

Análisis de estabilidad de un sistema de fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) a partir de glucosa empleando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

Laura Johana Castellanos Suárez,*¹ Luis Gerónimo Matallana Pérez*²
y Luis Javier López Giraldo³

¹ Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química, Carrera 27 calle 9 Ciudad Universitaria, Bucaramanga, Colombia. *Autor para correspondencia: lauracastellanos9009@gmail.com

² Universidad de Antioquia, Facultad de Ingeniería, Calle 67 N° 53-108, Medellín, Colombia *Autor para correspondencia: luis.matallana@udea.edu.co

³ Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química, Carrera 27 calle 9 Ciudad Universitaria, Bucaramanga, Colombia.

Stability analysis of acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 with glucose feeding

Abstract

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

Keywords: Bifurcation, Butanol, Dynamic simulation, Nonlinear dynamics, Stability Analysis.

Editora: Pataquiva-Mateus, A.Y.

Citation: Castellanos, L. J., Matallana, L. G. y López, L. J. (2014). Análisis de estabilidad de un sistema de fermentación Acetona-Butanol-Etanol (ABE) a partir de glucosa empleando *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824. *Revista Mutis 4(1)*; pag. 15-23

Received: Jun 30, 2014; **accepted:** Junio 8, 2014; **Published on line:** Junio 30, 2014

Copyright: ©2014 Castellanos *et al.* This is an open-access article, which permits unrestricted use, distributions and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Competing Interests: The authors have no conflict of interest.

Resumen

Se analiza la dinámica y estabilidad en la producción de butanol por fermentación en un biorreactor continuo. La respuesta dinámica del sistema se estudió eligiendo como criterio de evaluación la concentración de butanol, en un modelo cinético validado estadísticamente, que describe el comportamiento oscilatorio de cultivos continuos teniendo en cuenta la influencia del pH, inhibición por productos y los parámetros influyentes en el sistema. Se tomaron como paráme-



tros de bifurcación la dilución (D) y la concentración de sustrato de alimentación (Sf). Se empleó una rutina de cálculo en Matlab® y la herramienta Matcont® para generar diagramas de comportamiento dinámico, valores de estado estacionario y diagramas de bifurcación. Los resultados muestran que es conveniente operar a velocidades de dilución pequeñas ($D < 0,1 \text{ [h}^{-1}\text{]}$) y concentraciones de sustrato de alimentación (Sf) en un rango de 40 a 90 [g/L] para obtener las concentraciones más altas de butanol. Las implicaciones prácticas de los fenómenos descubiertos se analizan con el objetivo de aplicar una metodología adecuada para este tipo de estudios y para la puesta en marcha de este tipo de bioprocesos.

Palabras clave: análisis estabilidad, bifurcación, butanol, dinámica no lineal, simulación.

Introducción

La producción de alcoholes empleando fermentación de sustratos azucarados tiene un amplio mercado, que abarca desde la industria farmacéutica hasta su empleo como aditivos oxigenantes de combustibles para reducir su nivel contaminante. La fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol) es un ejemplo típico y fue uno de los primeros procesos fermentativos desarrollados industrialmente. No obstante, el aumento de los costos de los sustratos y la posibilidad de obtener materias primas y productos más económicos desde la industria petroquímica, fueron las causas para que este proceso pasara a un segundo plano. En los últimos años, el uso de biocombustibles ha sido ampliamente desarrollado y su producción ha crecido exponencialmente (Donaldson *et al.*, 2007; Kirschner, 2006; Lee *et al.*, 2008). Este renovado interés se basa casi exclusivamente en la preocupación por el agotamiento de los combustibles fósiles y la incertidumbre de los suministros de petróleo.

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

anterior debido a que la relación estequiométrica aire:combustible es menor y en consecuencia es posible inyectar mayor cantidad de combustible (Patakova *et al.*, 2011). Además, estas mezclas tienen mejores propiedades fisicoquímicas que las de etanol en cuanto a la estabilidad de fase en presencia de agua, mejores propiedades a baja temperatura, menor susceptibilidad a la oxidación durante el almacenamiento y una menor presión de vapor.

