

EVALUACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA ECUACION DE MONOD

*Alberto Duarte Torres
Ingeniero Químico, M.Sc.
Departamento de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad Nacional de Colombia. Bogotá*

La evaluación de la cinética de crecimiento de células microbiales, animales, o vegetales constituye un aspecto fundamental en el diseño, operación, simulación y predicción del comportamiento de los reactores biológicos. El propósito de este artículo es presentar una aplicación de los métodos diferencial e integral de análisis de datos en la determinación de los parámetros cinéticos del Modelo de Monod, uno de los modelos empleados con mayor frecuencia para relacionar el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad específica de formación de biomasa.

INTRODUCCION

El crecimiento celular es el resultado de numerosas interacciones entre reacciones bioquímicas y fenómenos de transporte con múltiples fases y sistemas multicomponentes. La mezcla heterogénea de células jóvenes y viejas experimenta durante el proceso de crecimiento un cambio continuo mientras se adapta a un medio ambiente cuyas condiciones físicas y químicas varían permanentemente. A causa de la imposibilidad para modelar exactamente la cinética de crecimiento, deben hacerse algunas suposiciones con el propósito de obtener modelos simples útiles para el diseño y operación de fermentadores y la predicción de su comportamiento. El más sencillo es un modelo no estructurado y distribuido basado en las siguientes suposiciones:

- Las células pueden ser representadas por un componente

simple tal como masa celular, número de células, o la concentración de proteínas, ADN (ácido desoxirribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico).

- La población celular esta distribuida uniformemente. La suspensión de células es homogénea, se ignora la naturaleza heterogénea de las células y la concentración celular se expresa como masa de células secas por unidad de volumen.

- El medio se formula de manera que solo un componente sea limitante de la velocidad de reacción. Los demás componentes están presentes en concentraciones lo suficientemente altas para evitar el efecto de cambios pequeños sobre la velocidad de reacción.

- El fermentador se controla para garantizar un nivel constante de condiciones ambientales tales como pH, temperatura y concentración de oxígeno disuelto.

La mezcla heterogénea de células jóvenes y viejas experimenta durante el proceso de crecimiento un cambio continuo mientras se adapta a un medio ambiente cuyas condiciones físicas y químicas varían permanentemente.

El modelo de Monod (Ecuaciones [1] y [2]) describe la interacción entre el crecimiento de microorganismos en un cultivo por lotes y la utilización del sustrato limitativo del crecimiento en aquellos sistemas donde prácticamente todo el sustrato es transformado en biomasa:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_M(s,x)}{K_S + s} \quad (1)$$

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (2)$$

Donde, $Y_{x/s}$: factor de rendimiento de sustrato en producto, (g células).(g sustrato)⁻¹; s: concentración del sustrato limitante, g.litro⁻¹; x: concentración de biomasa, (g células secas).litro⁻¹; μ_M : velocidad específica máxima de crecimiento, (hora)⁻¹; K_S : constante de saturación, g.litro⁻¹; K_x : concentración del sustrato correspondiente a una velocidad específica de crecimiento igual a $m_M/2$.

METODO INTEGRAL DE ANALISIS

El punto de partida del método integral de análisis del modelo de Monod (Ecuaciones [1] y [2]), propuesto por Ong, (1983), es la siguiente ecuación obtenida mediante integración de la Ecuación (2):

$$x = x_o + Y_{x/s} \cdot (s_o - s) \quad (3)$$

Donde, x_o, s_o : concentración inicial de biomasa y de sustrato limitativo del crecimiento, respectivamente.

Si la Ecuación (3) se sustituye en la Ecuación (1) se obtiene:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_M \cdot s}{K_S + s} [x_o + Y_{x/s} \cdot (s_o - s)] \quad (4)$$

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{\mu_M \cdot s}{K_S + s} [x_o + Y_{x/s} \cdot (s_o - s)] \quad (5)$$

$$\int_{s_o}^s \frac{K_S + s}{s [x_o + Y_{x/s} \cdot (s_o - s)]} \cdot ds = -\frac{\mu_M}{Y_{x/s}} \int_0^t dt$$

$$\frac{1}{t} \ln = \frac{s}{s_o} = b \frac{[\ln(1 + a \cdot d)]}{t} - c \quad (6)$$

$$a = \frac{Y_{x/s}}{x_o} \quad (7)$$

$$b = 1 + \frac{1}{Y_{x/s} \cdot K_S} [x_o + Y_{x/s} \cdot s_o] \quad (8)$$

$$c = \frac{\mu_M}{Y_{x/s} \cdot K_S} [x_o + Y_{x/s} \cdot s_o] \quad (9)$$

$$d = (s_o - s) \quad (10)$$

La Ecuación (6), deducida por Gates y Marlar, (1968), indica una relación lineal entre los términos $\{(1/t) \cdot \ln (s/s_0)\}$ y $\{(1/t) \cdot \ln (1 + a \cdot d)\}$. Gates y Marlar, (1968), sugieren un procedimiento basado en la representación gráfica de estos términos para diferentes valores supuestos del parámetro a .

