

## ESTUDIO DE SIMULACION DE UN FERMENTADOR CONTINUO USANDO CELULAS INMOVILIZADAS

A. Palomino-Infante, R. Erazo-Erazo\*

Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química  
Departamento de Análisis y Diseño de Procesos  
Av. Venezuela s/n - Lima - Perú

**Abstract:** This work pursues the goal of simulating a bioreactor to produce ethanol from glucose using immobilized cells. First, we have evaluated statistically the proposed kinetics models, from which we chose the Aiba, Shoda and Nagathani model [18], as the most appropriate model. Secondly, simulated fermentation values has been validated comparing the results with experimental data produced by Gencer and Mutharasan [17]. Finally, the performance of ethanol production was simulated considering a PFR type bioreactor. The solution of mass balances was done using Runge Kutta IV subroutine in Mathcad 7P. The simulated values show good agreement with experimental results of Gencer and Mutharasan.

**Key words:** models, kinetics, bioreactor, simulation, immobilized cells.

**Resumen:** Este trabajo tiene como objeto simular un bioreactor para producir etanol a partir de glucosa usando células inmovilizadas. Primeramente, hemos procedido a evaluar estadísticamente los modelos cinéticos propuestos, de donde hemos seleccionado el modelo de Aiba, Shoda y Nagathani [18], como el modelo más apropiado. En segundo término, los valores de la fermentación simulada han sido validados comparando los resultados con los datos experimentales de Gencer y Mutharasan [17]. Finalmente, el rendimiento de la producción de etanol fue simulado considerando un bioreactor del tipo PFR. Las solución de las ecuaciones de balance de materia fue hecho usando el algoritmo de Runge Kutta IV en Mathcad 7P. La comparación de los valores simulados con el experimental de Gencer y Mutharasan muestra acuerdo apropiado.

**Palabras Clave:** Modelo, cinética, bioreactor, simulación, células inmovilizadas.

### INTRODUCCION

La fermentación continua de glucosa empleando un bioreactor empacado con células inmovilizadas, es una alternativa al proceso batch y continuo en sistemas de mezcla completa. En este sentido, el propósito del presente estudio es simular un bioreactor continuo para la fermentación de glucosa a etanol en un lecho de células inmovilizadas de biocatalizador, evaluando la influencia de las variables más importantes del proceso, dentro de la estructura jerárquica que gobierna el proceso de fermentación. La evaluación de modelos cinéticos bioquímicos constituye por otra parte un ensayo que nos permita seleccionar el modelo a usar en el estudio. En general, podemos decir que el costo de los bioreactores representa una fracción apreciable en el costo total de los equipos en los procesos de fermentación, de donde una fermentación rápida conduce a la reducción de costos. En efecto, esto se puede lograr

mediante una alta concentración de células en el medio, lo cual entre otras técnicas, es posible mediante la inmovilización de las células.

### CINETICA

Los modelos cinéticos para el crecimiento de microorganismos, formación de productos de biosíntesis y utilización de sustratos son diferentes de los modelos existentes en la cinética química. El rasgo distintivo de estos modelos es el uso de la concentración de la población microbiana como un parámetro fundamental del modelo. Modelos tales como «crecimiento y destrucción» o sus modificaciones, consideran la población microbiana representada por un número finito de clases, cada uno de los cuales está caracterizada por células de una edad fisiológica simple [1]. Vinarov y colaboradores [2] demostraron que incluso la transición del crecimiento de microorganismos en un aparato de mezcla completa, totalmente idealizado a las condicio-

nes hidrodinámicas reales de un bioreactor, complica sustancialmente la descripción matemática del proceso. Un gran número de modelos matemáticos para la cinética del crecimiento de la población microbiana se conocen en la actualidad [3].

El modelo cinético global para el crecimiento de la población microbiana se formula también tomando en consideración los mecanismos fundamentales que gobiernan la influencia de las condiciones físicas y químicas del medio. Así, Nikolaev y Sokolov [4], deducen un modelo cinético para la velocidad específica de utilización de sustrato sujetos a restricciones de inhibición competitiva y no competitiva. Otros modelos cinéticos para la fermentación [5], incluyen la reacción del fermento con el oxígeno, además de las influencias de la alimentación del sustrato sobre la velocidad de crecimiento de los microorganismos y la inhibición por productos de metabolismo.

