

ANÁLISIS DEL EFECTO DE AGITACIÓN EN UNA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA POR PICHIA FERMENTANS MEDIANTE MODELIZADO MECANICISTA

*STIR EFFECT ANALYSIS IN AN ALCOHOLIC FERMENTATION BY
PICHIA FERMENTANS THROUGH MECHANISTIC MODELLING*

Iván Alonso García Alcantar

Tecnológico Nacional de México / IT de Durango, México
02041051@itdurango.edu.mx

Yolocuahtli Salazar Muñoz

Tecnológico Nacional de México / IT de Durango, México
ysalazar@itdurango.edu.mx

Paul Antonio Valle Trujillo

Tecnológico Nacional de México / IT de Tijuana, México
paul.valle@tectijuana.edu.mx

Nicolás Oscar Soto Cruz

Tecnológico Nacional de México / IT de Durango, México
nsoto@itdurango.edu.mx

Jesús Bernardo Páez Lerma

Tecnológico Nacional de México / IT de Durango, México
jpaez@itdurango.edu.mx

Recepción: 23/noviembre/2023

Aceptación: 26/abril/2024

Resumen

En los procesos de fermentación alcohólica existen modelos matemáticos centrados específicamente en interpretar la dinámica de crecimiento de la biomasa. Se omite por completo la interacción que ocurre entre otras variables que intervienen en este proceso como el sustrato, el producto final y el efecto de la velocidad de la agitación empleado. Por lo que se formuló un modelo matemático mediante EDOs de primer orden con el propósito de describir la dinámica entre las variables. El modelo permitió realizar el ajuste de los parámetros con los datos experimentales mediante regresión no lineal en MATLAB. El análisis estadístico mostró un índice de bondad de ajuste mayor a 0.9 para cada una de las variables

mencionadas. Los resultados obtenidos indican que el modelo propuesto en esta investigación es más efectivo y completo que los encontrados en la literatura.

Palabras clave: Bioestadística, Datos experimentales, Ecuaciones diferenciales, Fermentación alcohólica, *In silico*.

Abstract

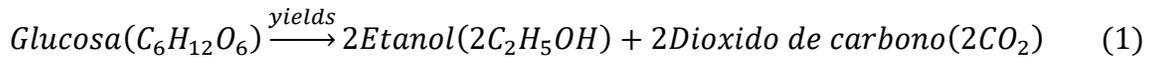
In alcoholic fermentation processes there are mathematical models specifically focused on interpreting the dynamics of biomass growth. The interaction that occurs between other variables that intervene in this process such as the substrate, the final product, and the effect of the speed of agitation used is completely omitted. Therefore, a mathematical model was formulated using first-order ODEs with the purpose of describing the dynamics between the variables. The model allowed the parameters to be adjusted with experimental data using nonlinear regression in MATLAB. The statistical analysis showed a goodness of fit index greater than 0.9 for each of the mentioned variables. The results obtained indicate that the model proposed in this research is more effective and complete than those found in the literature.

Keywords: *Alcoholic fermentation, Biostatistics, Differential equations, Experimental data, In silico.*

1. Introducción

En el proceso de fermentación alcohólica, los microorganismos unicelulares de naturaleza eucariota desempeñan un papel crucial [Soto, 2019]. Estos organismos no solo inciden en el nivel de alcohol generado en los vinos, sino que también influyen en aspectos determinantes como: el pH, el aroma, el sabor, el cuerpo de la bebida y la efervescencia, característica de los vinos espumosos. De esta manera, su participación resulta fundamental para la configuración de la calidad del producto final. Estos microorganismos, conocidos como levaduras, abarcan diversas variedades, entre las cuales destacan *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Saccharomyces* y *Pichia*. Es precisamente esta última, *Pichia*, la parte central de esta investigación por las características sensoriales distintivas que brinda,

particularmente el matiz de aroma a plátano que le otorga al producto final [Medeiros, 2022], [Rentería, 2021]. Estas levaduras consiguen su energía para sobrevivir al romper las moléculas de glucosa y convertir un 90% de éstas en cantidades equimoleculares de alcohol y dióxido de carbono. La ecuación 1 muestra este tipo de fermentación.



