

**ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN ABE
EMPLEANDO CLOSTRIDIUM SACCHAROPERBUTYLACETONICUM N1-4
ATCC13564 A PARTIR DEL APROVECHAMIENTO DE LA LACTOSA
PROVENIENTE DE LACTOSUERO**

LUIS EDUARDO ORTIZ BOHÓRQUEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

**ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN ABE
EMPLEANDO CLOSTRIDIUM SACCHAROPERBUTYLACETONICUM N1-4
ATCC13564 A PARTIR DEL APROVECHAMIENTO DE LA LACTOSA
PROVENIENTE DE LACTOSUERO**

LUIS EDUARDO ORTIZ BOHÓRQUEZ

**Trabajo de grado para optar por el título de
Ingeniero Químico**

**Director del Proyecto
LUIS JAVIER LÓPEZ GIRALDO
Ingeniero Químico, Ph.D**

**Codirectora del proyecto
Laura Johana Castellanos Suarez
Ingeniera Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUIMICA
BUCARAMANGA**

2014

DEDICATORIA

*“Tú tienes Señor, la llave de cada mirada que brota,
El tamaño de todos los proyectos y esperanzas;
Eres la puerta que dispone las entradas y salidas,
El marco en que se encierran,
Las luces y las sombras que componen nuestra vida.”*

(San Agustín)

Dedico esta investigación a Dios, por haberme permitido cumplir mis objetivos y otorgarme salud y bienestar diario.

A mis padres, promotores de mi crecimiento personal a través de la enseñanza de continuos principios y valores.

A mis familiares, por creer en mis capacidades intelectuales y entregarme su permanente sabiduría y humildad.

A mis maestros, por transmitir su amplio conocimiento y fundamentar mi perfil profesional.

A mis amigos, por la sinceridad de sus consejos y los momentos alegres vividos.

A la Universidad Industrial de Santander y la Escuela de Ingeniería Química por infundir su lema en mi “Construimos futuro”.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus más sinceros agradecimientos a:

Luis Javier López Giraldo, Director de mi tesis de investigación, por creer en mí y por su visión crítica en el análisis de procesos fermentativos ABE y aportes para el estudio de la dinámica de sistemas no estables.

Laura Castellanos Suarez, Codirectora de mi tesis de grado, por compartir sus conocimientos en Matlab y Matcont, con su constante asesoría en el análisis de estabilidad de este bioproceso.

Luis Gerónimo Matallana, Docente de Universidad de Medellín, por su aporte en conocimientos en la teoría de singularidad y Liapunov aplicables a una optimización profunda de modelos cinéticos.

TABLA DECONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	16
1.METODOLOGIA.....	22
1.1 Selección de condiciones de entrada e iniciales.....	23
1.2 Determinación de estados estacionarios.....	24
1.3 Eigenvalores y Diagramas de bifurcación.....	24
1.4 Determinación de regiones estables.....	26
2.RESULTADOS Y ANALISIS.....	27
2.1Selección de mejor condicion de entrada e inicial.....	27
2.2 Evaluación de estados estacionarios.....	27
2.3 Eigenvalores y Diagramas de bifurcación.....	28
2.4 Determinación de regiones estables.....	31
2.5 Analisis por regiones de estabilidad.....	34
3. CONCLUSIONES.....	36
4.RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFIA.....	38
ANEXOS.....	43

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Antecedentes generales de la fermentación continua ABE.....	17
Tabla 2. Valores iniciales de cada metabolito para determinación de parámetros cinéticos y validez en concentraciones iniciales de glucosa en 36,100, 70,600 ,122 y 295mM.....	23
Tabla 3. Posibles condiciones de partida para proceso de fermentación ABE por CS N1-4 con sustrato lactosa.....	23
Tabla 4. Bifurcaciones de estado estacionarios elementales.....	25
Tabla 5. Clasificación de estados estacionarios de acuerdo a sus eigenvalores.....	26
Tabla 6. Estabilidad para las condiciones iniciales y alimentación opcionales para proceso de fermentación ABE por CS N1-4 con sustrato lactosa.....	27
Tabla 7. Estados estacionarios del proceso de fermentación ABE por CS N1-4 con sustrato lactosa.....	28
Tabla 8 .Resumen de eigenvalores para el modelo propuesto para sistema de fermentación ABE por CS N1-4 con sustrato lactosa.....	29
Tabla 9. Clasificación de estados estacionarios y tipo de ramas por eigenvalores del sistema en estudio.....	31
Tabla 10. Ramas estables e inestables de acuerdo a la velocidad de dilución	32
Tabla 11. Distribución de las regiones de estabilidad para el parámetro velocidad de dilución determinadas para el sistema de fermentación ABE por CS N1-4 con sustrato lactosa.....	32
Tabla 12. Valores de parámetros cinéticos del modelo Shinto.....	46
Tabla 13. Pesos moleculares y formulas químicas de metabolitos en fermentación ABE.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig.1.Ruta metabólica de la CS N14 empleando lactosa como sustrato	19
Fig. 2. Metodología utilizada para análisis de estabilidad en fermentación continua con lactosa por CS N1-4.....	22
Fig.3 Diagramas de bifurcación para la concentración de metabolitos a)Lactosa b)Biomasa y c) Butanol con respecto a velocidad de dilución D.....	31
Fig.4. Regiones de estabilidad para diagramas de bifurcación con parámetro de velocidad de dilución para sistema de fermentación continua ABE.....	33
Fig.5.Vía metabólica Embden.-Meyerhof Parnas (EMP) para Clostridium con descripción de velocidades de reacción.....	45

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Determinación de R_j del modelo de Shinto (incluyendo inhibición por sustrato (glucosa) e inhibición por producto (Butanol)).....	43
Anexo B. Parámetros del modelo Shinto empleado en la descripción de fermentación ABE con CS N1-4.....	46
Anexo C. Conversiones de mol/L a g/L de cada metabolito.....	47
Anexo D. Comportamiento dinámico de metabolitos (a) Lactosa (b) Biomasa (c) Acetato (d) Etanol (e) Butirato (f) Butanol y (g) Acetona a $D=0,050h^{-1}$ y $L_f=147,500mM$	48
Anexo E: Diagramas de bifurcación para (a)Acetato (b)Acetona (c)Butirato (d) Etanol con parámetro de bifurcación (tasa de dilución) a $L_f=147,500mM$	52
Anexo F. Regiones de estabilidad para (a) Acetato y (b) Butirato con parámetro de bifurcación (tasa de dilución) a $L_f=147,500mM$	54

NOTACIÓN

Unidades de concentración

(mM)	Milimol de sustancia o metabolito por litro de volumen de solución.
(g/L)	Gramos de metabolito por L de volumen de fermentación
(% p/p)	Porcentaje en peso

Metabolitos y modelo propuesto

AACOA	Concentración de salida de Acetoacetil-CoA (mM)
AACOAF	Concentración de entrada de Acetoacetil-CoA (mM)
ACET	Concentración de salida de Acetoacetil-CoA (mM)
ACETf	Concentración de salida de Acetoacetil-CoA (mM)
ACETOA	Concentración de salida de Acetoacetato (mM)
ACETOAF	Concentración de entrada de Acetoacetato (mM)
A	Concentración de salida de Acetona (mM)
Af	Concentración de salida de Acetona (mM)
ACOA	Concentración de salida de Acetil-CoA (mM)
ACOAF	Concentración de entrada de Acetil-CoA (mM)
BCOA	Concentración de salida de Butiril-CoA (mM)
BCOAF	Concentración de entrada de Butiril-CoA (mM)
X	Concentración de salida de Biomasa (mM)
Xf	Concentración de entrada de Biomasa (mM)
B	Concentración de salida de Butanol (mM)
Bf	Concentración de entrada de Butanol (mM)

BUT	Concentración de salida de Butirato (mM)
BUTf	Concentración de entrada de Butirato (mM)
CO2	Concentración de salida de Dióxido de Carbono (mM)
CO2 f	Concentración de entrada de Dióxido de Carbono (mM)
D	Tasa de Dilución del fermentador (h^{-1})
E	Concentración de salida de Etanol (mM)
Ef	Concentración de entrada de Etanol (mM)
F6P	Concentración de salida de Frutosa6-fosfato (mM)
F6Pf	Concentración de entrada de Frutosa6-fosfato (mM)
G	Concentración de salida de Glucosa (mM)
Gf	Concentración de entrada de Glucosa (mM)
G3P	Concentración de salida de Gliceraldenido3-fosfato (mM)
G3Pf	Concentración de entrada de Gliceraldenido3-fosfato (mM)
LACT	Concentración de salida de Lactato (mM)
LACTf	Concentración de entrada de Lactato (mM)
L	Concentración de salida de Lactosa (mM)
Lf	Concentración de entrada de Lactosa (mM)
PIR	Concentración de salida de Piruvato (mM)
PIRf	Concentración de entrada de Piruvato (mM)
K_j	Constante de velocidad de cada reacción j (h^{-1})
K_{aj}, K_{bj}	Constantes de activación de cada reacción j (h^{-1})
K_{ijj}	Constante de inhibición para el inhibidor (mM)
K_{isj}	Constante de inhibición por sustrato (mM)

R_j	Ecuación de velocidad de cada reacción de ruta metabólica de Shinto
V_{maxj}	Velocidad máxima de cada reacción de ruta metabólica de Shinto (h^{-1})

Conversiones rendimientos y productividades

x_g	Conversión de glucosa
$Y_{B/X}$	Rendimiento de butanol por biomasa en reactor CSTR
$Y_{B/s}$	Rendimiento de butanol por sustrato en reactor CSTR.

Abreviaturas

CS N1-4	Clostridium Saccharoperbutylaceticum N1-4 ATCC 13564
Dc	Tasa de dilución crítica
Dopt	Tasa de dilución óptima
EDOs	Ecuaciones Diferenciales Ordinarias
EE	Estados estacionarios
EMP	Ruta Embden.-Meyerhof Parnas
p	Parámetro
Sln	Solución
x	Variable

Subíndices

j	Número correspondiente a cada reacción 1 a 19 de la ruta Shinto
----------	---

RESUMEN

TITULO: ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN ABE EMPLEANDO CLOSTRIDIUM SACCHAROPERBUTYLACETONICUM N1-4 ATCC 13564 A PARTIR DEL APROVECHAMIENTO DE LA LACTOSA PROVENIENTE DE LACTOSUERO*

AUTOR:LUIS EDUARDO ORTIZ BOHÓRQUEZ**

PALABRAS CLAVE: Butanol, velocidad de dilución, análisis de estabilidad, estados estacionarios, diagramas de bifurcación.

DESCRIPCION

En este trabajo se realizó el análisis de estabilidad de un fermentador ABE que emplea lactosa para la producción de biobutanol empleando *Clostridium Saccharoper-butylaceticum N1-4 ATCC 13564*; analizando el efecto de la velocidad de dilución (D) sobre la estabilidad del sistema. Se implementó un método de cálculo de estados estacionarios por Matlab 7,04 y reproducción de diagramas de bifurcación en la interface Matcont 4,2.

El análisis se desarrolló con base al modelo matemático propuesto por Obando & Cardona (2011), una adaptación de operación en continuo del modelo en batch desarrollado por Shinto (2007), para la fermentación ABE. En este modelo se alcanza una concentración en estado estacionario para butanol: 84,973(6,298g/L) cuando se alimentan 147,500 mM de lactosa ($L_f=53,200$ g/L) a una velocidad de dilución (D) de $0,050$ h⁻¹.

Se obtuvo un punto de bifurcación, limit point, en 1,132 mM butanol (0,084g/L) y dilución crítica $D_c=0,351$ h⁻¹. Así mismo, se encontró un punto de bifurcación neutral saddle (con carácter BP y Hopf) en 197,688 mM (14,653g/L) de butanol y $D=0,005$ h⁻¹.

Se concluye del análisis, que la región estable de operación se encuentra en intervalos de velocidad de dilución de $0,005$ h⁻¹ a $0,079$ h⁻¹. Bajo estas condiciones es posible alcanzar conversiones de lactosa y rendimiento producto/sustrato de 92,530% y 0,296g butanol/g lactosa respectivamente. En la región de estabilidad se optimizó el valor de velocidad de dilución (D_{opt}) con base en la productividad de biomasa. Los resultados muestran que a un D_{opt} de $0,079$ h⁻¹ es posible obtener 61,090 mM (4,528g/L) de butanol.

Finalmente el análisis de estabilidad permite concluir que las células experimentan un efecto tóxico letal cuando las concentraciones de lactosa y butanol son respectivamente 143,120 mM (51,569g/L) y 197,688 mM (14.653g/L) (neutral saddle).

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: LUIS JAVIER LOPEZ GIRALDO. Codirectora: LAURA JOHANNA CASTELLANOS SUAREZ

ABSTRACT

TITLE: STABILITY ANALYSIS OF FERMENTATION ABE PROCESS USING CLOSTRIDIUM SACCHAROPERBUTYLACETONICUM N1-4 ATCC 13564 FROM USING LACTOSE FROM WHEY PERMEATE*

AUTHOR:LUIS EDUARDO ORTIZ BOHÓRQUEZ**

KEYWORDS: Butanol, dilution rate, stability analysis, steady states, bifurcation diagrams.