Se infiere entonces que el butanol es una buena opción para diversificar la oferta energética de combustibles líquidos y también que es el producto más significativo de la fermentación Acetona-Butanol-Etanol (ABE). Diversos estudios han demostrado que su producción por vía fermentativa se puede desarrollar empleando diferentes tipos de bacterias, pero es de interés para el presente trabajo, citar el género *Clostridium* especie *acetobutylicum* debido a que es el más empleado industrialmente: presenta mayor potencial para la producción eficiente del butanol (Jang *et al.*, 2012; Kamiński *et al.*, 2011; Patakova *et al.*, 2013; Tashiro *et al.*, 2010).

Por otra parte, el incremento en la demanda de alcoholes obtenidos por vía fermentativa para ser empleados como biocombustibles, ha generado en las industrias la necesidad de aumentar la productividad de estos procesos. Además, debido a los altos precios de las materias primas, se hace necesario el diseño de procesos eficientes con el fin de minimizar los costos de operación y maximizar los rendimientos de los productos de interés. Por lo tanto, se hace imprescindible plantear estudios y análisis para el entendimiento detallado y optimización de los procesos fermentativos para la obtención de alcoholes. Por ejemplo, Paz (Paz, 2011a; Paz, 2011b) propone que en el diseño de procesos en general, se debe incluir un análisis riguroso de la estabilidad de los posibles estados estacionarios del sistema. De esta manera, será viable predecir y con mayor certeza el comportamiento dinámico del mismo, y así establecer condiciones de operación adecuadas para el desempeño eficiente del proceso.

Método de un análisis de estabilidad para un bioproceso

Contrario a lo esperado, el diseño de los bioprocesos a escala industrial aún es desarrollado empíricamente a pesar de los estudios presentados por la comunidad

científica, ignorando los límites de estabilidad característicos de los sistemas. Por esta razón, el diseño de estos procesos ha sido clasificado como un 'arte' empírico: preocupado principalmente por 'saber hacer' sin tener en cuenta la importancia de conocimientos científicos que expliquen el 'por qué' de estos (Ajbar et al., 2012; Stockar et al., 2003). Lo anterior, ha llevado a elevar los costos globales de los bioprocesos, y en la mayoría de los casos, ha sido un factor diferenciador y de gran desventaja frente a los procesos tradicionales. Es entonces evidente que la naturaleza dinámica del proceso fermentativo debe ser estudiada con el propósito de entender el efecto de las variables de diseño sobre los fenómenos de estabilidad que afectan la productividad.

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

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

Modelo cinético

Durante las últimas dos décadas se han logrado significativos avances en el área de investigación relacionada con el modelamiento matemático de la fermentación ABE (Mayank et al., 2012). Los modelos de rutas metabólicas pueden clasificarse en 2 categorías: los modelos estequiométricos y modelos de simulación cinéticos (Tashiro et al., 2010); Los últimos describen el comportamiento dinámico de los metabolitos y permiten desarrollar estrategias para la operación de biorreactores.

En el análisis de estabilidad de biorreactores continuos, los sistemas son modelados por medio de conjuntos de ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden (EDO). Las ecuaciones diferenciales usadas para modelar los sistemas, expresadas de forma vectorial, son:

$$\frac{dx}{dt} = \mathbf{f}(\mathbf{x}, \boldsymbol{\lambda}) \frac{dx}{dt} = \mathbf{f}(\mathbf{x}, \boldsymbol{\lambda}) \quad (1)$$

$$\mathbf{x}(0) = \mathbf{x}_0 \quad \mathbf{x}(0) = \mathbf{x}_0$$

Donde t representa el tiempo, $\mathbf{x} = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ es el vector de variables de estado, $\mathbf{f} = (f_1, f_2, \dots, f_n)$ es el vector de las funciones no lineales, $\boldsymbol{\lambda} = (\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_m)$ es el conjunto de parámetros del modelo, y \mathbf{x}_0 es el vector de las condiciones iniciales. También se asume que \mathbf{f}

no depende explícitamente de la variable independiente t . Así, se dice que el sistema descrito anteriormente en la Ecuación 1, es autónomo o invariante en el tiempo (Ajbar et al., 2012; Strogatz, 1994; Seydel, 2010). En relación con el número de ecuaciones (n), corresponden a la cantidad de variables de estado y también denotan la dimensión del sistema.

