 5. Condiciones iniciales y concentración de butanol en estado estacionario. Modelo con resina.	29
Tabla 6. Valores de estado estacionario obtenidos para cada una de las variables evaluadas.	30
Tabla 7. Condiciones iniciales del sistema de fermentación sin resina.	63
Tabla 8. Condiciones iniciales del sistema de fermentación con resina	64
Tabla 9. Valores de eigenvalores y variables en los puntos de bifurcación modelo cinético sin resina.	71
Tabla 10. Valores de eigenvalores y variables en los puntos de bifurcación modelo cinético con resina.	72
Tabla 11. Propiedades de la resina Polivinilpiridina (PVP).	81

## LISTA DE ANEXOS

Pág.

<b>ANEXO A.</b> Diagramas de los biorreactores. ....	56
<b>ANEXO B.</b> Sistema EDO lineal con coeficientes constantes. ....	57
<b>ANEXO C.</b> Modelos cinéticos completos .....	58
<b>ANEXO D.</b> Condiciones iniciales empleadas para obtener los valores de estado estacionario.....	63
<b>ANEXO E</b> Diagramas dinámicos modelos cinéticos.....	65
<b>ANEXO F.</b> Resultados análisis de estabilidad: Valores variables, eigenvalores y diagramas de bifurcación modelo cinético Yang, Tsao. ....	71
<b>ANEXO G.</b> RESINA PVP (Polivinilpiridía) .....	81

## RESUMEN

**TITULO:** ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE UN SISTEMA DE FERMENTACIÓN ACETONA-BUTANOL-ETANOL (ABE) A PARTIR DE GLUCOSA EMPLEANDO *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.\*

**AUTOR:** LAURA JOHANA CASTELLANOS SUÁREZ \*\*

**PALABRAS CLAVE:** Fermentación, Butanol, Análisis de estabilidad, Simulación dinámica, Modelos, Dinámica no lineal, bifurcación.

### CONTENIDO:

El incremento en la demanda de alcoholes obtenidos por vía fermentativa para ser empleados como biocombustibles, ha generado en las industrias la necesidad de aumentar la productividad de estos procesos. Por lo tanto, es imprescindible plantear estudios y análisis para el entendimiento detallado y optimización de los procesos fermentativos para la obtención de alcoholes. La comunidad científica propone que en el diseño de procesos en general debe incluir un análisis riguroso de la estabilidad de los posibles estados estacionarios del sistema. De ésta manera, será viable predecir con mayor certeza el comportamiento dinámico del mismo, y establecer condiciones de operación adecuadas para el desempeño eficiente del proceso.

Por esta razón, en el presente estudio se analiza la dinámica y estabilidad en la producción de butanol por fermentación con *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 en un biorreactor continuo. La respuesta dinámica del sistema se estudió eligiendo como criterio de evaluación la concentración de Butanol obtenida, utilizando dos modelos cinéticos validados experimental y estadísticamente, que describen el comportamiento oscilatorio de cultivos continuos teniendo en cuenta la influencia del pH, inhibición por productos y los parámetros influyentes en el sistema. Además se tomaron como parámetros de bifurcación la Dilución (D) y la concentración de sustrato de alimentación (Sf). Se empleó una rutina de cálculo desarrollado en *Matlab*® y la herramienta *Matcont*® para generar diagramas de comportamiento dinámico, valores de estado estacionario y diagramas de bifurcación. Los resultados muestran que es conveniente operar a velocidades de dilución pequeñas ( $D < 0,1$ ) y concentraciones de sustrato de alimentación (Sf) en un rango de 40 a 90 [g/L] para obtener las concentraciones más altas de Butanol. Las implicaciones prácticas de los fenómenos descubiertos se analizan con el objetivo de aplicar una metodología adecuada para este tipo de estudios y de la puesta en marcha de este tipo de bioprocesos.

---

\*Proyecto de grado

\*\*Facultad de ingenierías físico-químicas. Escuela de ingeniería química

Director: Ph.D. Luis Javier López Giraldo.

Codirector(es): Ph. D. Luis Gerónimo Matallana Pérez.

Ing. Qco. José Andrés Pérez Mendoza

## ABSTRACT

**TITLE:** STABILITY ANALYSIS OF A FERMENTATION SYSTEM ACETONE-BUTANOL-ETHANOL (ABE) USING GLUCOSE WITH *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.\*

**KEYWORDS:** Fermentation, Butanol, Stability Analysis, Dynamic simulation, Modelling, Nonlinear dynamics, Bifurcation.\*\*

### CONTENT:

Growing demand for alcohols obtained by fermentation for use as biofuel has generated a need to increase the productivity of these processes. Therefore, it is essential to consider studies and detailed analysis for understanding and optimizing fermentation processes for the production of alcohols. The scientific community suggests that the overall process design should include a rigorous analysis of the stability of the possible steady states of the system. In this way, it will be feasible to predict with greater certainty the dynamic behavior, and establish appropriate operating conditions for the efficient performance of the process.

For this reason, in the present study we analyzed the dynamics and stability in production of butanol by fermentation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 on a continuous bioreactor. The dynamic response of the system is studied as an evaluation criterion selecting the concentration of Butanol obtained and using two kinetic models experimental and statistically validated, which describe the continuous cultures oscillatory behavior taking into account the influence of pH, inhibition by products and influencing parameters in the system. The bifurcation parameters chosen were the dilution rate ( $D$ ) and feed substrate concentration ( $S_f$ ). We used a calculation routine developed in Matlab® and MATCONT® to generate diagrams for dynamic behavior, steady state values and bifurcation diagrams. The results show that it is convenient to operate at smaller dilution rates ( $D < 0.1 \text{ [h}^{-1}\text{]})$  and feed substrate concentrations ( $S_f$ ) in the range of 40 to 90 [g / L] for higher concentrations of butanol. The practical implications of the phenomena discovered are analyzed in order to apply an appropriate methodology for this type of study and the implementation of it in bioprocesses.

---

\*Project degree

\*\*Physical-chemistry Engineering Faculty. Chemical Engineering School

Director: Ph. D. Luis Javier López Giraldo

Codirector(s): Ph. D. Luis Gerónimo Matallana Pérez.

Ing. Qco. José Andrés Pérez Mendoza

## NOTACIÓN

$t$	tiempo
	vector de variables de estado
	vector de las funciones no lineales
	conjunto de parámetros del modelo
	vector de las condiciones iniciales
	vector de las soluciones de estado estacionario
	número de ecuaciones, cantidad de variables de estado y también denota la dimensión del sistema.
	Matriz Jacobiana de derivadas de primer orden de      con respecto a
	eigenvectores linealmente independientes
	Logaritmo natural.
	Parte Real
	Parte Imaginaria
ODE	Ecuaciones diferenciales ordinarias
PVP	Resina de Polivinilpiridía

## INTRODUCCIÓN

La producción de alcoholes empleando fermentación de sustratos azucarados tiene un amplio mercado, que abarca desde la industria farmacéutica hasta su empleo como aditivos oxigenantes de combustibles para reducir su nivel contaminante. La fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol) es un ejemplo típico y fue uno de los primeros procesos fermentativos desarrollados industrialmente. Así, a comienzos del siglo 20 y durante la I y II guerra mundial, se constituyó como un importante proceso para la producción de solventes. No obstante, el aumento de los costos de los sustratos y la posibilidad de obtener materias primas y productos más económicos desde la industria petroquímica, fueron las causas para que este proceso pasara a un segundo plano. Sin embargo, unas décadas después, ha surgido de nuevo un profundo interés en el proceso.

En los últimos años, el uso de biocombustibles ha sido ampliamente desarrollado y su producción ha crecido exponencialmente <sup>[1-3]</sup>. Recientes estudios del EMPA (The Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology) muestran que el biodiesel y el etanol colombiano reducen, respectivamente, en más de 83% y 74% las emisiones de gases de efecto invernadero, superando las cifras mundiales <sup>[4]</sup>. En consecuencia, en los últimos años, el gobierno colombiano ha puesto en marcha un agresivo plan para inyectar capital y crear políticas sólidas con el objetivo de mantener su potencial en éste campo a nivel regional y mundial. Este renovado interés se basa casi exclusivamente en la preocupación por el agotamiento de los combustibles fósiles y la incertidumbre de los suministros de petróleo.

Así las cosas, es necesario la diversificación de las fuentes de energía al tiempo que se mejoren las características de los biocombustibles existentes o se propongan nuevos con mejores características fisicoquímicas. En ese sentido, el butanol presenta ventajas con respecto al etanol y mejora considerablemente las propiedades de los combustibles fósiles utilizados. Por ejemplo, las mezclas butanol:gasolina hasta una relación del 30% (v:v) no

requieren modificaciones en el motor y además se mejora la potencia del éste. Lo anterior debido a que la relación estequiométrica aire:combustible es menor y en consecuencia es posible inyectar mayor cantidad de combustible<sup>[5]</sup>. Además, estas mezclas tienen mejores propiedades fisicoquímicas que las de etanol en cuanto a la estabilidad de fase en presencia de agua, mejores propiedades a baja temperatura, menor susceptibilidad a la oxidación durante el almacenamiento y una menor presión de vapor. Una lista comparativa de las propiedades más significativas de la gasolina, el etanol y el butanol se observa en la tabla 1. Finalmente el butanol no es tóxico ni corrosivo, es fácilmente biodegradable y no causa riesgo de contaminación del suelo y agua <sup>[6]</sup>.

**Tabla 1.** Principales propiedades Físico químicas de combustibles.

Propiedades Físico-químicas	Combustibles		
	Butanol	Etanol	Gasolina 95
Punto de ebullición (°C)	117,7	78,3	30-215
Densidad (kgxm-3)	809	794	720-750
Viscosidad Cinemática (mm2.s-1)	3,6	1,5	0,4-0,8
Densidad de energía	29,2	19,6	32
Relación Aire-Combustible	11,2	9	14,6
Calor de Vaporización	0,71	0,92	0,32
Índice de Octano	96	129	91-99
Octano del motor	80	102	81-89
R. Estequiométrica —————	11,1	9	14,8
Contenido de Oxígeno ( )	21,6	34,7	Máx. 2,7

Adaptado de: Jones D.T. BIOBUTANOL<sup>[6]</sup>

De los párrafos anteriores se infiere que el butanol es una buena opción para diversificar la oferta energética de combustibles líquidos.

El butanol es el producto más significativo de la fermentación Acetona-Butanol-Etanol (ABE). Diversos estudios, han demostrado que su producción por vía fermentativa se desarrolla empleando diferentes tipos de bacterias, pero es de interés para el presente trabajo, citar el género *Clostridia* especie *acetobutylicum* debido a que es el más empleado industrialmente, además este último es el que presenta mayor potencial para la producción eficiente del butanol <sup>[7-10]</sup>.

La fermentación ABE, se desarrolla en dos fases, la fase acidogénica y la solventogénica. 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 <sup>[11-13]</sup>. Cuando las condiciones son favorables para el crecimiento celular, las bacterias toman el camino de la producción de ácidos para generar la máxima cantidad de energía. Por lo tanto el pH tendrá un valor bajo y la fermentación tiende a estar en etapa de acidogénesis. Después, en la etapa de solventogénesis el pH del sistema se incrementa y las células alcanzan la fase estacionaria de su crecimiento. Esta etapa está acompañada por el inicio de la esporulación, transformando metabólicamente algunos de los ácidos formados en butanol, acetona, etanol. El incremento en la concentración de los ácidos conduce a una disminución tanto del metabolismo como del crecimiento celular <sup>[5,7,11]</sup>. En particular, en los sistemas fermentativos continuos, el metabolismo de crecimiento celular es influenciado exclusivamente por el pH externo. Puesto que la *C. acetobutylicum* es incapaz de mantener un pH intracelular constante, las células conservan un gradiente de pH transmembranal de aproximadamente 1 <sup>[13,14]</sup>. Además del pH, este tipo de fermentaciones están limitadas por fenómenos de inhibición por sustrato y por producto. Así por ejemplo, los trabajos de Ezeji T *et al.* <sup>[15,16]</sup> han demostrado que concentraciones de glucosa menores a 20 g/l y superiores a 100 g/l ocasionan una inhibición por sustrato. De la misma forma, Yang y Tsao <sup>[12,17]</sup> demostraron que la concentración a la cual ocurre inhibición completa por producto es 17, 11, 12 [g/L] para butanol, butirato y acetato respectivamente.

Por otra parte, el incremento en la demanda de alcoholes obtenidos por vía fermentativa para ser empleados como biocombustibles, ha generado en las industrias la necesidad de aumentar la productividad de estos procesos. Además, debido a los altos precios de las materias primas, se hace necesario el diseño de procesos eficientes con el fin de minimizar los costos de operación y maximizar los rendimientos de los productos de interés. Por lo tanto, se hace imprescindible plantear estudios y análisis para el entendimiento detallado y optimización de los procesos fermentativos para la obtención de alcoholes. Por

ejemplo, Paz <sup>[18-20]</sup> propone que en el diseño de procesos en general, se debe incluir un análisis riguroso de la estabilidad de los posibles estados estacionarios del sistema. De ésta manera, será viable predecir con mayor certeza el comportamiento dinámico del mismo, y establecer condiciones de operación adecuadas para el desempeño eficiente del proceso.

Sin embargo, contrario a lo esperado, el diseño de los bioprocesos a escala industrial aún es desarrollado empíricamente a pesar de los estudios presentados por la comunidad científica, ignorando los límites de estabilidad característicos de los sistemas. Por esta razón, el diseño de estos procesos ha sido clasificado como un 'arte' empírico <sup>[21,22]</sup> preocupado principalmente por 'saber hacer' sin tener en cuenta la importancia de conocimientos científicos que expliquen el 'por qué' de éstos. Lo anterior, ha llevado a elevar los costos globales de los bioprocesos, y en la mayoría de los casos, ha sido un factor diferenciador y de gran desventaja frente a los procesos tradicionales. Es entonces evidente que la naturaleza dinámica del proceso fermentativo debe ser estudiada con el propósito de entender el efecto de las variables de diseño sobre los fenómenos de estabilidad que afectan la productividad.

Por consiguiente, el análisis de un bioproceso, desde un punto de vista de estabilidad necesitará mínimo:

1. Modelo cinético que describa el proceso fermentativo.
2. Parámetros a evaluar en el análisis de estabilidad.
3. Conceptos necesarios para realizar un análisis de estabilidad del sistema.

### **1. Modelo cinético que describe el proceso fermentativo.**

Durante las últimas dos décadas se han logrado significativos avances en el área de investigación relacionada con el modelamiento matemático de la fermentación ABE <sup>[23]</sup>. Los modelos de rutas metabólicas pueden clasificarse en 2 categorías: los modelos estequiométricos y modelos de simulación cinéticos;

[8] los últimos describen el comportamiento dinámico de los metabolitos y permiten desarrollar estrategias para la operación de biorreactores.

El modo de operación Batch fue el que sentó las bases para posteriores estudios en el desarrollo de modelos cinéticos. Papoutsakis publicó por primera vez en 1984 un modelo estequiométrico de fermentación ABE [24]. El modelo se basa en las ecuaciones estequiométricas de cada producto, incluyendo la biomasa y equivalentes reductores a partir de glucosa como sustrato. La validez del modelo fue probado en varias cepas de *Clostridium* (*acetobutylicum*, *beijerinckii*, *butyricum*, *falsineum*, *lactoacetophilum*). Para este modo de operación también se destacan los trabajos de Volesky *et al.* (Votruba *et al.*, 1986; Yerushalmi *et al.*, 1986; Srivastava & Volesky, 1990) Desai *et al.* (1999), Yang and Tsao (1994) y Shinto *et al.* (2007).

Una característica importante del modelo Mulchandani y Voleski [25] es que la función de inhibición se basa en la concentración total de butanol y ácido butírico y no simplemente en términos de butanol como en documentos anteriores. Por otra parte, Desai *et al* [26] planteó una función objetivo para mejorar el modelo de Papoutsakis donde se permite la incorporación de ecuaciones no lineales en los modelos estequiométricos y permitió describir el metabolismo solventogénico en el género *Clostridium*. En 1994, Yang X., Tsao plantean un modelo en el que se consideran las causas y mecanismos de inhibición, concluyendo que es necesario considerar estos aspectos para el diseño eficaz del proceso. Más tarde, Shinto *et al* [27] propuso un modelo cinético con base en la ruta metabólica y en gran medida en la ecuación de Michaelis-Menten con consideraciones para la inhibición de sustrato, la inhibición de producto (butanol), activación de butirato, y el cese de las reacciones metabólicas si se presenta insuficiencia de energía después del agotamiento del sustrato, además de estimar los parámetros cinéticos.

En el análisis de estabilidad de biorreactores continuos, los sistemas son modelados por medio de conjuntos de ecuaciones diferenciales ordinarias de

primer orden (EDOs). Las ecuaciones diferenciales usadas para modelar los sistemas, expresadas de forma vectorial, son:

—

Donde  $t$  representa el tiempo,  $\mathbf{x}$  es el vector de variables de estado,  $\mathbf{f}$  es el vector de las funciones no lineales,  $\mathbf{p}$  es el conjunto de parámetros del modelo, y  $\mathbf{x}_0$  es el vector de las condiciones iniciales (ver sección 2.1). También se asume que  $\mathbf{f}$  no depende explícitamente de la variable independiente  $t$ . Así, se dice que el sistema descrito anteriormente  $\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{f}(\mathbf{x}, \mathbf{p})$ , es autónomo o invariante en el tiempo o también de parámetros concentrados o globales. [21,28,29]. Así mismo, el número de ecuaciones  $n$  corresponden a la cantidad de variables de estado y también denotan la dimensión del sistema.

## 2. Parámetros a evaluar en el análisis de estabilidad

El factor o velocidad de dilución ( $D$ ), el flujo de operación ( $F$ ), la concentración de sustrato alimentado ( $S_f$ ) y el valor de pH, son los parámetros elegidos para el análisis de bifurcación debido a que estos son los más fáciles de manipular durante la operación de un sistema de fermentación, y por lo tanto es realista pensar que los resultados pueden ser empleados en la puesta en marcha de este [30, 31]. En el anexo A se presenta un diagrama esquemático de los biorreactores junto con sus variables de entrada y salida.

## 3. Conceptos necesarios para realizar un análisis de estabilidad del sistema.

La simulación de biorreactores continuos a través de modelos cinéticos genera el reto de determinar cuáles de los múltiples estados estables posibles son los más adecuados para la operación del proceso [32]. Como se ha mencionado en párrafos anteriores, este análisis debe ser desarrollado basado en criterios

ingenieriles y no en criterios empíricos. A continuación se presentan brevemente los conceptos fundamentales y el orden metodológico asociados a un análisis de estabilidad.

### 3.1. Estados estables o estacionarios.

Representan las soluciones invariantes en el tiempo del sistema dinámico  $\dot{x} = f(x)$  que cumplen que  $f(x) = 0$ . También se les llama puntos fijos, puntos de equilibrio, o puntos críticos <sup>[21,28]</sup>. Las soluciones de estado estacionario satisfacen todo el conjunto de ecuaciones algebraicas, donde los parámetros de bifurcación también tienen valores fijos determinados.

Como  $f(x) = 0$  son ecuaciones algebraicas no lineales, la ecuación puede tener más de una solución. En ese caso se presenta un fenómeno llamado multiplicidad de estados estacionarios, que debe ser correctamente caracterizado para conocer la estabilidad de cada uno de éstos.

En los procesos fermentativos, los modelos se caracterizan por ser altamente no lineales y en consecuencia conducirán a soluciones que pueden ser o no estables. Esta situación genera la necesidad de analizar cuáles de las soluciones conducen a regiones de estabilidad <sup>[20,28,29]</sup>. Resolviendo todas las funciones como se indica en la ecuación (3.1), se obtienen las concentraciones que satisfacen la condición, siendo éstas los valores de estado estacionario de los modelos.

### 3.2. Estabilidad local de Estados Estacionarios.

Para la operación de un proceso se hace necesario tener una medida cuantitativa de su estabilidad. Este tipo de información puede ser obtenida mediante la linealización alrededor de un punto fijo, correspondiente a los estados o valores estacionarios del proceso <sup>[28, 29]</sup>. De esa manera, la estabilidad local del estado estacionario puede determinarse estudiando las propiedades de la matriz jacobiana cuando ésta se linealiza alrededor de  $x^*$ . Para

este propósito se desarrolla la matriz Jacobiana. Consiste en una matriz compuesta por derivadas parciales de primer orden, correspondiente a las ecuaciones del sistema evaluadas en los valores de equilibrio o estado estacionario calculados anteriormente. La estabilidad del equilibrio es caracterizada por los eigenvalores de esta matriz.

De forma vectorial, la matriz Jacobiana del sistema es:

—

Así el sistema linealizado, en notación vectorial sería:

Para el caso en estudio, como la matriz Jacobiana está constituida por eigenvalores linealmente independientes, la estabilidad local de la puede ser concluida fácilmente. Por lo tanto, la solución es una combinación lineal de funciones vectoriales <sup>[29]</sup>. (Ver anexo B) Así las cosas, lo anterior es posible debido a que el factor satisface que:

Cuando, el factor tiende a infinito para, y tiende a cero en caso de. Por lo tanto, el signo de la parte real define la estabilidad. Los vectores abarcan los espacios propios o 'eigenespacios'. Para un par de eigenvalores simples, con eigenvalores los dos vectores y ocupan el eigenespacio correspondiente. El anterior resultado general de estabilidad en sistemas no lineales, como el descrito vectorialmente por la y compuesto por las ecuaciones del sistema en estudio, se atribuye a Liapunov (1892) <sup>[28, 29]</sup>.

En otras palabras, de acuerdo con el resultado atribuido a Liapunov, las partes reales de los eigenvalores de la matriz jacobiana, evaluada en la solución estacionaria ( ), determinan su estabilidad: si la parte real de los eigenvalores es negativa, el estado estacionario evaluado es considerado

estable. Si un solo valor propio tiene una parte real positiva, entonces es inestable.

### 3.3. Diagrama de bifurcación.

Después de contar con valores escalares del vector es posible representar gráficamente las soluciones de la o de la en un diagrama que muestra a en función de . Esta figura se denomina diagrama de bifurcación o ramificación, o diagrama de respuesta. El objetivo de la teoría de la bifurcación es caracterizar cualitativamente los cambios en el comportamiento dinámico de los sistemas no lineales mientras los parámetros principales o elegidos cambian.

Los diagramas de bifurcación son de gran utilidad. Las soluciones continuas se denominan ramas. Las ramas son curvas unidimensionales, cuando varían los valores de , el número de soluciones y en consecuencia, de ramas, pueden cambiar. Nuevas ramas pueden surgir, pueden terminar o pueden cruzarse con otras en ciertos puntos llamados puntos de bifurcación de estado estable. <sup>[21]</sup>

### 3.4. Puntos de Bifurcación de estado estable.

Los puntos más comunes encontrados en diagramas de bifurcación se presentan en la tabla 2.

En consecuencia, la delimitación de las regiones correspondientes a estados estacionarios estables brindará no solo mayores productividades y conversiones de sustrato, sino que también favorecerá la operación del proceso. De manera que se comprenda el comportamiento dinámico de éste para mejorar su capacidad, junto con las estrategias de control, teniendo en cuenta los parámetros de mayor influencia.

**Tabla 2.** Puntos de bifurcación comunes en sistemas continuos.

Punto de Bifurcación	Principales Características
Punto de Inflexión Bifurcación Fold o Punto límite estacionario (SLP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En este punto 2 ramas de una solución de estado estacionario se unen formando 'Tangentes Limitantes'.               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dos ramas nacen o se anulan entre sí.</li> </ul> </li> <li>• Localmente no hay soluciones a un lado del punto y al otro lado hay dos soluciones.</li> </ul>

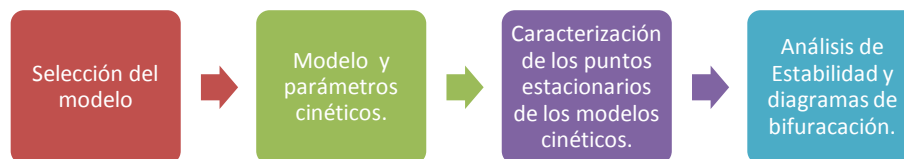
Punto de Bifurcación Estacionario (SPB) <sub>o</sub> (BP)	En este punto dos y sólo dos curvas con diferentes tangentes se cruzan entre sí.
Punto Cúspide Estacionario (SCP)	Es el punto de contacto entre dos curvas de estado estacionario con la misma tangente.
Punto Hopf (HP)	Asociada con la aparición de dos eigenvalores complejos conjugados , con $\sigma > 0$ . Solo puede aparecer en sistemas de dimensión 2 o más

Adaptado de: Seydel R. Practical Bifurcation and Stability Analysis <sup>[29]</sup>

Ajbar A., Alhumaizi K., Dynamics of the Chemostat. A Bifurcation Theory Approach <sup>[21]</sup>.

El propósito de este trabajo es realizar un análisis de estabilidad del proceso de fermentación Acetona-Butanol-Etanol (ABE) empleando glucosa y la bacteria *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Con éste fin, se analizarán las regiones estables del sistema, el comportamiento dinámico, se realizarán los diagramas de bifurcación y la caracterización de puntos de bifurcación empleando un modelo cinético ajustado y validado estadísticamente en el que se incluye una dinámica del pH <sup>[12]</sup>.

