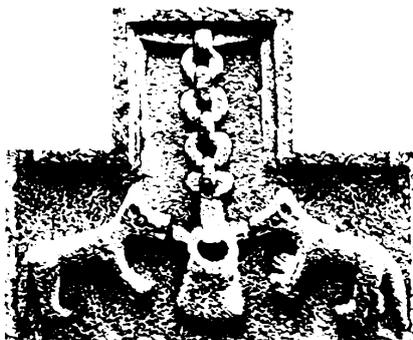


UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

Estudios con Reconocimiento de Validez Oficial por Decreto Presidencial

del 3 de Abril de 1981



LA VERDAD NOS HARÁ LIBRES

”Experimentación, Modelado Matemático y Estimación de Parámetros de la Fermentación de mezclas de azúcares mediante un co-cultivo de *Pichia stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de Bioetanol”

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Ingeniería Química

Presenta

Héctor Toribio Cuaya

Director de Tesis: Dr. Antonio Flores Tlacuahuac

Lector 1: Dr. Mauricio Sales Cruz

Lector 2: M.B. Lorena Pedraza Segura

México, D.F.

2011

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un modelo matemático estructurado para la fermentación de mezclas de azúcares de glucosa y xilosa utilizando un co-cultivo de *Pichia stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de etanol, con la principal intención de generar una herramienta que sea capaz de simular la operación de fermentación de mezclas de azúcares obtenidas de hidrolizados de material lignocelulósico. El trabajo se divide en cuatro etapas: la determinación de las cinéticas de fermentación del co-cultivo, el modelado del co-cultivo utilizando el enfoque cibernético, la estimación de parámetros cinéticos y el análisis de sensibilidad dinámico.

Las cinéticas de fermentación se llevaron a cabo variando la relación de las mezclas de glucosa y xilosa (20%:80%, 50%:50%, 80%:20%) y los datos obtenidos fueron utilizados para la estimación de los parámetros cinéticos. Las condiciones iniciales en la fermentación tiene un gran efecto en la producción de etanol, además el consumo de la glucosa siempre domino sobre el de la xilosa. El modelo cibernético desarrollado para el co-cultivo utiliza el diseño de un sistema de reacciones basado en las rutas metabólicas de las levaduras durante la fermentación. La estimación de los parámetros cinéticos del modelo de co-cultivo se abordó como un problema de optimización NLP que se obtuvo al discretizar el modelo DEA del co-cultivo, la función objetivo a minimizar mide la desviación entre los valores calculados y los datos experimentales.

El análisis de sensibilidad dinámico permite identificar de manera cualitativa los parámetros más sensibles que afectan el comportamiento de las variables de estado y todo el sistema en general. Este método requiere de la determinación de los coeficientes de sensibilidad que se definen como la derivadas parciales del modelo con respecto a los parámetros a analizar. Se utilizó la diferenciación automática en la plataforma computacional Matlab para determinar las ecuaciones de sensibilidad del modelo de co-cultivo. Debido a que cada sistema tiene condiciones iniciales distintas las respuestas del análisis de sensibilidad son diferentes en cada caso, pero eso no resta importancia a la información que brinda sobre el cuidado que se debe tener al estimar los parámetros cinéticos más sensibles.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	I
Agradecimientos	VIII
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1. Química y Bioquímica para la Producción de Bioetanol	3
2.1.1. Materiales lignocelulósicos	3
2.1.2. Pretratamiento de materiales lignocelulósicos	4
2.1.2.1. Pretratamientos físicos	5
2.1.2.2. Pretratamientos fisicoquímicos	5
2.1.2.3. Pretratamientos químicos	6
2.1.2.4. Pretratamientos Biológicos	7
2.1.3. Hidrólisis	8
2.1.4. Fermentación	10
2.2. Modelado de co-cultivos	14
2.3. Estimación de parámetros	16
3. Justificación	18
4. Objetivos	19
5. Materiales, Métodos y Estrategia Experimental	20
5.1. Materiales	20
5.1.1. Reactivos	20
5.1.2. Microorganismos	20
5.2. Métodos	20
5.2.1. Medio y condiciones de cultivo	20
5.2.2. Técnicas Analíticas	21
5.2.2.1. Crecimiento Microbiano	21
5.2.2.2. Cuantificación de Glucosa, Xilosa y Etanol	22

5.3. Estrategia Experimental	22
6. Resultados experimentales y Análisis	23
6.1. Resultados experimentales de la fermentación del co-cultivo	23
6.2. Análisis de resultados	25
7. Modelado del co-cultivo y estimación de parámetros	30
7.1. Ruta metabólica de <i>P. Stipitis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	30
7.2. Modelamiento del co-cultivo	33
7.2.1. Modelado Cibernético	34
7.2.2. Desarrollo del modelo cibernético del co-cultivo de <i>P. stipitis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	35
7.3. Estimación de parámetros	44
7.3.1. Problema de optimización dinámica	45
7.3.2. Formulación del problema de programación no lineal (NLP) para la estimación de los parámetros cinéticos del co-cultivo	47
7.4. Resultados de la estimación de parámetros y simulación del modelo cibernético del co-cultivo	55
7.4.1. Estimación de parámetros cinéticos del co-cultivo de <i>P. stipitis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	55
7.4.2. Simulación del modelo de co-cultivo de <i>P. stipitis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	59
7.4.2.1. Discusión de resultados de las simulaciones	60
7.5. Análisis de sensibilidad	74
7.5.1. Análisis de sensibilidad dinámica del modelo de co-cultivo de <i>P. stipitis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	76
7.5.1.1. Análisis de sensibilidad dinámica sobre cada variable	76
7.5.1.2. Análisis de sensibilidad dinámica sobre todas las variables	79
8. Conclusiones	83
Apéndice A	91
Anexo 1	97
Anexo 2	99

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1. Estructura de la pared vegetal.	4
2.2. Diagrama genérico de bloques para la producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico.	8
6.1. Cinética de la fermentación de co-cultivo con una mezcla 20:80 glucosa-xilosa. . .	26
6.2. Cinética de la fermentación de co-cultivo con una mezcla 50:50 glucosa-xilosa. . .	27
6.3. Cinética de la fermentación de co-cultivo con una mezcla 80:20 glucosa-xilosa. . .	28
7.1. Ruta metabólica de <i>S. cerevisiae</i> bajo condiciones aerobias y anaerobias.	31
7.2. Ruta metabólica de <i>P. stipitis</i>	32
7.3. Ruta metabólica propuesta para generar el modelo matemático.	36
7.4. Ruta metabólica convergente (a) y ruta metabólica divergente (b).	36
7.5. Ruta elemental convergente.	36
7.6. Ruta elemental divergente.	39
7.7. Estrategias de solución para la optimización dinámica.	46
7.8. Colocación sobre elementos finitos. Los diamantes representan u y y en los puntos de colocación. Los triángulos representan dz/dt en los puntos de colocación y los círculos representan z en las fronteras de los elementos, donde la discontinuidad se permite en u y y , a pesar de que la continuidad en z sea retenida.	49
7.9. Comparación de los datos experimentales con la simulación del co-cultivo del caso F1 C1; a) \diamond xilosa y \circ glucosa, las líneas continuas: variables de estado (xilosa y glucosa) de la simulación; b) perfil de piruvato de la simulación; c) \square etanol, línea continua: perfil de etanol de la simulación; d) \triangleright células, línea continua: perfil de células de la simulación; e) perfiles de las enzimas $- - e_1$, $- e_2$, y $\cdot \cdot e_3$ de la simulación; y f) perfiles de las enzimas $- e_4$ y $- - e_5$ de la simulación.	60
7.10. Velocidad de reacción y actividad enzimática de la simulación del co-cultivo del caso F1 C1; a) velocidad de reacción $- r_1$, $- - r_2$ y $\cdot \cdot r_3$; b) velocidad de reacción $- r_4$ y $- - r_5$; c) actividad enzimática $- V_1^c$, $- - V_2^c$ y $\cdot \cdot V_3^c$; y d) actividad enzimática $- V_4^d$ y $- - V_5^d$	61

7.11. Comparación de los datos experimentales con la simulación del co-cultivo del caso F1 C2; a) \diamond xilosa y \circ glucosa, las líneas continuas: variables de estado (xilosa y glucosa) de la simulación; b) perfil de piruvato de la simulación; c) \square etanol, línea continua: perfil de etanol de la simulación; d) \triangleright células, línea continua: perfil de células de la simulación; e) perfiles de las enzimas - - e_1 , - e_2 , y $\cdot \cdot$ e_3 de la simulación; y f) perfiles de las enzimas - e_4 y - - e_5 de la simulación.	63
7.12. Velocidad de reacción y actividad enzimática de la simulación del co-cultivo del caso F1 C2; a) velocidad de reacción - r_1 , - - r_2 y $\cdot \cdot$ r_3 ; b) velocidad de reacción - r_4 y - - r_5 ; c) actividad enzimática - V_1^c , - - V_2^c y $\cdot \cdot$ V_3^c ; y d) actividad enzimática - V_4^d y - - V_5^d	64
7.13. Comparación de los datos experimentales con la simulación del co-cultivo del caso F1 C3; a) \diamond xilosa y \circ glucosa, las líneas continuas: variables de estado (xilosa y glucosa) de la simulación; b) perfil de piruvato de la simulación; c) \square etanol, línea continua: perfil de etanol de la simulación; d) \triangleright células, línea continua: perfil de células de la simulación; e) perfiles de las enzimas - - e_1 , - e_2 , y $\cdot \cdot$ e_3 de la simulación; y f) perfiles de las enzimas - e_4 y - - e_5 de la simulación.	65
7.14. Velocidad de reacción y actividad enzimática de la simulación del co-cultivo del caso F1 C3; a) velocidad de reacción - r_1 , - - r_2 y $\cdot \cdot$ r_3 ; b) velocidad de reacción - r_4 y - - r_5 ; c) actividad enzimática - V_1^c , - - V_2^c y $\cdot \cdot$ V_3^c ; y d) actividad enzimática - V_4^d y - - V_5^d	66
7.15. Comparación de los datos experimentales con la simulación del co-cultivo del caso F2 C1; a) \diamond xilosa y \circ glucosa, las líneas continuas: variables de estado (xilosa y glucosa) de la simulación; b) perfil de piruvato de la simulación; c) \square etanol, línea continua: perfil de etanol de la simulación; d) \triangleright células, línea continua: perfil de células de la simulación; e) perfiles de las enzimas - - e_1 , - e_2 , y $\cdot \cdot$ e_3 de la simulación; y f) perfiles de las enzimas - e_4 y - - e_5 de la simulación.	67
7.16. Velocidad de reacción y actividad enzimática de la simulación del co-cultivo del caso F2 C1; a) velocidad de reacción - r_1 , - - r_2 y $\cdot \cdot$ r_3 ; b) velocidad de reacción - r_4 y - - r_5 ; c) actividad enzimática - V_1^c , - - V_2^c y $\cdot \cdot$ V_3^c ; y d) actividad enzimática - V_4^d y - - V_5^d	68
7.17. Comparación de los datos experimentales con la simulación del co-cultivo del caso F2 C2; a) \diamond xilosa y \circ glucosa, las líneas continuas: variables de estado (xilosa y glucosa) de la simulación; b) perfil de piruvato de la simulación; c) \square etanol, línea continua: perfil de etanol de la simulación; d) \triangleright células, línea continua: perfil de células de la simulación; e) perfiles de las enzimas - - e_1 , - e_2 , y $\cdot \cdot$ e_3 de la simulación; y f) perfiles de las enzimas - e_4 y - - e_5 de la simulación.	69
7.18. Velocidad de reacción y actividad enzimática de la simulación del co-cultivo del caso F2 C2; a) velocidad de reacción - r_1 , - - r_2 y $\cdot \cdot$ r_3 ; b) velocidad de reacción - r_4 y - - r_5 ; c) actividad enzimática - V_1^c , - - V_2^c y $\cdot \cdot$ V_3^c ; y d) actividad enzimática - V_4^d y - - V_5^d	70

7.19. Comparación de los datos experimentales con la simulación del co-cultivo del caso F2 C3; a) \diamond xilosa y \circ glucosa, las líneas continuas: variables de estado (xilosa y glucosa) de la simulación; b) perfil de piruvato de la simulación; c) \square etanol, línea continua: perfil de etanol de la simulación; d) \triangleright células, línea continua: perfil de células de la simulación; e) perfiles de las enzimas - - e_1 , - e_2 , y $\cdot \cdot$ e_3 de la simulación; y f) perfiles de las enzimas - e_4 y - - e_5 de la simulación.	71
7.20. Velocidad de reacción y actividad enzimática de la simulación del co-cultivo del caso F2 C3; a) velocidad de reacción - r_1 , - - r_2 y $\cdot \cdot$ r_3 ; b) velocidad de reacción - r_4 y - - r_5 ; c) actividad enzimática - V_1^c , - - V_2^c y $\cdot \cdot$ V_3^c ; y d) actividad enzimática - V_4^d y - - V_5^d	72
7.21. Distribución del desempeño integral de RS para el caso C1.	77
7.22. Distribución del desempeño integral de RS para el caso C2.	78
7.23. Distribución del desempeño integral de RS para el caso C3.	78
7.24. Desempeño integral total de OS para el caso C1.	80
7.25. Desempeño integral total de OS para el caso C2.	81
7.26. Desempeño integral de OS para el caso C3.	81

ÍNDICE DE TABLAS

5.1. Condiciones de los experimentos de fermentación del co-cultivo.	21
6.1. Datos cinéticos de la mezcla 20:80 glucosa-xilosa.	23
6.2. Datos cinéticos de la mezcla 50:50 glucosa-xilosa.	24
6.3. Datos cinéticos de la mezcla 80:20 glucosa-xilosa.	24
7.1. Resumen de resultados obtenidos en una computadora con procesador Intel Core i3, con una velocidad de 2.13 GHz y una memoria RAM de 4 GB. Se emplearon tres puntos internos de colocación en cada elemento finito.	56
7.2. Parámetros cinéticos para la formulación F1 calculados como óptimo local del problema NLP.	57
7.3. Parámetros cinéticos para la formulación F2 calculados como óptimo local del problema NLP.	58
7.4. Condiciones iniciales de las mezclas de glucosa y xilosa para el modelo de co-cultivo. . .	59
8.1. Condiciones iniciales de las mezclas de glucosa y xilosa para el modelo de co-cultivo. . .	101
8.2. Parámetros cinéticos para la formulación F1 calculados como óptimo local del problema NLP.	101
8.3. Parámetros cinéticos para la formulación F2 calculados como óptimo local del problema NLP.	102

AGRADECIMIENTOS

A la M.B. Lorena Pedraza Segura y al Dr. Antonio Flores Tlacuahuac.
Por su apoyo, dirección y enseñanzas durante el desarrollo de la presente tesis.

Al Dr. Mauricio Sales Cruz.
Por el tiempo que me brindo para la corrección y sugerencias que enriquecieron el escrito de la tesis.

A la Universidad Iberoamericana
Por el financiamiento que me otorgó durante el estudio de la maestría.

Al Dr. Martín Rivera Toledo.
Por sus consejos y apoyo durante mi estancia en la maestría.

A mis padres: Isabel Cuaya y Valente Toribio.
Por el soporte emocional que me han brindado siempre.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El uso continuo de los combustibles fósiles para satisfacer la demanda de energía del mundo ha incrementado las concentraciones de CO₂ en la atmósfera y esta es la principal causa del calentamiento global. Los combustibles fósiles son responsables del 73% de la producción del CO₂. La gran preocupación sobre el tema del calentamiento global y la creciente disminución de las reservas de los combustibles fósiles han incrementado el interés en el desarrollo de métodos para mitigar la emisión de los gases de efecto invernadero y aprovechar las nuevas fuentes de combustibles renovables. [4]

El bioetanol es una alternativa atractiva de combustible debido a que puede ser obtenido de fuentes renovables (Biomasa) y este está oxigenado, lo que provee el potencial para reducir las emisiones particulares de los motores de compresión-ignición que son los principales consumidores de combustibles fósiles. La biomasa celulósica es una atractiva fuente de materia prima ya que esta disponible en grandes cantidades en la naturaleza; en general se puede clasificar convenientemente en tres tipos: *la materia que contiene sacarosa (Disacárido de glucosa + fructosa) como la caña de azúcar, la materia que contienen almidones (polisacárido) como el maíz o el trigo, y la materia lignocelulósica que contiene hemicelulosa, celulosa y lignina como las maderas, rastrojos, residuos sólidos urbanos y pastos.* [22]

Es bien sabido que los principales productores de bioetanol en la actualidad son Brasil y Estados Unidos, y que este es producido a partir de la caña de azúcar y el maíz, respectivamente. Sin embargo, el cultivo de estas materias primas para la producción de bioetanol causan más erosión del suelo y utilizan fertilizantes a base de nitrógeno, que son limitantes ambientales de gran importancia para su uso.

La materia lignocelulósica en cambio es una opción más viable para la producción de bio-

etanol puesto que es uno de los recursos más abundantes en la tierra (rastros de maíz, paja de trigo, maderas y cultivos energéticos). Los cultivos lignocelulósicos perennes son fuentes prometedoras de materia prima a causa de sus altos rendimientos, bajos costos, su buena adaptabilidad a tierras de baja calidad (lo cual está más disponible para los cultivos energéticos), y su bajo impacto ambiental. La estructura básica de la materia lignocelulósica consiste de tres polímeros básicos: celulosa $(C_6H_{10}O_5)_x$, hemicelulosa como xilanos $(C_5H_8O_4)_m$, y lignina $[C_9H_{10}O_3 \cdot (OCH_3)_{0,9-1,7}]_n$ en el tronco, follaje y corteza. Gracias a la composición de la materia lignocelulósica se pueden obtener principalmente dos tipos de monosacáridos: *glucosa* y *xilosa*, los cuales mediante el proceso de fermentación pueden producir bioetanol.

Pero hablar en estos momentos de la obtención de bioetanol a partir de material lignocelulósico conduce a un costo relativamente alto en la producción, si se basa en la tecnología con la que se cuenta en la actualidad. Para afrontar este problema es necesario enfocarse en el desarrollo tecnológico de ciertas operaciones que son de gran importancia en la producción del bioetanol como:

1. Hacer más eficiente el proceso de de-polimerización de la celulosa y hemicelulosa a azúcares solubles
2. *Hacer más eficiente el proceso de fermentación del hidrolizado que contenga mezclas de azúcares de cinco carbonos (Pentosas) y seis carbonos (Hexosas), además de disminuir la concentración de componentes inhibidores de la fermentación*
3. Utilizar integración energética de procesos para minimizar la demanda de energía de la producción del bioetanol
4. Utilizar los remanentes del material lignocelulósico que no se utilizan en la producción del bioetanol (ej. Lignina) para desarrollar nuevos productos a partir del concepto de biorefinerías, lo cual disminuirá el costo de la producción del bioetanol. [20]

El presente trabajo se dirige al desarrollo del punto 2 porque es un tema de gran interés en el área de modelado matemático, además de ser una parte fundamental para el diseño del proceso y su posterior escalamiento. Se estudió la fermentación de mezclas de azúcares (Glucosa y Xilosa) a distintas concentraciones utilizando un co-cultivo de *P. Stipitis* y *S. Cerevisiae*. El trabajo abarca la parte experimental, el modelamiento matemático y la estimación de parámetros del modelo propuesto.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. Química y Bioquímica para la Producción de Bioetanol

El conocimiento de la química de los materiales lignocelulósicos y la bioquímica de las levaduras son la columna que soporta la producción de bioetanol a partir de biomasa. La composición del material lignocelulósico es la parte primordial para la selección de los pretratamientos que permitan producir los azúcares que son la fuente de carbono para la fermentación. La bioquímica de las levaduras, *P. stipitis* y *S. cerevisiae*, son también factores determinantes para la producción de bioetanol ya que conociendo esta parte se pueden determinar las condiciones de proceso, además ese conocimiento es una parte importante para la modelación de la fermentación del co-cultivo.

2.1.1. Materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos son fuentes renovables que pueden ser utilizados directa o indirectamente para la producción de biomoléculas y productos químicos. Sin embargo, algunas de estas aplicaciones están limitadas por la asociación tan cerrada que existe entre los tres componentes principales de la pared celular de la planta, la celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 2.1).

La celulosa es un polímero de glucanos con unidades de *D*-glucopiranososa, las cuales están unidas mediante enlaces β -(1 \rightarrow 4) glicosídicos. La hemicelulosa está compuesta por una variedad de polímeros de polisacáridos con una polidispersidad menor que la celulosa y contiene principalmente azúcares como *D*-xilosa, *D*-glucosa, *L*-arabinosa, *D*-manosa, ácido *D*-glucopiranosilurónico y ácido *D*-galactopiranosilurónico con cantidades menores de otros azúcares. La lignina es principalmente un polímero aromático, amorfo y altamente complejo, de unidades de *fenilpropano*. Los precursores de la biosíntesis de la lignina son el alcohol *p*-cumarílico, el alcohol coniferílico, y el alcohol sinapílico unidos por enlaces C–O–C y C–C. [35] Como consecuencia de la

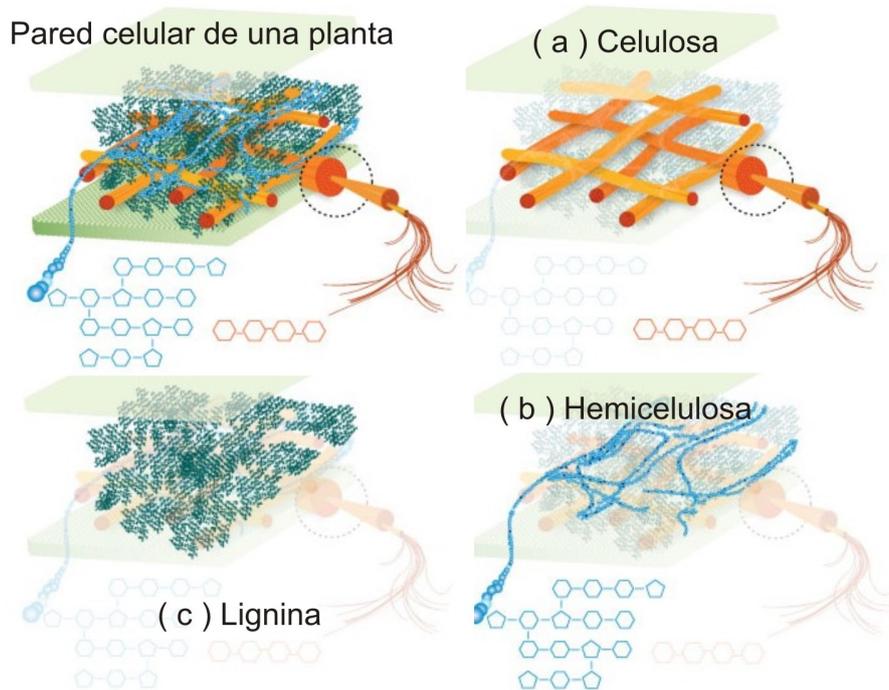


Figura 2.1: Estructura de la pared vegetal.

composición de los materiales lignocelulósicos la sacarificación posterior se considera una forma prometedora para producir combustibles y productos químicos; se han desarrollado diferentes procesos para la generación de los azúcares fermentables a partir del material lignocelulósico, los métodos pueden ser biológicos, físicos y químicos.

2.1.2. Pretratamiento de materiales lignocelulósicos

Los pretratamientos son una etapa primordial e importante en la generación de azúcares fermentables, estos tienen el mayor peso en el costo de producción y su éxito lleva a obtener substratos útiles para la producción de combustibles o productos químicos renovables. [30] El pretratamiento puede tener implicaciones significativas en la configuración y la eficiencia del resto del proceso de producción de combustibles o químicos y, en última instancia, también en el aspecto económico. La etapa de pretratamiento promueve la alteración de la matriz lignocelulósica de modo que se facilite la hidrólisis ácida o catalizada por enzimas. El objetivo del pretratamiento es remover la lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa, e incrementar la porosidad del material lignocelulósico. Un pretratamiento exitoso es aquel que cumple los siguientes requisitos: (i) aumentar la formación de azúcares o mejorar la sucesiva capacidad de generar azúcares mediante la hidrólisis, (ii) evitar la degradación o pérdida de carbohidratos, (iii) evitar la producción de subproductos que son inhibidores para los sucesivos procesos de hidrólisis y fermentación, y (iv) ser rentable. [30]

Los métodos de los pretratamientos pueden ser divididos en las siguientes categorías: físicos (molienda o picado), fisicoquímicos (pretratamiento de vapor/autohidrólisis, hidrotermólisis, oxidación húmeda), químicos (alcalinos, ácido diluido, agentes oxidantes, y solventes orgánicos), biológicos, eléctricos, o una combinación de estos. [4, 30]

2.1.2.1. Pretratamientos físicos

El objetivo de estos pretratamientos es reducir la cristalinidad de la celulosa y la reducción del material a través del troceo, el picado y el molido del material lignocelulósico. El tamaño del material es usualmente entre 10-30 *mm* después del troceado y de 0.2-2 *mm* después de la molienda o picado. El tamaño final de la partícula y las características de la biomasa determinan la cantidad de poder requerido para la operación de reducción mecánica de los materiales agrícolas. [30]

2.1.2.2. Pretratamientos fisicoquímicos

Entre los pretratamientos que utilizan métodos fisicoquímicos en su proceso tenemos la explosión de vapor/autohidrólisis, la explosión con amoníaco (AFEX) y la explosión con CO₂. En estos pretratamientos la biomasa sufre cambios físicos y químicos en la matriz de la pared celular.

En la explosión de vapor la biomasa es tratada con vapor saturado a altas presiones, y posteriormente la presión es reducida rápidamente, lo cual causa que el material padezca una explosión por descompresión. La explosión de vapor es llevada a cabo a una temperatura que varía de 160-260 °C por un tiempo de residencia que puede ser de unos minutos antes que el material sea expuesto a la presión atmosférica. El proceso degrada la hemicelulosa removiéndola de las microfibras de la pared celular lo que incrementa la accesibilidad a la celulosa, y transforma a la lignina, que es parcialmente removida hasta un límite redistribuyéndola en la superficie de la fibra como resultado de su depolimerización; estos efectos son el resultado de la alta temperatura que se utiliza. Las limitaciones de la explosión de vapor incluyen: la destrucción de solo una porción de la fracción de xilano extraída, la destrucción incompleta de la matriz lignina-carbohidrato, y la generación de compuestos que podrían inhibir a los microorganismos que se usarán en procesos posteriores. [41]

En el pretratamiento AFEX la biomasa es expuesta en amoníaco líquido a altas temperaturas y presiones por un periodo de tiempo, y posteriormente la presión es reducida rápidamente. El AFEX puede mejorar significativamente la velocidad de fermentación de varias plantas perennes y pastos. Durante el pretratamiento solo una pequeña cantidad del material sólido es solubilizada; así que, no se remueve gran cantidad de hemicelulosa o lignina. La estructura del material

es cambiada, como resultado incrementa la retención de agua y se incrementa la digestibilidad. Sin embargo, el proceso AFEX no es muy efectivo para la biomasa con alto contenido de lignina.

En la explosión con CO_2 , se plantea la hipótesis de que el CO_2 se transforma en ácido carbónico cuando es disuelto en agua, y el ácido incrementa la velocidad de la hidrólisis. Las moléculas de CO_2 son comparables en tamaño a las de agua y amoníaco y pueden ser capaces de penetrar en los poros accesibles a estas moléculas en la matriz celulósica. Se sugiere que el CO_2 es tanto útil para la hidrólisis de la hemicelulosa como de la celulosa. Además, la baja temperatura previene cualquier descomposición apreciable de los monosacáridos por el ácido. Una vez que el sistema es liberado de la presurización del CO_2 , la alteración de la estructura celulósica produce el incremento de la superficie de accesibilidad del substrato a hidrolizar. Debido a que la explosión con CO_2 es operada a bajas temperaturas, esto no provoca degradación de los azúcares como sucede con la explosión de vapor. [30]

2.1.2.3. Pretratamientos químicos

Este tipo de procesos atacan directamente a los enlaces existentes en la matriz celulósica alterando su estructura. El ataque se lleva a cabo utilizando un medio ácido o básico, también agentes oxidantes o solventes. La hemicelulosa y la lignina son la parte más afectada en este tipo de pretratamientos generando corrientes ricas en lignina, oligosacáridos y monosacáridos, y la fracción de la celulosa restante sufre cambios en su estructura cristalina.

- ◇ Los pretratamientos ácidos normalmente tienen como objetivo alcanzar altos rendimientos de azúcares a partir de la biomasa lignocelulósica, además pueden mejorar el resultado de la hidrólisis enzimática. A pesar de ser un tratamiento poderoso para la hidrólisis de la celulosa, los ácidos concentrados son tóxicos, corrosivos, peligrosos, y por lo tanto es necesario que los reactores sean resistentes a la corrosión, lo que tiene como consecuencia que el proceso sea muy caro. Además, el ácido concentrado debe ser recuperado después de la hidrólisis para hacer que el proceso sea más factible económicamente.
- ◇ El pretratamiento con ácido diluido ha sido desarrollado exitosamente para el procesamiento del material lignocelulósico. El ácido diluido remueve y recupera efectivamente la mayoría de la hemicelulosa como azúcares disueltos, y el rendimiento de la glucosa que se obtiene de la celulosa incrementa en función de la remoción de hemicelulosa a casi el 100% cuando la hidrólisis de la hemicelulosa ha sido completa, a pesar de estas ventajas el costo de este proceso es relativamente más caro que el de los procesos como el la explosión de vapor y el AFEX. La neutralización del pH es necesaria para el efluente que se utilizará en la hidrólisis enzimática o el proceso de fermentación, también es sabido que

el pretratamiento tiene influencia negativa en la hidrólisis enzimática de la biomasa. [30]

- ◇ El proceso del pretratamiento alcalino utiliza temperaturas y presiones bajas a diferencia de otras tecnologías de pretratamiento, pero los tiempos de reacción son del orden de horas a días en lugar de minutos o segundos. Comparado con los procesos ácidos, los procesos alcalinos producen menor degradación de azúcares, y muchas de las sales cáusticas pueden ser recuperadas y/o regeneradas. El proceso del pretratamiento con cal involucra lechar la cal con agua, rocear sobre la biomasa, y el almacenamiento del material en una pila por un periodo de horas o semanas. El tamaño de la partícula de biomasa generalmente es de 10 mm o menor, y elevar la temperatura en el proceso reduce el tiempo de contacto. El tratamiento con NaOH diluido del material lignocelulósico produce su inchamiento, lo que lleva a un incremento en el área de superficie interna, una reducción en el grado de polimerización, la disminución de la cristalinidad, la separación de los enlaces estructurales entre la lignina y los carbohidratos, y la alteración de la estructura de la lignina. Este pretratamiento ha mostrado ser efectivo para el material lignocelulósico que contiene un nivel relativamente bajo de lignina del 10-18 %. [30]

- ◇ La delignificación oxidante utiliza como principal agente el H_2O_2 . Este proceso se lleva a cabo mediante una reacción nucleofílica, donde el HO_2^- realiza un ataque nucleofílico a un carbono deficiente de electrones en la lignina, además la hemicelulosa y los grupos cromóforos también son atacados. Este pretratamiento mejora enormemente la susceptibilidad de la biomasa a la hidrólisis enzimática. La adición de base a este proceso oxida fácilmente a la lignina, de este modo los polisacáridos son más susceptibles a la hidrólisis enzimática. La generación de inhibidores como *furfural* y *5-hidroxi-metil-furfural* en este tipo de procesos es nula. [4, 30]

2.1.2.4. Pretratamientos Biológicos

Los pretratamientos biológicos usan hongos para solubilizar la lignina. Este método es seguro y amigable con el medio ambiente, y es recomendado cada vez más como un proceso que no requiere gran cantidad de energía para la remoción de lignina de la biomasa lignocelulósica, a pesar de la amplia degradación de la lignina. La degradación de la lignina y la hemicelulosa en estos procesos se lleva a cabo a través de microorganismos tales como hongos de podredumbre café, blanca y blanda. Los hongos de podredumbre café principalmente atacan a la hemicelulosa, mientras que los de podredumbre blanca y blanda atacan ambas a la hemicelulosa y la lignina. La degradación de la lignina por hongos de podredumbre blanca ocurren mediante la acción de enzimas degradadoras de lignina tales como peroxidasa y laccasa. Estas enzimas son reguladas por la fuente de carbono y nitrógeno. Los hongos de podredumbre blanca son los más efectivos

para el pretratamiento biológico de los materiales lignocelulósicos. Las ventajas del pretratamiento biológico incluyen los bajos requisitos de energía y las condiciones ambientales suaves. Sin embargo, la velocidad de hidrólisis en la mayoría de los procesos de los pretratamientos biológicos son muy lentos. [4, 30]

2.1.3. Hidrólisis

El procesamiento del material lignocelulósico a bioetanol consiste de cuatro operaciones principales: el pretratamiento, la hidrólisis, la fermentación y la purificación del etanol (Figura 2.2). En la sección anterior se describe que pretratamientos se pueden aplicar durante la primera fase del proceso, en estos pretratamientos frecuentemente se obtienen un efluente sólido y uno líquido. Los efluentes líquidos pueden contener lignina soluble, oligosacáridos parcialmente hidrolizados, monosacáridos y subproductos de la degradación de los monosacáridos, mientras que los efluentes sólidos contienen un material compuesto principalmente por celulosa estructuralmente alterada con trazas de lignina y hemicelulosa.

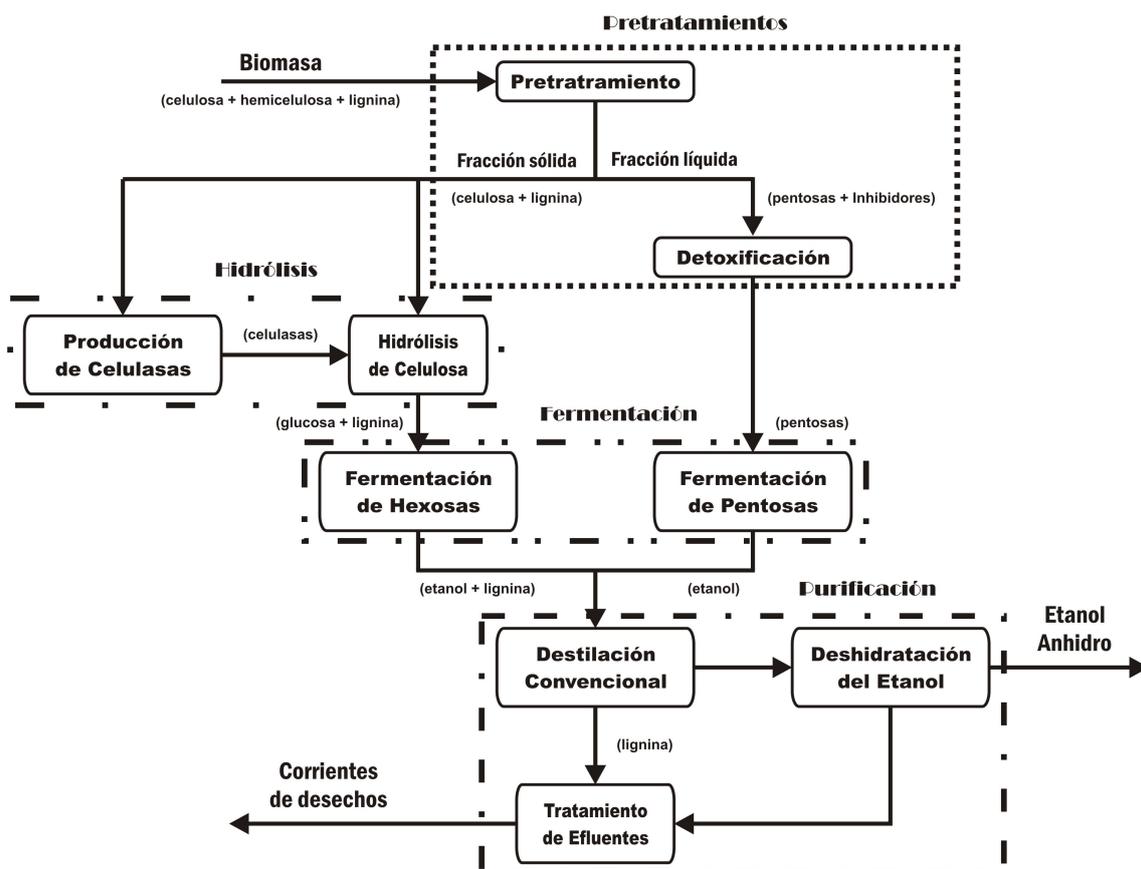


Figura 2.2: Diagrama genérico de bloques para la producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico.

La hidrólisis es la segunda etapa de la producción de bioetanol, donde los efluentes generados del pretratamiento son procesados para aumentar el rendimiento de la generación de monosacáridos. Las tecnologías para la hidrólisis de biomasa incluyen la hidrólisis ácida, la hidrólisis alcalina y la hidrólisis enzimática. Los procesos de la hidrólisis ácida y la alcalina han sido ya mencionados en los pretratamientos químicos, la diferencia en esta etapa es que los efluentes a procesar ya han sufrido un ataque previo lo que permite tener mayor accesibilidad y superficie de reacción para que la hidrólisis ácida o alcalina sea más eficiente.

La hidrólisis enzimática se basa en los mismos principios de la descomposición microbiana de la biomasa como una parte integral del ciclo global del carbono. La investigación sobre el mecanismo de degradación microbiana de la celulosa y la hemicelulosa han provisto del marco conceptual para una conversión enzimática de la pared celular de la planta. Muchos microorganismos incluyendo los hongos y bacterias han sido reportados por su capacidad para hidrólizar la biomasa. Para esta tarea los microorganismos producen múltiples enzimas especializadas (xilanasas, ligninasas y celulasas) para degradar la celulosa cristalina, la hemicelulosa heterogénea y la lignina; las enzimas interactúan sinérgicamente en alta concentración local sobre el enlace a atacar.