De acuerdo con Ong, 1983, los valores de a , b , y c , asociados con la mejor línea recta obtenida, son seleccionados como los mejores estimativos y utilizados en la evaluación de μ_M , K_s y $Y_{x/s}$ a partir de las Ecuaciones (7), (8) y (9):

$$\mu_M = \frac{c}{b - 1} \quad (11)$$

$$K_s = \frac{\frac{1}{a} + s_0}{b - 1} \quad (12)$$

$$Y_{x/s} = a \cdot x_0 \quad (13)$$

Los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod, μ_M y K_s , no pueden estimarse con la misma facilidad que los correspondientes al modelo de Michaelis-Menten en una reacción enzimática. En el caso de una reacción enzimática, hay una velocidad inicial de reacción medida en función de la concentración de sustrato a partir de una serie de varios ensayos por lotes. En un cultivo de microorganismos, la velocidad inicial de reacción siempre es cero por la necesidad de una fase previa de adaptación durante la cual no se aplica la ecuación de Monod. Además, estas ecuaciones, aunque similares, son diferentes:

Michaelis-Menten:

$$\frac{dP}{dt} = r_p = \frac{r_{M \cdot s}}{K_M + s} \quad (14)$$

Monod:

$$\frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{1}{x} \cdot r_x = \frac{\mu_M \cdot s}{K_s + s} \quad (15)$$

Los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod no pueden estimarse con la misma facilidad que los correspondientes al modelo de Michaelis-Menten en una reacción enzimática.

Donde, r_M : velocidad máxima de la reacción enzimática; r_p : velocidad de formación de producto, g.(litro.hora)⁻¹; μ_M : velocidad específica máxima de crecimiento, (hora)⁻¹; x : concentración de biomasa, (g células secas).litro⁻¹; s : concentración de sustrato, g.litro⁻¹; K_s : constante de saturación, g.(litro)⁻¹; K_M : constante de saturación en el modelo de Michaelis-Menten, g.(litro)⁻¹.

El coeficiente de correlación R , describe el grado de ajuste de una línea recta. Por consiguiente el coeficiente R correspondiente a la relación lineal expresada en la Ecuación (6) es:

$$R^2 = \frac{(n \cdot \sum x \cdot y - \sum x \cdot \sum y)^2}{[n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2] [n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2]} \quad (16)$$

$$x = \frac{\ln(1 + a \cdot d)}{t} \quad (17)$$

$$y = \frac{\ln \frac{s}{s_0}}{t} \quad (18)$$

Donde, n : número de datos analizados; y : ordenada; x : abcisa. En las tres ecuaciones anteriores se conocen todos los términos, excepto el parámetro a . La función objetivo es minimizar (R^2). Esta función objetivo es unimodal para $a > 0$, esto es, solo tiene un valor óptimo local igual al óptimo global. El algoritmo mencionado en esta Sección es una modificación de la técnica de búsqueda unidimensional de Powell desarrollada originalmente para la solución de un problema de programación no lineal no restringida descrito por Reklaitis et al., 1983.

El programa C:\GWBASIC\ MONOD.BAS, resumido en la Tabla 5, constituye un ejemplo de la aplicación del método integral de análisis de datos en la evaluación de los parámetros cinéticos de la Ecuación de Monod.

METODO DIFERENCIAL DE ANALISIS

El objetivo del método diferencial de análisis es la evaluación de las velocidades de crecimiento de biomasa y de consumo de sustrato a partir de un conjunto de datos experimentales de las concentraciones de biomasa y de sustrato en función del tiempo en un cultivo por lotes. Aunque existen numerosas alternativas para la evaluación de estas velocidades, los siguientes procedimientos han sido utilizados con alguna frecuencia:

- El procedimiento geométrico de diferenciación de una función experimental en un punto, propuesto por Leduy y Zajic, 1973. En el programa C:\GWBASIC\LEDUYZAJ.BAS, resumido en la Tabla 6, se aplica la subrutina de Leduy y Zajic, en la evaluación de la velocidad de crecimiento de biomasa a partir de un conjunto de valores de la concentración de biomasa (variable dependiente) en función del tiempo.

- El procedimiento propuesto por Tao, 1987, fundamentado en arreglos de polinomios de la forma:

$$f(x) = a(i) + b(i).x + c(i).x^2 + d(i).x^3 \quad (19)$$

Donde: x: variable dependiente; t: variable independiente.

El programa C:\GWBASIC\SPLINE.BAS, resumido en la Tabla 7, evalúa los coeficientes de la curva de ajuste correspondientes a cada

intervalo de la variable independiente (tiempo). La variable dependiente en la ecuación (19) es la concentración de biomasa. En el programa se obtienen las derivadas de los polinomios en cada punto de la curva.

Los valores de los parámetros μ_M y K_s son obtenidos a partir de las siguientes relaciones lineales, deducidas de la ecuación de Monod, una vez conocidos los valores de la velocidad de crecimiento de biomasa r_x y de la velocidad de consumo de sustrato r_s :

Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_M} + \frac{K_s}{\mu_M} \cdot \frac{1}{s} \quad (20)$$

La representación gráfica de $1/\mu$ versus $1/s$, en el caso de microorganismos que se comportan de acuerdo con el modelo de Monod, corresponde a una línea recta, cuyo intercepto es $1/\mu_M$ y cuya pendiente es K_s/μ_M . La evaluación de μ_M y K_s por el método de Lineweaver-Burk depende las mediciones realizadas a bajas concentraciones de sustrato. Si se considera que el valor de $1/\mu$ tiende a infinito a medida que la concentración de sustrato disminuye, los puntos correspondientes a estos valores afectan la pendiente y el intercepto.

Langmuir:

$$\frac{s}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_M} + \frac{1}{\mu_M} \cdot s \quad (21)$$

La representación gráfica de s/μ versus s , en el caso de microorganismos que se comportan de acuerdo con el modelo de Monod, corresponde a una línea recta, cuyo intercepto es K_s/μ_M y cuya pendiente es $1/\mu_M$.