La selección del modelo se realizó con base en el análisis de las referencias bibliográficas. Así las cosas, el modelo de Yang X. (1990) y Tso G. (Yang et al., 1994) fue seleccionado porque: (i) describe el comportamiento de inhibición por producto, (ii) plantea una expresión cinética para el crecimiento celular, (iii) considera el efecto del pH sobre la cinética de crecimiento celular, (iv) se tiene conocimiento de cada una de las constantes cinéticas, (v) está validado experimental y estadísticamente y, (vi) considera la recuperación *in situ* de solventes (modelo que considera la adición de resinas).

Parámetros a evaluar en el análisis de estabilidad

La velocidad de dilución (D), y la concentración de sustrato alimentado (S_f) son los parámetros elegidos para el análisis de bifurcación debido a que estos son los más fáciles de manipular durante la operación de un sistema de fermentación, y por lo tanto es realista pensar que los resultados puedan ser empleados en la puesta en marcha de este (Garhyana et al., 2003; Mahecha-Botero et al., 2005). En la Figura 1 se presenta un diagrama esquemático de los biorreactores junto con sus variables de entrada y salida.

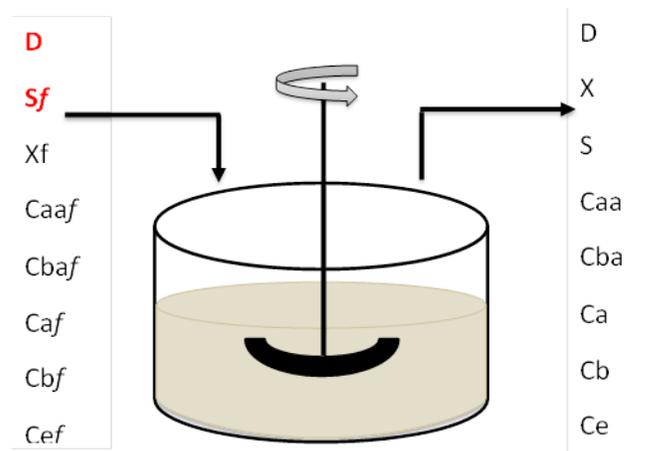


Figura 1. Diagrama esquemático del fermentador continuo

Análisis de estabilidad

La simulación de biorreactores continuos a través de modelos cinéticos genera el reto de determinar cuáles de los múltiples estados estables posibles son los más adecuados para la operación del proceso (Fradkov *et al.*, 1999). Como se ha mencionado en párrafos anteriores, este análisis debe ser desarrollado basado en criterios ingenieriles y no en criterios empíricos. A continuación se presentan brevemente los conceptos fundamentales y el orden metodológico asociados a un análisis de estabilidad.

Estados estables o estacionarios

Los estados estacionarios de un sistema dinámico, representan las soluciones invariantes en el tiempo del sistema dinámico representado por (1) y deben cumplir que:

$$\frac{dx}{dt} = \mathbf{0} \quad \frac{dx}{dt} = \mathbf{0} \quad \frac{dx}{dt} = \mathbf{0} \quad \frac{dx}{dt} = \mathbf{0} \quad (2)$$

Siendo (2) un sistema de ecuaciones algebraico, generalmente de carácter no lineal. Estos puntos de estado estacionario, t les llama puntos fijos, puntos de equilibrio, o puntos críticos (Ajbar *et al.*, 2012; Strogatz, 1994). Las soluciones de estado estacionario (\mathbf{x}_s) satisfacen todo el conjunto de ecuaciones algebraicas, donde los parámetros de bifurcación también tienen valores fijos determinados.