## 1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA



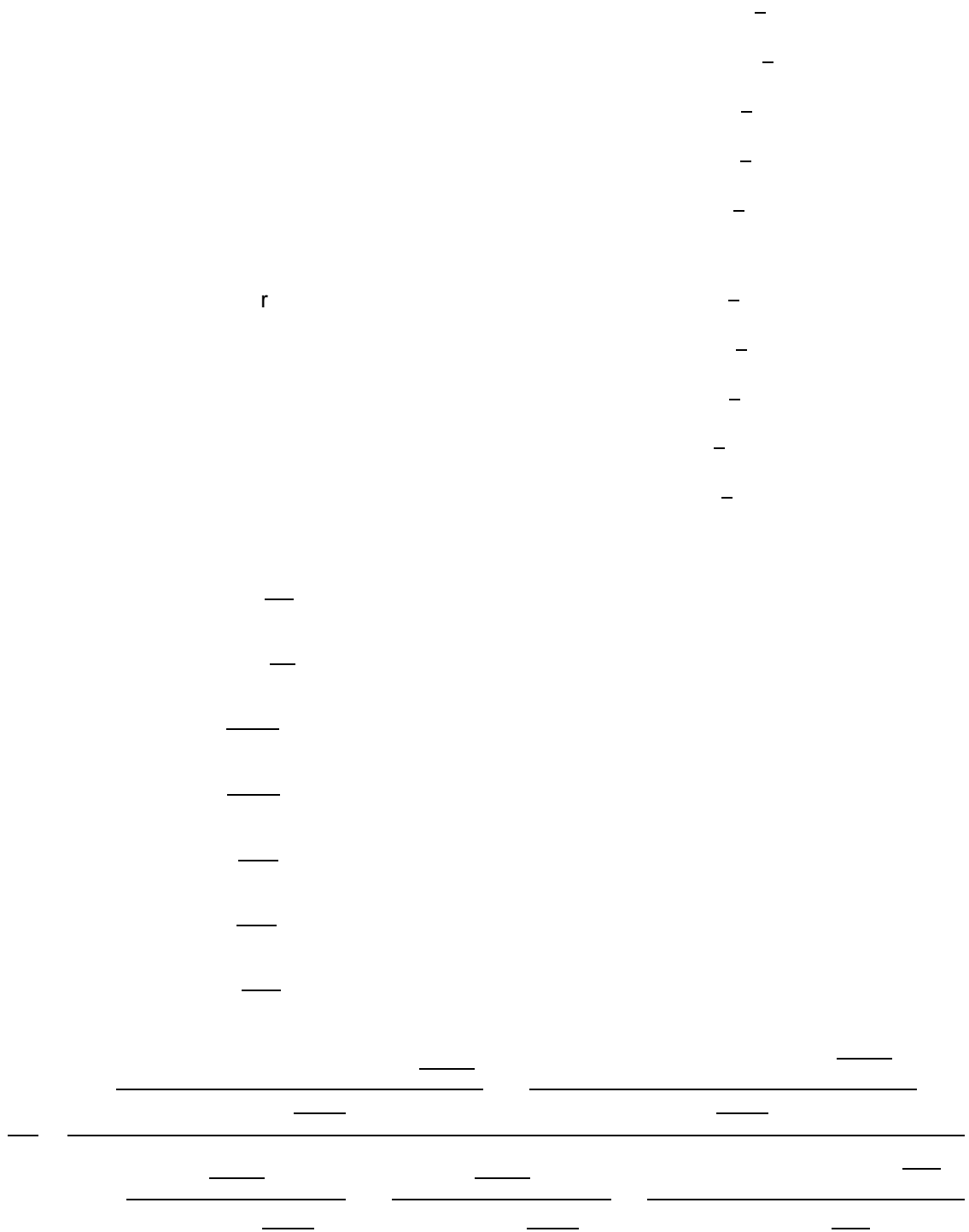
### 1.1. SELECCIÓN DEL MODELO

La selección del modelo se hace con base en el análisis de las referencias bibliográficas realizado. Así las cosas, el modelo de Yang X, Tsao G [12, 17] fue seleccionado porque: (i) describe el comportamiento de inhibición por producto, (ii) plantea una expresión cinética para el crecimiento celular, (iii) considera el efecto del pH sobre la cinética de crecimiento celular, (iv) se tiene conocimiento de cada una de las constantes cinéticas, (v) está validado experimental y estadísticamente y (vi) considera la recuperación *in situ* de solventes (modelo que considera la adición de resinas).

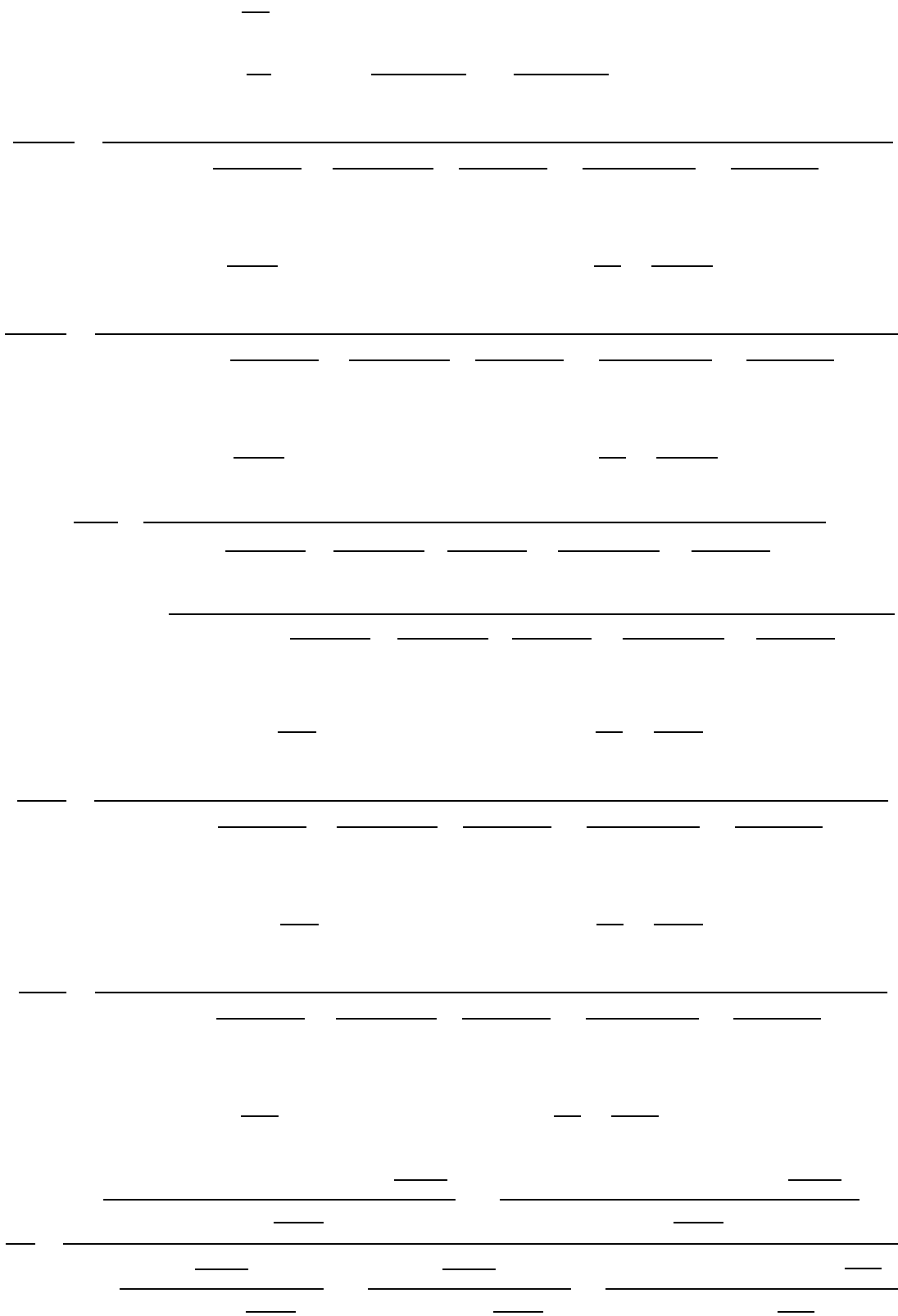
### 1.2. MODELOS Y PARÁMETROS CINÉTICOS.

Para el sistema en estudio se tienen dos modelos cinéticos. El sistema continuo sin resina está representado en las siguientes 8 ecuaciones diferenciales:

	Nomenclatura	
F		–
		,
		–
		–
		–
		–
		–
		–
		–



Así mismo, el modelo cinético para el sistema de fermentación con adición de resina Polivinilpiridina (PVP) está representado por las siguientes 14 ecuaciones diferenciales:



Los parámetros cinéticos del sistema para los dos diferentes modelos se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Parámetros cinéticos del conjunto de ecuaciones dinámicas correspondientes a los modelos cinéticos.

Concentración Alimentación			
Xf [g biomasa/L]	0	Cbf [g butanol /L]	0
Sf [g glucosa/L]	40	Caf [g acetona/L]	0
Caaf [g a. acético/L]	0	Cef [g etanol/L]	0
Cbaf [g a. butírico/L]	0	Hf	1,00E-07
Constantes de Disociación			
kdaa (A. Acético)	1,75E-05	kd3 (A. Fosfórico)	7,50E-03
kdba (A. Butírico)	1,50E-05	kd2 (A. Fosfórico)	6,20E-08
Concentración Molar A. Fosfórico			
M1 (Monobásico)	5,51E-03	M2 (Dibásico)	4,57E-03
Volumen de fermentación			
Vr [L] (Resina)	8,00E-04	Vf [L] (Medio Fermentación)	2

**Adaptado de: Yang X, Tsao George.** A novel extractive fermentation for the production of Acetone-butanol by *Clostridium Acetobutylicum* <sup>[12]</sup>.

A partir del conocimiento del modelo se seleccionan un conjunto de 10 condiciones iniciales. Estas últimas son elegidas con base en el análisis bibliográfico de sistemas de fermentación en continuo. En los Anexos C y D se muestran los modelos cinéticos completos y las condiciones iniciales evaluadas, respectivamente.

### 1.3. DETERMINACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS PUNTOS ESTACIONARIOS

Para obtener los valores de estado estacionario se emplea el software MATLAB®. Para el caso de estudio se desarrolló una rutina de cálculo que permite la solución simultánea de las ecuaciones diferenciales para cada modelo, solucionando los balances en estado no estacionario del biorreactor que opera en continuo y al mismo tiempo, permite obtener las gráficas del comportamiento dinámico. Además, estas figuras confirman las concentraciones en estado estacionario de cada una de las variables y con éstas es posible validar el comportamiento de los modelos al compararlos con

rangos de valores reportados en la literatura para otros casos (ver Anexo E) [3,11,12,17].

#### **1.4. ANÁLISIS DE ESTABILIDAD Y DIAGRAMAS DE BIFURCACIÓN.**

Los diagramas de bifurcación se realizaron con ayuda del software Matcont® (versión libre), el cual permite hacer análisis de continuidad y determinar las bifurcaciones posibles del sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias planteado. Matcont® es una serie de rutinas que corren en MATLAB® 7.0 y que sirven para el estudio numérico e interactivo de sistemas dinámicos. Permite obtener diagramas de estabilidad y curvas de equilibrio con sus correspondientes singularidades. Además MATCONT es un paquete flexible que permite al usuario controlar el tamaño del paso y errores de tolerancia, escoger los parámetros de bifurcación, modificar el modelo cinético y realizar diferentes análisis de continuidad, [33] entre otros. El programa hace uso de algoritmos predictor–corrector, así como métodos especializados de continuidad.

Finalmente, se hizo un análisis de cada punto de bifurcación estático encontrado por el programa MATCONT. Lo anterior con el fin de encontrar las mejores regiones de operación del sistema fermentativo y compararlas con los resultados reportados en la literatura.

## 2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 2.1. DETERMINACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS PUNTOS ESTACIONARIOS

La solución del modelo cinético descrito en la sección 1.2, bajo condiciones de estado estacionario se muestra en las tablas 4 y 5. Sólo se muestran las tres condiciones iniciales con las que se obtienen las mayores concentraciones de butanol en estado estacionario (E.E) para cada modelo cinético. Además, se incluye el estado estacionario de lavado, el cual será necesario para acotar el análisis de estabilidad.

**Tabla 4.** Condiciones iniciales y concentración de butanol en estado estacionario. Modelo sin resina.

Condición Inicial	X [g/L]	S [g/L]	Caa [g/L]	Cba [g/L]	Cb [g/L]	Ca [g/L]	Ce [g/L]	H	D [h <sup>-1</sup> ]	Sf [g/L]	Cb (E.E.) [g/L]
1	0	40	0	0	0	0	0	7,9433E-05	0,03	40	0
2	0,10	40	0	0	0	0	0	7,9433E-05	0,10	40	8,58
3	0,10	20	0	0	0	0	0	7,9433E-05	0,03	20	8,95
4	0,01	40	0	0	0	0	0	7,9433E-05	0,03	40	10,63

Fuente: Autores

**Tabla 5.** Condiciones iniciales y concentración de butanol en estado estacionario. Modelo con resina.

Condición Inicial	X [g/L]	S [g/L]	Caa [g/L]	Cba [g/L]	Cb [g/L]	Ca [g/L]	Ce [g/L]	H	F [L/h]	Sf [g/L]	Cb (E.E.) [g/L]	% Wr/Vf
1	0	40	0	0	0	0	0	7,9433E-05	0,06	40	0	40
2	0,10	20	0	0	0	0	0	7,9433E-05	0,06	20	8,95	40
3	0,10	30	0	0	0	0	0	7,9433E-05	0,06	30	10,00	40
4	0,10	40	0	0	0	0	0	7,9433E-05	0,06	40	10,63	40

Fuente: Autores

Se aprecia claramente para el primer caso que el transcurso de la fermentación se favorece a dilución y concentración de sustrato de 0.03 y 40 [g/L], respectivamente. El segundo caso se favorece a las mismas condiciones anteriores con un volumen de resina de 40% (p/v). Estos resultados concuerdan con los Yang X., Tsao G y Fuciños, Pallares<sup>[11, 12, 17]</sup>, en el cual la producción de butanol se favorece a condiciones similares. Con respecto a la condición de lavado, la velocidad de dilución crítica de 0,54 h<sup>-1</sup>

está en el rango (0,4 – 0,7 h<sup>-1</sup>) de los valores obtenidos para este tipo de sistemas [23, 30,31,34,35,36].

## 2.2. ANÁLISIS DE ESTABILIDAD Y DIAGRAMAS DE BIFURCACIÓN

En la tabla 6 se observan los estados estacionarios, incluyendo el obtenido bajo condiciones de lavado, para cada uno de los modelos cinéticos evaluados.

**Tabla 6.** Valores de estado estacionario obtenidos para cada una de las variables evaluadas.

Variable	Concentraciones Estado Estacionario E.E			
	Células Libres		Resina PVP	
X	5,3080	0	5,3078	0
S	0,0882	40	0,0882	40
Caa	2,1996	0	2,1996	0
Cba	2,4522	0	2,4523	0
Ca	4,6642	0	4,6444	0
Cb	10,6312	0	10,6324	0
Ce	0,3254	0	0,3255	0
H	1,0001E-07	1,0001E-07	9,981E-08	9,981E-08
pH	6,9999	6,9999	7,0008	7,0008

Fuente: Autores.

La información presentada, permite ver que no existen diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas en ambos modelos. Esta situación se explica al analizar el modo de actuar de la resina. En efecto, el material adsorbente de la resina retiene el butanol y de esta forma se evita la inhibición por producto. En consecuencia, el efecto de emplear resina deberá analizarse incluyendo en el modelo los balances relacionados con la desorción del butanol e incluir las modificaciones al modelo cinético (no hace parte del alcance de este trabajo).

## 2.3. DIAGRAMAS DE BIFURCACIÓN

Los resultados del análisis de bifurcación están clasificados en dos secciones. La primera sección donde el parámetro de bifurcación es la tasa de dilución (D) o el flujo (F), y la segunda donde el parámetro de bifurcación es la concentración de glucosa de alimentación (S<sub>f</sub>). Además se analizarán para los dos casos en estudio, el biorreactor continuo y el biorreactor continuo con

adición de resina. A pesar que en las secciones siguientes se ejemplifican los resultados en forma gráfica, se anexan cada uno de los resultados obtenidos (ver tabla 9, tabla 10, Anexo F).

#### 2.4. DILUCIÓN COMO PARÁMETRO DE BIFURCACIÓN.

En la tabla 6 (sección 2.2) se resumen los valores necesarios para iniciar este análisis. En este caso en particular el interés es el de determinar cuántos y cuáles son los estados estables obtenibles cuando se varia la velocidad de dilución y se mantienen constante la concentración de sustrato de alimentación en 40 g/l. En la figuras 1 y 2 se presentan los diagramas de bifurcación para los dos modelos cinéticos.

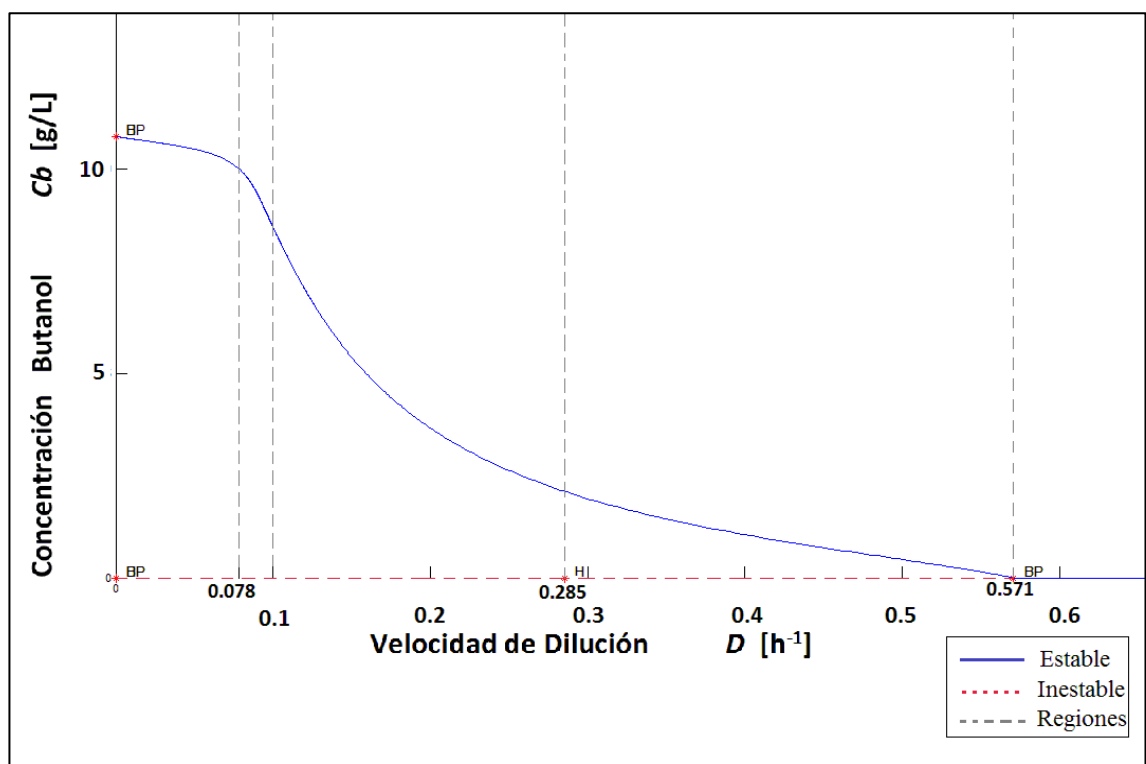
En general, se puede observar que los diagramas de bifurcación de los dos sistemas exhiben un comportamiento similar y se obtienen bifurcaciones comunes para sistemas continuos <sup>[29]</sup>. En efecto las figuras tienen dos tipos de puntos: puntos Hopf (HP) y puntos de bifurcación (SBP). Además, las líneas continuas simbolizan las ramas estables del sistema, y las punteadas o discontinuas las inestables. Así mismo, se analizará con base a 4 diagramas de bifurcación representativos de todo el sistema: (i) biomasa, (ii) sustrato, (iii) butanol para el caso de los solventes y (iv) ácido butírico para el caso de los ácidos. Los diagramas completos se encuentran en el Anexo F.

Para el primer caso, la primera región está limitada por velocidades de dilución . En esta zona existe multiplicidad de soluciones para la velocidad de dilución, constituidas por dos ramas, una estable y la otra inestable. En la estable, las concentraciones máximas de butanol son mayores a - , Para esta misma región, la biomasa alcanza concentraciones máximas del orden de 9 g/L.

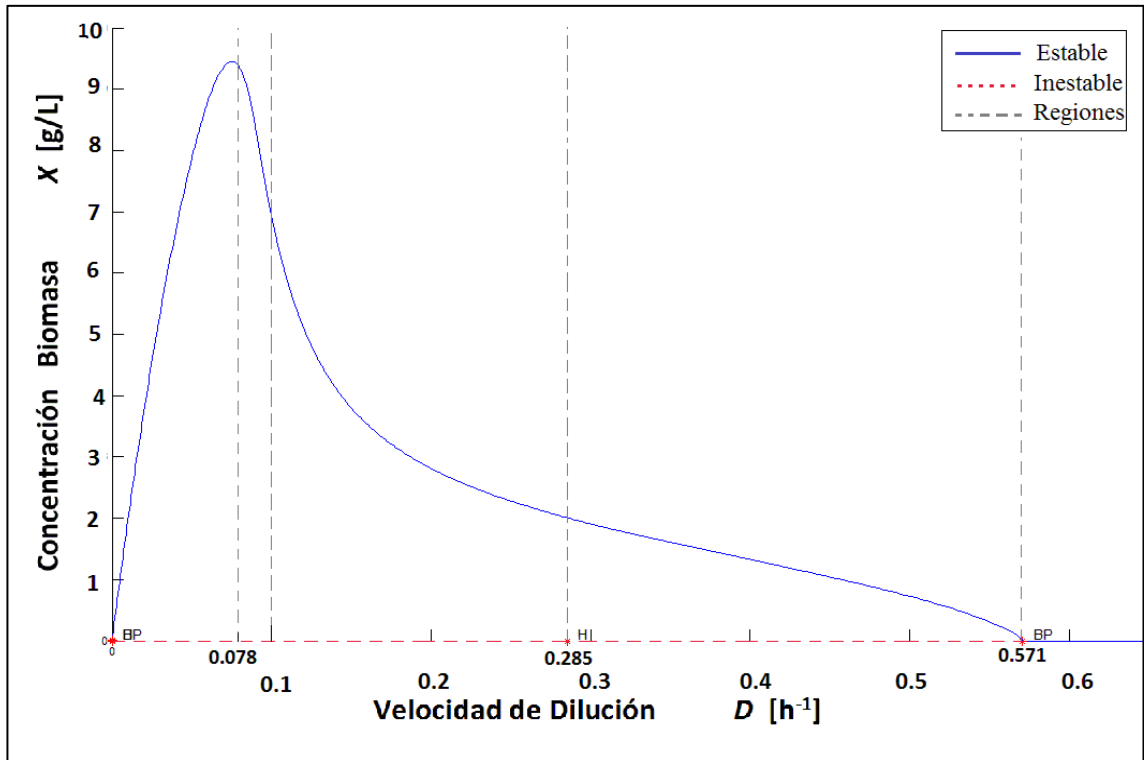
Por ejemplo para una concentración de butanol igual a - , la concentración de biomasa es de - . Este comportamiento corresponde a los resultados reportados en estudios de biorreactores continuos <sup>[26]</sup>. Así, en la mayoría de los casos y con la cepa *Clostridium* cuando se está en un

bioreactor de células libres se opera a bajas diluciones ( ) alcanzando las mejores productividades de solventes. Así mismo, el sustrato alcanza conversiones mayores al 90%. En contraste, en la segunda región

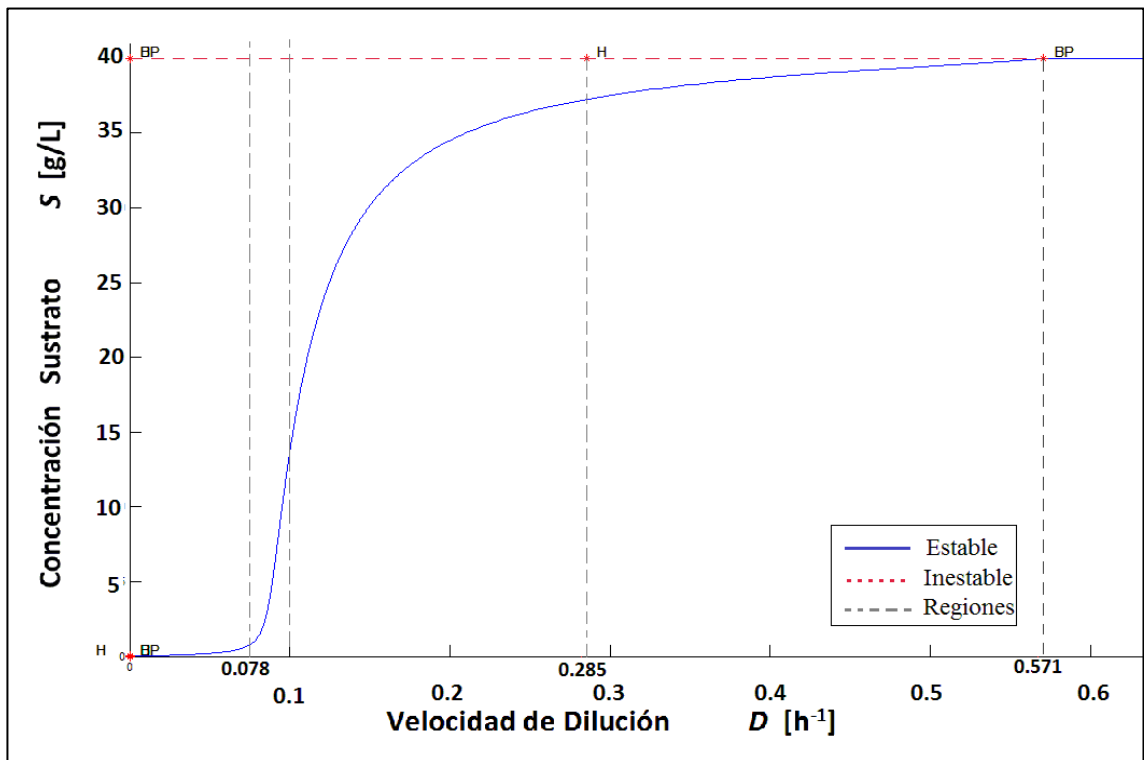
se puede observar una disminución del 20% en la concentración de butanol para un . Por otra parte, se aumenta la concentración de ácidos en el medio, en un porcentaje similar al del producto principal – , lo que afecta además el crecimiento de la biomasa, donde para estas mismas condiciones corresponde a – Además la conversión del sustrato disminuye a un 67% aproximadamente. En la rama inestable, todas las concentraciones son nulas, a excepción de la concentración de sustrato que corresponde al mismo valor de alimentación. Esta rama describe el comportamiento del sistema cuando se encuentra en condición de lavado.