Para la degradación de la celulosa a monosacáridos existen tres principales clases de celulasas: (1) las *endoglucanasas*, las cuales actúan aleatoriamente sobre las cadenas solubles e insolubles de celulosa, (2) las *exoglucanasas*, las cuales incluyen las *glucanhidrolasas* que preferentemente liberan monómeros de glucosa del final de la cadena de celulosa y las *celobihidrolasas* que preferentemente liberan celobiosa del final de la cadena de celulosa, y (3) las *β -glucosidasas*, las cuales liberan *D-glucosa* de los dímeros de celobiosa y la celodextrina soluble.

En el caso de la hemicelulosa debido a su composición heterogénea su degradación a monosacáridos requiere de una gran variedad de enzimas para romper los diferentes enlaces químicos. Las xilanasas que permiten la hidrólisis completa de la hemicelulosa son: (1) las *Endo-1,4- β -xilanasas* que depolimerizan a xilanos a el esqueleto de xilanos (hemicelulosa) mediante una hidrólisis aleatoria y (2) las *1,4- β -D-xilosidasas* que liberan pequeños oligosacáridos de esté. Los grupos laterales presentes en el xilano son liberados mediante (3) las *α -L-arabinofuranosidasas* que hidrolizan los grupos *α -L-arabinofuranosil* terminales no reducidos de arabinanos, arabinoxilanos, y arabinogalactanos; (4) las *α -D-glucuronidasas* son requeridas para la hidrólisis de los enlaces *α -1,2-glicosídicos* entre la xilosa y el ácido D-glucurónico o su enlace 4-O-metil éter; (5) las *esterasas* rompen los enlaces de la xilosa del ácido acético, las cadenas residuales laterales de arabinosa del ácido ferrúlico y las cadenas residuales laterales del ácido p-cumárico. [49, 55, 58]

Las corrientes generadas en estos procesos son ricas en pentosas, hexosas o mezclas de am-

bas, y éstas son la fuente de carbono primordial para la siguiente etapa del proceso que es la fermentación (Figura 2.2).

2.1.4. Fermentación

La fermentación involucra microorganismos que utilizan los azúcares fermentables como alimento y en el proceso producen alcohol etílico y otros subproductos. Los hidrolizados de material lignocelulósico son una fuente de carbono útil para la fermentación pero estos no solo contienen glucosa sino también varios monosacáridos tales como xilosa, manosa, galactosa, arabinosa y oligosacáridos. De manera que la fermentación de estos hidrolizados requiere de microorganismos que sean capaces de metabolizar eficientemente los azúcares presentes aumentando el rendimiento de la producción de bioetanol, con la finalidad de escalar industrialmente este proceso con éxito. Estos microorganismos se califican como etanologénicos, pero en la actualidad solo son capaces de convertir solo una porción de los azúcares (hexosas o pentosas) del hidrolizado a bioetanol.

Entre los microorganismos fermentadores de hexosas tenemos que la más efectiva es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por su alta producción de etanol, su alta tolerancia al etanol y otros inhibidores; las bacterias etanologénicas más prometedoras para la explotación industrial son *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Zymomonas mobilis*. Entre los microorganismos fermentadores de pentosas se encuentran las bacterias nativas y modificadas genéticamente; además de levaduras como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Candida parapsilosis* [4, 44]; y los hongos filamentosos.

La fermentación puede llevarse a cabo en un proceso por lote, semi continuo o continuo. La selección del proceso más apropiado depende de las propiedades cinéticas del microorganismo y el tipo de hidrolizado lignocelulósico además de los aspectos económicos inherentes al proceso. Los parámetros que determinan el desempeño de la fermentación son: el intervalo de temperatura, el intervalo de pH, la tolerancia al alcohol, la velocidad de crecimiento, la productividad, la tolerancia osmótica, la especificación del sustrato, el rendimiento, la estabilidad genética y la tolerancia a inhibidores. [4]

Debido a la variada composición de azúcares en los hidrolizados de material lignocelulósico se han realizado estudios que proponen el uso de co-cultivos para mejorar el consumo de la mezcla de sustratos en busca de aumentar el rendimiento en la producción de etanol.

En la década de los 80's se realizaron estudios independientes para la conversión de celulosa a etanol utilizando co-cultivos. Khan *et al* [29] utilizaron dos microorganismos mesofílicos anaerobios obteniendo un rendimiento de 0.8 mol de etanol por mol de celulosa. Leschine *et al* [33] desarrollaron una fermentación utilizando un co-cultivo de *Clostridium* que hidroliza

la celulosa a celobiosa y glucosa, y además depolimeriza la celobiosa a glucosa; la glucosa es fermentada a etanol utilizando *Zymomonas mobilis* obteniendo una concentración de 7 g de etanol en 100 mL. Volfová *et al* [53] llevaron a cabo la fermentación de celulosa cristalina al 2% con un co-cultivo de una bacteria termofílica y una especie de *Clostridium* obteniendo 4.6–5.1 g/L de etanol a temperaturas de 55–60 °C, se observó que la concentración de celulosa y la concentración de etanol >20 g/L afectan al rendimiento de etanol y la degradación de celulosa a glucosa respectivamente.

El almidón es otra fuente de azúcares que se utiliza en la generación de etanol, en la actualidad Estados Unidos produce su etanol carburante a partir de almidón de maíz. Abouzied *et al* [1] utilizaron un co-cultivo de *Saccharomycopsis fibuligera* (amilolítica) y *Saccharomyces cerevisiae* (no amilolítica) para fermentar almidón 10% p/v hasta una conversión mayor a 90% del máximo teórico, a un pH de 5 a 6. Al incrementar la cantidad de *S. cerevisiae* en la relación de levaduras se observó que el rendimiento del etanol incrementa del 35–40% y llevar a cabo la fermentación en condiciones anaeróbicas o limitada aerobicamente incrementa el rendimiento del etanol casi al doble. Otro trabajo referente a la fermentación directa de almidón a etanol fue realizado por He *et al* [21] utilizando un co-cultivo de una bacteria amilolítica *Peaenibacillus sp.* y diferentes cepas de *Z. mobilis* para fermentar almidón obtenido de papa dulce. En este co-cultivo la bacteria hidrolizó el almidón a glucosa que la levadura fermentó a etanol, el mejor rendimiento fue de 6.89 g/L; la adición de glucosa al medio no tuvo efecto negativo en la producción de etanol. Al escalar el proceso a una concentración de 50 g/L se alcanzó un rendimiento teórico del 23.24% de etanol aunque no se consumió toda la glucosa generada (2.3 g/L residual), esto se debe posiblemente a la baja eficacia de digestión del almidón o la utilización rápida de la glucosa por la *Z. mobilis*.

Otra propuesta de sustrato son los residuos de la industria láctea, Kamini *et al* [26] comparó la fermentación de lactosa (200 g/L) obtenida de suero lácteo residual a etanol utilizando un cultivo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL 665 (36 g/L de etanol) y un co-cultivo de *K. fragilis* NRRL 665 y *Z. mobilis* (55 g/L de etanol), la tasa de producción de etanol y la tasa de consumo específico de sustrato incrementó en el co-cultivo, sin embargo los azúcares residuales también aumentaron. Guo *et al* [19] utilizaron suero residual de queso para producir etanol, el estudio comparó el uso de mono-cultivos y co-cultivos de *K. marciianus* y *S. cerevisiae* de manera libre o inmovilizada. El mejor desempeño lo mostró el co-cultivo, un factor a tomar en cuenta es la proporción de las levaduras en el co-cultivo para lograr altos rendimientos de etanol. El mejor desempeño en la fermentación se obtuvo utilizando un co-cultivo donde la *K. marciianus* inmovilizada y la *S. cerevisiae* libre con una velocidad de producción de etanol de 0.88 g/L/h.

La fermentación de hidrolizados lignocelulósicos y mezclas de azúcares utilizando co-cultivos son un área de investigación de gran importancia para la producción de etanol como combustible

renovable. Murray *et al* [37] utilizaron un co-cultivo de una mutante *Clostridium saccharolyticum* y *Zymomonas mobilis* para fermentar un hidrolizado de hojuelas de alamo (mezcla de 70 % hexosas y 30 % pentosas) alcanzando un rendimiento máximo de 93.2 % teórico. En tanto que Asther *et al* [2] fermentaron una mezcla sintética de celobiosa, glucosa y xilosa utilizando un co-cultivo de *Zymomonas anaerobia* y una mutante de *Clostridium saccharolyticum* tolerante al etanol (75 g/L), produciendo 50 g/L de etanol a partir de 130 g/L de azúcares totales.

Laplace *et al* [32] desarrollo tres esquemas de fermentación posibles para mezclas de glucosa y xilosa utilizando las cepas *P. stipitis* Y7124, *C. shehatae* ATCC 22984, *S. cerevisiae* CBS1200 y *Z. mobilis* ATCC10988. Los esquemas de fermentación son:

- i. el esquema consiste en desarrollar una fermentación secuencial donde la fermentación de la glucosa debe ser realizada antes de la fermentación de la xilosa, el etanol producido en la primera fermentación debe ser removido antes de la fermentación de la xilosa. En el esquema figuran como mejores candidatos la *P. stipitis* y la *Z. mobilis*. Una cepa más tolerante al etanol que fermente xilosa sería una opción para evitar la remoción del etanol obtenido de la glucosa.
- ii. el segundo esquema se apoya del concepto de co-cultivo, un convenio entre *C. shehatae* y *S. cerevisiae* puede imaginarse fácilmente ya que sus parámetros cinéticos son poco afectados por el grado de aereación del medio de cultivo. La restricción que se puede haber es la poca tolerancia que tienen las levaduras que fermentan la xilosa, por esta razón las concentración inicial de azúcar se limita a no mayor de 50 g/L debido a la rápida producción de etanol a partir de la glucosa, además de no cumplir con los requerimientos de etanol necesarios para la operación de destilación. Una cepa más tolerante al etanol que fermente xilosa sería una mejora muy interesante para el esquema.
- iii. el esquema consiste en llevar a cabo la fermentación de cada azúcar por separado utilizando el microorganismo más adecuado, siendo viable para los hidrolizados de material lignocelulósico, los cuales producen corrientes separadas de xilosa y glucosa de la hemicelulosa y la celulosa, respectivamente. Gracias a este esquema se puede fermentar la xilosa (50 g/L) que representa alrededor del 30 % de los azúcares fermentables del material lignocelulósico y además fermentar la glucosa (100 g/L) evitando los problemas de la inhibición por el etanol producido; con estas concentraciones de azúcares es posible alcanzar una concentración suficientemente alta de etanol que no sea penalizada por el proceso de destilación.

Unos años más adelante Laplace *et al* [31] llevaron a cabo el estudio de las condiciones para la co-fermentación de una mezcla de glucosa y xilosa (70:30 %) utilizando una *Saccharomyces diastaticus* mutante y *Pichia stipitis* para la producción de etanol en régimen permanente. Evaluaron el efecto de la velocidad de dilución (D) y la concentración inicial de los azúcares (S0).

La D fue evaluada a 0.006, 0.015 y 0.023 (1/h), observandose que el incremento en D lleva a un incremento en la producción de etanol a expensas de la producción de las células. Durante la evaluación de D altas se observó que la concentración de etanol puede afectar la proporción relativa de las células de *P. stipitis*. El incremento en S0 de 20-80 g/L resulta tener un efecto inverso de la proporción de las cepas de levadura inicial. El lavado rápido de la *P. stipitis* lleva a un decremento significativo en el consumo de xilosa y como resultado de su baja tolerancia al etanol, este aspecto fisiológico es el principal paso limitante del proceso de cocultivo.

En la década pasada Rouhollah *et al* [45] realizaron el estudio de la fermentación de mezclas de azúcares (30 g/L glucosa, 30 g/L xilosa, 12 g/L manosa, 8 g/L galactosa) utilizando cultivos individuales y co-cultivos de las cepas *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *K. marxianus*. *K. marxianus* mostró el mejor rendimiento de etanol en la fermentación de los azúcares de manera individual a excepción del consumo de xilosa en la cual domina la *P. stipitis*. En la fermentación de las mezclas de azúcares con las cepas de forma individual el mejor rendimiento lo presentó la *P. stipitis* al tener un rendimiento de 30.23 g/L de etanol. En el caso de los cocultivos se observó que el mejor convenio desde el punto de vista de rendimiento es *K. marxianus* y *P. stipitis* por su alta concentración de etanol (31.87 g/L) y un consumo del 99% de los azúcares fermentables. Aunque el cocultivo de *S. cerevisiae* y *P. stipitis* no consumió todos los azúcares fermentables y la concentración de etanol fue menor (29.45 g/L) la mejora que se puede observar es que la velocidad de fermentación redujo el tiempo de residencia a 60 horas cuando alcanza la concentración máxima de etanol.

Por su parte Eiteman *et al* [14] fermentaron mezclas de glucosa y xilosa utilizando dos cepas de *Escherichia coli* (co-cultivo) las cuales son selectivas en el consumo de la fuente de carbono. La ventaja que presentó el proceso fue su adaptación a las fluctuaciones en la corriente de alimentación gracias a la selectividad de las cepas por la fuente de carbono, además del uso de un proceso fed-batch que previene la acumulación de azúcares y permite un rendimiento alto de etanol y alta productividad. La robustez operacional del proceso es el distintivo de la estrategia del proceso, y esta constituye un gran avance hacia la utilización de material lignocelulósico. La represión catabólica debida a la presencia de glucosa es irrelevante por el uso de las dos cepas. Los resultados de la investigación mostraron que una población de cepas selectivas, donde cada cepa consume un tipo de azúcar, mejora la capacidad para metabolizar mezclas de azúcares que una sola cepa que consuma múltiples tipos de azúcar.

Un enfoque nuevo para el proceso de co-cultivos lo presentaron Fu *et al* [18], la fermentación de mezclas de glucosa/xilosa a etanol fue exitosa utilizando un cocultivo de *Z. mobilis* inmovilizada y *P. stipitis* libre, utilizando todas las azúcares en el medio. Sin embargo al utilizar continuamente el cultivo inmovilizado en condiciones batch se disminuyó su desempeño. Una modificación del reactor que remueve *Z. mobilis* inmovilizada durante la co-fermentación alivia

el daño realizado a la levadura inmovilizada como consecuencia el desempeño de la fermentación fue estabilizado. Al aumentar la concentración inicial de azúcares a 75 g/L el rendimiento del etanol disminuyó debido a la reasimilación del etanol en etapas posteriores del proceso, sin embargo la productividad del etanol de 0.878 g/L/h es favorable. También se fermentó un hidrolizado de bagazo de caña adicionado con azúcar (32.14 g/L de glucosa y 21.42 g/L de xilosa) mostrando alta eficacia en el proceso.

A pesar de la información limitada disponible acerca de la investigación de los co-cultivos, los reportes mostrados anteriormente muestran que los co-cultivos son una opción viable para la producción de etanol a partir de material lignocelulósico. La fermentación de co-cultivos provee la oportunidad de lograr una conversión simultánea de hexosas y pentosas, maximizar la velocidad del uso del sustrato, incrementar el rendimiento de etanol y la velocidad de producción, y reducir costos de proceso. Sin embargo, se trata de una tecnología inmadura pero prometedora, como consecuencia su escalamiento a la industria requiere superar algunos retos abriendo campos de investigación nuevos que requieren de la atención de la ciencia.

2.2. Modelado de co-cultivos

Los co-cultivos son muy comunes en los ecosistemas, pero hay muy pocos estudios reportados a causa de la naturaleza compleja que presenta la dinámica y el control de estos sistemas. El desarrollo de un modelo matemático que represente los procesos que ocurren en el co-cultivo es difícil debido a las interacciones que ocurren entre los microorganismos, la preferencia por los sustratos, y la interacción con los productos que pueden estimular, inhibir o ser nuevos sustratos para los microorganismos. El modelado matemático consiste en explicar de forma cuantitativa el comportamiento de un proceso utilizando un conjunto de relaciones (funciones) entre las variables en el sistema, y generalmente pueden predecir las variables de salida, "el estado del sistema", a partir de las variables de entrada. Los modelos de fermentación pueden ser divididos aproximadamente en 4 grupos dependiendo del nivel de detalle en el modelo, ellos son: modelos no-estructurados, modelos estructurados, y en segregados y no-segregados respectivamente. En general, los modelos cinéticos requieren de parámetros cinéticos y los parámetros cinéticos son determinados a partir de procedimientos experimentales ajustando los datos a diversos tipos de funciones.

En la literatura el modelamiento matemático de los co-cultivos es escaso aunque se han reportado algunos trabajos. Broholm *et al* [10] realizaron el modelado del crecimiento de un co-cultivo de bacterias para la degradación de metano y tricloroetileno (TCE) basados en el concepto de inhibición competitiva. El modelo (no estructurado) que describió exitosamente los resultados experimentales a diferentes concentraciones iniciales de metano y TCE manteniendo constan-

tes las condiciones de crecimiento de las bacterias, pero bajo otras condiciones del crecimiento bacteriano el modelo fallo. Esto se debe a que los parámetros cinéticos no son constantes en el tiempo cuando las condiciones de crecimiento bacterial cambian durante los experimentos.

Por su parte Katoh *et al* [27] desarrollaron un modelo matemático (estructurado) que representa el co-cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* que consume glucosa fermentándola a lactato, y el lactato es fermentado a poli- β -hidroxibutirato (PHB) utilizando *Alcaligenes eutrophus* en un solo paso. El modelo se desarrollo utilizando los balances de masa para ambos microorganismos y teniendo en cuenta que *A. eutrophus* acumula PHB en el interior de la célula como respuesta a la limitación de un nutriente esencial, en particular la limitación del nitrógeno, pero el problema es el paro del crecimiento de las células por la limitación de nutrientes, como consecuencia la productividad de PHB se limita. Para poder abstraer este fenómeno se recurrió al análisis de flujo metabólico (metabolic flux analysis) generando un modelo estequiométrico basado en las rutas metabólicas. Los parámetros del modelo fueron sintonizados mediante el ajuste a datos experimentales.

Mu *et al* [36] modelaron la producción de hidrógeno a través de mezclas de cultivos anaeróbicos. El modelo no estructurado se utilizó para describir la cinética de la producción de biológica de hidrógeno a partir de sacarosa en un proceso batch. El modelo describe la cinética del uso del sustrato utilizando la ecuación de Michaelis-Menten, el modelo logístico fue adaptado para describir la cinética de crecimiento microbiano y la cinética para la formación de producto empleo la ecuación modificada de Gompertz. La relación entre la biomasa y el producto para la producción anaeróbica de hidrógeno puede ser simulada por el modelo de Luedeking-Piret, y la relación entre el sustrato y los productos fue asociada con el crecimiento de la biomasa, la correlación que la simula es una relación lineal donde la pendiente es el rendimiento del producto con respecto al sustrato. Los parámetros cinéticos se determinaron de manera analítica a partir de datos experimentales.

Otro modelo de co-cultivo fue desarrollado por Kedia *et al* [28] que en la búsqueda de producir nuevos alimentos probióticos mediante un co-cultivo de una levadura y la bacteria *Lactobacillus reuteri* para aportar mejoras en el aroma, sabor y pH. El co-cultivo utilizo un modelo logístico empírico y la ecuación de Lotka-Volterra que simula el crecimiento microbiano de la levadura y la bacteria cuando las células inhiben su propio crecimiento debido a el agotamiento de un nutriente limitante, la acumulación de producto, o por razones no definidas. Los parámetros cinéticos se determinaron analíticamente a partir de datos experimentales.

Durante el desarrollo del proceso para la producción de kefiran Cheirsilp *et al* [11] observaron que la velocidad de crecimiento microbiano y la producción de kefiran utilizando *Lactobacillus kefiranofaciens* mejoró significativamente cuando este era parte de un co-cultivo con *Saccha-*

Saccharomyces cerevisiae en comparación con un cultivo puro de *L. kefiranofaciens*, es claro que la interacción entre *L. kefiranofaciens* y *S. cerevisiae* permiten obtener alta productividad. En la búsqueda de entender este fenómeno se modeló el co-cultivo mezclando un modelo desarrollado a partir de la cinética de *L. kefiranofaciens* como cultivo puro, un modelo para *S. cerevisiae* que se rige por la cinética de Monod y la cinética de Luedeking-Piret, y adicionando una ecuación diferencial para describir el consumo de nitrógeno de ambos microorganismos además de la introducción de una función de protección para *L. kefiranofaciens*. Los parámetros cinéticos se determinaron a partir de comparación del resultado de la simulación del modelo y los datos experimentales.

Para el caso de la producción de etanol a partir de la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos o mezclas de hexosas y pentosas existe un trabajo presentado por Chen [12], quien realizó una búsqueda bibliográfica sobre trabajos acerca de la fermentación de mezclas de xilosa y glucosa utilizando co-cultivos para la producción de etanol; 35 sistemas desarrollados generalmente en la parte experimental fueron hallados desde los 80's hasta nuestros días. La revisión abarca temas muy interesantes como: las interacciones entre los microorganismos que conforman el co-cultivo, las cepas usadas en esos sistemas, el modo para llevar a cabo la fermentación, las condiciones para la fermentación, el desempeño de la fermentación, los beneficios y retos de usar un co-cultivo para la fermentación de hexosas y pentosas a escala industrial, el modelado cinético de los co-cultivos y el modelado de redes metabólicas para los co-cultivos. El tópico que concierne a esta investigación es el modelado de la cinética del co-cultivo. Sin embargo, muy poca investigación ha sido enfocada hacia el modelado de los co-cultivos para describir de manera cuantitativa la dinámica del sistema. Esto se debe a la naturaleza compleja de la dinámica, la dificultad en el análisis de la dinámica, y el control de sistemas que contienen dos microorganismos. Otro problema asociado con el desarrollo de modelos cinéticos de co-cultivos es la falta de parámetros cinéticos para cada cepa, esto se debe a las diferentes interacciones que existen entre las cepas en el sistema en comparación con cultivos puros. En teoría, al capturar las propiedades dinámicas del sistema, un modelo cinético podría ser utilizado como una herramienta poderosa para ayudar a obtener las condiciones óptimas de operación y alcanzando suficiente rentabilidad para el proceso. Esta es la razón principal para el desarrollo de modelos cinéticos para la producción de etanol utilizando co-cultivos.

2.3. Estimación de parámetros

La estimación de parámetros es uno de los pasos involucrados en la formulación y validación de modelos matemáticos que describen un proceso de interés. Esta alude al proceso de obtener los valores para los parámetros, mediante el ajuste de los valores calculados por el modelo al conjunto de mediciones o datos experimentales. Cuando las ecuaciones de un modelo son funciones lineales de los parámetros el problema es llamado problema de estimación lineal. La estimación

no lineal alude a las situaciones encontradas de forma general y frecuente, donde las ecuaciones del modelo son funciones no lineales de los parámetros.

La estructura de un modelo tiene la forma general

$$\mathbf{g}(\mathbf{z}, \Theta) = 0$$

donde:

$$\mathbf{g} = \{g_1, g_2, \dots, g_m\}^T$$

es un vector de funciones de dimensión m .

$$\mathbf{z} = \{z_1, z_2, \dots, z_k\}^T$$

es un vector de variables de dimensión k .

$$\Theta = \{\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_l\}^T$$

es un vector de parámetros cuyos valores no son precisamente conocidos.

El modelo descrito anteriormente es llamado modelo determinístico, puesto que todas las cantidades que aparecen en él suponen estar bien determinadas. El modelo puede ser de poco valor práctico a menos que los valores de sus parámetros sean conocidos. Existen dos métodos principales por los cuales podemos establecer los valores de los parámetros:

- a.** Calcular el valor de los parámetros aplicando las leyes de la naturaleza utilizando las cantidades medibles en la situación (forma analítica).
- b.** Medir los valores de las variables del modelo que ocurren de manera física en las situaciones, y después buscar los valores de los parámetros que satisfagan las ecuaciones del modelo, al menos aproximadamente.

En la estimación de parámetros, el problema general a resolver es:

Dada la estructura de un modelo y un conjunto de datos, el problema es encontrar los parámetros del modelo desconocidos de manera que los valores calculados por el modelo se ajusten a los datos de alguna manera óptima.

En general los parámetros desconocidos de un modelo pueden ser obtenidos por la minimización de una función objetivo apropiada. La función objetivo es una medida de la discrepancia o desviación media de los datos generados por el modelo. Entonces, el problema puede ser visto como un problema de optimización y en principio se pueden emplear una variedad de métodos disponibles para solucionar este problema. [54, 39]

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

El estudio de los co-cultivos para la producción de etanol a partir de mezclas de hexosas y pentosas, es un campo que no se ha explotado completamente en el área del modelado y estimación de parámetros del proceso. A pesar de los estudios experimentales existentes la naturaleza del fenómeno es muy compleja, por lo tanto plasmarlo a un modelo matemático es muy complicado.

La mayoría de los co-cultivos modelados utilizan modelos no estructurados que reducen las dificultades para simular el comportamiento del sistema, pero pierden mucha información importante durante su desarrollo. Sin embargo, estos sistemas no son tan simples y se requiere de mayor información del fenómeno para el desarrollo de mejores modelos, el uso modelos estructurados nos permite tener una mejor descripción del proceso, y como consecuencia esta herramienta debe ser capaz de simular de mejor manera el comportamiento del sistema.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

GENERAL:

Desarrollar de un modelo estructurado del co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae* para la obtención de etanol y la estimación de los parámetros cinéticos a partir de datos experimentales del co-cultivo.

ESPECÍFICOS:

- Llevar a cabo las cinéticas de fermentación del co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae* utilizando distintas mezclas de glucosa y xilosa.
- Planteamiento de un modelo estructurado que plasme la dinámica del co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*
- Estimación de parámetros cinéticos utilizando un problema de optimización que minimice una función objetivo que mide la discrepancia de las variables de estado con los datos experimentales

CAPÍTULO 5

MATERIALES, MÉTODOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5.1. *Materiales*

5.1.1. **Reactivos**

La glucosa y la xilosa son compuestos grado reactivo de JT Beaker y Sigma Aldrich. NH_3PO_4 y KH_2PO_4 son compuestos grado reactivo de Reasol y Reactivos y Productos Químicos Finos.

La peptona y el extracto de levadura son productos de Bioxon.

5.1.2. **Microorganismos**

Los microorganismos que se utilizaron son: *S. cerevisiae* silvestre y *P. stipitis* que se obtuvo de ARS Culture Collection (NRRL).

5.2. *Métodos*

5.2.1. **Medio y condiciones de cultivo**

El medio de fermentación utilizado contiene una mezcla de glucosa y xilosa, en la Tabla 5.1 muestra las diferentes concentraciones de azúcares utilizadas en los experimentos de fermentación. La composición del medio de fermentación es la siguiente: 40 g/L de azúcares totales, 3.5 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de NH_3PO_4 , 1 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L peptona, el pH fue ajustado a 4.5. El cultivo se llevó a cabo en matraces de 250 mL con 100 mL de medio, con 0.3 g peso seco/L de inóculo del co-cultivo (siembra de las cepas por separado), el cual proviene de

Tabla 5.1: Condiciones de los experimentos de fermentación del co-cultivo.

Experimento de fermentación	% Glucosa	% Xilose	<i>P. stipitis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Tiempo de fermentación [h]
1	20	80	×	×	72
2	50	50	×	×	72
3	80	20	×	×	72

un medio rico conteniendo glucosa como fuente de carbono, cosechado durante fase exponencial. Las condiciones de cultivo son: fermentación anaerobia, a 30 °C y 130 rpm, en una agitadora orbital (New Brunswick Scientific, Co, Edison, N.J.).

5.2.2. Técnicas Analíticas

A continuación se muestran las técnicas que se utilizaron para la determinación de los datos cinéticos.

5.2.2.1. Crecimiento Microbiano

DENSIDAD ÓPTICA El crecimiento del microorganismo se monitoreó mediante la medición de la densidad óptica, según el siguiente protocolo.

- Tomar 1 mL de muestra del cultivo, y diluir con solución salina (0.9% NaCl P/V), en una proporción 1:3.
- Leer la muestra diluida a 660 nm, en un espectrofotómetro (Milton-Roy, Rochester, N.Y.).
- La densidad óptica de la muestra se multiplica por el factor de dilución, para obtener el valor real de la muestra.
- Si el valor de la lectura de densidad óptica excede 0.6 se recomienda diluir más la muestra, a fin de tener datos confiables [40].

PESO SECO

- Tomar una alícuota del cultivo (2 a 5 mL), y colocar en un tubo de centrifuga.
- La muestra se centrifuga a 4000 *rpm* por 20 minutos. El sobrenadante se descarta.
- La biomasa (pastilla) se resuspende en agua destilada para lavar los restos de medio de cultivo y se centrifuga en las mismas condiciones. El sobrenadante se descarta.
- La pastilla se resuspende en agua destilada; la suspensión se vacía en charolas (que previamente se han llevado a peso constante) y se seca a 80°C hasta peso constante [40].

5.2.2.2. Cuantificación de Glucosa, Xilosa y Etanol

La cuantificación de los azúcares y el etanol se efectúa mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), en un cromatógrafo 1050 (Agilent, USA) con una columna Aminex HP-87H (BioRad, Hercules, CA), empleando H_2SO_4 5mM como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min, a 30°C. Todos los compuestos aparecen en el cromatograma correspondiente al detector de índice de refracción (IR). Se inyectan 5 μL de muestra a la columna; los tiempos de retención (promedio) son de 9.44 minutos para la glucosa, 10.09 minutos para la xilosa y 21.50 minutos para el etanol.

En el anexo 1 se encuentran las curvas estándar para los azúcares, etanol y peso seco de las células.

5.3. Estrategia Experimental

La estrategia experimental se diseñó con base en los objetivos del trabajo, así como la información recabada en la literatura especializada. El medio de cultivo contiene diferentes relaciones de composición de la glucosa y la xilosa, y la fermentación se llevo a cabo por un tiempo de 72 horas cuando se observó que el consumo de los azúcares es imperceptible. La variación de las condiciones iniciales de azúcares permiten observar la influencia en el desarrollo de la cinética de fermentación y el comportamiento del co-cultivo. La cinética de fermentación se determinó llevando a cabo los experimentos por triplicado. La metodología mencionada anteriormente se utilizó para cuantificar la concentración de los sustratos y los productos.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y

ANÁLISIS

6.1. Resultados experimentales de la fermentación del co-cultivo

Los datos de las cinéticas de fermentación del co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae* a distintas condiciones iniciales de azúcares se presentan en las Tablas 6.1, 6.2, y 6.3. Las Figuras 6.1, 6.2, y 6.3 muestran los datos gráficos de las distintas concentraciones de azúcares, etanol y biomasa generadas en la fermentación, con su respectiva desviación media.

Tabla 6.1: Datos cinéticos de la mezcla 20:80 glucosa-xilosa.

Tiempo	Glucosa [g/L]		Xilosa [g/L]		Etanol [g / L]		Células [g peso seco /L]	
	Media	Desv. St.	Media	Desv. St.	Media	Desv. St.	Media	Desv. St.
0.00	8.00	0.00	32.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.00
4.00	3.92	0.14	15.10	0.36	0.22	0.35	0.32	0.00
8.00	3.54	1.30	15.11	2.00	1.52	0.16	0.67	0.09
12.00	0.15	0.26	16.29	1.29	3.02	0.39	1.53	0.10
16.00	0.30	0.53	14.82	1.12	2.25	0.31	1.64	0.18
20.00	0.24	0.41	14.52	2.17	3.28	0.99	1.81	0.26
24.00	0.00	0.00	14.58	0.88	3.14	1.17	2.60	0.25
28.00	0.00	0.00	13.64	1.33	2.59	0.21	2.91	0.28
32.00	0.00	0.00	12.05	0.79	5.63	0.24	3.16	0.22
36.00	0.00	0.00	13.89	2.99	3.35	1.24	3.42	0.30
40.00	0.00	0.00	12.59	2.98	4.10	1.04	1.65	0.51
44.00	0.00	0.00	13.27	3.04	2.96	0.37	1.93	0.64
48.00	0.00	0.00	12.35	3.30	3.28	1.56	1.86	0.65
60.00	0.00	0.00	11.04	3.94	3.86	1.11	2.33	0.86
64.00	0.00	0.00	9.86	3.69	3.64	1.17	2.33	0.79
68.00	0.00	0.00	8.82	4.19	4.35	1.25	2.43	0.97
72.00	0.00	0.00	8.56	3.92	5.90	2.81	2.66	1.11

Tabla 6.2: Datos cinéticos de la mezcla 50:50 glucosa-xilosa.

Tiempo	Glucosa [g/L]		Xilosa [g/L]		Etanol [g / L]		Células [g peso seco /L]	
	Media	Desv. St.	Media	Desv. St.	Media	Desv. St.	Media	Desv. St.
0.00	20.00	0.00	20.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.00
4.00	10.31	0.02	8.38	0.11	0.00	0.00	0.31	0.00
8.00	9.21	0.46	8.68	0.22	2.68	0.96	0.36	0.03
12.00	6.46	0.11	8.99	0.54	4.52	0.75	0.99	0.22
16.00	1.73	0.70	9.89	0.48	6.75	0.34	2.18	0.22
20.00	0.00	0.00	9.85	0.63	9.54	0.47	2.67	0.17
24.00	0.00	0.00	9.38	1.13	9.53	1.20	3.02	0.10
28.00	0.00	0.00	9.27	0.70	9.32	1.78	3.29	0.18
32.00	0.00	0.00	8.59	1.37	9.59	1.06	3.39	0.18
36.00	0.00	0.00	7.27	0.39	9.41	1.59	3.56	0.28
40.00	0.00	0.00	6.08	0.54	8.43	2.38	3.37	0.52
44.00	0.00	0.00	5.79	0.57	9.05	1.55	3.76	0.87
48.00	0.00	0.00	5.75	1.19	9.66	0.73	4.14	0.54
52.00	0.00	0.00	4.67	1.00	9.19	0.50	4.14	0.47
56.00	0.00	0.00	4.47	1.54	8.70	1.22	4.07	0.35
60.00	0.00	0.00	3.88	1.11	9.99	0.28	4.02	0.21
64.00	0.00	0.00	3.79	1.30	8.01	1.00	4.48	1.28
68.00	0.00	0.00	3.96	1.22	8.72	1.77	4.45	1.34
72.00	0.00	0.00	3.67	1.28	8.05	2.61	4.12	1.24

Tabla 6.3: Datos cinéticos de la mezcla 80:20 glucosa-xilosa.

Tiempo	Glucosa [g/L]		Xilosa [g/L]		Etanol [g / L]		Células [g peso seco /L]	
	Media	Desv. St.	Media	Desv. St.	Media	Desv. St.	Media	Desv. St.
0.00	32.00	0.00	8.00	0.00	0.00	0.00	0.31	0.00
4.00	17.39	1.87	3.41	0.98	1.12	1.37	0.34	0.01
8.00	14.97	2.28	3.76	1.17	2.80	1.59	0.79	0.03
12.00	9.56	1.04	3.18	0.12	4.76	0.47	1.85	0.06
16.00	6.18	0.39	3.45	0.14	6.72	0.79	2.86	0.10
20.00	2.46	0.49	4.59	1.32	7.61	1.01	3.43	0.29
24.00	0.46	0.18	4.56	1.37	7.37	0.80	4.30	0.01
28.00	0.00	0.00	4.37	1.05	11.63	1.16	4.39	0.10
32.00	0.00	0.00	3.82	0.99	10.95	1.32	4.53	0.22
36.00	0.06	0.10	3.28	0.94	10.75	0.61	4.57	0.19
40.00	0.00	0.00	3.21	0.46	8.45	1.38	4.01	0.17
44.00	0.00	0.00	3.91	0.09	8.30	1.30	4.29	0.07
48.00	0.00	0.00	4.03	0.22	7.20	0.63	4.23	0.09
60.00	0.00	0.00	3.71	0.48	8.23	0.20	4.32	0.34
64.00	0.00	0.00	3.57	0.26	7.31	0.41	4.66	0.10
68.00	0.00	0.00	4.03	0.39	5.92	0.47	4.37	0.23
72.00	0.00	0.00	3.21	0.61	9.38	3.21	4.56	0.16

6.2. Análisis de resultados

La cinética de fermentación del sistema 20:80 glucosa-xilosa muestra como el consumo de la glucosa es muy rápido agotándola aproximadamente en las primeras 12 horas. La xilosa es consumida con rapidez por *P. stipitis* durante las primeras 16 horas, sin embargo, en las horas posteriores su asimilación fue muy lenta, como consecuencia la xilosa residual en el medio fue de 8.56 g/L. La etapa lag fue muy corta (4 - 6 horas) mientras que la etapa exponencial fue muy lenta y duró aproximadamente 24 horas. A las 36 horas la biomasa alcanzó el estado estacionario, sin embargo, en las siguientes 4 horas se observó una disminución del 51.75 % de la biomasa. Posiblemente la biomasa disminuyó por el agotamiento de la glucosa, y durante la reasimilación de la xilosa hizo que la biomasa se estabilizara nuevamente hasta alcanzar el estado estacionario. La producción de etanol fue muy pobre, alcanzó el 41.69 % del rendimiento teórico; el factor que posiblemente influyó, puede ser la asimilación del etanol por la biomasa, porque en el momento que disminuyeron las células la concentración de etanol disminuyó también, observándose un comportamiento semejante en las horas posteriores entre la biomasa y el etanol hasta alcanzar un estado estacionario nuevamente.