En los procesos fermentativos, los modelos se caracterizan por ser altamente no lineales y en consecuencia conducirán a soluciones (estados estacionarios) que pueden ser o no estables. Esta situación genera la necesidad de analizar cuáles de las soluciones conducen a regiones de estabilidad (Paz *et al.*, 2011a; Seydel 2010; Strogatz, 1994). Resolviendo todas las ecuaciones de carácter no lineal (2), se obtienen las concentraciones que satisfacen la condición, siendo estas los valores de estado estacionario de los modelos.

Para obtener los valores de estado estacionario se emplea el software MATLAB®. Se desarrolló una rutina de cálculo que permite la solución simultánea de las ecuaciones diferenciales para el modelo cinético elegido (3-10), solucionando los balances en estado no estacionario y al mismo tiempo, permite obtener las gráficas del comportamiento dinámico.

$$\frac{dX}{dt} = \mu * X + D * (Xf - X) \quad (3)$$

$$\frac{dS}{dt} = -Rs + D * (Sf - S) \quad (4)$$

$$\frac{dCaa}{dt} = Raa + D * (Caaf - Caa) \quad (5)$$

$$\frac{dCba}{dt} = Rba + D * (Cbaf - Cba) \quad (6)$$

$$\frac{dCb}{dt} = Rb + D * (Cbf - Cb) \quad (7)$$

$$\frac{dCa}{dt} = Ra + D * (Caf - Ca) \quad (8)$$

$$\frac{dCe}{dt} = Re + D * (Cef - Ce) \quad (9)$$

$$\frac{dH}{dt} = \frac{\left(\frac{(Raa+D*(Caaf-Caa))*\left(\frac{1}{SS.05}\right)}{\left(1+\frac{H}{kdaa}\right)} \right) + \left(\frac{(Rba+D*(Cbaf-Cba))*\left(\frac{1}{SS.11}\right)}{\left(1+\frac{H}{kdba}\right)} \right)}{\left(1+\frac{\left(\frac{Caa}{SS.05}\right)}{\left(kdaa*\left(1+\frac{H}{kdaa}\right)^2\right)}\right) + \left(\frac{\left(\frac{Cba}{SS.11}\right)}{\left(kdba*\left(1+\frac{H}{kdba}\right)^2\right)}\right) + \frac{(M1+M2)*\left(1+kds*\left(\frac{kds}{H^2}\right)}{kds*\left(1+\frac{H}{kds}\right)^2}\right)} + D * (Hf - H) \quad (10)$$