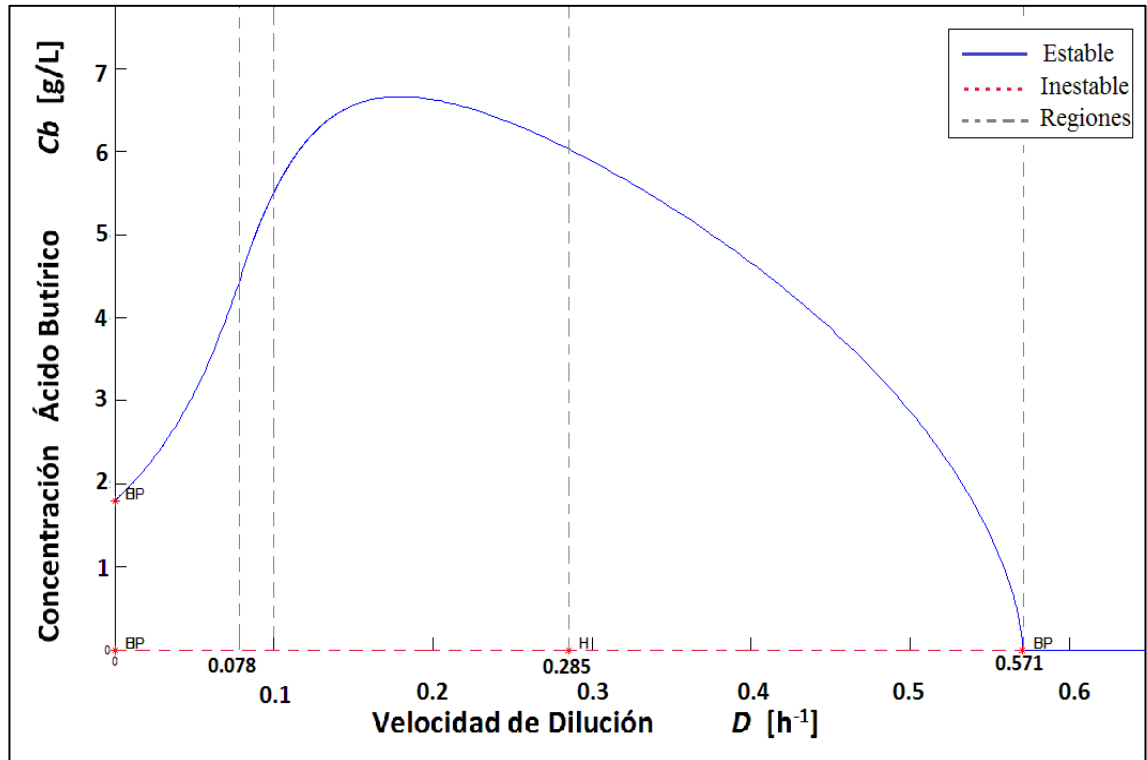
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 1. Diagramas de bifurcación para biorreactor sin resina empleando como parámetro la velocidad de dilución. (a) Concentración de biomasa, (b) concentración de butanol, (c) concentración de sustrato y (d) concentración de ácido butírico.

En la tercera región, para velocidades de dilución comprendidas entre ; el comportamiento de la rama estable e inestable siguen la tendencia encontrada en la anterior región analizada. No obstante, la rama inestable experimenta la aparición de un punto Hopf. Este punto confirma su inestabilidad y permite pensar que para este valor de dilución, aunque sea inestable, podrían existir soluciones periódicas o ciclos límites que deben considerarse en un estudio de inestabilidad más profundo. Para este punto, todos los valores de la parte real de los eigenvalores tienen el mismo valor que la tasa de dilución ( ) y todos son positivos menos el primero.

Finalmente, en la última región ; la rama estable disminuye progresivamente para todas las concentraciones hasta llegar a cero, a excepción de la del sustrato. Como era de esperarse, con el aumento de la velocidad de dilución, se llega al valor de dilución crítica ( ) para el

sistema y al mismo tiempo a un punto de bifurcación. En este punto, convergen las dos ramas que se analizaron a lo largo de las 4 regiones, donde una desaparece (la rama estable) y la otra pasa a ser estable porque todos sus eigenvalores tienen parte real negativa, describiendo de nuevo el lavado pero en esta ocasión, como una rama estable del sistema.

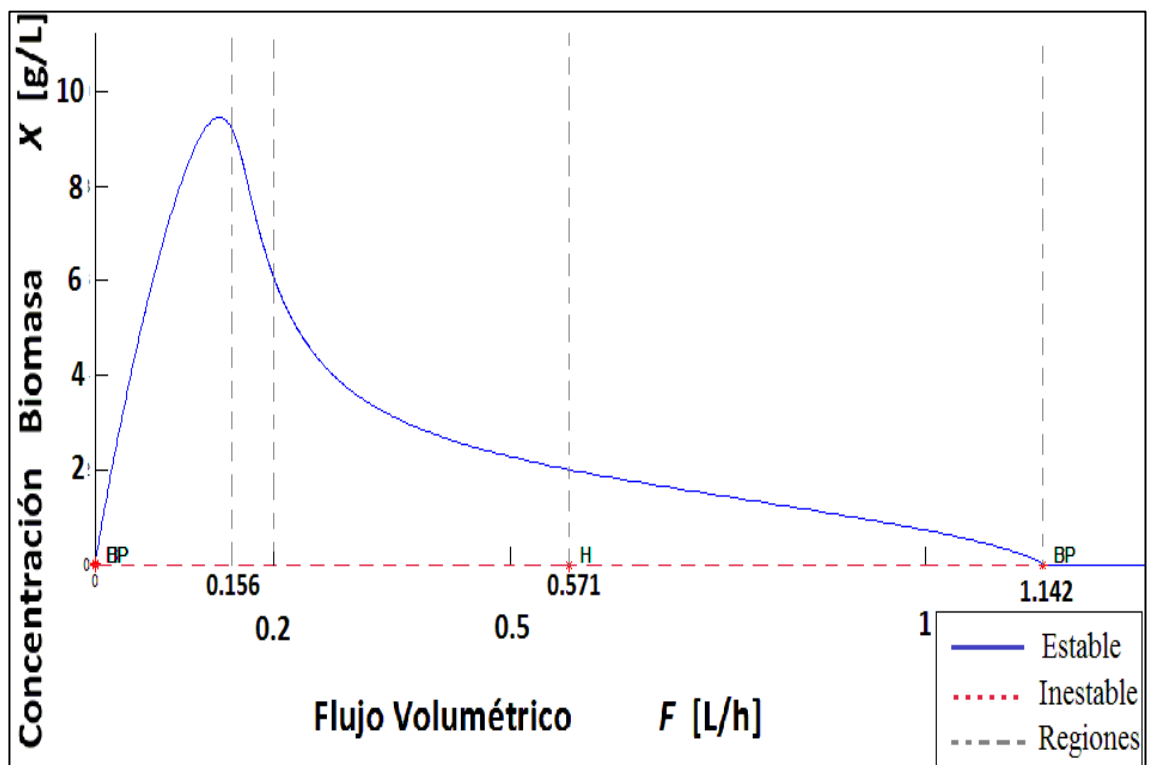
Para el segundo caso, el biorreactor con adición de resina, el comportamiento es muy similar al diagrama para el modelo cinético sin resina. En particular, cambia el parámetro de bifurcación debido a que aparece un nuevo término: el volumen de la resina. Por esto, se hace conveniente emplear el flujo volumétrico de alimentación para clasificar las zonas estables porque se considera que el volumen de fermentación permanece constante.

Debido a que no se tiene ningún medio de retención, es conveniente trabajar flujos pequeños, – para maximizar las concentraciones de butanol, evitar la pérdida de resina en el flujo de salida y aumentar la conversión de sustrato. El valor de flujo máximo para obtener concentraciones de butanol – es – . Al avanzar en la rama estable hacia la derecha, se observa la misma tendencia que el caso anterior, las concentraciones de butanol y biomasa disminuyen rápidamente, y en consecuencia, aumenta la concentración de sustrato y de ácidos en el medio. Por otro lado, el máximo flujo para poder operar el biorreactor es – pues corresponde a la tasa de dilución crítica para este modelo.

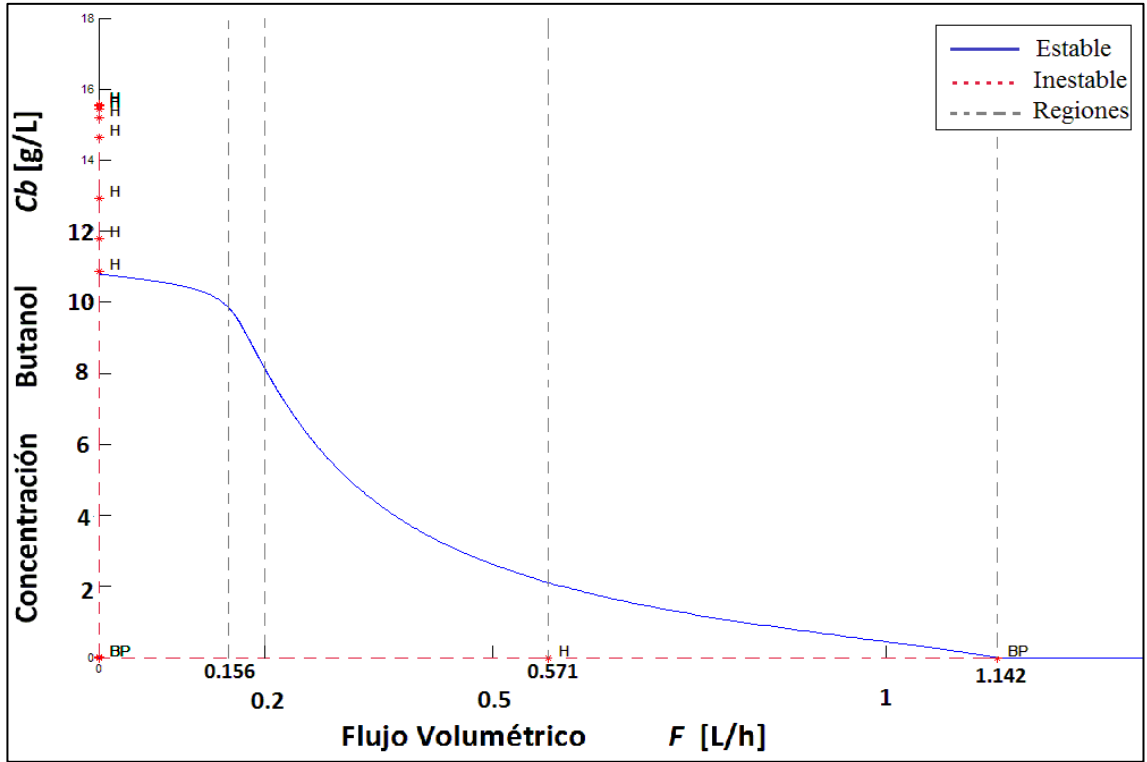
Tal como se explicó para el caso anterior, los puntos de bifurcación Hopf se obtienen para el estado estable de lavado del biorreactor y todos los valores de la parte real de los eigenvalores tienen el mismo valor del anterior caso ( ) pero todos tienen valor negativo con excepción del último eigenvalor.

El aumento de la velocidad de dilución causa disminución en la producción de solventes, y conduce a un único estado estable, pero indeseado, cuando alcanza su valor crítico. En el primer caso es recomendable operar el

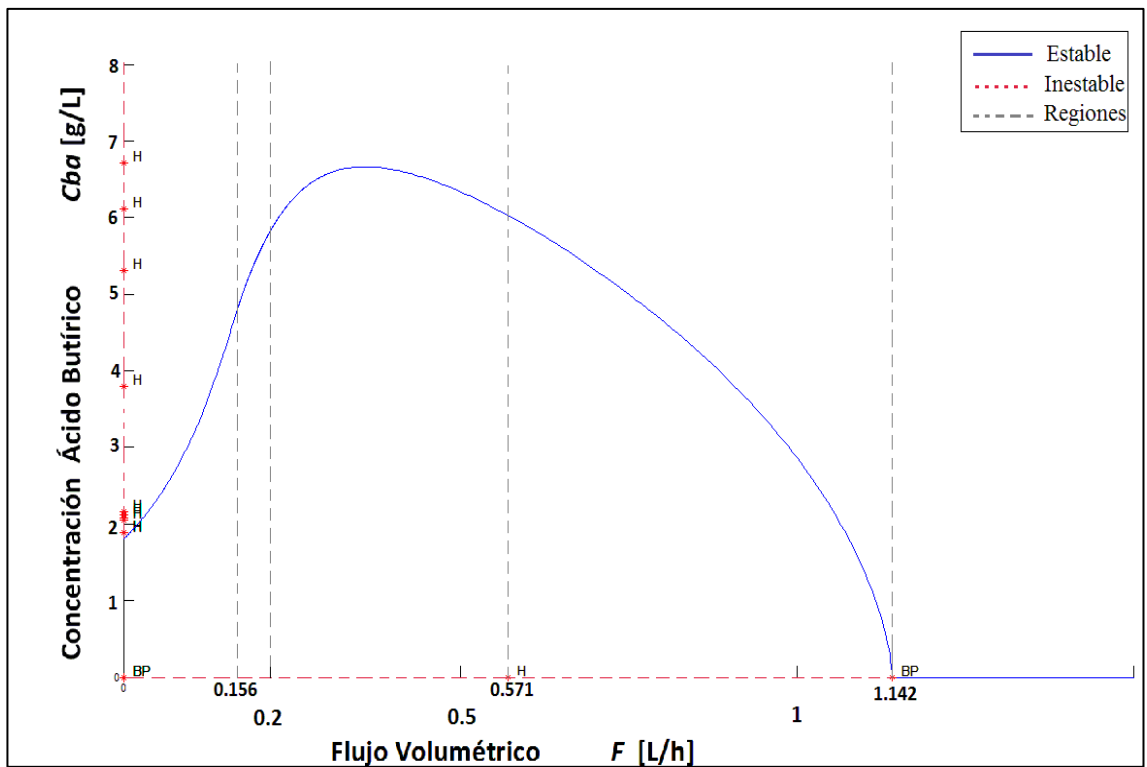
reactor a velocidades de dilución menores o iguales a  $0,1 \text{ h}^{-1}$ . Mientras que para el segundo caso los flujos de alimentación deben ser menores o iguales a  $0,2 \text{ L/h}$ . Lo anterior con el objetivo de alcanzar las mejores concentraciones de butanol mayores a  $10 \text{ g/L}$  que concuerdan con los valores experimentales reportados [5,7,13,23,27,17,37,38]. Además, con estos valores de velocidad de dilución se evitan las condiciones de lavado en sistemas que operan con células libres. Este resultado se esperaba, porque a medida que aumenta la tasa de dilución se corre el riesgo que la biomasa y la resina sean arrastradas a la salida del biorreactor, lo que causa menor cantidad de producción de solventes.



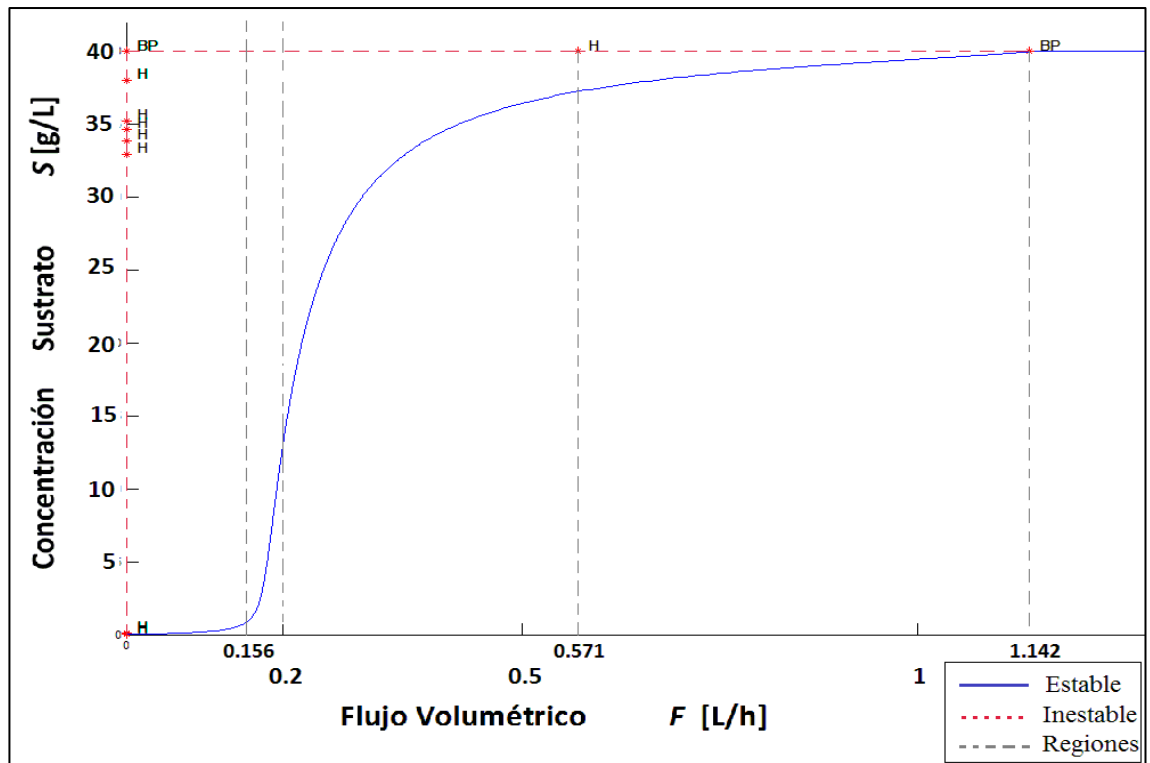
(a)



(b)



(c)



(d)

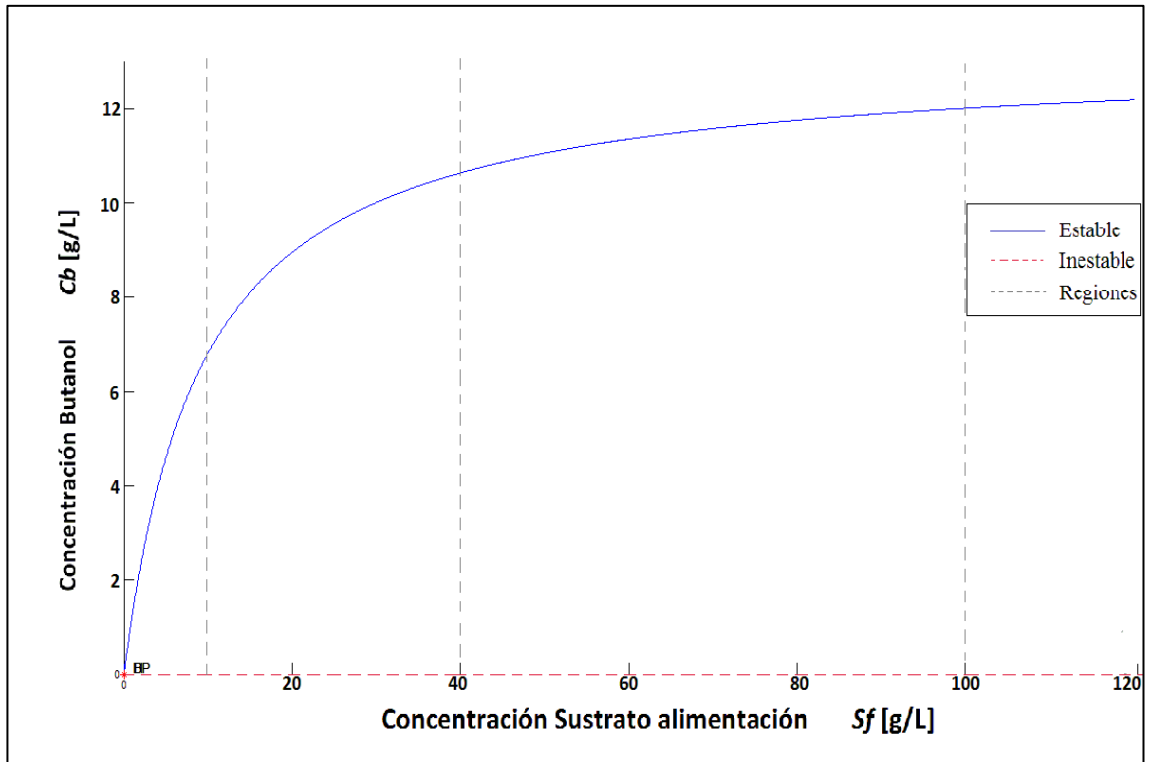
**Figura 2.** Diagramas de bifurcación para biorreactor con resina empleando como parámetro de bifurcación el Flujo alimentación. (a) Concentración de biomasa, (b) concentración de butanol, (c) concentración de ácido butírico y (d) concentración de sustrato.

## 2.5. SUSTRATO DE ALIMENTACIÓN COMO PARÁMETRO DE BIFURCACIÓN

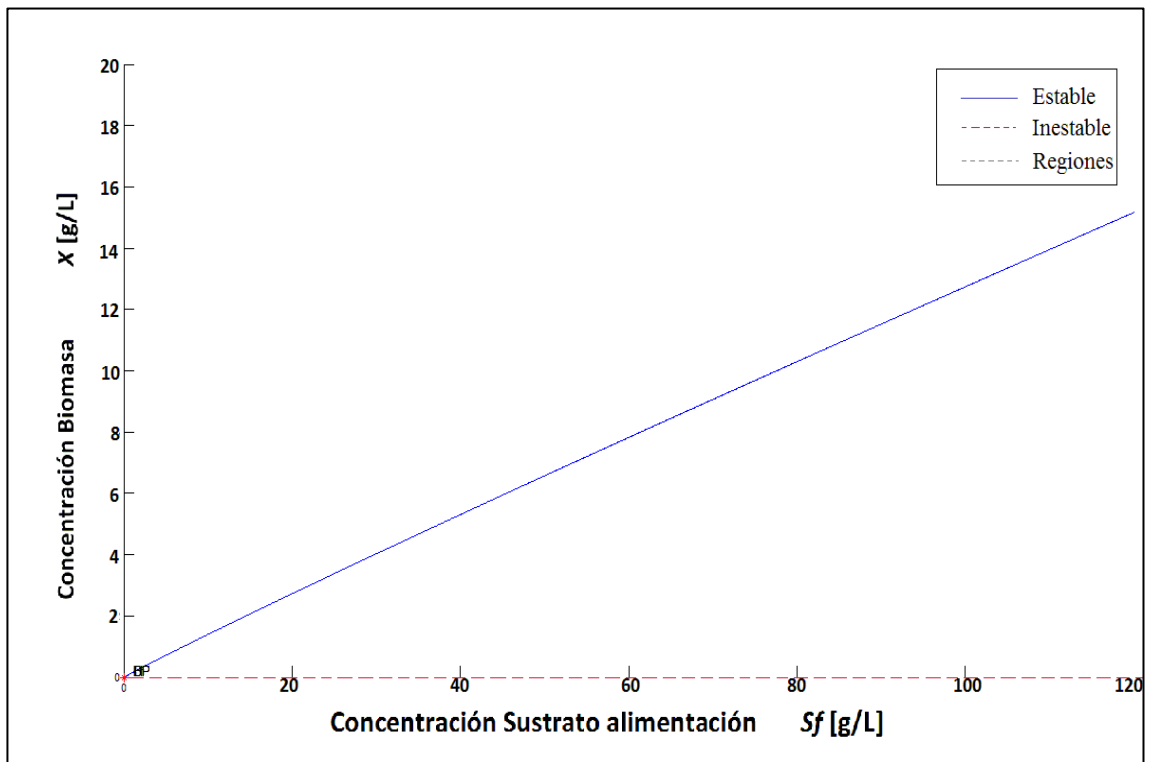
Los modelos cinéticos se analizaron para una velocidad de dilución y un flujo de alimentación – respectivamente. En las figura 3 se muestran los diagramas obtenidos para el modelo cinético sin y con adición de resina PVP. Para este análisis, los resultados del análisis de bifurcación fueron los mismos para los dos casos. Así, los diagramas de bifurcación elegidos para el análisis fueron: concentración de biomasa , concentración de sustrato , concentración de butanol en el caso de los solventes y concentración de ácido acético en el caso de los ácidos.