Otras aproximaciones usando los principales sistemas en el desarrollo de los modelos cinéticos [6-10] consideran la aplicación del concepto estructura-función del sistema. La medida de la velocidad de consumo de oxígeno por los microorganismos para diferentes concentraciones de sustrato han dado lugar a otros modelos cinéticos, los que toman en cuenta altos niveles de inhibición sobre el crecimiento microbiano.

Bajpai y colaboradores [11], Thompson y Kramer [12] proponen relaciones para la velocidad específica de crecimiento microbiano en función de la concentración de sustrato con diferentes parámetros, los que se pueden relacionar con la forma del modelo clásico de Monod. Las curvas de crecimiento pueden también ser ajustados usando la ecuación de Gompertz, tal como lo describen Ciurlizza y Delgado [13]. Para casos de células inmovilizadas, Shiraishi [14] postula una expresión modificada de Michaelis-Menten que induce al uso de un factor de efectividad, el cual puede ser extendido al caso de células inmovilizadas en cuyo caso la ecuación de Monod es aplicable [15,16].

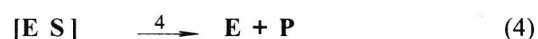
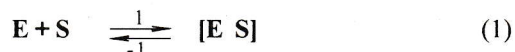
## ANÁLISIS DE LA CINÉTICA

Haremos uso de técnicas estándares para la interpretación de los datos cinéticos y seleccionar el modelo apropiado para su empleo en la simulación.

Para este efecto se utilizan los datos extraídos del trabajo de Gencer y Mutharasan [17],

quienes investigaron la cinética de producción de etanol usando glucosa en un lecho de células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL Y 132) usando partículas de madera de Abedul en un bioreactor tubular de volumen constante.

Postulamos aquí que la cinética intrínseca está gobernada por un mecanismo de seis pasos elementales en la cual la etapa final se considera como el paso controlante.



Formulando la dinámica de la reacción a partir del mecanismo propuesto, aproximando al estado estacionario la velocidad de formación de las especies intermedias, se tiene:

$$r = \frac{\mu_m S}{S + K_s + S^2/K_m} \quad (5)$$

En la ecuación (5) observamos que  $K_m$  es la constante de inhibición, un valor alto conduce a la conocida ecuación de Monod, con  $r = u$

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (6)$$

Sobre las ecuaciones (5) y (6) se han hecho varias modificaciones. Consideramos el modelo de Aiba, Shoda y Nagathani [18], el cual tiene una forma análoga a los modelos cinéticos químicos que considera la fracción de colisiones moleculares dado por una exponencial, como la limitación cinética, la cual establece que:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \text{EXP}(-K_1 P) \quad (7)$$

$$v = v_m \frac{S}{K_s' + S} \text{EXP}(-K_2 P) \quad (8)$$

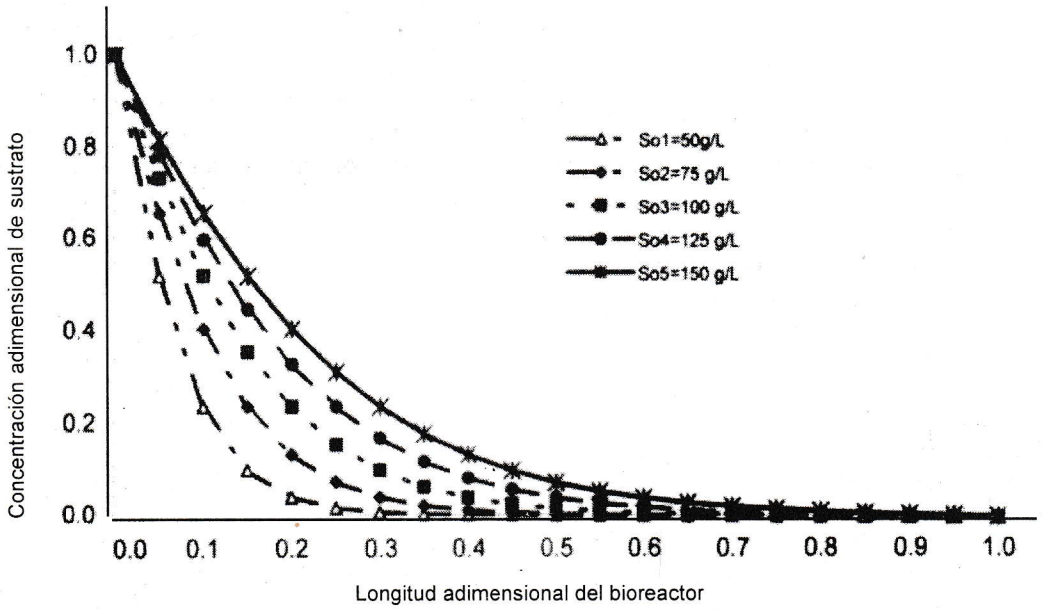


Figura 1.- Perfil de concentraciones adimensionales para  $V_o = 75 \text{ mL/h}$