DESCRIPTION

In this work was performed the stability analysis that employ lactose for production of biobutanol using *Clostridium Saccharoperbutylacetonicum N1-4* ATCC 13564, analyzing the effect of rate of dilution (D) on the stability of ABE fermentation system. It was implement a calculation method of stationary states in Matlab 7,04 and reproduction of bifurcation diagrams in Matcont 4,2 interface.

The analysis was developed based on the model proposed by Obando & Cardona 2011, an adaptation from a model in batch developed by Shinto (2007) for ABE fermentation. In this model shows that the steady state is in 84,973 mM butanol (6,298 g / L) is alcanzated for the conditions of 147,500 mM lactose feeding = 295mM ($L_f = 147,5\text{mM} = 53,200 \text{ g lactose / L}$) and a dilution rate(D) of $0,05 \text{ h}^{-1}$.

A branch point was obtained, limit point, in 1, 1325 mM butanol and dilution critical $D_c = 0, 35084 \text{ h}^{-1}$. In addition, a neutral saddle bifurcation was found (with character BP and Hopf) in 197,688 mM butanol (14,653g/L) and $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$.

For the analysis is concluded that the stable operation region was found in intervals for dilution rate of $0,005 \text{ h}^{-1}$ to $0,079 \text{ h}^{-1}$. Under these conditions it is possible alcanzate a maximum conversion of lactose and yield product / substrate in 53% and $Y_{p/s} = 0,296 \text{ g Butanol/g Lactose}$, respectively. In the region of stability the value of dilution rate optimal (D_{opt}) based on biomass productivity is in 0.079 h^{-1} is possible obtain concentrations of Lactose and Butanol in 91,193mM and 61,090 mM(4,528g/L).

Finally, the stability analysis allows come to the conclusion that the cells experiment a lethal toxic effect when the concentrations of lactose and butanol are respectively 143,120 mM (51,569g/L) y 197,688 mM (14.653g/L) (neutral saddle).

*Workdegree

**Engineering Faculty of Physical and Chemical. School of Chemical Engineering.

Head teacher: LUIS JAVIER LOPEZ Giraldo. Co-Head Teacher: LAURA JOHANNA CASTELLANOS SUAREZ

INTRODUCCION

Considerando las expectativas de las reservas energéticas mundiales, el futuro agotamiento de los combustibles fósiles y a su vez el impacto ambiental generado por sus derivados, muchos gobiernos han centrado su atención en procesos biotecnológicos dirigidos a la obtención de materias primas y combustibles que provengan de recursos renovables. (García *et al.*, 2011; Kumar&Gayen2011)

En lo que respecta a los combustibles obtenidos desde recursos renovables sobresalen biodiesel, bioetanol y el butanol. Se destaca el butanol por las siguientes ventajas: valor energético alto, fácilmente mezclable en su forma pura con gasolina y diésel, no requiere modificación en los motores de combustión interna, no es higroscópico (no absorbe agua), presión de vapor baja, menos corrosivo. Además, este metabolito se considera una materia prima valiosa en la elaboración de otros compuestos químicos como acrilato, ésteres de metacrilato, éteres de glicol, butiletilo, etc.

En la búsqueda de obtener este producto, se ha recurrido a la fermentación ABE, un proceso a escala industrial que surgió a principios del siglo XX y que durante las Guerras Mundiales tuvo su máximo apogeo, recobrando interés para industrias de África del Sur, Unión Soviética y China a finales de los años 90 (Santos Bernárdez, 2011; Ni, 2009; Syed, 1994). En esta fermentación anaerobia se emplea como biocatalizador a las especies de la bacteria *Clostridium* (Jones & Woods, 1986), entre las que sobresalen: *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* y *C. saccharobutylicum* (Deshmukh, 2013; Jones&Keis, 1995; Patakova *et al.*, 2013). La gran mayoría de especies de este género son capaces de producir acetona, butanol y etanol bajo determinadas condiciones de operación a partir de una gran variedad de sustratos (pentosas, hexosas, mono, di- o polisacáridos, entre ellos: glucosa, sacarosa, lactosa, xilosa, xilano, almidón, glicerol) (Tashiro & Sonomoto, 2010; Green,2011;Reid,2005).

Otro aspecto importante para el éxito de la fermentación anaerobia ABE es la configuración del biorreactor, pues la operación en batch proporciona el rendimiento más alto de disolventes y una relación másica A: B: E (03:06:01) aunque se prefiere el modo continuo en términos de rendimiento butanol y productividad donde se sugiere una velocidad de dilución baja

En ese sentido, son numerosos los trabajos de fermentación continua ABE que se han desarrollado con el fin de aumentar las productividades de solventes obtenidos. En orden cronológico encontramos:

Tabla 1. Antecedentes generales de la fermentación continua ABE

Referencia bibliográfica	Antecedentes
Qureshi&Maddox,1987	A $D=0,100 \text{ h}^{-1}$, en reactor de lecho empacado con suero de queso y <i>C. Acetobutylicum</i> , se obtuvo una productividad máxima de disolvente de $4,100 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, que representa un rendimiento de $0,230\text{g disolvente / g lactosa}$.
Godin y Engasser,1990	Proceso de dos etapas con <i>Clostridium acetobutylicum</i> con pH 4,5 en cada etapa y $D=0,080 \text{ h}^{-1}$ y $0,040 \text{ h}^{-1}$ respectivamente. Se logró un rendimiento de $0,360 \text{ g disolvente/g de glucosa consumida}$, en el consumo total de glucosa.
Qureshi&Maddox, 1995	En un reactor de lecho fluidizado empleando <i>C. Acetobutylicum</i> inmovilizada y permeado de suero de leche para la producción continua de ABE. En el intervalo de $D=0,350\text{-}1,100 \text{ h}^{-1}$, se observaron valores de productividad ABE de 3 a 4 g /Lh , pero los valores de conversión de lactosa eran pobres.
Huang, W.C., Ramey D.E., Yang S.T,2004	En un biorreactor de 200-ml con <i>C. Acetobutylicum</i> se obtuvo una productividad óptima de butanol $4,600 \text{ g / (L h)}$ y un rendimiento de $0,420 \text{ g butanol/ g glucosa}$ a una tasa de dilución de $0,900 \text{ h}^{-1}$ y pH 4,3.
Tashiro <i>et al.</i> , 2005	A $D=0,200 \text{ h}^{-1}$ en cultivo continuo convencional ABE con CS N1-4 y sustrato glucosa (sin reciclaje de células), la máxima productividad ABE fue sólo $1,850 \text{ gl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y la concentración de biomasa por debajo de $5,200 \text{ gL}^{-1}$.
Napoli,2009	En reactor de biopelícula bajo condiciones de operación: pH (4 -5,1), D (0,540 y $2,500 \text{ h}^{-1}$) y Lf (15 - 30 g / L) por <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSMZ 792. La productividad máxima de butanol fue $4,430 \text{ g /Lh}$ y la selectividad del butanol con respecto a los disolventes era de 88% en peso a $D=0,970\text{h}^{-1}$.
Tashiro,2010	En reactores con recirculación de células, la biomasa superó 100 g / L en intervalos de velocidad de dilución de $0,330\text{-}0,850 \text{ h}^{-1}$, con tasas superiores a D_c de $0,260 \text{ h}^{-1}$ (sin reciclaje de células). Con recirculación de células, la mayor productividad de solventes fue 11 g/L h cuando la CSN 1-4 fue empleada.
Survase <i>et al.</i> , 2011	En un reactor de columna con <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 en glucosa, la concentración total máxima de solventes fue de $14,320 \text{ g L}^{-1}$ a una velocidad de dilución de $0,220 \text{ h}^{-1}$; mientras que la productividad máxima de solventes ($13,660 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) se obtuvo a una velocidad de dilución de $1,900 \text{ h}^{-1}$.
Zheng <i>et al.</i> ,2012	Producción de butanol en continuo con recirculación de células empleando CSN1-4 y xilosa como sustrato. Con recirculación de células la productividad de butanol aumentó de $0,529 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a $1,200 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a una velocidad de dilución de $0,260 \text{ h}^{-1}$.

De los estudios anteriores queda claro que son múltiples los sustratos y microorganismos que pueden ser empleados. De acuerdo con la operación continua existe una mayor producción por conversión de lactosa en comparación con la glucosa, que resultan ser los sustratos más comunes (Foda *et al.*, 2010).

Por ello, un sustrato interesante para emplear en la fermentación ABE es el suero lácteo debido al gran volumen generado en el sector quesero, su elevada carga contaminante, que hace imprescindible un proceso de valorización o tratamiento antes de su vertido. Debido a que presenta una concentración de lactosa de 5-6%, que podría ser utilizada por cepas de *Clostridium* (Napoli, 2010) para la producción de biobutanol. Según Fedegan (2013), los residuos de lactosuero en el 2006 ascendieron a 921672 millones de litros, lo cual genera un impacto ambiental en DBO de 40-50g/l por vertimiento en aguas superficiales.

Así mismo, la cepa CS N1-4 ATCC 13564 podría ser considerada apta para la producción de solventes debido a sus altos rendimientos y porque se conoce su metabolismo y descripción cinética. El microorganismo CS N1-4 produce altos niveles de concentración de butanol en la fermentación ABE (Ogata *et al.*, 1982) inclusive el doble con respecto a otras cepas industriales. (Biebl 1999). Esta cepa fue aislada y patentada por Hongo (1960) y muestra una alta adaptabilidad a un gran número de sustratos (Keis *et al.*, 2001).

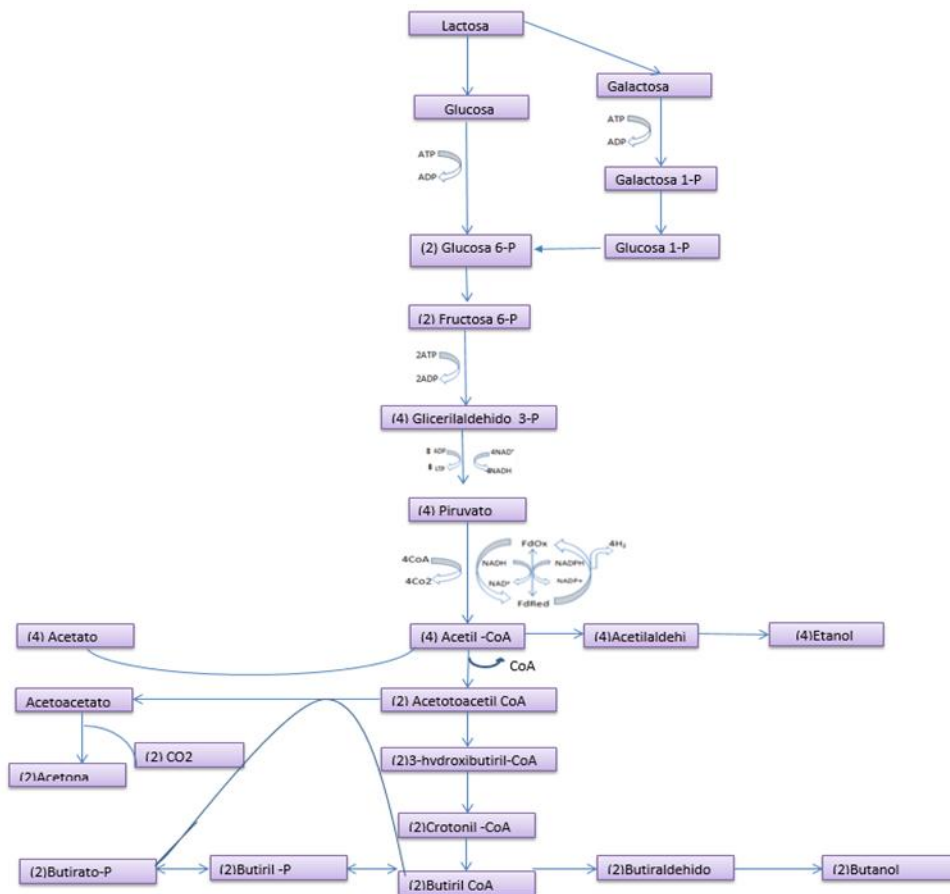
Dentro de los modelos que describen el comportamiento cinético de este microorganismo se encuentra el propuesto por Shinto *et al.* (2007) en modo batch, para concentraciones iniciales de glucosa de 36,100 a 295 mM. Estos autores desarrollaron las ecuaciones cinéticas para las reacciones metabólicas (Ver anexo I) basados en la ecuación de Michaelis-Menten con consideraciones de inhibición por sustrato y por producto. Así mismo, los autores estimaron los parámetros cinéticos (Ver anexo II). Finalmente, propusieron los modelos matemáticos para la fermentación ABE de la ruta metabólica de glucólisis o *Embend Meyerhof-Parnas* (EMP) para los sustratos glucosa y xilosa (Shinto, 2008).