La primera observación que se debe hacer con respecto a todos los diagramas es que en todo el rango se observan dos ramas de estados estacionarios, la continua correspondiente a la rama estable y la discontinua correspondiente a la rama inestable. La rama inestable corresponde a las condiciones de lavado para el fermentador donde sus eigenvalores tienen parte real positiva y evidencian la no estabilidad. Además, cuando la concentración de sustrato de alimentación es muy pequeña  $\mu = 0$ , se encuentra el único punto de bifurcación para este diagrama. En él, se anulan las dos ramas que conforman el diagrama de bifurcación. El presente análisis se realiza a la rama estable debido a que el sistema alcanzará estas concentraciones fácilmente y se garantizará la operación estable del mismo.

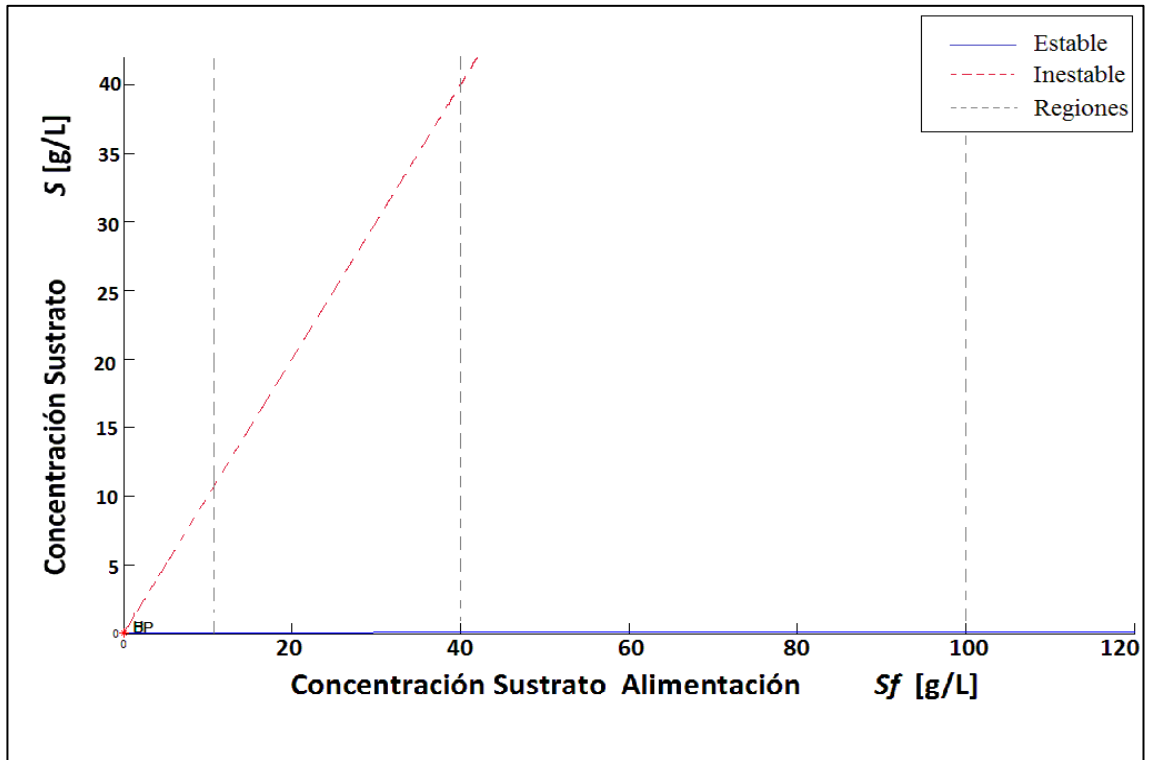
En general se puede dividir los diagramas de bifurcación en 3 zonas. Para la primera donde  $\mu = 0$ , las concentraciones de butanol son  $X_1$  y  $X_2$  y son las más pequeñas en todo el rango. Además, la pendiente en esta zona es la mayor de toda la rama estable. Lo que nos muestra que a medida que aumenta el sustrato de alimentación, las concentraciones de butanol aumentan rápidamente.



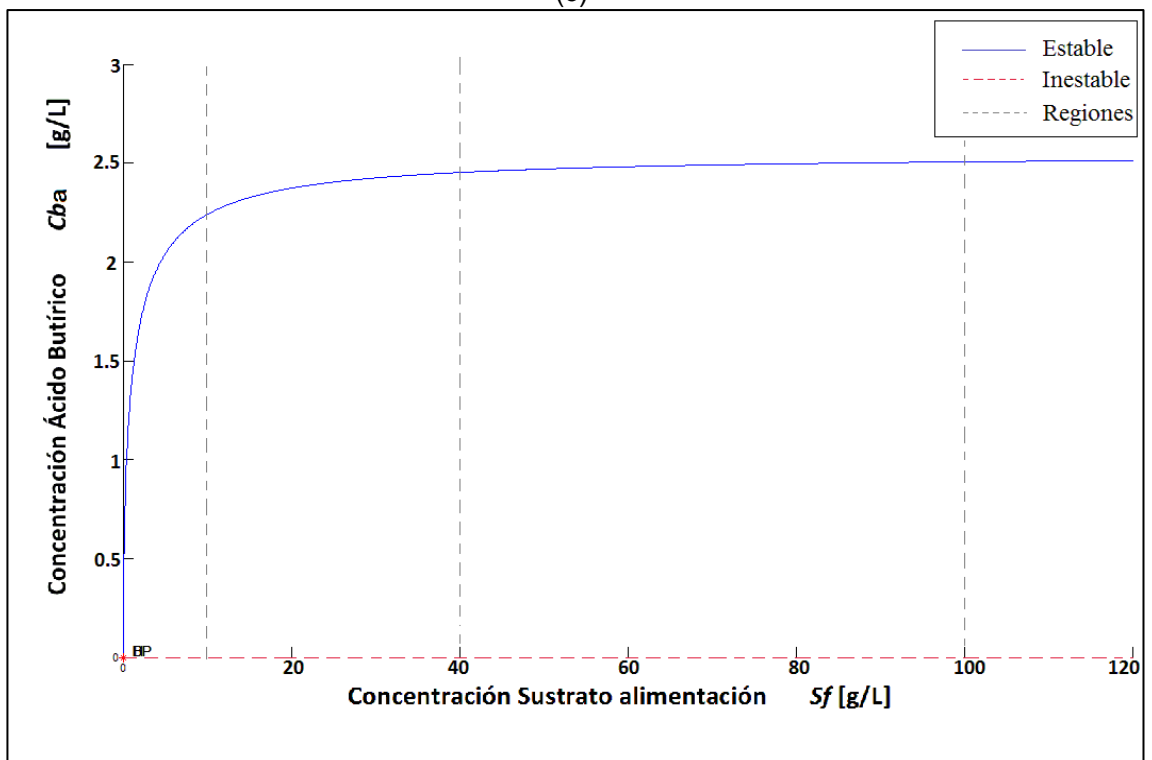
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 3.** Diagramas de bifurcación para biorreactor sin resina empleando como parámetro la Concentración sustrato alimentación. (a) Concentración de butanol, (b) concentración de biomasa, (c) concentración de sustrato y (d) concentración de ácido butírico.

De igual forma, las concentraciones de ácidos en la figura 3(d) experimentan el mismo comportamiento. Así mismo, en la gráfica 3(b) se observa un crecimiento de biomasa lineal y proporcional con respecto al sustrato de alimentación. En la figura 3(c) se muestra un comportamiento particular para el sustrato debido a que sin importar la biomasa alimentada, el valor permanece aproximadamente constante ( - ), lo que hace pensar que es conveniente trabajar en zonas donde se presenten altas concentraciones de sustrato de alimentación y permitan alcanzar altas conversiones.

Para la segunda zona, donde - se observa que la figura 3(a) sigue la tendencia de aumento de concentraciones hasta alcanzar - , pero con menor pendiente. En la figura 3(d), es evidente que durante este rango, la concentración de ácidos aumenta lentamente a diferencia de la primera zona. Por ejemplo - y para - lo que demuestra que para un amplio rango de sustrato de alimentación, la concentración del ácido butírico tan solo aumenta , lo que es conveniente para la producción de solventes. Por último, para el caso de la biomasa en la figura 3 (b), la tendencia de aumento lineal no cambia.

Para la tercera zona, donde - como se ve en la figura 3(a) la concentración del butanol, así como de los solventes, sigue aumentando. En este rango, el sustrato también experimenta un leve aumento pasando de - a - lo que no afectaría considerablemente la conversión. En contraste y como lo muestra la figura 3(d), al final de este rango - , mostrando que los ácidos alcanzan un valor aproximadamente constante.

Finalmente, ha sido reportado por varios autores<sup>[3,8,10,14]</sup> que a concentraciones 100 – la biomasa presenta inhibición por sustrato, por lo tanto el análisis resulta interesante hasta este punto. Debido a que este modelo no toma en consideración este tipo de inhibición, las gráficas siguen la tendencia compuesta por el modelamiento de la cinética.

En síntesis, el aumento de concentración en el flujo de alimentación causa aumento en las concentraciones de biomasa y en consecuencia, aumento en la producción de solventes lo que produce mayor concentración de butanol.

Los resultados de la concentración estacionaria de sustrato de los modelos cinéticos estudiados, muestran que existe una buena respuesta de los microorganismos para consumir altas concentraciones de glucosa, mejorando notablemente las concentraciones de butanol y alcanzando valores

– , referenciados como altos comparados con los que se encuentran en otros estudios para biorreactores de células libres<sup>[37,38]</sup>.

### 3. CONCLUSIONES

Con referencia a la velocidad de dilución, el análisis de estabilidad demostró que la zona de estados estables posibles que favorecen el aumento en la concentración de butanol está delimitado para aquellos valores menores a  $0,078 \text{ h}^{-1}$ . Además el mismo análisis, permite concluir que el valor más adecuado de velocidad de dilución es de 0,03 sin sacrificar la eficacia del proceso.

En lo que respecta a la concentración de sustrato de alimentación, el análisis de estabilidad mostró que los sistemas de fermentación ABE estudiados pueden ser puestos en marcha empleando concentraciones de sustrato en el intervalo de  $40 \text{ g/L} < S_f < 90 \text{ g/L}$ .

Finalmente, la zona de estados estables encontrada cuando se analiza tanto la velocidad de dilución, como la concentración de sustrato de alimentación como parámetros de bifurcación, concuerdan con los valores experimentales reportados por varios autores.

El análisis de estabilidad permite concluir que su utilización simplifica y reduce el número de experimentos a desarrollar, con miras a identificar las zonas estables del proceso de fermentación ABE que permiten la producción de altas concentraciones de solventes.

#### **4. RECOMENDACIONES**

A futuro se sugiere emplear modelos cinéticos más robustos que incluyan la inhibición por sustrato y la temperatura en sus concepciones, con el fin de mejorar el modelamiento y la precisión de los resultados del análisis de estabilidad.

Se recomienda implementar este tipo de análisis en el diseño de bioprocesos, en especial en aquellos que involucran la producción de alcoholes carburantes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Kirschner M. 2006. n-Butanol. Chemical Market Reporter January 30–February 5, ABI/INFORM Global, p42.
- [2] Donaldson GK, Huang LL, Maggio-Hall LA, Nagarajan V, Nakamura CE, Suh W. Fermentative production of four carbon alcohols. 2007. International Patent WO2007/041269.
- [3] Lee S Y, Park J H, Jang S H, Nielsen L K, Kim J, Jung K S. Fermentative Butanol Production by Clostridia. *Biotechnol. Bioeng.* 2008;101(2):209-28.
- [4] Consorcio CUE: Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology. EMPA. Centro Nacional de Producción más Limpia CNPML. Universidad Pontificia Bolivariana. Evaluación del ciclo de vida de la cadena de producción de biocombustibles en Colombia. Bogotá, Colombia. 2012.
- [5] Patakova P., Maxa D., Rychtera M., Linhova M., Fribert P., Muzikova Z., *et al.* Perspectives of Biobutanol Production and Use. En: *Biofuel's Engineering Process Technology*. Dr. Dos Santos M.A. Editorial: InTech. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/biofuel-sengineering-process-technology/perspectives-of-biobutanol-production-and-use>. Croacia. 2011. p. 234-266.
- [6] Jones D.T. BIOBUTANOL. En: *Biotechnology*. Vol. VI. Doelle H. W., Rokem S. Editor. EOLSS. 2009 p. 98-134
- [7] Patakova P., Linhova M., Rychtera M., Paulova L., Melzoch K. Novel and neglected issues of acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by clostridia: Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. *Biotechnol Adv.* 2013;31:58–67.
- [8] Tashiro Y., Sonomoto K. Advances in butanol production by clostridia. En: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology*

and Microbial Biotechnnology. Mendez-Vilas A. Ed. FORMATEX. 2010. p. 1383-1394 Disponible en: <http://www.formatex.info/microbiology2/1383-1394.pdf>

[9] Kamiński W, Tomczak E, GÓRAK A. Biobutanol-Production and purification methods. Ecol Chem Eng S. 2011;18:1:31-37.

[10] Jang Y.-S., Malaviya A., Cho C., Lee J., Lee S. Butanol production from renewable biomass by clostridia. Bioresource Technol. 2012; 123:653–663.

[11] Fuciños V., Pallares A. 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. Universidad Industrial De Santander. Bucaramanga 2011.

[12] YANG X. A novel extractive fermentation for the production of Acetone-butanol by *Clostridium Acetobutylicum*. Purdue University. 1990.

[13] Millat T., Janssen H., Bahl H., Fischer R., Wolkenhauer O. Integrative modelling of pH-dependent enzyme activity and transcriptomic regulation of the acetone–butanol–ethanol fermentation of *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing. 2013.

[14] Gottwald, M., Gottschalk, G. The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. Arch Microbiol. 1985;143: 42–46.

[15]Ezeji T.C., Qureshi N., Blaschek H.P. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. World Journal of Microbiology & Biotechnology 19: 595–603, 2003.

[16] Ezeji T., Qureshi N., Blaschek H. Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. Appl Microbiol Biotechnol. 2004;63:653–658.

- [17] Yang X., Tsao G. Mathematical modeling of inhibition kinetics in acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Prog.*, 1994;10:5: 532-538.
- [18] Paz, I., Cardona C. Importance of stability study of continuous systems for ethanol production. *J. Biotechnol.* 2011;151: 43-55.
- [19] Paz I. Diseño integral de biorreactores continuos de tanque agitado aplicados a procesos de fermentación. 2010. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales. Manizales. 159 p.
- [20] Paz I., Cardona C. Influencia de las regiones de estabilidad del bioreactor en la producción eficiente de alcohol carburante. *Rev.Colomb.Biotecnol.*2011;XIII No.1:23-32.
- [21] Ajbar A., Alhumaizi K., *Dynamics of the Chemostat. A Bifurcation Theory Approach.* U.S.A: Taylor & Francis Group, LLC. 2012.
- [22] Stockar U., Valentinotti S., Marison I., Cannizzaro C., Herwig C. Know-how and know-why in biochemical engineering. *Biotechnol Adv.* 2003;21:417–430.
- [23] Mayank R., Ranjan A., Moholkar V. S. Mathematical models of ABE fermentation: review and analysis. *Crc Cr Rev Biotechn.*2012; Early Online: 1–29.
- [24] Papoutsakis ET. Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 1984; 26:174-187.
- [25] Mulchandani A, Volesky B. Modeling of the acetone–butanol fermentation with cell retention. *Can J Chem Eng.* 1986;64:625–631.
- [26] Desai R, Nielsen L, Papoutsakis ET. Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *J Biotechnol.* 1999; 71: 191–205.

- [27] Shinto, H., Tashiro, Y., Yamashita, M., Kobayashi, G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Kuriya, Y., Okamoto, M., Sonomoto, K. Kinetic modeling and sensitivity analysis of Acetone-Butanol-Ethanol production'. J Biotech. 2007;131:1: 45–56.
- [28] STROGATZ S. H. Nonlinear Dynamics and Chaos. Perseus Books. 1994.
- [29] Seydel R.. Practical Bifurcation and Stability Analysis. Third Edition. Springer, New York, 2010.
- [30] Mahecha-Botero A., Garhyan P., Elnashaie S. S. E. H. Bifurcation, Stabilization, and Ethanol Productivity Enhancement for a Membrane Fermentor. Math.Comput.Model 2005; 41:391-406.
- [31] Garhyana P., Elnashaiea S. S. E. H., Al-Haddadb S. M., Ibrahimc G., Elshishinid S. Exploration and exploitation of bifurcation/chaotic behavior of a continuous fermentor for the production of ethanol. Chem. Eng. Sci. 2003; 58: 1479 – 1496
- [32] Fradkov A.L., Miroshnik I.V., Nikiforov V.O. Nonlinear and adaptive control of complex systems". Kluwer. 1999.
- [33] Dhooge, A., Govaerts, W., Y.A., K., Mestrom, W., y Riet, A.M, a. S. B. MATCONT and CL MATCONT: Continuation toolboxes in Matlab. 2006. University Gent, Bélgica.
- [34] Zhang Y., Henson M. Bifurcation analysis of continuous biochemical reactor models. Biotechnol. Prog. 2001;17:647–660.
- [35] Bai F. W. Process oscillations in continuous ethanol fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. 2007. Tesis doctoral. Universidad de Waterloo. Waterloo. 218 p.
- [36] Godin C., Engasser J. M. Two-stage continuous fermentation of *Clostridium acetobutylicum*: effects of pH and dilution rate. Appl Microbiol Biotechnol. 1990 ; 33:269-273

[37] Garhyan, P., Elnashaie, S. Experimental investigation and confirmation of static/dynamic bifurcation behavior in a continuous ethanol fermentor. Practical relevance of bifurcation and the contribution Harmon Ray. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2005;44: 2525–2531.

[38] Bai, F. W., Chen, L. J., Zhang, Z., Anderson, W. A., Moo-Young, M. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *J Biotechnol.* 2004;110: 287-293.

## BIBLIOGRAFÍA

Ajbar A., Alhumaizi K., Dynamics of the Chemostat. A Bifurcation Theory Approach. U.S.A: Taylor & Francis Group, LLC. 2012.

Bai F. W. Chen, L. J., Zhang, Z., Anderson, W. A., Moo-Young, M. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. J Biotechnol. 2004;110: 287-293.

Consortio CUE: Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology. EMPA. Centro Nacional de Producción más Limpia CNPML. Universidad Pontificia Bolivariana. Evaluación del ciclo de vida de la cadena de producción de biocombustibles en Colombia. Bogotá, Colombia. 2012.

Desai R, Nielsen L, Papoutsakis ET. Stoichiometric modeling of Clostridium acetobutylicum fermentations with non-linear constraints. J Biotechnol. 1999; 71: 191–205.

Dhooge, A., Govaerts, W., Y.A., K., Mestrom, W., y Riet, A.M, a. S. B. MATCONT and CL MATCONT: Continuation toolboxes in Matlab. 2006. University Gent, Bélgica.

Donaldson GK, Huang LL, Maggio-Hall LA, Nagarajan V, Nakamura CE, Suh W. Fermentative production of four carbon alcohols. 2007. International Patent WO2007/041269.

Ezeji T., Qureshi N., Blaschek H. Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. Appl Microbiol Biotechnol. 2004;63:653–658.

Ezeji T.C., Qureshi N., Blaschek H.P. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 595–603, 2003.

Fradkov A.L., Miroshnik I.V., Nikiforov V.O. *Nonlinear and adaptive control of complex systems*". Kluwer. 1999.

Fuciños V., Pallares A. 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. Universidad Industrial De Santander. Bucaramanga 2011.

Garhyan, P., Elnashaie, S. Experimental investigation and confirmation of static/dynamic bifurcation behavior in a continuous ethanol fermentor. Practical relevance of bifurcation and the contribution Harmon Ray. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2005;44: 2525–2531.

Garhyana P., Elnashaiea S. S. E. H., Al-Haddadb S. M., Ibrahimc G., Elshishinid S. Exploration and exploitation of bifurcation/chaotic behavior of a continuous fermentor for the production of ethanol. *Chem. Eng. Sci.* 2003; 58: 1479 – 1496

Godin C., Engasser J. M. Two-stage continuous fermentation of *Clostridium acetobutylicum*:effects of pH and dilution rate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1990 ; 33:269-273

Gottwald, M., Gottschalk, G. The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Arch Microbiol.* 1985;143: 42–46.

Jang Y.-S., Malaviya A., Cho C., Lee J., Lee S. Butanol production from renewable biomass by clostridia. *Bioresource Technol.* 2012; 123:653–663.

Jones D.T. BIOBUTANOL. En: Biotechnology. Vol. VI. Doelle H. W., Rokem S. Editor. EOLSS. 2009 p. 98-134

Kamiński W, Tomczak E, GÓRAK A. Biobutanol-Production and purification methods. *Ecol Chem Eng S.* 2011;18:1:31-37.

Kirschner M. 2006. n-Butanol. *Chemical Market Reporter* January 30–February 5, ABI/INFORM Global, p42.

Lee S Y, Park J H, Jang S H, Nielsen L K, Kim J, Jung K S. Fermentative Butanol Production by Clostridia. *Biotechnol. Bioeng.* 2008;101(2):209-28.

Mahecha-Botero A., Garhyan P., Elnashaie S. S. E. H. Bifurcation, Stabilization, and Ethanol Productivity Enhancement for a Membrane Fermentor. *Math.Comput.Model* 2005; 41:391-406.

Mayank R., Ranjan A., Moholkar V. S. Mathematical models of ABE fermentation: review and analysis. *Crc Cr Rev Biotechn.*2012; Early Online: 1–29.

Millat T., Janssen H., Bahl H., Fischer R., Wolkenhauer O. Integrative modelling of pH-dependent enzyme activity and transcriptomic regulation of the acetone–butanol–ethanol fermentation of *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing.* 2013.

Mulchandani A, Volesky B. Modeling of the acetone–butanol fermentation with cell retention. *Can J Chem Eng.* 1986;64:625–631.

Papoutsakis ET. Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 1984; 26:174-187.

Patakova P., Linhova M., Rychtera M., Paulova L., Melzoch K. Novel and neglected issues of acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by clostridia:

Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. *Biotechnol Adv.* 2013;31:58–67.

Patakova P., Maxa D., Rychtera M., Linhova M., Fribert P., Muzikova Z., *et al.* Perspectives of Biobutanol Production and Use. En: *Biofuel's Engineering Process Technology*. Dr. Dos Santos M.A. Editorial: InTech. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/biofuel-sengineering->

Paz I. Diseño integral de biorreactores continuos de tanque agitado aplicados a procesos de fermentación. 2010. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales. Manizales. 159 p.

Paz I., Cardona C. Influencia de las regiones de estabilidad del bioreactor en la producción eficiente de alcohol carburante. *Rev.Colomb.Biotecnol.*2011;XIII No.1:23-32.

Paz, I., Cardona C. Importance of stability study of continuous systems for ethanol production. *J. Biotechnol.* 2011;151: 43-55.

[process-technology/perspectives-of-biobutanol-production-and-use.Croacia.](http://www.intechopen.com/process-technology/perspectives-of-biobutanol-production-and-use)

2011. p. 234-266.

*Saccharomyces cerevisiae*. 2007. Tesis doctoral. Universidad de Waterloo. Waterloo. 218 p.

Seydel R.. *Practical Bifurcation and Stability Analysis*. Third Edition. Springer, New York, 2010.

Shinto, H., Tashiro, Y., Yamashita, M., Kobayashi, G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Kuriya, Y., Okamoto, M., Sonomoto, K. Kinetic modeling and sensitivity analysis of Acetone-Butanol-Ethanol production'. *J Biotech.* 2007;131:1: 45–56.

Stockar U., Valentinotti S., Marison I., Cannizzaro C., Herwig C. Know-how and know-why in biochemical engineering. *Biotechnol Adv.* 2003;21:417–430.

STROGATZ S. H. Nonlinear Dynamics and Chaos. Perseus Books. 1994.