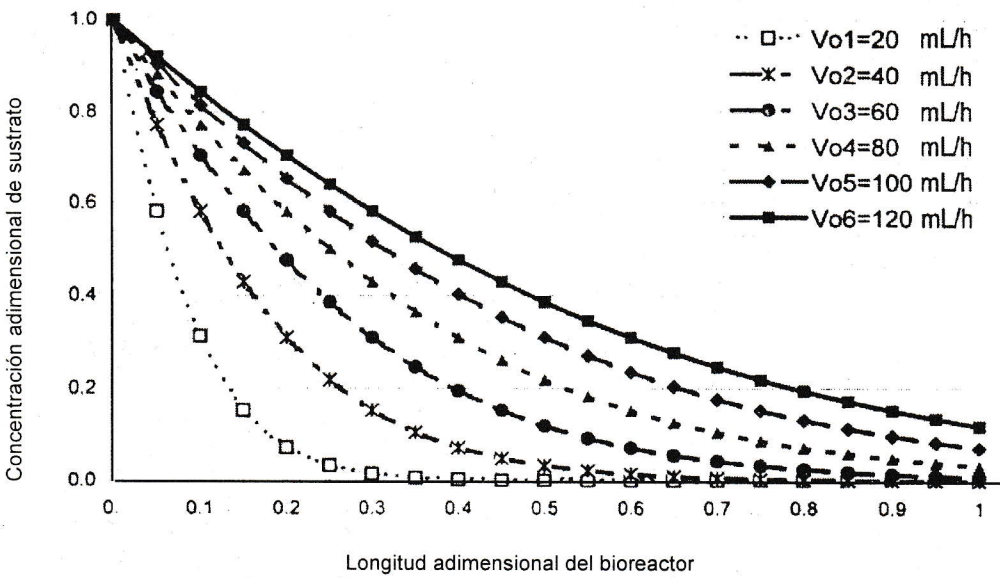


Figura 2.- Perfil de concentracion de sustrato vs. longitud del bioreactor

**Tabla 1.** Resultados de análisis cinético

Casos	Coef. Correlación	Parámetro	Valor Parámetros	Error Exptl.
CASO 1	0.990127	ao bo	0.086934 42.412156	0.15167 1.733250
CASO 2	0.998728	ao bo	5.053519 0.014067	0.004984 0.000205
CASO 3	0.992819	ao bo	5.11435 0.016	0.013557 0.000647
CASO 3	1000000	ao bo	0.365337 0.0167	4.72E-17 2.25E-18

**Tabla 2.** Datos de entrada para la simulación (\*)

$K_1 = 0.016 \text{ L/g}$ $K_2 = 0.0167 \text{ L/g}$ $K_s = 0.86 \text{ g/L}$ $K'_s = 0.67 \text{ Ks. g/L}$	$\mu_{\max} = 0.03-0.24 \text{ h}^{-1}$ $v_{\max} = 1.4 \text{ h}^{-1}$ $X = 21.6 \text{ g/L}$ $Y_{x/s} = 0.035$	$S_o = \text{variable (g/L)}$ $V_o = \text{variable, mL/h}$ $\text{Area}_t = \pi\phi^2/4$ $\phi = 2.5 \text{ cm.}$	$V = V_o/\text{Area, cm/h}$ $T = 303 \text{ K}$ $\varepsilon = 0.35-0.40$
--	---	---	---

(\*) Obtenido de referencia [17]

Aplicando este modelo a los datos del bioreactor tubular, las ecuaciones anteriores se pueden escribir:

$$r = - \frac{\mu_{\max}}{E Y_{x/s}} \frac{S}{K_s + S} X \text{ EXP}(-K_1 P) \quad (9)$$

$$r = \frac{v_{\max}}{E} \frac{S}{K'_s + S} X \text{ EXP}(-K_2 P) \quad (10)$$

Para ganar generalidad en nuestro análisis, estudiamos tres restricciones básicas:

1. Cuando el producto no tiene efecto inhibitorio:

$$\frac{1}{-r_s} = a_0 + b_0 \frac{1}{S} \quad (11)$$

2. Cuando  $K_s$  y  $K'_s$  son significativamente mayores que  $S$  y las exponenciales tienden a uno.

$$\ln S = a_0 + b_0 (t) \quad (12)$$

3. Cuando la concentración de sustrato es significativamente mayor que  $K_s$ :

$$\ln(-r_s) = a_0 + b_0 (P) \quad (13)$$

La solución de las ecuaciones anteriores se realiza con los datos de Gencer y Mutharasan aplicando los métodos de la estadística cuyos resultados se muestran en la **tabla 1**.

Estos resultados muestran que el modelo de Aiba, Shoda y Nagathani ofrecen un adecuado ajuste de los datos y tiene mayor consistencia física que los modelos simplificados, por involucrar efectos inhibitorios debido al producto; los cuales están demostrados por el análisis de los errores experimentales dados en la **tabla 1**.

## SIMULACION

Se simula el comportamiento de un bioreactor de lecho empacado con células inmovilizadas, para producir etanol a partir de la fermentación de la glucosa. El bioreactor que simulamos es un sistema reaccionante pseudohomogéneo, isotérmico cuya hidrodinámica se asume descrita adecuadamente mediante flujo tipo tapón. El balance de materia para las especies involucradas; células libres, sustrato y producto en función de la longitud del bioreactor y en forma adimensional, son:

$$\frac{df_1}{dy} = Da \frac{f_2}{a + f_2} \text{EXP}(-K_m f_3) \quad (14)$$

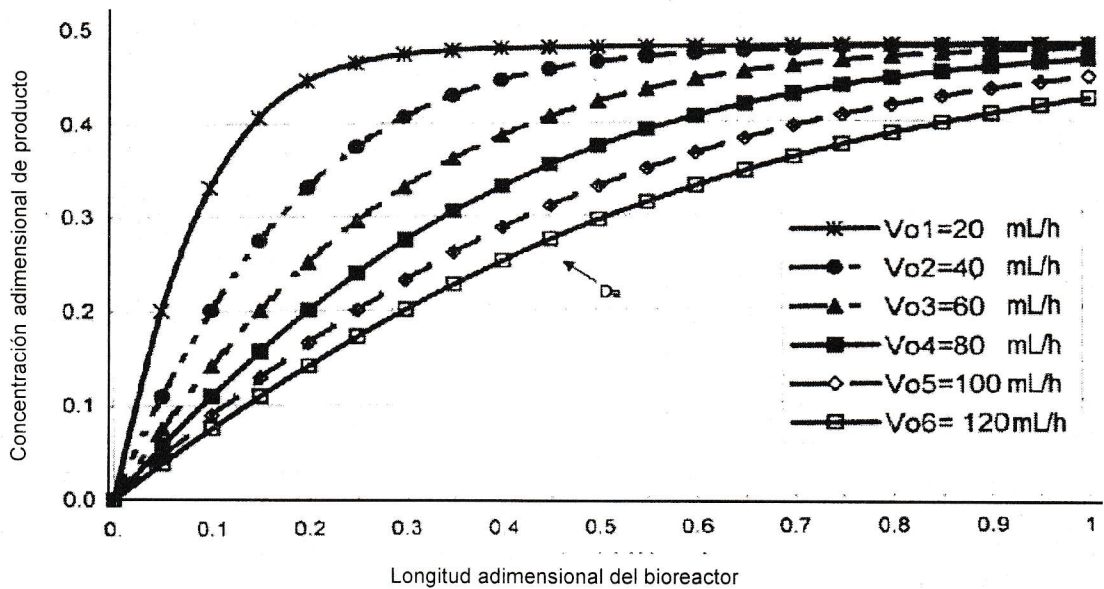


Figura 3.- Perfil de concentración de producto vs. longitud del bioreactor

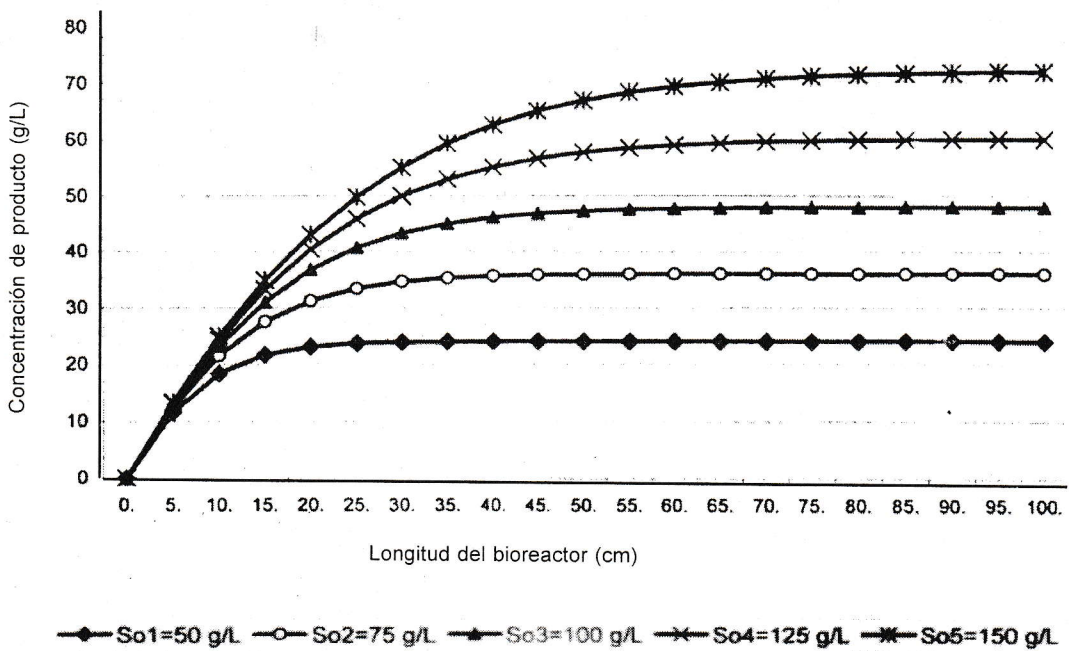


Figura 4.- Perfil de concentración de productos a diferentes concentraciones iniciales de sustrato y  $V_o=125$  mL/h

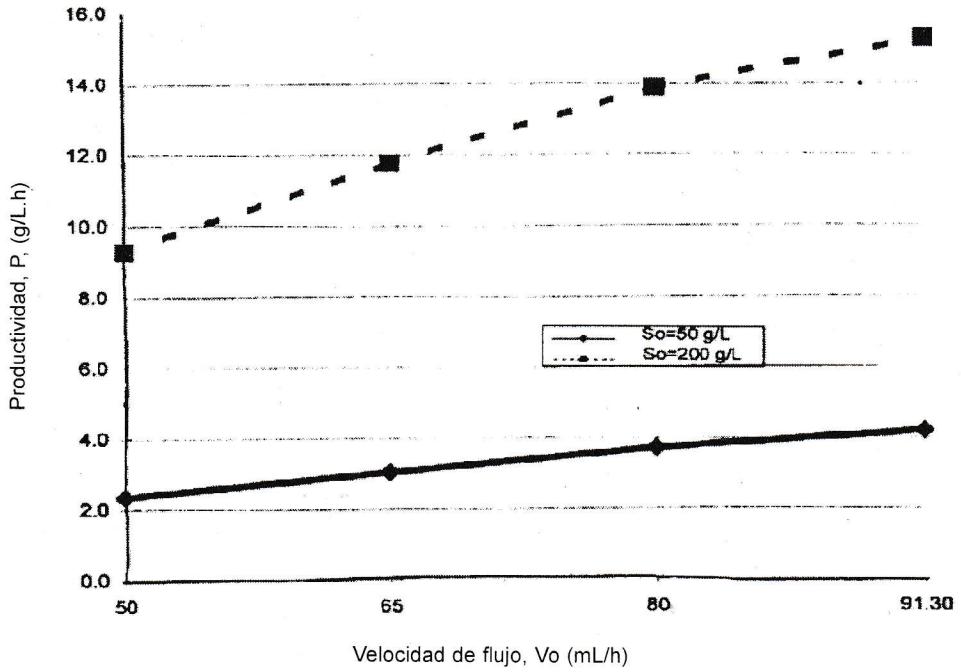


Figura 5.- Productividad de etanol respecto al flujo ( Vo)