Cada uno de estos modelos muestran altos valores del coeficiente de correlación al cuadrado ($> 0,900$). Posteriormente Obando 2011, estableció la inclusión de parámetros de operación en continuo tales como, velocidad de dilución D y concentración en la alimentación de sustrato. Además verificó el desempeño de una serie de 4 biorreactores por simulación matemática comparando su rendimiento, conversión y productividad. Sus resultados muestran que los mejores rendimientos de butanol se obtienen a glucosa alimentada $G_f=295$ mM y $D=0,150$ h⁻¹.

El conocimiento cinético es importante porque permite la simulación del proceso con el fin de determinar condiciones de operación, invirtiendo menos tiempo y gastos asociados con la experimentación. En lo que respecta a la descripción de la ruta metabólica, el disacárido lactosa, ha evidenciado el mismo proceso de

glucólisis o ruta metabólica EMP, solo que sufre un proceso precedente de hidrólisis, (Ver fig.1)

Fig.1. Ruta metabólica de la CS N14 empleando lactosa como sustrato. Fuente: Napoli, 2009



Comparando los pasos de oxidación tanto de la glucosa y la galactosa a piruvato resulta que las dos vías son equivalentes en términos de balance de masa y balance energético. Por lo tanto, la bioconversión de la lactosa puede ser considerada como la conversión de dos moléculas (moles) de glucosa (Napoli, 2009). El modelo matemático. (Ver Ec.1) que se presentará a continuación, representará la ruta metabólica para la cepa *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (CS N1-4) ATCC 13564 en continuo con los parámetros cinéticos calculados por Shinto e incluirá la suposición estequiométrica sobre lactosa anteriormente mencionada. ($G_f=2 \cdot L_f$ y $L=2 \cdot G$).

$$\frac{dG}{dt} = -D*(G_f - G) + R1$$

$$\frac{dF6P}{dt} = D*(F6P_f - F6P) + R1 - R2$$

$$\frac{dG3P}{dt} = D*(G3P_f - G3P) + R2 - R3$$

$$\frac{dPIR}{dt} = D*(PIR_f - PIR) + R3 + R4 - R5 - R6$$

$$\frac{dLACT}{dt} = D*(LACT_f - LACT) + R5 - R4$$

$$\frac{dACOA}{dt} = D*(ACOA_f - ACOA) + R6 + R7 + R8 - R9 - R10 - R11 - R12$$

$$\frac{dX}{dt} = D*(X_f - X) + R12 - R13$$

$$\frac{dACET}{dt} = D*(ACET_f - ACET) + R9 - R7 - R8$$

$$\frac{dE}{dt} = D*(E_f - E) + R11$$

$$\frac{dAACOA}{dt} = D*(AACOA_f - AACOA) + R10 - R8 - R14 - R15$$

$$\frac{dBCOA}{dt} = D*(BCOA_f - BCOA) + R14 + R15 + R17 - R18 - R19$$

$$\frac{dACETOA}{dt} = D*(ACETOA_f - ACETOA) + R8 + R15 - R16$$

$$\frac{dBUTIR}{dt} = D*(BUTIR_f - BUTIR) + R18 - R15 - R17$$

$$\frac{dCO2}{dt} = D*(CO2_f - CO2) + R6 + R16$$

$$\frac{dB}{dt} = D*(B_f - B) + R19$$

$$\frac{dA}{dt} = D*(A_f - A) + R16$$

Así mismo, este modelo considera inhibición celular por sustrato y producto con el fin de obtener resultados cercanos a los valores experimentales. Desde el punto de vista experimental la fermentación ABE alcanza valores de butanol <20 g / L, productividad <0,500 g / L h, y rendimiento 0,280 a 0,330 g / g (Jones&Woods, 1986).

Con el fin de alcanzar los máximos valores de concentración de butanol, productividad y rendimiento; se hace necesaria la búsqueda de regiones estables que garanticen procesos más viables desde el punto de vista operacional. En lo que respecta a la simulación, una estrategia para determinar estas regiones es a

través del análisis de estabilidad. Este consiste en evaluar la dinámica local de los estados estacionarios (Berezowski, 2000) y el carácter de cada estado estacionario que se determina linealizando el sistema de ecuaciones diferenciales alrededor del estado estacionario y calculando los valores propios o eigenvalores de la matriz Jacobiana resultante, basados en la teoría de la singularidad y la linealización por teorema de Liapunov (Cardona *et al.*, 2003; Cardona *et al.*, 2007, Abjar&Almuhaizi 2012).

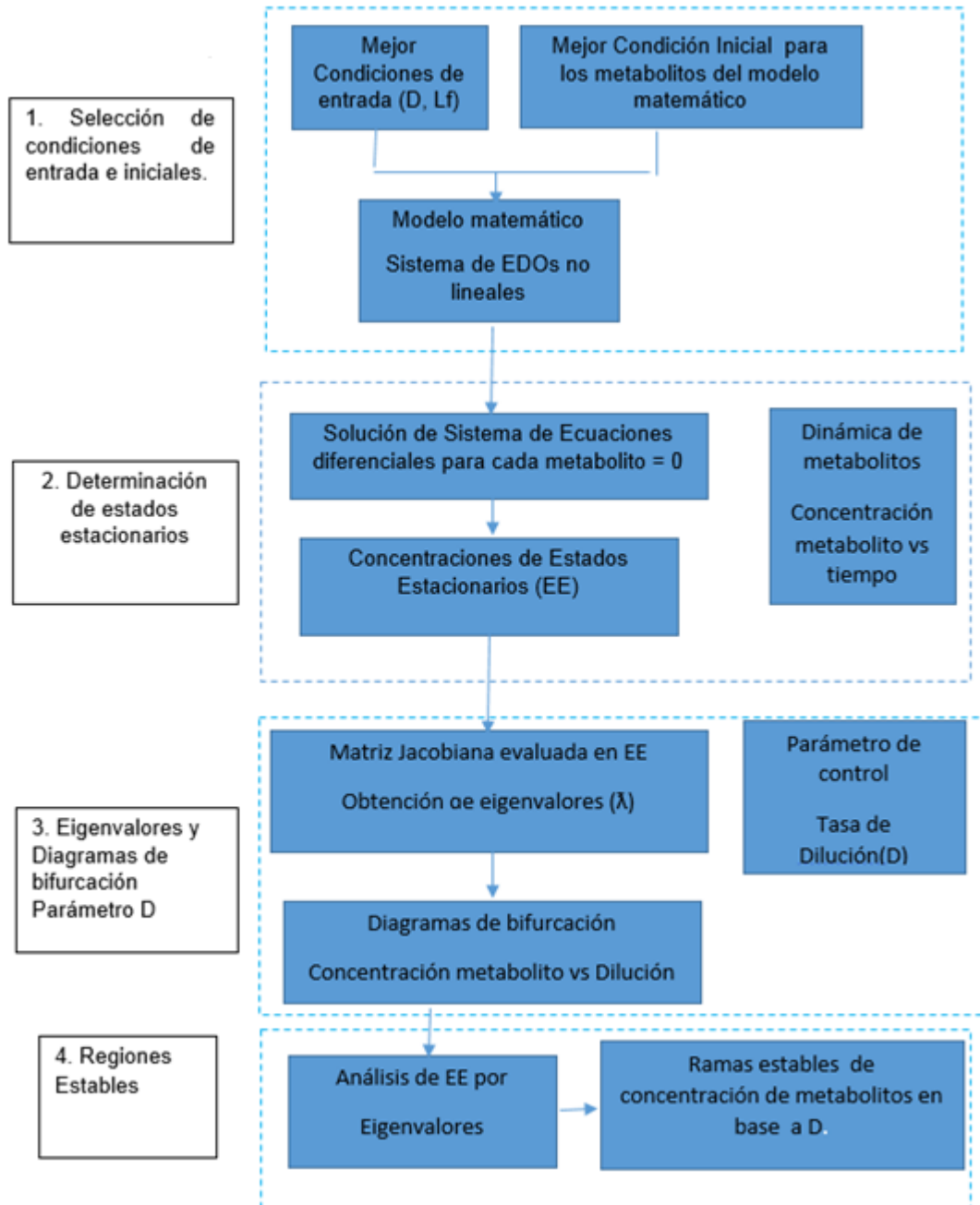
Para el análisis de estabilidad, se aplica la teoría de bifurcaciones para describir cualquier cambio cualitativo repentino en el comportamiento de un sistema, a medida que se varía ligeramente un parámetro de control (Abashar, 2004; Garhyan&Elnashaie, 2005). Tal cambio se conoce como bifurcación o inestabilidad estructural. Matemáticamente, las bifurcaciones se caracterizan por el cambio en los eigenvalores del sistema cuando se varía un parámetro (Seydel, 1994; Pavlou, 1999).

Estas formas de cambio se obtienen en diagramas de bifurcación, en los cuales se grafican variables de salida del sistema contra el parámetro de interés (Dibiasio, 1981). Con el análisis de bifurcaciones se determina cuáles parámetros son claves para la estabilidad del sistema, y se tiene una idea del rango de valores apropiados para la operación cuando se desea formular una estrategia de optimización y control para el biorreactor. (Garhyan and Elnashaie, 2004).

Así las cosas, este trabajo tendrá como objetivo realizar el análisis de estabilidad como estrategia para el diseño y operación de fermentadores que empleen lactosa como fuente de carbono para la producción de biobutanol empleando *Clostridium Saccharoper-butylaceticum N1-4 ATCC 13564 (CS N1-4)*, analizando el efecto del parámetro de control velocidad de dilución (D) sobre la estabilidad del sistema de la fermentación ABE.

1. METODOLOGIA

Fig. 2. Metodología utilizada para análisis de estabilidad en fermentación continua con lactosa por CS N1-4. (Basada en Cardona, 2011)



1.1 Selección de condiciones de entrada e iniciales

Los estados estacionarios para un proceso de fermentación siempre dependen de las condiciones iniciales de operación y de alimentación (condiciones de entrada Lf y D). Para plantear las condiciones iniciales más adecuadas, se emplean los valores iniciales de Shinto *et al.* (2007) de los cuales se seleccionaron los tabulados en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores iniciales de cada metabolito para una determinación de parámetros cinéticos y validez en concentraciones iniciales de glucosa en 36,100, 70,600, 122,000 y 295,000mM. Fuente: (Shinto, y otros, 2007).

Lactosa (mM)	Glucosa (mM)	Biomasa (mM)	Acetato (mM)	Acetona (mM)	Butirato (mM)	Butanol (mM)
18,05	36,100	1,340	41,600	0,000	1,920	3,010
35,3	70,600	1,530	40,000	2,000	1,950	3,830
61	122,00	1,360	46,500	0,000	3,980	2,900
147,5	295,00	1,410	41,20	2,880	1,000	4,490

Para seleccionar la mejor condición de entrada se partió de la optimización de Obando y Cardona, 2011, que plantea que la mejor productividad de butanol (27,460 mM/h), $Y_{p/s}$ (0,651 mM/mM) y porcentaje de conversión (95,380) se obtienen con una concentración de alimento de glucosa (Gf) igual a 295 mM (Lf=147,500mM) y $D=0,150h^{-1}$

En consideración de lo expuesto, las condiciones anteriormente descritas se evaluaron por el modelo matemático en Matlab (ver Anexo VIII). Cuyo objetivo es encontrar la mejor condición de partida que garantice la máxima concentración de biobutanol. Las condiciones de partida evaluadas se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Posibles condiciones de partida para proceso de fermentación ABE por CS N1-4 con sustrato lactosa. Fuente: Autor

Tipo de condición	Inicial						Entrada	
	Lactosa (mM)	Biomasa (mM)	Acetato (mM)	Acetona (mM)	Butirato (mM)	Butanol (mM)	Lf (mM)	D (h^{-1})
1	18,050	1,340	41,600	0,000	1,920	3,010	18,050	0,150

2	35,300	1,530	40,000	2,000	1,950	3,830	35,300	0,150
3	61,000	1,360	46,500	0,000	3,980	2,900	61,000	0,150
4	147,500	1,410	41,200	2,880	1,000	4,490	147,50	0,200
5	147,500	1,530	0,000	0,000	0,000	0,000	147,50	0,150
6	147,500	1,530	0,000	0,000	0,000	0,000	147,50	0,100
7	147,500	1,530	0,000	0,000	0,000	0,000	147,50	0,050

1.2 Determinación de estados estacionarios

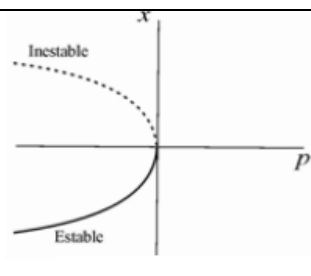
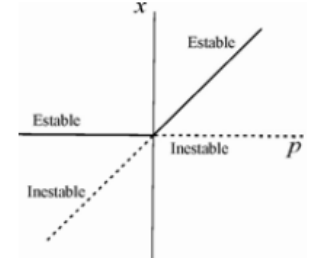
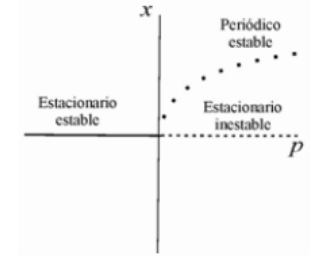
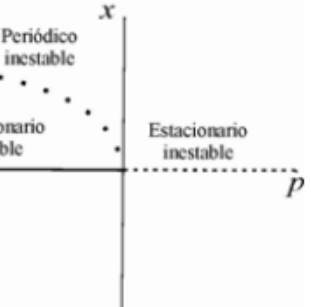
Las singularidades (X^*) del sistema de fermentación se obtienen en situaciones de lavado (condiciones donde no existe presencia de biomasa $X=0$) o en la mejor condición de partida (entrada e iniciales) seleccionada del paso anterior, cuya solución es conocida como solución no trivial del sistema. En el entorno de Matlab 7,04 se igualan las ecuaciones diferenciales no lineales a cero bajo estas condiciones y se emplea la función ode45 para obtener la concentración de estados estacionarios junto con los respectivos diagramas que describen la dinámica de metabolitos en la mejor condición de partida (Concentración de metabolitos vs tiempo)

1.3 Eigenvalores y Diagramas de bifurcación

Para la determinación de los eigenvalores y diagramas de bifurcación se empleó la interface Matcont 4,2, la cual es un paquete gráfico de Matlab para el estudio numérico interactivo de sistemas dinámicos no lineales y EDOs particulares. Los diagramas de bifurcación en Matcont 4.2 describen bifurcaciones de tipo Limit point (LP), Branch point (BP) y Hopf (H), dependiendo del cambio de valores en sus eigenvalores, donde su estabilidad puede ser nodo estable (si todos son reales negativos), nodo inestable (todos son reales positivos), nodo silla (si alguno es real positivo) o foco (existe presencia de complejos conjugados) (Ver tabla 4). Desde el punto de vista operacional la interface permite graficar las variables de salida (rendimiento, concentración de biobutanol, conversión, etc.) con respecto a un parámetro de operación como lo puede ser la velocidad de dilución D (conocido como diagrama de bifurcación). La detección de bifurcaciones locales en el

sistema, se realiza a través de la determinación de los eigenvalores, cuando éste último es evaluado en los estados estacionarios.