La cinética de fermentación del sistema 50:50 glucosa-xilosa mejoró el rendimiento teórico de etanol a 61.32 % a diferencia del sistema 20:80. La glucosa se consumió completamente en las primeras 20 horas de la fermentación. En cambio el consumo de la xilosa fue rápido durante las primeras 16 horas hasta llegar al estado estacionario, pero la xilosa no se consume completamente (3.80 g/L residual de xilosa). Los azúcares totales consumidos fueron 36.2 g/L. La fase lag duró aproximadamente 8 horas, en tanto que la etapa exponencial fue muy larga alcanzando un estado estacionario a los 4.27 g/L de células. El etanol tuvo una producción rápida en aproximadamente 12 horas de 2.68 a 9.54 g/L y alcanzó un estado estacionario relativamente estable, teniendo como producción máxima 9.9 g/L de etanol.

El sistema 80:20 glucosa-xilosa mostró una cinética de fermentación donde el consumo de la glucosa fue completo durante las primeras 24 horas de fermentación. La xilosa se consumió muy lentamente hasta alcanzar una concentración en promedio 3.74 g/L de xilosa residual en las últimas horas del proceso. Se consumieron en total 36.26 g/L de los azúcares, semejante al sistema anterior a pesar de que la concentración de glucosa es mayor en este sistema. La fase lag fue corta de 4 horas aproximadamente, la etapa exponencial duró 20 horas hasta alcanzar un estado estacionario constante. La generación de etanol fue rápida durante las primeras 20 horas alcanzando una concentración de 11.63 g/L. Se alcanzó un estado estacionario por 8 horas pero a las 40 horas disminuyó drásticamente la concentración a 8.45 g/L, posiblemente, al agotarse la glucosa y por la baja asimilación de la xilosa las células comenzaron a consumir etanol. Se alcanzó un rendimiento del 71.26 % del teórico y la máxima concentración de etanol fue de 11.63 g/L.

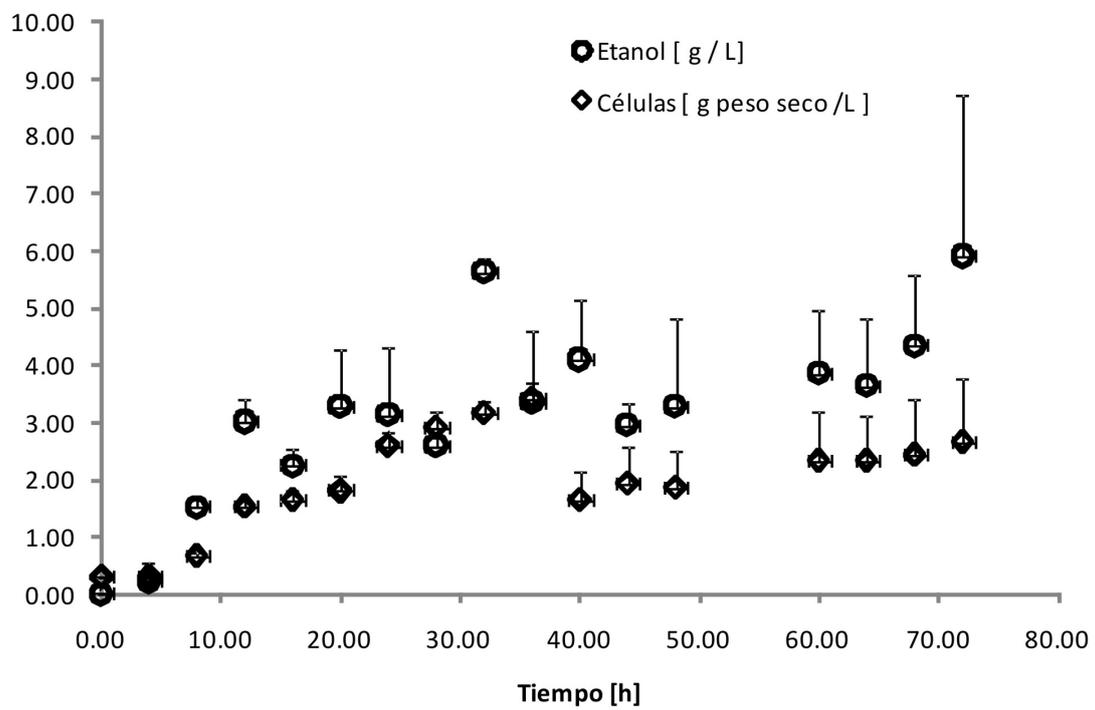
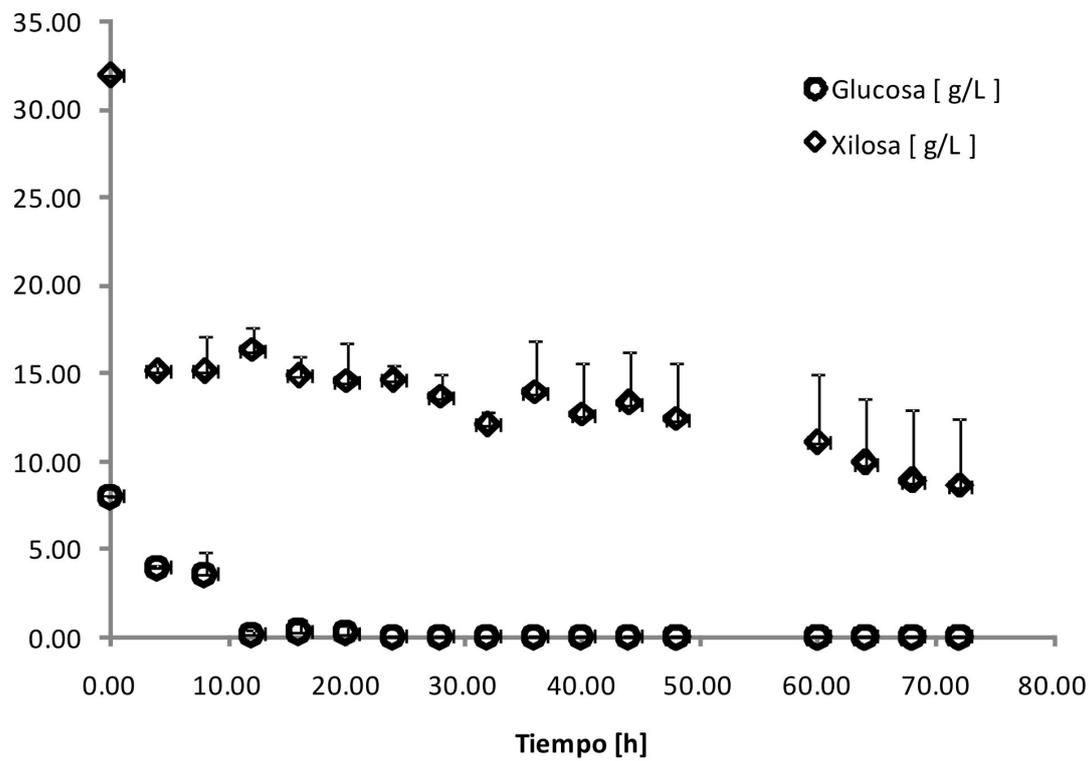


Figura 6.1: Cinética de la fermentación de co-cultivo con una mezcla 20:80 glucosa-xilosa.

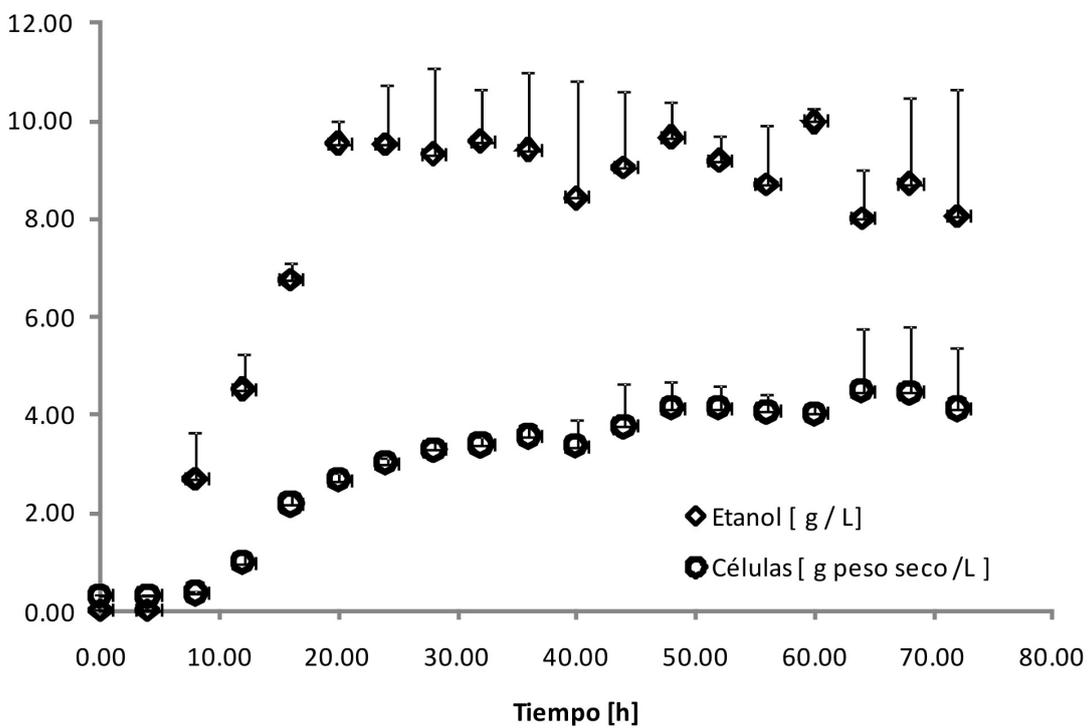
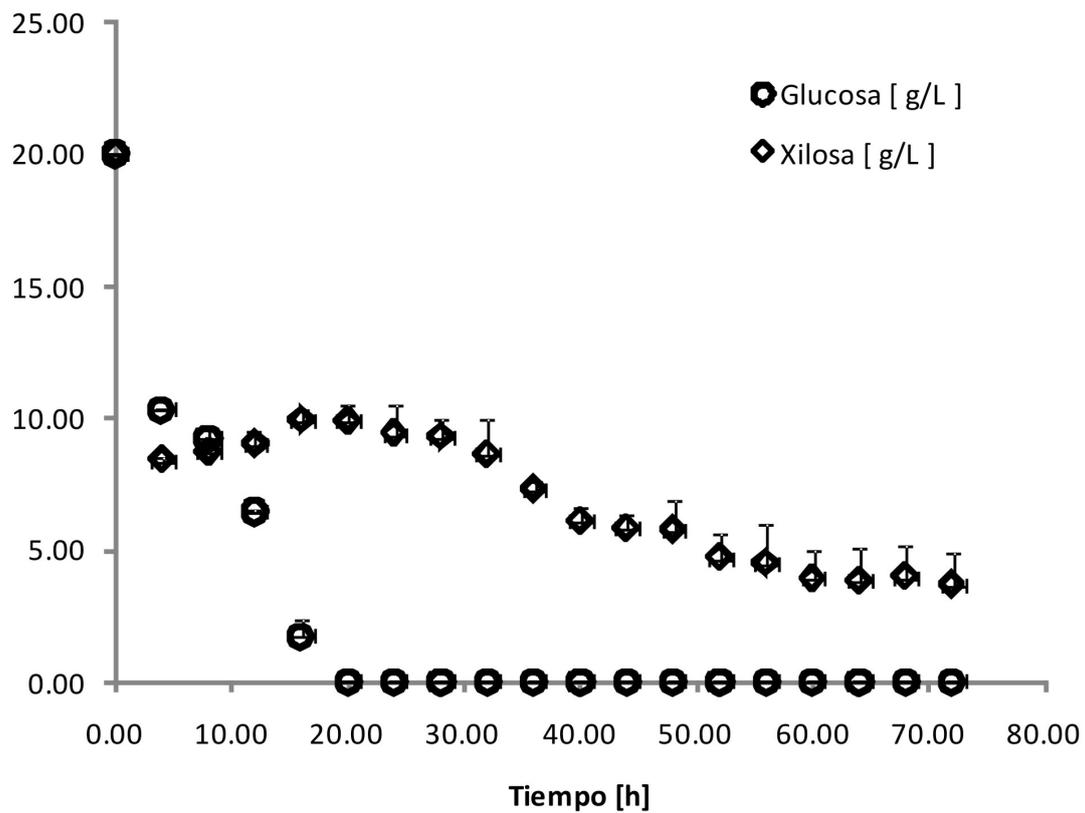


Figura 6.2: Cinética de la fermentación de co-cultivo con una mezcla 50:50 glucosa-xilosa.

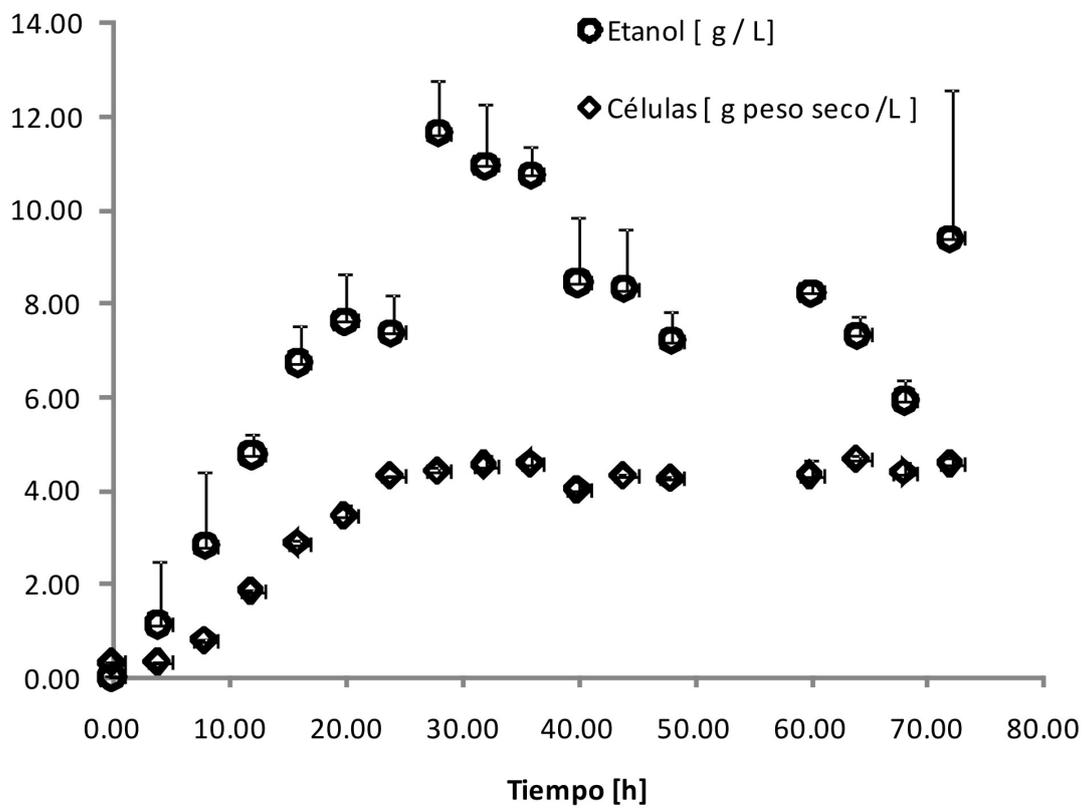
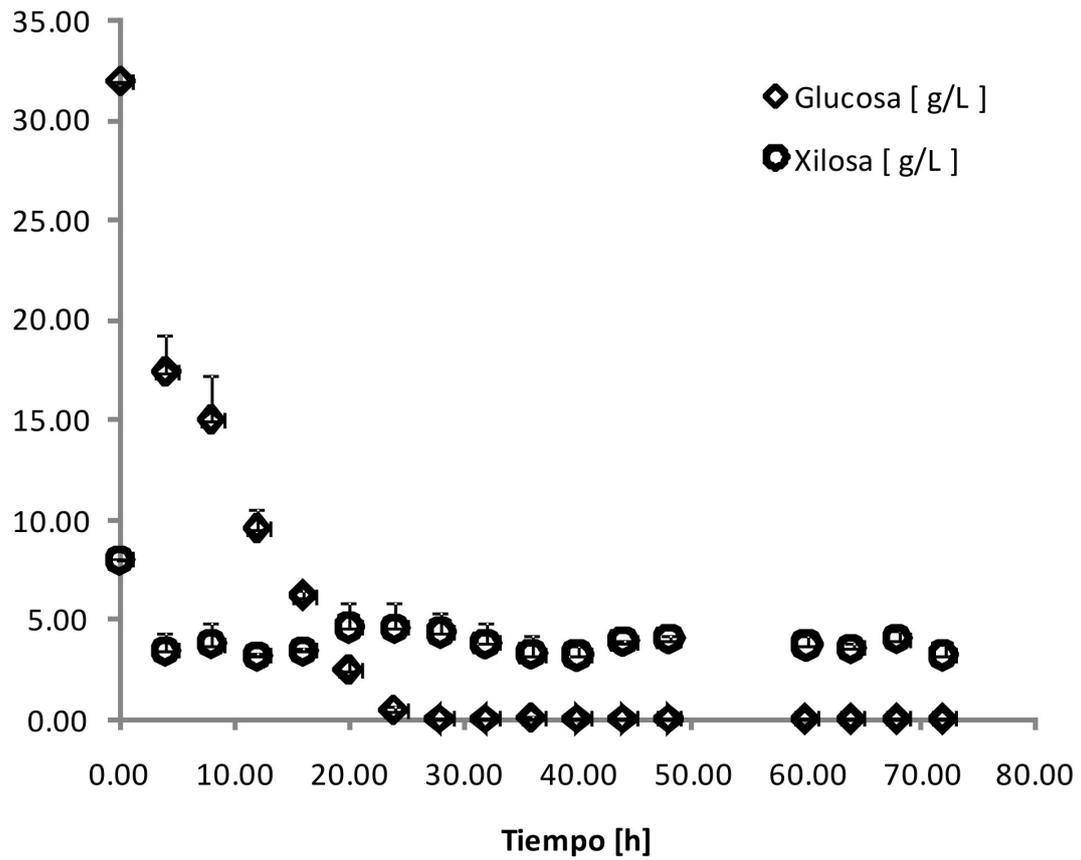


Figura 6.3: Cinética de la fermentación de co-cultivo con una mezcla 80:20 glucosa-xilosa.

Al analizar los resultados de los tres sistemas se puede argumentar que la composición del medio afecta el desempeño de la producción de etanol, las concentraciones de medios que contienen cantidades iguales o menores de xilosa con respecto a la glucosa tienen mejores rendimientos de etanol. Sin embargo, al agotarse la glucosa en los medios y por la lenta asimilación de xilosa posiblemente las células comienzan a consumir el etanol para mantenerse. Una forma de evitar este problema es disminuir el tiempo de la fermentación a tiempos menores de 40 horas cuando se observa que las células comienzan a asimilar al etanol.

CAPÍTULO 7

MODELADO DEL CO-CULTIVO Y ESTIMACIÓN DE PARAMÉTROS

7.1. Ruta metabólica de *P. Stipitis* y *S. cerevisiae*

Para desarrollar el modelado estructurado del co-cultivo se requiere del análisis de las rutas metabólicas de las levaduras a utilizar. La ruta metabólica de *S. cerevisiae* es de las más conocidas por su uso en los procesos de fermentación de vinos, cerveza y pan. *S. cerevisiae* tiene como principal fuente de energía a la glucosa y la convierte a piruvato mediante la glicólisis, mientras que la producción de energía en forma de ATP está acoplada a la generación de intermediarios y la reducción de carga en la forma de NADH mediante rutas biosintéticas.

Las dos formas principales del uso del piruvato en la producción de energía son: la respiración y la fermentación (Figura 7.1). En presencia del oxígeno, el piruvato entra en la matriz mitocondrial en donde es descarboxilado oxidativamente a acetil-CoA por el complejo multi enzimático piruvato dehidrogenasa. Esta reacción enlaza a la glucólisis con el ciclo del ácido cítrico, en la cual la acetil-CoA es completamente oxidado para dar dos moléculas de CO₂ y las formas equivalentes reducidas en la forma de NADH y FADH₂. Sin embargo, el ciclo del ácido cítrico es una ruta anfibólica, ya que combina ambas funciones, la anabólica y la catabólica. Los resultados de este último, por ejemplo, son la producción de intermediarios para la síntesis de aminoácidos y nucleótidos. El reabastecimiento de los componentes necesarios para conducir el ciclo del ácido cítrico, como oxaloacetato y α -cetoglutarato, son (i) la fijación de CO₂ al piruvato por la acción de las enzimas piruvato carboxilasa (dependiente del ATP) y el fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y (ii) el ciclo del glioxilato (un acceso directo al ciclo del ácido cítrico), lo cual es importante cuando las levaduras están creciendo en presencia de dos fuentes de carbono, tales como acetato o etanol.

Durante la fermentación alcohólica de azúcares, las levaduras vuelven a oxidar al NADH a

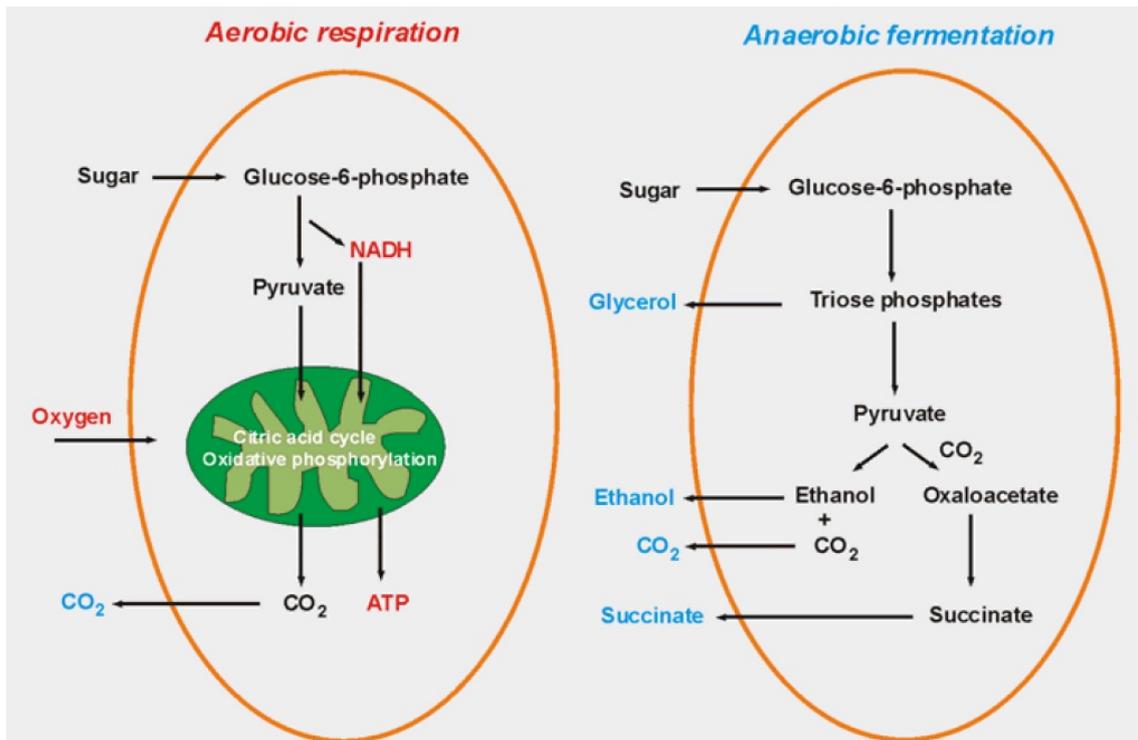


Figura 7.1: Ruta metabólica de *S. cerevisiae* bajo condiciones aerobias y anaerobias.

NAD en una reacción de dos pasos a partir del piruvato, el cual es primero decarboxilado por la piruvato decarboxilasa seguido de la reducción de acetaldehído, catalizado por la alcohol deshidrogenasa (ADH). Al mismo tiempo, el glicerol se genera a partir del dihidroxiacetona fosfato para asegurar la producción de este compuesto importante.

Un modo alternativo de oxidación de la glucosa es la ruta de la hexosa monofosfato también conocido como el ciclo de la pentosa fosfato, que proporciona a la célula pentosas y NADPH citosólico, necesarios para las reacciones biosintéticas, como la producción de ácidos grasos, aminoácidos y polialcoholes (glicol, arabitol, manitol, glicerol, xilitol). El primer paso en esta ruta es la deshidrogenación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona y la generación de un mol de NADPH (por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). Posteriormente, el 6-fosfogluconato es descarboxilado por la acción de la fosfogluconato deshidrogenasa para dar ribulosa-5-fosfato y un segundo mol de NADPH. Por lo tanto, además de generar NADPH, la otra función mayor de esta ruta es la producción de ribosa, que sirve en la biosíntesis de los precursores de ácidos nucleicos y nucleótidos coenzimáticos.

Los transportadores redox, NAD y FAD, que se reducen durante la descomposición de los azúcares a NADH y FADH₂, respectivamente, son oxidados de nuevo durante la respiración (trasporte de electrones) de la cadena situada en el interior de la membrana mitocondrial. La energía liberada durante la transferencia de electrones se acopla a el proceso de fosforilación

oxidativa, que es efectuado por la ATP sintasa, un complejo enzimático que esta localizado en la membrana mitocondrial interna y diseñado para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. [15]

El conocimiento de la ruta metabólica de *P. stipitis* es de gran importancia para el uso de la hemicelulosa que existe en el material lignocelulósico. En la revisión bibliográfica de Jeffries [24] se presenta la ruta metabólica de *P. stipitis*, en este trabajo se presenta los distintos enfoques que han sido utilizados para diseñar la ruta metabólica de la xilosa (Figura 7.2).

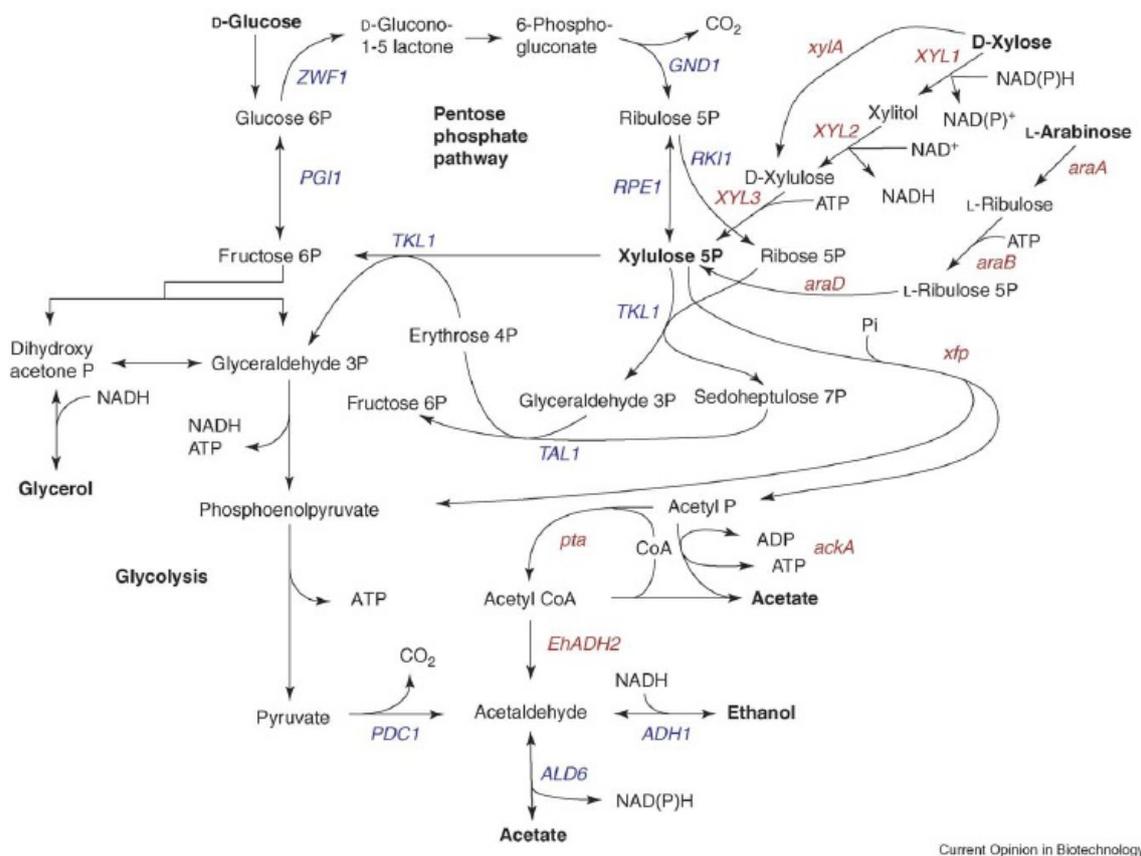


Figura 7.2: Ruta metabólica de *P. stipitis*.

La ruta de la pentosa fosfato (the pentose phosphate pathway **PPP**), que es la ruta bioquímica para el metabolismo de la xilosa, se encuentra en prácticamente todos los organismos donde se proporciona D-ribosa para la biosíntesis de ácidos nucleicos, D-eritrosa-4-fosfato para la síntesis de aminoácidos aromáticos y NADPH para las reacciones anabólicas. La ruta PPP se considerada como un proceso que contiene dos fases. La fase oxidante convierte a la hexosa, D-glucosa-6P, en la pentosa, 5P-D-ribulosa, además de CO₂ y NADPH. La fase no oxidante convierte la D-ribulosa-5P en D-ribosa-5P, D-xilulosa-5P, D-sedoheptulosa-7P, D-eritrosa-4P,

D-fructosa-6P y D-gliceraldehído-3P. La D-xilosa y la L-arabinosa entran en la ruta PPP a través de la D-xilulosa (Figura 7.2). En las bacterias la conversión de D-xilosa a D-xilulosa es a través de xilosa isomerasa (*xylA*). En las levaduras, los hongos filamentosos y los eucariotas, esto se lleva a cabo a través de dos pasos una reducción y oxidación, realizados por la xilosa reductasa (*XYL1*, *Xyl1p*) y la xilitol deshidrogenasa (*XYL2*, *Xyl2p*), respectivamente. Jeffries *et al* [25] han secuenciado y ensamblado el genoma completo de *P. stipitis*. La secuencia genómica provee la idea de como *P. stipitis* regula su balance redox mientras que de manera muy eficiente la fermentación de la xilosa en condiciones de microaerobiosis.

Con la descripción anterior sobre las rutas metabólicas de las levaduras *S. cerevisiae* y *P. stipitis* se tiene el conocimiento para el desarrollo de un modelo estructurado. El proceso de fermentación se llevo a cabo de modo batch y en condiciones de disponibilidad de oxígeno limitada, por lo tanto se considera que la ruta metabólica que predomina en *S. cerevisiae* es la fermentación anaerobia y *P. stipitis* utiliza la PPP para metabolizar la glucosa y la xilosa del medio. De acuerdo a los resultados experimentales no existió la producción de xilitol por consecuencia *P. stipitis* metabolizó la xilosa completamente a etanol.

7.2. Modelamiento del co-cultivo

Los modelos no estructurados son muy adecuados para la descripción de los sistemas en condiciones de estado estacionario incluso si se incorpora un patrón de crecimiento complejo. Sin embargo, los modelos no estructurados dan una pobre descripción de la dinámica de los experimentos donde la composición de la biomasa cambia y la actividad de la biomasa varía considerablemente. Los modelos estructurados simples, a diferencia de los mencionados anteriormente, son mejores ya que algunos mecanismos básicos del comportamiento celular son incorporados al menos cualitativamente. De este modo, el modelo estructurado puede tener algo de fuerza predictiva. Esto puede describir el proceso del crecimiento a diferentes condiciones de operación con el mismo conjunto de parámetros, y además puede ser aplicado para la optimización del proceso.

En los modelos estructurados simples, los componentes de la biomasa son colocados en unas cuantas variables claves que, con suerte, son representativas del comportamiento celular. A partir de ahora la actividad microbiana se vuelve no solo una función de las variables abióticas, que pueden cambiar en muy poco tiempo, sino también de la composición celular. La actividad microbiana, por lo tanto depende del ambiente y los sucesos que rodean a las células. En los modelos estructurados simples los componentes celulares incluidos en el modelo representan reservas de enzimas, metabolitos, u otros biomoléculas. Las reacciones celulares consideradas en el modelo son por lo tanto empíricas puesto que ellas no representan la conversión entre los verdaderos componentes. Del mismo modo, la cinética para las reacciones individuales son descritas normalmente con expresiones empíricas, de tal modo que parece ajustar a los datos

experimentales con un pequeño número de parámetros. A pesar de su naturaleza empírica, los modelos estructurados simples están basados normalmente en mecanismos celulares bien establecidos, y son capaces de simular ciertos rasgos de los experimentos muy bien. Dos tipos diferentes de modelos estructurados simples son: los modelos de compartimiento y los modelos cibernéticos.

7.2.1. Modelado Cibernético

Ramkrishna y colaboradores [38] han desarrollado un concepto ingenioso de modelado, que es especialmente apropiado para la descripción de crecimiento microbiano en presencia de múltiples fuentes de carbono y energía. Su enfoque para el modelado cibernético se basa en la hipótesis de que, si bien el modelado detallado de los procesos regulatorios es complicado, puede ser posible interpretar que el funcionamiento de las células esté dirigido por una estrategia de asignación óptima de los recursos. Ya que realmente no existen maneras directas de confirmar como un microorganismo optimiza la asignación de sus recursos durante el crecimiento, los modelos cibernéticos deben ser aceptados bajo las mismas condiciones que cualquier otro modelo estructural simple: ya que ellos proveen una buena estructura de modelado que puede ser utilizada para simular el crecimiento en presencia de múltiples sustratos y por esta razón son utilizados en el diseño de los procesos de fermentación.

La idea básica del modelado cibernético es que una enzima clave juega el rol de cuello de botella en el crecimiento microbiano en un sustrato particular, y esta enzima clave debe ser sintetizada antes de que el crecimiento microbiano pueda ocurrir en ese sustrato. En realidad esta enzima clave puede representar a muchas enzimas. [38]

En el trabajo presentado por Ramkrishna y Varner en 1999 [42] se detalla un análisis no lineal del modelado cibernético y las directrices para la formulación del modelado. La visión para el desarrollo del modelado de sistemas microbianos se sitúa entre la escuela del pensamiento del modelado de la caja negra y la escuela del pensamiento del modelado de la caja blanca; la escuela de modelado de la caja blanca que se basa en el desarrollo del modelo a partir de toda información disponible que existe del fenómeno, y la escuela de modelado de la caja negra que se basa en el ajuste de funciones básicas a los datos experimentales.

El desarrollo de la formulación de la metodología del modelo cibernético busca producir un grado de conocimiento biológico más alto que el modelado de la caja negra, que al mismo tiempo garantice la descripción macroscópica de los fenómenos biológicos, como el crecimiento microbiano y los perfiles de asimilación de nutrientes. Además esta metodología no se basa solamente en la intuición física como es el caso del enfoque de la caja blanca. Mejor dicho, se inspira en un conjunto de postulados operativos que gobiernan las características dinámicas mostradas

por la estructura topológica de una ruta particular. Por lo tanto, después de una inspección de la estructura topológica de la estructura de un modelo, las características dinámicas cualitativas son identificadas fácilmente.

Esto es algo similar, por analogía, a armar un rompecabezas. Imagine que posee una colección de piezas elementales que pueden ser utilizadas para ensamblar el rompecabezas. Cada pieza tiene una estructura topológica asociada con ella. Además, como resultado de la estructura, cada pieza elemental tiene una función particular. Por ejemplo, algunas piezas pueden ser piezas de las esquinas, mientras que otras solo pueden encajar en el centro del rompecabezas. Cualquiera que sea el caso, claramente, la forma de las piezas reflejan su propósito o función en el rompecabezas.

El modelado cibernético propone algo similar, se postula que un mapa metabólico global puede ser descompuesto en componentes elementales abstractos, similares a las piezas de un rompecabezas. Lo contrario a este postulado implica que dada una colección apropiada de componentes elementales, se pueden ensamblar estructuras de modelos a partir de piezas elementales abstractas. Teniendo en mente que cada componente elemental tiene una configuración matemática distinta, por lo tanto, esto representa el lado estructural del argumento.

En la siguiente sección se desarrolla el modelo cibernético del co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae* utilizando la metodología desarrollada por Ramkrishna y Varner [42].

7.2.2. Desarrollo del modelo cibernético del co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*

En la sección 7.1 se estudiaron las rutas metabólicas que detallan las reacciones químicas que suceden a la glucosa y xilosa para su asimilación y uso como fuente de energía. De acuerdo a los resultados experimentales se considera que *P. stipitis* usa la ruta PPP para metabolizar la glucosa y xilosa para producir etanol, en tanto que *S. cerevisiae* metaboliza la glucosa a través de la fermentación anaerobia generando etanol como producto. Para construir una ruta metabólica que represente todo el sistema de co-cultivo se considera que: *el sistema es cerrado y aunque existen dos tipo de levaduras diferentes estas pueden ser consideradas como una sola población de biomasa que tiene la capacidad de asimilar glucosa y xilosa al mismo tiempo con distintas afinidades*. La ruta metabólica que puede describir el proceso del co-cultivo se muestra en la Figura 7.3, esta es una mezcla de las rutas metabólicas de *P. stipitis* y *S.cerevisiae* que tienen como nodo de intersección al piruvato.