Para que esto se lleve a cabo, además de la presencia de la levadura, se deben considerar algunas condiciones para la producción como: la concentración de azúcares, la ausencia de oxígeno (O_2), la presencia de fosfatos, el control de temperatura entre $15\text{ }^\circ\text{C}$ y $25\text{ }^\circ\text{C}$. Debido a que es un proceso exotérmico, emite energía en forma de calor y al sobrepasar este nivel de temperatura, las levaduras comenzarían a morir, iniciando con esto la última etapa del proceso de fermentación [Katz, 2012]. En la producción de etanol se deben contemplar más compuestos y variables, que al aumentar o disminuir sus concentraciones, modifican el porcentaje de alcohol generado. Esto puede generar que no se obtenga el producto con las características sensoriales deseadas [Méndez, 2022]. Una de las variables que intervienen en este proceso, es la agitación, debido a que causa efectos conforme a la intensidad y fase específica en que se aplique. Además, ayuda a reducir la acumulación de metabolitos secundarios como ésteres no deseados, que podrían perturbar la producción y las características sensoriales del producto final [Vejarano, 2019]. En fermentaciones industriales, las levaduras tienden a sedimentarse en el fondo del tanque, por lo que, al aplicar una agitación, se evita este acumulamiento. La agitación propicia una distribución uniforme de los insumos que se emplean dentro del fermentador. Esto facilita que las levaduras accedan a los recursos necesarios. De esta manera se promueve el crecimiento de la biomasa, un consumo controlado de sustrato y una fermentación que cumpla con las características específicas del producto final. De igual manera, la agitación contribuye a que la temperatura sea uniforme en todo el fermentador, conservando las condiciones óptimas de temperatura que requiere el microorganismo para su actividad [Malvasi, 2022], [Zhou, 2018].

Es importante mencionar que, de acuerdo con el microorganismo y producto final deseado, dependerá la intensidad y momento en que intervendrá la agitación. Por lo que una velocidad inapropiada tendrá efectos negativos en la calidad y rendimiento del producto final [Rollero, 2018], [Silva, 2010], [Zhang, 2015]. El proceso fermentativo se desarrolla en cuatro fases principales denominadas de la siguiente forma: latencia, exponencial, estacionaria y de muerte. Las cuales se pueden estudiar mediante modelos matemáticos que logren describir su dinámica a través del tiempo [Himeoka, 2017], [Maier, 2015]. Esto brinda información fundamental para el productor y el consumidor, es decir, la vida útil del producto, caducidad y su calidad.

Existen dos métodos utilizados para la producción de etanol, la fermentación por lotes y la fermentación continua. Ambos métodos se basan en la capacidad de las levaduras para convertir el azúcar del sustrato disponible en etanol, a través de un proceso bioquímico. La fermentación alcohólica por lotes se configura como un proceso intrínsecamente repetitivo y sistemático, donde una cantidad única de sustrato se introduce en un equipo fermentador. En este equipo los microorganismos presentes metabolizan el sustrato, principalmente durante la fase exponencial de su crecimiento. El resultado primario de este proceso es la generación de etanol como producto final. Al concluir cada ciclo de fermentación, se extrae el producto final del fermentador, marcando el fin de un lote.

Por otro lado, en la fermentación continua las levaduras se mantienen exclusivamente en su fase exponencial de crecimiento, ya que es en la que se produce el etanol. Una vez que se obtiene el producto final, éste se extrae del fermentador y a su vez se agrega al sistema un flujo constante de sustrato, lo que permite que los microorganismos se mantengan en su fase de crecimiento exponencial óptima y se maximice la producción de etanol [Escalante, 2011].

Dada la importancia que tiene la generación de productos a través de las fermentaciones alcohólicas, el objetivo del presente trabajo es analizar el efecto que tiene la agitación durante el proceso de fermentación al variar la velocidad de agitación y su efecto en las variables que en el intervienen.

2. Métodos

En esta sección, se describen; a) el origen de los datos experimentales, la dinámica de crecimiento de la levadura empleada, las características del medio de cultivo y el equipo de laboratorio empleado para la toma de mediciones; b) la propuesta del modelo matemático, así como la descripción de los elementos que intervienen en él, junto con sus valores y unidades de medición; c) y el proceso de estimación de ajuste de los parámetros del modelo formulado, lo cual se realiza mediante un algoritmo de regresión no lineal desarrollado en MATLAB, utilizando como base la función *lsqcurvefit* [MathWorks, 2023] y los datos experimentales de la fermentación alcohólica.