Tabla 4. Bifurcaciones de estados estacionarios elementales. Fuente: Strogartz, 2000, Paz Astudillo, 2010

Bifurcación	Descripción	Diagrama de bifurcación
Silla-nodo (Limit point LP)	Dos estados estacionarios difiriendo en el signo de uno de sus eigenvalores colisionan y desaparecen	
Transcritica (BP)	Dos estados estacionarios difiriendo en el signo de uno de eigenvalores colisionan y desaparecen.	
Hopf supercrítica	En un sistema de dos dimensiones , un foco esta-ble se convierte en un foco inestable y nace de un ciclo limite estable a su alrededor	
Hopf subcritica	En un sistema de dos dimensiones , un foco inestable se convierte en un foco estable y nace de un ciclo limite inestable a su alrededor	

1.4 Determinación de regiones estables

En esta etapa, se analizaron los diagramas de bifurcación y se establecieron los intervalos permitidos para las variables de operación y se evaluó la factibilidad de obtener estados estacionarios estables de alta productividad, así como las condiciones bajo las cuales pueden alcanzarse y mantenerse. Para ello se clasificaron los estados estacionarios de acuerdo con los eigenvalores y esto determina si hace parte de una rama estable o inestable (Ver tabla 5)

Tabla 5. Clasificación de estados estacionarios de acuerdo a sus eigenvalores. Fuente: Cardona, 2011

Descripción de los eigenvalores	Clasificación del estado estacionario
Todos los eigenvalores reales negativos	Nodo Estable
Todos los eigenvalores reales positivos	Nodo Inestable
Eigenvalores reales pero existe un real positivo	Nodo silla
Todos los eigenvalores complejos conjugados con parte real negativa	Foco Estable
Todos los eigenvalores complejos conjugados con parte real positiva	Foco Inestable
Eigenvalores complejos conjugados y alguno con parte real positiva	Foco Inestable

De manera general, las oscilaciones de los eigenvalores suelen ocurrir cuando las concentraciones de sustrato en la alimentación son suficientemente altas, mientras que a bajas concentraciones de sustrato los sistemas tienden a su estado estable. Los estados estacionarios EE inestables corresponden a las condiciones de lavado de las células (Doran, 1995); razón por la cual no hay formación de biomasa ni de producto, y la concentración de sustrato en la salida es igual a la de entrada. En la rama de EE estables, a medida que la velocidad de dilución se incrementa, la concentración de células aumenta, y la concentración de producto tiende a disminuir.

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

2.1 Selección de mejor condición de entrada e inicial

Las condiciones opcionales de partida planteadas en la tabla 3, fueron ingresadas en el modelo matemático y evaluadas usando el código en Matlab 7,04 con el fin de comparar la concentración de metabolitos con cada condición de partida. A continuación se resumen los resultados:

Tabla 6. Estabilidad para las condiciones iniciales y alimentación opcionales para proceso de fermentación ABE por CS N1-4 con sustrato lactosa.

EE de condición de partida	Lactosa (mM)	Acetona (mM)	Butanol (mM)	Etanol (mM)
1	10,132	1,545	5,454	0,148
2	17,931	4,999	15,301	0,352
3	35,232	9,106	23,820	0,545
4	113,634	13,854	31,440	0,739
5	113,634	13,854	31,441	0,740
6	99,840	21,266	49,3031	1,077
7	74,432	34,621	84,973	1,709

Finalmente se seleccionó como mejor condición de entrada $D=0,0500h^{-1}$ y $L_f=147,500mM=53,200gLactosa/L$ y mejor condición inicial para el biorreactor con los metabolitos lactosa en $147,500mM$ y biomasa en $1,530Mm$, que corresponde a la condición 7 de partida de la tabla 3.

2.2 Evaluación de estados estacionarios

Evaluando la mejor condición de partida se determinaron las concentraciones de cada uno de los metabolitos en el estado estacionario (ver tabla 7).

Tabla 7. Estados estacionarios del proceso de fermentación ABE por CS N1-4 con sustrato lactosa.

METABOLITO	EE (MMOL) Lavado	EE (G/L) Lavado	EE (MMOL) Sln no trivial	EE (G/L) Sln no trivial
LACTOSA	147,500	53,140	74,432	26.819
F6P	0,000	0,000	0,241	0,063
G3P	0,000	0,000	0,209	0,025
PIRUVATO	0,000	0,000	0,008	6,851E-4
LACTATO	0,000	0,000	0,003	2,786E-4
ACOA	0,000	0,000	0,044	0,036
BIOMASA	0,000	0,000	7,753	1,333
ACETATO	0,000	0,000	1,590	0,094
ETANOL	0,000	0,000	1,709	0,079
AACOA	0,000	0,000	0,346	0,295
BCOA	0,000	0,000	1,746	1,458
ACETOACETATO	0,000	0,000	0,190	0,019
BUTIRATO	0,000	0,000	10,067	0,876
C02	0,000	0,000	180,296	7,935
BUTANOL	0,000	0,000	84,973	6,298
ACETONA	0,000	0,000	34,621	2,011

Para ratificar que los estados estacionarios encontrados en la solución trivial son acordes a la dinámica de metabolitos se analiza su concentración en función de un tiempo de operación de hasta 600 horas (Ver anexo IV).

2.3 Eigenvalores y Diagramas de Bifurcación

El estado estacionario determinado en el numeral anterior se introduce como punto de equilibrio en Matcont 4,2 considerando como parámetro de bifurcación a la velocidad de dilución(D). Así mismo, la concentración del flujo de alimentación

se mantiene constante en $L_f=147,5\text{Mm}$. Finalmente los eigenvalores y puntos de bifurcación son los tabulados en la tabla 8.

Tabla 8 .Resumen de eigenvalores para el modelo propuesto para sistema de fermentación ABE por CS N1-4 con sustrato lactosa.

Parámetro de Bifurcación	Tasa de Dilución D a concentración fija $L_f=147,5\text{mM}$	
	Neutral Saddle BP y H en $D=0,005\text{h}^{-1}$	LP en $D=0,351\text{h}^{-1}$
1.LACTOSA	11,008mM	143,116 mM
2.F6P	0,118 mM	0,396 mM
3.G3P	0,104 mM	0,327 mM
4.PIRUVATO	0,004 mM	0,012 mM
5.LACTATO	0,002 mM	0,001 mM
6.ACOA	0,023 mM	0,055 mM
7.BIOMASA	0,040E-03mM	1,927 mM
8.ACETATO	1,335 mM	0,149 mM
9.ETANOL	3,276 mM	0,075 mM
10.AACOA	0,189 mM	0,475 mM
11.BCOA	1,257 mM	0,622 mM
12.ACETOACETATO	0,076mM	0,088mM
13.BUTIRATO	6,250mM	2,841 mM
14.C02	325,492mM	8,604 mM
15BUTANOL	197,688mM	1,133 mM
16.ACETONA	52,735mM	0,573 mM
Re(1)	-0,047	-227,902
Re(2)	-8,186E-04	-48,721
Re(3)	-5,221E-04	-33,207
Re(4)	-1,881E-04	-8,758
Re(5)	-1,881E-04-	-7,625
Re(6)	-8,947E-05	-3,889
Re(7)	-4,692E-05	-2,623

Re(8)	-1,747E-06	-0,589
Re(9)	-1,507E-06	-0,432
Re(10)	-3,407E-07	-0,368
Re(11)	-7,799E-08	-0,351
Re(12)	-6,873E-08	-0,351
Re(13)	-6,787E-08	-0,358
Re(14)	-6,787E-08	-0,358
Re(15)	2,182E-05	-0,291
Re(16)	2,1821E-05	8,129E-08
Im(1)	0,000	0,000
Im(2)	0,000	0,000
Im(3)	0,000	0,000
Im(4)	6,970E-05	0,000
Im(5)	-6,970E-05	0,000
Im(6)	0,000	0,000
Im(7)	0,000	0,000
Im(8)	0,000	0,000
Im(9)	0,000	0,000
Im(10)	0,000	0,000
Im(11)	0,000	0,000
Im(12)	0,000	0,000
Im(13)	0,000	0,000
Im(14)	0,000	0,000
Im(15)	5,881E-05	0,000
Im(16)	-5,881E-05	0,000

Así mismo, empleando el comando plotter se procedió a graficar la concentración de cada metabolito en función de su tasa de dilución (diagramas de bifurcación) obteniéndose los siguientes resultados para lactosa, biomasa y butanol. (Ver Fig.3) También se realizaron para los metabolitos acetona, etanol, acetato y butirato (Ver anexo IV)

Fig.3 Diagramas de bifurcación para la concentración de metabolitos a) Lactosa b) Biomasa y c) Butanol con respecto a velocidad de dilución D. Fuente: Autor

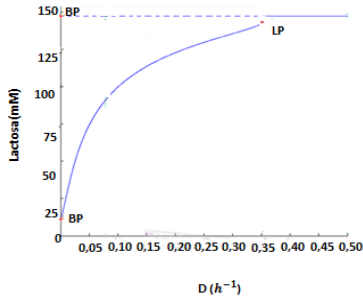


Fig.3a

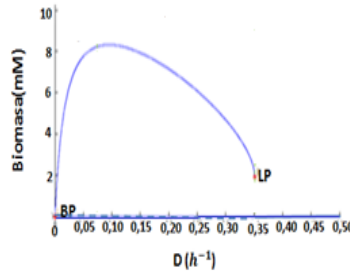


Fig.3b

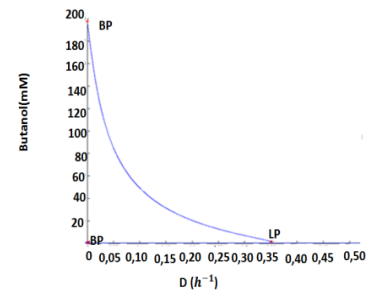


fig3c

2.4 Determinación de regiones estables

De acuerdo con los puntos de bifurcación obtenidos en el intervalo de 0-0,05h⁻¹ de los diferentes diagramas de bifurcación para la solución trivial, se procedió a clasificar cada uno de los estados estacionarios y tipo de rama encontrados para el sistema de fermentación bajo estudio (Ver tabla 9).