Donde

D Velocidad de Dilución, h^{-1}

Sf Concentración Sustrato Alimentación, $\frac{g}{L}$

Xf Concentración Biomasa Alimentación, $\frac{g}{L}$

$Caaf$ Concentración Ácido Acético Alimentación, $\frac{g}{L}$

$Cbaf$ Concentración Ácido Butírico Alimentación, $\frac{g}{L}$

Caf Concentración Acetona Alimentación, $\frac{g}{L}$

Cbf Concentración Butanol Alimentación, $\frac{g}{L}$

Cef Concentración Etanol Alimentación, $\frac{g}{L}$

Hf Iones Hidrógeno Alimentación

S Concentración Sustrato en el biorreactor, $\frac{g}{L}$

X Concentración Biomasa en el biorreactor, $\frac{g}{L}$

Caa Concentración Ácido Acético en el biorreactor, $\frac{g}{L}$

Cba Concentración Ácido Butírico en el biorreactor, $\frac{g}{L}$

Ca Concentración Acetona en el biorreactor, $\frac{g}{L}$

Cbf Concentración Butanol en el biorreactor, $\frac{g}{L}$

Cef Concentración Etanol en el biorreactor, $\frac{g}{L}$

Hf Iones Hidrógeno en el biorreactor

Estabilidad local de estados estacionarios

Para la operación de un proceso se hace necesario tener una medida cuantitativa de su estabilidad. Este tipo de información puede ser obtenida mediante la linealización alrededor de un punto fijo, correspondiente a los estados o valores estacionarios del proceso (Seydel 2010; Strogatz, 1994). De esa manera, la estabilidad local del estado estacionario (\mathbf{x}_s) puede determinarse estudiando las propiedades de la Ecuación (1), cuando esta se linealiza alrededor de \mathbf{x}_s . Para este propósito se desarrolla la matriz jacobiana. La estabilidad del equilibrio es caracterizada por los eigenvalores $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_n$ de esta matriz. Para el caso en estudio, como la matriz jacobiana \mathbf{J} está constituida por n eigenvectores linealmente independientes $\mathbf{w}^k, k = 1, \dots, n$, la estabilidad local de la Ec. (1) puede ser concluida fácilmente. De acuerdo con el resultado atribuido a Liapunov, las partes reales de los eigenvalores de la matriz jacobiana \mathbf{J} , evaluada en la solución estacionaria (\mathbf{x}_s), determinan su estabilidad: si la parte real de los eigenvalores son menores que cero, el estado estacionario evaluado es considerado estable, de lo contrario el estado estacionario es inestable.

Diagrama de bifurcación

Después de contar con valores escalares del vector \mathbf{x} es posible representar gráficamente las soluciones de la ecuación (1) en un diagrama que muestra a $[\mathbf{x}]$ en fun-

ción de λ . El objetivo de la teoría de la bifurcación es caracterizar cualitativamente los cambios en el comportamiento dinámico de los sistemas no lineales mientras los parámetros principales o elegidos cambian.

Los diagramas de bifurcación son de gran utilidad. Las soluciones continuas se denominan ramas. Las ramas son curvas unidimensionales, cuando varían los valores de λ , el número de soluciones y en consecuencia, de ramas, pueden cambiar. Nuevas ramas pueden surgir, pueden terminar o pueden cruzarse con otras en ciertos puntos llamados puntos de bifurcación de estado estable (Ajbar et al., 2012).

Los diagramas de bifurcación se realizaron con ayuda del software Matcont®, el cual permite hacer análisis de continuidad y determinar las bifurcaciones posibles del sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias planteado (Dhooge et al., 2006).

Puntos de bifurcación de estado estable

Los puntos comunes encontrados en diagramas de bifurcación se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Puntos de bifurcación comunes en sistemas continuos

Punto de bifurcación	Principales características
Punto de inflexión Bifurcación Fold Punto límite estacionario Nodo de silla (SLP)	En este punto 2 ramas de una solución de estado estacionario se unen formando ' tangentes limitantes '. Dos ramas nacen o se anulan entre sí. Localmente no hay soluciones a un lado del punto y al otro lado hay dos soluciones.
Punto de bifurcación estacionario (SPB) o (BP)	En este punto dos y solo dos curvas con diferentes tangentes se cruzan entre sí.
Punto cúspide estacionario (SCP)	Es el punto de contacto entre dos curvas de estado estacionario con la misma tangente.
Punto Hopf (HP)	Asociado con la aparición de dos eigenvalores complejos conjugados, con $\text{Re}(\mu) > 0$. Solo puede aparecer en sistemas de dimensión 2 o más.

Adaptado de: Ajbar et al. (2012) y Seydel (2010).

Resultados y discusión

Determinación y selección de los puntos estacionarios

La solución del modelo cinético descrito en la sección 2.3.1, bajo condiciones de estado estacionario se muestra en la tabla 2. Del mismo modo, en la tabla 3 se muestran las tres condiciones iniciales con las que se obtienen las mayores concentraciones de butanol en estado

estacionario (E.E) para cada modelo cinético. Además, se incluye el estado estacionario de lavado, donde se produce arrastre de la biomasa al flujo de salida del biorreactor y no se obtienen productos, los cuales serán necesarios para acotar el análisis de estabilidad.