Eadie-Hofstee:

$$\mu = \mu_M - \frac{\mu}{s} \cdot K_s \quad (22)$$

La representación gráfica de μ versus μ/s , en el caso de microorganismos que se comportan de acuerdo con el modelo de Monod, corresponde a una línea recta, cuyo intercepto es μ_M y cuya pendiente es $-K_s$.

La principal limitación del método diferencial de análisis en la determinación de parámetros cinéticos es la dificultad para la realización de ensayos en un reactor continuo de mezcla completa (CSTR) donde existe la posibilidad de mantener un medio ambiente estable para los microorganismos. En los ensayos por lotes pueden utilizarse matraces para realizar simultáneamente múltiples ensayos con diferentes condiciones ambientales. Los ensayos en reactores continuos requieren tanques de reserva de nutrientes y de producto conectados asepticamente al fermentador. El control del caudal se dificulta en algunos casos por la formación de espuma y por el taponamiento del ducto de salida con aglomerados de células. La duración de un ensayo puede prolongarse durante varios días, e incluso semanas, y aumentar el riesgo de contaminación y de mutación de la cepa por su adaptación a las nuevas condiciones ambientales. Estas pueden ser diferentes en un ensayo por lotes y en una

fermentación continua y afectan la validez del modelo cinético desarrollado en un reactor continuo para la predicción del comportamiento de una fermentación por lotes y viceversa. Por consiguiente, estos parámetros requieren una verificación cuidadosa con el propósito de evaluar la confiabilidad del modelo establecido.

EVALUACIÓN DE LOS PARAMETROS CINÉTICOS DE LA ECUACIÓN DE MONOD

El siguiente Ejemplo muestra la evaluación de los parámetros cinéticos de la Ecuación de Monod. Los programas LEDUYZAJ.BAS y SPLINE.BAS obtienen las velocidades de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato. Los parámetros μ_M , K_s y $Y_{x/s}$ son obtenidos mediante un análisis de regresión de las ecuaciones de Lineweaver-Burk, Langmuir y Eadie-Hofstee, con el programa C:\QPRO\MONOD.WQ1. Los parámetros de la ecuación de Monod también son obtenidos por método integral de análisis con el programa C:\GWBASIC\MONOD.BAS.

En la Tabla 1 se presentan datos de formación de biomasa y consumo de sustrato, para el crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un reactor por lotes. Evaluar los parámetros cinéticos: μ_M , K_s y $Y_{x/s}$, de la ecuación de Monod mediante los métodos integral y diferencial de análisis de datos.

Tabla 1. Programa C:\XPRO\MONOD.WQ1: Evaluación de las velocidades de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato a partir de datos de formación de biomasa y consumo de sustrato, generados mediante simulación de la información presentada por Herbert et. al (1956), para el crecimiento de Aerobacter cloacae en un reactor por lotes con un medio químicamente definido compuesto por glicerol como sustrato limitativo del crecimiento.

A Tiempo horas	B Biomasa mg/litro	C Sustrato mg/litro	D dx/dt LD-Z	E dx/dt SPLINE	P s prom
0,00	15,5	73,9	13,46	12,24	67,25
0,52	22,5	60,6	15,54	15,90	54,90
0,86	28,6	49,2	19,25	19,63	42,85
1,18	35,3	36,5	22,09	22,29	31,00
1,43	41,1	25,5	23,07	23,92	18,25
1,74	48,2	11,0	17,43	20,20	7,05
2,06	53,0	3,1	5,40	9,12	1,75
2,37	54,4	0,4	1,02	1,66	
2,48	54,5	0,2			
G dx/dt prom LDZ	H dx/dt prom SPLINE	I (1/s)	J x prom	K μ	L μ SPLINE
14,500	14,070	0,0149	19,00	0,7632	0,7405
17,395	17,765	0,0182	25,55	0,6808	0,6953
20,670	20,960	0,0233	31,95	0,6469	0,6560
22,580	23,105	0,0323	38,20	0,5911	0,6048
20,250	22,060	0,0548	44,65	0,4535	0,4941
11,415	14,660	0,1418	50,60	0,2256	0,2897
3,210	5,390	0,5714	53,70	0,0598	0,1004
M (1/ μ) LD-Z	N (1/ μ) SPLINE	O (μ /s) LD-Z	P (μ /S) SPLINE	Q (s/ μ) LD-Z	R (s/ μ) SPLINE
1,310	1,350	0,0113	0,0110	88,121	90,814
1,469	1,438	0,0124	0,0127	80,638	78,958
1,546	1,524	0,0151	0,0153	66,234	65,318
1,692	2,653	0,0191	0,0195	52,445	51,253
2,205	2,024	0,0249	0,0271	40,240	36,938
4,433	3,452	0,0320	0,0411	31,251	24,334
16,729	9,963	0,0342	0,0574	29,276	17,435
S μ prom LDZ-SPL	T 1/ μ prom LDZ-SPL	U μ prom/s LDZ-SPL	V s/ μ prom LDZ-SPL		
0,752	1,330	0,0112	89,467		
0,688	1,453	0,0125	79,798		
0,651	1,535	0,0152	65,776		
0,598	1,672	0,0193	51,849		
0,474	2,114	0,0260	38,589		
0,258	3,942	0,0365	27,792		
0,080	13,346	0,0458	23,355		

OBSERVACIONES A LA TABLA 1

- Columnas A, B, C: Datos de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato, generados mediante simulación de la información presentada por Herbert, et. al., (1956), para el crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un reactor por lotes con un medio químicamente definido compuesto por glicerol como sustrato limitativo del crecimiento. La concentración inicial de biomasa: 15,50 (mg de biomasa seca)/litro, corresponde a la concentración de biomasa después del período de adaptación, esto es, la concentración al comienzo de la fase exponencial.