Tashiro Y., Sonomoto K. Advances in butanol production by clostridia. En: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Mendez-Vilas A. Ed. FORMATEX. 2010. p. 1383-1394 Disponible en: <http://www.formatex.info/microbiology2/1383-1394.pdf>

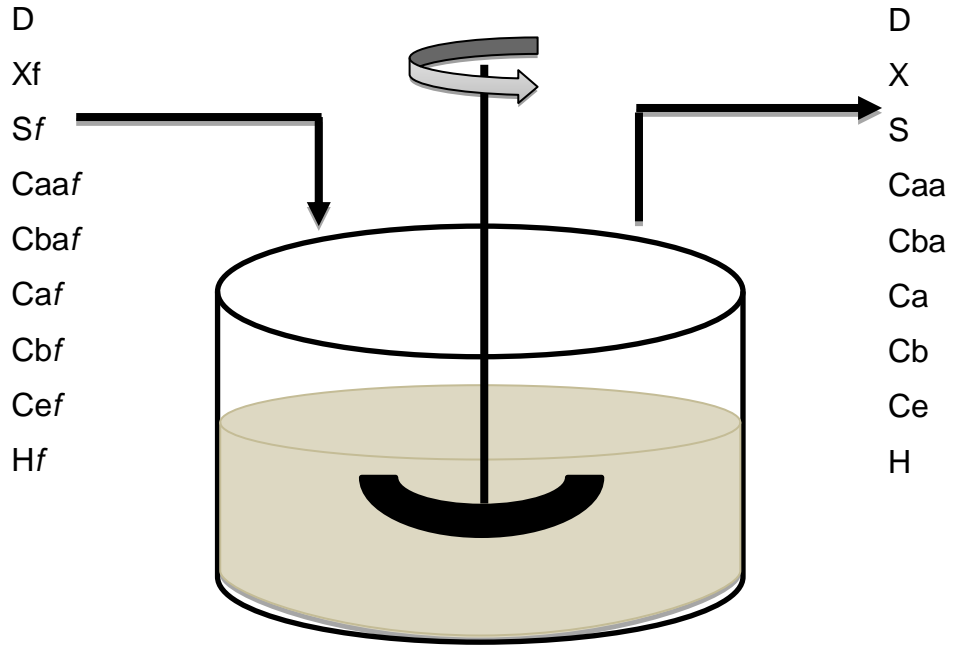
YANG X. A novel extractive fermentation for the production of Acetone-butanol by *Clostridium Acetobutylicum*. Purdue University. 1990.

Yang X., Tsao G. Mathematical modeling of inhibition kinetics in acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnol. Prog., 1994;10:5: 532-538.

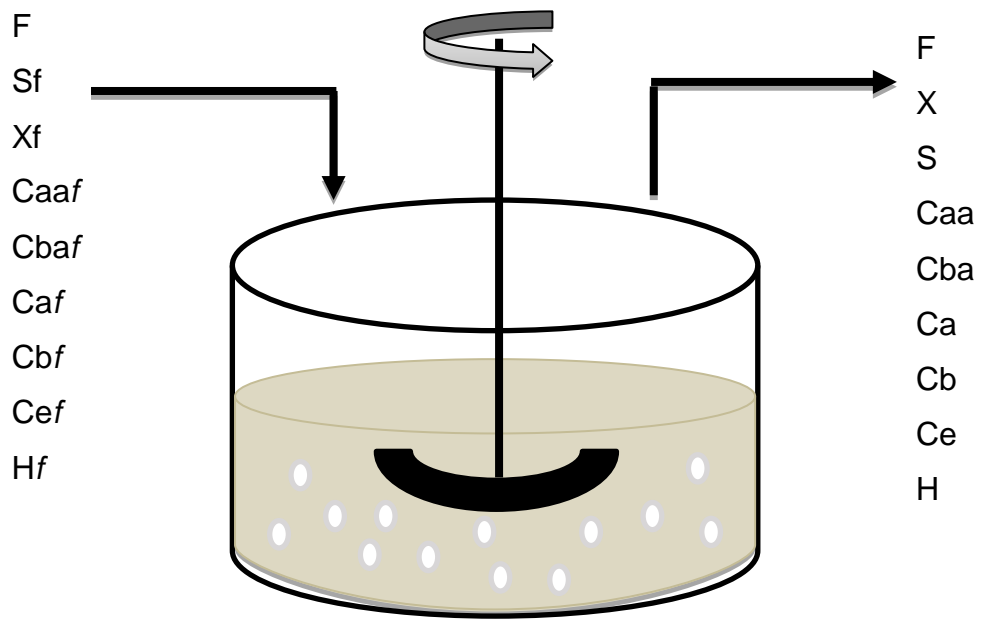
Zhang Y., Henson M. Bifurcation analysis of continuous biochemical reactor models. Biotechnol. Prog. 2001;17:647–660.

## ANEXOS

### ANEXO A. Diagramas de los biorreactores.



(a) Fermentador continuo.



(b) Fermentador continuo con adición de resina PVP

Figura 4. Diagrama esquemático de los biorreactores. (a) Fermentador continuo sin resina.

## ANEXO B. Sistema EDO lineal con coeficientes constantes.

En este anexo se examinará la solución general de un sistema homogéneo de ecuaciones diferenciales lineales de la forma:

Donde se supone que Supongamos que  $A$  es una matriz constante real y se compone de  $n$  filas y  $n$  columnas. Una solución general se obtiene mediante la superposición lineal de  $n$  soluciones linealmente independientes  $\mathbf{x}_i(t)$ . Así,

(El superíndice  $i$  no es exponente). Las constantes  $c_i$  pueden determinarse con las condiciones iniciales o por las condiciones límite. La estructura de la solución es más sencilla cuando  $A$  tiene  $n$  eigenvectores o vectores propios lineales e independientes, asociados con los eigenvalores  $\lambda_i$ . A continuación, se muestra que las funciones de base toman la forma:

Teniendo en cuenta que desde  $A$  sea real, los eigenvalores son pares complejos conjugados. Las funciones de base pueden ser tomadas como reales, incluso cuando  $\lambda_i$  son complejos. Si se determina que un par de eigenvalores sean

Con eigenvectores  $\mathbf{v}_i$  y  $\mathbf{v}_i^*$  Donde  $\alpha$  parte real  $\beta$  parte imaginaria.

Luego, dos funciones base son linealmente independientes de la forma:

## ANEXO C. Modelos cinéticos completos

### Nomenclatura

F

—

,

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

r

—

—

—

—

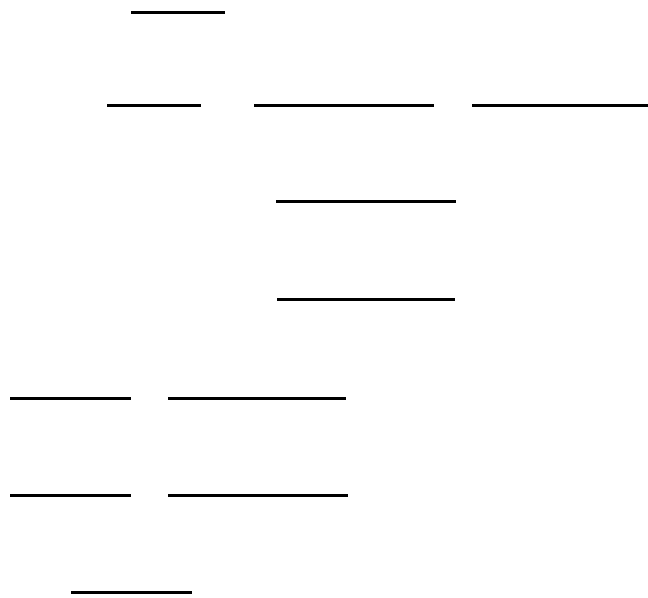
—

Primero se presenta el modelo cinético para el sistema continuo sin adición de resina.

### Cinética Inhibición

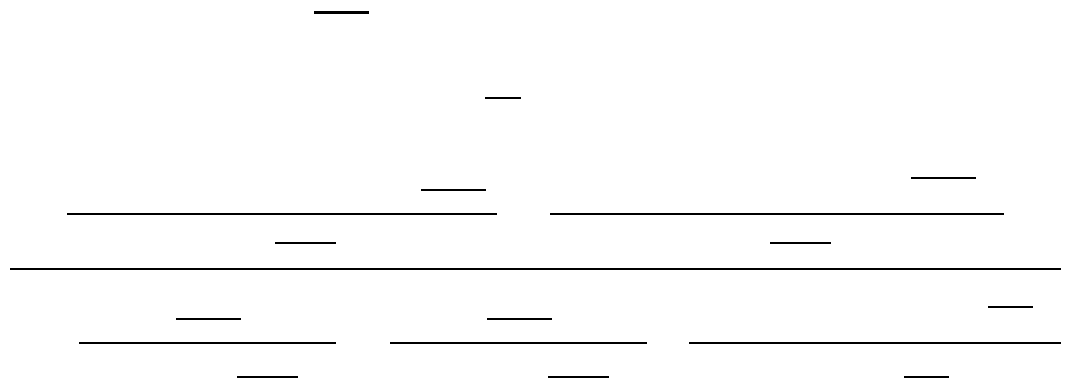


### Cinética Fermentación

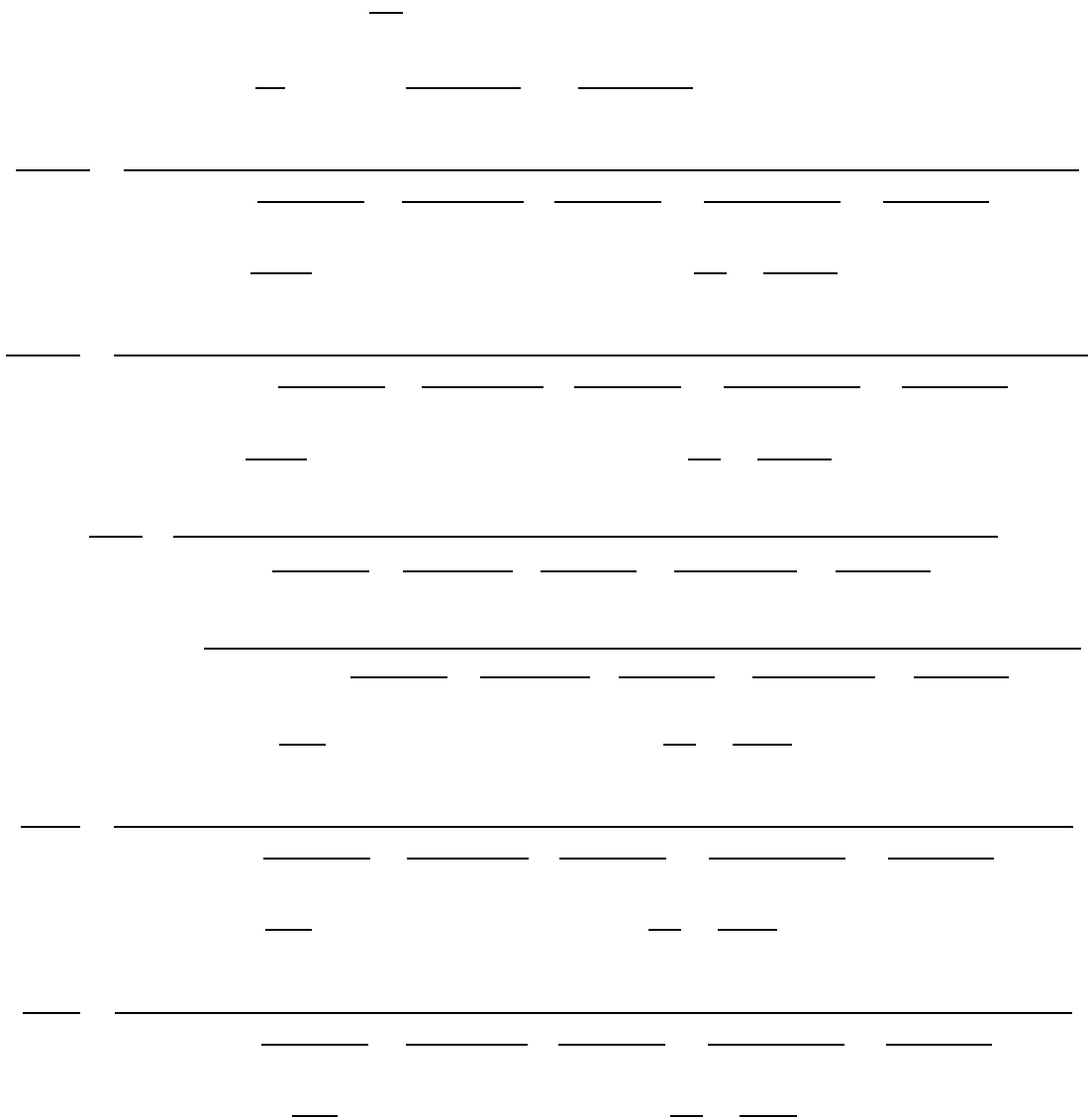


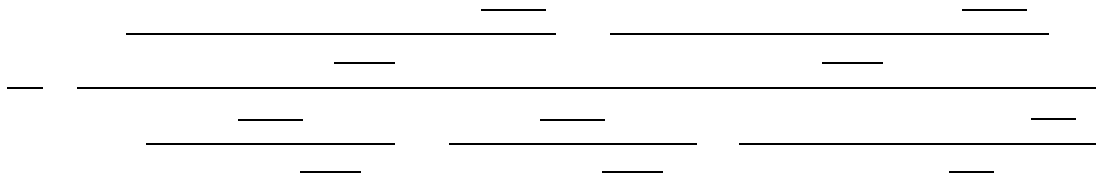
### Balances Dinámicos





Ahora se presenta el modelo cinético para el sistema continuo con adición de resina PVP:





---

**Valores Parámetros Inhibición Modelo Cinético**

---

---

**Formación de Producto**

---

---

**Valores Parámetros Modelo Cinético**

---



**ANEXO D.** Condiciones iniciales empleadas para obtener los valores de estado estacionario.

En la tabla 7 y 8 se muestran sólo 10 condiciones iniciales de las totales empleadas en el desarrollo del presente trabajo para cada uno de los modelos cinéticos. Éstas fueron elegidas debido a ser muestras representativas de los resultados obtenidos y por consiguiente, reflejan la influencia de escoger una u otra condición inicial.

**Tabla 7.** Condiciones iniciales del sistema de fermentación sin resina.

Condición Inicial	X [g/L]	S [g/L]	Caa [g/L]	Cba [g/L]	Cb [g/L]	Ca [g/L]	Ce [g/L]	H	D [h <sup>-1</sup> ]	Sf [g/L]
1	0,0000	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0300	40,0000
2	0,0100	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0300	40,0000
3	0,0500	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0300	40,0000
4	0,1000	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,1000	40,0000
5	0,1000	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,5000	40,0000
6	0,1000	10,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0300	10,0000
7	0,1000	20,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0300	20,0000
8	0,1000	30,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0300	30,0000
9	0,1000	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0300	40,0000
10	0,5000	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0001E+00	0,0300	40,0000
Concentraciones E.E.	X [g/L]	S [g/L]	Caa [g/L]	Cba [g/L]	Cb [g/L]	Ca [g/L]	Ce [g/L]	H	D [h <sup>-1</sup> ]	Sf [g/L]
1	0,0000	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0007E-07	0,0300	40,0000
2	5,3080	0,0882	2,1997	2,4523	10,6312	4,6642	0,3254	1,0007E-07	0,0300	40,0000
3	5,3080	0,0881	2,1997	2,4524	10,6312	4,6642	0,3254	1,0007E-07	0,0300	40,0000
4	6,9254	13,6457	4,0565	5,5083	8,5819	3,8280	1,8019	9,8520E-08	0,1000	40,0000
5	0,7254	39,4757	2,3805	2,8685	0,4465	0,1941	0,1072	9,9592E-08	0,5000	40,0000
6	1,3971	0,0493	2,0274	2,2397	6,7987	2,9699	0,1256	1,0003E-07	0,0300	10,0000
7	2,7264	0,0635	2,1 <sup>36</sup> 1	2,3728	8,9482	3,9199	0,2059	1,0023E-07	0,0300	20,0000
8	4,0276	0,0765	2,1775	2,4245	10,0027	4,3862	0,2707	1,0000E-07	0,0300	30,0000
9	5,3080	0,0881	2,1995	2,4522	10,6312	4,6642	0,3254	1,0000E-07	0,0300	40,0000
10	5,3080	0,0882	2,1997	2,4524	10,6312	4,6642	0,3254	1,0005E-07	0,0300	40,0000

Fuente: Autores

**Tabla 8.** Condiciones iniciales del sistema de fermentación con resina

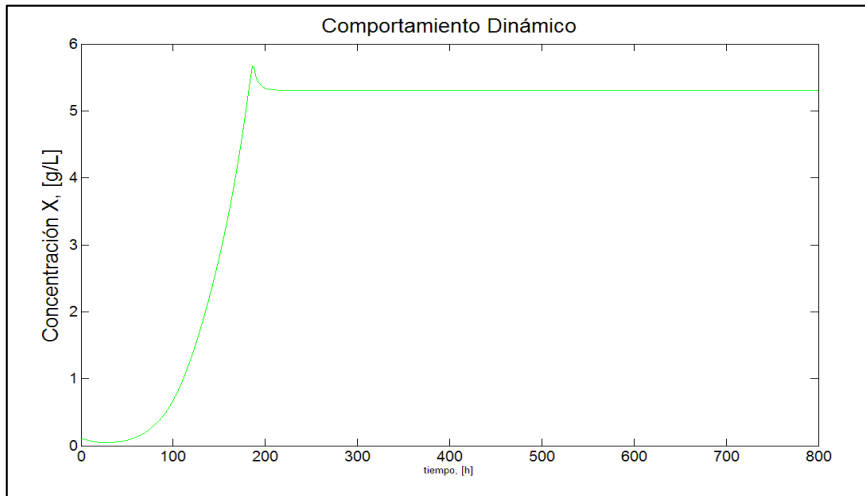
Condición Inicial	X [g/L]	S [g/L]	Caa [g/L]	Cba [g/L]	Ca [g/L]	Cb [g/L]	Ce [g/L]	H	F [L/h]	Sf [g/L]
1	0,0000	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0600	40,0000
2	0,0100	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0600	40,0000
3	0,1000	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0600	40,0000
4	0,1000	5,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0600	5,0000
5	0,1000	10,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0600	10,0000
6	0,1000	20,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0600	20,0000
7	0,1000	30,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,0600	30,0000
8	0,1000	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,2000	40,0000
9	0,1000	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	0,8000	40,0000
10	0,1000	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7,9433E-05	1,0000	40,0000
Concentraciones E.E.	X [g/L]	S [g/L]	Caa [g/L]	Cba [g/L]	Ca [g/L]	Cb [g/L]	Ce [g/L]	H	F [L/h]	Sf [g/L]
1	0,0000	40,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000E-07	0,0600	40,0000
2	5,3079	0,0883	2,2005	2,4533	4,6444	10,6324	0,3253	9,9927E-08	0,0600	40,0000
3	5,3079	0,0882	2,1996	2,4523	4,6444	10,6324	0,3253	9,9529E-08	0,0600	40,0000
4	0,7175	0,0420	1,8583	2,0390	1,9706	4,5864	0,0747	9,9429E-08	0,0600	5,0000
5	1,3971	0,0493	2,0274	2,2399	2,9494	6,8011	0,1256	9,9485E-08	0,0600	10,0000
6	2,7263	0,0636	2,1361	2,3730	3,8999	8,9500	0,2059	9,9695E-08	0,0600	20,0000
7	4,0275	0,0765	2,1778	2,4249	4,3663	10,0042	0,2707	9,9632E-08	0,0600	30,0000
8	6,9244	13,6493	4,0563	5,5083	3,8228	8,5819	1,8017	9,8333E-08	0,2000	40,0000
9	1,3251	38,7371	3,7681	4,6597	0,4722	1,0549	0,2331	9,7151E-08	0,8000	40,0000
10	0,7254	39,4758	2,3806	2,8687	0,1928	0,4465	0,1072	9,9866E-08	1,0000	40,0000

Fuente: Autores

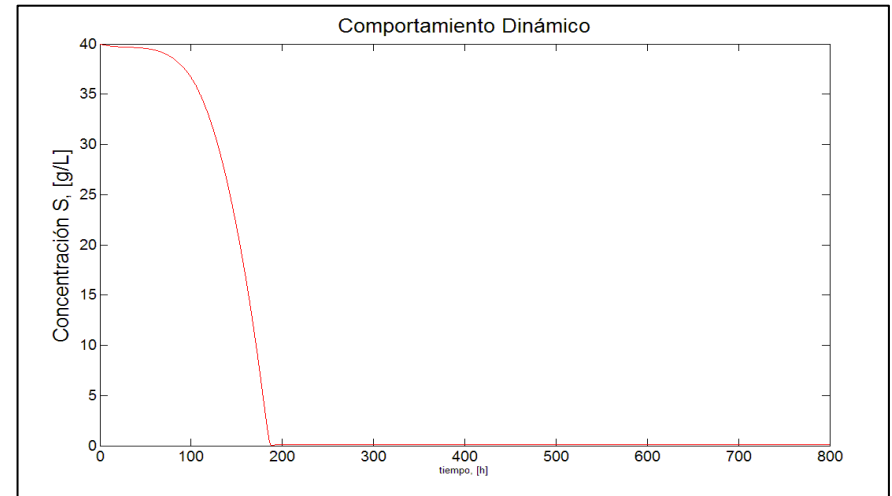
## ANEXO E Diagramas dinámicos modelos cinéticos.

Las concentraciones en estado estacionario de cada una de las variables se determinaron por medio del software MATLAB®. Para el caso de estudio se desarrolló una rutina de cálculo que permite la solución simultánea de las ecuaciones diferenciales para cada modelo, solucionando los balances en estado no estacionario del biorreactor que opera en continuo y al mismo tiempo, permite obtener las gráficas del comportamiento dinámico del sistema que reflejan el comportamiento de éste hasta alcanzar un estado estacionario. A continuación en la figura 5 y 6 se muestran las gráficas para el modelo cinético sin resina y con adición de ésta, respectivamente. Para la solución de las ecuaciones diferenciales se empleó un tiempo de 800 horas para garantizar la obtención de valores de estado estacionario para cada una de las variables. En los resultados se observa que para un tiempo mayor de aproximadamente 300 horas el sistema alcanza un estado estacionario con valores invariantes.