Tabla 9. Clasificación de estados estacionarios y tipo de ramas por eigenvalores del sistema en estudio Fuente: Autor

Punto de bifurcación y tipo de bifurcación	Descripción de los eigenvalores	Clasificación del estado estacionario y tipos de ramas
Neutral saddle (BP y H) BP=Bifurcación Transcritica H=Bifurcación Subcritica	Existencia de complejos conjugados y 2 números reales positivos	Foco inestable (Rama inestable periódica antes de BP y Rama estable después de BP)
Limit Point(LP)	Existencia de 1 real positivo y los demás son eigenvalores reales negativos	Nodo silla (Rama estable antes de LP y Rama inestable después de LP)

De acuerdo con los resultados anteriores se puede definir intervalos de dilución con sus respectivas ramas de estabilidad como se muestra a continuación:

Tabla 10. Ramas estables e inestables de acuerdo a la velocidad de dilución. D Fuente: Autor

Punto de bifurcación y valor de tasa de dilución (D)	Tipos de ramas	Intervalo de dilución y estabilidad
BP en $D=0,005h^{-1}$	Rama inestable periódica antes de BP	$0-0,005h^{-1}$ (Inestable)
	Rama estable después de BP	$0,005h^{-1}$ hasta llegar al limit point (Estable)
LP en $D=0,351h^{-1}$	Rama estable antes de LP	Antes de $0,351h^{-1}$ hasta llegar a BP(Estable)
	Rama inestable después de LP	Después de $0,351h^{-1}$ (Inestable)

A partir de los resultados de la tabla 10 se infiere que existe una sola rama estable general para valores de D que varían entre $0,005h^{-1}$ - $0,351h^{-1}$ y 2 ramas inestables para valores de D menores a $0-0,0049h^{-1}$ y superiores a $0,351h^{-1}$. Observando la rama estable de acuerdo con el diagrama de bifurcación de biomasa (Figura 3b), ésta alcanza 2 diluciones importantes para el sistema, una dilución óptima $D_{opt}=0,079h^{-1}$ y una dilución crítica $D_c=0,351h^{-1}$ (Limit point). Por tanto la rama estable será analizada con base en el valor estable inicial en BP ($D=0,005h^{-1}$) hasta D optima (Región I, ver Figura 4) y luego la segunda parte de la rama estable se visualizara desde D_{opt} hasta D_c (Región II, Figura 4). En cuanto a las regiones inestables en D, la región antes de BP requiere un control complicado, mientras que la región inestable después de D_c (Limit point) se puede controlar y ocurre el lavado celular (Región III, Figura 4)

Tabla 11. Distribución de las regiones de estabilidad para el parámetro velocidad de dilución determinadas para el sistema de fermentación ABE por CS N1-4 con sustrato lactosa

Parámetro fijo	Región	Parámetro De Bifurcación	Rango de Dilución(h^{-1})
Lf=147,5mM	I (Estable)	$D(h^{-1})$	0,005– 0,079
Lf=147,5mM	II(Estable)	$D(h^{-1})$	0,079- 0,351
Lf=147,5mM	III(Inestable)	$D(h^{-1})$	0,351-0,500

A continuación se muestra los diagramas de bifurcación con su respectiva distribución de ramas estables (línea azul completa) e inestables (línea azul punteada) y sus respectivas regiones (Ver figura 4)

Fig.4. Regiones de estabilidad para diagramas de bifurcación con parámetro de velocidad de dilución para sistema de fermentación continua ABE por CS N1-4 a $L_f=147,500Mm=53,200$ g Lactosa/L para (a) Lactosa, (b) Biomasa, (c) Acetona (d) Butanol y (e) Etanol.

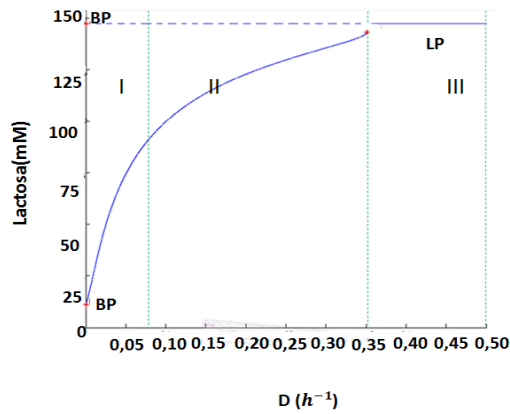


Fig.4a

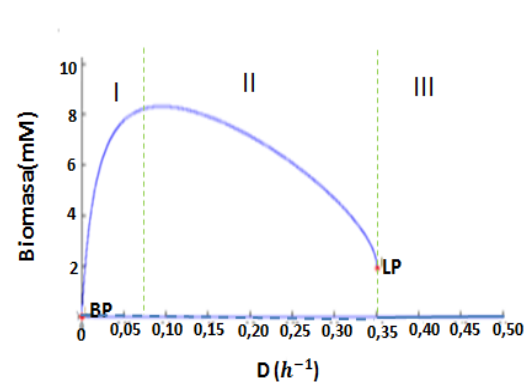


Fig. 4b

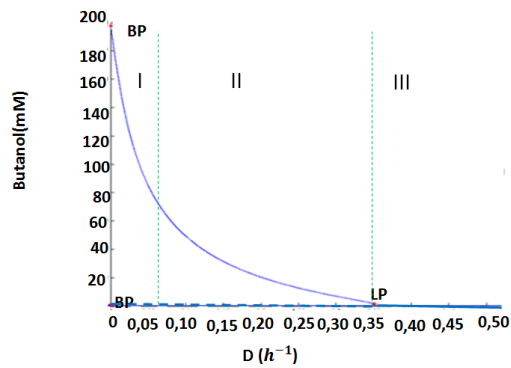


Fig.4c

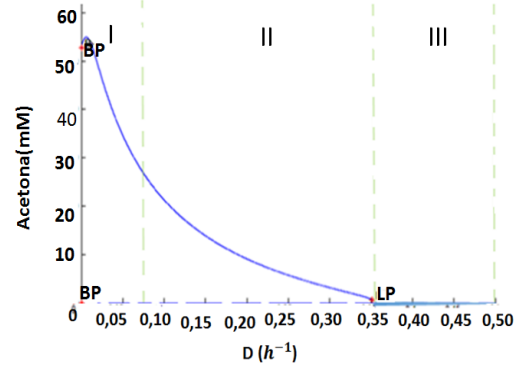


Fig. 4d

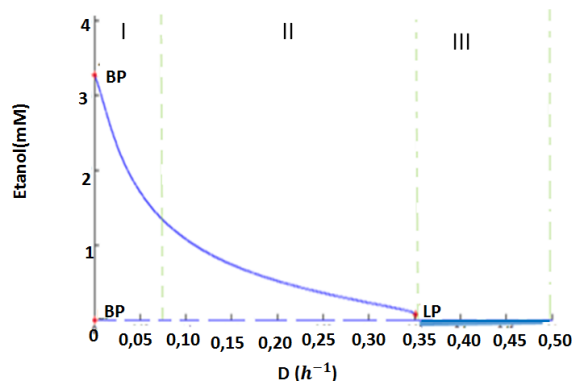


Fig. 4e

2.5 Análisis por regiones de estabilidad

En la **región I**, en $D=0,005h^{-1}$, que contiene características neutral saddle (foco inestable según eigenvalores en Matcont)(Dhooge et el, 2006), el sistema alcanza su mayor concentración de productos ABE (Fig. 4c – 4e). En efecto, la concentración de acetona, butanol y etanol son 52,735, mM, 197,688 mM y 3,277mM, respectivamente. A velocidades de dilución mayores a $0,005 h^{-1}$ se favorece la producción de biomasa que llega hasta su nivel máximo en $D_{opt}=0,079h^{-1}$ (Ver Fig.4b), donde se alcanza valores locales de 61,090mM de butanol, 25,901 mM de acetona y 1,292 mM de etanol. Además, se evidencia que los mayores incrementos de la concentración de butanol se obtienen entre $0,005 - 0,0786h^{-1}$, lo que sugiere que la operación se debe llevar en la región I si se pretende favorecer la producción de butanol (Li, Srivastava, Suib, Li, & Parnas, 2011) (Ver figura 4c).

En la región I se hace evidente que ocurre muerte celular (figura 4b) en el punto de bifurcación BP donde las concentraciones de lactosa (143,120 mM Lactosa (51,569g/L)) y butanol (197,688 mM (14.653g/L)) alcanzan valores inhibitorios. A la velocidad de dilución óptima la productividad de butanol obtenida en este trabajo es de 3,054 mM/l ó 0,226g/l h, este valor no supera el límite de productividad máximo de 0,500 g/l h obtenido por Jones&Woods (1986) empleando glucosa como fuente de carbono. En lo que respecta al porcentaje de rendimiento másico de solventes por gramo de sustrato ($Y_{ABE/S}$), el obtenido en este trabajo a una velocidad de dilución de $0,050 h^{-1}$ fue de 30,400; apenas 5,600% menor al obtenido experimentalmente por Godin y Engasser (1990) empleando *C. acetobutylicum* y una velocidad de dilución de $0,04 h^{-1}$. Si bien, el trabajo de Godin y Engasser (1990) tiene un rendimiento ligeramente mayor, para cumplir con el

parámetro de operación ($D=0,040\text{h}^{-1}$) se deberá aumentar el volumen del fermentador o disminuir el flujo de alimentación, en cuyo caso se sacrifica la cantidad de sustrato que puede tratarse por hora de operación.

De acuerdo con los resultados de este trabajo, en el punto de estado estable $D=0,05\text{h}^{-1}$, la relación másica A: B: E fue de 26:80:01, mientras que en batch la misma relación es de tan solo 03:06:01. Estos valores muestran claramente las ventajas de operar este tipo de procesos en continuo y las bondades de la metodología propuesta para determinar el intervalo en el cual se deben operar las variables de diseño. Según Syed (1994) la relación A: B:E para el microorganismo CS N1-4 es 22,74:76,5:2 para azúcares invertidos como sucrosa, un disacárido que se hidroliza en glucosa y fructosa, cuyo valor es cercano al valor obtenido por nuestro sistema.

En la **región II**, la conversión de lactosa disminuye de 38,180% a 2,970%, y su rendimiento $Y_{p/s}$ pasa de 0,223g/g a 0,053g/g, mientras la productividad llega hasta 0,057 mM/Lh=0,004g/Lh. Según Qureshi&Maddox (1987) a $D=0,100\text{h}^{-1}$ con *C. acetobutylicum*, el rendimiento con lactosuero es de 0,230 g disolvente / g lactosa. Al comparar los resultados de Qureshi&Madox,1987 con los obtenidos en este trabajo a las mismas condiciones de velocidad de dilución ($Y_{p/s} =0,213\text{g/g}$), se observa que la diferencia porcentual es de tan solo 1,7%.

En la **región III**, existe condición de lavado celular y el modelo no encuentra concentraciones de metabolitos coherentes, es una región estable para lavado celular, pero inestable para formación de productos y consumo de sustrato lactosa. De acuerdo con la figura 4b, el valor de D_c es de $0,350\text{h}^{-1}$ que supera el valor típico mostrado por Tashiro(2010) de $0,2600\text{h}^{-1}$ para un sistema que emplea el mismo microorganismo pero glucosa como sustrato. Este resultado sugiere que el sustrato lactosa le confiere al sistema un mayor grado de robustez en este aspecto. Por otro lado, Qureshi&Maddox (1995) concluyen que con velocidades de dilución entre 0,350-1,100 se obtienen altas productividades pero existe poca conversión de lactosa en esta región. Este intervalo sobrepasa la dilución crítica hallada y por ende no podría emplearse en el tipo de configuración planteada en este trabajo. Sin embargo, podría implementarse un modo de operación en lecho fluidizado el cual es considerado un proceso de intensificación para aumentar la velocidad de dilución crítica, así como como ocurre en procesos de recirculación de células.

3.CONCLUSIONES

1. Empleando el análisis de estabilidad se determinó que la región estable de operación para la fermentación está en el intervalo de velocidades de dilución de $0,005 \text{ h}^{-1}$ a $0,079 \text{ h}^{-1}$. En este intervalo se alcanza una conversión máxima de lactosa de 92,530% y un rendimiento máximo $Y_{p/s} = 0,296 \text{ g/g}$. Así mismo, en la región se encuentra el valor óptimo de la velocidad de dilución ($0,079 \text{ h}^{-1}$). Se comprueba que al emplear lactosa como sustrato y la cepa CS N1-4 en continuo en la región de la rama estable se aumenta la relación en másica A: B: E en 26:80:01 comparado con 03:06:01 en procesos batch.
2. Se evidenció que cuando se emplea lactosa como sustrato, el valor de la velocidad de dilución crítica es 1,346 veces superior al obtenido empleando glucosa y el mismo microorganismo.
3. En lo que respecta a los efectos tóxicos, los resultados obtenidos en el análisis de estabilidad concuerdan con los obtenidos experimentalmente por otros trabajos. Es decir, las células experimentan un efecto tóxico letal cuando las concentraciones de lactosa y butanol son respectivamente 143,120 mM (51,569g/L) y 197,688 Mm (14,653g/L).

4. RECOMENDACIONES

1. Optimizar por análisis de flujos metabólicos (Shimizu, 1999) los parámetros cinéticos para el proceso de fermentación ABE incluyendo parámetros de bifurcación como pH (Ennis&Madox, 1985) y temperatura (Voget, 1989), que también se convierte en factores influyentes de la actividad enzimática de *Clostridium*.
2. Plantear un modelo cinético con otra cepa de *Clostridium* más utilizada, como *Clostridium* ATCC 824 bajo las condiciones iniciales y regiones estables descritas en este trabajo para el sustrato lactosa.
3. Verificar con la cinética de *Clostridium* en fermentación ABE un análisis más profundo de inestabilidades como por ejemplo si hay existencia de múltiples estados estacionarios, ciclos límites, comportamientos aperiódicos, dominios de atracción, ajuste de funciones de Liapunov, múltiples modos de comportamiento (histéresis, entre otros) y caos.