La ruta metabólica del modelo cibernético de co-cultivo se derivar de dos piezas estructurales que se derivan de la Figura 7.3 que son la ruta metabólica elemental convergente Figura 7.4(a) y la ruta metabólica elemental divergente Figura 7.4(b), utilizando estas dos piezas podemos

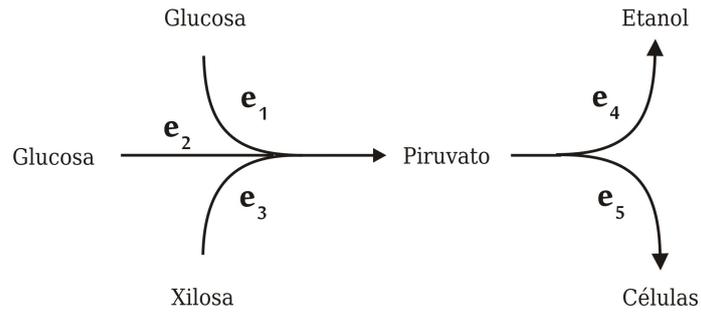


Figura 7.3: Ruta metabólica propuesta para generar el modelo matemático.

comenzar con el planteamiento del modelo.

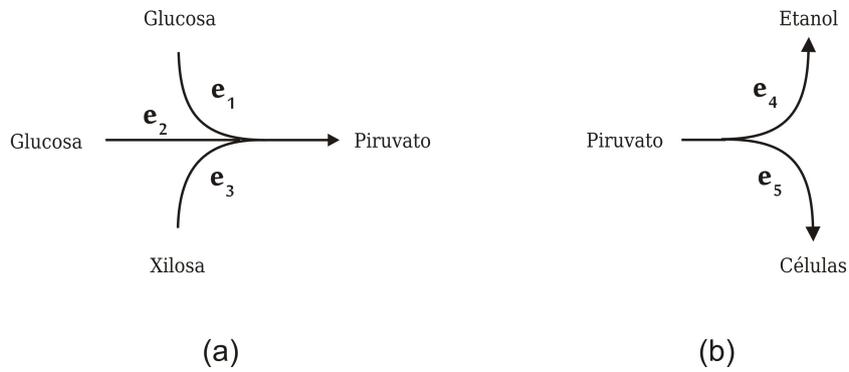


Figura 7.4: Ruta metabólica convergente (a) y ruta metabólica divergente (b).

RUTA ELEMENTAL CONVERGENTE (Figura 7.5) El objetivo de la ruta elemental convergente se basa en la maximización del nivel del intermediario P_{n+1} , este objetivo se sujeta a una restricción de los recursos disponibles para la expresión enzimática.

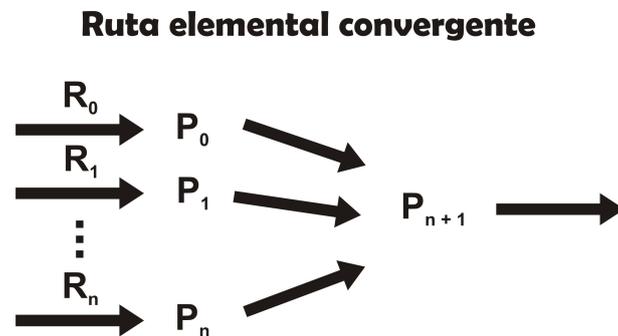


Figura 7.5: Ruta elemental convergente.

La velocidad de reacción metabólica para la ruta elemental convergente se define como:

$$r_j = \mu_j^{max} \left(\frac{e_j}{e_j^{max}} \right) \frac{P_j}{K_j + P_j} , j = 0, 1, \dots, n$$

donde:

μ_j^{max} es la constante de la velocidad de reacción que gobierna la formación de P_{n+1}

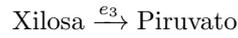
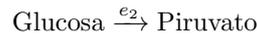
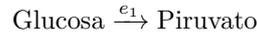
K_j es la constante de saturación que gobierna la formación de P_{n+1}

P_j es el sustrato

e_j es la enzima clave que es inducida por el sustrato

e_j^{max} es el nivel máximo específico de enzima clave

Para el caso del co-cultivo tenemos que las reacciones y velocidades de reacción se definen como:



$$r_1 = \frac{\mu_{max,1} \left(\frac{e_1}{e_1^{max}} \right) G}{K_1 + G}$$

$$r_2 = \frac{\mu_{max,2} \left(\frac{e_2}{e_2^{max}} \right) G}{K_2 + G}$$

$$r_3 = \frac{\mu_{max,3} \left(\frac{e_3}{e_3^{max}} \right) Xil}{K_3 + Xil}$$

La variable cibernética que gobierna la asignación del recurso crítico destinado a la operación de la ruta elemental convergente de la síntesis de la enzima clave e_j se define como:

$$U_j^s = \frac{r_j}{r_j + \sum_{q=0,j}^n r_q} , j = 0, 1, \dots, n$$

donde el superíndice s denota sustituible. Las variables cibernéticas que controlan la síntesis enzimática (U_i^c) para el co-cultivo se definen como:

$$U_1^c = \frac{r_1}{r_1 + r_2 + r_3}$$

$$U_2^c = \frac{r_2}{r_1 + r_2 + r_3}$$

$$U_3^c = \frac{r_3}{r_1 + r_2 + r_3}$$

La actividad enzimática es proporcional a la velocidad de reacción que lo cataliza. La variable cibernética que gobierna la actividad de la ruta convergente de la enzima clave es definida como:

$$V_j^s = \frac{r_j}{\max(r_0, r_1, \dots, r_n)} \quad , j = 0, 1, \dots, n$$

Las variables cibernéticas que controlan la actividad enzimática (V_i^c) en el co-cultivo se definen como:

$$V_1^c = \frac{r_1}{\max(r_1, r_2, r_3)}$$

$$V_2^c = \frac{r_2}{\max(r_1, r_2, r_3)}$$

$$V_3^c = \frac{r_3}{\max(r_1, r_2, r_3)}$$

El conjunto completo de los balances de masa que gobiernan la evolución del modelo de la ruta elemental convergente que refleja la aportación de la regulación metabólica esta dado por el conjunto:

$$\frac{dP_j}{dt} = R_j - r_j V_j^s - r_g P_j \quad , j = 0, 1, \dots, n$$

$$\frac{dP_{n+1}}{dt} = \sum_{j=0}^n r_j V_j^s - r_{n+1} V_{n+1}^s - r_g P_{n+1}$$

$$\frac{de_j}{dt} = r_{e_j} U_j^s - (r_g + \beta) e_j + r_{e_j}^* \quad , j = 0, 1, \dots, n$$

donde r_g representa la velocidad específica de crecimiento y $r_{e_j}^*$ representa la velocidad de síntesis de enzimas constitutivas de e_j . El parámetro β es la constante de velocidad de primer orden que gobierna la descomposición de e_j .

RUTA ELEMENTAL DIVERGENTE (Figura 7.6) El objetivo de ramificación divergente es la maximización de los metabolitos. Este objetivo esta sujeto a una restricción sobre la disponibilidad de los recursos presentes para la expresión de las enzimas claves sobre la ramificación.

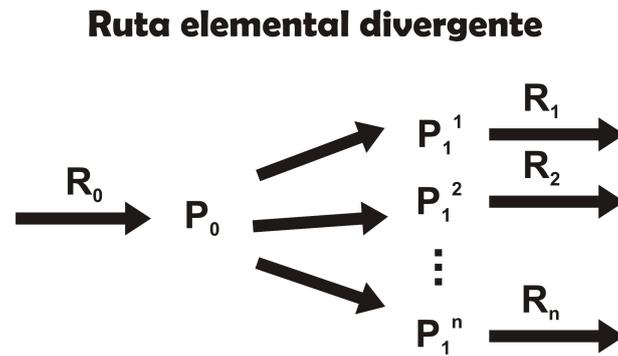


Figura 7.6: Ruta elemental divergente.

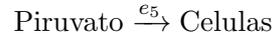
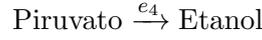
La velocidad de reacción metabólica para la ruta elemental divergente se define como:

$$r_0^j = \mu_0^{j \max} \left(\frac{e_0^j}{e_0^{j \max}} \right) \frac{P_0}{K_0^j + P_0} \quad , j = 1, 2, \dots, n$$

donde:

- μ_0^{jmax} es la constante de la velocidad de reacción máxima que gobierna la formación de P_1^j
- K_0^j es la constante de saturación que gobierna la formación de P_1^j
- P_0 es el sustrato
- e_0^j es la enzima clave que es inducida por el sustrato
- e_0^{jmax} es el nivel máximo específico de enzima clave

Para el caso del co-cultivo tenemos que las reacciones y velocidades de reacción se definen como:



$$r_4 = \frac{\mu_{max,4} \left(\frac{e_4}{e_4^{max}} \right) Pir}{Pir + K_4 + \frac{Pir^2}{K_{sini,4}}} \left(1 - \frac{E}{K_{pini,4}} \right)$$

$$r_5 = \frac{\mu_{max,5} \left(\frac{e_5}{e_5^{max}} \right) Pir}{Pir + K_5 + \frac{Pir^2}{K_{sini,5}}} \left(1 - \frac{E}{K_{pini,5}} \right)$$

Las velocidades de reacción presentadas anteriormente han sido modificadas de acuerdo a la definición dada en la metodología del modelado cibernético. La modificación se realizó para incluir el efecto de la inhibición causada por el sustrato (piruvato, con una ecuación cuadrática) y por el producto (etanol, desviación de la idealidad).

La variable cibernética que gobierna la asignación del recurso crítico para la expresión de e_0^j , $j = 1, 2, \dots, n$ es definida por:

$$U_{0j}^c = \frac{\frac{r_0^j}{P_1^j}}{\frac{r_0^j}{P_1^j} + \sum_{q=1, j}^n \frac{r_0^q}{P_1^q}}, \quad j = 1, 2, \dots, n$$

donde el superíndice c denota el proceso complementario. Las variables cibernéticas que controlan la síntesis enzimática (U_j^d) para el co-cultivo se definen como:

$$U_4^d = \frac{\frac{r_4}{E}}{\frac{r_4}{E} + \frac{r_5}{X}}$$

$$U_5^d = \frac{\frac{r_5}{X}}{\frac{r_4}{E} + \frac{r_5}{X}}$$

La variable cibernética que gobierna la actividad de e_0^j , $j = 1, 2, \dots, n$, sigue el postulado de la ley de proporcional y es definida como:

$$V_{0j}^c = \frac{\frac{r_0^j}{P_1^j}}{\max\left(\frac{r_0^1}{P_1^1}, \frac{r_0^2}{P_1^2}, \dots, \frac{r_0^n}{P_1^n}\right)}, \quad j = 1, 2, \dots, n$$

Las variables cibernéticas que controlan la actividad enzimática (V_j^d) en el co-cultivo se definen como:

$$V_4^d = \frac{\frac{r_4}{E}}{\max\left(\frac{r_4}{E}, \frac{r_5}{X}\right)}$$

$$V_5^d = \frac{\frac{r_5}{X}}{\max\left(\frac{r_4}{E}, \frac{r_5}{X}\right)}$$

El conjunto completo de los balances de masa que gobiernan la evolución del modelo de la ruta elemental divergente que refleja la aportación de la regulación metabólica esta dado por el conjunto:

$$\frac{dP_0}{dt} = R_0 - \sum_{j=1}^n r_0^j V_{0j}^c - r_g P_0$$

$$\frac{dP_1^j}{dt} = r_0^j V_{0j}^c - r_1^j - r_g P_1^j, \quad j = 1, 2, \dots, n$$

$$\frac{de_0^j}{dt} = r_{e_0^j} U_{0j}^c - (r_g + \beta) e_0^j + r_{e_0^j}^*, \quad j = 1, 2, \dots, n$$

donde r_g representa la velocidad específica de crecimiento y $r_{e_0}^*$ representa la velocidad de síntesis de enzimas constitutivas de e_j . El parámetro β es la constante de velocidad de primer orden que gobierna la descomposición de e_j .

A continuación se presentan los balances de materia por especie de la ruta metabólica completa (Figura 7.3)

Glucosa

$$\frac{dG}{dt} = (-r_1 V_1^c - r_2 V_2^c) X \quad (7.1)$$

Xilosa

$$\frac{dXil}{dt} = -r_3 V_3^c X \quad (7.2)$$

Etanol

$$\frac{dE}{dt} = r_4 V_4^d X \quad (7.3)$$

Células

$$\frac{dX}{dt} = (r_5 V_5^d - K_d) X \quad (7.4)$$

Piruvato

$$\frac{dPir}{dt} = \left(r_1 V_1^c Y_{G1}^{Pir} + r_2 V_2^c Y_{G2}^{Pir} + r_3 V_3^c Y_{Xil}^{Pir} - \frac{r_4 V_4^d}{Y_{Pir}^E} - \frac{r_5 V_5^d}{Y_{Pir}^X} \right) X \quad (7.5)$$

Los balances de materia de la porción enzimática intracelular se definen como:

$$\text{Enzima 1} \left[\frac{e_1}{e_1^{max}} \right]$$

$$\frac{d\left(\frac{e_1}{e_1^{max}}\right)}{dt} = \frac{(\mu_{e_1}^{max} + \beta_1) G}{K_{e_1} + G} U_1^c - (r_5 V_5^d - K_d) \left(\frac{e_1}{e_1^{max}}\right) - \beta_1 \left(\frac{e_1}{e_1^{max}}\right) \quad (7.6)$$

Enzima 2 $\left[\frac{e_2}{e_2^{max}}\right]$

$$\frac{d\left(\frac{e_2}{e_2^{max}}\right)}{dt} = \frac{(\mu_{e_2}^{max} + \beta_2) G}{K_{e_2} + G} U_2^c - (r_5 V_5^d - K_d) \left(\frac{e_2}{e_2^{max}}\right) - \beta_2 \left(\frac{e_2}{e_2^{max}}\right) \quad (7.7)$$

Enzima 3 $\left[\frac{e_3}{e_3^{max}}\right]$

$$\frac{d\left(\frac{e_3}{e_3^{max}}\right)}{dt} = \frac{(\mu_{e_3}^{max} + \beta_3) Xil}{K_{e_3} + Xil} U_3^c - (r_5 V_5^d - K_d) \left(\frac{e_3}{e_3^{max}}\right) - \beta_3 \left(\frac{e_3}{e_3^{max}}\right) \quad (7.8)$$

Enzima 4 $\left[\frac{e_4}{e_4^{max}}\right]$

$$\frac{d\left(\frac{e_4}{e_4^{max}}\right)}{dt} = \frac{(\mu_{e_4}^{max} + \beta_4) Pir}{K_{e_4} + Pir} U_4^d - (r_5 V_5^d - K_d) \left(\frac{e_4}{e_4^{max}}\right) - \beta_4 \left(\frac{e_4}{e_4^{max}}\right) \quad (7.9)$$

Enzima 5 $\left[\frac{e_5}{e_5^{max}}\right]$

$$\frac{d\left(\frac{e_5}{e_5^{max}}\right)}{dt} = \frac{(\mu_{e_5}^{max} + \beta_5) Pir}{K_{e_5} + Pir} U_5^d - (r_5 V_5^d - K_d) \left(\frac{e_5}{e_5^{max}}\right) - \beta_5 \left(\frac{e_5}{e_5^{max}}\right) \quad (7.10)$$

El modelo cibernético se presenta de modo condensado en el Anexo 2. Este modelo se utilizó para determinar los parámetros cinéticos del co-cultivo, el modelo se convierte a un problema de optimización NLP utilizando la metodología que se describe en la siguiente sección.

7.3. Estimación de parámetros

Los modelos matemáticos son utilizados frecuentemente para describir procesos químicos, físicos o biológicos. El comportamiento de la mayoría de estos procesos puede ser descrito en general por un sistema de ecuaciones diferenciales algebraicas (DAEs) conteniendo parámetros cinéticos ajustables a los datos experimentales. La estimación de parámetros es uno de los pasos involucrados en la formulación y validación de un modelo matemático que describe el proceso de interés. El desarrollo de un método eficaz para resolver el problema de la estimación de parámetros para estos modelos es una parte importante para el avance y la mejora de los modelos de los procesos.

Para la estimación de parámetros de un modelo matemático es necesario un conjunto de mediciones experimentales. Estas mediciones frecuentemente contienen errores inherentes. Aquí, el método de máxima verosimilitud es usado frecuentemente como el método de estimación. Además, si el error tiene una distribución normal con una covarianza conocida, el método de máxima verosimilitud se reduce a una función de mínimos cuadrados ponderados. Bajo estas condiciones, se pueden utilizar técnicas de optimización eficaces para explotar la estructura de mínimos cuadrados en la estimación de parámetros con restricciones.

Bajo este enfoque Tjoa *et al* [51] presentaron un método híbrido de programación cuadrática sucesiva para resolver problemas no-lineales de estimación de parámetros, el cual explota la estructura de mínimos cuadrados de la función objetivo y optimiza los parámetros sólo en un espacio reducido. La metodología establece que la estimación de parámetros que involucra ecuaciones diferenciales puede ser formulada como un problema no-lineal (NLP) utilizando la colocación ortogonal sobre elementos finitos. Esta formulación permite que otras restricciones del proceso sean agregadas directamente. Además, la solución y optimización pueden ser obtenidas simultáneamente.

En general este tipo de problemas se define como problema de optimización dinámica. El objetivo de la optimización dinámica es determinar, en un sistema a lazo abierto, el conjunto de perfiles a lo largo del tiempo para las variables de decisión (presión, temperatura, flujo, carga térmica, ...) para el sistema dinámico que optimice a una función de desempeño dada (o funcional

de costo o criterio de optimización) relativo a un costo, tiempo, energía, selectividad, ..., la cual está sujeta a restricciones especificadas (seguridad, restricciones ambientales y operativas). Existen varios enfoques que pueden ser aplicados para resolver el problema general de optimización dinámica. Estos pueden ser divididos en métodos analíticos, que han sido utilizados desde el origen de este tipo de problemas, y los métodos numéricos, que tienen gran preferencia hoy en día.

7.3.1. Problema de optimización dinámica

El problema de optimización dinámica se puede definir como:

$$\min_{z(t), u(t), p} \varphi(z(t_f)) \quad (7.11)$$

$$\text{s.t.} \quad \frac{dz(t)}{dt} = f(z(t), y(t), u(t), p), \quad z(t_0) = z_0 \quad (7.12)$$

$$g(z(t), y(t), u(t), p) = 0 \quad (7.13)$$

$$g_f(z(t_f)) = 0 \quad (7.14)$$

$$u_I \leq u(t) \leq u_S$$

$$y_I \leq y(t) \leq y_S$$

$$z_I \leq z(t) \leq z_S \quad (7.15)$$

Las incógnitas en este problema de optimización son las *variables estados* $z(t)$, las *variables algebraicas* $y(t)$, las *variables de control* $u(t)$, todas funciones del parámetro escalar "tiempo" $t \in [t_0, t_f]$, así como los *parámetros independientes del tiempo* p . Como restricciones tenemos el sistema de ecuaciones diferencial algebraico (DAEs) dado por las ecuaciones (7.12)-(7.14) y suponemos sin perder generalidad que el sistema DAE (ec. (7.12), ec. (7.13)) es índice uno. [5]

En la Figura 7.7, se presentan distintos enfoques para resolver las ecuaciones (7.11)-(7.15). Para hacer frente a los problemas de optimización dinámica con sistemas de pequeña escala, se ha aplicado tradicionalmente el principio del máximo de Pontryagin. Sin embargo, este enfoque comienza a ser difícil de manejar cuando se enfrentan sistemas grandes o con restricciones. Para enfrentar estos problemas, metodologías basadas en enfoques secuenciales y simultáneos han sido ampliamente utilizadas.

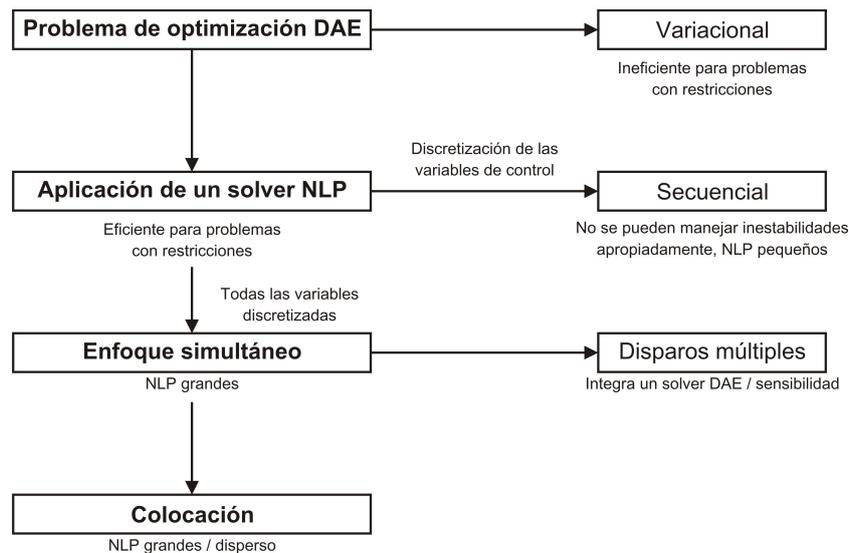


Figura 7.7: Estrategias de solución para la optimización dinámica.

El enfoque secuencial frecuentemente llamado parametrización del vector de control (CVP), que consiste en una aproximación en la trayectoria por una función que consta de solo unos cuantos parámetros, manteniendo las ecuaciones de los estados en su forma original para el sistema ODE/DAE. En su mayor parte los perfiles constantes de control son utilizados por secciones. De ahí que el problema de optimización dimensional infinito en variables de control continuas es transformado en un problema de programación NLP dimensional finito, el cual puede ser resuelto por cualquier técnica basada en el método del gradiente. Los gradientes de la función objetivo con respecto a los coeficientes de control y los parámetros son calculados de forma directa de las ecuaciones de sensibilidad del sistema ODE/DAE o por la integración de las ecuaciones adjuntas. Además, este método es conveniente, ya que mejora su solución en cada iteración

El enfoque simultáneo de discretización completa aproxima los perfiles continuos en el tiempo de las variables estado y de control a cada elemento finito gracias a un esquema de cuadratura numérica. Con esto, el modelo DAE discretizado puede ser agregado directamente como restricciones algebraicas en la formulación NLP. El solver NLP resuelve simultáneamente el modelo DAE al mismo tiempo que minimiza la función objetivo. En otras palabras, el sistema discretizado DAE es resuelto solo una ocasión, en el punto óptimo, y además evita la integración repetida de modelos DAE de gran escala. Otra consecuencia de esto es que este enfoque puede manejar sistemas inestables a lazo abierto. Finalmente, debido a que el problema no lineal está completamente en forma algebraica, la información de las derivadas de primer y segundo orden pueden ser calculadas con bajo costo computacional mediante plataformas de modelado o rutinas de diferenciación automática. Un problema que surge en el enfoque de discretización completa es que se requiere de un gran número de puntos de discretización y técnicas para refinar el mallado para manipular sistemas dinámicos rígidos [57]. Justamente este método fue empleado para resolver el modelo descrito en la sección 7.2.2.

7.3.2. Formulación del problema de programación no lineal (NLP) para la estimación de los parámetros cinéticos del co-cultivo

El modelo DAE generado en la sección 7.2.2 se puede resolver planteándose como un problema de optimización dinámica. El modelo cibernético del co-cultivo se discretizó completamente en los perfiles estado. Esto significa que los perfiles son aproximados por combinaciones lineales de algunas bases de funciones, las cuales son conocidas y solamente los coeficientes de la combinación lineal tendrán que ser optimizados. Además, cada segmento en la secuencia de control está definida en el intervalo del tiempo, cuya longitud misma puede ser la variable optimizada. Se ha supuesto que el modelo dinámico optimizado puede ser descrito por un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias.

El problema de optimización DAE (ecs. (7.11)-(7.15)) puede ser convertido en un problema NLP aproximando las variables estado y de control como una familia de polinomios sobre elementos finitos ($t_0 < t_1 < \dots < t_N = \Theta$). Estos polinomios pueden ser representados como

una serie de potencias, sumas de polinomios ortogonales o polinomios de Lagrange. Utilizando la siguiente base monomial para representar los perfiles diferenciales, que es popular para la discretización Runge-Kutta:

$$z(t) = z_{i-1} + h_i \sum_{q=1}^K \Omega_q \left(\frac{t - t_{i-1}}{h_i} \right) \frac{dz}{dt}_{i,q} \quad (7.16)$$

donde z_{i-1} es el valor de la variable diferencial al inicio de cada elemento i , h_i es la longitud del elemento i , $\frac{dz}{dt}_{i,q}$ es el valor de su primera derivada en el elemento i en el punto de colocación q , y Ω_q es un polinomio de orden K , que satisface

$$\begin{aligned} \Omega_q(0) &= 0 \quad \text{para } q = 1, \dots, K \\ \Omega'_q(\rho_r) &= \delta_{q,r} \quad \text{para } q, r = 1, \dots, K \end{aligned}$$

donde ρ_r es la posición del r -ésimo punto de colocación dentro de cada elemento.

La continuidad de los perfiles diferenciales es forzada al final de cada elemento por

$$z_i = z_{i-1} + h_i \sum_{q=1}^K \Omega_q(1) \frac{dz}{dt}_{i,q} \quad (7.17)$$

De acuerdo a los numerosos estudios realizados por Biegler [5], se recomienda utilizar los puntos de colocación de Radau porque permiten restringir los perfiles de manera fácil en las fronteras de cada elemento finito y estabilizan el sistema de manera más eficiente si el DAE es de índice alto. Además, los perfiles de control y los algebraicos son aproximados utilizando una representación base de Lagrange la cual tiene la forma

$$y(t) = \sum_{q=1}^K \psi_q \left(\frac{t - t_{i-1}}{h_i} \right) y_{i,q} \quad (7.18)$$

$$u(t) = \sum_{q=1}^K \psi_q \left(\frac{t - t_{i-1}}{h_i} \right) u_{i,q} \quad (7.19)$$

donde $y_{i,q}$ y $u_{i,q}$ representan los valores de las variables algebraicas y de control, respectivamente, en el elemento i en el punto de colocación q . ψ_q es el polinomio de Lagrange de grado K que satisface

$$\psi_q(\rho_r) = \delta_{q,r} \quad \text{para } q, r = 1, \dots, K$$

En la ecuación (7.16), las variables diferenciales deben ser continuas durante todo el horizonte del tiempo, en tanto que las variables de control y las variables algebraicas se les permite tener discontinuidad en las fronteras de los elementos. Como se muestra en la Figura 7.8, la ecuación (7.16) permite que los límites sobre las variables diferenciales sean reforzadas directamente en las fronteras de los elementos, utilizando z_i .

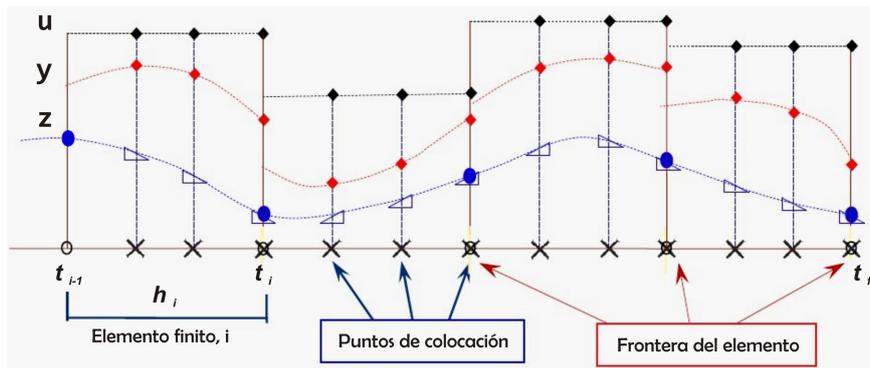


Figura 7.8: Colocación sobre elementos finitos. Los diamantes representan u y y en los puntos de colocación. Los triángulos representan dz/dt en los puntos de colocación y los círculos representan z en las fronteras de los elementos, donde la discontinuidad se permite en u y y , a pesar de que la continuidad en z sea retenida.

La substitución de las ecuaciones (7.16)-(7.19) en las ecuaciones (7.11)-(7.15) lleva al siguiente NLP.

$$\min_{\frac{dz}{dt}_{i,q}, u_{i,q}, y_{i,q}, p} \varphi(z_N) \quad (7.20)$$

$$\text{s.t.} \quad \frac{dz}{dt}_{i,q} = f(z_{i,q}, y_{i,q}, u_{i,q}, p), \quad (7.21)$$

$$z_{i,q} = z_{i-1} + h_i \sum_{q'=1}^K \Omega_{q'}(\rho_q) \quad (7.22)$$

$$g(z_{i,q}, y_{i,q}, u_{i,q}, p) = 0 \quad i = 1, \dots, N, \quad q = 1, \dots, K \quad (7.23)$$

$$z_i = z_{i-1} + h_i \sum_{q=1}^K \Omega_q(1) \quad i = 1, \dots, N \quad (7.24)$$

$$g_f(z_N) = 0 \quad (7.25)$$

y para $i = 1, \dots, N, \quad q = 1, \dots, K$:

$$u_I \leq u_{i,q} \leq u_S$$

$$y_I \leq y_{i,q} \leq y_S$$

$$z_I \leq z_{i,q} \leq z_S \quad (7.26)$$

Este NLP puede ser re-escrito como:

$$\min_{x \in \mathfrak{R}^n} f(x) \quad (7.27)$$

$$\text{s.t.} \quad c(x) = 0 \quad (7.28)$$

$$x_I \leq x \leq x_S \quad (7.29)$$

donde $x = \left(\frac{dz}{dt}_{i,q}, z_i, y_{i,k}, u_{i,q}, t, p \right)^T$, $f : \mathfrak{R}^n \rightarrow \mathfrak{R}$ y $c : \mathfrak{R}^n \leftrightarrow \mathfrak{R}^m$.

El enfoque simultáneo tiene ventajas con respecto a otros enfoques en la optimización dinámica:

- i) Debido a que las variables de control y las variables de estado están discretizadas al mismo nivel, las condiciones de Karush Kuhn Tucker (KKT) del NLP simultáneo son consistentes con las condiciones de optimalidad del problema variacional discretizado,
- ii) el enfoque simultáneo puede ser visto como una extensión de un solver de valores a la frontera robusto, que es capaz de precisar modos inestables. Esta característica tiene beneficios sobre problemas que contengan puntos inestables de transición, sistemas caóticos de optimización y sistemas con ciclos límite o bifurcaciones,
- iii) los métodos simultáneos también permiten un reforzamiento directo a las restricciones de las variables de estado y de control, al mismo nivel de discretización como las variables de estado del sistema DAE, esto presenta grandes ventajas en problemas de gran escala, y
- iv) el enfoque simultáneo tiene distintas ventajas para problemas de control singulares y problemas con restricciones de índice alto.

Para aplicar el enfoque simultáneo al modelo DAE del co-cultivo primero debemos definir una función objetivo que nos permita disminuir el error entre las variables estado calculadas por el modelo y los datos experimentales, que son la glucosa, la xilosa, la biomasa y el etanol. El ajuste de datos a modelos, empíricos o deterministas, tradicionalmente utiliza el método de los mínimos cuadrados donde el mejor ajuste minimiza la suma del cuadrado de los errores. El trabajo de Tjoa *et al* [51] mostró que utilizar una función objetivo con una estructura de mínimos cuadrados es capaz de optimizar los parámetros utilizando el enfoque simultáneo. La función objetivo general que se utiliza en el NLP es la siguiente:

$$\min_{G, Xil, X, E} \int_0^{t_f} \left\{ \alpha_1 (G - G^{ex})^2 + \alpha_2 (Xil - Xil^{ex})^2 + \alpha_3 (X - X^{ex})^2 + \alpha_4 (E - E^{ex})^2 \right\} dt \quad (7.30)$$

la cual está sujeta a los balances de materia (ecuaciones (7.1)-(7.10)) y las condiciones iniciales (Tablas (6.1), (6.2) y (6.3)). En esta función objetivo G^{ex} , Xil^{ex} , X^{ex} y E^{ex} representan los valores experimentales obtenidos en la sección 6. α_1 , α_2 , α_3 y α_4 son los factores de peso correspondientes a las variables estado glucosa, xilosa, células y etanol. El objetivo es minimizar el error residual entre las variables estado y los valores experimentales, de este modo estimación de los parámetros cinéticos asegurarán el buen comportamiento de los perfiles de las variables estado que describe el modelo matemático.

Al aplicar el enfoque simultáneo para resolver el problema de optimización dinámica dado por la función objetivo (ecuación (7.30)) y las restricciones correspondientes al problema DAE (ecuaciones (7.1)-(7.10)) y las respectivas definiciones algebraicas, este fue convertido en un problema NLP a través de la aproximación del DAEs que tiene como funciones (G , Xil , Pir , X , E , $e_i \equiv \frac{e_i}{e_i^{max}}$) por medio del empleo del método de colocación ortogonal sobre elementos finitos para la coordenada temporal. El problema NLP discretizado está dado por la función objetivo siguiente:

$$\min_{G_{i,j}, Xil_{i,j}, X_{i,j}, E_{i,j}} \sum_{i=1}^{NFE} h_i \sum_{j=1}^{NCP} A_{j,NCP} \left[\alpha_1 (G_{i,j} - G_{i,j}^{ex})^2 + \alpha_2 (Xil_{i,j} - Xil_{i,j}^{ex})^2 + \alpha_3 (X_{i,j} - X_{i,j}^{ex})^2 + \alpha_4 (E_{i,j} - E_{i,j}^{ex})^2 \right] \quad (7.31)$$

donde $NFE \equiv FE$ es el número de elementos finitos y $NCP \equiv CP$ es el número del punto de colocación. Los balances de materia discretizados están dados por las ecuaciones algebraicas siguientes:

$$\mathbf{Z}_{i,j} = \mathbf{Z}^0_i + \text{tiempo} \cdot h_i \cdot \sum_{k=1}^{CP} A_{k,j} \cdot \dot{\mathbf{Z}}_{i,k} \quad (7.32)$$

donde $\mathbf{Z}_{i,j}$ representa las variables estado discretizadas ($G_{i,j}$, $Xil_{i,j}$, $Pir_{i,j}$, $X_{i,j}$, $E_{i,j}$, $e_{1\ i,j}$, $e_{2\ i,j}$, $e_{3\ i,j}$, $e_{4\ i,j}$, $e_{5\ i,j}$), \mathbf{Z}^0_i representa las variables estado en los puntos iniciales de cada elemento, 'tiempo' es el horizonte de tiempo, h_i la longitud del elemento finito y $\dot{\mathbf{Z}}_{i,j}$ son restricciones de las derivadas de primer orden. Las expresiones para $\dot{\mathbf{Z}}_{i,j}$ son las siguientes:

$$\dot{G}_{i,j} = (-r_{1\ i,j} V_{1\ i,j}^c - r_{2\ i,j} V_{2\ i,j}^c) X_{i,j} \quad (7.33)$$

$$\dot{X}il_{i,j} = -r_{3\ i,j} V_{3\ i,j}^c X_{i,j} \quad (7.34)$$

$$\dot{P}ir_{i,j} = \left(r_{1\ i,j} V_{1\ i,j}^c Y_{G1}^{Pir} + r_{2\ i,j} V_{2\ i,j}^c Y_{G2}^{Pir} + r_{3\ i,j} V_{3\ i,j}^c Y_{Xil}^{Pir} - \frac{r_{4\ i,j} V_{4\ i,j}^d}{Y_{Pir}^E} - \frac{r_{5\ i,j} V_{5\ i,j}^d}{Y_{Pir}^X} \right) X_{i,j} \quad (7.35)$$

$$\dot{E}_{i,j} = r_{4\ i,j} V_{4\ i,j}^d X_{i,j} \quad (7.36)$$

$$\dot{X}_{i,j} = (r_{5\ i,j} V_{5\ i,j}^d - K_d) X_{i,j} \quad (7.37)$$

$$\dot{e}_{1\ i,j} = \frac{(\mu_{e_1}^{max} + \beta_1) G_{i,j}}{K_{e_1} + G_{i,j}} U_{1\ i,j}^c - (r_{5\ i,j} V_{5\ i,j}^d - K_d) e_{1\ i,j} - \beta_1 e_{1\ i,j} \quad (7.38)$$

$$\dot{e}_{2\ i,j} = \frac{(\mu_{e_2}^{max} + \beta_2) G_{i,j}}{K_{e_2} + G_{i,j}} U_{2\ i,j}^c - (r_{5\ i,j} V_{5\ i,j}^d - K_d) e_{2\ i,j} - \beta_2 e_{2\ i,j} \quad (7.39)$$

$$\dot{e}_{3\ i,j} = \frac{(\mu_{e_3}^{max} + \beta_3) Xil_{i,j}}{K_{e_3} + Xil_{i,j}} U_{3\ i,j}^c - (r_{5\ i,j} V_{5\ i,j}^d - K_d) e_{3\ i,j} - \beta_3 e_{3\ i,j} \quad (7.40)$$

$$\dot{e}_{4\ i,j} = \frac{(\mu_{e_4}^{max} + \beta_4) Pir_{i,j}}{K_{e_4} + Pir_{i,j}} U_{4\ i,j}^d - (r_{5\ i,j} V_{5\ i,j}^d - K_d) e_{4\ i,j} - \beta_4 e_{4\ i,j} \quad (7.41)$$

$$\dot{e}_{5\ i,j} = \frac{(\mu_{e_5}^{max} + \beta_5) Pir_{i,j}}{K_{e_5} + Pir_{i,j}} U_{5\ i,j}^d - (r_{5\ i,j} V_{5\ i,j}^d - K_d) e_{5\ i,j} - \beta_5 e_{5\ i,j} \quad (7.42)$$

Las derivadas involucran ecuaciones algebraicas para las velocidades de reacción, las variables cibernéticas que controlan la síntesis enzimática y las variables cibernéticas que controlan la actividad enzimática que se definen como:

$$r_{1\ i,j} = \frac{\mu_{max,1} e_{1\ i,j} G_{i,j}}{K_1 + G_{i,j}} \quad (7.43)$$

$$r_{2\ i,j} = \frac{\mu_{max,2} e_{2\ i,j} G_{i,j}}{K_2 + G_{i,j}} \quad (7.44)$$

$$r_{3\ i,j} = \frac{\mu_{max,3} e_{3\ i,j} Xil_{i,j}}{K_3 + Xil_{i,j}} \quad (7.45)$$

$$r_{4\ i,j} = \frac{\mu_{max,4} e_{4\ i,j} Pir_{i,j}}{Pir_{i,j} + K_4 + \frac{Pir_{i,j}^2}{K_{sini,4}}} \left(1 - \frac{E_{i,j}}{K_{pini,4}}\right) \quad (7.46)$$

$$r_{5\ i,j} = \frac{\mu_{max,5} e_{5\ i,j} Pir_{i,j}}{Pir_{i,j} + K_5 + \frac{Pir_{i,j}^2}{K_{sini,5}}} \left(1 - \frac{E_{i,j}}{K_{pini,5}}\right) \quad (7.47)$$

$$U_{1\ i,j}^c = \frac{r_{1\ i,j}}{r_{1\ i,j} + r_{2\ i,j} + r_{3\ i,j}} \quad (7.48)$$

$$U_{2\ i,j}^c = \frac{r_{2\ i,j}}{r_{1\ i,j} + r_{2\ i,j} + r_{3\ i,j}} \quad (7.49)$$

$$U_{3\ i,j}^c = \frac{r_{3\ i,j}}{r_{1\ i,j} + r_{2\ i,j} + r_{3\ i,j}} \quad (7.50)$$

$$U_{4\ i,j}^d = \frac{\frac{r_{4\ i,j}}{E_{i,j}}}{\frac{r_{4\ i,j}}{E_{i,j}} + \frac{r_{5\ i,j}}{X_{i,j}}} \quad (7.51)$$

$$U_{5\ i,j}^d = \frac{\frac{r_{5\ i,j}}{X_{i,j}}}{\frac{r_{4\ i,j}}{E_{i,j}} + \frac{r_{5\ i,j}}{X_{i,j}}} \quad (7.52)$$

Las variables cibernéticas que controlan la actividad enzimática contienen la función $max(x_1, \dots, x_n)$ que es una función no diferenciable, para poder discretizar la variable necesitamos convertir a la función $max()$ no diferenciable a una diferenciable. Balakrishna *et al* [3] proponen una técnica simple basada en una aproximación hiperbólica para convertir la función no diferenciable $max()$ en modelo DAE. Las ecuaciones se definen a continuación:

$$V_{1\ i,j}^c = \frac{r_{1\ i,j}}{r_{1\ i,j} + \sqrt{(z_{1\ i,j}^2 + Ep^2)/2} - (z_{1\ i,j}/2)} \quad (7.53)$$

$$V_{2\ i,j}^c = \frac{r_{2\ i,j}}{r_{1\ i,j} + \sqrt{(z_{1\ i,j}^2 + Ep^2)/2} - (z_{1\ i,j}/2)} \quad (7.54)$$

$$V_{3\ i,j}^c = \frac{r_{3\ i,j}}{r_{1\ i,j} + \sqrt{(z_{1\ i,j}^2 + Ep^2)/2} - (z_{1\ i,j}/2)} \quad (7.55)$$

$$z_{1\ i,j} = r_{1\ i,j} - z_{2\ i,j}$$

$$z_{2\ i,j} = r_{2\ i,j} + \sqrt{(z_{3\ i,j}^2 + Ep^2)/2} - (z_{3\ i,j}/2)$$

$$z_{3\ i,j} = r_{2\ i,j} - r_{3\ i,j}$$

$$V_{4\ i,j}^d = \frac{(r_{4\ i,j}/E_{i,j})}{(r_{4\ i,j}/E_{i,j}) + \sqrt{(z_{4\ i,j}^2 + Ep^2)/2} - (z_{4\ i,j}/2)} \quad (7.56)$$

$$V_{5\ i,j}^d = \frac{(r_{5\ i,j}/X_{i,j})}{(r_{4\ i,j}/E_{i,j}) + \sqrt{(z_{4\ i,j}^2 + Ep^2)/2} - (z_{4\ i,j}/2)} \quad (7.57)$$

$$z_{4\ i,j} = (r_{4\ i,j}/E_{i,j}) - (r_{5\ i,j}/X_{i,j})$$

Las restricciones de continuidad entre cada uno de los elementos se definen como:

$$\mathbf{Z}_i^0 = \mathbf{Z}_{i-1}^0 + \text{tiempo} \cdot h_{i-1} \cdot \sum_{k=1}^{CP} A_{k,j} \cdot \dot{\mathbf{Z}}_{i-1,k} \quad (7.58)$$

Los valores iniciales son $\mathbf{Z}_1^0 = [G_{init}, Xil_{init}, Pir_{init}, E_{init}, X_{init}, e_{1\ init}, e_{2\ init}, e_{3\ init},$

$e_{4 \text{ init}}, e_{5 \text{ init}}$]. En esta formulación matemática, la notación de subíndices fue utilizada para representar los puntos en un tiempo determinado. Por ejemplo, $E_{i,j}$ denota el valor de la concentración de etanol en el i -ésimo elemento finito, del j -ésimo punto de colocación en la discretización temporal.