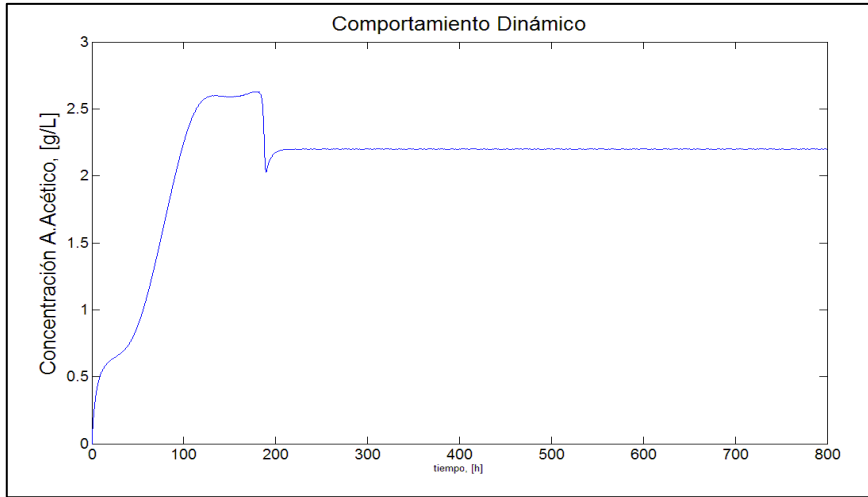
Modelo cinético sin resina



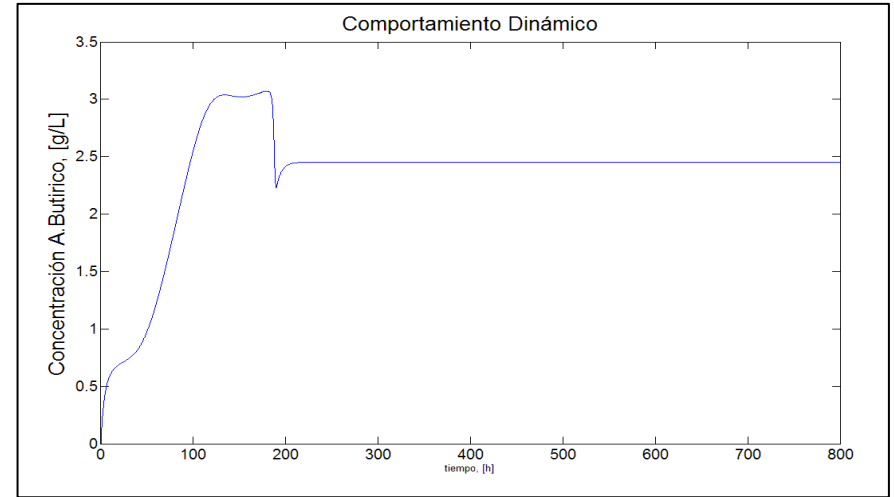
(a)



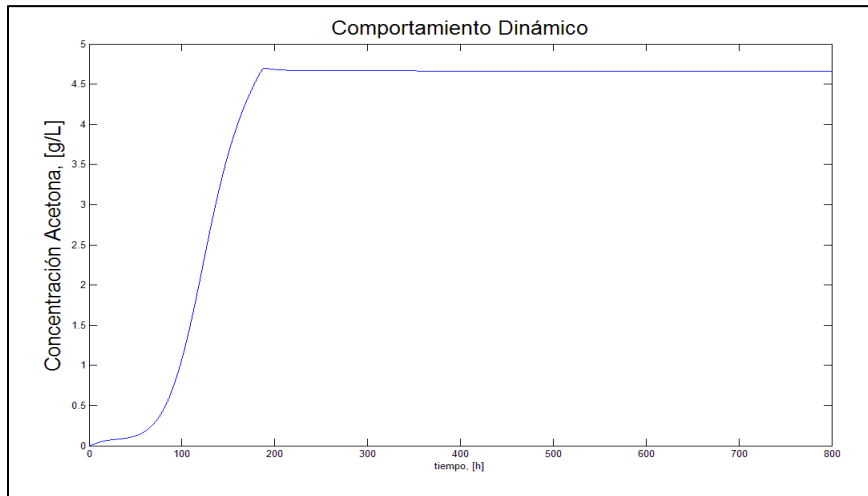
(b)



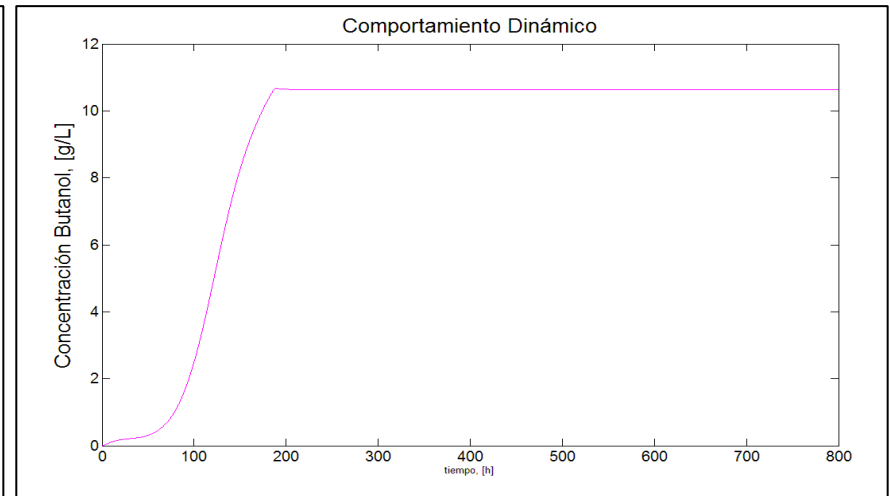
(c)



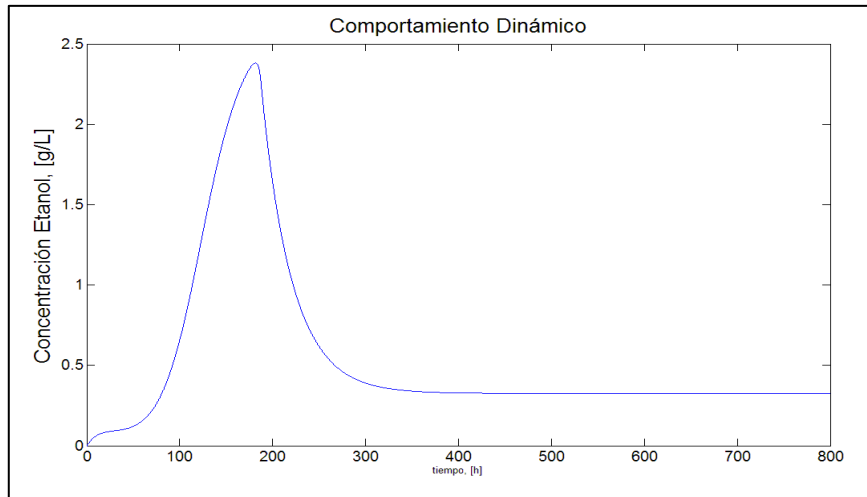
(d)



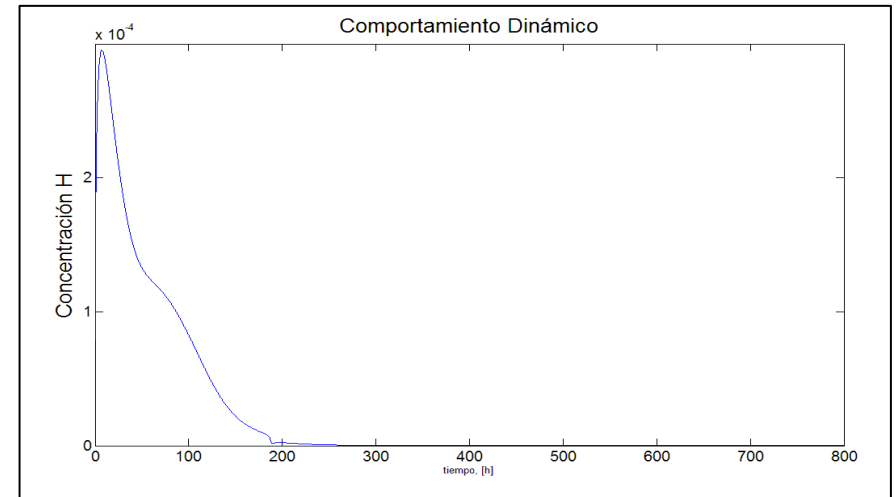
(e)



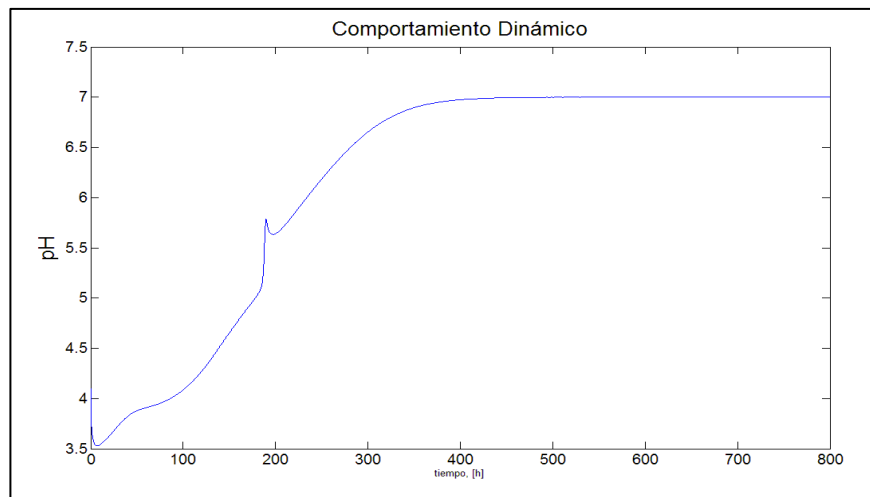
(f)



(g)



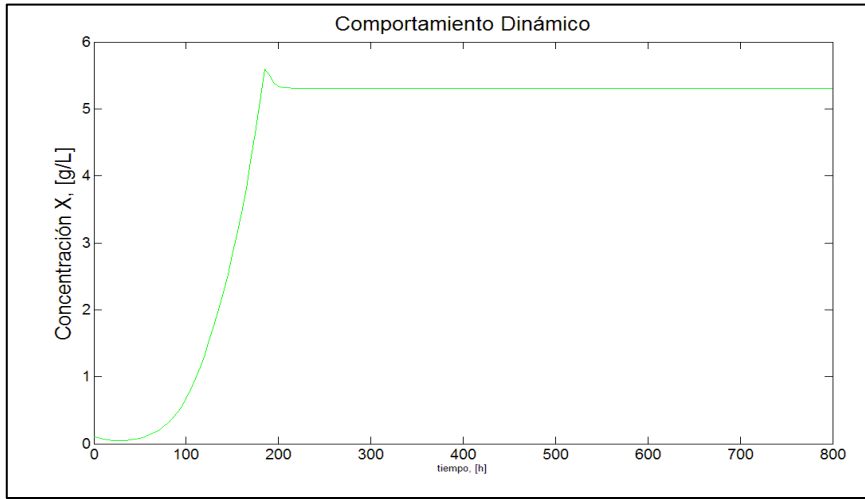
(h)



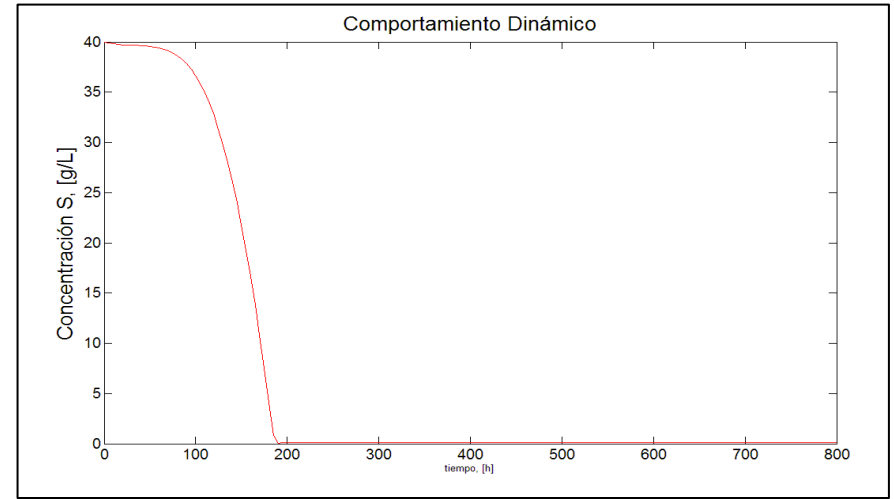
(i)

Figura 5. Diagramas dinámicos del modelo sin adición de resina. (a) Concentración de Biomasa, (b) concentración de sustrato, (c) concentración ácido acético, (d) concentración ácido butírico, (e) concentración acetona, (f) concentración butanol, (g) concentración etanol, (h) concentración iones H, (i) pH.

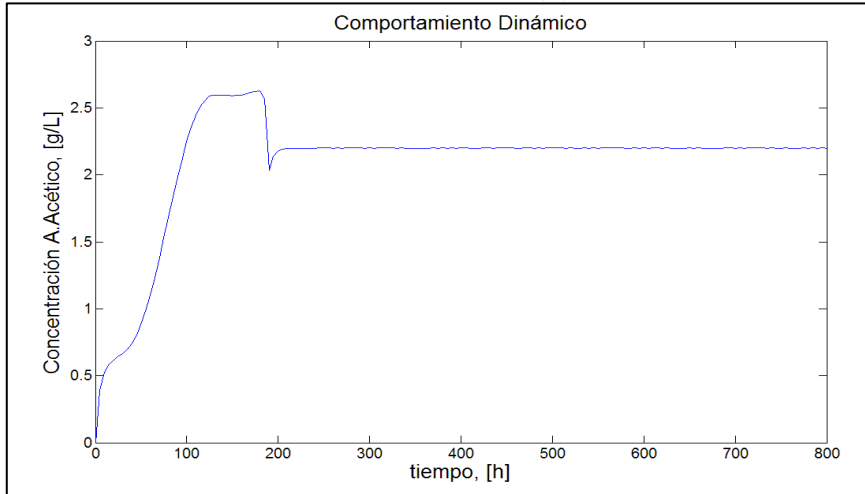
### Modelo cinético con adición de resina PVP



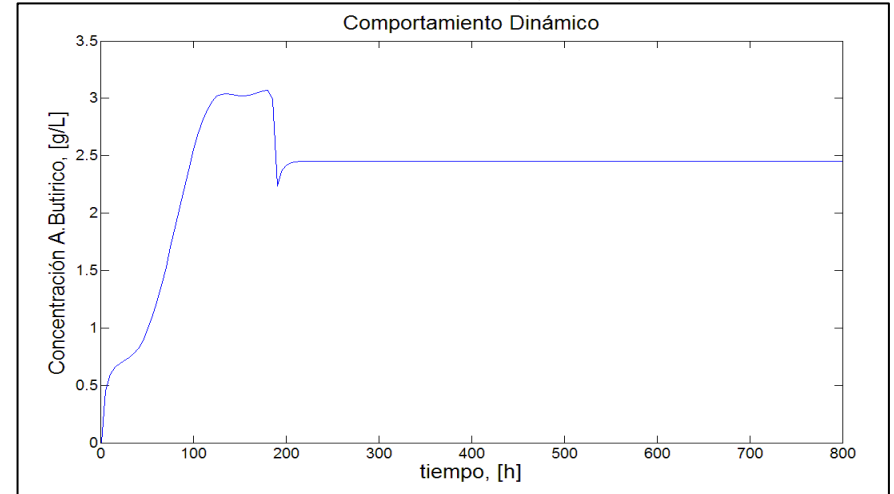
(a)



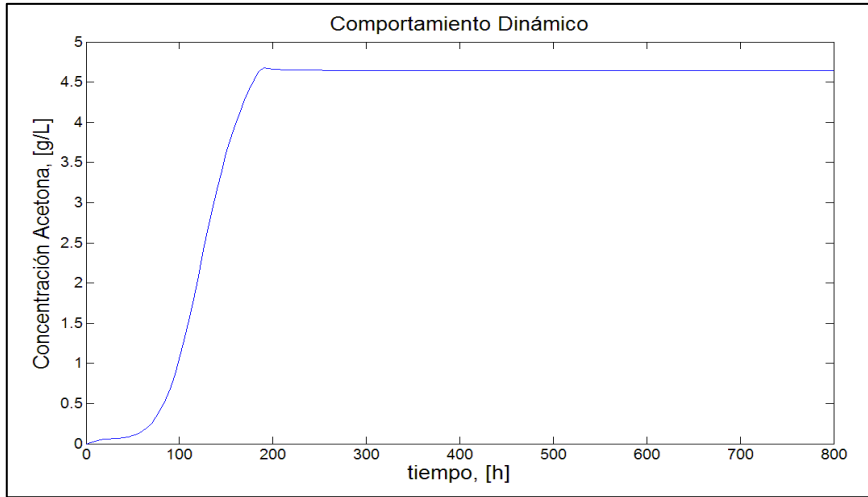
(b)



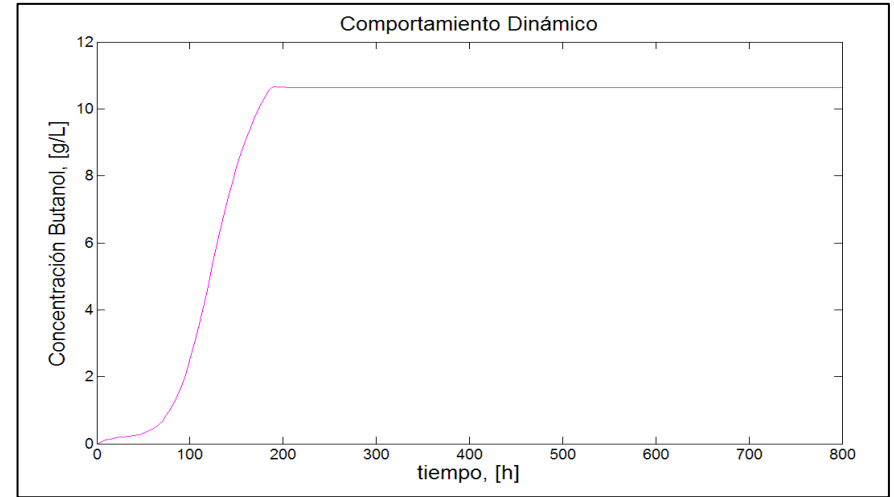
(c)



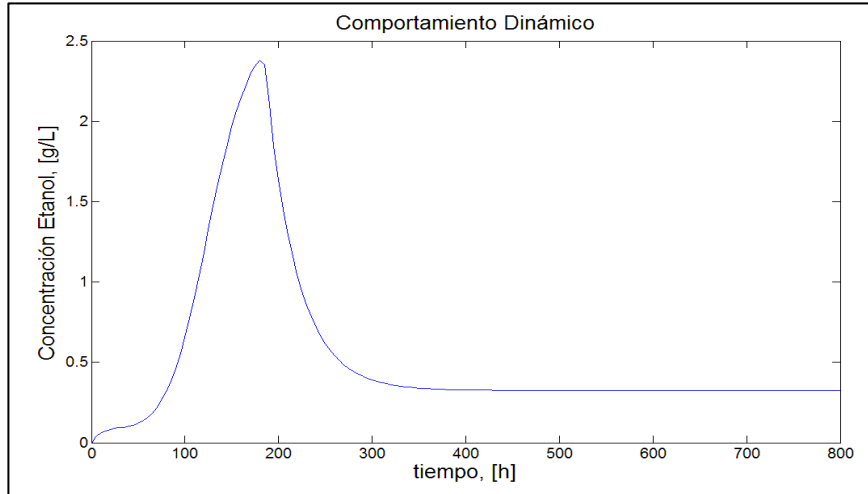
(d)



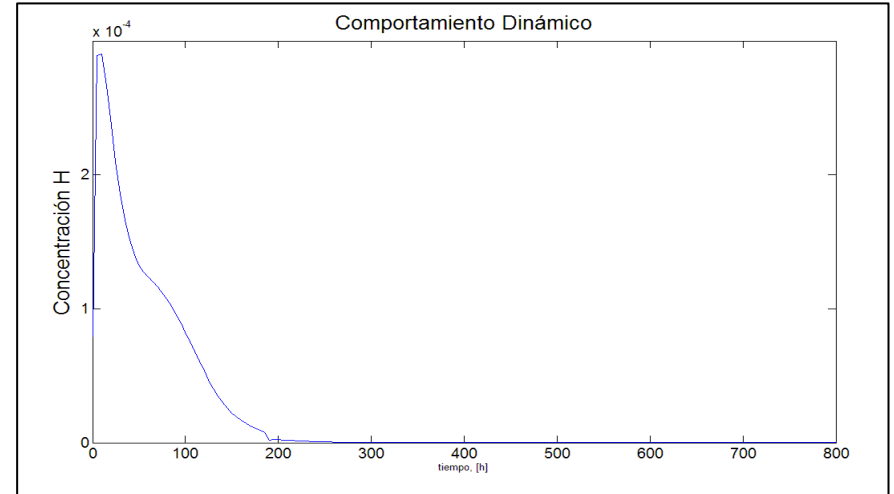
(e)



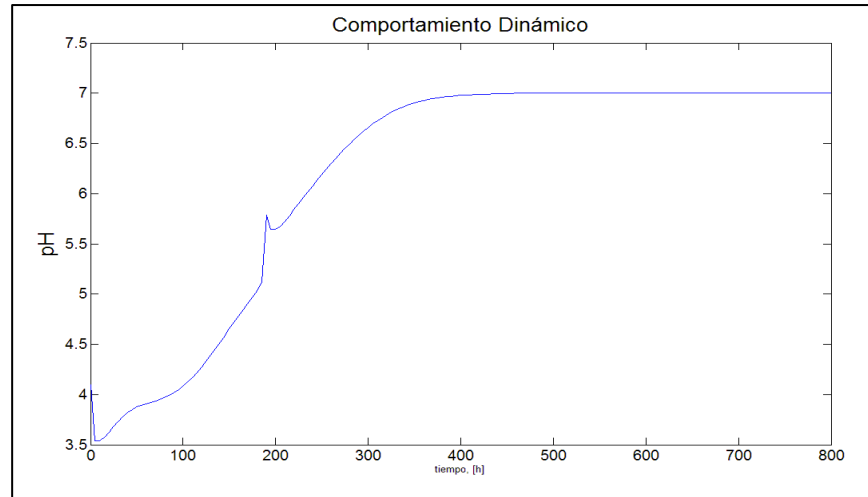
(f)



(g)



(h)



(i)

**Figura 6.** Diagramas dinámicos del modelo con adición de resina. (a) Concentración de Biomasa, (b) concentración de sustrato, (c) concentración ácido acético, (d) concentración ácido butírico, (e) concentración acetona, (f) concentración butanol, (g) concentración etanol, (h) concentración iones H, (i) pH.

**ANEXO F.** Resultados análisis de estabilidad: Valores variables, eigenvalores y diagramas de bifurcación modelo cinético Yang, Tsao.

En el presente anexo, se registra de una forma más detallada los resultados obtenidos mediante el análisis de estabilidad realizado a los modelos cinéticos en estudio. Primero, en la tabla 9 y 10 se presentan todos los puntos de bifurcación obtenidos en los diagramas de bifurcación, con los valores de cada una de las variables evaluadas en éstos. Además, se muestran los valores de los 8 eigenvalores obtenidos de la evaluación de la matriz Jacobiana divididos en sus dos partes: la real y la imaginaria. Así pues, las características de las partes reales confirman la estabilidad o inestabilidad, de los puntos de bifurcación y regiones evaluadas.

**Tabla 9.** Valores de eigenvalores y variables en los puntos de bifurcación modelo cinético sin resina.

Modelo Cinético sin resina					
Puntos Bifurcación/ Variables	Parámetro Bifurcación D			Parámetro Bifurcación Sf	
	BP	HP	BP	NS	BP
D	8,94E-18	0,28543307	0,57086614	0,03	0,03
F	[Redacted]				
Sf	40	40	40	0,07384616	0,034909091
X	2,78E-15	0	0	0	-1,69E-103
S	-2,70E-05	40	40	0,07384616	0,034909091
Caa	1,6982938	0	0	0	-1,23E-101
Cba	1,7977589	0	0	0	-1,56E-101
Ca	10,796407	0	0	0	-1,10E-105
Cb	4,7069377	0	0	0	-1,10E-105
Ce	0,044726456	0	0	0	-4,68E-97
H	1,00E-07	1,00E-07	1,00E-07	1,00E-07	1,00E-07
pH	7,000029581	7	7	7	7
Eigenvalores					
Re (1)	-1,18E-05	-0,285433	-0,570866	-0,03	-0,03
Re (2)	-1,97E-11	-0,285433	-0,570866	-0,03	-0,03
Re (3)	-6,70E-16	-0,285433	-0,570866	-0,03	-0,03
Re (4)	-6,84E-17	-0,285433	-0,570866	-0,03	-0,03
Re (5)	-8,94E-18	-0,285433	-0,570866	-0,03	-0,03
Re (6)	-8,94E-19	-0,285433	-0,570866	-0,03	-0,03
Re (7)	-4,53E-18	-0,285433	-0,570866	-0,03	-0,03
Re (8)	0	0,285433	0	0,03	5,29E-18
Im (1)	0	0	0	0	0
Im (2)	0	0	0	0	0
Im (3)	0	0	0	0	0
Im (4)	0	0	0	0	2,51E-146
Im (5)	0	0	0	0	3,79E-148
Im (6)	0	0	0	0	-6,81E-109
Im (7)	0	0	0	0	0
Im (8)	0	0	0	0	0

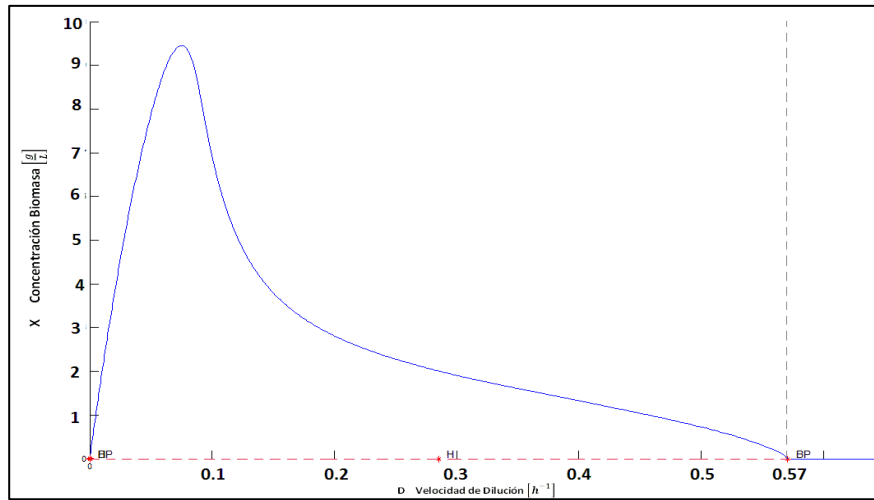
Fuente: Autores

**Tabla 10.** Valores de eigenvalores y variables en los puntos de bifurcación modelo cinético con resina.

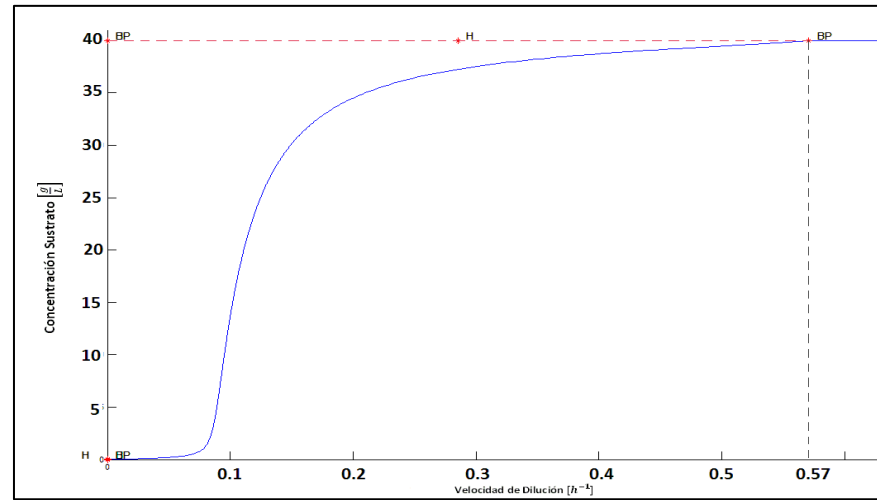
Modelo Cinético con PVP					
Puntos Bifurcación/ Variables	Parámetro Bifurcación F			Parámetro Bifurcación Sf	
	BPS	NS	NS	BPS	BPS
D					
F	1,141733	8,24E-05	8,27E-05	0,06	0,06
Sf	40	40	40	0,073823474	0,0349091
X	-0,007084	0,008494063	0,007648609	0	-6,40E-82
S	40,001879	0,001709484	0,10942523	0,079823474	0,034909091
Caa	-0,039644193	1,7201036	1,718449	0	-4,66E-80
Cba	-0,054041899	1,8827929	1,8877775	0	-5,92E-80
Ca	-0,001360834	-50,491141	-49,980575	-0,027618108	-2,79E-02
Cb	0,000355226	15,211235	15,429208	0	-4,16E-84
Ce	-0,000949005	-0,010935235	-0,59405667	0	-8,73E-82
H	1,00E-07	4,60E-08	3,22E-08	1,00E-07	1,00E-07
pH	6,999994658	7,336869326	7,491752604	7	7
Eigenvalores	Eigenvalores				
Re (1)	-0,570921	-0,00202196	-0,00263396	-0,03	-0,03
Re (2)	-0,570856	-0,00186074	-0,00177585	-0,0299891	-0,0299891
Re (3)	-0,570844	-0,00102346	-0,00135055	-0,029988	-0,029988
Re (4)	-0,570839	-0,00102346	-0,00135055	-0,0299835	-0,0299835
Re (5)	-0,570639	-0,000209524	-9,23E-05	-0,0299774	-0,0299774
Re (6)	-0,557416	-9,23E-05	-2,47E-05	-0,0299426	-0,029958
Re (7)	-0,548396	-2,43E-05	2,47E-05	0,0299835	-0,0299426
Re (8)	3,95E-07	2,43E-05	1,66E-03	0,00E+00	5,29E-18
Im (1)	-0,000107589	0	0	0	-6,79E-71
Im (2)	-0,000107589	0	0	0	3,40E-18
Im (3)	-0,000107589	0,00622233	0,000230468	0	2,54E-71
Im (4)	-0,000107589	-0,00622233	-0,000230468	0	-1,81E-18
Im (5)	-0,00010755	0	0	0	2,47E-31
Im (6)	-0,000170687	0	0	0	7,06E-20
Im (7)	-0,00010516	0	0	0	1,74E-18
Im (8)	0,000164407	0	0	0	0