Datos experimentales

Los datos experimentales de la cinética de crecimiento para la levadura *Pichia fermentans* consisten en las mediciones realizadas en tres variables, biomasa [$x(t)$], concentración de sustrato [$y(t)$] y producción de etanol [$z(t)$]. Estos datos fueron proporcionados por el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Unidad de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Durango (UPIDET). Las propiedades del medio de fermentación fueron proporcionadas por el medio químicamente definido (MDQ), principalmente, por glucosa. Para la preparación de inóculos, conservación y activación de las cepas se utilizó el medio *Yeast Peptone Dextrose* (YDP), esta última se llevó a cabo en caja Petri durante 12 h a 28 °C y en la conservación se empleó el medio YDP al 50% de glicerol en crioviales a -70 °C. Respecto a la obtención de inóculos de la cepa seleccionada, ITD00165, se emplearon frascos serológicos de 120 ml. Con un volumen de trabajo de 70 ml de MDQ, inoculados con 1×10^8 células/ml viables de *Pichia fermentans*. Después, se realizaron ensayos en matraces de 250 ml con un volumen de trabajo de 200 ml de MDQ inoculados con 1×10^8 células/ml viables de *Pichia fermentans*. Finalmente, se procedió a realizar el conteo de células de levaduras en una cámara Neubauer, para el conteo en el microscopio, obteniendo pellets de 1×10^6 células/ml. Como parte de la evaluación sobre el crecimiento celular de gramos por litro, se elaboró una curva de peso seco de la levadura *Pichia fermentans*. Las

muestras obtenidas en la fermentación se analizaron por espectrofotometría con un equipo HACH DR 6000 a una longitud de onda única de 600 nm. La fase de fermentación se llevó a cabo por duplicado, a una concentración de 35 g/l de sustrato para diferentes velocidades de agitación a 100, 125 y 150 rpm [Paredes, 2022].

En cuanto a la cuantificación para determinar la concentración de glucosa $[y(t)]$ y etanol $[z(t)]$, las muestras fueron analizadas por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en el equipo de la marca Agilent technologies 1200 series [Pássaro, 2016]. Para realizar la separación de los compuestos producidos se usó una columna Carboximix H-NP10 con los siguientes parámetros de operación: Flujo de 0.6 ml/min y a un volumen de inyección de 1 μ l, como fase móvil se empleó una solución de ácido sulfúrico al 5 mM, esta concentración se calculó interpolando el área bajo la curva del pico correspondiente en curva patrón de dicho compuesto. Las mediciones fueron realizadas cada 3 h entre las 0 y 24 h y después cada 6 h hasta alcanzar las 42 h [Paredes, 2022].

Modelo mecanicista

El modelo mecanicista *Pichia fermentans* (PF) es propuesto para proporcionar una descripción detallada y completa de la dinámica de la fermentación alcohólica en la que interviene la levadura *Pichia fermentans*, junto con el efecto que causa la variación de la velocidad de agitación. La fermentación alcohólica es un proceso bioquímico anaeróbico, lo que significa que ocurre en la ausencia del oxígeno, durante el cual, los azúcares presentes en el sustrato se descomponen utilizando microorganismos llamados levaduras (biomasa). A medida que las levaduras metabolizan los azúcares, se generan diversos productos, siendo los metabolitos primarios más comunes el alcohol etílico y el dióxido de carbono, y metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los siguientes: glicerol, que contribuye a la textura y suavidad del producto final; ésteres, ácidos orgánicos y acetaldehído, los cuales influyen en el aroma, sabor y estabilidad del producto [Mas, 2014].

El modelo PF se basa en un conjunto de tres ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden, las cuales describen de manera matemática las interacciones y

procesos que ocurren durante la fermentación alcohólica. Lo que permite emular y predecir el comportamiento de la levadura *Pichia fermentans* en diferentes condiciones de fermentación, ecuaciones 2, 3 y 4.

$$\dot{x} = \rho_1 x - \rho_2 x z \quad (2)$$

$$\dot{y} = -\rho_3 x y - \rho_4 y \quad (3)$$

$$\dot{z} = \rho_5 x y + \rho_6 z y (1 - \rho_7 z) \quad (4)$$

Donde

$x(t)$: Levadura (biomasa)

$y(t)$: Sustrato (glucosa)

$z(t)$: Producto (etanol)

$\rho_1 - \rho_7$: Parámetros del modelo (Tabla 1)

Tabla 1 Descripción y unidades para las variables y parámetros del modelo.