- Columna D: Velocidad de crecimiento de biomasa obtenida con el programa C:\DOS\GWBA-SIC\LEDUYZAJ.BAS (Tabla 6) a partir de la información de las columnas A y B.

- Columna E: Velocidad de crecimiento de biomasa obtenida con el programa C:\DOS\GWBA-SIC\SPLINE.BAS (Tabla 7) a partir de la información de las columnas A y B.

- Columnas F, G, H: Valores promedio de las columnas C, D y E, respectivamente; Columna I: recíproco de los valores de la columna F.

- Columna J: Concentración de biomasa. Promedio de los valores anotados en la columna B en cada intervalo de tiempo. Columnas K, L: Velocidad específica de crecimiento de biomasa, calculada con los valores de la columna J, y las columnas D y E respectivamente, en (horas)⁻¹.

- Columna S: La velocidad específica promedio, μ prom es el promedio aritmético de los valores anotados en las columnas K y L en cada intervalo de tiempo.

OBSERVACIONES A LA TABLA 2

Y: Intercepto con el eje Y; Y: variable dependiente.

Err Y: Error estándar de los valores estimados de Y.

R: coeficiente de correlación linear; R²: coeficiente de determinación, (Steel y Torrie, 1980).

m: Valor de la pendiente o coeficiente de X; X: variable independiente.

Err X: Error estándar de los valores estimados de X.

- Lineweaver-Burk, Ecuación (20): Variable independiente: datos de la columna I (Tabla 1); Variable dependiente: columna N: método Spline; columna M: método de Leduy y Zajic; columna T: método de la velocidad específica promedio de crecimiento.

	Y	Err Y	R ²	m	Err x
Lineweaver-Burk, Ecuación (20):					
SPL	1,1699	0,0492	0,9998	15,4252	0,0990
LDZ	0,8026	0,1769	0,9992	27,7388	0,3559
PROM	0,9862	0,0678	0,9998	21,5820	0,1364
Langmuir, Ecuación (21):					
SPL	16,2130	0,8319	0,9992	1,1278	0,0138
LDZ	24,9965	2,3695	0,9916	0,9560	0,0394
PROM	20,6048	1,3236	0,9978	1,0419	0,0220
Eadie-Hofstee, Ecuación (22):					
SPL	0,8723	0,0145	0,9969	-13,7207	0,3435
LDZ	1,0725	0,0550	0,9624	-27,4395	2,4270
PROM	0,9483	0,0162	0,9964	-18,8473	0,5057

Tabla 2. Resultados obtenidos mediante análisis de regresión de los valores anotados en la Tabla 1 con el programa C:\QPRO\MONOD.WQI

Lineweaver-Burk, Ecuación (20):

Spline	$\mu_m = 0,8548$	$K_s = 13,185$	$R = 0,9999$
Leduy y Zajic	$\mu_m = 1,2459$	$K_s = 34,560$	$R = 0,9996$
Promedio	$\mu_m = 1,014$	$K_s = 21,884$	$R = 0,9984$

Langmuir, Ecuación (21):

Spline	$\mu_m = 0,8867$	$K_s = 14,376$	$R = 0,9996$
Leduy y Zajic	$\mu_m = 1,0460$	$K_s = 26,147$	$R = 0,9958$
Promedio	$\mu_m = 0,9598$	$K_s = 19,776$	$R = 0,9989$

Eadie-Hofstee, Ecuación (22):

Spline	$\mu_m = 0,8723$	$K_s = 13,721$	$R = 0,9984$
Leduy y Zajic	$\mu_m = 1,0725$	$K_s = 27,439$	$R = 0,9810$
Promedio	$\mu_m = 0,9483$	$K_s = 18,847$	$R = 0,9982$

Tabla 3. Parámetros de la Ecuación de Monod obtenidos a partir de los valores anotados en la Tabla 2 (Método diferencial de análisis); R: coeficiente de correlación.

Tabla 4. Parámetros de la Ecuación de Monod obtenidos por el método integral de análisis con el programa C:\GWBASIC\MONOD.BAS, resumido en la Tabla 5, para un conjunto de valores de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato, (Valores anotados en las columnas A, B, y C de la Tabla 1, deducidos de la información presentada por Herbert et al., 1956)

$$Y_{x/s} = 0,53 \text{ (g células secas) / (g glicerol utilizado)}$$

$$m_M = 0,8528 \text{ (hora)}^{-1}$$

$$K_s = 12,326 \text{ (mg glicerol) / (litro de medio)}$$

Estos valores coinciden con los informados por Herbert et al., 1956:

$$Y_{x/s} = 0,53 \text{ g/g}$$

$$m_M = 0,85 \text{ (hora)}^{-1}$$

$$K_s = 12,3 \text{ mg/litro.}$$

- Langmuir, Ecuación (21):
Variable independiente: datos de la columna F (Tabla 1); Variable dependiente: columna R: método Spline; columna Q: método de Leduy y Zajic; columna V: método de la velocidad específica promedio de crecimiento.