Fuente: Autores

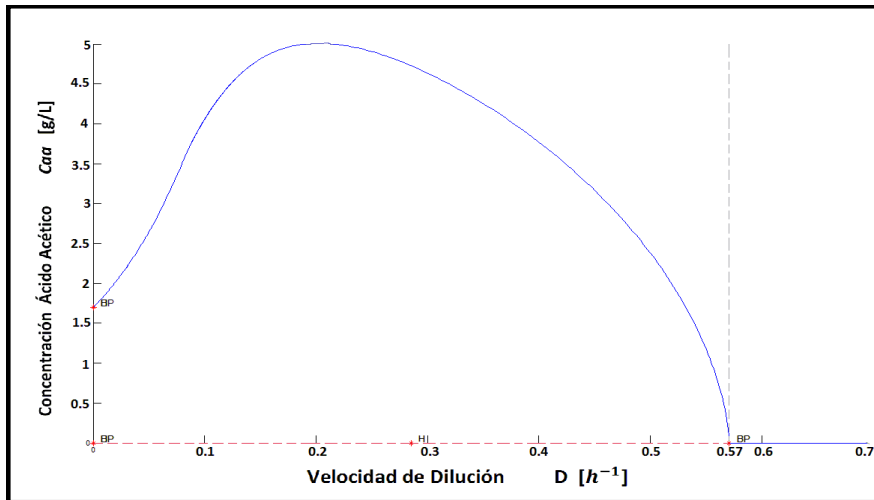
Segundo, en las figuras 7 a 10 se presentan todos los diagramas de bifurcación obtenidos para los modelos en estudio. Las figuras 7 y 8 corresponden al modelo cinético sin resina con los dos parámetros de bifurcación analizados, velocidad de dilución y concentración de sustrato en la alimentación, respectivamente. De igual forma, las figuras 9 y 10 corresponden al modelo cinético con adición de resina, dónde el flujo volumétrico de alimentación y concentración de sustrato de alimentación corresponden a los parámetros de bifurcación.



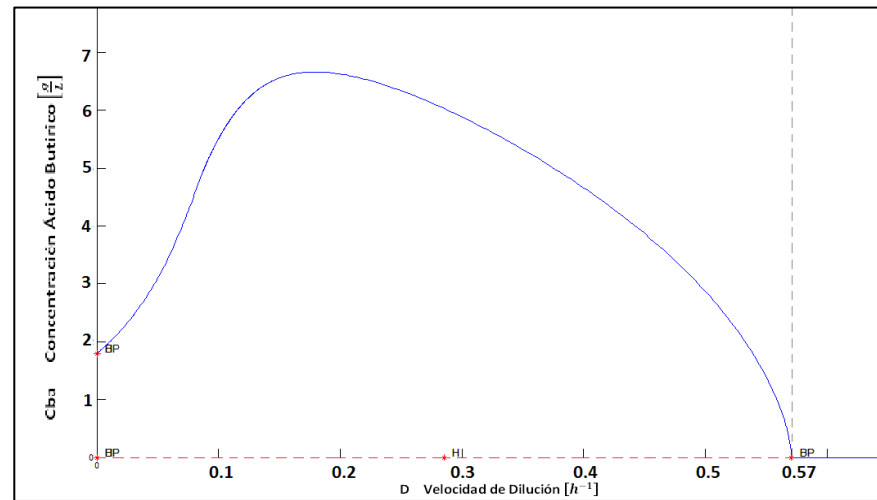
(a)



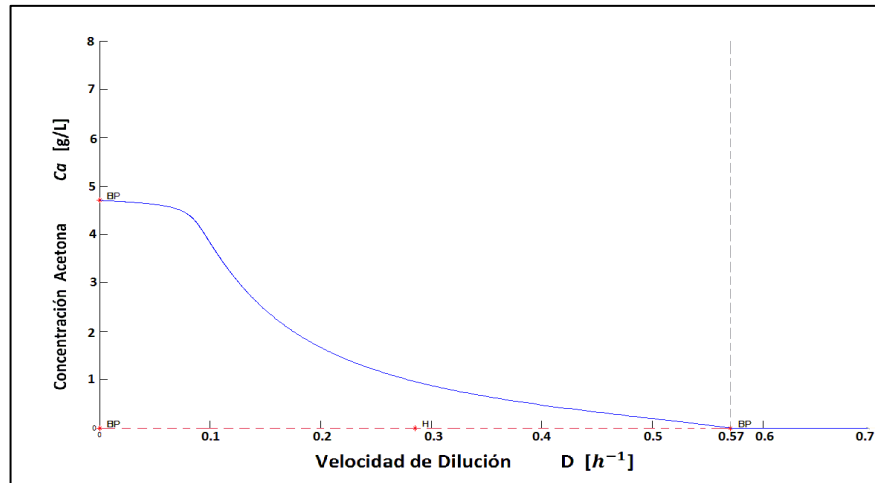
(b)



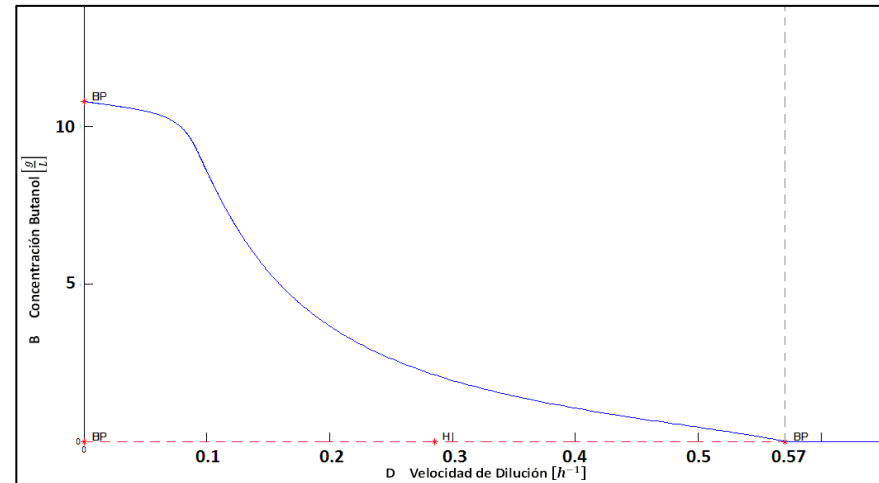
(c)



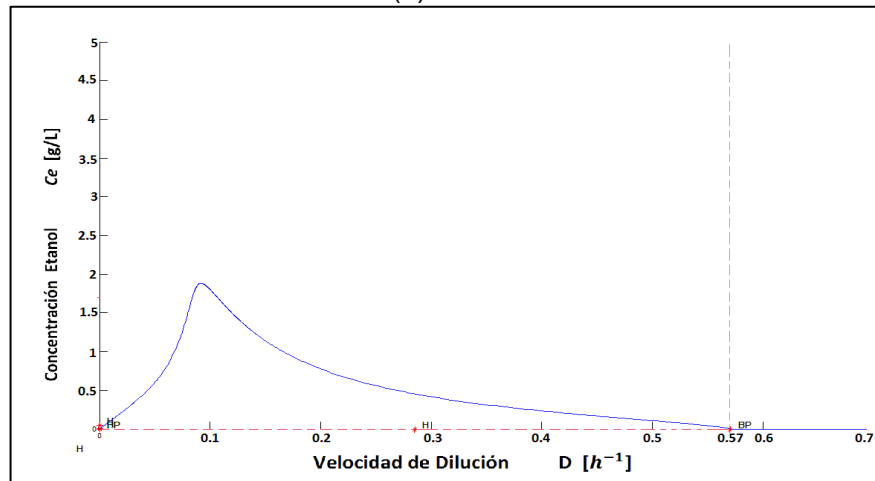
(d)



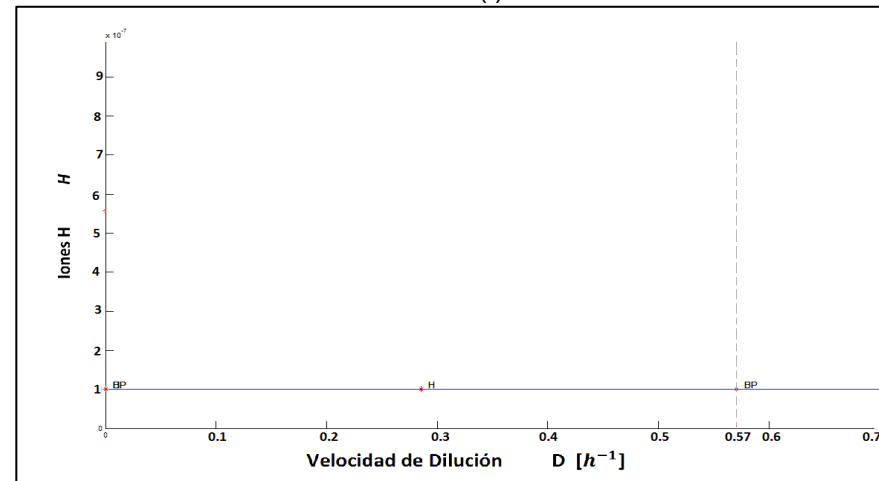
(e)



(f)

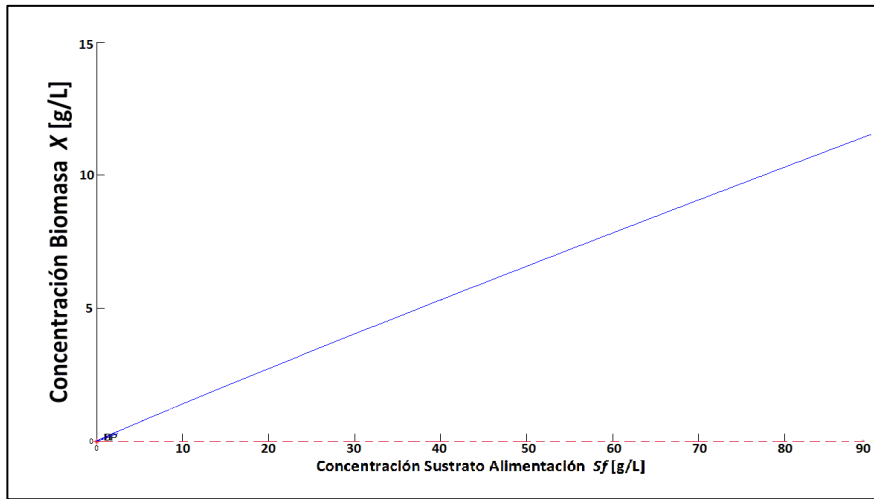


(g)

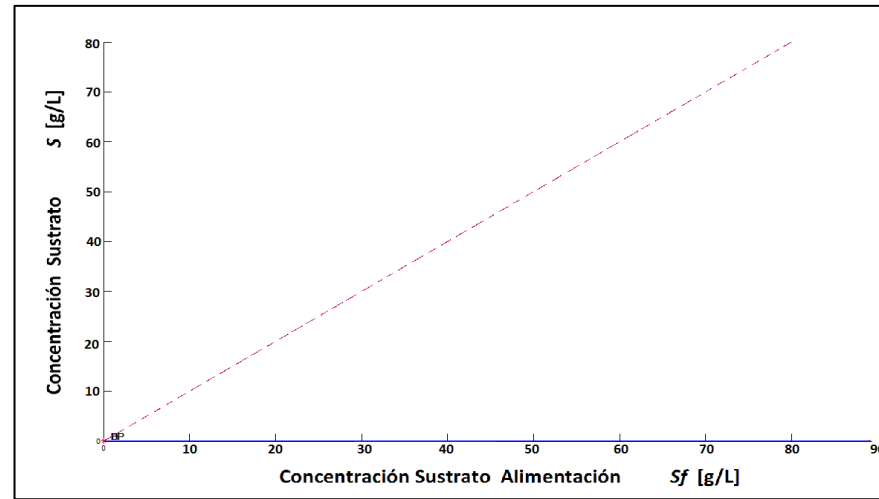


(h)

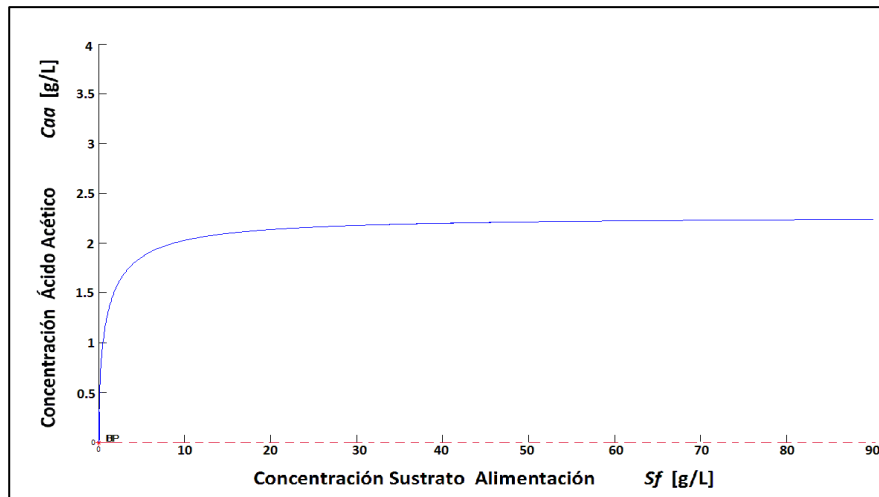
**Figura 7.** Diagramas de bifurcación modelo cinético sin resina, dilución como parámetro de bifurcación. (a) Concentración de biomasa, (b) concentración de sustrato, (c) concentración de ácido acético, (d) concentración de ácido butírico, (e) concentración de acetona, (f) concentración de butanol, (g) concentración de etanol, (e) iones H.



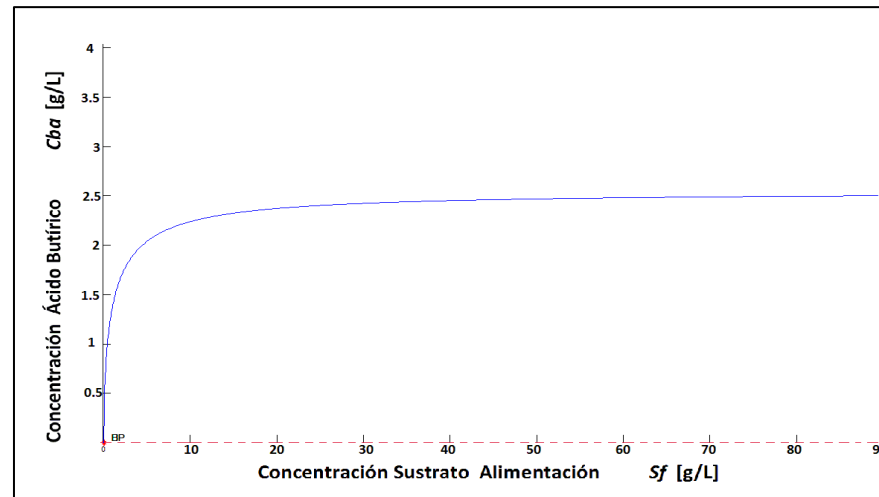
(a)



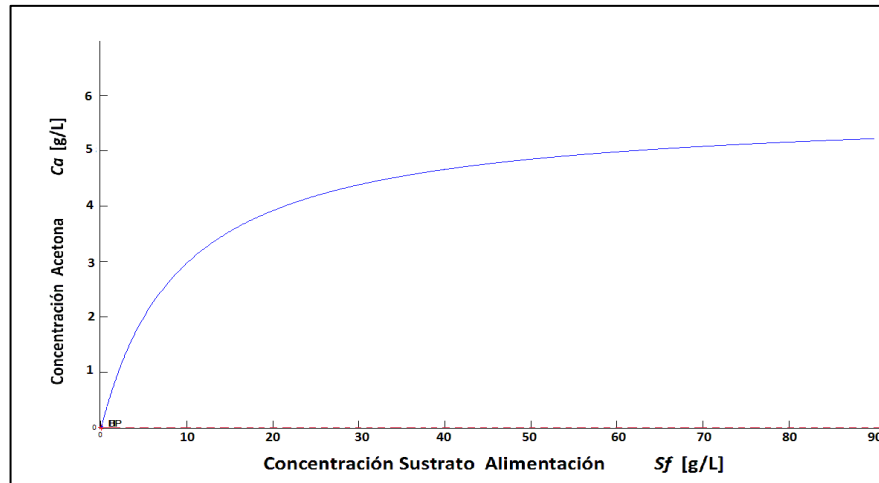
(b)



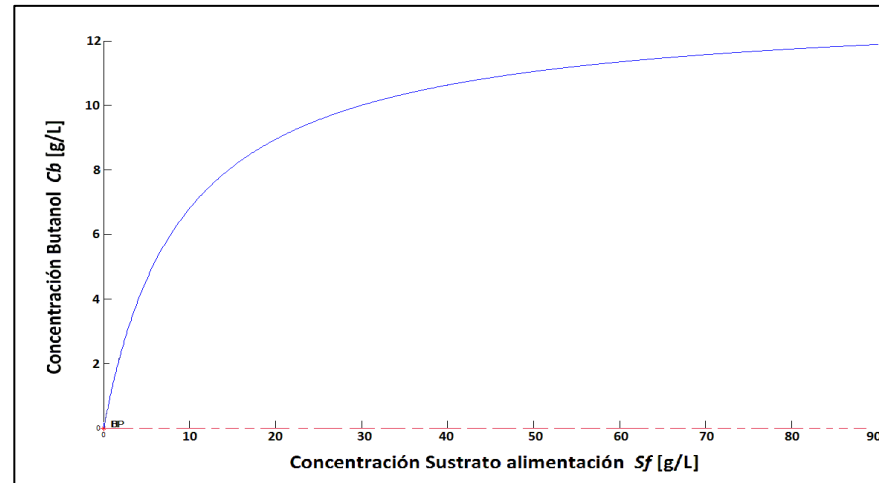
(c)



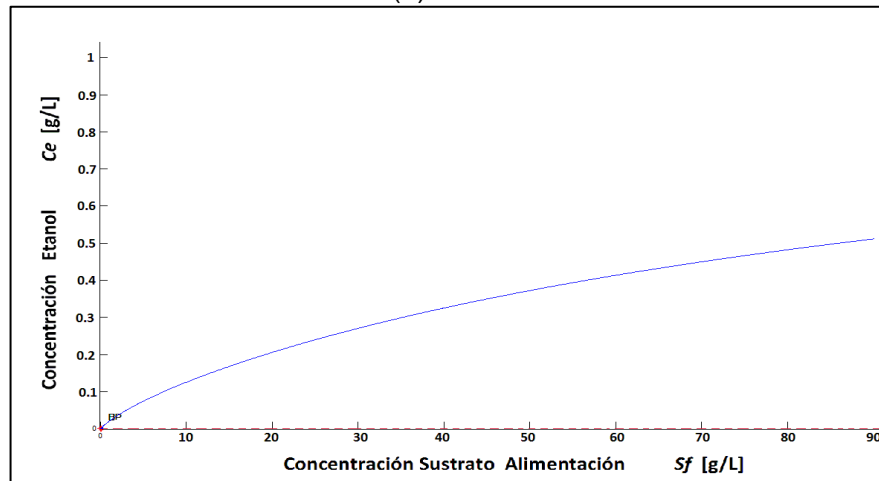
(d)



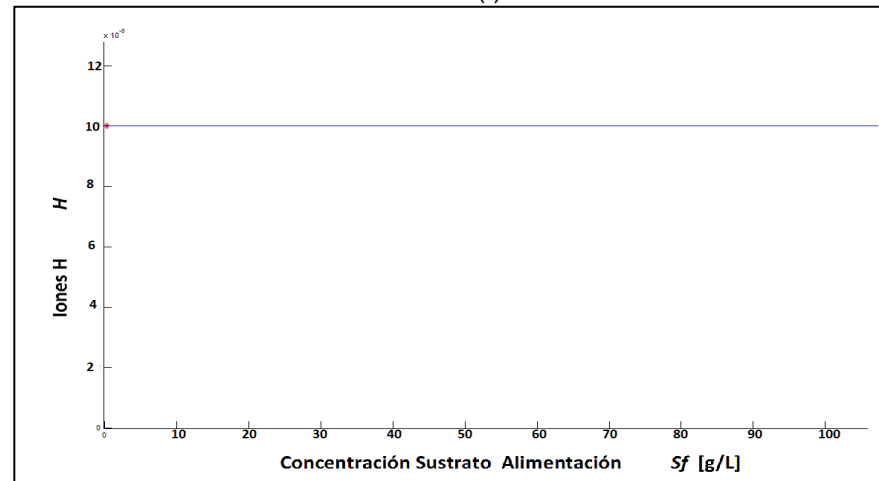
(e)



(f)

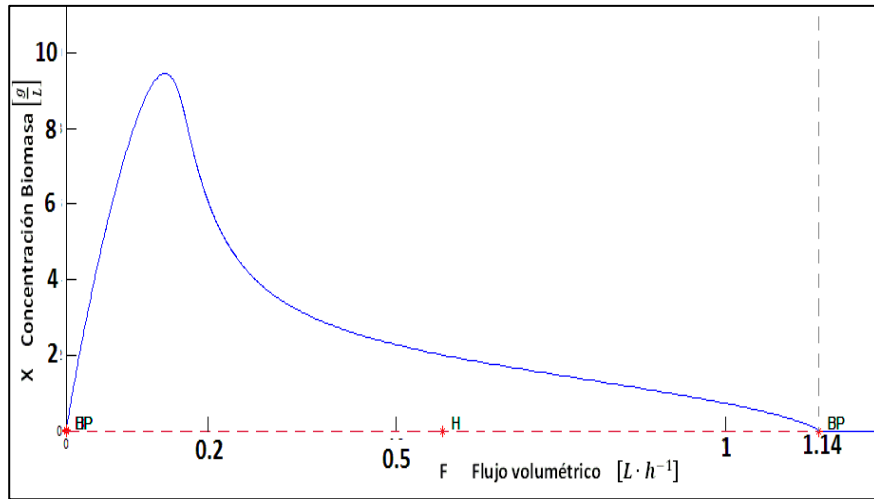


(g)

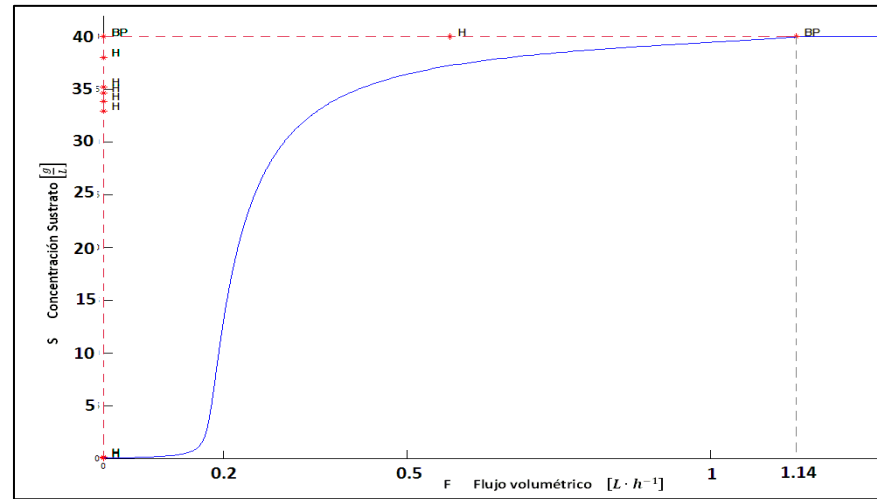


(h)

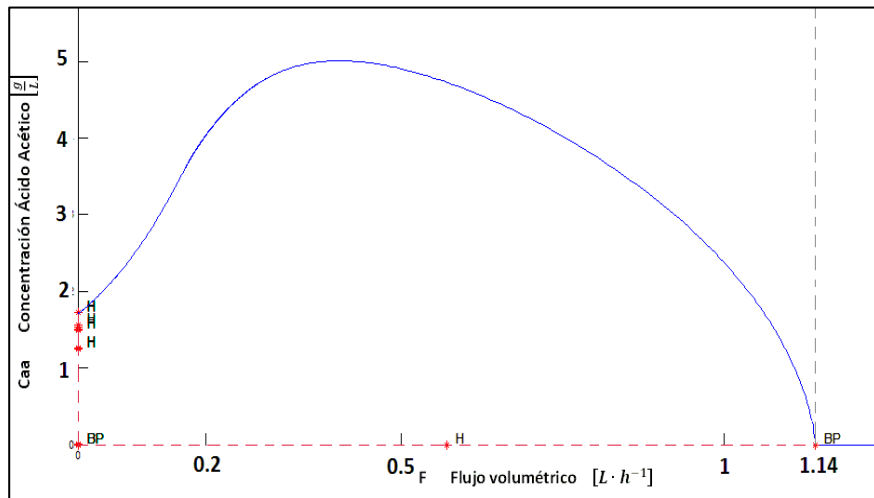
**Figura 8.** Diagramas de bifurcación modelo cinético sin resina, Sustrato alimentación como parámetro de bifurcación. (a) Concentración de biomasa, (b) concentración de sustrato, (c) concentración de ácido acético, (d) concentración de ácido butírico, (e) concentración de acetona, (f) concentración de butanol, (g) concentración de etanol, (e) iones H.