Los trabajos presentados por Tjoa *et al* [51] y Luperini-Enciso *et al* [34] han empleado el enfoque simultáneo para la estimación de parámetros de sistemas (DAEs) mostrando buen desempeño para la solución de estos problemas. La sección 7.4 muestra los resultados obtenidos en la estimación de parámetros al emplear el enfoque simultáneo en el modelo de co-cultivo.

7.4. Resultados de la estimación de parámetros y simulación del modelo cibernético del co-cultivo

7.4.1. Estimación de parámetros cinéticos del co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*

El problema de optimización dinámica se formuló de dos formas distintas: i) la primera formulación, de ahora en adelante denotada como F1, tiene como objetivo ajustar los perfiles de la glucosa G , xilosa Xil , biomasa X y etanol E a los datos experimentales, y calcular los perfiles del piruvato y las proporción de las enzimas e_i , además de determinar los parámetros cinéticos (35 parámetros) que aseguran el comportamiento del modelo de co-cultivo; ii) la segunda formulación, denotada como F2, tiene el mismo objetivo de ajustar los perfiles a los datos experimentales y calcular las variables estado restantes pero el número de parámetros cinéticos a determinar es de 32 parámetros, los tres parámetros restantes ($\mu_{max,1}$, K_1 , K_d) se declaran como constantes en el problema de optimización dinámica. El primer caso permite al problema tener una región factible amplia para la búsqueda de la solución, mientras que el segundo caso acota más a la región factible de búsqueda. Para ambos casos, el análisis fue hecho para tres condiciones iniciales diferentes de las mezclas de azúcares, y el tiempo del proceso de fermentación fue de 72 horas en todos los casos. En la Tabla 7.1 se muestra el número de elementos finitos y los factores de peso empleados en la función objetivo para cada caso de estudio. Los problemas de optimización dinámica discretizados se resolvieron en una computadora con procesador

Intel Core i3, con una velocidad de 2.13 GHz y una memoria RAM de 4 GB. El problema de programación no lineal (NLP), descrito en la sección 7.3.2, fue resuelto utilizando CONOPT, algoritmo de optimización local que se basa en el método de gradiente reducido generalizado, y el empleo de la interfase GAMS.

Tabla 7.1: Resumen de resultados obtenidos en una computadora con procesador Intel Core i3, con una velocidad de 2.13 GHz y una memoria RAM de 4 GB. Se emplearon tres puntos internos de colocación en cada elemento finito.

Caso	Mezcla glucosa : xilosa	Número de Elementos Finitos (NFE)	Factores de peso $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4$	Función objetivo	Tiempo de CPU [seg]
F1	20% : 80%	16	1, 1, 1, 1	1.0114	429.9
F1	50% : 50%	18	1, 1, 1, 1	1.4177	61.1
F1	80% : 20%	16	1, 1, 1, 1	4.2129	187.6
F2	20% : 80%	16	1, 1, 10, 1	2.406	431.6
F2	50% : 50%	18	1, 1, 1, 1	0.4789	472.4
F2	80% : 20%	16	0.1, 0.1, 10, 10	16.628	501.2

Las Tablas 8.2 y 8.3 contienen los valores de los parámetros cinéticos de la formulación F1 y F2 para los sistemas con distintas condiciones iniciales de mezclas de azúcares. Estos parámetros cinéticos se utilizaron para simular el proceso de fermentación de los 6 distintos casos (Tabla 7.1). Los valores de los parámetros cinéticos de la formulación F2 son: $\mu_{max,1} = 0.65$ 1/h y $K_1 = 11.39$ g/L tomados del trabajo presentado por Shafaghat *et al* [48], mientras que $K_d = 0.001$ 1/h que se determino utilizando el trabajo presentado por Brányik *et al* [9] que determina el parámetro K_d a partir de una ecuación lineal que ajusta datos experimentales del $\ln K_d$ vs. $1/T$.

El tiempo de CPU aumentó al resolver el problema NLP cuando se utilizó la formulación F2 como consecuencia del acotamiento de la región de búsqueda, además de utilizar los factores de peso para ponderar la importancia de los términos a ajustar en la función objetivo. El hecho de reducir los parámetros cinéticos a estimar no facilito la búsqueda del óptimo local del problema NLP. Los parámetros de las Tablas 8.2 y 8.3 se utilizan en la siguiente sección para simular el proceso de fermentación del co-cultivo.

Tabla 7.2: Parámetros cinéticos para la formulación F1 calculados como óptimo local del problema NLP.

<i>Mezcla de glucosa – xilosa</i>	<i>Límite inferior</i>	20 : 80	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	50 : 50	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	80 : 20	<i>Límite superior</i>	<i>Unidades</i>
<i>Parámetros</i>										
$\mu_{\max,1}$	0.01	43.50	$+\infty$	0.00	34.0140	$+\infty$	0.01	28.248	500.00	h^{-1}
$\mu_{\max,2}$	0.01	0.01	$+\infty$	0.00	1.4970	$+\infty$	0.01	183.109	500.00	h^{-1}
$\mu_{\max,3}$	0.01	35.24	$+\infty$	0.00	37.7090	$+\infty$	0.01	90.639	500.00	h^{-1}
$\mu_{\max,4}$	0.01	197780	$+\infty$	0.00	6.6060	$+\infty$	0.01	0.368	500.00	h^{-1}
$\mu_{\max,5}$	0.01	1.63	$+\infty$	0.00	0.1270	$+\infty$	0.01	0.113	500.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e1}$	0.01	0.01	$+\infty$	1.00E-020	0.3280	$+\infty$	0.01	0.010	500.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e2}$	0.01	7.05	$+\infty$	1.00E-024	0.4930	$+\infty$	0.01	0.010	500.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e3}$	0.01	0.01	$+\infty$	1.00E-020	2.4280	$+\infty$	0.01	0.010	500.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e4}$	0.01	3678.47	$+\infty$	0.00	1.2290	$+\infty$	0.01	3.742	500.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e5}$	0.01	1924.01	$+\infty$	0.00	4.9800	$+\infty$	0.01	2.834	500.00	h^{-1}
K_1	1.00E-008	1.04	$+\infty$	0.00	1.0630	$+\infty$	0.01	94.583	200.00	g/L
K_2	1.00E-008	1.00E-008	$+\infty$	0.00	4233.2170	$+\infty$	0.01	26.146	200.00	g/L
K_3	1.00E-008	1.00E-008	$+\infty$	0.00	20.9800	$+\infty$	0.01	197.488	200.00	g/L
K_4	1.00E-008	1009500	$+\infty$	0.00	66.0790	$+\infty$	0.01	9.489	200.00	g/L
K_5	1.00E-008	6.614	$+\infty$	1.00E-005	6.1520	$+\infty$	0.01	3.249	200.00	g/L
K_{e1}	1.00E-008	83.66	$+\infty$	0.00	172.0300	$+\infty$	0.01	13.555	200.00	g/L
K_{e2}	1.00E-008	0.378	$+\infty$	0.00	10.0100	$+\infty$	0.01	200.000	200.00	g/L
K_{e3}	1.00E-008	9225.53	$+\infty$	0.00	13045.4640	$+\infty$	0.01	208.000	208.00	g/L
K_{e4}	1.00E-008	411910	$+\infty$	0.00	9.1280	$+\infty$	0.01	0.705	200.00	g/L
K_{e5}	1.00E-008	134720	$+\infty$	0.00	7.9550	$+\infty$	0.01	3.386	200.00	g/L
$K_{\text{sini},4}$	0.00	287.98	$+\infty$	0.00	500.5270	$+\infty$	0.00	628.533	$+\infty$	g/L
$K_{\text{sini},5}$	0.00	6095.89	$+\infty$	0.00	499.6690	$+\infty$	0.00	425.449	$+\infty$	g/L
$K_{\text{pini},4}$	0.00	972.33	$+\infty$	0.00	499.8160	$+\infty$	0.00	4177.492	$+\infty$	g/L
$K_{\text{pini},5}$	0.00	1105.54	$+\infty$	0.00	500.5370	$+\infty$	0.00	7592.792	$+\infty$	g/L
K_d	0.00	0.0001	0.0001	0.01	0.0100	$+\infty$	0.00	0.000	1.00E-004	h^{-1}
$Y_{\text{Pir}/G1}$	0.20	0.20	0.95	0.10	0.6460	1.00	0.25	0.392	0.90	g/g
$Y_{\text{Pir}/G2}$	0.20	0.20	0.95	0.10	0.4980	1.00	0.25	0.469	0.90	g/g
$Y_{\text{Pir}/Xil}$	0.40	0.46	0.95	0.40	0.4000	1.00	0.01	0.058	0.90	g/g
$Y_{E/\text{Pir}}$	0.20	0.95	0.95	0.10	0.6780	1.00	0.00	0.875	0.88	g/g
$Y_{X/\text{Pir}}$	0.40	0.40	0.95	0.10	0.9660	1.00	0.00	0.795	0.80	g/g
β_1	0.00	0.782	$+\infty$	0.00	0.5540	$+\infty$	0.00	0.021	$+\infty$	h^{-1}
β_2	0.00	0.228	$+\infty$	0.00	0.0000	$+\infty$	0.00	1.985	$+\infty$	h^{-1}
β_3	0.00	0.613	$+\infty$	0.00	0.3760	$+\infty$	0.00	0.097	$+\infty$	h^{-1}
β_4	0.00	0.023	$+\infty$	0.00	0.0120	$+\infty$	0.00	0.092	$+\infty$	h^{-1}
β_5	0.00	0.100	0.100	0.00	0.0450	$+\infty$	0.00	0.000	$+\infty$	h^{-1}

Tabla 7.3: Parámetros cinéticos para la formulación F2 calculados como óptimo local del problema NLP.

<i>Mezcla de glucosa-xilosa</i>	<i>Límite inferior</i>	20 : 80	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	50 : 50	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	80 : 20	<i>Límite superior</i>	<i>Unidades</i>
<i>Parámetros</i>										
$\mu_{\max,2}$	0.01	42.055	$+\infty$	0.01	44.385	$+\infty$	0.01	1000.000	1000.00	h^{-1}
$\mu_{\max,3}$	0.01	34.778	$+\infty$	0.01	35.48	$+\infty$	0.01	647.132	1000.00	h^{-1}
$\mu_{\max,4}$	0.01	17.098	$+\infty$	0.01	0.193	1000.00	0.01	2.642	1000.00	h^{-1}
$\mu_{\max,5}$	0.01	0.901	$+\infty$	0.01	0.875	$+\infty$	0.01	1.374	1000.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e1}$	0.01	0.912	$+\infty$	0.01	0.01	$+\infty$	0.01	0.525	1000.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e2}$	0.01	0.01	$+\infty$	0.01	286.742	$+\infty$	0.01	100.000	100.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e3}$	0.01	0.01	$+\infty$	0.01	0.01	$+\infty$	0.01	0.001	100.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e4}$	0.01	101.24	$+\infty$	0.01	2.74E+008	$+\infty$	0.01	3.884	1000.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e5}$	0.01	8956.201	$+\infty$	0.01	0.01	$+\infty$	0.01	423.839	1000.00	h^{-1}
K_2	1.00E-006	0.772	$+\infty$	1.00E-006	0.36	$+\infty$	1.00E-006	326.083	$+\infty$	g/L
K_3	1.00E-006	1.00E-006	$+\infty$	1.00E-006	6.609	$+\infty$	1.00E-006	489.261	$+\infty$	g/L
K_4	1.00E-006	1156.215	$+\infty$	1.00E-006	7.718	$+\infty$	1.00E-006	2.9049E-4	$+\infty$	g/L
K_5	1.00E-006	0.069	$+\infty$	1.00E-006	0.006	$+\infty$	1.00E-006	1.0000E-6	$+\infty$	g/L
K_{e1}	1.00E-006	1.00E-006	$+\infty$	1.00E-006	1.17E+008	$+\infty$	1.00E-006	0.001	$+\infty$	g/L
K_{e2}	1.00E-006	71.242	$+\infty$	1.00E-006	97399.289	$+\infty$	1.00E-006	3148.758	$+\infty$	g/L
K_{e3}	1.00E-006	9131.936	$+\infty$	1.00E-006	2850.337	$+\infty$	1.00E-006	1.1146E+5	$+\infty$	g/L
K_{e4}	1.00E-006	1.00E-006	$+\infty$	1.00E-006	6.86E+008	$+\infty$	1.00E-006	81.051	$+\infty$	g/L
K_{e5}	1.00E-006	5.93E+005	$+\infty$	1.00E-006	1.00E-006	$+\infty$	1.00E-006	12372.889	$+\infty$	g/L
$K_{\text{sini},4}$	0.00	0.313	$+\infty$	0.00	37.011	$+\infty$	0.00	3264.621	$+\infty$	g/L
$K_{\text{sini},5}$	0.00	69160.499	$+\infty$	0.00	6.69E+008	$+\infty$	0.00	21.541	$+\infty$	g/L
$K_{\text{pini},4}$	0.00	1128.205	$+\infty$	0.00	2.14E+009	$+\infty$	0.00	3897.274	$+\infty$	g/L
$K_{\text{pini},5}$	0.00	344.127	$+\infty$	0.00	9.725	$+\infty$	0.00	343.637	$+\infty$	g/L
$Y_{\text{Pir}/\text{G1}}$	0.20	0.968	0.99	0.25	0.25	0.99	0.30	0.900	0.99	g/g
$Y_{\text{Pir}/\text{G2}}$	0.20	0.2	0.99	0.25	0.9	0.99	2.95E-001	0.295	0.99	g/g
$Y_{\text{Pir}/\text{Xil}}$	0.20	0.99	0.99	0.20	0.258	0.99	0.30	0.900	0.99	g/g
$Y_{\text{E}/\text{Pir}}$	0.20	0.316	0.99	0.30	0.518	0.99	0.30	0.900	0.99	g/g
$Y_{\text{X}/\text{Pir}}$	0.20	0.288	0.99	0.30	0.9	0.99	0.30	0.681	0.99	g/g
β_1	0.00	0	$+\infty$	0.00	0	$+\infty$	0.00	0	$+\infty$	h^{-1}
β_2	0.00	0.813	$+\infty$	0.00	0.684	$+\infty$	0.00	7.304	$+\infty$	h^{-1}
β_3	0.00	0.605	$+\infty$	0.00	0.628	$+\infty$	0.00	0.235	$+\infty$	h^{-1}
β_4	0.00	18.658	$+\infty$	0.00	0.007	$+\infty$	0.00	0.523	$+\infty$	h^{-1}
β_5	0.00	0.338	$+\infty$	0.00	1.152	$+\infty$	0.00	0.379	$+\infty$	h^{-1}

7.4.2. Simulación del modelo de co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*

En esta sección se validó el modelo de co-cultivo con los datos experimentales obtenidos en la sección 6.1 para la formulación F1 y F2 interpretando el sentido físico del comportamiento del modelo. Algunos parámetros cinéticos estimados para las velocidades de reacción (μ_{max}) y las constantes de saturación (K) son grandes comparados con los encontrados en la literatura para levaduras en cultivos puros. La falta de parámetros cinéticos para co-cultivos con los cuales comparar los resultados obtenidos se debe a las interacciones que existen entre las dos cepas en el co-cultivo, ya que el comportamiento de cada cepa es diferente si se compara con el que se observa en un cultivo puro, y por lo tanto los parámetros cinéticos de cada cepa en el co-cultivo y en el cultivo puro deberán ser diferentes.

Las simulaciones se realizaron en Matlab R2010b utilizando la rutina ode15s para integrar el modelo del co-cultivo, a excepción de la formulación F2 para una mezcla 80%:20% de glucosa y xilosa donde se utilizó la rutina ode23s. Las condiciones iniciales utilizadas para las simulaciones de las tres mezclas de azúcares se muestran en el Cuadro 8.1. La nomenclatura para referirnos a un caso simulado en particular es la siguiente: "caso **F1 C2**" que significa formulación 1 con condiciones iniciales 2.

Tabla 7.4: Condiciones iniciales de las mezclas de glucosa y xilosa para el modelo de co-cultivo.

Caso	Mezcla de glucosa : xilosa	G(t = 0)	Xil(t=0)	Pir(t=0)	E(t=0)	X(t=0)	e1(t=0)	e2(t=0)	e3(t=0)	e4(t=0)	e5(t=0)
C1	20% : 80%	8	32	1.00E-05	1.00E-05	0.3	0.5	0.5	1	0.5	0.5
C2	50% : 50%	20	20	1.00E-05	1.00E-05	0.3	0.5	0.5	1	0.5	0.5
C3	80% : 20%	32	8	1.00E-05	1.00E-05	0.3	0.5	0.5	1	0.5	0.5

Las condiciones iniciales para las enzimas e_1 y e_2 tienen el mismo valor debido a que ambas levaduras crecen en un medio rico con glucosa como fuente de carbono entonces tienen la misma probabilidad de consumir la glucosa, e_3 tiene el valor más alto porque es la única ruta que existe para consumir la xilosa del sistema, y por último las enzimas e_4 y e_5 tienen el mismo valor porque

se considera que las cepas tiene la misma probabilidad para producir biomasa y etanol durante el crecimiento de las mismas.

7.4.2.1. Discusión de resultados de las simulaciones

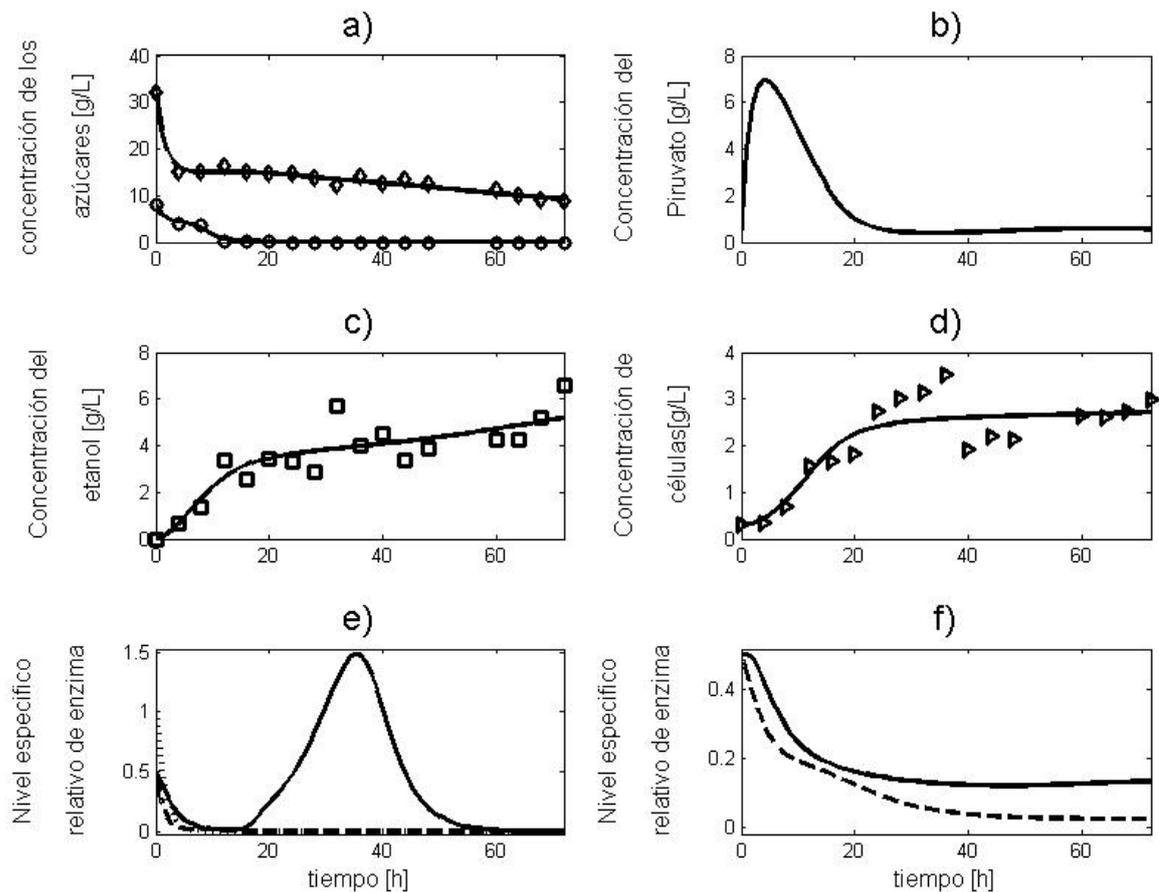


Figura 7.9: Comparación de los datos experimentales con la simulación del co-cultivo del caso F1 C1; a) \diamond xilosa y \circ glucosa, las líneas continuas: variables de estado (xilosa y glucosa) de la simulación; b) perfil de piruvato de la simulación; c) \square etanol, línea continúa: perfil de etanol de la simulación; d) \triangleright células, línea continúa: perfil de células de la simulación; e) perfiles de las enzimas - - e_1 , - e_2 , y $\cdot\cdot\cdot$ e_3 de la simulación; y f) perfiles de las enzimas - e_4 y - - e_5 de la simulación.

Caso F1 C1: La Figura 7.9 muestra los resultados de la simulación del modelo de co-cultivo comparado con los datos experimentales. Los perfiles que describen el consumo de la glucosa y la xilosa se ajustan muy bien a los datos experimentales, así como al perfil de etanol. La

biomasa por su parte ajusta el perfil de modo que presenta un estado estacionario aún cuando los datos experimentales muestran un valor máximo y un decremento amplio en un lapso de 4 horas debido al fenómeno de asimilación de la xilosa como se explico en la sección 6.2. Las enzimas que catalizan el consumo de glucosa (e_1) y la xilosa (e_3) son agotadas por la degradación que es controlada por las constantes β_1 y β_3 que tienen un valor alto; en tanto que la enzima e_2 muestra una acumulación hasta un máximo y una posterior degradación que sucede cuando se observa la disminución de la biomasa en los datos experimentales. Las enzimas e_4 y e_5 que controlan la producción de etanol y biomasa respectivamente, muestran un comportamiento similar de degradación hasta alcanzar un estado estacionario que existe en todo el sistema.

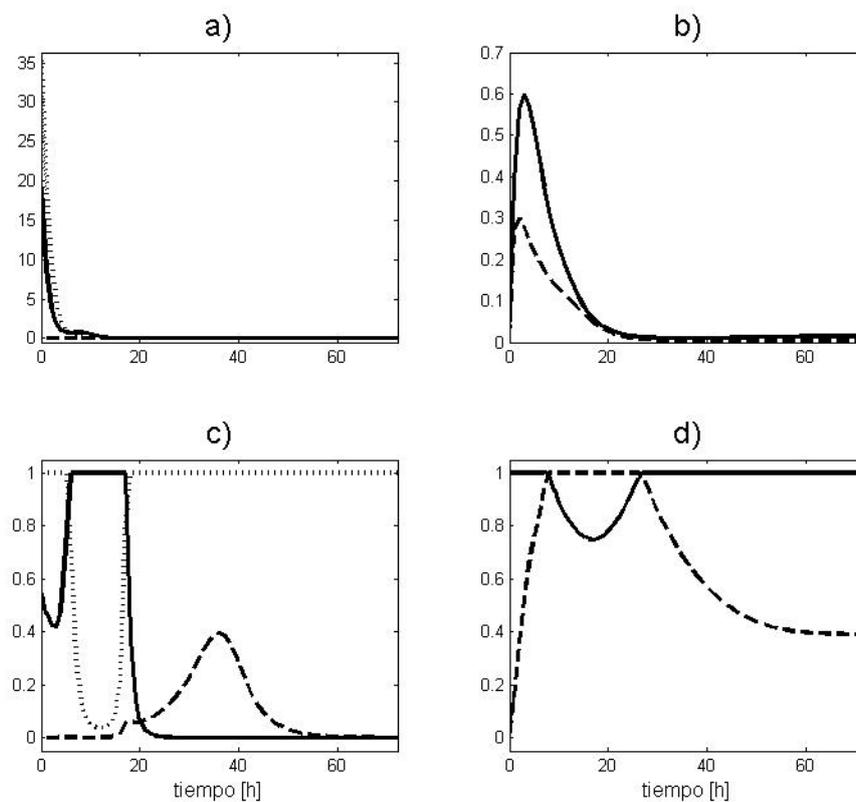


Figura 7.10: Velocidad de reacción y actividad enzimática de la simulación del co-cultivo del caso F1 C1; a) velocidad de reacción $- r_1$, $- - r_2$ y $\cdot \cdot r_3$; b) velocidad de reacción $- r_4$ y $- - r_5$; c) actividad enzimática $- V_1^c$, $- - V_2^c$ y $\cdot \cdot V_3^c$; y d) actividad enzimática $- V_4^d$ y $- - V_5^d$.

La actividad enzimática se mide en una escala adimensional de 0 a 1, donde 0 representa

inactividad y 1 es la mayor actividad alcanzada por las enzimas. La actividad enzimática y las velocidades de reacción confirman que la ruta dominante para el consumo de glucosa es la que pertenece a *S. cerevisiae* en tanto que *P. stipitis* consume la xilosa durante todo el proceso, esto se justifica con el trabajo de Does *et al* [13] que determinó que las especies del genero *Saccharomyces* tienen una velocidad más alta para el consumo de glucosa que las especies del genero *Pichia*. La ruta para el consumo de glucosa de *P. stipitis* es inactiva durante las primeras 16 horas cuando la glucosa es consumida con rapidez por *S. cerevisiae*, posteriormente cuando la actividad de la enzima e_1 es nula inmediatamente se favorece la actividad de la enzima e_2 , esto se debe a la alta afinidad al consumo de glucosa que presentan las especies del genero *Pichia* a bajas concentraciones de glucosa.

La alta actividad de e_4 y la respuesta de la velocidad de reacción r_4 aseguran que la producción de etanol es continua durante la fermentación. La actividad de la enzima e_5 y la respuesta de la velocidad de reacción r_5 explican muy bien como el perfil de biomasa pasa por una etapa exponencial durante las primeras horas hasta alcanzar un estado cuasi-estacionario aproximadamente a las 30 horas cuando la actividad enzimática disminuye sin anularse y la velocidad de reacción tiene valores bajos que estabilizan la tasa de crecimiento de la biomasa.

Caso F1 C2: Los perfiles de glucosa, xilosa y etanol representan muy bien los datos experimentales, sin embargo, el perfil de biomasa (Figura 7.11) difiere ligeramente de los datos experimentales sin perder el sentido físico del proceso. Las enzimas que se encargan del consumo de la glucosa y xilosa son e_1 y e_3 , esto se confirma al analizar las velocidades de reacción r_1 y r_3 , estas tienen el mayor efecto sobre el consumo de los azúcares; además las variables que controlan la actividad enzimática V_1^c y V_3^c son las únicas activas durante el consumo de los azúcares. La enzima e_2 se agota por degradación durante la fermentación pero su participación en el consumo de glucosa es nulo. La enzima e_4 encargada de la producción de etanol tiene una actividad continua en todo el proceso de fermentación lo que se justifica al observar el perfil de etanol que incrementa durante toda la operación.

La enzima e_5 tiene una alta actividad enzimática después de las primeras 10 horas, el tiempo

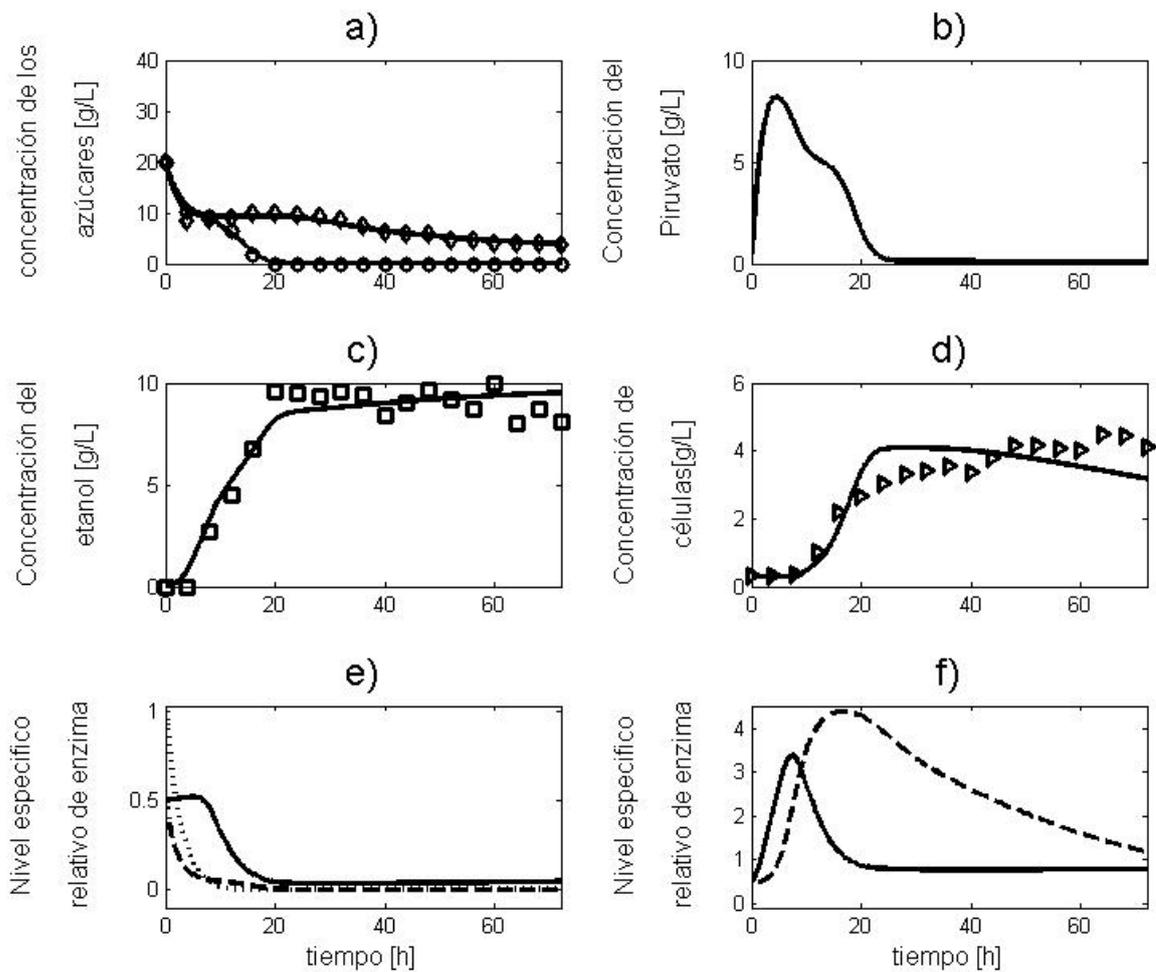


Figura 7.11: Comparación de los datos experimentales con la simulación del co-cultivo del caso F1 C2; a) \diamond xilosa y \circ glucosa, las líneas continuas: variables de estado (xilosa y glucosa) de la simulación; b) perfil de piruvato de la simulación; c) \square etanol, línea continua: perfil de etanol de la simulación; d) \triangleright células, línea continua: perfil de células de la simulación; e) perfiles de las enzimas e_1 , e_2 , y e_3 de la simulación; y f) perfiles de las enzimas e_4 y e_5 de la simulación.

que dura la fase lag, esta alta actividad sugiere la generación de biomasa durante toda la operación la cual es congruente con los datos experimentales, sin embargo, esto no se observa en el perfil calculado para la biomasa. El perfil de biomasa es afectado directamente en el modelo de co-cultivo por la constante de muerte celular K_d , esta tiene un valor alto que repercute de manera negativa en la población de células haciendo que esta disminuya.