- Eadie-Hofstee, Ecuación (22):
Variable independiente: datos de las columnas P, O y U (Tabla 1) para los métodos de Spline, Leduy y Zajic, y velocidad específica promedio de crecimiento, respectivamente. Variable dependiente: datos de las columnas L, K y S (Tabla 1) para los métodos de Spline, Leduy y Zajic, y velocidad específica promedio de crecimiento, respectivamente.

Tabla 5. Programa C:\GWBASIC\MONOD.BAS. Gates, W.E., y Marlar, 1968; Moser, 1988; Reklaitis, G.V., Ravindran, A., and Ragsdell, 1983; Ong, S.L. 1983; Rolz Carlos, 1989.

```

1 0 CLS
20 PRINT "MONOD.BAS: METODO INTEGRAL DE ANALISIS"
30 PRINT "EVALUACION DE LOS PARAMETROS DE LA ECUACIÓN DE MONOD"
40 PRINT
50 PRINT "REFERENCIAS:"
60 PRINT
70 PRINT "Gates, W.E., y Marlar, J.T., Water Poll."
80 PRINT "Control Fed. 40: R 469,1968"
90 PRINT
100 PRINT "Moser, A., Bioprocess Technology, Kinetics"
110 PRINT "and Reactors, Springer Verlag, 1988"
120 PRINT
130 PRINT "Ong, S. L., Biotechnol. Bioeng. 25: 2347,1983"
140 PRINT
150 PRINT "Reklaitis, G.V., Ravindran, A. and Ragsdell,"
160 PRINT "K.M., Engineering Optimization, Methods and"
170 PRINT "Applications, John Wiley & Sons, 1983"
180 PRINT
190 PRINT "Rolz Carlos, Curso: Ingenieria de Reacciones"
200 PRINT "y Procesos Biologicos. Instituto Centroamericano"
210 PRINT "de Investigación y Tecnologia Industrial, Icaiti,"
220 PRINT "Programa: MOINTXS.BAS,1989"
230 PRINT
240 PRINT "PULSE ENTER !"
250 ANS$ = INPUT$(1)
260 CLS
270 FOR X = 1 TO 10000
280 NEXT X
290 CLS:KEY OFF
300 GOSUB 1050
310 CLS
320 WHILE CMD < >3
330 ON CMD GOTO 360,640
340 WEND
350 GOTO 1030
360 PAGINA% = 1
370 GOSUB 1200
380 REM SUMINISTRAR DATOS Y CONSTANTES
390 PRINT
400 INPUT "Conc.inicial de biomasa y sustrato ";CX0,CS0
410 PRINT
420 INPUT "Numero de pares de datos, incluir datos para t=0 ";N
430 PRINT
440 I = N
450 DIM CS(I),T(I),CX(I),X(I),Y(I),A(I),E 1 (I),XX(I),TT(I)
460 FOR I = 1 TO N
470 INPUT "Conc. biomasa, sustrato, tiempo ";CX(I),CS(I),T(I)

```

```

480 NEXT I
490 PRINT
500 CLS
510 REM CONCENTRACIÓN DE BIOMASAY DE SUSTRATO
520 PRINT SPC(10);"DATOS EXPERIMENTALES"
530 PRINT
540 PRINT SPC(5);"Conc.biomasa";SPC(5);"Conc.sustrato";SPC(5);"Tiempo"
550 PRINT
560 F1 $ =" ## " + " ###.## " +SPACE$(5) + ~ ### ## n + SPACE$(5) + "###.##"
570 FOR I = 1 TO N
580     PRINT USING F1 $;1,CX(I),CS(I),T(I)
590 NEXT I
600 PRINT
610 PRINT "PULSE ENTER !"
620 ANS$ = INPUT$(1)
630 CLS
640 IF PAGINA% > 1 THEN PRINT CHR $ (12);
650 GOSUB 1200
660 REM CALCULO DEL RENDIMIENTO CELULAR
670 YE = (CX(N)-CXO)/(CSO-CS(N))
680 REM CALCULO DE AP
690 AP=YE/CX0
700 REM CALCULO DE X'S E Y'S SEGUN ONG
710 FOR I=1 TO N
720     X(I)=LOG(1 +AP*(CSO-CS(I)))/T(I)
730     Y(I) = LOG(CS(I)/CSO)/T(I)
740 NEXT I
750 REM SUBROUTINA DE AJUSTE POR MINIMOS CUADRADOS
760 L=2
770 INPUT " Criterio de convergencia, (se sugiere 1 E-3): " ;E
780 E1 =.5
790 GOSUB 1740
800 GOSUB 1230
810 REM CALCULO DE MUMAX Y KS
820 MUMAX=A(2)/(A(1)-1)
830 KS = ((1 /AP) + CSO)/(A(1)-1)
840 PRINT
850 PRINT "Criterio de convergencia usado: ";E
860 PRINT
870 PRINT "El valor calculado del rendimiento Y es: ";YE
880 PRINT
890 PRINT "Velocidad maxima de crecimiento, MUMAX ";MUMAX
900 PRINT
910 PRINT "El valor estimado constante Ks es: ";KS
920 PRINT
930 PRINT "Desviación estandar del ajuste ",
940 PRINT INT(10000000#*D)/10000000#
950 PRINT
960 PRINT "Numero de iteraciones requeridas: ";M
970 PRINT
980 PRINT "PULSE ENTER !"