BIBLIOGRAFIA

- ABASHAR M. Dynamic behavior of two-phase systems in physical equilibrium. (2004) Chemical Engineering Journal 97 pgs.183-194.
- AJBAR Abdelhamid, ALHUMAIZI Khalid Dynamics of the Chemostat: A Bifurcation Theory Approach.(2012) Editorial CRC Press Taylor & Francis Group, USA.
- BEREZOWSKI M. Method of determination of steady – state diagrams of chemical reactors. Chemical Engineering Science.(2000), pgs. 4291 – 4295.
- BIEBL, H. Comparative investigations of growth and solvent formation in Clostridium Saccharoperbutylaceticum DSM 2152 y Clostridium acetobutylicum DSM 792(1999). J Ind. Microbiol. Biotechnol. pgs. 115-120.
- CARDONA C.; MATALLANA, L. GÓMEZ, A. Steady-State Multiplicities in the Reactive Distillation Process for DIPE Production(2003).En: IV European Congress of Chemical Engineering, Granada, España.
- CARDONA C.; RESTREPO J. B. y SÁNCHEZ, O. J. Análisis de estabilidad de la fermentación continua para la producción de alcohol carburante(2007). En: XXIV Congreso Colombiano de Ingeniería Química, 2007, Cali, Colombia.
- CARDONA C., ASTUDILLO Paz, Influencia de las regiones de estabilidad del biorreactor en la producción eficiente de alcohol carburante(2011). Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XVIII.
- DESHMUKH, A. C. Current developments in abe fermentation(2013). Bionano frontier Vol.6, pgs.159-177.
- DIBIASIO, D.; LIM, H. C. WEIGAND, W. An experimental investigation of stability and multiplicity of steady states in a biological reactor. (1981). AIChE Journal., 27, p. 284 – 292.
- DHOOGHE A., GOVAERTS W, KUZNETSOV Y. y SAUTOIS B. Matcont : A Matlab package for dynamical systems with applications to neural activity.(2006).
- DORAN, Pauline Bioprocess Engineering Principles (1995). ISBN: 0122208552 Elsevier Science & Technology Books.
- DÜRRE , P. Biobutanol: An attractive biofuel(2007).Biotechnol. J., pgs.1525-1534.

- ENNIS, B.M., MADDOX, I.S. . The effect of pH and lactose concentration on solvent production from whey permeates using *Clostridium acetobutylicum* (1987). *Biotechnology and Bioengineering*, 29, pgs. 329–334
- FODA, M., DONG, H., LI, Y. Study the suitability of cheese whey for bio-Butanol production by *Clostridia*(2010).*American Science*, pgs.39-46.
- GARCÍA, V., PÄKKILÄ, J., OJAMO, H., MUURINEN, E., & KEISKI, R. L. Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency?(2011). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, pgs.964-980.
- GARHYAN P., ELNASHAIE S. Bifurcation analysis of two continuous membrane fermentor configurations for producing ethanol. (2004) *Chemical Engineering*
- 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 of Harmon Ray.(2005) *Industrial and Engineering Chemical Research* 44:pgs.2525-2531
- GREEN E.M. Fermentative production of butanol the industrial perspective.(2011). *Current Opinion in Biotechnology*; 22, pgs.1-7.
- GODIN, C., ENGASSER, J.M., Two-stage continuous fermentation of *Clostridium acetobutylicum*: effects of pH and dilution rate. (1990). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, pgs.269–273.
- HONGO, M. Process for production of Butanol by fermentation (1960), US patent 2945786.
- HUANG, W.C., RAMEY D.E., YANG S.T. Continuous production of butanol by *Clostridium acetobutylicum* immobilized in a fibrous bed bioreactor.(2004) *Appl. Biochem. Biotechnol.* vol. 113, 887-898
- JONES, D.T., WOODS, D.R. Acetone revisited.(1986). *Microbiological Reviews*, 50, pgs.484-524.
- JONES , D., & KEIS , S. Origins and relationships of industrial solvent-producing clostridial strains.(1995). *FEMS Microbiol. Rev.*, pgs.223-232.
- KEIS , S., SHAHEEN R. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. (2001). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, pgs. 2095-2103.

KUMAR , M., & GAYEN , K. Developments in biobutanol production: New insights. Applied Energy, (2011). pgs. 1999–2012.

KUZNETSOV, Yuri A. Elements of Applied Bifurcation Theory.(2004) 3th Ed. Edit. Springer Verlag, Nueva York.

KUZNETSOV, Y. Tutorial ii:One-parameter bifurcation analysis of equilibria with matcont(2011). Department of Mathematics Utrecht ,University Budapest.

LI, S.-Y., SRIVASTAVA, R., SUIB, S., LI, Y., & PARNAS, R. Performance of batch, fed-batch, and continuous A–B–E fermentation with pH-control (2011). Bioresource Technology, pgs. 4241-4250.

NAPOLI, F. Tesi Dottorato in Scienze Biotechnologiche. Deveploment of a integrated process for butanol production(2009).Universitá di Napoli Federico II.

NAPOLI, F., OLIVIERI, G., MARZOCHELLA, A.RUSSO, M.E., SALATINO P., Butanol Production by Clostridium acetobutylicum in a continuous packed bed reactor. (2010). Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, pgs.603-608.

NI Y, S. Z. Recent progress on industrial fermentative production of acetone–butanol–ethanol by Clostridium acetobutylicum in China.(2009). Appl. Microbiol. Biotechnol., pgs.415-423.

OBANDO, J. & CARDONA, Ariel. Análisis de la producción de biobutanol en la fermentación acetobutilica con clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4 ATCC13564 (2011). Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia

OGATA S., YOSHINO S., OKUMA Y, HAYSHIDA S. (1982), Chemical composition of autoplast membrane Of Clostridium Sacchaperbutylacetonicum J Gen Applied Microbiol. Pgs. 293-301.

PATAKOVA, P., LINHOVA, M., RYCHTERA, M., PAULOVA, L., MELZUCH, K. Novel and neglected issues of acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by clostridia: Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems.(2013). Biotechnology Advances, pgs.58-67.

PAVLOU, S. Computing operating diagrams of bioreactors.Journal of Biotechnology, (1999) pgs. 7 – 16.

PAZ ASTUDILLO, Isabel .Diseño integral de biorreactores continuos de tanques agitados aplicados a procesos de fermentación (2010), Universidad Nacional de Colombia, Manizales.

QURESHI, N., MADDOX I.S. Continuous solvent production from whey permeate using cells of *Clostridium acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar, (1987), *Enz. Microbial. Technol.*, vol. 9, 668-671.

QURESHI N, MADDOX I.S. Continuous production of acetone-butanol-ethanol using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* and integration with product removal by liquid-liquid extraction.(1995) *J. Ferment. Bioeng.* 80:185-189

RAGANATI, F., OLIVIERI, G., PROCENTESE, P., MARZOCHELLA, A. Bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor, (2013). *Bioresource Technology*, pgs.259-265.

REID, S. Genetic organization and regulation of hexose and pentose utilization in the clostridia (2005). USA: Dürre P, editor. *Handbook on clostridia*, CRC Press.

SANTOS BERNARDES, M. A. *Biofuel's Engineering Process Technology*, cap. 11 Perspectives of Biobutanol Production and Use.(2011).China: Intech open sciences.

SEYDEL R. Practical bifurcation and stability analysis - from equilibrium to chaos.(1994). 2da Ed. Edit Springer – Verlag, Nueva York, 1994

SHIMIZU H, TAKIGUCHI N, TANAKA H, SHIOYA S. A maximum production strategy of lysine based on a simplified model derived from a metabolic reaction network.(1999) *Metab. Eng.*; 1:pgs.299-308.

SHINTO, H., TASHIRO, Y., YAMASHITA, M., KOBAYASHI, G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Sonomoto, K. "Kinetic modeling and sensitivity analysis of Acetone-Butanol-Ethanol production"(2007)*Journal of Biotechnology. Vol. 131.*, pgs. 45-56.

SHINTO,H. TASHIRO Y.,KOBAYASHI G.,SEKIGUCHI T.,HANAI T.,KURIYA Y,OKAMOTO M,SONOMOTO K. Kinetic study of substrate dependency for higher butanol production in acetone-butanol-ethanol fermentation.(2008) *Process Biochem.* pgs.1452

STROGATZ, S. *Non-linear Dynamics and Chaos: With applications to Physics, Biology. Chemistry and Engineering.*(2000). Perseus Books.

SURVASE, Shrikant A., HEININGEN, Adriaan V., GRANSTRÖM T. Continuous bio-catalytic conversion of sugar mixture to acetone-butanol-ethanol by immobilized *Clostridium acetobutylicum* DSM 792, (2011). *Science Direct*

SYED Q. Biochemical studies on anaerobic fermentation of molasses and *Clostridium acetobutylicum*.(1994). Institute of Chemistry, Pakistan.

TASHIRO Y., TAKEDA K., KOBAYASHI G.,SONOMOTO K., High production of acetone butanol ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding. (2005). *Journal of Biotechnology*; 120, 197206

TASHIRO, Y., SONOMOTO, K. Advances in butanol production by clostridia(2010). . *Current research,Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*,pgs. 1383-1394.

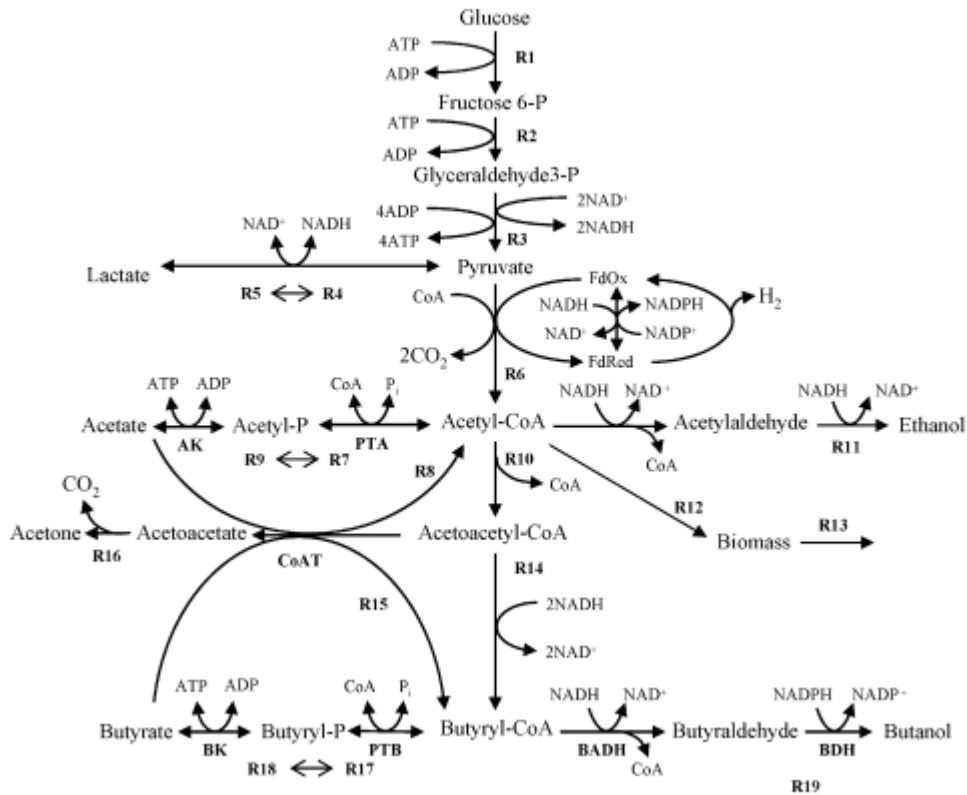
VOGET, C. E., MIGNONE, R. Influence of temperature on solvents production from whey (1989). *Biotechnol. Lett.* vol. 7, pgs.607-610.

ZHENG J. TASHIRO Y. , YOSHIDA T. ,GAO M., Wang Q. , SONOMOTO K. Continuous butanol fermentation from xylose with high cell density by cell recycling system. (2012) DOI: 10.1016/j.biortech.2012.11.066

ANEXOS

Anexo A. Determinación de Rj del modelo de Shinto (incluyendo inhibición por sustrato glucosa e inhibición por producto butanol).

Fig. 5. Vía metabólica EMP para *Clostridium* con descripción de velocidades de reacción. Fuente: Shinto et al, 2007



Las enzimas se indican en negrita y abreviadas como sigue: PTA, fosfotransacetilasa; AK, acetato quinasa; Abrigo, transferasa CoA; PTB, foddofotransbutirilasa; BK, butirato quinasa; BADH, butiraldehido deshidrogenasa; BDH, butanol deshidrogenasa.