Variables y Parámetros	Descripción	Unidades
$x(t)$	Concentración de biomasa	g/l
$y(t)$	Concentración de glucosa	g/l
$z(t)$	Concentración de etanol	g/l
ρ_1	Tasa máxima de crecimiento de la biomasa	h^{-1}
ρ_2	Tasa de inhibición del crecimiento de la biomasa debido a la acumulación de etanol	$\frac{l}{gh}$
ρ_3	Tasa de consumo de sustrato	$\frac{l}{gh}$
ρ_4	Tasa de descomposición espontanea de sustrato	h^{-1}
ρ_5	Tasa de producción de etanol asociada al crecimiento de biomasa por el consumo de sustrato	$\frac{l}{gh}$
ρ_6	Tasa máxima de producción de etanol	h^{-1}
ρ_7	Inverso del máximo producción de etanol	h^{-1}

Fuente: elaboración propia.

Cada variable de estado [$x(t)$, $y(t)$ y $z(t)$] está expresada en una concentración de g/l y la unidad de tiempo del sistema está medida en horas.

Considerando los resultados de Leenher y Aeyels (ver sección II.A en [De Leenheer, 2001]), todas las soluciones del sistema con condiciones iniciales no negativas, es decir, $x(0), y(0), z(0) \geq 0$, se ubicarán en el octante no negativo como se define en la ecuación 5.

$$R_{+,0}^3 = \{x(t), y(t), z(t) \geq 0\} \quad (5)$$

Con base en el comportamiento biológico de las variables consideradas para el modelo, biomasa, sustrato y etanol, se supone que valores negativos en las soluciones no son biológicamente factibles. Además, estas variables tampoco pueden crecer de manera exponencial hacia el infinito, por el contrario, se deben de considerar sus límites biológicos, los cuales se discutirán en la próxima sección.

La relación de la concentración del sustrato inicial y_0 y las variaciones en la velocidad de agitación (r), se determinaron con la ayuda de *Eureqa* [Eureqa, 2023], software de inteligencia artificial basado en algoritmos genéticos. Se definió la ecuación 6 para el parámetro ρ_1 .

$$\rho_1 = 0.0107 r - 0.5457 - 1.4787^{-5} r y_0 - 4.0181^{-5} r^2 \quad (6)$$

Con la ecuación 6 se establece la relación que presenta la variación de la agitación (r), la concentración de sustrato [$y(t)$] respecto al crecimiento de la biomasa [$x(t)$]. Por lo tanto, los parámetros y las variables que intervienen en el sistema descrito por las ecuaciones del modelo *Pichia fermentans* (PF) 2, 3 y 4, se describen en la tabla 1.

El modelo matemático describe la relación que existe entre la concentración de biomasa [$x(t)$], consumo de sustrato [$y(t)$] y producción de etanol [$z(t)$] con respecto al tiempo. La ecuación 2 describe la dinámica de la biomasa, en la cual, se tienen dos parámetros ρ_1 y ρ_2 . El parámetro ρ_1 representa el rango máximo de crecimiento de esta variable en función de la agitación y la concentración inicial del sustrato. El parámetro ρ_2 es de signo negativo porque representa la muerte biológica de la biomasa, por la propia generación del metabolito primario (etanol). Siendo este último un factor de toxicidad descrito por la ley de acción de masas [Chou, 2011]. Para la dinámica del sustrato en la ecuación 3, se empleó el modelo de decrecimiento exponencial, ρ_3 describe el comportamiento de sistemas biológicos debido al consumo de sustrato por la biomasa para su crecimiento; el parámetro ρ_4 describe la degradación del sustrato debido a que no hay más suministro de éste por ser un proceso de fermentación por lotes [Wolfenden, 2008]. En cuanto a la dinámica del producto de la ecuación 4, el término ρ_5 se refiere a la producción de etanol derivado del crecimiento de biomasa por el consumo de

sustrato; para los parámetros ρ_6 y ρ_7 se utilizó la ecuación de crecimiento logístico [Wang, 2020]; a parte, ρ_6 representa el crecimiento exponencial inicial, en el cual, la producción de etanol crece proporcionalmente a su tamaño actual; ρ_7 introduce un factor de limitación que ajusta la tasa de crecimiento a medida que el producto final se acerca a su capacidad de carga.