```

```

990 ANS$ = INPUT$(1)
1000 WHILE CMD < > 3
1010 ON CMD GOTO 290,290
1020 WEND
1030 END
1040 REM VENTANA DE MENU PRINCIPAL
1050 PRINT " MENU PRINCIPAL"
1060 PRINT
1070 PRINT " 1. Ingreso datos experimentales"
1080 PRINT " 2. Reiniciar calculo con nuevos valores parametros"
1090 PRINT " 3. Terminar el calculo"
1100 PRINT
1110 INPUT "Favor seleccione número y luego pulse ENTER !:",CMD
1120 PRINT
1130 PR INT " PU LSE ENTER !"
1140 WHILE CMD < > FIX(CMD) OR CMD<1 OR CMD>3
1150 BEEP
1160 PRINT SPC(40);
1170 INPUT "Favor entre 1.2 o 3: ".CMD
1180 WEND
1190 RETURN
1200 PRINT "CALCULO DE PARAMETROS DE MONOD"
1210 RETURN
1220 REM SUBROUTINA DE AJUSTE DE LA CURVA POR MINIMOS CUADRADOS
1230 FOR I=1 TO L
1240 E1(1)=E1
1250 NEXT I
1260 M =0
1270 REM FIJAR RESIDUAL PARA EL ENSAYO
1280 L1 = 1000000!
1290 REM RECORRER TODOS LOS PARAMETROS
1300 FOR I = 1 TO L
1310AO=A(I)
1320 REM OBTENER EL VALOR DEL RESIDUAL
1330 A(I) =AO
1340 GOSUB 1590
1350 REM ALMACENAR EL RESULTADO EN MO
1360 MO = L2
1370 REM REPETIR PARA M1
1380 A(I) =AO*(1-E1 (I))
1390 GOSUB 1590
1400 M1 =L2
1410 REM CAMBIAR EL INTERVALO SI ES NECESARIO
1420 REM SI LA VARIANZA AUMENTA, DIVIDA E1 (I) EN DOS PARTES IGUALES
1430 IF M1 > MO THEN E1 (I) = -E1 (I)/2
1440 REM SI LA VARIANZA DISMINUYE, AUMENTE E1(1)
1450 IF M1 <MO THEN E1 (I) = 1.2*E1 (I)
1460 REM SI LA VARIANZA AUMENTA, INTENTE REDUCIRLA
1470 IF M1 > MO THEN A(I) = AO
1480 IF M1 > MO THEN GOTO 1340
1490 NEXT I

```

```

1500 REM FIN DE UN PASO COMPLETO
1510 REM ENSAYO DE CONVERGENCIA
1520 M=M+1
1530 IF L2 = 0 THEN RETURN
1540 IF ABS((L1 -L2)/L2) < E THEN RETURN
1550 REM SI ALCANZA ESTE PUNTO, SE REQUIERE OTRO PASO
1560 L1 = L2
1570 GOTO 1300
1580 REM SUBROUTINA DE GENERACIÓN DE RESIDUAL
1590 L2 = 0
1600 FOR J=1 TO N
1610 X = X(J)
1620 REM OBTENCIÓN DE LA FUNCION
1630 GOSUB 1690
1640 L2 = L2 + (Y(J)-Y) * (Y(J)-Y)
1650 NEXT J
1660 D = SQR(L2/(N-L))
1670 RETURN
1680 REM SUBROUTINA DE FUNCIONES
1690Y=A(1)*X-A(2)
1700 RETURN
1710REM LECTURA ESTIMADOS DE PARAMETROS INICIALES
1720 ANS$ = INPUT$(1)
1730 CLS
1740 INPUT "Estimado inicial de Ks para iniciar calculo:";KS
1750 PRINT
1760 PRINT " Estimado inicial de Ks: "; KS
1770 A(1) =(1 + (CXO +YE*CSO)/(YE*KS))
1780 PRINT
1790 INPUT " Estimado inicial de MUMAX para iniciar calculo:";MUMAX
1800 PRINT " Estimado inicial MUMAX: " ;MUMAX
1810 A(2) = MUMAX* (CXO + YE*CSO)/(YE* KS)
1820 RETURN

```

Tabla 6. Programa C:\GWBASIC\LEDUYZAJ.BAS. Leduy, A.L.,y Zajic, J.E., 1973; Oner, M.D., et al., 1 986; Rolz, Carlos, 1989.

```

10 CLS
20 PRINT "LEDUYZAJ.BAS: METODO DIFERENCIAL DE ANALISIS "
30 PRINT
40 PRINIT "PROCEDIMIENTO GEOMETRICO DE DIFERENCIACION DE UNA "
50 PRINT " FUNCIÓN EXPERIMENTAL EN UN PUNTO "
60 PRINT
70 PRINT
80 PRINT "REFERENCIAS: "
90 PRINT
100 PRINT "Leduy, A.L.,y Zajic, J.E., Biotechnol. Bioeng. "
110 PRINT " 15: 805,1973 "
120 PRINT
130 PRINT "Oner, M.D., et al., Biotechnol. Bioeng.
140 PRINT "28: 902,1986 "