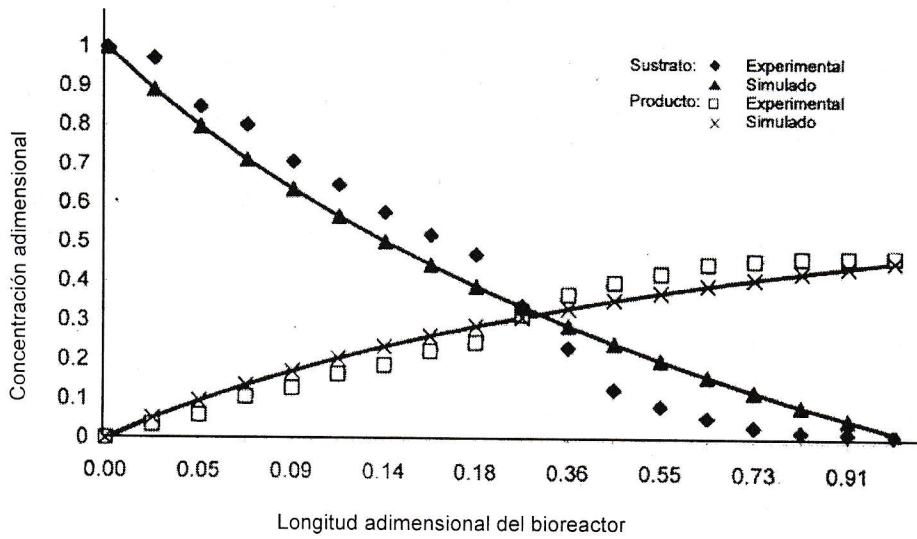


Figura 6.- Gráfica de valores experimentales y simulados

$$\frac{df_2}{dy} = -B \text{ Da} \frac{f_2}{a_1 + f_2} \text{EXP}(-K_m f_3) \quad (15)$$

$$\frac{df_3}{dy} = \text{Dap} \frac{f_2}{ap + f_2} \text{EXP}(-K_n f_3) \quad (16)$$

Con las condiciones iniciales:

$$\text{para } y = 0, \quad f_1 = 0, \quad f_2 = 1, \quad f_3 = 0 \quad (17)$$

donde:

$$y = z/L$$

$$f = C/S$$

$$f = S/S$$

$$f = P/S$$

$$B = 1/Y$$

El modelo mostrado viene a ser un sistema de ecuaciones diferenciadas de valor inicial, cuya solución numérica nos permite simular el comportamiento del bioreactor bajo diferentes condiciones de operación. La solución se realiza empleando el algoritmo de Runge Kutta IV, implementado en Mathcad 7P. En la **tabla 2** se muestran los datos de entrada para la simulación tomados de referencia [17].

La longitud del bioreactor y el tiempo de residencia son parámetros usados comúnmente para mostrar los perfiles de concentración, de este modo se puede distinguir el rendimiento aparente del etanol a lo largo del bioreactor. En la **figura 1** se presentan los resultados de la simulación numérica para diferentes concentraciones de sustrato alimentado y distintos valores de número de Damkohler (Da), observándose que la velocidad de reacción aumenta al incrementar los valores de Da. Asimismo, en la **figura 2** se observan los mismos efectos mencionados en el resultado anterior cuando se simula para diferentes velocidades de flujo de alimentación. En la **figura 3** podemos identificar niveles de rendimiento de producto a sustrato en el orden del 47%,  $Y_{p/s} = 0,47$ , el cual puede ser tomado como un criterio conservador en concordancia con los argumentos teóricos. En la **figura 4** podemos observar la variación de la

concentración de productos a lo largo del bioreactor, es decir, fijado la velocidad de flujo, la concentración de salida es directamente proporcional a la concentración de la alimentación de sustrato. En la **figura 5** se muestra la productividad del sistema basado en el líquido retirado que está en función de la velocidad de flujo y la velocidad superficial. La productividad se incrementa con las concentraciones de entrada y con la velocidad de flujo, esto es consistente con los trabajos reportados en la referencia [19]. En la **figura 6** se muestran los perfiles de concentración comparativos entre los valores experimentales y los simulados, encontrando que el modelo interpreta satisfactoriamente el comportamiento del sistema reaccionante. Se debe remarcar que el análisis cinético nos ha permitido encontrar explicación adecuada para el uso de los parámetros cinéticos de acuerdo a la naturaleza propia del sistema.