Estimación de los parámetros

En esta sección se describe la metodología aplicada para la estimación de los valores numéricos para los parámetros del sistema PF. Primero, se realiza una revisión de la literatura y se encuentra información experimental sobre la vida media del sustrato empleado en la fermentación alcohólica. Se encuentra que la vida media ($t_{1/2}$) es de 96 años [Wolfenden, 2008], por lo tanto, al considerar una cinética de primer orden se obtiene el siguiente resultado para la tasa de descomposición descrita por el parámetro ρ_4 como se muestra en la ecuación 7, consiguiendo la constante que se utilizara en el modelo PF.

$$\rho_4 = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} = 824.2332 \times 10^{-9} \text{ h}^{-1} \quad (7)$$

Para la determinación de los valores de los parámetros ρ_i , $i = 2, 3, 5$ y 6 ; se aplica el método de Euler [Burden, 2015] a las ecuaciones 2 a 4 y se obtiene el sistema de ecuaciones 8,9,10, donde $\Delta_t = 1 \times 10^{-3}$.

$$x_{i+1} = x_i + (\rho_1 x_i - \rho_2 x_i z_i) \Delta_t \quad (8)$$

$$y_{i+1} = y_i + (-\rho_3 x_i y_i - \rho_4 y_i) \Delta_t \quad (9)$$

$$z_{i+1} = z_i + (\rho_5 x_i y_i + \rho_6 z_i y_i (1 - \rho_7 z_i)) \Delta_t \quad (10)$$

Con estos resultados se desarrolló un algoritmo en MATLAB para poder realizar el ajuste de los parámetros con los datos experimentales mediante una regresión no lineal con la función *lsqcurvefit*. Los valores iniciales para cada uno de los parámetros ρ_i (excepto ρ_4), se establecieron en 1×10^{-2} . Para la optimización de las funciones, se tomaron en cuenta las siguientes condiciones: *max function evaluations* = 500, *max iterations* = 500, *function tolerance* = 1×10^{-12} y *step tolerance* = 1×10^{-12} .

Para la estimación del coeficiente de determinación, comúnmente conocido como R^2 , se utilizó la ecuación 11.

$$R^2 = 1 - \frac{SSR}{SST} \quad (11)$$

Donde SSR (*suma de cuadrados de la regresión*) es la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores ajustados por el modelo y la media de la variable dependiente, y SST (*suma de cuadrados totales*) es la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores reales de la variable dependiente y su media, el resultado final va expresado en valores que oscilan entre 0 y 1 [Palma, 2022].

3. Resultados

En esta sección, se muestran los resultados correspondientes a la estimación de los parámetros y la experimentación *in silico* para ilustrar el ajuste de las soluciones del sistema PF (2 a 4) a los datos experimentales. Cabe destacar que los datos experimentales fueron promediados (debido a que se contaba con dos muestras por unidad de tiempo) y normalizados para evitar el sesgo entre las diferentes escalas de magnitud de las variables. El efectuar una comparación entre los datos experimentales y los datos aproximados generados en las simulaciones numéricas, permiten validar la precisión y confiabilidad del modelo PF propuesto, facilitando la comprensión del comportamiento del sistema durante el proceso de fermentación alcohólica.

Las simulaciones numéricas se utilizan para representar visualmente los resultados cualitativos. En la tabla 2, se muestran los resultados obtenidos de la regresión no lineal cuando se ajusta el modelo PF, ecuaciones 2 a 4, a los datos experimentales de la fermentación alcohólica, para cada una de las velocidades de agitación: 100, 125 y 150 *rpm*, y para cada uno de los parámetros del modelo propuesto. De acuerdo con los resultados se observa que, al incrementar la velocidad de agitación, los parámetros ρ_i (excepto ρ_4) varían conforme a la propia dinámica biológica que está represente. Se observa que el parámetro ρ_1 conforme aumentó la velocidad de agitación de 100 a 125 *rpm*, la velocidad de crecimiento microbiano se incrementó hasta 0.1652 h^{-1} . La inhibición al crecimiento de la biomasa debido a la acumulación

de etanol producido, identificado como ρ_2 , el valor más alto se presentó a 125 rpm con $0.1854 h^{-1}$.

Tabla 2 Valores estimados de los parámetros mediante el algoritmo.

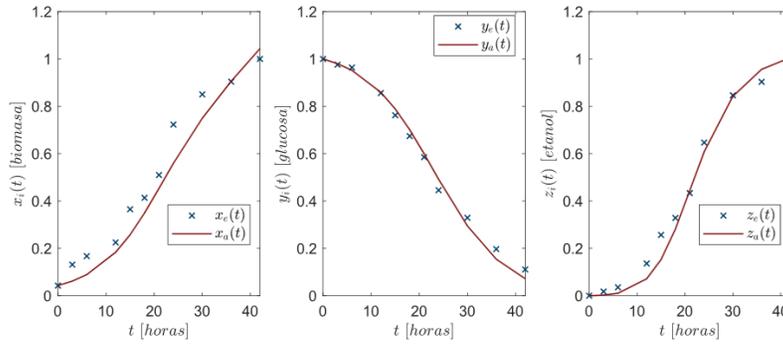
Parámetros	100 rpm	125 rpm	150 rpm
ρ_1	0.1234	0.1652	0.1567
ρ_2	0.1013	0.1854	0.1590
ρ_3	0.1300	0.1058	0.0985
ρ_5	0.0105	0.01876	0.0224
ρ_6	0.3110	0.2783	0.2705
ρ_7	0.7999	0.9111	0.9696

Fuente: elaboración propia.