```

```

150 PRINT
160 PRINT "Rolz Carlos, Instituto Centroamericano de "
170 PRINT "Investigación y Tecnología Industrial. ICAITI "
180 PRINT "Curso de Ingeniería de Reacciones y Procesos "
190 PRINT "Biologicos, Guatemala, 1989.Programa: DIFLEZ.BAS"
200 PRINT
210 PRINT "EVALUACIÓN DE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO DE BIOMASA "
220 PRINT "Y DE CONSUMO DE SUSTRATO A PARTIR DE DATOS EXPERIMENTALES"
230 PRINT
240 PRINT "PULSE ENTER !"
250 ANS$ = INPUT$(1)
260 CLS
270 FOR X = 1 TO 10000
280 NEXT X
290 CLS:KEY OFF
300 GOSUB 790
310 CLS
320 WHILE CMD < >3
330 ON CMD GOTO 360,440
340 WEND
350 GOTO 770
360 PAGINA% = 1
370 REM SUMINISTRAR DATOS
380 PRINT
390 INPUT "Numero de valores de la variable dependiente ";V
400 PRINT
410 W=V+3
420 DIM TETA(W),CX(W),ZMAB(W),ZMBC(W),DCX(W),CXCR(W),ZMNO(W),ZNNO(W)
430 DIM ZMMO(W),ZNMO(W),TETAC(W)
440 FOR I = 1 TO V
450 INPUT "IND,DEP";TETA(I),CX(I)
460 NEXT I
470 REM ESCRIBIR DATOS EXPERIMENTALES
480 CLS
490 PRINT SPC(16); " DATOS EXPERIMENTALES"
500 PRINT
510 PRINT SPC(5); " Variable independiente";SPC(5); " Variable dependiente"
520 PRINT
530 F1 $ = " ## " + " #####.#### " + SPACE$(10) + "      #####.#### "
540 FOR I= 1 TO V
550 PRINT USING F1 $;1,TETA(I),CX(I)
560 NEXT I
570 PRINT
580 PRINT "PULSE ENTER !"
590 ANS$ = INPUT$(1)
600 IF PAGINA% > 1 THEN PRINT CHR$(12);
610 CLS
620 PRINT SPC(10); "DATOS CALCULADOS"
630 PRINT
640 PRINT SPC(5); "1ND";SPC(17); "DERIVADA"
650 PRINT

```

```

660 GOSUB 930
670 F1 $ = " ##.## " @ ~ + SPACE$(8) + " ####.## "
680 FOR I = 1 TO V
690 PRINT USING F1 $; TETA(I),DCX(I)
700 NEXT I
710 PRINT
720 PRINT "PULSE ENTER !"
730 ANS$ = INPUT$(1)
740 WHILE CMD < > 3
750 ON CMD GOTO 290,290
760 WEND
770 CLS
780 END
790 PRINT "MENU PRINCIPAL"
800 PRINT
810 PRINT "1. Ingreso datos experimentales"
820 PRINT "2. Reiniciar calculo"
830 PRINT "3. Terminar calculo"
840 PRINT
850 INPUT "Favor seleccione numero: " ,CMD
860 WHILE CMD < > FIX(CMD) OR CMD < 1 OR CMD > 3
870 BEEP
880 INPUT "Favor entre 1,2 o 3: " ,CMD
890 WEND
900 RETURN
910 PAGINA% =PAGINA% + 1
920 REM SUBROUTINA LEDUY Y ZAJIC
930 I=1
940 DCX(I) = (CX(I + 1)-CX(I))/(TETA(I + 1)-TETA(I))
950 ZMAB(I + 1) = (CX(I + 1)-CX(I))/(TETA(I + 1)-TETA(I))
960 ZMBC(I + 1) = (CX(I + 2)-CX(I + 1))/(TETA(I + 2)-TETA(I + 1))
970 IF ABS(ZMAB(I + 1)-ZMBC(I + 1)) <= .001 THEN 980 ELSE 1030
980 DCX(I + 1) = .5 * (ZMAB(I + 1) + ZM BC(I + 1))
990 I + 1
1000 IF (I + 2) <= V THEN 1010 ELSE 1020
1010 GOTO 950
1020 IF I < V THEN 1110 ELSE 1130
1030 ZMNO(I + 1) = (TETA(I + 1)-TETA(I + 2))/(CX(I + 2)-CX(I + 1))
1040 ZNNO(I + 1) = .5*(CX(I + 1) +CX(I + 2))-ZMNO(I + 1)*.5*(TETA(I + 1) +TETA(I + 2))
1050 ZMMO(I + 1) = (TETA(I)-TETA(I + 1))/(CX(I + 1)-CX(I))
1060 ZNMO(I + 1) = .5*(CX(I) +CX(I + 1))-ZMMO(I + 1)*.5*(TETA(I) +TETA(I + 1))
1070 TETAC(I + 1) = (ZNNO(I + 1)-ZNMO(I + 1))/(ZMMO(I + 1)-ZMNO(I + 1))
1080 CXCR(I + 1) =ZMMO(I + 1)*TETAC(I + 1) +ZNMO(I + 1)
1090 DCX(I + 1) = (TETAC(I + 1)-TETA(I + 1))/(CX(I + 1)-CXCR(I + 1))
1100 GOTO 990
1110 DCX(I + 1) = (CX(I + 1)-CX(I))/(TETA(I + 1)-TETA(i))
1120 GOTO 990
1130 RETURN