Para este caso el transcurso de la fermentación se favorece a dilución y concentración de sustrato de 0,03 [h^{-1}] y 40 [g/L], respectivamente. Con respecto a la

Tabla 2. Condiciones iniciales y concentración de butanol en estado estacionario

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

Tabla 3. Valores de estado estacionario obtenidos para cada una de las variables evaluadas

Variable	E.E	Lavado
X [g/L]	5,3080	0
S [g/L]	0,0882	40
Caa[g/L]	2,1996	0
Cba[g/L]	2,4522	0
Ca [g/L]	4,6642	0
Cb [g/L]	10,6312	0
Ce [g/L]	0,3254	0
H	1,0001E-07	1,0001E-07
pH	6,9999	6,9999

condición de lavado, la velocidad de dilución crítica de 0,54 h^{-1} corresponde al rango (0,4-0,7 h^{-1}) de los valores obtenidos para este tipo de sistemas (Bai, 2007; Godin *et al.*, 1990; Mayank *et al.*, 2012; Mahecha-Botero *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2001).

Análisis de estabilidad y diagramas de bifurcación

Se eligieron los diagramas y resultados más representativos, correspondientes a aquellos cuyo parámetro de bifurcación es la tasa de dilución (D). En la tabla 2 (sección 3.1) se resumen los valores necesarios para iniciar este análisis. En este caso en particular el interés es de determinar cuántos y cuáles son los estados

estables obtenibles cuando se varía la velocidad de dilución y se mantiene constante la concentración de sustrato de alimentación en 40 g/L. En la Figura 2 se presentan los diagramas de bifurcación.

En general, se puede observar que los diagramas de bifurcación exhiben un comportamiento similar y se obtienen bifurcaciones comunes para sistemas continuos (Seydel, 2010). En efecto las figuras tienen dos tipos de puntos: puntos Hopf (HP) y puntos de bifurcación (SBP). Las gráficas fueron divididas en 5 regiones para realizar el análisis, donde las líneas continuas simbolizan las ramas estables del sistema, y las punteadas o discontinuas las inestables. De igual modo, se analizará con base en 4 diagramas de bifurcación representativos de todo el sistema: (i) biomasa, (ii) sustrato, (iii) butanol para el caso de los solventes y, (iv) ácido butírico para el caso de los ácidos.

La primera región está limitada por velocidades de dilución $D < 0,078 [h^{-1}]$. En esta zona existe multiplicidad de soluciones para la velocidad de dilución, constituidas por dos ramas, una estable y la otra inestable. En la estable, las concentraciones máximas de butanol son mayores a 10 g/L. Para esta misma región, la biomasa alcanza concentraciones máximas del orden de 9 g/L.