Ecuaciones cinéticas

$$R_1 = \frac{Vmáx_1[Glucosa][Biomasa]}{Km_1 \left(1 + \frac{[1]}{K_{IS1}} \right) + [Glucosa] \left(\frac{[1]}{1 + \frac{[Butanol]}{K_{ii1}}} \right)}$$

$$R_2 = \frac{Vmáx_2[F6P][Biomasa]}{Km_2 + [F6P]}$$

$$R_3 = \frac{Vmáx_3[G3P][Biomasa]}{Km_3 + [G3P]}$$

$$R_4 = \frac{Vmáx_4[Lactato][Biomasa]}{Km_4 + [Lactato]}$$

$$R_5 = \frac{Vmáx_5[Piruvato][Biomasa]}{Km_5 + [Piruvato]}$$

$$R_6 = \frac{Vmáx_6[Piruvato][Biomasa]}{Km_6 + [Piruvato]}$$

$$R_7 = \frac{Vmáx_7[Acetato][Biomasa]}{Km_7 + [Acetato]}$$

$$R_8 = \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{K_{msa}}{[Acetato]} \right)} \right) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{K_{msB}}{[ACoA]} \right)} \right) * [Biomasa]$$

$$R_9 = \frac{Vmáx_9[ACoA][Biomasa]}{Km_9 + [ACoA]}$$

$$R_{10} = \frac{Vmáx_{10}[ACoA][Biomasa]}{Km_{10} + [ACoA]}$$

$$R_{11} = \frac{Vmáx_{11}[ACoA][Biomasa]}{Km_{11} + [ACoA]}$$

$$R_{12} = \frac{Vmáx_{12}[ACoA][Biomasa]}{Km_{12} \left(1 + \frac{[Butanol]}{K_{ii12}} \right) + [ACoA] \left(1 + \frac{[Butanol]}{K_{ii2}} \right)}$$

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

$$R_{14} = \frac{Vmáx_{14}[AACo][Biomasa]}{Km_{14} + [AACoA]}$$

$$R_{15} = \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{Km_{15A}}{[Butirato]} \right)} \right) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{Km_{15B}}{[AACoA]} \right)} \right) * [Biomasa]$$

$$R_{16} = \frac{Vmáx_{16}[Acetoacetato][Biomasa]}{Km_{16} + [Acetoacetato]}$$

$$R_{17} = \frac{Vmáx_{17}[Butirato][Biomasa]}{Km_2 \left(1 + \frac{K_{a17}}{[Butirato]} \right) + [Butirato]}$$

$$R_{18} = \frac{Vmáx_{18}[BCoA][Biomasa]}{Km_{18} + [BCoA]}$$

$$R_{19} = \frac{Vmáx_{19}[BCoA][Biomasa]}{Km_1 \left(\frac{[1]}{1 + \frac{K_{a19}}{[Butirato]}} \right) + [BCoA] \left(\frac{[1]}{1 + \frac{K_{ii19}}{[Butanol]}} \right)}$$

Anexo B. Parámetros del modelo Shinto empleado en la descripción de fermentación ABE con CS N1-4.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
$Vmáx_1$	3.20	$Vmáx_{11}$	7.45
Km_1	46	Km_{11}	30
K_{is1}	55.6	$Vmáx_{12}$	8.10
K_{ii1}	67.5	Km_{12}	1.10
$Vmáx_2$	40	K_{ii12}	23
Km_2	10	K_{13}	0.017
$Vmáx_3$	120	$Vmáx_{14}$	10
Km_3	26.5	Km_{14}	5.20
$Vmáx_4$	7.5	$Vmáx_{15}$	80
Km_4	177	Km_{15A}	15
$Vmáx_5$	9.7	K_{m15B}	50
Km_5	500	$Vmáx_{16}$	12
$Vmáx_6$	180	Km_{16}	10
Km_6	1.5	$Vmáx_{17}$	35
$Vmáx_7$	0.30	Km_{17}	4.9
Km_7	50	K_{A17}	2.2
$Vmáx_8$	19	$Vmáx_{18}$	100
Km_{8A}	40	Km_{18}	6.10
K_{m8B}	70	$Vmáx_{19}$	3.15
$Vmáx_9$	26.5	Km_{19}	5
Km_9	51	K_{m19A}	2.20
$Vmáx_{10}$	20	K_{ii19}	67.5
Km_{10}	1		

Tabla 12. Valores de parámetros cinéticos del modelo Shinto

Fuente: Shinto *et al.*, 2007

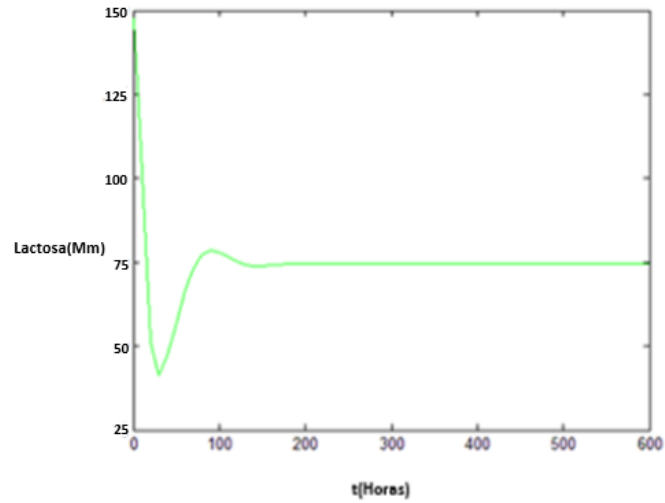
Anexo C. Base de conversión de Mm/L a g/L de cada metabolito

Tabla 13. Pesos moleculares y formulas químicas de metabolitos en fermentación ABE

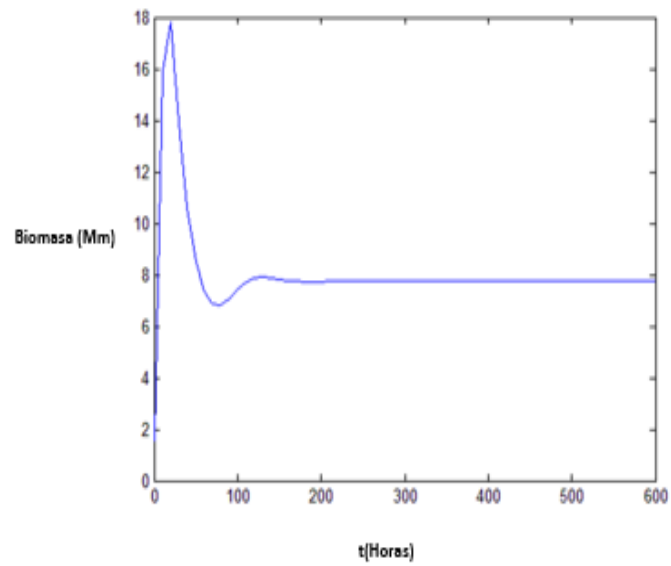
Fuente: Autor

Metabolito	Formula	Peso Molecular(g/mol)
LACTOSA	$C_{12}H_{22}O_{11}H_2O$	360,32
GLUCOSA	$C_6H_{12}O_6$	180,16
F6P	$C_6H_{13}O_9P$	262,1535
G3P	$C_3H_6O_3P$	121,08
PIRUVATO	$C_6H_3O_3 - 1$	87,06
LACTATO	$C_6H_5O_3 - 1$	89,08
ACOA	$C_{23}H_{34}N_7O_{17}P_3S$	805,57
BIOMASA	$CH_pO_nN_q$	172(Shinto et al,2007)
ACETATO	$C_2H_3O_2 - 1$	59,05
ETANOL	C_2H_5OH	46,068
AACOA	$C_{25}H_{40}N_7O_{18}P_3S$	851,609
BCOA	$C_4H_7CoA - SH$ CoA-SH= $C_{21}H_{35}N_7O_{16}P_3-SH$	835
ACETOACETATO	$C_4H_5O_3 - 1$	101,09
BUTIRATO	$C_4H_7O_2$	87
DIOXIDO DE CARBONO	CO_2	44,010
BUTANOL	$C_4H_{10}O$	74,122
ACETONA	CH_3COCH_3	58,08

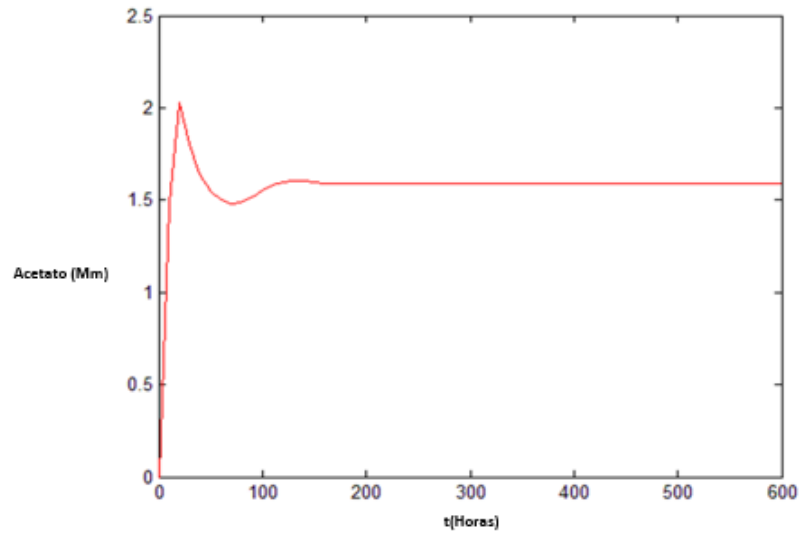
Anexo D. Comportamiento dinámico de metabolitos (a) Lactosa (b) Biomasa (c) Acetato (d) Etanol (e) Butirato (f) Butanol y (g) Acetona a $D=0,09h^{-1}$ y $Lf = 147,5mM$.