#### LISTA DE SIMBOLOS

- E: Concentración de enzima
- ES: Concentración de enzima - sustrato
- S: Concentración de sustrato
- P: Concentración de producto
- X: Concentración de células
- $\mu$ : Velocidad específica de crecimiento celular
- $\mu_m$ : Velocidad máxima de crecimiento celular
- v: Velocidad de formación de producto
- $v_m$ : Velocidad máxima de formación de producto
- E: Fracción vacía de la columna empacada
- $Y_{x/s}$ : Factor de rendimiento celular
- $r_s$ : Velocidad de consumo de glucosa
- $r_p$ : Velocidad de formación de etanol
- Da: Número de Damkohler referido a sustrato
- Dap: Número de Damkohler referido a producto
- B: Factor de rendimiento ( $1/Y_{x/s}$ )
- y: Longitud adimensional del bioreactor
- Ks: Constante de Saturación
- $K_1$ : Constante de inhibición de etanol
- $K_2$ : Constante de inhibición de etanol
- PFR: Reactor de flujo tipo tapón
- L: Longitud del Bioreactor

**Agradecimiento:** El segundo de los autores, desea expresar su reconocimiento al Dr. Joaquín Lombira Echevarría, docente de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su paciente y valiosa revisión y sugerencias sobre el tema.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Chotani G. y Constantinides A., Immobilized Cell Cross - Flow Reactor. *Biotech and Bioeng.* **26**, 217 (1984).
- [2] Vinarov, A. Kafarov, V., Gordeev, L. *Microbiol Prom.* N°5, (1973).
- [3] Schuler M., Aris, R., Tsuchiya, H., *J. Theor. Biol.* **35**, 67 (1972).
- [4] Nikolaev, P., Sokolov, D.P., *Biochem and Microbiol*, 502 (1967).
- [5] Lortie, R., Thomas, D. Heterogeneous One-Dimensional Model for Fixed Bed Enzyme Reactors. *Biotech and Bioeng.* **28**, 1256 (1986).
- [6] Hahn - Hagerdal, B. An Enzyme Coimmobilized with a Microorganism the conversion of cellobiose to Ethanol using B-Glucosidase and *Saccharomyces Cerevisiae* in Calcium Alginate Gels. *Biotech and Bioeng.* **26**, 771(1984).
- [7] Navarro, A., Rubio, M., Callieri, D. Production of Ethanol by Yeasts Immobilized in Pectin, *Eur. Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, **17**, 148 (1983).
- [8] Fernández N., Gavalas, G. Solution of Equations Describing Fluid-Solid Reactions in Packed Columns. *AIChE Journal.*, **41**(12), 254(1995).
- [9] Sundaresan, S., Amundson, N., Aris, R. Observations on Fixed-Bed Dispersion Models. The Role of the Interstitial Fluid. *AIChE Journal*, **26**, 529. (1980).
- [10] Hiby, J. Longitudinal and Transverse Mixing During Single-Phase Flow Through Granular Beds, Interactions Between Fluids and Particles, pp. 312, Institute Chemical Engineers, London, England (1963).
- [11] Bajpai P. and Margaritis A. Continuous Ethanol Production from Jerusalem Artichoke stalks using immobilized cell of *Kluyveromyces Marxianus*. *Process y Biochemistry*, June (1986).
- [12] Thompson, M., Kramer, M. *AIChE Journal*, **40** (8), 1328 (1994).
- [13] Ciurlizza, G., Delgado, J., *Chem. Eng.* 115 (1997).
- [14] Shiraishi, F. *Int. Chem. Eng.*, 140 (1992).
- [15] Fish, N., Fox, R. y Thornhill. Computer Applications in Fermentation Technology, Modelling and Control of Biotechnological Processes. *Soc of Chem. Ind. USA* (1989).
- [16] Falch, E., Gaden, E., *Biotech and Bioeng.* **11**, 927(1965).
- [17] Gencer, M., Mutharasan, R. *Biotech and Bioeng.*, 2243 (1983).
- [18] Aiba, S., Shoda, M., Nagathani, M. *Biotech and Bioeng.* **10**, 845(1968).
- [19] *AIChE Modular Instruction-Series E. Kinetics. Vol. 3 AIChE USA* (1982).
- [20] Davis, Mark. *Numerical Methods and Modeling for Chemical Engineers.* John Wiley and Sons USA, (1984).