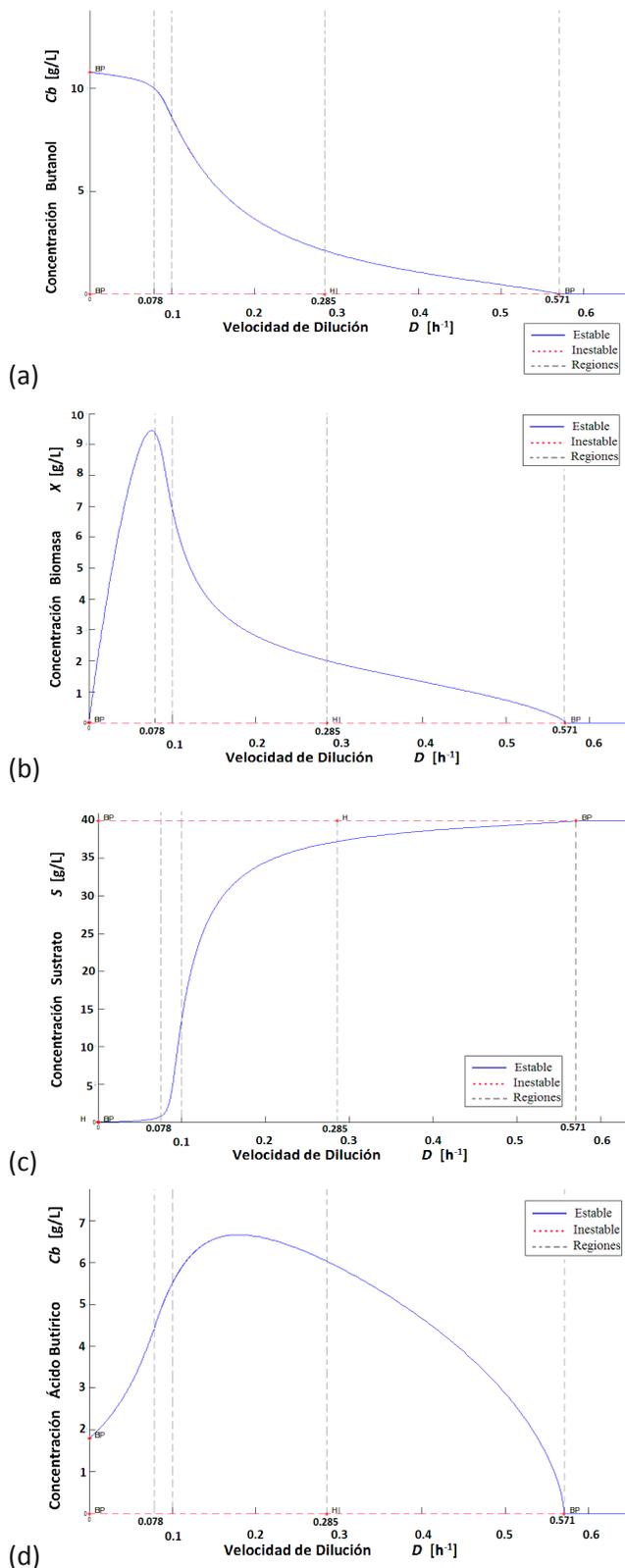


Figura 2. Diagramas de bifurcación para biorreactor empleando como parámetro la velocidad de dilución (a) concentración de biomasa, (b) concentración de butanol, (c) concentración de sustrato y (d) concentración de ácido butírico

Por ejemplo para una concentración de butanol igual a 10,02 g/L, la concentración de biomasa es de 9,412 g/L. Este comportamiento corresponde a los resultados reportados en estudios de biorreactores continuos (Godin et al, 1990). Así, en la mayoría de los casos y con la cepa *Clostridium* cuando se está en un biorreactor de células libres se opera a bajas diluciones ($D \leq 0,1$) alcanzando las mejores productividades de solventes. Análogamente, el sustrato alcanza conversiones mayores al 90%.

En contraste, en la segunda región $0,078 \leq D \leq 0,1$ se puede observar una disminución del 20% en la concentración de butanol para un $\Delta D = 0,022$. Por otra parte, se aumenta la concentración de ácidos en el medio, en un porcentaje similar al del producto $C_{ba}=5,509$ g/L, lo que afecta además el crecimiento de la biomasa, donde para estas mismas condiciones corresponde a $X=6,926$ g/L. Además la conversión del sustrato disminuye a un 67% aproximadamente. En la rama inestable, todas las concentraciones son nulas, a excepción de la concentración de sustrato que corresponde al mismo valor de alimentación. Esta rama describe el comportamiento del sistema cuando se encuentra en condición de lavado.

En la tercera región, para velocidades de dilución comprendidas entre $0,1 < D < 0,285$; el comportamiento de la rama estable e inestable siguen la tendencia encontrada en la anterior región analizada. No obstante, la rama inestable experimenta la aparición de un punto Hopf. Este punto confirma su inestabilidad y permite pensar que para este valor de dilución, aunque sea inestable, podrían existir soluciones periódicas o ciclos límites que deben considerarse en un estudio de inestabilidad más profundo. Para este punto, todos los valores de la parte real de los eigenvalores tienen el mismo valor que la tasa de dilución ($\mu_{1-8} = \pm 0,285433$) y todos son positivos menos el primero.

Finalmente, en la última región $0,285 < D < 0,571$; la rama estable disminuye hasta llegar a cero, a excepción de la del sustrato. Con el aumento de la velocidad de dilución, se llega al valor de dilución crítica ($D_c = 0,571$) para el sistema y al mismo tiempo a un punto de bifurcación. En este punto, convergen las dos ramas que se analizaron a lo largo de las 4 regiones, donde una desaparece (la rama estable) y la otra pasa a ser estable, describiendo de nuevo el lavado pero en esta ocasión, como una rama estable del sistema.