La variable ρ_3 indica que la tasa de consumo de sustrato fue menor conforme se incrementó la velocidad de agitación. En el análisis de la dinámica de crecimiento del etanol, el parámetro ρ_5 indicó un alto nivel de producción de etanol a mayor agitación, debido a la conversión de los azúcares del sustrato en alcohol, al ser consumido por la biomasa con un valor estimado de $0.0224 \frac{l}{gh}$ para la velocidad de agitación de 150 rpm. El parámetro ρ_6 , a menor velocidad de agitación se observó una mayor velocidad de producción de etanol; sin embargo, el parámetro ρ_7 estableció el límite de esta producción con un valor de $0.9696 \frac{l}{gh}$.

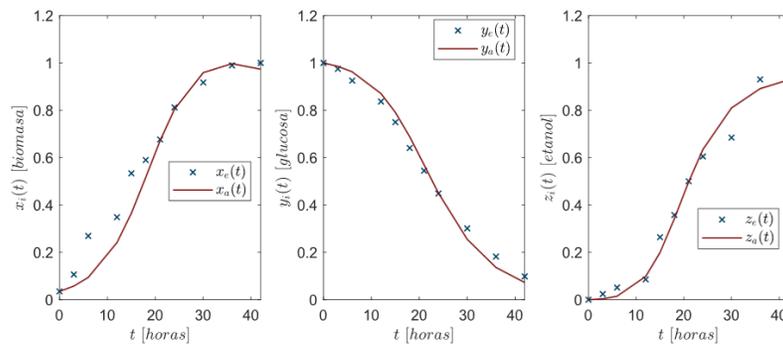
En las figuras 1, 2 y 3, se ilustran los resultados de la experimentación *in silico*, para las tres velocidades de agitación 100, 125 y 150 rpm respectivamente. Los datos experimentales se identifican con el marcador x, mientras que la línea continua representa los datos aproximados por el sistema PF, ecuaciones 2 a 4. Las unidades del tiempo en el eje x de cada solución están dadas en horas, mientras que el eje y está normalizado para cada una de las variables. Se observa de manera gráfica el ajuste generado por el modelo para cada una de las variables analizadas: biomasa $[x(t)]$, sustrato $[y(t)]$ y etanol $[z(t)]$, para cada una de las velocidades de agitación que se tuvieron durante el experimento.

La validación del modelo PF se realizó con el coeficiente de determinación o R^2 , el cual suministra un valor que permite contemplar de manera cuantitativa la capacidad de ajuste del modelo PF a los datos experimentales.



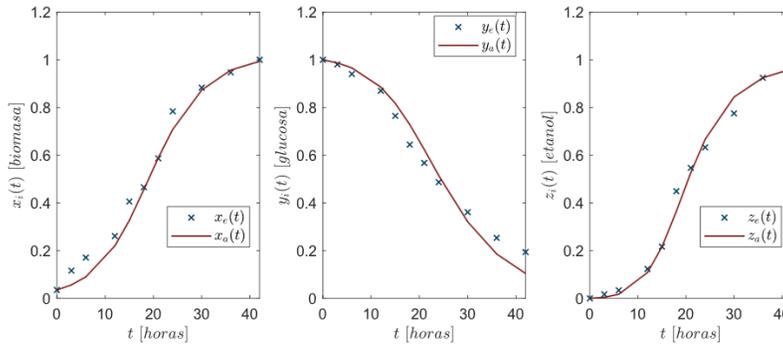
Fuente: elaboración propia.

Figura 1 Datos experimentales vs datos estimados a una agitación de 100 rpm.



Fuente: elaboración propia.

Figura 2 Datos experimentales vs datos estimados a una agitación de 125 rpm.



Fuente: elaboración propia.

Figura 3 Datos experimentales vs datos estimados a una agitación de 150 rpm.