```

Tabla 7. Programa C:\GWBASIC\SPLINE.BAS. Rolz, C., 1989; Tao, B.Y., 1987.

```
10 CLS:KEY OFF
20 PRINT "SPLINE.BAS: METODO DIFERENCIAL DE ANALISIS"
30 PRINT
40 PRINT
50 PRINT "EVALUACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE LA CURVA"
60 PRINT "DE AJUSTE DE UNA FUNCIÓN EXPERIMENTAL "
70 PRINT
80 PRINT "REFERENCIAS:"
90 PRINT
100 PRINT "Rolz Carlos, Instituto Centroamericano de"
110 PRINT "Investigación y Tecnología Industrial, ICAIT!"
120 PRINT "Curso de Ingeniería y Procesos Biologicos"
130 PRINT "Guatemala,1989"
140 PRINT
150 PRINT "Tao. B.Y.. Chem. Eng. October 26, p. 109,1987"
160 PRINT
170 PRINT
180 PRINT "EVALUACIÓN DE VELOCIDADES DE CRECIMIENTO"
190 PRINT "DE BIOMASA Y CONSUMO DE SUSTRATO A PARTIR"
200 PRINT "DE DATOS EXPERIMENTALES"
210 PRINT
220 PRINT "PULSE ENTER !"
230 ANS$ = INPUT$(1)
240 CLS
250 INPUT "NUMERO DE PUNTOS DE DATOS" ;NUM
260 PRINT
270 PRINT "X: variable independiente: Y: variable independiente"
280 PRINT
290 DIM XDATA(NUM),YDATA(NUM)
300   FOR I=0 TO NUM-1
310     INPUT "X,Y";XDATA(I), YDATA(I)
320   NEXT I
330 GOTO 390
340 OPEN "O",#1,N$:WRITE #1, NUM
350   FOR N = 0 TO NUM-1
360     WRITE #1, XDATA(N):WRITE #1, YDATA(N)
370   NEXT N
380 CLOSE
390 GOTO 480
400 OPEN "1",#1,N$
410 INPUT #1,NUM
420 DIM XDATA(NUM),YDATA(NUM)
430   FOR I =0 TO NUM-1
440     INPUT #1, XDATA(I):INPUT #1,YDATA(I)
450 NEXT I
460 CLOSE
470 ANS$ = INPUT$(1)
480 N =NUM:CLS
490 PRINT "RESULTADOS"
```

```

500 PRINT
510 PRINT
520 PRINT "X: Variable independiente"
530 PRINT "Y: Variable dependiente"
540 PRINT "B: primera derivada"
550 PRINT "C,D: coeficientes"
560 PRINT
570 DIM A(N),B(N),C(N),D(N), P(N), Q(N),R(N),S(N), STEPSIZE(N)
580 REM XDATA(n), YDATA(n) son arreglos de n puntos de datos
590 REM A(N),B(N),C(N),D(N) son arreglos de coeficientes polinomiales
600 REM en la forma  $f(x) = a(i) + b(i) * x + c(i) * x^2 + d(i) * x^3$ 
610 REM PASO 1 DEL ALGORITMO
620 Q(0) = 1 :Q(N) = 1 :R(0) =0:S(0) =0:S(N) =0:C(N) =0
630 FOR I=0 TO N:A(I)=YDATA(I):NEXT I
640 REM PASO 2 DEL ALGORITMO
650     FOR I = 0 TO N-1
660         STEPSIZE(I)=XDATA(I+1)-XDATA(I)
670     NEXT I
680 REM PASO 3 DEL ALGORITMO
690 FOR I = 1 TO N-1
700 (1)=3*((A(I+1)*STEPSIZE(I-1))-(A(I)*(XDATA(I+1)-XDATA(I-1)))) + (A(I-1)*STEPSIZE(I))/ZTEPSIZE(I-1)
        *STEPSIZE(I)
710 Q(I) =2*(XDATA(I+1)-XDATA(I-1))-(STEPSIZE(I-1)*R(I-1))
720 R(I) = STEPSIZE(I)/Q(I)
730 S(I) = (P(I)-(STEPSIZE(I-1) *S(I-1)))/Q(I)
740 NEXT I
750 REM PASO 4 DEL ALGORITMO
760     FOR I=0 TO N-1
770         J=N-1-I
780         C(J) = S(J)-(R(J) *C(J + 1))
790         B(J) =((A(J + 1)-A(J))/STEPSIZE(J))-(STEPSIZE(J)*(C(J + 1) +2*C(J))/3)
800         D(J) = (C(J + 1)-C(J))/(3 * STEPSIZE(J))
810     NEXT I
820 REM IMPRIMIR LOS COEFICIENTES DE CADA INTERVALO
830 FOR I=0 TO N-1
840 PRINT " X = " ;XDATA(I);SPC(3); " Y = " ;YDATA(I); SPC(3); " B = " ;B(I); SPC(3); " C = " ;C(I);SP
C(3); " D = ";D(I)
850 NEXT I
860 END

```

BIBLIOGRAFIA

- 1- GATES, W.E., Y MARLAR, J.T. (1968), *WaterPoll. Control Fed.* 40: R469.
- 2- HERBERT, D., ELSWORTH, R., AND TELLING, R.C. (1956), "The continuous culture of bacteria; a Theoretical and Experimental Study." *J. Gen. Microbiol.* 14: 601-622.
- 3- LEDUY, A.L., Y ZAJIC, J.E. (1973), *Biotechnol. Bioeng.* 15: 805.
- 4- MOSER, A. (1988), *Bioprocess Technology, Kinetics and Reactors*, Springer Verlag.
- 5- ONER, M.D., et al. (1986), *Biotechnol. Bioeng.* 28:902.
- 6- ONG, S.L. (1983). *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2347.
- 7- REKLAITIS, G.V., RAVINDRAN, A., AND RAGSDELL, K.M. (1983). *Engineering Optimization, Methods and Applications*, John Wiley & Sons.
- 8- ROLZ CARLOS. (1989). *Curso: Ingenieria de*