Conclusiones

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

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

Finalmente, la zona de estados estables encontrada concuerda con los valores experimentales reportados por varios autores.

Referencias

- Ajbar, A., & Alhumaizi, K. (2011). *Dynamics of the chemostat: a bifurcation theory approach*. CRC Press.
- Bai, F. W. (2007). Process oscillations in continuous ethanol fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis doctoral. Universidad de Waterloo. Waterloo. 218 p.
- Dhooge, A., Govaerts, W., Y. A., K., Mestrom, W., y Riet, A. M., a. S. B. Matcont and C. L. Matcont. (2006): *Continuation toolboxes in Matlab*. University Gent, Bélgica.
- Donaldson, G. K., Huang, L. L., Maggio-Hall, L. A., Nagarajan, V., Nakamura, C. E., Suh, W. (2007). *Fermentative production of four carbon alcohols*. International Patent WO2007/041269.
- Fradkov, A. L., Miroshnik, I. V., & Nikiforov, V. O. (1999). *Nonlinear and adaptive control of complex systems* (Vol. 491). Springer.
- Garhyan, P., Elnashaie, S. S. E. H., Al-Haddad, S. M., Ibrahim, G., & Elshishini, S. S. (2003). Exploration and exploitation of bifurcation/chaotic behavior of a continuous fermentor for the production of ethanol. *Chemical Engineering Science*, 58(8), 1479-1496.
- Godin, C., & Engasser, J. M. (1990). Two-stage continuous fermentation of *Clostridium acetobutylicum*: effects of pH and dilution rate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 269-273.
- Jang, Y.-S., Malaviya, A., Cho C., Lee J., Lee S. (2012). Butanol production from renewable biomass by clostridia. *Bioresource Technology* 123, 653-663.
- Kamiński, W., Tomczak, E., Górak, A. (2011). Biobutanol-Production and purification methods. *Ecological Chemistry and Engineering*. 18(1), 31-37.
- Kirschner M. (2006). n-Butanol. Chemical Market Reporter January 30-February 5, ABI/INFORM Global, p. 42.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., Jung, K. S. (2008). Fermentative Butanol Production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*. 101(2), 209-28.
- Mahecha-Botero, A., Garhyan, P., Elnashaie, S.S.E.H. (2005). Bifurcation, Stabilization, and Ethanol Productivity Enhancement for a Membrane Fermentor. *Mathematical and Computer Modelling*. 41, 391-406.
- Patakova, P., Linhova, M., Rychtera, M., Paulova, L., & Melzoch, K. (2013). Novel and neglected issues of acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by clostridia: *Clostridium* metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. *Biotechnology Advances*, 31(1), 58-67.
- Paz I., Cardona C. (2011a). Influencia de las regiones de estabilidad del bioreactor en la producción eficiente de alcohol carburante. *Revista Colombiana de Biotecnología* 8(1), 23-32.
- Paz, I., Cardona C. (2011b) Importance of stability study of continuous systems for ethanol production. *Journal of Biotechnology* 151, 43-55.
- Seydel, R. (2010). *Practical Bifurcation and Stability Analysis*. Third Edition. Springer, New York.
- Stockar, U., Valentinotti, S., Marison, I., Cannizzaro, C., Herwig, C. (2003). Know-how and know-why in biochemical engineering. *Biotechnology Advances* 21, 417-430.

- Strogatz, S. H. (1996). *Nonlinear dynamics and chaos, 1994. Reading: Perseus Books.*
- Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2010). Advances in butanol production by clostridia. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (Microbiology Book Series, number# 2). FORMATEX, Spain, 1383-1394.*
- Yang, X. (1990). A novel extractive fermentation for the production of Acetone-butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *PurdueUniversity.*
- Yang, X., Tsao G. (1994). Mathematical modeling of inhibition kinetics in acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Progress 10(5), 532-538.*
- Zhang, Y., & Henson, M. A. (2001). Bifurcation analysis of continuous biochemical reactor models. *Biotechnology Progress, 17(4), 647-660.*