La tabla 3, muestra los valores de R^2 , calculado entre los datos aproximados del modelo PF y los datos experimentales de la fermentación alcohólica. Se observa el coeficiente de determinación del modelo para cada una de las variables con respecto a la velocidad de agitación, para la biomasa $[x(t)]$ un valor mayor a 0.93, para el sustrato $[y(t)]$ mayor a 0.96 y para el etanol $[z(t)]$ mayor a 0.97.

Tabla 3 Coeficiente de determinación R^2 para cada una de las variables del sistema.

Velocidad de agitación (rpm)	Biomasa [$x(t)$]	Sustrato [$y(t)$]	Etanol [$z(t)$]
100	0.9383	0.9916	0.9839
125	0.9323	0.9882	0.9775
150	0.9802	0.9663	0.9889

Fuente: elaboración propia.

4. Discusión y conclusiones

El modelo mecanicista PF establece la relación biológica que existe entre las variables de biomasa [$x(t)$], glucosa [$y(t)$], etanol [$z(t)$] y el efecto causado por la agitación (r) en el proceso de la fermentación alcohólica por lotes. Para la obtención de los datos experimentales se utilizó la levadura *Pichia fermentans*, a una concentración de 35 g/l de sustrato para diferentes velocidades de agitación: 100, 125 y 150 rpm. Con estos datos, se desarrolló un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden. Este modelo facilita estimar los datos aproximados conforme transcurre el tiempo en la fermentación alcohólica. El modelo permitió obtener predicciones sobre la dinámica del proceso para cada variable. La validez del modelo se verificó mediante su coeficiente de determinación superior a 0.9. El efecto de la velocidad de agitación al emplear la levadura *Pichia fermentans*, tiene un efecto significativo en este proceso de fermentación alcohólica, ya que promueve la distribución de los nutrientes. Se puede observar en la tabla 2, que el parámetro de la tasa máxima de crecimiento de la biomasa ρ_1 , fue mayor a una velocidad intermedia: 125 rpm. Por lo tanto, al aumentar la concentración de biomasa provoca una rápida producción de etanol, indicado en el incremento del parámetro ρ_5 . El parámetro ρ_2 , presenta su máximo valor a 125 rpm lo que indica que se alcanza la tasa de inhibición del crecimiento de biomasa por la acumulación de etanol en el proceso de fermentación. En el caso de la agitación a 100 rpm, se observa que la tasa de producción de etanol es la menor ρ_5 , al igual que el inverso de la máxima producción de etanol ρ_7 . Por lo que la velocidad de agitación determina las variaciones de los coeficientes ligados a la producción de etanol y la velocidad de crecimiento de la biomasa. Además, estas características dependerán del tipo de levadura, condiciones específicas del proceso y de la calidad o particularidades que se pretendan del producto final.

Agradecimientos

El primer autor agradece a CONACyHT por la beca otorgada para la realización de su tesis de maestría. Este trabajo ha sido apoyado por los proyectos: TecNM 16803.23-P. Aplicación de los gemelos digitales para el análisis y control de sistemas biológicos y TecNM 17428.23-P. Modelizado de sistemas no lineales para procesos de fermentación basados en la dinámica de crecimiento de microorganismos.

6. Bibliografía y Referencias

- [1] Burden, R. L., Faires, J. D., and Burden, A. M. Numerical analysis. Cengage learning, 9th edition, 2015.
- [2] Chou, T. C., (2011). The mass-action law based algorithms for quantitative econo-green bio-research. *Integrative Biology*, 3(5), 548-559.
- [3] De Leenheer, P., & Aeyels, D., (2001). Stability properties of equilibria of classes of cooperative systems. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 46(12), 1996-2001.
- [4] Escalante, W. E., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama Polo, E., & Hatta Sakoda, B., (2011). Estudio de la actividad fermentativa de *Hansenula anomala* y producción de compuestos químicos de importancia sensorial. *Revista peruana de Biología*, 18(3), 325-334.
- [5] Eureka, Ecuaciones Diferenciales. <https://www.nutonian.com/>, accessed Jun. 21, 2023.
- [6] Himeoka, Y., & Kaneko, K., (2017). Theory for transitions between exponential and stationary phases: universal laws for lag time. *Physical Review X*, 7(2), 021049.
- [7] Katz, S. E., (2012). *The art of fermentation: an in-depth exploration of essential concepts and processes from around the world*. Chelsea Green Publishing. Vermont, USA.
- [8] Maier, R. M., & Pepper, I. L., (2015). Bacterial growth. In *Environmental microbiology* (pp. 37-56). Academic Press.