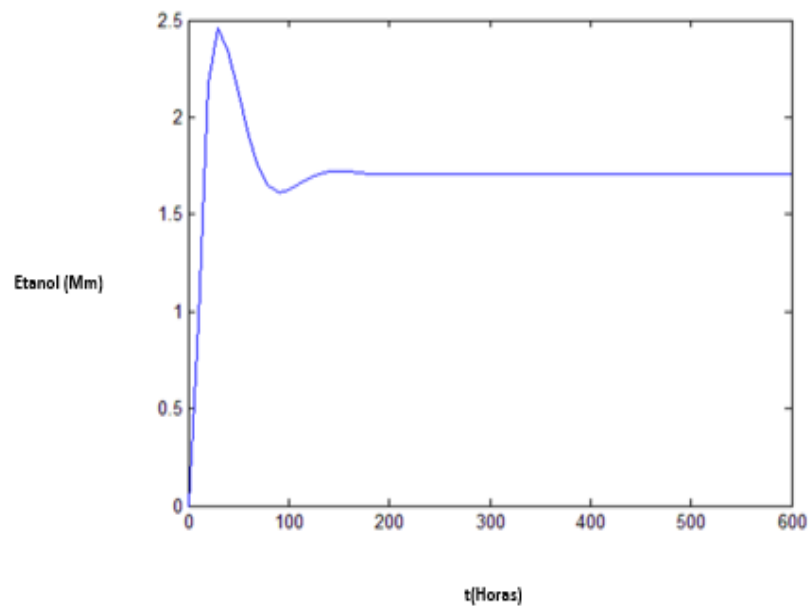
(a) Lactosa



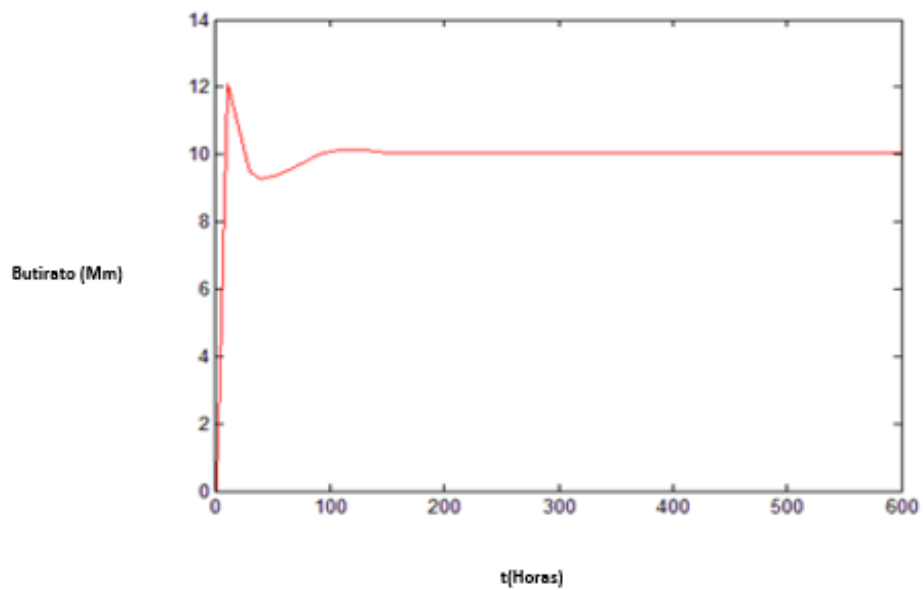
(b)Biomasa



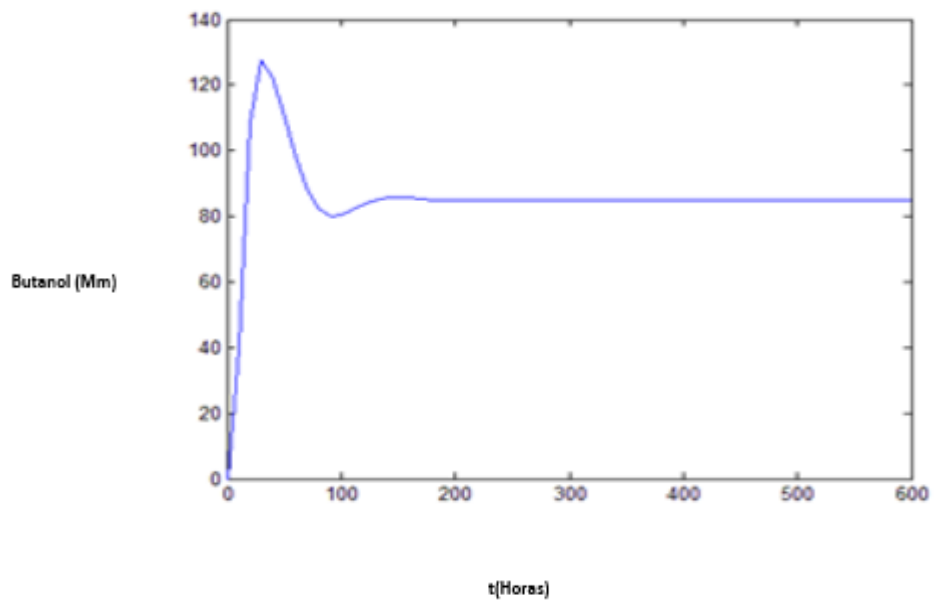
(c) Acetato



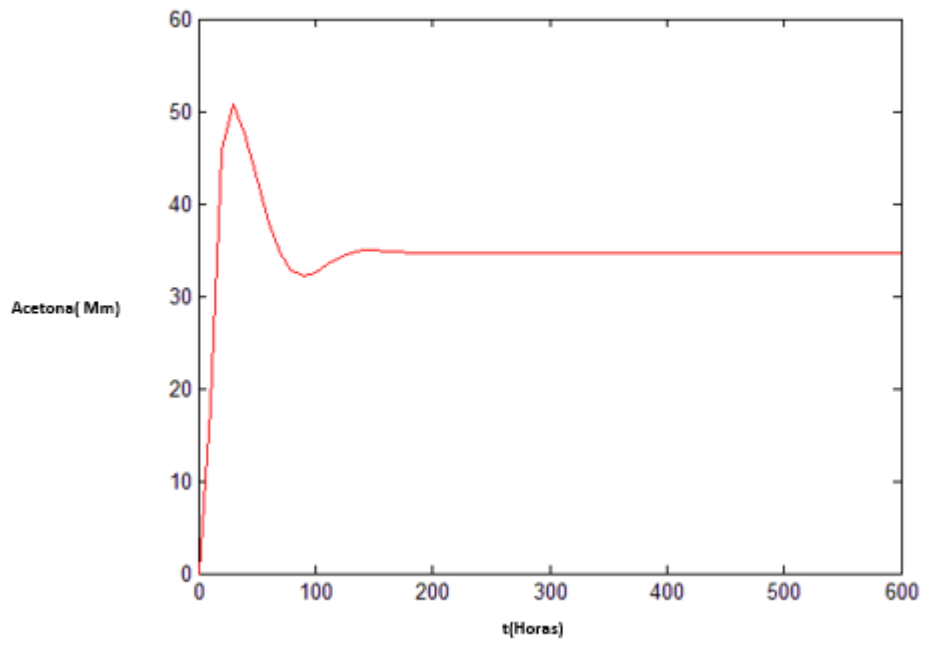
(d) Etanol



(e) Butirato

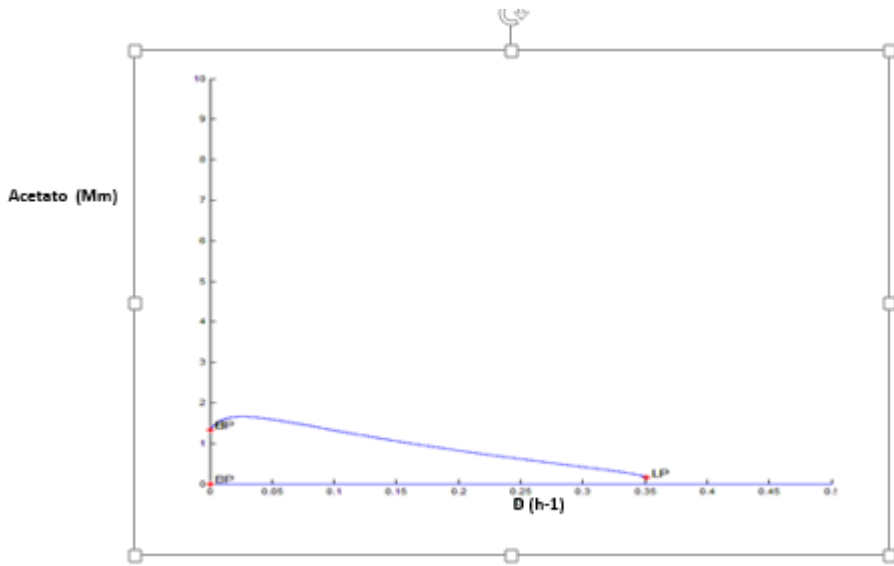


(f) Butanol

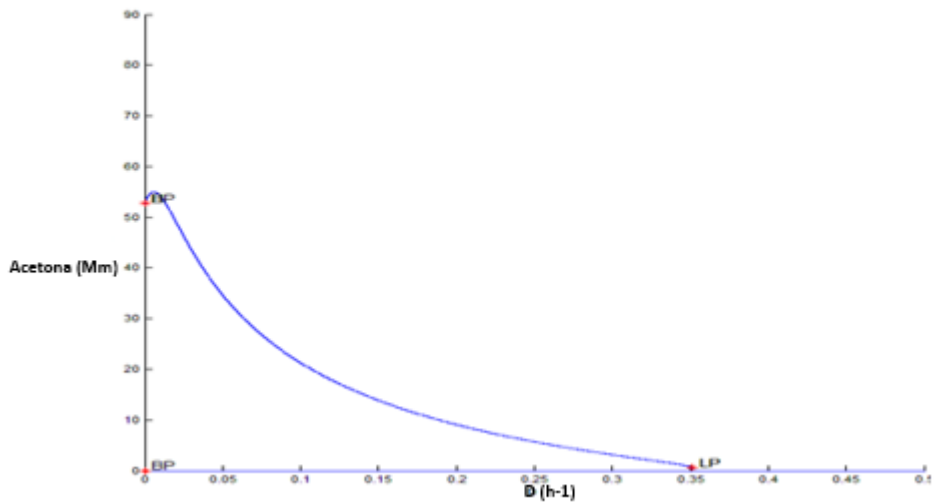


(g)Acetona

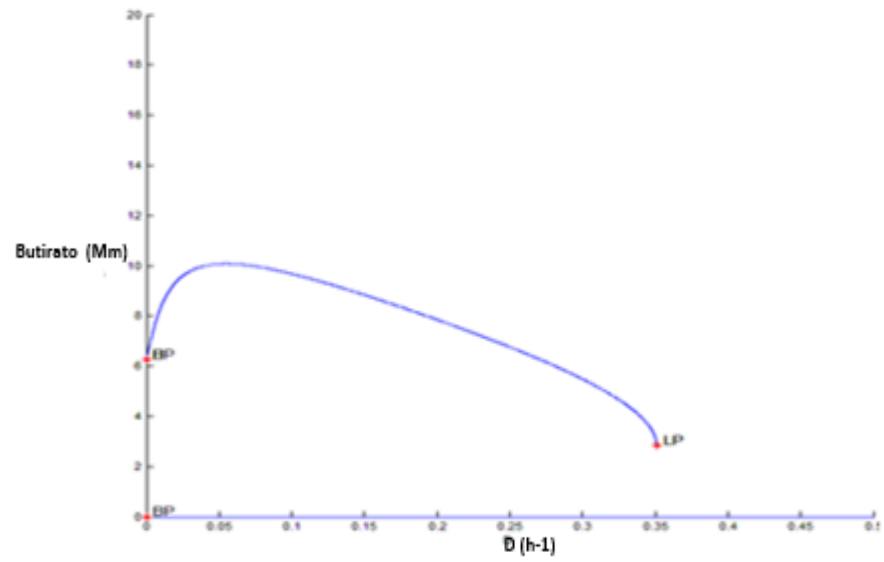
Anexo E. Diagramas de bifurcación para (a)Acetato (b)Acetona (c)Butirato (d) Etanol con parámetro de bifurcación (tasa de dilución) a $Lf = 147,5mM$



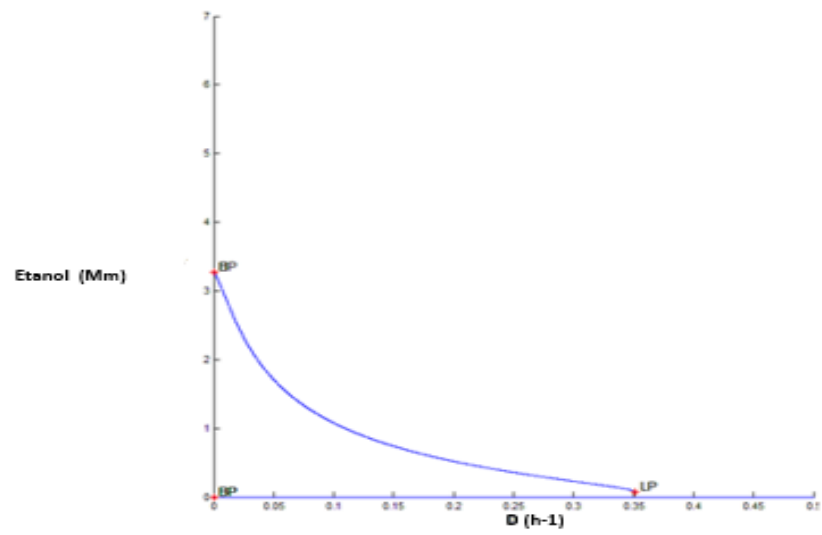
(a) Acetato



(b) Acetona

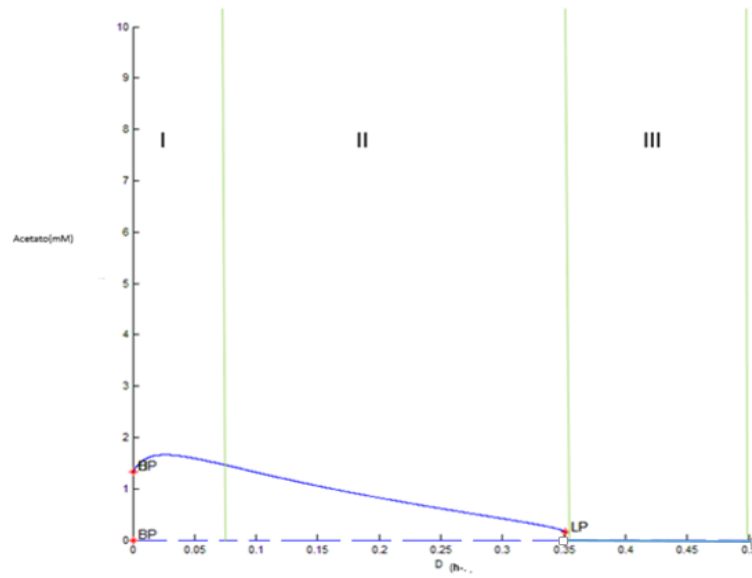


(c)Butirato

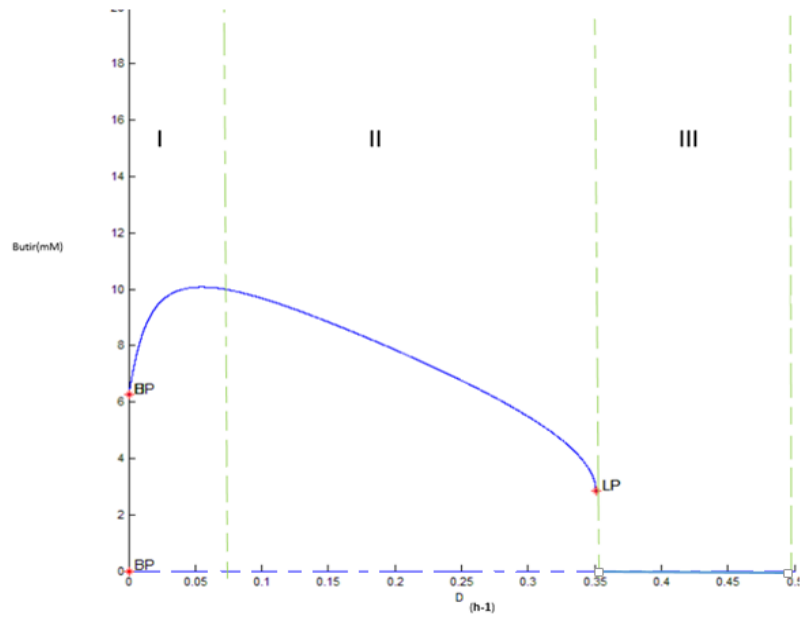


(d)Etanol

Anexo F. Regiones de estabilidad para (a) Acetato y (b) butirato con parámetro de bifurcación (tasa de dilución) a $L_f = 147,5mM$



a) Acetato



b) Butirato