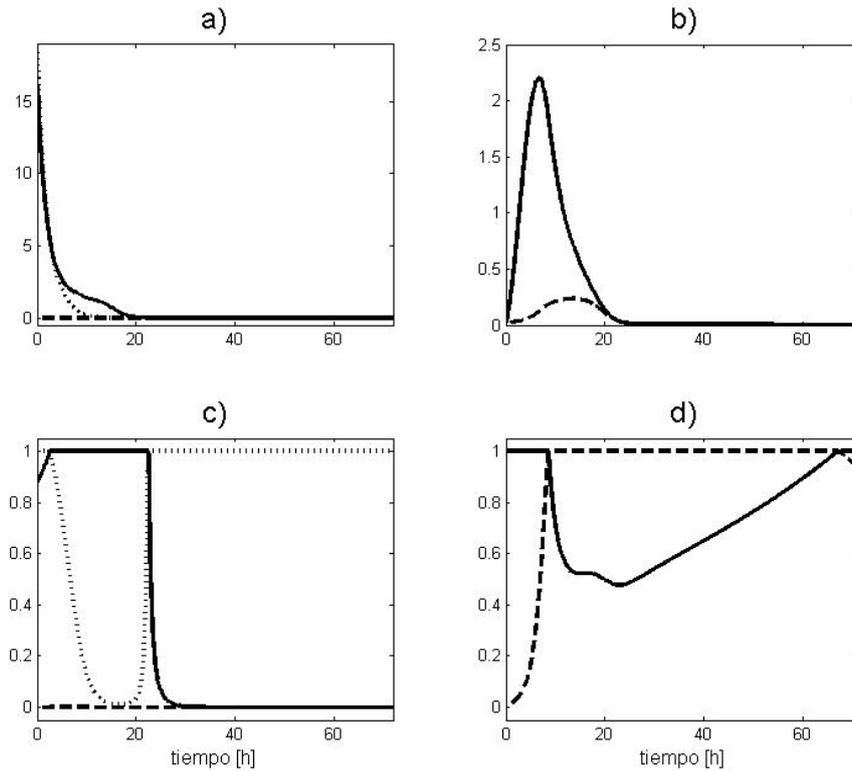


Figura 7.12: Velocidad de reacción y actividad enzimática de la simulación del co-cultivo del caso F1 C2; a) velocidad de reacción $-r_1$, $-r_2$ y $-r_3$; b) velocidad de reacción $-r_4$ y $-r_5$; c) actividad enzimática $-V_1^c$, $-V_2^c$ y $-V_3^c$; y d) actividad enzimática $-V_4^d$ y $-V_5^d$.

Caso F1 C3: El perfil de glucosa y xilosa ajustan bien en los datos experimentales mientras que el ajuste del perfil de la biomasa varía ligeramente de los datos experimentales sin perder la tendencia del fenómeno. Sin embargo, el perfil de etanol discrepa de los datos experimentales alcanzando un estado estacionario después de 20 horas de fermentación. En la sección 6.2 se explicó que después de alcanzar la concentración máxima de etanol este fue consumido por las células a causa del agotamiento de la glucosa y el consumo lento de xilosa, este fenómeno no se describe en el modelo de co-cultivo y como consecuencia el sistema no puede ajustar de manera más precisa el perfil de etanol a los datos experimentales.

Analizando la actividad enzimática y las velocidades de reacción encargadas del consumo de los azúcares, se observó que la enzima e_2 domina en el consumo de la glucosa sobre la enzima e_1 donde la afinidad al sustrato juega el papel principal. Does *et al* [13] mostraron que las especies del género *Pichia* son más afines al consumo de glucosa a altas concentraciones de esta, en tanto

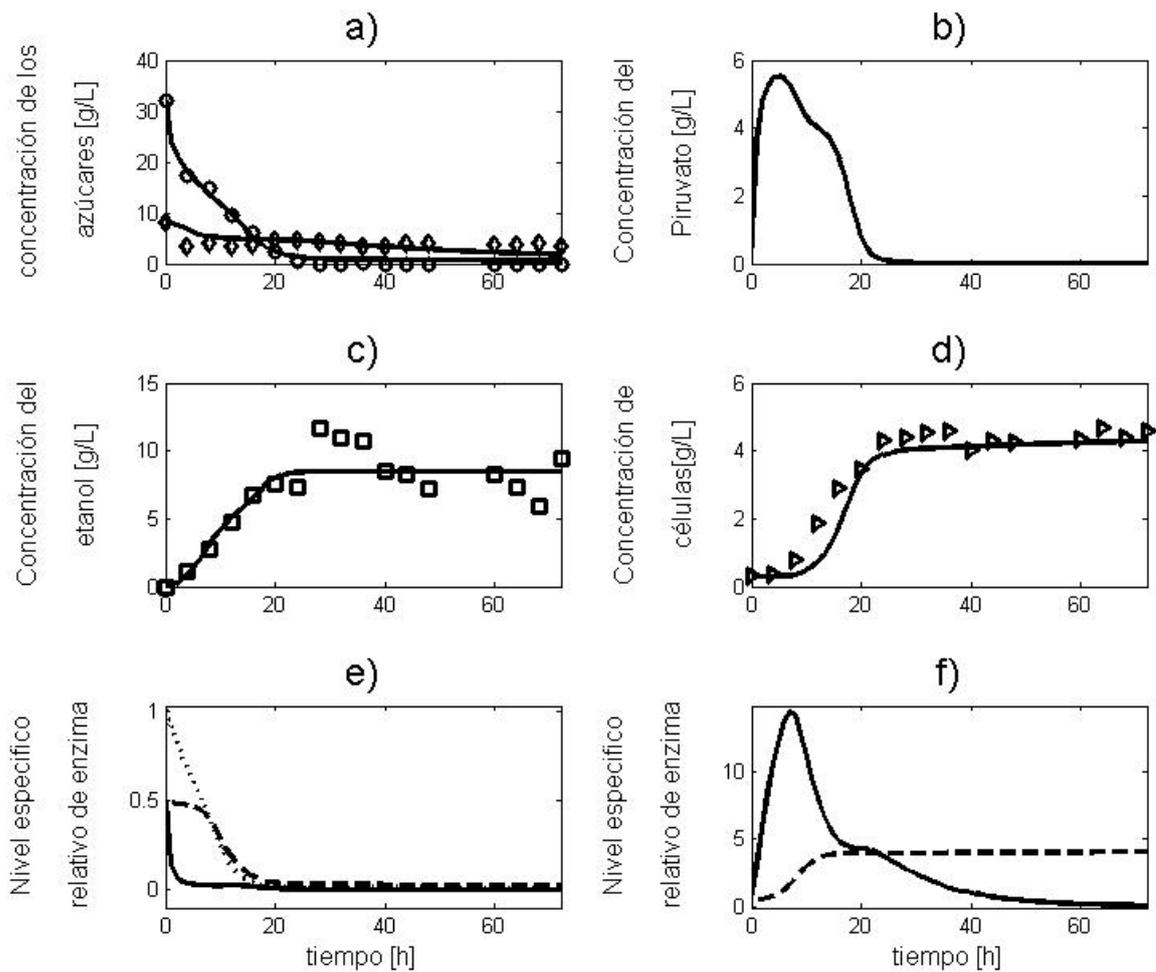


Figura 7.13: Comparación de los datos experimentales con la simulación del co-cultivo del caso F1 C3; a) \diamond xilosa y \circ glucosa, las líneas continuas: variables de estado (xilosa y glucosa) de la simulación; b) perfil de piruvato de la simulación; c) \square etanol, línea continua: perfil de etanol de la simulación; d) \triangleright células, línea continua: perfil de células de la simulación; e) perfiles de las enzimas e_1 , e_2 , y e_3 de la simulación; y f) perfiles de las enzimas e_4 y e_5 de la simulación.

que las especies del genero *Saccharomyces* muestran baja afinidad en el consumo de glucosa en estas condiciones. El consumo de xilosa por su parte tienen sentido con el comportamiento de la actividad enzimática V_3^c y la respuesta de la velocidad de reacción r_3 .

La actividad enzimática de e_4 se mantiene alta después de las 10 primeras horas pero la variable de mayor peso para el perfil del etanol es la velocidad de reacción r_4 que después de 20 horas de fermentación disminuye su magnitud haciendo que el perfil de etanol alcance un estado

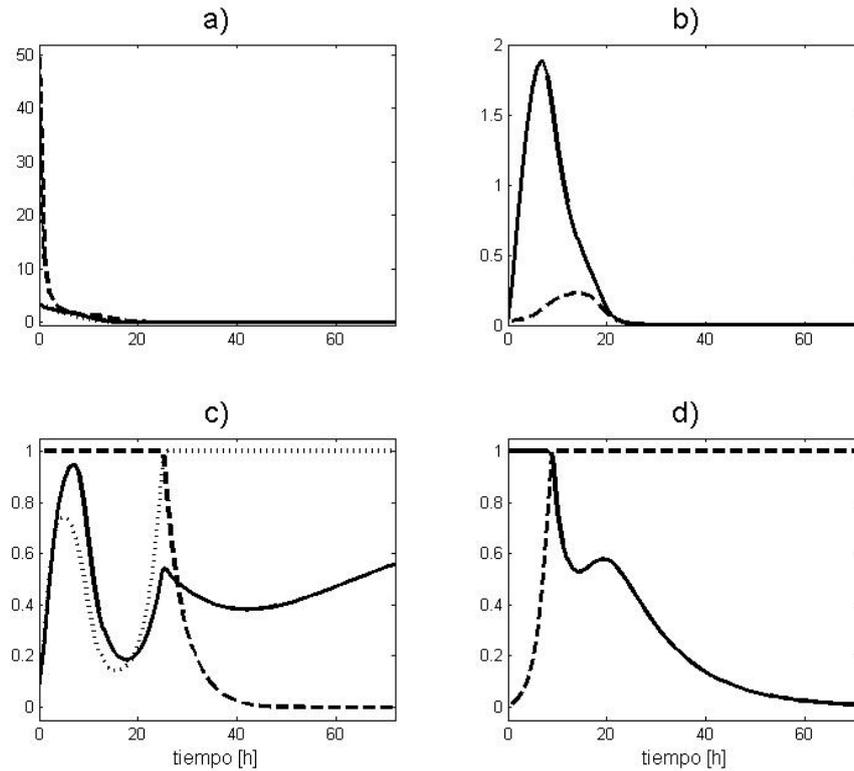


Figura 7.14: Velocidad de reacción y actividad enzimática de la simulación del co-cultivo del caso F1 C3; a) velocidad de reacción $-r_1$, $-r_2$ y $-r_3$; b) velocidad de reacción $-r_4$ y $-r_5$; c) actividad enzimática $-V_1^c$, $-V_2^c$ y $-V_3^c$; y d) actividad enzimática $-V_4^d$ y $-V_5^d$.

estacionario. La enzima e_5 tiene una actividad alta por poco tiempo (10 horas) y gradualmente se inactiva, en tanto la velocidad de reacción r_5 domina la etapa exponencial del perfil de biomasa hasta alcanzar el estado estacionario después de 25 horas.

Caso F2 C1: Los perfiles de glucosa, xilosa, etanol y biomasa son semejantes a los obtenidos a la formulación F1 C1, sin embargo, al comparar el perfil de piruvato su magnitud se duplica (~ 14 g/L) además las respuestas de las enzimas difieren demasiado en ambas formulaciones. En la formulación F2 C1 la proporción de la enzima e_1 es demasiado alta lo que sugiere que no se utilizó en la fermentación, analizando la actividad enzimática de e_1 esta no presenta gran actividad durante el proceso y la baja respuesta de la velocidad de reacción r_1 confirman que la ruta para el consumo de glucosa de *S. cerevisiae* no es la ruta dominante, en la formulación F1 C1 sucede lo contrario la ruta dominante para el consumo de glucosa es de *S. cerevisiae*. Por lo tanto las rutas que dominan en el consumo de los azúcares son las de *P. stipitis*, esto es claro

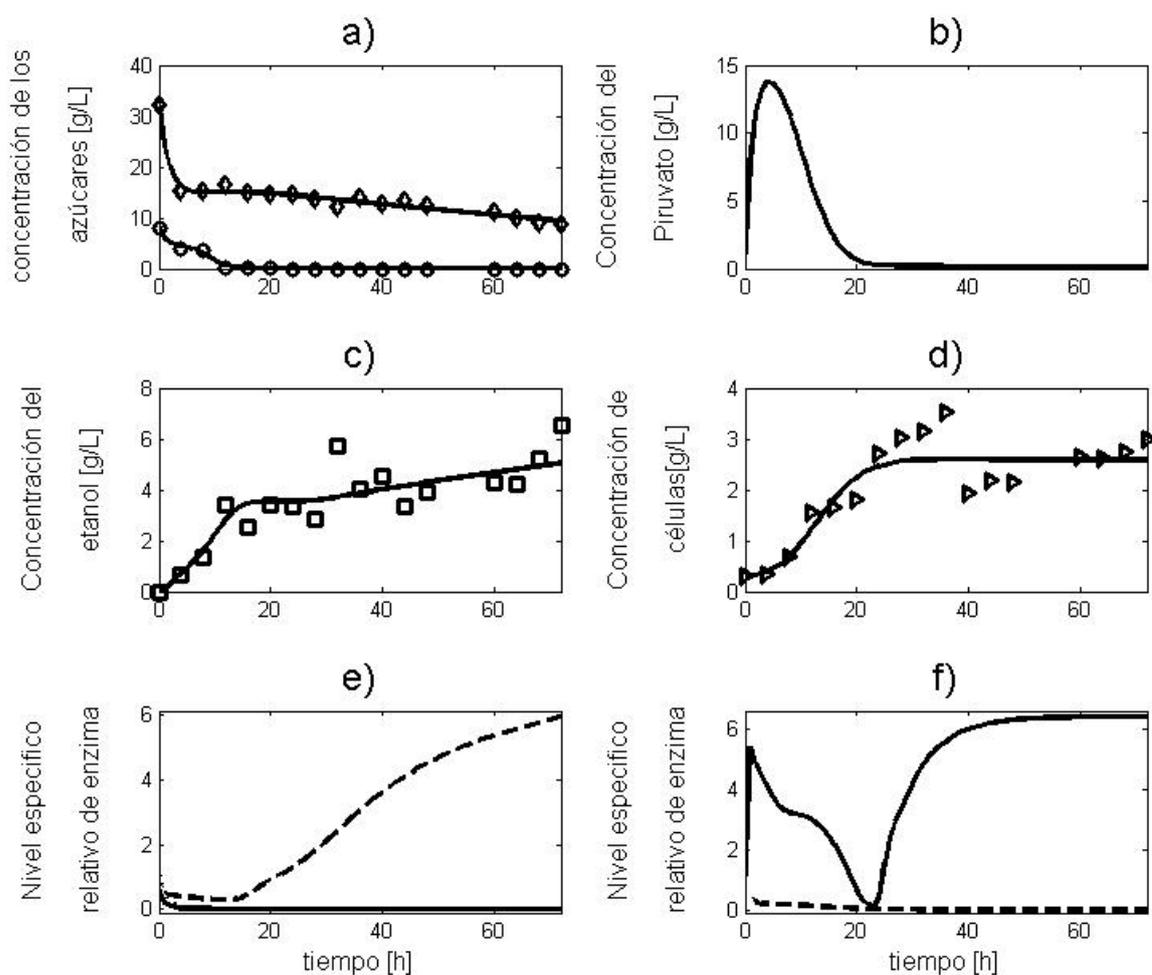


Figura 7.15: Comparación de los datos experimentales con la simulación del co-cultivo del caso F2 C1; a) \diamond xilosa y \circ glucosa, las líneas continuas: variables de estado (xilosa y glucosa) de la simulación; b) perfil de piruvato de la simulación; c) \square etanol, línea continua: perfil de etanol de la simulación; d) \triangleright células, línea continua: perfil de células de la simulación; e) perfiles de las enzimas $- - e_1$, $- e_2$, y $\cdot \cdot e_3$ de la simulación; y f) perfiles de las enzimas $- e_4$ y $- - e_5$ de la simulación.

cuando uno observa la actividad enzimática de e_2 y e_3 , y las respuestas de las velocidades de reacción r_2 y r_3 . Sin embargo, los resultados anteriores contradicen el sentido físico del fenómeno donde las especies del género *Saccharomyces* dominan en la velocidad de consumo de glucosa sobre las especies del género *Pichia*.

La proporción enzimática de e_4 tiene un comportamiento que oscila abruptamente y su magnitud es mayor que el observado en la formulación F1 C1, este comportamiento no tiene un

sentido físico apropiado. La respuesta de la velocidad de reacción r_4 tiene una tendencia similar en ambos casos pero la actividad enzimática presenta una disminución abrupta lo que explica el bajo consumo de piruvato. El perfil de la enzima e_5 tiene el mismo comportamiento en ambas formulaciones en la respuesta de la velocidad de reacción mientras que en la actividad enzimática presenta una desactivación después de 50 horas que hace alcanzar el estado estacionario del perfil de biomasa.

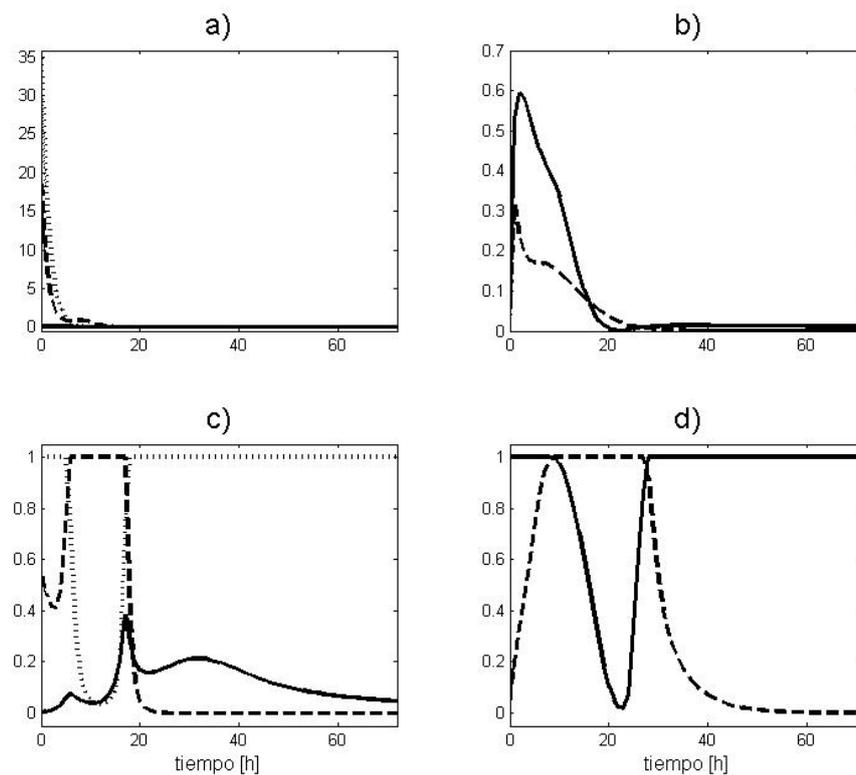


Figura 7.16: Velocidad de reacción y actividad enzimática de la simulación del co-cultivo del caso F2 C1; a) velocidad de reacción $- r_1$, $- - r_2$ y $\cdot \cdot r_3$; b) velocidad de reacción $- r_4$ y $- - r_5$; c) actividad enzimática $- V_1^c$, $- - V_2^c$ y $\cdot \cdot V_3^c$; y d) actividad enzimática $- V_4^d$ y $- - V_5^d$.

Caso F2 C2: En la Figura 7.17 se observa que los perfiles de glucosa, xilosa, etanol y biomasa ajustan muy bien a los datos experimentales a diferencia de la formulación F1 C2, sin embargo, el perfil de piruvato aumento su respuesta aproximadamente un 25 % con respecto al obtenido en F1 C2. Los perfiles de las enzimas también presentan una gran variación en sus comportamiento respecto a F1 C2. Se observa que el consumo de la glucosa se lleva a cabo por la ruta de P .

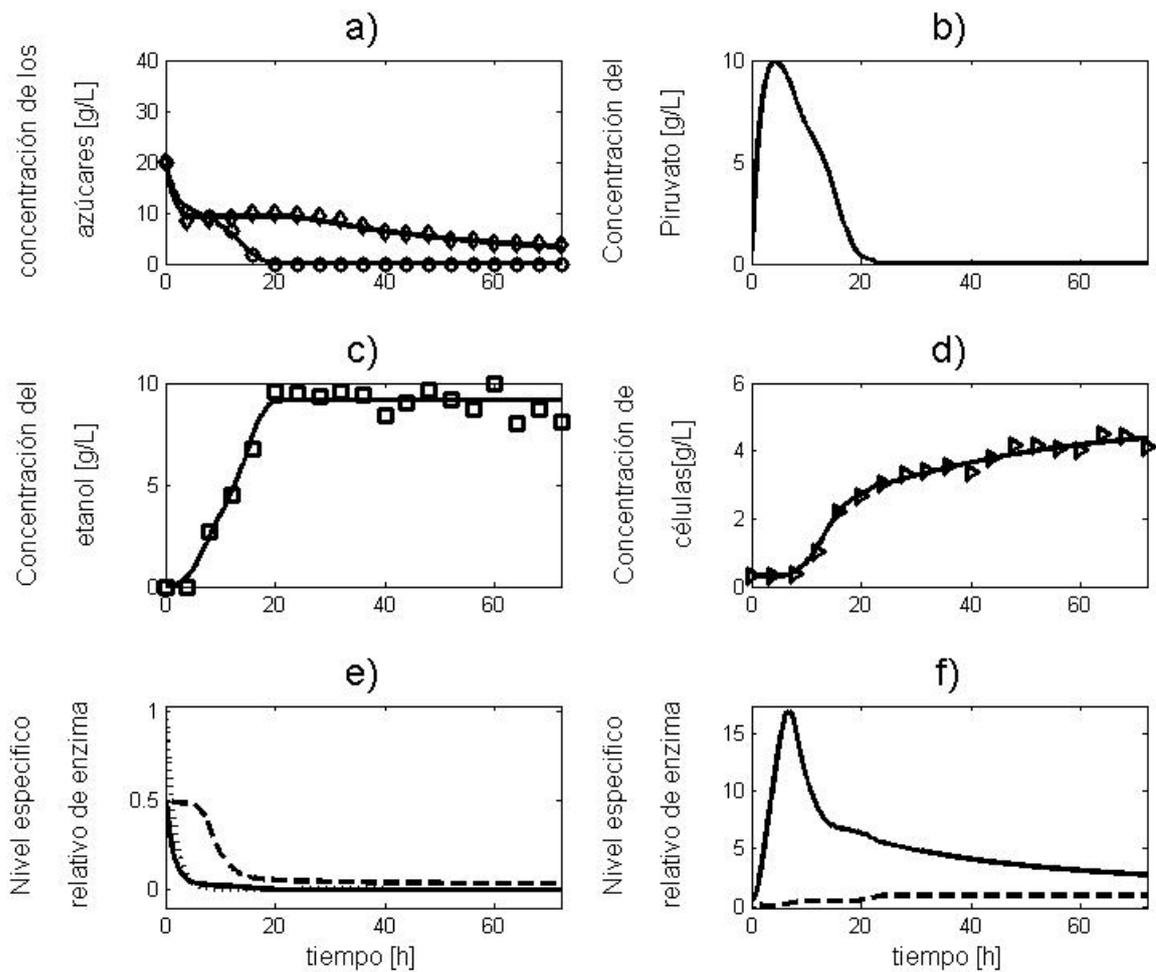


Figura 7.17: Comparación de los datos experimentales con la simulación del co-cultivo del caso F2 C2; a) \diamond xilosa y \circ glucosa, las líneas continuas: variables de estado (xilosa y glucosa) de la simulación; b) perfil de piruvato de la simulación; c) \square etanol, línea continua: perfil de etanol de la simulación; d) \triangleright células, línea continua: perfil de células de la simulación; e) perfiles de las enzimas $- - e_1$, $- e_2$, y $\cdot \cdot e_3$ de la simulación; y f) perfiles de las enzimas $- e_4$ y $- - e_5$ de la simulación.

stipitis al igual que el consumo de xilosa, lo que se confirma al analizar la actividad enzimática y las velocidades de reacción implicadas en estas rutas. Al igual que en el caso F2 C1, la ruta para el consumo de glucosa de *S. cerevisiae* no es la dominante, esto no es viable físicamente de acuerdo al trabajo presentado por Does *et al* [13]. El hecho de que el ajuste es mejor en esta formulación no evita que la interpretación sea errónea físicamente, el mejor ajuste del perfil de biomasa se debe a la oscilación que presentan la actividad enzimática V_5^d y la respuesta de la velocidad de reacción r_5 . La pequeña diferencia que existe entre los perfiles de etanol de las

formulaciones F1 y F2, es que F2 presenta un estado estacionario después de 16 horas, la causa que permite alcanzar este estado estacionario es la inactividad que ocurre a las 22 horas del proceso.

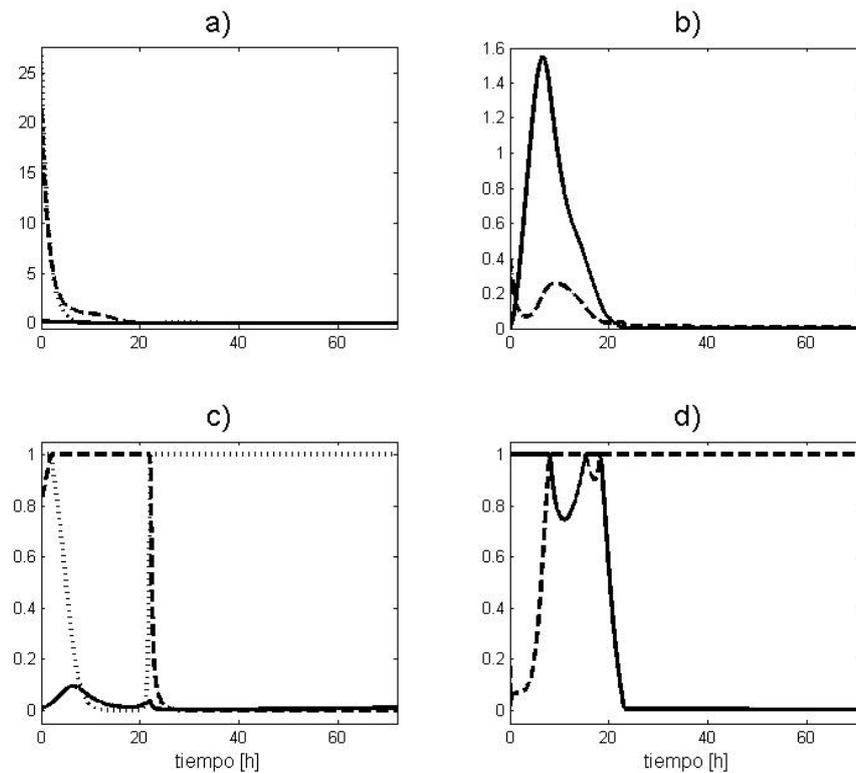


Figura 7.18: Velocidad de reacción y actividad enzimática de la simulación del co-cultivo del caso F2 C2; a) velocidad de reacción r_1 , r_2 y r_3 ; b) velocidad de reacción r_4 y r_5 ; c) actividad enzimática V_1^c , V_2^c y V_3^c ; y d) actividad enzimática V_4^d y V_5^d .

Caso F2 C3: Los perfiles de los azúcares y la biomasa ajustan de forma precisa a los datos experimentales a excepción del perfil de etanol, en el caso F1 C3 se explicó la razón por la cual este perfil no ajusta a los datos experimentales (la asimilación del etanol por parte de las células). La actividad enzimática de e_1 , e_2 y e_3 y las respuestas de las velocidades de reacción r_1 , r_2 y r_3 muestran que las rutas que consumen los azúcares son las que pertenecen a *P. stipitis* en tanto que la ruta de *S. cerevisiae* para el consumo de glucosa tiene un efecto casi nulo en la fermentación. El hecho de que exista un intercambio en la actividad enzimática para el consumo de glucosa entre *P. stipitis* y *S. cerevisiae* (Figura 7.20) no puede existir en un co-cultivo, aun

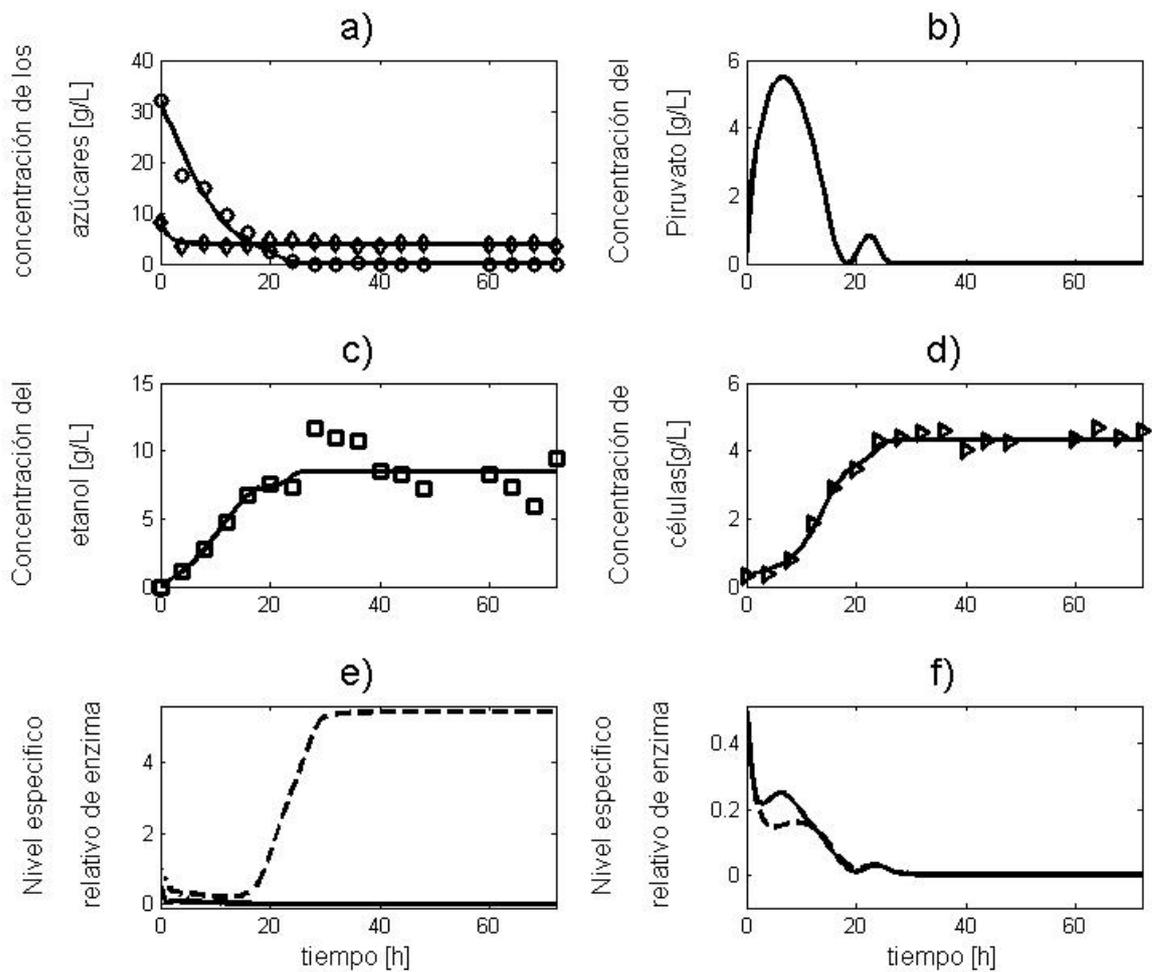


Figura 7.19: Comparación de los datos experimentales con la simulación del co-cultivo del caso F2 C3; a) \diamond xilosa y \circ glucosa, las líneas continuas: variables de estado (xilosa y glucosa) de la simulación; b) perfil de piruvato de la simulación; c) \square etanol, línea continua: perfil de etanol de la simulación; d) \triangleright células, línea continua: perfil de células de la simulación; e) perfiles de las enzimas $- - e_1$, $- e_2$, y $\cdot \cdot e_3$ de la simulación; y f) perfiles de las enzimas $- e_4$ y $- - e_5$ de la simulación.

cuando el fenómeno sea explicado por la afinidad de la glucosa a altas concentraciones que tiene las especies del genero *Pichia*, porque las levaduras en este tipo de sistemas deben competir por el sustrato como consecuencia la actividad de las enzimas e_1 y e_2 deben existir durante el tiempo que la glucosa es consumida como se observa en la Figura 7.14. El perfil de piruvato sugiere que durante la generación de este intermediario existe un cambio de sustrato, en este caso en particular de glucosa a xilosa, por parte de *P. stipitis*. Esto se confirma al observar los perfiles de biomasa y etanol que a las 20 horas presentan un comportamiento diaúxico muy

pequeño, donde la actividad enzimática de e_4 y e_5 y sus respectivas respuestas de las velocidades de reacción confirman este fenómeno. Por lo tanto, esta simulación no representa de manera correcta el co-cultivo, la respuesta del sistema es más característica del crecimiento diaúxico de un microorganismo como cultivo puro.

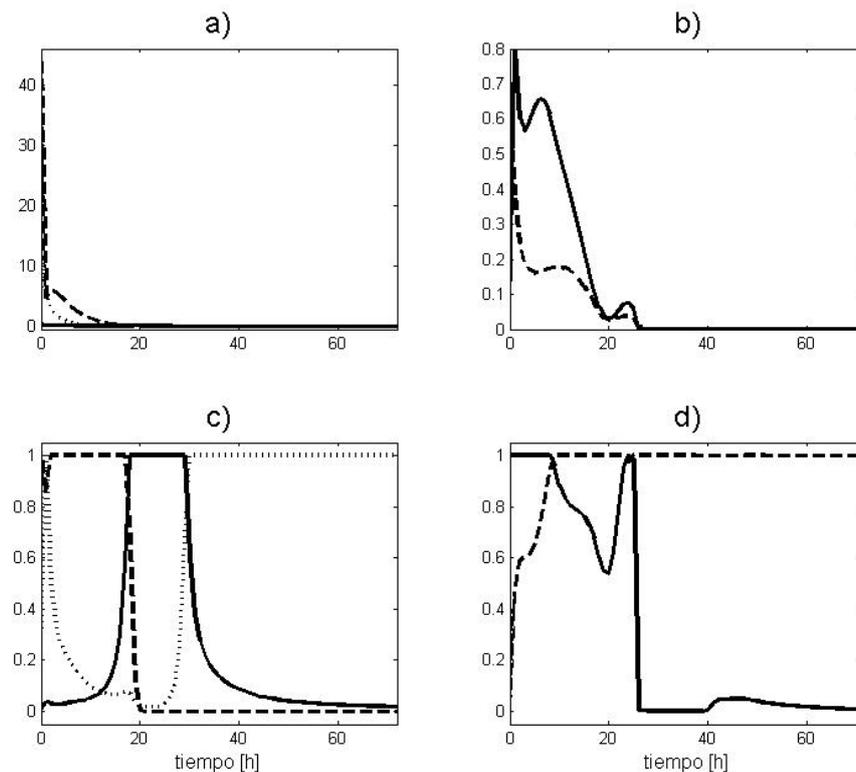


Figura 7.20: Velocidad de reacción y actividad enzimática de la simulación del co-cultivo del caso F2 C3; a) velocidad de reacción $- r_1$, $- - r_2$ y $\cdot \cdot r_3$; b) velocidad de reacción $- r_4$ y $- - r_5$; c) actividad enzimática $- V_1^c$, $- - V_2^c$ y $\cdot \cdot V_3^c$; y d) actividad enzimática $- V_4^d$ y $- - V_5^d$.

El análisis realizado en esta sección nos permite afirmar que al permitir al problema NLP estimar todas las constantes cinéticas del modelo del co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*, formulaciones F1 C1, F1 C2 y F1 C3, ofrece una solución local capaz de representar de manera lógica el fenómeno físico aunque las condiciones iniciales en cada sistema sean distintas. Cabe mencionar que para representar de mejor manera el comportamiento del perfil de etanol en la formulación F1 C3 se necesita que el modelo considere otras rutas alternativas como la del consumo de etanol por las células cuando el sustrato más afín se ha agotado.

En las formulaciones F2 C1, F2 C2 y F2 C3 se definieron tres parámetros cinéticos que son $\mu_{max,1}$, K_1 , K_d tomados de la literatura y que fueron determinados a partir de cultivos puros, el problema NLP generado de estas formulaciones se encargó de estimar los restantes 32 parámetros cinéticos ofreciendo una solución global que a pesar de describir de manera muy precisa los perfiles de las variables estado con respecto a los datos experimentales su interpretación del fenómeno físico no es la correcta. Esta interpretación incorrecta es la consecuencia de restringir la región de búsqueda de solución del problema NLP, donde los parámetros cinéticos determinados tienen valores con órdenes de magnitud muy variados, además el hecho de mezclar parámetros cinéticos determinados de cultivos puros no permite representar de manera correcta el comportamiento de los microorganismos en un co-cultivo porque las interacciones que se desarrollan en este sistema son muy diferentes de las que existen en un cultivo puro.

Los resultados presentados en los párrafos anteriores permiten discernir entre las formulaciones F1 y F2, donde las soluciones de la formulación F1 describen de mejor manera el fenómeno físico que sucede en el co-cultivo. Por lo tanto, las soluciones que ofrece la formulación F2 no son útiles para la simulación del proceso de fermentación de mezclas de glucosa y xilosa utilizando un co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*. El paso a seguir en este estudio es identificar que parámetros tienen más impacto en la respuesta de las variables estado y capturan las características esenciales del sistema, el análisis de sensibilidad es la herramienta que permite determinar los rasgos mencionados anteriormente. El estudio del análisis de sensibilidad se aplicará a las formulaciones F1 C1, F1 C2 y F1 C3, que presentaron los mejores resultados en la simulación del proceso de fermentación.