- [9] Malavasi, M., Cattani, L., Bozzoli, F., & Rainieri, S., (2022). Development of an innovative temperature control system in a fermenter: application to the case of the wine industry. In *Journal of Physics: Conference Series*, Vol. 2177, No. 1, p. 012036. IOP Publishing.
- [10] Mas, A., Guillamon, J. M., Torija, M. J., Beltran, G., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. *BioMed Research International*, 2014.
- [11] MathWorks. (n.d), *Sistemas Dinámicos*, 2022. <https://www.mathworks.com/discovery/dynamic-systems.html>.
- [12] Medeiros, A. B. P., Rossi, S. C., Bier, M. C. J., Martínez-Burgos, W. J., & Soccol, C. R., (2022). Microencapsulation of aroma compounds produced by *Pichia fermentans*. *Dyna*, 89(220), 163-171.
- [13] Méndez-Zamora, A., Gutiérrez-Avendaño, D. O., Arellano-Plaza, M., De la Torre González, F. J., Barrera-Martínez, I., Gschaedler Mathis, A., & Casas-Godoy, L., (2020). The non-Saccharomyces yeast *Pichia kluyveri* for the production of aromatic volatile compounds in alcoholic fermentation. *FEMS Yeast Research*, 20(8), foaa067.
- [14] Palma, R. P., (2022). Análisis crítico del coeficiente de determinación (R²), como indicador de la calidad de modelos lineales y no lineales. *Matemática*, 20(2).
- [15] Paredes-Ortíz, A., Olvera-Martínez, T. G., Páez-Lerma, J. B., Rojas-Contreras, J. A., Moreno-Jiménez, M. R., Aguilar, C., & Soto-Cruz, N. O., (2022). Isoamyl acetate production during continuous culture of *Pichia fermentans*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 21(1), 1-16.
- [16] Pássaro Carvalho, C. P., Rivera Narváez, C. M., Román Páez, M. A., Cardona Bermúdez, L. M., Muñoz Echeverri, L. M., Gómez, D. D., ... & Rojas Bedoya, L. C., (2016). Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones.
- [17] Rentería-Martínez, O., Páez-Lerma, J. B., Rojas-Contreras, J. A., López-Miranda, J., Martell-Nevárez, M. A., & Soto-Cruz, N. O., (2021). Enhancing

- isoamyl acetate biosynthesis by *Pichia fermentans*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 20(2), 621-633.
- [18] Rollero, S., Roberts, S., Bauer, F. F., & Divol, B., (2018). Agitation impacts fermentation performance as well as carbon and nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* under winemaking conditions. *Australian journal of grape and wine research*, 24(3), 360-367.
- [19] Silva, J. P. A., Mussatto, S. I., & Roberto, I. C., (2010). The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162, 1306-1315.
- [20] Soto-Cruz, N. O., Paredes-Ortíz, A., and Páez-Lerma, J. B.. Alcoholic Fermentation, in *Advances in Food Bioproducts and Bioprocessing Technologies*, CRC Press, pp. 265–280, 2019.
- [21] Vejarano, R., Gil-Calderón, A., & Morata, A., (2019). Bioconversion and effect of metabolic inhibitors on secondary metabolites production during alcoholic fermentation [Bioconversión y efecto de inhibidores metabólicos sobre la producción de metabolitos secundarios durante la fermentación alcohólica].
- [22] Wang, P., Zheng, X., Li, J., & Zhu, B., (2020). Prediction of epidemic trends in COVID-19 with logistic model and machine learning technics. *Chaos, Solitons & Fractals*, 139, 110058.
- [23] Wolfenden, R., & Yuan, Y., (2008). Rates of spontaneous cleavage of glucose, fructose, sucrose, and trehalose in water, and the catalytic proficiencies of invertase and trehalas. *Journal of the American Chemical Society*, 130(24), 7548-7549.
- [24] Zhang, Q., Wu, D., Lin, Y., Wang, X., Kong, H., & Tanaka, S., (2015). Substrate and product inhibition on yeast performance in ethanol fermentation. *Energy & Fuels*, 29(2), 1019-1027.
- [25] Zhou, Y., Han, L. R., He, H. W., Sang, B., Yu, D. L., Feng, J. T., & Zhang, X., (2018). Effects of agitation, aeration and temperature on production of a novel glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasensis* ZX01 and scale-up based on volumetric oxygen transfer coefficient. *Molecules*, 23(1), 125.