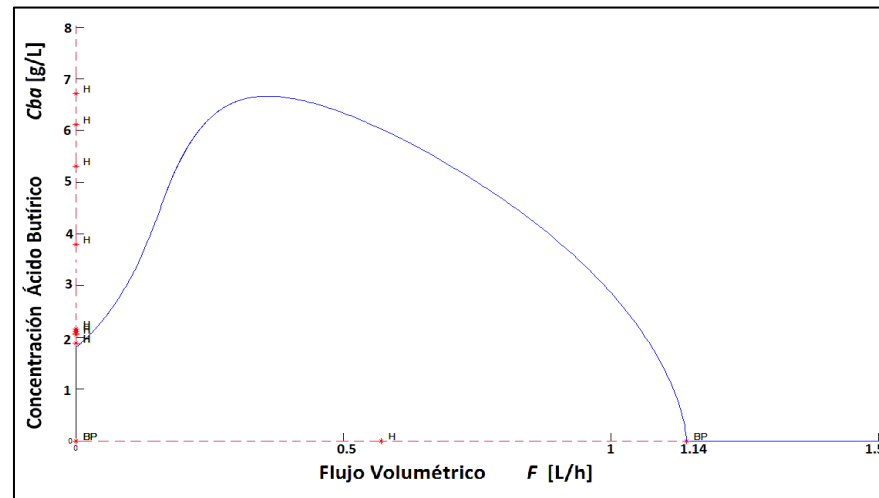
(a)



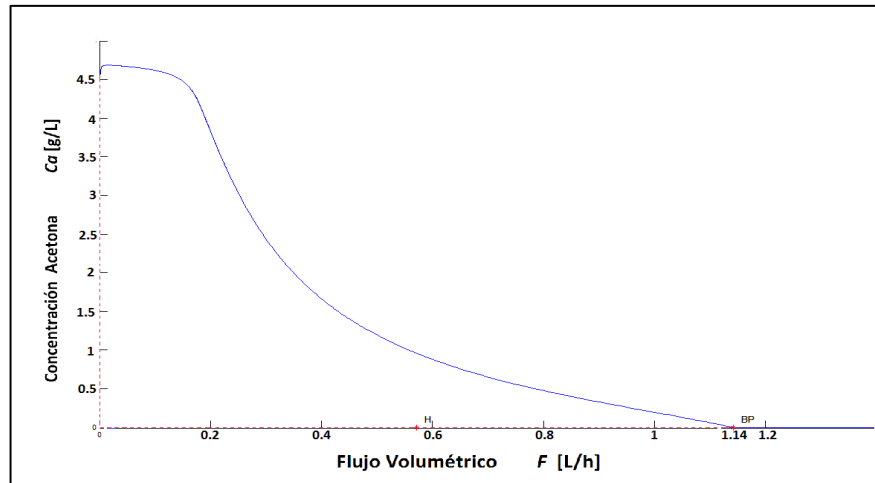
(b)



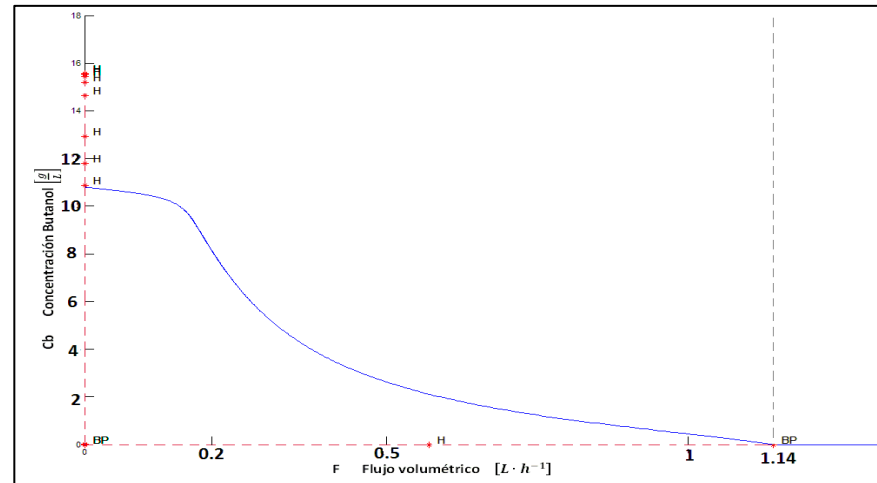
(c)



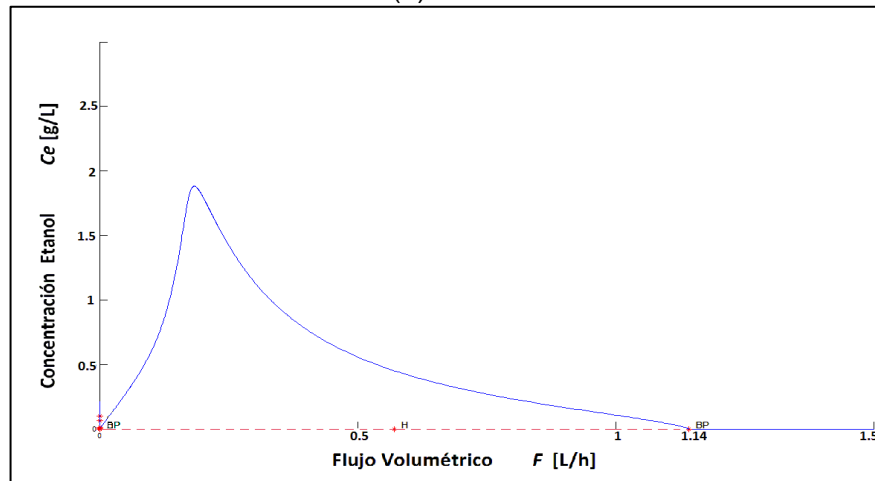
(d)



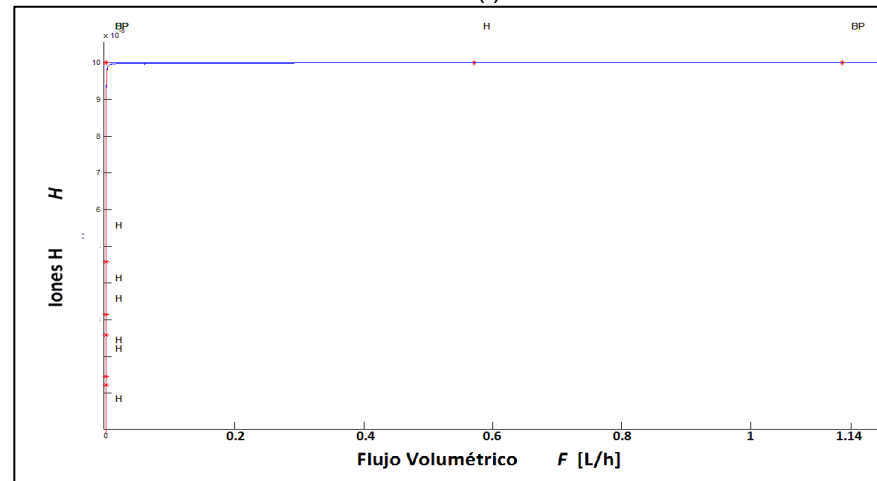
(e)



(f)

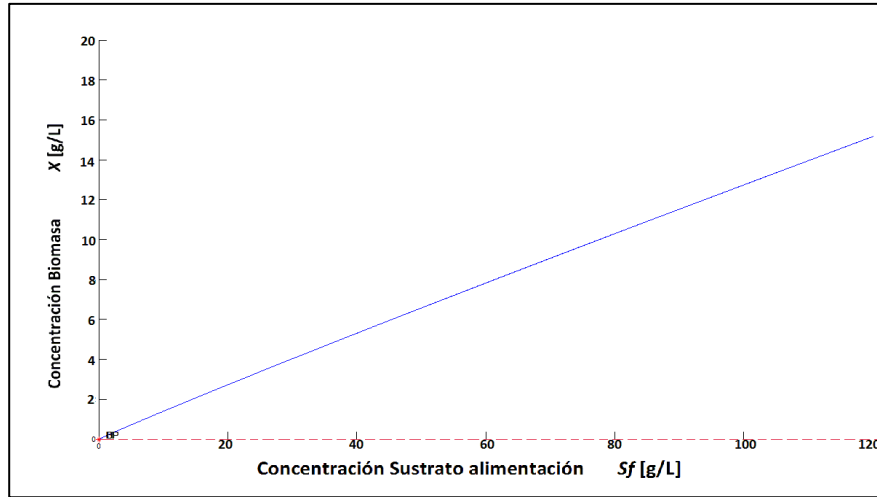


(g)

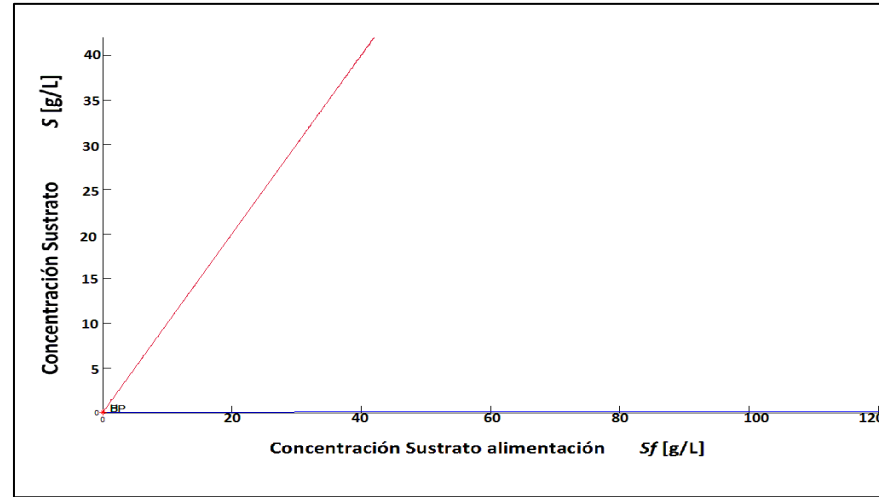


(h)

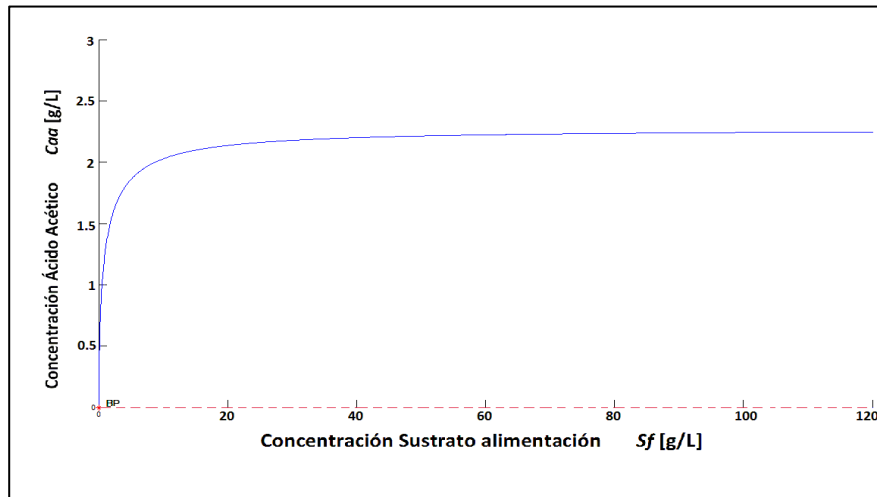
**Figura 9.** Diagramas de bifurcación modelo cinético con resina, Flujo volumétrico alimentación como parámetro de bifurcación. (a)Concentración de biomasa, (b)concentración de sustrato, (c)concentración de ácido acético, (d)concentración de ácido butírico, (e)concentración de acetona, (f) concentración de butanol, (g) concentración de etanol, (e)iones H.



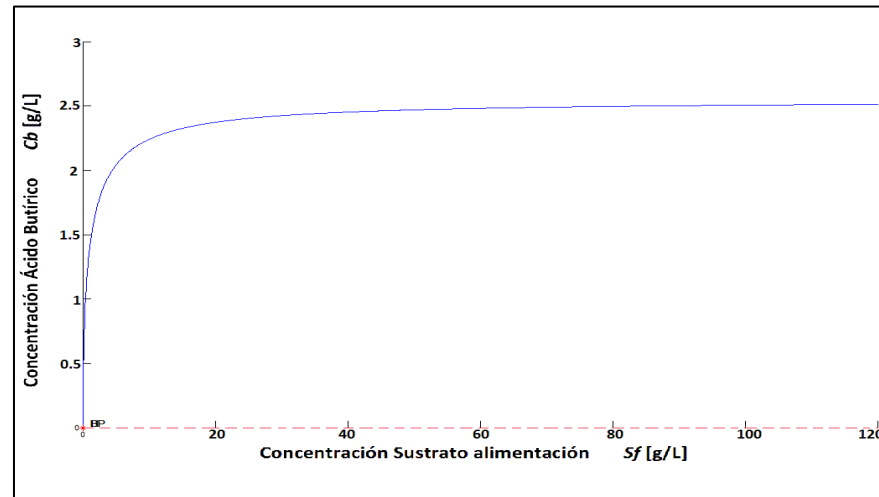
(a)



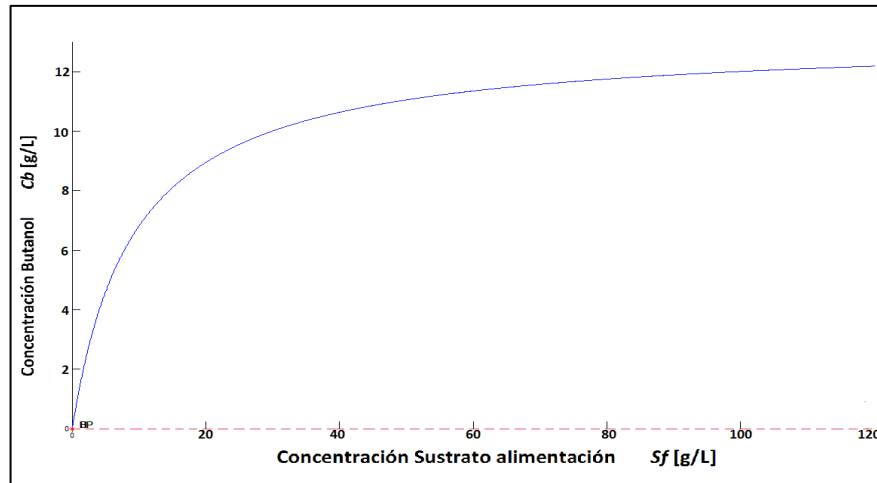
(b)



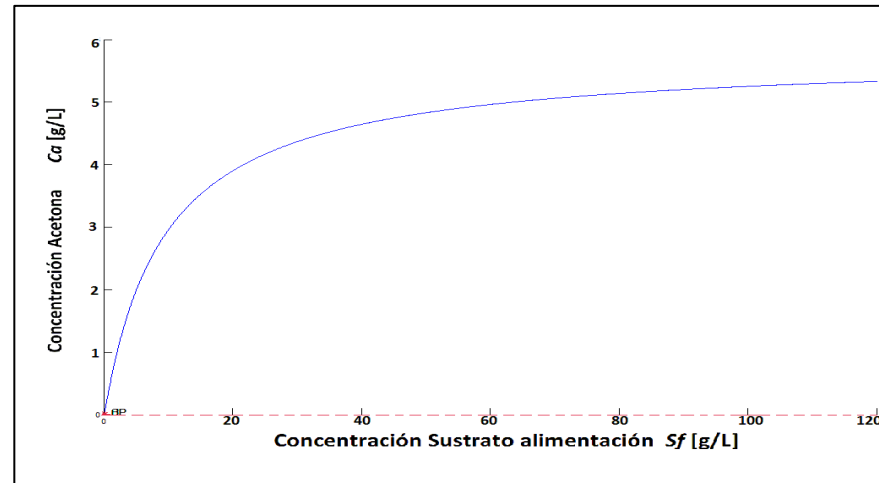
(c)



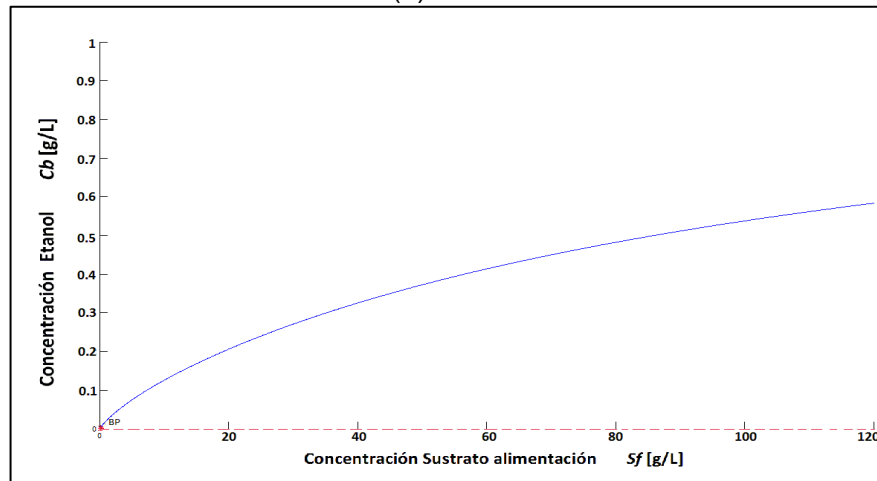
(d)



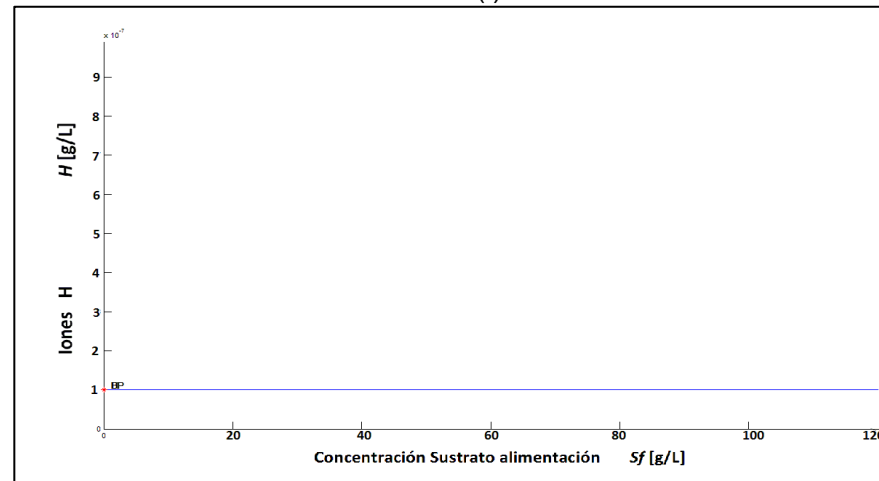
(e)



(f)



(g)



(h)

**Figura 10.** Diagramas de bifurcación modelo cinético con resina, Concentración sustrato alimentación como parámetro de bifurcación. (a)Concentración de biomasa, (b)concentración de sustrato, (c)concentración de ácido acético, (d)concentración de ácido butírico, (e)concentración de acetona, (f) concentración de butanol, (g) concentración de etanol, (e)iones H.

## ANEXO G. RESINA PVP (Polivinilpiridina)

Un polivinilo de piridina reticulado (PVP) se utilizó como un adsorbente por Yang, Tsao en el desarrollo experimental. Las propiedades típicas de la resina de PVP se enumeran en la tabla 11.

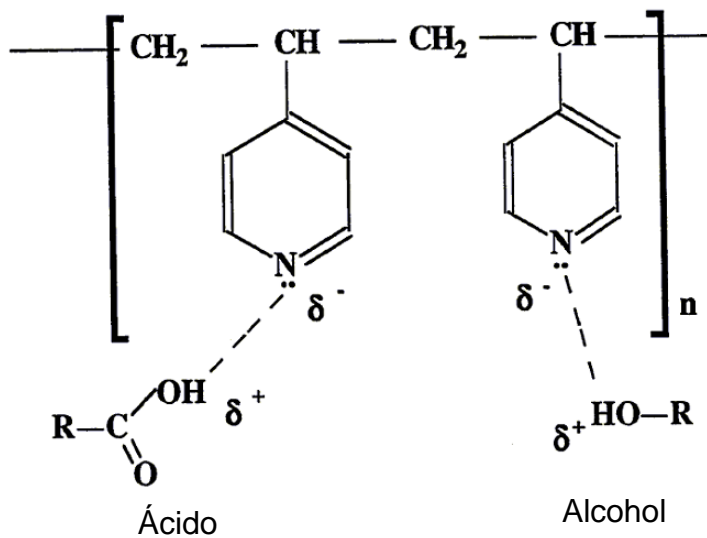
**Tabla 11.** Propiedades de la resina Polivinilpiridina (PVP).

Marca	Reillex425
Tamaño partícula	Malla 18-50
Densidad [g/cm <sup>3</sup> ]	0,29
Densidad esquelética [g/cm <sup>3</sup> ]	1,14
Densidad partícula [g/cm <sup>3</sup> ]	0,6
Área de superficie [m <sup>2</sup> /g]	ca. 90
Humedad retenida en filtración [%wt]	50-60
pKa aproximado	3 a 4
Capacidad de iones de hidrógeno en el agua [meg/g]	5,5
Adsorción de la base libre en forma de clorhidrato en agua	52%
Adsorción de estado a estado seco solvente saturado	
Metanol	28-32%
Acetona	32-36%
Agua	12-16%
Isopropanol	28-32%
Tolueno	18-22%
Acetato de Etilo	32-36%
Hexano	12-16%

Fuente: Yang X, Tsao G. Adaptado de: Yang X, Tsao George. A novel extractive fermentation for the production of Acetone-butanol by *Clostridium Acetobutylicum* <sup>[12]</sup>.

Es insoluble en la mayoría de los disolventes y tiene buena estabilidad de la temperatura hasta 260 ° C. Es fácilmente recuperable y duradera. El PVP es un muy buen adsorbente para ácidos y algunos solventes. Pero no se adsorbe la glucosa, lo que hace que el uso como adsorbente en el sistema de fermentación sea conveniente. Mejora el crecimiento del microorganismo *C. acetobutylicum* debido a que proporciona mayor superficie para esto. En el caldo de fermentación acetona-butanol, la resina PVP adsorbe una relación de 1 [L / kg de resina] y así un kilogramo de resina posee un litro de líquido en la fase de retención. El mecanismo de la adsorción de ácidos y solventes por la

PVP no se conoce. Sin embargo, se cree que el grupo piridilo del polímero absorbe un protón para formar un anión complejo de carbonilo como el contraión asociado. Una representación esquemática del mecanismo se muestra en la figura 11.



**Figura 11.** Representación esquemática del posible mecanismo de adsorción de la resina PVP.