7.5. *Análisis de sensibilidad*

El análisis de sensibilidad es una herramienta importante para el estudio de la dependencia de los sistemas sobre sus parámetros. El estudio del análisis de sensibilidad ayuda a identificar aquellos parámetros que tienen más impacto sobre las variables de salida del sistema y captura las características esenciales del sistema. Los métodos para el análisis de sensibilidad pueden ser clasificados de distintas maneras. Frey y Patil [17] clasifican los métodos como:

i) **Métodos matemáticos.** Evalúan la sensibilidad de la respuesta de salida de un modelo para un intervalo de variación de una entrada. Estos métodos evalúan el impacto de la variación en los valores de entrada sobre los valores de salida. En algunos casos, los métodos matemáticos pueden ser útiles en la detección de las entradas más importantes, también pueden ser utilizados para la verificación y la validación, y para identificar las entradas que requieren de la adquisición de más datos o de investigación. Entre los métodos matemáticos se encuentran el análisis de sensibilidad local, el análisis de punto de equilibrio, la diferencia entre el logaritmo de la razón de las posibilidades [50] (log odds ratio) y la diferenciación automática.

ii) **Métodos estadísticos.** Estos métodos involucran la corrida de simulaciones en las cuales las entradas son asignadas a distribuciones de probabilidad y evalúan el efecto de la varianza de las entradas sobre la distribución de las salidas. Dependiendo del método a utilizar, una o más entradas pueden ser variadas a la vez. El intervalo y la probabilidad de las entradas pueden ser propagadas utilizando técnicas como simulación Monte Carlo, muestreo por hipercubo latino, y otros métodos. La sensibilidad del modelo es resultado de entradas individuales o grupos de entradas que pueden ser evaluadas por una variedad de técnicas. Unos de los métodos estadísticos utilizados en la literatura son el análisis de regresión, el análisis de la varianza, los métodos de superficie de respuesta, la evaluación de sensibilidad de amplitud de Fourier y el índice de información mutua.

iii) **Métodos gráficos.** Dan una representación de la sensibilidad en forma de gráficos, tablas o superficies. Generalmente, los métodos gráficos son utilizados para dar una indicación visual de cuanto una salida es afectada por la variación de una entrada. Los métodos gráficos pueden ser utilizados como un método de detección antes de cualquier análisis del modelo o para representar dependencias complejas entre las entradas y salidas. Los métodos gráficos pueden ser usados como complementos de los resultados de métodos matemáticos y métodos estadísticos

para una mejor representación.

No existe un solo método que sea claramente superior a los otros. Cada método tiene sus propias suposiciones claves y limitaciones. Cada método tiene sus propias demandas con respecto al tiempo y esfuerzo para aplicar el método e interpretar los resultados. Cada método tiene su fuerza y limitaciones con respecto al tipo de visión que este pueda proveer.

7.5.1. Análisis de sensibilidad dinámica del modelo de co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*

Se llevó a cabo el análisis de sensibilidad dinámico utilizando el método de diferenciación directa (DDM), descrito en el Apéndice A, en el modelo de co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*, la comparación de las respuestas de los coeficiente de sensibilidad se llevó a cabo utilizando las sensibilidades normalizadas que evitan el problema de la diferencia del orden de magnitud entre los parámetros cinéticos, ya que estos son adimensionales. Para calcular las ecuaciones diferenciales de sensibilidad absoluta (ecuación A-4) se utilizó la diferenciación automática (AD) aplicado a la plataforma de Matlab. El software utilizado para la AD fue desarrollado por M. Fink [16] que implemento los algoritmos de AD para Matlab (software utilizado para análisis de sensibilidad y estimación paramétrica). Se desarrollo un sistema ODEs que contiene las ecuaciones diferenciales estado y de sensibilidad local que se integro simultáneamente utilizando la rutina ode15s. Las condiciones iniciales de las variables estado para cada sistema se muestran en el Cuadro 8.1 y las condiciones iniciales para los coeficientes de sensibilidad fue $S_{i,j}(t_0) = 0$. El análisis de sensibilidad dinámico se aplico a los tres casos (C1, C2 y C3) presentados en el Cuadro 8.1, para todos los casos se uso un horizonte de tiempo de 72 horas para la simulación con una frecuencia de muestreo de 1 hora. Los resultados obtenidos en cada caso se analizaron con respecto al efecto de cada parámetro sobre cada variable estado y también analizando el efecto de cada parámetro sobre todas las variables estado.

7.5.1.1. Análisis de sensibilidad dinámica sobre cada variable

Para el análisis de sensibilidad dinámico realizado sobre cada variable se utilizó la norma L^2 (ec. 7.59) para medir el desempeño relativo de los coeficientes sólo en el horizonte del tiempo.

$$RS_{i,j} = \frac{1}{N} \sqrt{\sum_{k=1}^N |S_{i,j}(k)|^2} \quad (7.59)$$

En la ecuación anterior k es el punto de muestreo en el tiempo y N es el número total de puntos de muestreo. Las Figuras 7.21, 7.22 y 7.23 muestran la distribución de los valores de $RS_{i,j}$ para

el C1, C2 y C3, respectivamente.

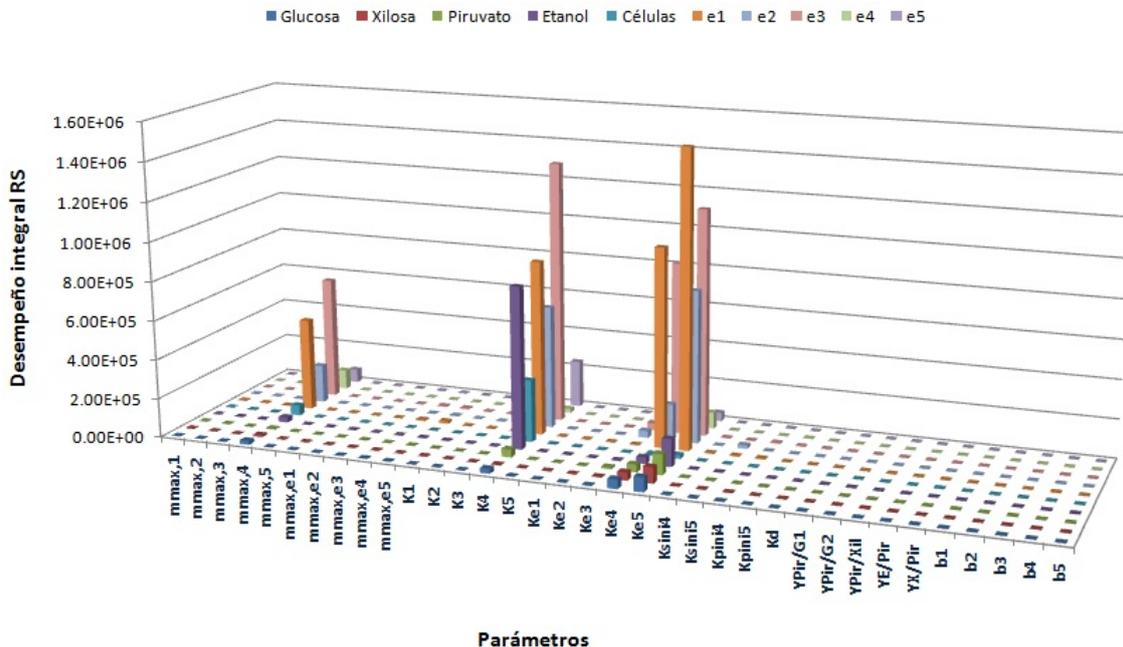


Figura 7.21: Distribución del desempeño integral de RS para el caso C1.

Caso C1: Las variables estado e_1 , e_3 , e_2 y E son las más afectadas en el análisis de sensibilidad dinámica, donde los parámetros más sensibles son: K_{e5} , K_{e4} , K_4 y $\mu_{max,4}$. La variable e_1 es la más afectada en todo el sistema, y los parámetros cinéticos que la afectan pueden ser clasificados de acuerdo a su impacto de manera descendente como: K_{e5} , K_{e4} , K_4 , $\mu_{max,4}$, $\mu_{max,e5}$, $\mu_{max,e4}$, K_{pini4} , K_{sini5} , K_{sini4} , $\mu_{max,1}$, K_{e3} , $\mu_{max,3}$, $\mu_{max,e2}$, K_5 , K_{e1} , $\mu_{max,5}$, K_{pini5} , K_1 , $Y_{X/Pir}$, K_{e2} , $Y_{E/Pir}$, $Y_{Pir/G2}$, β_3 , $Y_{Pir/Xil}$, $Y_{Pir/G1}$, β_5 , β_2 , β_1 , $\mu_{max,e3}$, β_4 , $\mu_{max,e1}$, $\mu_{max,2}$, K_d , K_3 , K_2 . Como se puede observar de la Figura 7.21 el análisis de sensibilidad resulta diferente dependiendo de la variable estado seleccionada.

Caso C2: Las variables estado e_1 , e_3 , Pir y E son las más afectadas en el análisis de sensibilidad dinámica, donde los parámetros más sensibles son: K_{e3} , K_{e1} , K_{pini5} , K_{sini4} y K_{pini4} . La variable Pir es la más afectada en todo el sistema, y los parámetros cinéticos que la afectan pueden ser clasificados de acuerdo a su impacto de manera descendente como: K_{e3} , K_{pini5} , K_{e1} , K_{sini4} , $\mu_{max,3}$, $\mu_{max,1}$, K_{pini4} , K_4 , K_3 , K_{e4} , K_1 , $\mu_{max,4}$, K_2 , K_{e5} , $\mu_{max,e3}$, K_{sini5} , $\mu_{max,5}$,

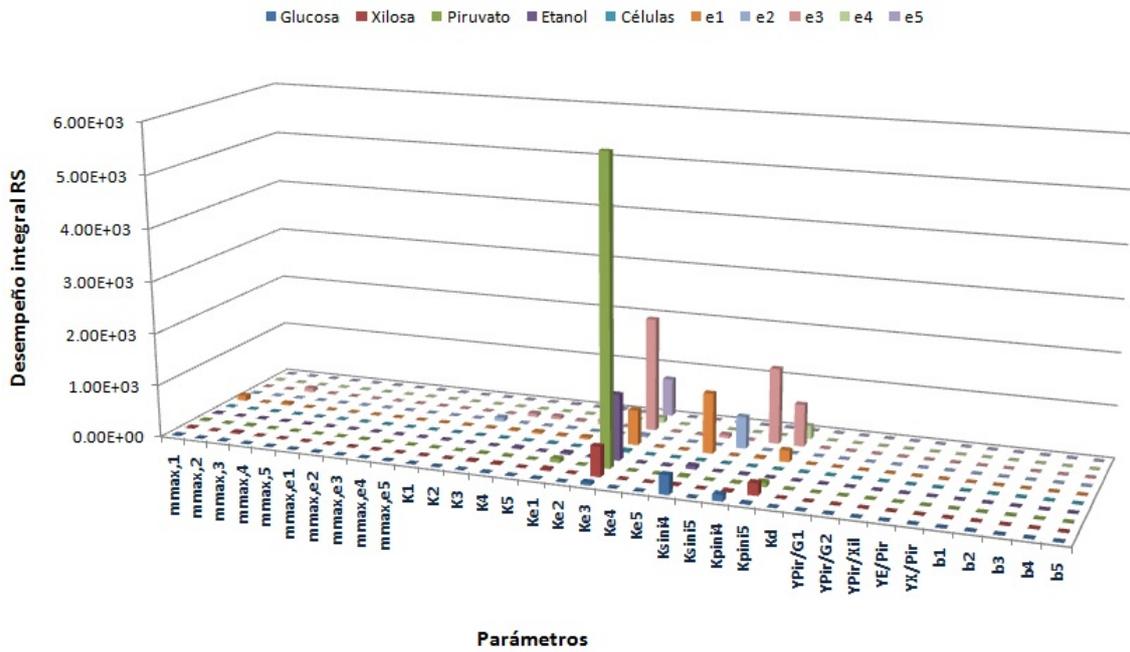


Figura 7.22: Distribución del desempeño integral de RS para el caso C2.

$\mu_{max,e5}$, $\mu_{max,e1}$, $Y_{X/Pir}$, $\mu_{max,e4}$, K_5 , $Y_{Pir/G1}$, $Y_{Pir/Xil}$, $Y_{E/Pir}$, β_1 , β_3 , K_{e2} , $\mu_{max,2}$, β_5 , K_d , $\mu_{max,e2}$, β_4 , $Y_{Pir/G2}$, β_2 .

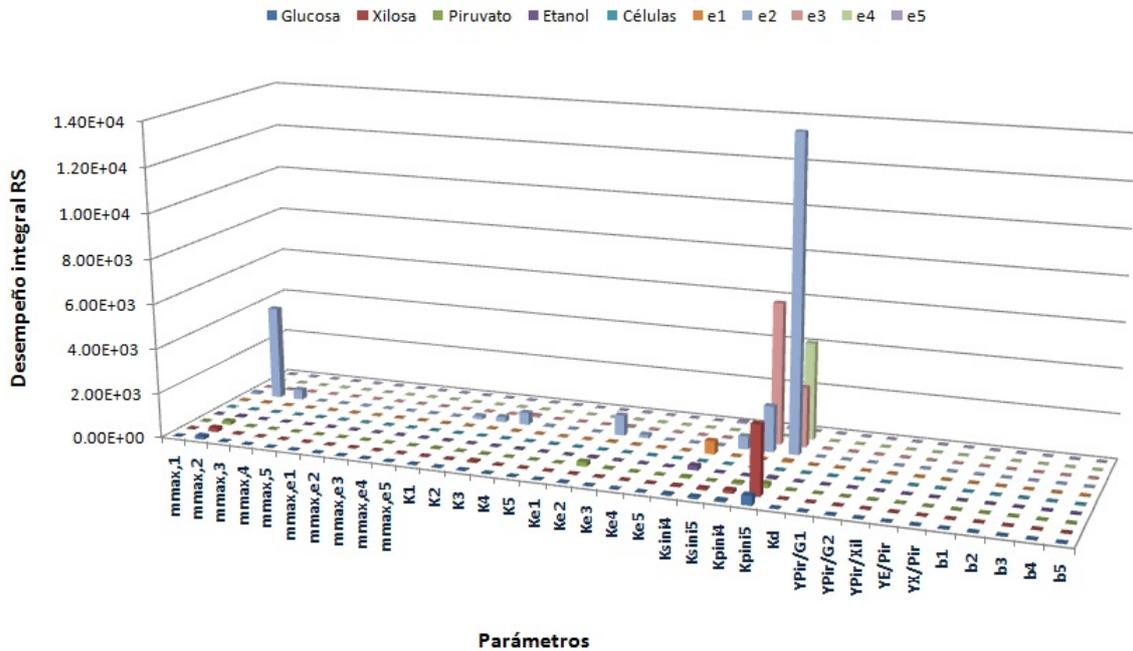


Figura 7.23: Distribución del desempeño integral de RS para el caso C3.

Caso C3: Las variables estado e_2 , e_3 , e_4 y Xil son las más afectadas en el análisis de sensibilidad dinámica, donde los parámetros más sensibles son: K_{pini5} , K_{pini4} , $\mu_{max,2}$, K_{e2} y K_{sini4} . La variable e_2 es la más afectada en todo el sistema, y los parámetros cinéticos que la afectan pueden ser clasificados de acuerdo a su impacto de manera descendente como: K_{pini5} , $\mu_{max,2}$, K_{pini4} , K_{e2} , K_{sini5} , K_3 , $\mu_{max,3}$, K_2 , K_1 , K_{e3} , $\mu_{max,1}$, K_4 , K_{sini4} , K_5 , K_{e5} , $\mu_{max,e5}$, K_{e1} , $\mu_{max,e4}$, $\mu_{max,5}$, $\mu_{max,4}$, K_{e4} , $Y_{X/Pir}$, β_2 , $Y_{E/Pir}$, $Y_{Pir/G2}$, $\mu_{max,e2}$, β_3 , $Y_{Pir/G1}$, $Y_{Pir/Xil}$, $\mu_{max,e3}$, β_4 , $\mu_{max,e1}$, β_1 , K_d , β_5 . Comparando los resultados del análisis de sensibilidad de los 3 casos es evidente que la variación se debe a que los tres casos tienen distintos valores en sus parámetros además de que las condiciones iniciales son diferentes también, lo que confiere comportamientos distintos en cada sistema y por lo tanto distintas respuestas en los coeficientes de sensibilidad.

Resulta claro ver que para un sistema multivariable, las conclusiones del análisis de sensibilidad dinámico depende en gran medida de la variable seleccionada. Además otro factor que influye son las distintas condiciones iniciales y valores de los parámetros cinéticos que presenta cada caso a pesar de que el modelo matemático sea el mismo. Ahora se plantea la cuestión de si existe una manera de medir la sensibilidad que contenga información útil sobre todo el sistema, o al menos las variables más importantes. Una manera simple para solucionar el problema anterior es utilizar la norma Euclidiana sobre los coeficientes de sensibilidad.

7.5.1.2. Análisis de sensibilidad dinámica sobre todas las variables

Para considerar todo el efecto del cambio de los parámetros sobre todas las variables estado de manera sencilla se utilizó la norma Euclidiana en los coeficientes de sensibilidad

$$OS_j = \frac{1}{N} \sqrt{\sum_{k=1}^N \sum_{i=1}^p |S_{i,j}(k)|^2} \quad (7.60)$$

OS_j agrupa todo el impacto de las variables de estado involucradas con respecto a cada j -ésimo parámetro. Este desempeño es también referido como sensibilidad total en algunos trabajos de la literatura. Las Figuras 7.24, 7.25 y 7.26 presentan los resultados de OS_j para cada caso.

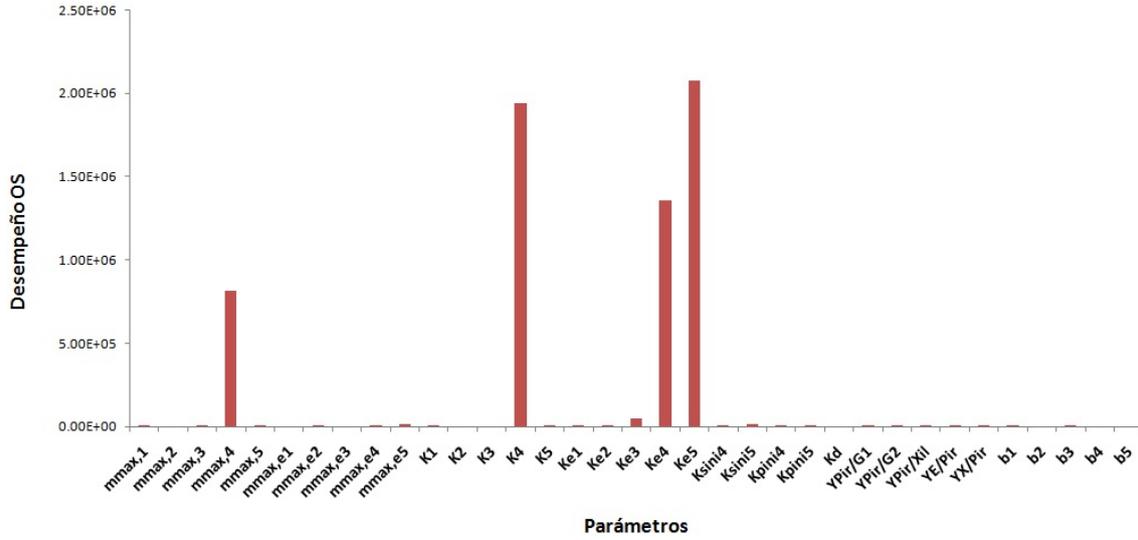


Figura 7.24: Desempeño integral total de OS para el caso C1.

Caso C1: De acuerdo al desempeño OS de los coeficientes de sensibilidad del caso C1 podemos clasificar los 35 parámetros en orden descendente de acuerdo a su efecto en el sistema como: K_{e5} , K_4 , K_{e4} , $\mu_{max,4}$, K_{e3} , K_{sini5} , $\mu_{max,e5}$, $\mu_{max,e4}$, K_{pini4} , K_{pini5} , K_{sini4} , $\mu_{max,3}$, $\mu_{max,1}$, K_5 , $\mu_{max,e2}$, K_{e1} , $\mu_{max,5}$, K_1 , $Y_{X/Pir}$, $Y_{Pir/Xil}$, K_{e2} , $Y_{E/Pir}$, β_3 , $Y_{Pir/G2}$, β_1 , $Y_{Pir/G1}$, β_5 , β_2 , $\mu_{max,e3}$, $\mu_{max,2}$, β_4 , $\mu_{max,e1}$, K_d , K_3 , K_2 . En base a estos resultados, los 5 primeros parámetros K_{e3} , K_4 , K_{e4} , $\mu_{max,4}$ y K_{e5} son los parámetros más sensibles en el sistema y estos están relacionados en las reacciones: Xilosa $\xrightarrow{e_3}$ Piruvato, Piruvato $\xrightarrow{e_4}$ Etanol y Piruvato $\xrightarrow{e_5}$ Celulas.

Caso C2: De acuerdo al desempeño OS de los coeficientes de sensibilidad del caso C2 podemos clasificar los 35 parámetros en orden descendente de acuerdo a su efecto en el sistema como: K_{e3} , K_{pini4} , K_{sini4} , K_{pini5} , K_{sini5} , K_{e1} , $\mu_{max,1}$, $\mu_{max,3}$, K_2 , K_4 , K_3 , K_5 , K_{e5} , K_1 , $\mu_{max,4}$, $Y_{X/Pir}$, $\mu_{max,e3}$, K_{e4} , $\mu_{max,e5}$, $Y_{Pir/G1}$, $\mu_{max,5}$, $Y_{Pir/Xil}$, β_1 , $\mu_{max,e1}$, $Y_{E/Pir}$, β_3 , $\mu_{max,e4}$, β_4 , K_{e2} , β_5 , $\mu_{max,2}$, $Y_{Pir/G2}$, K_d , $\mu_{max,e2}$, β_2 . En base a estos resultados, los 5 primeros parámetros K_{e3} , K_{sini4} , K_{pini4} , K_{sini5} y K_{pini5} son los parámetros más sensibles en el sistema y estos están relacionados en las reacciones: Xilosa $\xrightarrow{e_3}$ Piruvato, Piruvato $\xrightarrow{e_4}$ Etanol y Piruvato $\xrightarrow{e_5}$ Celulas.

Caso C3: De acuerdo al desempeño OS de los coeficientes de sensibilidad del caso C3 podemos clasificar los 35 parámetros en orden descendente de acuerdo a su efecto en el sistema como:

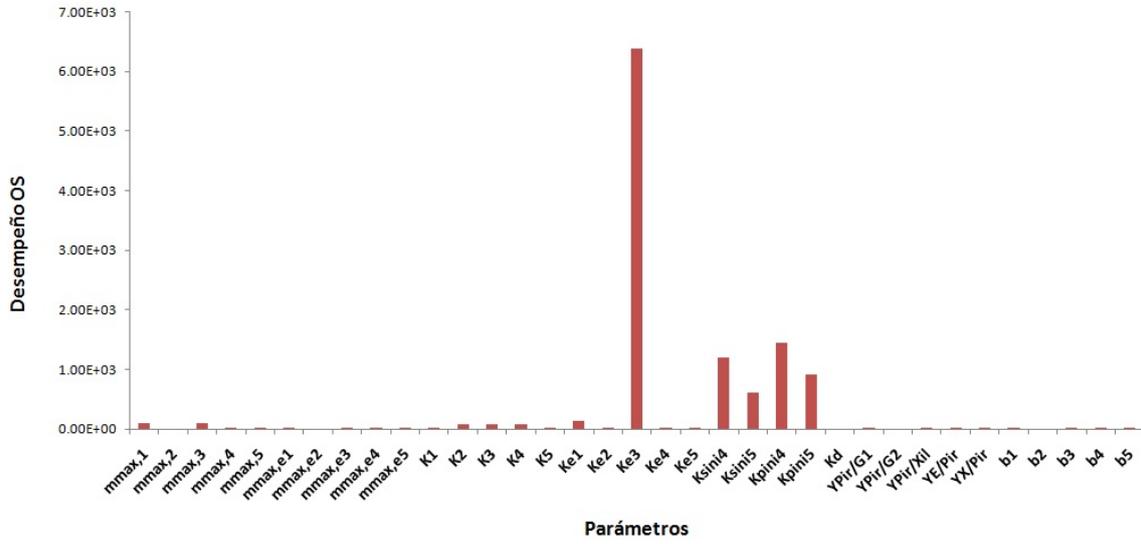


Figura 7.25: Desempeño integral total de OS para el caso C2.

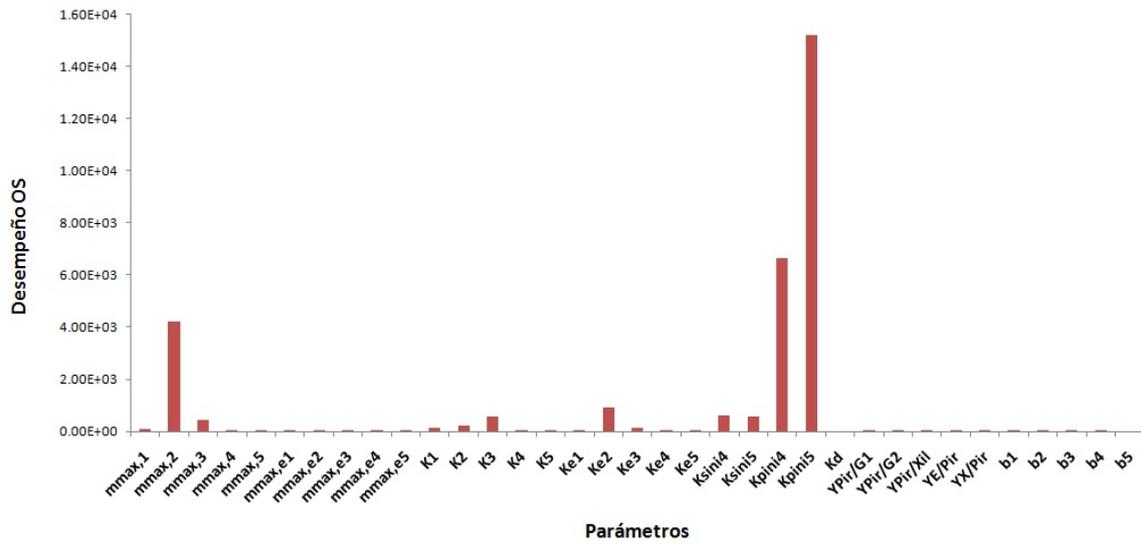


Figura 7.26: Desempeño integral de OS para el caso C3.

$K_{pini5}, K_{pini4}, \mu_{max,2}, K_{e2}, K_{sini4}, K_{sini5}, K_3, \mu_{max,3}, K_2, K_1, K_{e3}, \mu_{max,1}, K_4, K_5, K_{e5}, \mu_{max,e5},$
 $K_{e1}, \mu_{max,e4}, Y_{X/Pir}, \mu_{max,5}, \beta_2, \mu_{max,4}, Y_{Pir/G2}, Y_{E/Pir}, K_{e4}, \beta_4, Y_{Pir/G1}, \mu_{max,e2}, Y_{Pir/Xil},$
 $\beta_3, \beta_1, \mu_{max,e3}, \mu_{max,e1}, K_d, \beta_5.$ En base a estos resultados, los 9 primeros parámetros $\mu_{max,2},$
 $K_2, K_{e2}, \mu_{max,3}, K_3, K_{sini4}, K_{pini4}, K_{sini5}$ y K_{pini5} son los parámetros más sensibles en el
 sistema y estos están relacionados en las reacciones: Glucosa $\xrightarrow{e_2}$ Piruvato, Xilosa $\xrightarrow{e_3}$ Piruvato,
 Piruvato $\xrightarrow{e_4}$ Etanol y Piruvato $\xrightarrow{e_5}$ Celulas.

Los parámetros cinéticos que son más sensibles en los tres casos anteriores indican que su estimación debe ser realizada con más cuidado porque tienen un gran impacto en las respuestas de las variables estado así como en el comportamiento de todo el sistema. El hecho de que los valores de estos parámetros cinéticos más sensibles varían de manera notable en magnitud comparados con el resto de los parámetros en cada sistema es la confirmación de la alta sensibilidad inherente a ellos. Aunque los parámetros cinéticos de cada caso aseguran un buen comportamiento del sistema tanto en los perfiles de las variables estado como en el sentido físico del fenómeno de co-cultivo, estos siguen siendo soluciones óptimas locales por lo tanto puede existir una solución global del problema de estimación paramétrica que disminuya la alta sensibilidad que se presentaron los parámetros cinéticos de los tres casos anteriores.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrollo un modelo matemático utilizando el enfoque cibernético para describir la fermentación de mezclas de glucosa y xilosa utilizando un co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*, con la principal intención de generar una herramienta que sea capaz de simular la operación de fermentación de mezclas de azúcares obtenidas de hidrolizados de material lignocelulósico. El trabajo abarcó cuatro etapas: determinación experimental de los datos cinéticos del co-cultivo, el modelado cibernético del co-cultivo, la estimación de los parámetros cinéticos del modelo y el análisis de sensibilidad dinámico del modelo de co-cultivo. Las conclusiones obtenidas de este estudio se listan a continuación:

1. **Cinéticas de la fermentación del co-cultivo:** Los experimentos de fermentación del co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae* presentaron mejores rendimientos en la producción de etanol cuando la formulación del medio contiene una concentración del 50 % o superior de glucosa. El consumo de xilosa es lento a diferencia de la glucosa en todos los casos además se observó que el azúcar residual en todos los experimentos fue la xilosa. El co-cultivo de *P. stipitis* y *S. cerevisiae* fue capaz de fermentar a etanol las mezclas de azúcares a tres distintas realciones, esto permitió observar cual es efecto que tienen las condiciones iniciales sobre el co-cultivo y como afectan tanto en el desempeño como en la eficacia del proceso.
2. **Modelado del co-cultivo:** El modelo estructurado que se desarrollo para el proceso de fermentación de mezclas de azúcares utilizando un co-cultivo se baso en la rutas metabólicas de las levaduras utilizando el enfoque cibernético, y este fue capaz de describir el fenómeno que se lleva a cabo en la fermentación a diferentes condiciones iniciales. Los

perfiles que predice para la glucosa, xilosa, etanol y células mostraron un buen comportamiento con respecto a los datos experimentales, otro punto a favor es que durante la interpretación de los perfiles generados por el modelo describen de manera correcta el sentido físico del fenómeno de la fermentación del co-cultivo.

Estimación de parámetros cinéticos: Para la estimación de parámetros el problema se trató como un problema de optimización NLP. El problema DAE se convierte en un problema NLP empleando el método de colocación ortogonal sobre elementos finitos para la coordenada temporal. Mientras que la función objetivo del problema se define como la suma del cuadrado de los errores entre las variables de estado calculadas y los datos experimentales correspondientes. Se utiliza el enfoque simultáneo para dar solución al problema de optimización NLP que se encarga de minimizar la función objetivo y determinar el conjunto de parámetros cinéticos para dos formulaciones diferentes y tres condiciones iniciales distintas, las soluciones que se determinaron son óptimos locales porque son la solución del problema solo en la vecindad de la región de búsqueda acotada en el problema de optimización. Los resultados de las formulaciones sugieren que para obtener una solución que asegure una buena interpretación desde el punto de vista físico es necesario permitir al problema de optimización determinar todos los parámetros cinéticos del problema, ya que al acotar la región de búsqueda de la solución hace que el sentido físico de esta sea incorrecto.

3. **Análisis de sensibilidad dinámico:** Se identificaron los parámetros cinéticos más sensibles, de manera cualitativa, que afectan tanto a las variables de estado como al sistema en general utilizando el análisis de sensibilidad dinámico. Los coeficientes de sensibilidad se determinaron utilizando diferenciación automática (AD) en la plataforma de Matlab, el sistema de las ecuaciones diferenciales de sensibilidad se acopló al ODE del modelo del co-cultivo y el sistema resultante se integro de manera simultánea. Los parámetros cinéticos identificados como más sensibles deben ser estimados de manera más cuidadosa durante la resolución del problema de optimización.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.M. Abouzied and C.A. Reddy. Fermentation of starch to ethanol by a complementary mixture of an amylolytic yeast and *saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 9(1): 59–62, 1987.
- [2] M. Asther and A.W. Khan. Improved fermentation of cellobiose, glucose, and xylose to ethanol by *zymomonas anaerobia* and a high ethanol tolerant strain of *clostridium saccharolyticum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (3).
- [3] S. Balakrishna and L.T. Biegler. Targeting strategies for the synthesis and energy integration of nonisothermal reactor networks. *Industrial & Engineering Chemical Research*, 31(9):2152–2164, 1992.
- [4] M. Balat, H. Balat, and C. Öz. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5):551–573, 2008.
- [5] L.T. Biegler. An overview of simultaneous strategies for dynamic optimization. *Chemical Engineering Process*, 46(11):1043–1053, 2007.
- [6] C.H. Bischof, A. Carle, G. Corliss, A. Griewank, and P. Hovland. Adifor generating derivative codes from fortran programs. Technical report, Argonne National Laboratory, Argonne, Illinois, 1992.
- [7] C.H. Bischof, A. Carle, P. Khademi, and A. Mauer. The adifor 2.0 system for the automatic differentiation of fortran 77 programs. In *Rice University*, pages 18–32, 1994.
- [8] C.H. Bischof, A. Carle, P. Khademi, and A. Mauer. Adifor 2.0: Automatic differentiation of fortran 77 programs. *IEEE Computational Science & Engineering*, 3(3):18–32, 1996.
- [9] T. Brányik, R. Lehnert, A.A. Vicente, and J.A. Teixeira. Aging of immobilized brewing yeast in a continuous bubble-column reactor. Website, 2005. <http://hdl.handle.net/1822/3507>.

- [10] K. Broholm, T.H. Christensen, and B.K. Jensen. Modelling tce degradation by a mixed culture of methane-oxidizing bacteria. *Water Research*, 26(9):1177–1185, 1992.
- [11] B. Cheirsilp, H. Shimizu, and S. Shioya. Kinetic modeling of kefiran production in mixed culture of lactobacillus kefiranofaciens and saccharomyces cerevisiae. *Process Biochemistry*, 42(4):570–579, 2007.
- [12] Y. Chen. Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: a systematic review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, pages 1–17, 2010.
- [13] A.L. Does and L.F. Bisson. Comparison of glucose uptake kinetics in different yeast. *Journal of Bacteriology*, 171(3):1303–1308, 1989.
- [14] M.A. Eiteman, S.A. Lee, and E. Altman. A co-fermentation strategy to consume sugar mixtures effectively. *Journal of Biological Engineering*, 2(3):1–8, 2008.
- [15] H. Feldmann. Yeast molecular biology. Website, 2005. http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/03%20Yeast%20Metabolism.pdf.
- [16] M. Fink. myad, mya2d, mymatrixad: Software packages for automatic differentiation in matlab. Website, 2008. <http://gosh.gmxhome.de/>.
- [17] H.C. Frey and S.R. Patil. Identification and review of sensitivity analysis methods. *Risk Analysis*, 22(3):553–578, 2002.
- [18] N. Fu, P. Peiris, J. Markham, and J. Bavor. Improved ethanol production by mixed immobilized cells of kluyveromyces marxianus and saccharomyces cerevisiae from cheese whey powder solution fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(3):210–217, 2009.
- [19] X. Guo, J. Zhou, and D. Xiao. Improved ethanol production by mixed immobilized cells of kluyveromyces marxianus and saccharomyces cerevisiae from cheese whey powder solution fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2):532–538, 2010.
- [20] M. N. Gupta and S. Raghava. Relevance of chemistry to white biotechnology. *Chemistry Central Journal*, 1(17):1–3, 2007.

- [21] M. X. He, Y. Li, X. Liu, F. Bai, H. Feng, and Y.Z. Zhang. Ethanol production by mixed-cultures of paenibacillus sp. and zymomonas mobilis using the raw starchy material from sweet potato. *Annals of Microbiology*, 59(4):749–754, 2009.
- [22] H. Huang, S. Ramaswamy, U. W. Tschirner, and B. V. Ramarao. A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*, 62(1):1–21, 2008.
- [23] E.W. Jacobsen and G. Cedersund. On parametric sensitivity and structural robustness of cellular functions - the oscillatory metabolism of activated neutrophils. In *Proceedings of the 44th IEEE Conference on Decision and Control, and the European Control Conference 2005*, pages 3681–3686, Seville, Spain, 2005.
- [24] T.W. Jeffries. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3):320–326, 2006.
- [25] T.W. Jeffries, I.V. Grigoriev, J. Grimwood, J.M. Laplaza, A. Aerts, A. Salamov, J. Schmutz, E. Lindquist, P. Dehal, H. Shapiro, Y. Jin, V. Passoth, and P.M. Richardson. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast pichia stipitis. *Nature Biotechnology*, 25(3):319–326, 2007.
- [26] N.R. Kamini and P. Gunasekaran. Simultaneous ethanol production from lactose by kluyveromyces fragilis and zymomonas mobilis. *Current Microbiology*, 16(3):153–157, 1987.
- [27] T. Katoh, D. Yuguchi, H. Yoshii, H. Shi, and K. Shimizu. Dynamics and modeling on fermentative production of poly(β -hydroxybutyric acid) from sugars via lactate by a mixed culture of lactobacillus delbrueckii and alcaligenes eutrophus. *Journal of Biotechnology*, 67(2-3):113–134, 1999.
- [28] G. Kedia, R. Wang, H. Patel, and S.S. Pandiella. Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. *Process Biochemistry*, 42(1):65–70, 2007.
- [29] A.W. Khan and W.D. Murray. Single step conversion of cellulose to ethanol by a mesophilic coculture. *Biotechnology Letters*, 4(3):177–180, 1982.

- [30] P. Kumar, D. M. Barrett, M. J. Delwiche, and P. Stroeve. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemical Research*, 48(8):3713–3729, 2009.
- [31] J. M. Laplace, J. P. Delgenes, R. Moletta, and J. M. Navarro. Effects of culture conditions on the co-fermentation of a glucose and xylose mixture to ethanol by a mutant of *saccharomyces diastaticus* associated with *pichia stipitis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 39(6):760–763, 1993.
- [32] J.M. Laplace, J.P. Delgenes, R. Moletta, and J.M. Navarro. Combined alcoholic fermentation of d-xylose and d-glucose by four selected microbial strains: process considerations in relation to ethanol tolerance. *Biotechnology Letters*, 13(6):445–450, 1991.
- [33] S.B. Leschine and E. Canale-Parola. Ethanol production from cellulose by a coculture of *zymomonas mobilis* and a *clostridium*. *Current Microbiology*, 11(3):129–136, 1984.
- [34] L. Luperini-Enciso, H. Purón-Zepeda, L. Pedraza-Segura, and A. Flores-Tlacuahua. Optimal startup/shutdown operating policies with a recombinant strain continuously stirred bioreactor. *Industrial & Engineering Chemical Research*, 49(1):308–316, 2010.
- [35] Rowell R. M. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*, chapter 3. Cell Wall Chemistry, pages 35–74. CRC Press, 2005.
- [36] Y. Mu, G. Wang, and H.Q. Yu. Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Bioresource Technology*, 97(11):1302–1307, 2006.
- [37] W.D. Murray and M. Asther. Ethanol fermentation of hexose and pentose wood sugars produced by hydrogen-fluoride solvolysis of aspen chips. *Biotechnology Letters*, 6(5):323–326, 1984.
- [38] J. Nielsen, J. Villadsen, and G. Lidén. *Bioreaction Engineering Principles*, chapter 7 Modelling of Growth Kinetics, pages 235–314. Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2003.
- [39] Englezos P. and Kalogerakis N. *Applied Parameter Estimation for Chemical Engineers*, chapter 1. Introduction, pages 1–6. Marcel Dekker, 2001.

- [40] L. Pedraza-Segura. Efecto de la sobreexpresión del gen *sctps2* en el metabolismo de carbono de *Saccharomyces cerevisiae*. M. phil. thesis, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2005.
- [41] L. Pereira Ramos. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nova*, 26(6):863–871, 2003.
- [42] D. Ramkrishna and J. Varner. The non-linear analysis of cybernetic models. guidelines for model formulation. *Journal of Biotechnology*, (1).
- [43] M. Rivera-Soto, R. Viera-Bertrán, and R. Matos-Durán. Análisis de sensibilidad paramétrica en reactores de reformación catalítica de lpg. *Tecnología Química*, 25(1):43–49, 2005.
- [44] M. Rizzi, P. Erlemann, N. Bui-Thanh, and H. Dellweg. Xylose fermentation by yeasts 4. purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (2).
- [45] H. Rouhollah, N. Iraj, E. Giti, and A. Sorah. Mixed sugar fermentation by *pichia stipis*, *saccharomyces cerevisiaea*, and an isolated xylose-fermenting *kluveromyces marxianus* and their cocultures. *African Journal of Biotechnology*, 6(9):1110–1114, 2007.
- [46] A. Saltelli, M. Ratto, S. Tarantola, and F. Campolongo. Sensitivity analysis for chemical models. *Chemical Reviews*, 105(7):2811–2828, 2005.
- [47] A. Sandu, G.R. Carmichael, and F.A. Potra. Sensitivity analysis for atmospheric chemistry models via automatic differentiation. *Atmospheric Environment*, 31(3):475–489, 1997.
- [48] H. Shafaghat, G.D. Najafpour, P.S. Rezaei, and M. Sharifzadeh. Growth kinetics and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 24860 on various carbon sources. *World Applied Sciences Journal*, 7(2):140–144, 2009.
- [49] S. Subramaniyan and P. Prema. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1):33–46, 2002.
- [50] J. A. Tapia and F. J. Nieto. Razón de posibilidades: Una propuesta de traducción de la expresión odds ratio. *Salud Pública de México*, 35(4):419–424, 1993.

- [51] I.B. Tjoan and L.T. Biegler. Simultaneous solution and optimization strategies for parameter estimation of differential-algebraic equation systems. *Industrial & Engineering Chemical Research*, 30(2):376–385, 1991.
- [52] T. Turányi. Applications of sensitivity analysis to combustion chemistry. *Reliability Engineering and System Safety*, 57(1):41–48, 1997.
- [53] O. Volfová, O. Suchardová, J. Panos, and V. Krumphazl. Ethanol formation from cellulose by thermophilic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22(4):246–248, 1985.
- [54] Bard Y. *Nonlinear Parameter Estimation*, chapter II. Problem formulation, pages 11–14. Academic Press, 1974.
- [55] Y. Yu, X. Lou, and H. Wu. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. *Energy & Fuels*, 22(1):46–60, 2008.
- [56] H. Yue, M. Brown, J. Knowles, H. Wang, D.S. Broomhead, and D.B. Kell. Insights into the behaviour of systems biology models from dynamic sensitivity and identifiability analysis: a case study of an nf- κ b signalling pathway. *Molecular BioSystems*, 2(12):640–649, 2006.
- [57] V.M. Zavala. *Computational Strategies for the Optimal Operation of Large-Scale Chemical Processes*. Ph. d. thesis, Carnegie Mellon University, 2008.
- [58] V. V. Zverlov and W. H. Schwarz. Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental subsystems – clostridium thermocellum and clostridium stercorarium, thermophilic plant-fiber degraders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1125:298–307, 2008.

APÉNDICE A

Esta sección describe la formulación del análisis de sensibilidad local y dinámica que se utilizó para determinar la sensibilidad de los parámetros cinéticos del modelo de co-cultivo.

Análisis de sensibilidad local

La mayoría de los análisis de sensibilidad que se encuentran en química y física son locales y basados en derivadas. La sensibilidad local es útil para una variedad de aplicaciones, como la solución de problemas inversos, por ejemplo relacionando las observaciones macroscópicas de un sistema, como las constantes cinéticas, a las propiedades mecánicas cuánticas del sistema, o el análisis de pérdida de control y la sensibilidad paramétrica de varios tipos de reactores químicos. Los contextos donde la sensibilidad local ha sido ampliamente utilizada son: (1) para el entendimiento de las rutas de reacción, mecanismos, o la determinación de los pasos de reacción en un modelo cinético detallado con un gran número de reacciones elementales; (2) para extraer las reacciones elementales de un modelo cinético complejo para obtener un modelo reducido con un poder predictivo equivalente o para seleccionar reacciones importantes para ambos análisis; (3) para estimar la salida de un programa de computadora en la vecindad de un conjunto de condiciones frontera sin la necesidad de volver a correr el programa; y (4) la asimilación de datos, para reconciliar los parámetros del modelo con las observaciones. [46]

Algunos trabajos donde se aplicó el análisis de sensibilidad local son: el trabajo de Turányi [52] donde aplicó el análisis de sensibilidad local para analizar modelos de combustión química. El análisis de sensibilidad local se llevo a cabo a los modelos de explosión homogénea de hidrógeno y la flama de hidrógeno-aire laminar pre-mezclado, los resultados de sensibilidad revelan que los procesos químicos son muy similares, aunque los procesos físicos y la manera de la iniciación

sean diferentes. Rivera-Soto *et al* [43] realizaron el análisis de sensibilidad local al modelo de un reactor de reformación catalítica de LPG, este análisis permitió identificar los parámetros que ejercen el mayor efecto sobre cada uno de los resultados de interés, y dió la oportunidad de seleccionar aquellos que requieren una estimación rigurosa. Por su parte, Jacobsen y Cedersund [23] comprobaron la robustez de un modelo del metabolismo oscilatorio de neutrófilos activados utilizando el análisis de sensibilidad paramétrica para cuantificar la robustez con respecto a la variación paramétrica. Se encontró que el modelo es altamente robusto contra la incertidumbre paramétrica, pero también exhibe una pobre robustez estructural.

El análisis de sensibilidad local requiere de los coeficientes de sensibilidad local que son definidos como:

$$S_{i,j}(t) = \frac{\partial c_i}{\partial \alpha_j}$$

donde α_j representa tanto los valores iniciales c_j^0 o el parámetro β_j . El término local refiere a el hecho de que esas sensibilidades describen el sistema alrededor de un conjunto dado de valores de los parámetros α . Se considera que el sistema responde linealmente a pequeñas perturbaciones, $S_{i,j}$ mide la relación entre el efecto (variación absoluta de la salida Δc_i) y la causa (variación absoluta de la entrada $\Delta \alpha_j$).

Algunas ocasiones es útil considerar la relación entre la variación relativa de la salida y la variación relativa de la entrada:

$$S_{i,j}^* = \frac{\alpha_j}{c_i} \cdot S_{i,j} = \frac{\partial \ln(c_i)}{\partial \ln(\alpha_j)} \approx \frac{\Delta c_i}{c_i} \left(\frac{\Delta \alpha_j}{\alpha_j} \right)^{-1}$$

donde $S_{i,j}^*$ es el coeficiente de sensibilidad normalizado. Los coeficientes normalizados tienen la ventaja de ser adimensionales, de ahí su utilidad cuando comparas sensibilidades con respecto a parámetros cuyos valores absolutos tienen diferentes ordenes de magnitud. Si $\Delta \alpha_j = \alpha_j$ entonces $\alpha_j' = \alpha_j + \Delta \alpha_j = 2\alpha_j$ y tenemos la siguiente interpretación: $S_{i,j}^*$ es la variación relativa en c_i cuando el parámetro α_j dobla su valor, si el sistema responde linealmente.

La desventaja de los coeficientes normalizados es que ellos no son definidos para $c_i = 0$. Para superar este inconveniente, se puede considerar la sensibilidad semi-normalizada $S_{i,j}^+$, representando la variación absoluta en c_i cuando α_j dobla su valor (si el sistema responde linealmente):

$$S_{i,j}^+ = \alpha_j \cdot S_{i,j} = \frac{\partial c_i}{\partial \ln(\alpha_j)} \approx \Delta c_i \left(\frac{\Delta \alpha_j}{\alpha_j} \right)^{-1}$$

Aplicar el análisis de sensibilidad local a problemas de gran tamaño se requiere de herramientas como la diferenciación automática (AD) para evaluar las derivadas parciales que definen a los coeficientes de sensibilidad local. Las técnicas AD son basadas en el hecho que cualquier función (a pesar de su complejidad) es ejecutada en una computadora como una secuencia de operaciones elementales bien determinadas como sumas, multiplicaciones y las llamadas funciones elementales (intrínsecas) como el seno, coseno, etc. La AD es implementada mediante pre-compiladores que analizan el código del modelo complejo y después añaden instrucciones necesarias para calcular las derivadas de primer orden o de orden superior de una manera eficiente que salva tiempo computacional y reduce la complejidad. El código expandido resultante es posteriormente compilado con compiladores estándar de modo que el código puede evaluar los valores de la funciones utilizadas en el modelo, salidas y derivadas. La AD en Fortran (ADIFOR) es uno de los softwares utilizados para la implementación de AD, este fue desarrollado por Bischof *et al* [6, 7, 8] en la decada de los 90's, ADIFOR adopta un enfoque híbrido para evaluar las derivadas que se basa generalmente en el modo hacia adelante, pero utiliza el modo hacia atrás para derivadas que contienen expresiones complicadas.

Sandu *et al* [47] realizaron el análisis de sensibilidad para un modelo sobre la química atmosférica via AD. Para el análisis de sensibilidad del modelo sobre la química de la tropósfera se utilizó ADIFOR 2.0 de manera exitosa, lo que confirma que la AD es una herramienta valiosa para el análisis de sensibilidad. Un aspecto valioso del empleo de la AD para el análisis de sensibilidad es que los modelos que se analizan pueden estar sujetos a modificaciones y mejoras de manera permanente. Sucede lo contrario en un análisis de sensibilidad rutinario, cualquier modificación que se realice al modelo, implica realizar el ajuste correspondiente en las ecuaciones variacionales. El error más ligero en la generación de las ecuaciones variacionales podría dar lugar a resultados inútiles, como consecuencia uno necesita realizar un chequeo a fondo para su

corrección. Ambos problemas pueden evitarse con éxito y de manera directa utilizando la AD, la AD ofrece la facilidad de generar ecuaciones de sensibilidad con la seguridad de que estén libres de errores.

El análisis de sensibilidad local sigue siendo el método más utilizado en el área de los sistemas biológicos cuando los parámetros del sistema son proporcionados de forma fiable por experimentos o cálculos. El análisis de sensibilidad local puede ser realizado de modo estático o de modo dinámico. El análisis de sensibilidad estático se basa en la respuesta del estado estacionario a cambios constantes en los parámetros. Este puede proveer una descripción adecuada del comportamiento del sistema para mecanismos que están bajo control homeostático y tiende a exhibir un comportamiento uniforme con estados transitorios insignificantes, en sistemas particulares que son asintóticamente estables. Sin embargo, para sistemas generales con comportamiento nominal variable en el tiempo, como transducción de señales y sistemas regulatorios, el análisis de sensibilidad dinámica es de interés primario. Por lo tanto se debería poner más énfasis en la dinámica en lugar de la concentración instantánea de los componentes. La investigación del comportamiento de los estados transitorios en las redes de transducción de señales o cualquier fenómeno que involucre oscilaciones cíclicas limitadas requiere un análisis dinámico.

Se han desarrollado un número de métodos para la evaluación de la sensibilidad local como el método de diferencias finitas (FDM), el método de diferenciación directa (DDM), el método de la función de Green, el método de integral analítica de Magnus, etc. Estos algoritmos pueden ser agrupados en dos categorías: los métodos secuenciales y los métodos simultáneos. Comúnmente se utiliza el método diferencial directo, donde las ecuaciones diferenciales del sistema del modelo y las sensibilidades son combinados en un sistema acoplado y son resueltas simultáneamente. En la mayoría de los casos, el cálculo de la sensibilidad es un problema de resolver ODEs rígidos, como en los sistemas biológicos que normalmente involucran un gran número de reacciones y los parámetros que pueden abarcar muchos ordenes de magnitud.

Sensibilidad dinámica

Designando x_i como el i -ésimo estado en \mathbf{X} , θ_j el j -ésimo parámetro en θ , el efecto del cambio

del parámetro θ_j al estado de la especie de interés, x_i , puede ser expresado por la expansión de la serie de Taylor:

$$x_i(\theta_j + \Delta\theta_j, t) = x_i(\theta_j, t) + \sum_{j=1}^m \frac{\partial x_i}{\partial \theta_j} \Delta\theta_j + \frac{1}{2} \sum_{l=1}^m \sum_{j=1}^m \frac{\partial^2 x_i}{\partial \theta_l \partial \theta_j} \Delta\theta_l \Delta\theta_j + \dots \quad (\text{A-1})$$

En la ecuación A-1, las derivadas parciales $\partial x_i / \partial \theta_j$ son llamados los coeficientes de sensibilidad de concentración local de primer orden, mientras $\partial^2 x_i / \partial \theta_l \partial \theta_j$ son los coeficientes de sensibilidad de concentración local de segundo orden, etc. Normalmente sólo se consideran los coeficientes de sensibilidad de primer orden. La matriz de sensibilidad absoluta se define como:

$$S = \frac{\partial \mathbf{X}}{\partial \theta} = \begin{bmatrix} S_{1,1} & S_{1,2} & \dots & S_{1,m} \\ S_{2,1} & S_{2,2} & \dots & S_{2,m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ S_{n,1} & S_{n,2} & \dots & S_{n,m} \end{bmatrix} \quad (\text{A-2})$$

donde $S_{i,j} = \partial x_i / \partial \theta_j$.

La matriz S puede ser obtenida de manera conveniente por diferenciación si la solución analítica del ODEs en $\dot{\mathbf{X}} = f(\mathbf{X}, \theta, t)$, $\mathbf{X}(t_0) = \mathbf{X}_0$ es disponible. Desafortunadamente, esto es muy raro para sistemas de redes celulares cuya dinámica es descrita por ODEs no-lineales complejos. Además, los métodos numéricos deben ser aplicados para obtener S en cada punto del tiempo. Dos de los métodos numéricos utilizados comúnmente son el método de diferencias finitas (FDM) y el método de diferenciación directa (DDM). La aproximación por diferencias finitas es utilizada en el FDM, en el cual los coeficientes de sensibilidad $S_{i,j}$ son calculados a partir de la diferencia de la solución nominal y la perturbada.

$$S_{i,j} = \frac{\partial x_i(t)}{\partial \theta_j} = \frac{x_i(\theta_j + \Delta\theta_{j,t}) - x_i(\theta_{j,t})}{\Delta\theta_j} \quad (\text{A-3})$$

Este método es directo ya que solamente requiere de cálculo de x_i con los parámetros nominales y los perturbados. Sin embargo, los valores numéricos obtenidos podrían variar significativamente con respecto a $\Delta\theta_j$, y se requiere de la solución repetida del modelo de al menos una ocasión por cada parámetro. Esto implica discontinuidades inherentes con respecto al estado inicial del

parámetro.

El DDM calcula la sensibilidad local como función del tiempo. Tomando las derivadas parciales del sistema $\dot{\mathbf{X}} = f(\mathbf{X}, \theta, t)$, $\mathbf{X}(t_0) = \mathbf{X}_0$ con respecto a θ_j produce el siguiente conjunto de ecuaciones diferenciales de sensibilidad absoluta:

$$\frac{d}{dt} \frac{\partial \mathbf{X}}{\partial \theta_j} = \frac{\partial f}{\partial \mathbf{X}} \frac{\partial \mathbf{X}}{\partial \theta_j} + \frac{\partial f}{\partial \theta_j} = \mathbf{J} \cdot \mathbf{S}_j + \mathbf{F}_j \quad (\text{A-4})$$

donde

$$\mathbf{J} = \frac{\partial \mathbf{f}}{\partial \mathbf{X}} = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \frac{\partial f_1}{\partial x_2} & \cdots & \frac{\partial f_1}{\partial x_n} \\ \frac{\partial f_2}{\partial x_1} & \frac{\partial f_2}{\partial x_2} & \cdots & \frac{\partial f_2}{\partial x_n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial f_n}{\partial x_1} & \frac{\partial f_n}{\partial x_2} & \cdots & \frac{\partial f_n}{\partial x_n} \end{bmatrix}, \quad \mathbf{F}_j = \frac{\partial \mathbf{f}}{\partial \theta_j} = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial \theta_j} \\ \frac{\partial f_2}{\partial \theta_j} \\ \vdots \\ \frac{\partial f_n}{\partial \theta_j} \end{bmatrix}$$

son referidos como la matriz Jacobiana, la matriz Jacobiana de parámetros y

$$\mathbf{S}_j = \frac{\partial \mathbf{X}}{\partial \theta_j} = \begin{bmatrix} S_{1,j} \\ S_{2,j} \\ \vdots \\ S_{n,j} \end{bmatrix}$$

es el vector columna de sensibilidad con respecto al j -ésimo parámetro. Resolviendo las n ecuaciones de $\dot{\mathbf{X}} = f(\mathbf{X}, \theta, t)$, $\mathbf{X}(t_0) = \mathbf{X}_0$ junto con las n ecuaciones de (A-4) como un conjunto de ecuaciones diferenciales:

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{X}} = f(\mathbf{X}, \theta, t), & \mathbf{X}(t_0) = \mathbf{X}_0 \\ \dot{\mathbf{S}} = \mathbf{J} \cdot \mathbf{S}_j + \mathbf{F}_j, & \mathbf{S}_j(t_0) = \mathbf{S}_0 \end{cases} \quad (\text{A-5})$$

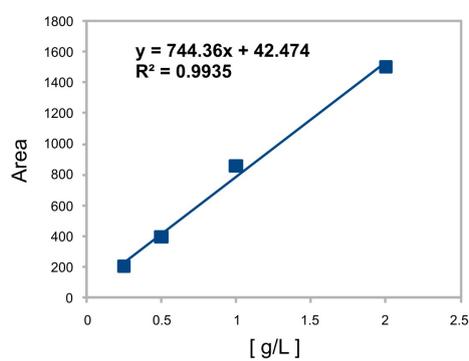
ambos $\mathbf{X}(t)$ y $\partial \mathbf{X}(t)/\partial \theta_j$ pueden ser determinados simultáneamente. En el análisis de sistemas reales, se utilizan las sensibilidades normalizadas en lugar de $S_{i,j}$ que permiten una comparación directa de las respuestas de diferentes estados o de diferentes parámetros. [56]

$$\bar{S}_{i,j} = \frac{\partial x_i/x_i}{\partial \theta_j/\theta_j} = \frac{\partial x_i}{\partial \theta_j} \cdot \frac{\theta_j}{x_i} \quad (\text{A-6})$$

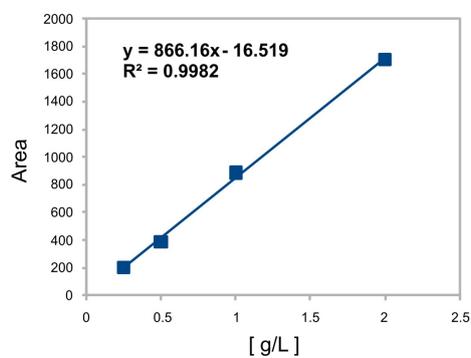
ANEXO 1

Curvas estándar de calibración para azúcares y etanol

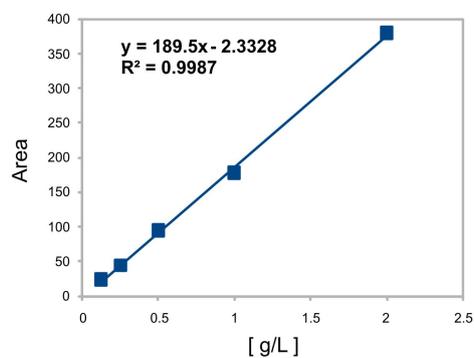
Curva Glucosa



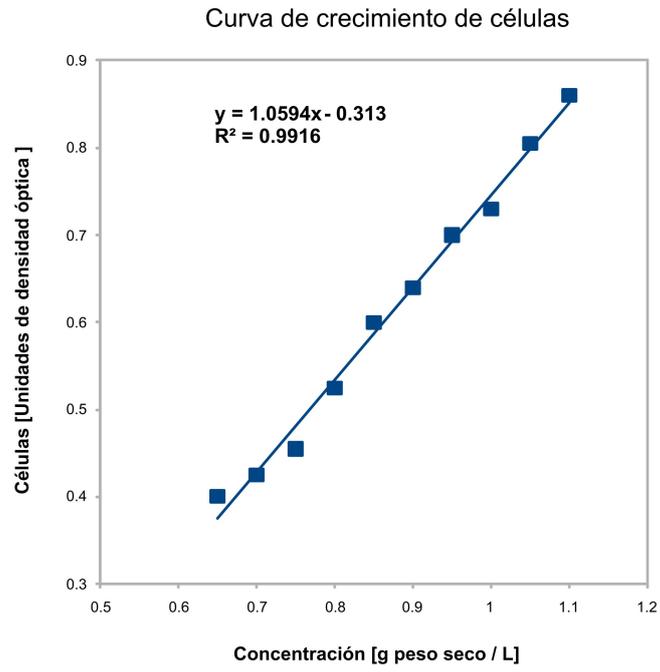
Curva Xilose



Curva Etanol



Curva de calibración peso seco de células



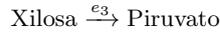
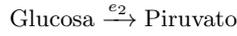
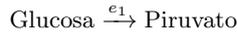
ANEXO 2

Modelo cibernético del co-cultivo de P. stipitis y S. cerevisiae

Modelo condensado

(a) Ruta elemental convergente

Velocidades de reacción



$$r_i = \frac{\mu_{max,i} \left(\frac{e_i}{e_i^{max}} \right) P_j}{K_i + P_j} \quad i = 1, 2, 3; P_j = G, Xil$$

VARIABLES CIBERNÉTICAS QUE CONTROLAN LA SÍNTESIS ENZIMÁTICA (U_i^c)

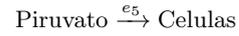
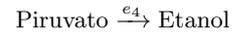
$$U_i^c = \frac{r_i}{\sum_i r_i} \quad i = 1, 2, 3$$

VARIABLES CIBERNÉTICAS QUE CONTROLAN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (V_i^c)

$$V_i^c = \frac{r_i}{\max(r_1 + r_2 + r_3)} \quad i = 1, 2, 3$$

(b) Ruta elemental divergente

Velocidades de reacción



$$r_k = \frac{\mu_{max,k} \left(\frac{e_k}{e_k^{max}} \right) Pir}{Pir + K_k + \frac{Pir^2}{K_{sini,k}}} \left(1 - \frac{E}{K_{pini,k}} \right) \quad k = 4, 5$$

VARIABLES CIBERNÉTICAS QUE CONTROLAN LA SÍNTESIS ENZIMÁTICA (U_k^d)

$$U_k^d = \frac{\frac{r_k}{P_l}}{\frac{r_4}{E} + \frac{r_5}{X}} \quad k = 4, 5; P_l = E, X$$

VARIABLES CIBERNÉTICAS QUE CONTROLAN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (V_k^d)

$$V_k^d = \frac{\frac{r_k}{P_l}}{\max\left(\frac{r_4}{E}, \frac{r_5}{X}\right)} \quad k = 4, 5; P_l = E, X$$

Balances de materia

Glucosa

$$\frac{dG}{dt} = (-r_1 V_1^c - r_2 V_2^c) X - \left(\frac{r_4 V_4^d}{Y_{\frac{E}{Pir}}} - \frac{r_5 V_5^d}{Y_{\frac{X}{Pir}}} \right) X$$

Xilosa

$$\frac{dXil}{dt} = -r_3 V_3^c X$$

Etanol

$$\frac{dE}{dt} = r_4 V_4^d X$$

Células

$$\frac{dX}{dt} = (r_5 V_5^d - K_d) X$$

Piruvato

Balances de materia de la proporción enzimática intracelular [e_m]

$$\frac{d\left(\frac{e_m}{e_m^{max}}\right)}{dt} = \frac{(\mu_{e_m}^{max} + \beta_m) P_n}{K_{e_m} + P_n} U_m^c - (r_5 V_5^d - K_d) \cdot$$

$$\left(\frac{e_m}{e_m^{max}}\right) - \beta_m \left(\frac{e_m}{e_m^{max}}\right)$$

$$m = 1, \dots, 5; P_n = G, Xil, Pir$$

El modelo esta compuesto por:

- ▶ 10 ecuaciones diferenciales
- ▶ 15 ecuaciones algebraicas explicitas
- ▶ 10 Variables de estado
- ▶ 35 o 32 parámetros cinéticos dependiendo de la formulación

Las ecuaciones algebraicas se pueden sustituir directamente en las ecuaciones diferenciales, por lo tanto, el sistema esta compuesto por 10 ecuaciones y 10 variables; los grados de libertad se definen como: Número de variables - Número de ecuaciones, así los grados de libertad del modelo son de 0 y en principio el sistema puede resolverse.

Condiciones iniciales

Tabla 8.1: Condiciones iniciales de las mezclas de glucosa y xilosa para el modelo de co-cultivo.

Caso	Mezcla de glucosa : xilosa	G(t=0)	Xil(t=0)	Pir(t=0)	E(t=0)	X(t=0)	e1(t=0)	e2(t=0)	e3(t=0)	e4(t=0)	e5(t=0)
C1	20% : 80%	8	32	1.00E-05	1.00E-05	0.3	0.5	0.5	1	0.5	0.5
C2	50% : 50%	20	20	1.00E-05	1.00E-05	0.3	0.5	0.5	1	0.5	0.5
C3	80% : 20%	32	8	1.00E-05	1.00E-05	0.3	0.5	0.5	1	0.5	0.5

Parámetros cinéticos del modelo de co-cultivo

Tabla 8.2: Parámetros cinéticos para la formulación F1 calculados como óptimo local del problema NLP.

Mezcla de glucosa – xilosa	Limite inferior	20 : 80	Limite superior	Limite inferior	50 : 50	Limite superior	Limite inferior	80 : 20	Limite superior	Unidades
$\mu_{max,1}$	0.01	43.50	$+\infty$	0.00	34.0140	$+\infty$	0.01	28.248	500.00	h^{-1}
$\mu_{max,2}$	0.01	0.01	$+\infty$	0.00	1.4970	$+\infty$	0.01	183.109	500.00	h^{-1}
$\mu_{max,3}$	0.01	35.24	$+\infty$	0.00	37.7090	$+\infty$	0.01	90.639	500.00	h^{-1}
$\mu_{max,4}$	0.01	197780	$+\infty$	0.00	6.6060	$+\infty$	0.01	0.368	500.00	h^{-1}
$\mu_{max,5}$	0.01	1.63	$+\infty$	0.00	0.1270	$+\infty$	0.01	0.113	500.00	h^{-1}
$\mu_{max,e1}$	0.01	0.01	$+\infty$	1.00E-020	0.3280	$+\infty$	0.01	0.010	500.00	h^{-1}
$\mu_{max,e2}$	0.01	7.05	$+\infty$	1.00E-024	0.4930	$+\infty$	0.01	0.010	500.00	h^{-1}
$\mu_{max,e3}$	0.01	0.01	$+\infty$	1.00E-020	2.4280	$+\infty$	0.01	0.010	500.00	h^{-1}
$\mu_{max,e4}$	0.01	3678.47	$+\infty$	0.00	1.2290	$+\infty$	0.01	3.742	500.00	h^{-1}
$\mu_{max,e5}$	0.01	1924.01	$+\infty$	0.00	4.9800	$+\infty$	0.01	2.834	500.00	h^{-1}
K_1	1.00E-008	1.04	$+\infty$	0.00	1.0630	$+\infty$	0.01	94.583	200.00	g/L
K_2	1.00E-008	1.00E-008	$+\infty$	0.00	4233.2170	$+\infty$	0.01	26.146	200.00	g/L
K_3	1.00E-008	1.00E-008	$+\infty$	0.00	20.9800	$+\infty$	0.01	197.488	200.00	g/L
K_4	1.00E-008	1009500	$+\infty$	0.00	66.0790	$+\infty$	0.01	9.489	200.00	g/L
K_5	1.00E-008	6.614	$+\infty$	1.00E-005	6.1520	$+\infty$	0.01	3.249	200.00	g/L
K_{e1}	1.00E-008	83.66	$+\infty$	0.00	172.0300	$+\infty$	0.01	13.555	200.00	g/L
K_{e2}	1.00E-008	0.378	$+\infty$	0.00	10.0100	$+\infty$	0.01	200.000	200.00	g/L
K_{e3}	1.00E-008	9225.53	$+\infty$	0.00	13045.4640	$+\infty$	0.01	208.000	208.00	g/L
K_{e4}	1.00E-008	411910	$+\infty$	0.00	9.1280	$+\infty$	0.01	0.705	200.00	g/L
K_{e5}	1.00E-008	134720	$+\infty$	0.00	7.9550	$+\infty$	0.01	3.386	200.00	g/L
$K_{sini,4}$	0.00	287.98	$+\infty$	0.00	500.5270	$+\infty$	0.00	628.533	$+\infty$	g/L
$K_{sini,5}$	0.00	6095.89	$+\infty$	0.00	499.6690	$+\infty$	0.00	425.449	$+\infty$	g/L
$K_{pini,4}$	0.00	972.33	$+\infty$	0.00	499.8160	$+\infty$	0.00	4177.492	$+\infty$	g/L
$K_{pini,5}$	0.00	1105.54	$+\infty$	0.00	500.5370	$+\infty$	0.00	7592.792	$+\infty$	g/L
K_d	0.00	0.0001	0.0001	0.01	0.0100	$+\infty$	0.00	0.000	1.00E-004	h^{-1}
$Y_{Pir/G1}$	0.20	0.20	0.95	0.10	0.6460	1.00	0.25	0.392	0.90	g/g
$Y_{Pir/G2}$	0.20	0.20	0.95	0.10	0.4980	1.00	0.25	0.469	0.90	g/g
$Y_{Pir/Xil}$	0.40	0.46	0.95	0.40	0.4000	1.00	0.01	0.058	0.90	g/g
$Y_{E/Pir}$	0.20	0.95	0.95	0.10	0.6780	1.00	0.00	0.875	0.88	g/g
$Y_{X/Pir}$	0.40	0.40	0.95	0.10	0.9660	1.00	0.00	0.795	0.80	g/g
β_1	0.00	0.782	$+\infty$	0.00	0.5540	$+\infty$	0.00	0.021	$+\infty$	h^{-1}
β_2	0.00	0.228	$+\infty$	0.00	0.0000	$+\infty$	0.00	1.985	$+\infty$	h^{-1}
β_3	0.00	0.613	$+\infty$	0.00	0.3760	$+\infty$	0.00	0.097	$+\infty$	h^{-1}
β_4	0.00	0.023	$+\infty$	0.00	0.0120	$+\infty$	0.00	0.092	$+\infty$	h^{-1}
β_5	0.00	0.100	0.100	0.00	0.0450	$+\infty$	0.00	0.000	$+\infty$	h^{-1}

Tabla 8.3: Parámetros cinéticos para la formulación F2 calculados como óptimo local del problema NLP.

<i>Mezcla de glucosa-xilosa</i>										
<i>Parámetros</i>	<i>Límite inferior</i>	20 : 80	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	50 : 50	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	80 : 20	<i>Límite superior</i>	<i>Unidades</i>
$\mu_{\max,2}$	0.01	42.055	$+\infty$	0.01	44.385	$+\infty$	0.01	1000.000	1000.00	h^{-1}
$\mu_{\max,3}$	0.01	34.778	$+\infty$	0.01	35.48	$+\infty$	0.01	647.132	1000.00	h^{-1}
$\mu_{\max,4}$	0.01	17.098	$+\infty$	0.01	0.193	1000.00	0.01	2.642	1000.00	h^{-1}
$\mu_{\max,5}$	0.01	0.901	$+\infty$	0.01	0.875	$+\infty$	0.01	1.374	1000.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e1}$	0.01	0.912	$+\infty$	0.01	0.01	$+\infty$	0.01	0.525	1000.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e2}$	0.01	0.01	$+\infty$	0.01	286.742	$+\infty$	0.01	100.000	100.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e3}$	0.01	0.01	$+\infty$	0.01	0.01	$+\infty$	0.01	0.001	100.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e4}$	0.01	101.24	$+\infty$	0.01	2.74E+008	$+\infty$	0.01	3.884	1000.00	h^{-1}
$\mu_{\max,e5}$	0.01	8956.201	$+\infty$	0.01	0.01	$+\infty$	0.01	423.839	1000.00	h^{-1}
K_2	1.00E-006	0.772	$+\infty$	1.00E-006	0.36	$+\infty$	1.00E-006	326.083	$+\infty$	g/L
K_3	1.00E-006	1.00E-006	$+\infty$	1.00E-006	6.609	$+\infty$	1.00E-006	489.261	$+\infty$	g/L
K_4	1.00E-006	1156.215	$+\infty$	1.00E-006	7.718	$+\infty$	1.00E-006	2.9049E-4	$+\infty$	g/L
K_5	1.00E-006	0.069	$+\infty$	1.00E-006	0.006	$+\infty$	1.00E-006	1.0000E-6	$+\infty$	g/L
K_{e1}	1.00E-006	1.00E-006	$+\infty$	1.00E-006	1.17E+008	$+\infty$	1.00E-006	0.001	$+\infty$	g/L
K_{e2}	1.00E-006	71.242	$+\infty$	1.00E-006	97399.289	$+\infty$	1.00E-006	3148.758	$+\infty$	g/L
K_{e3}	1.00E-006	9131.936	$+\infty$	1.00E-006	2850.337	$+\infty$	1.00E-006	1.1146E+5	$+\infty$	g/L
K_{e4}	1.00E-006	1.00E-006	$+\infty$	1.00E-006	6.86E+008	$+\infty$	1.00E-006	81.051	$+\infty$	g/L
K_{e5}	1.00E-006	5.93E+005	$+\infty$	1.00E-006	1.00E-006	$+\infty$	1.00E-006	12372.889	$+\infty$	g/L
$K_{\text{ini},4}$	0.00	0.313	$+\infty$	0.00	37.011	$+\infty$	0.00	3264.621	$+\infty$	g/L
$K_{\text{ini},5}$	0.00	69160.499	$+\infty$	0.00	6.69E+008	$+\infty$	0.00	21.541	$+\infty$	g/L
$K_{\text{pini},4}$	0.00	1128.205	$+\infty$	0.00	2.14E+009	$+\infty$	0.00	3897.274	$+\infty$	g/L
$K_{\text{pini},5}$	0.00	344.127	$+\infty$	0.00	9.725	$+\infty$	0.00	343.637	$+\infty$	g/L
$Y_{\text{Pir}/\text{G1}}$	0.20	0.968	0.99	0.25	0.25	0.99	0.30	0.900	0.99	g/g
$Y_{\text{Pir}/\text{G2}}$	0.20	0.2	0.99	0.25	0.9	0.99	2.95E-001	0.295	0.99	g/g
$Y_{\text{Pir}/\text{Xil}}$	0.20	0.99	0.99	0.20	0.258	0.99	0.30	0.900	0.99	g/g
$Y_{\text{E}/\text{Pir}}$	0.20	0.316	0.99	0.30	0.518	0.99	0.30	0.900	0.99	g/g
$Y_{\text{X}/\text{Pir}}$	0.20	0.288	0.99	0.30	0.9	0.99	0.30	0.681	0.99	g/g
β_1	0.00	0	$+\infty$	0.00	0	$+\infty$	0.00	0	$+\infty$	h^{-1}
β_2	0.00	0.813	$+\infty$	0.00	0.684	$+\infty$	0.00	7.304	$+\infty$	h^{-1}
β_3	0.00	0.605	$+\infty$	0.00	0.628	$+\infty$	0.00	0.235	$+\infty$	h^{-1}
β_4	0.00	18.658	$+\infty$	0.00	0.007	$+\infty$	0.00	0.523	$+\infty$	h^{-1}
β_5	0.00	0.338	$+\infty$	0.00	1.152	$+\infty$	0.00	0.379	$+\infty$	h^{-1}