

**Títol del treball:**

**Litost: Development of a simulation app of kinetic tendencies**

---

Estudiant: Sara Azidane Chenlo

Grau en Biotecnología

Correu electrònic: sara.azidane@gmail.com

Tutor: Jesus Colprim

Cotutor\*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor\*):

Nom del tutor:

Nom del cotutor\*:

Empresa / institució:

Correu(s) electrònic(s):

\*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

## Abstract

The current need to improve the conditions for studying the production of biotechnological products highlights the need to create kinetic trends simulators in upstream processes. For this reason, in this project, the programming of a Shiny web app using R language is carried out, which allows numerical calculation and graphing of the design equations of the different types of reactors.

R is an object-oriented statistical programming language, which allows the installation of pre-built libraries that facilitate script writing. These libraries have a wide potential for action and application, and in the development of this project, dSolve libraries were used to solve systems of differential equations, ggplot2 to plot the results, and the package Shiny, which allows generating the joint file interface and server, which together compute the web app.

The type of biorreactor studied includes: batch, feed-batch and chemostate. The first one has no external output or flow rate input, so the reactor volume remains constant. Feed-Batch, as the name implies, refers to a batch reactor that only has an inlet but no output flow. Chemostate, on the other hand, has both outlet and inlet flow, which is why it is also called a continuous reactor (without biomass retention). Calculations are made taking into account the reaction rate equation and the mass balances of each reactor ( $OUTPUT + ACCUMULATION = INPUT + GENERATION$ ). In addition, other factors such as the association of product formation with metabolism, calculations of the specific reaction speed or enzyme inactivation must be taken into account when defining the model. In this way, the batch and feedbatch reactor types present model equations in which the results of product, biomass and substrate are calculated using systems of simple differential equations as a function of time, while the chemostate establishes the result of these variables as a function of the dilution rate from systems of non-linear equations. One of the main objectives in the development of the project has been to maintain the premise of simplicity and clarity of the interface, thus making accessible to the user a global vision of how the different parameters affect with the whole process.

# 1 ÍNDICE

Abstract .....	1
1. Introducción .....	3
1.1 Importancia de los biorreactores dentro de los procesos de producción .....	3
1.2 Tipo de proceso .....	4
1.3 Modo de operación .....	5
1.3.1 Batch.....	5
1.3.2 Feed-batch.....	6
1.3.3 Quimioestado.....	6
1.4 Ingeniería de biorreactores.....	7
1.4.1 Los parámetros de operación.....	7
1.4.2 Parámetros estequiométricos.....	8
1.4.3 Parámetros cinéticos.....	8
2 Ética y sostenibilidad .....	10
3 Objetivo:.....	11
4 Metodología .....	12
4.1 Lenguaje R y Shiny apps .....	12
4.1.1 Shiny:.....	13
4.1.2 ggplot2: .....	14
4.1.3 deSolve:.....	15
4.2 Balances.....	16
4.2.1 Batch: Cinética enzimática: .....	18
4.2.2 Batch: Cinética celular .....	18
4.2.3 Feed-Batch: Cinética celular .....	20
4.2.4 Quimioestado: Cinética celular .....	21
5 Resultados .....	22
5.1 Ejemplos de estudio: .....	25
6 Conclusions .....	27
7 Bibliografía .....	27

## 1. Introducción

Con la finalidad de poder controlar los procesos de fermentación que tienen lugar en los biorreactores, se establecen modelos matemáticos, que permiten realizar un control del sistema más allá de las observaciones ambientales. Teniendo en cuenta que el proceso en cuestión es de naturaleza biológica, es complicado establecer modelos en función de variables complejas que dependen de procesos celulares. Además, aparece el problema añadido de que numerosos parámetros que influyen en la evolución de la fermentación han sido poco estudiados o no se conoce cuál es su grado de incidencia en el resultado y valoración final del proceso. Por este motivo la modelización de bioprocesos son aproximaciones, establecidas a partir de resultados empíricos, más que a leyes teóricas de funcionamiento.

Aunque los modelos pueden diferir dependiendo del tipo de proceso, la característica que los engloba a todos es que computan y valoran las salidas en función del conjunto de entradas en el sistema, es decir, balances de masa y energía.

En los bioprocesos se combina las técnicas y diseño de la ingeniería con las capacidades de producción biológica de diferentes microorganismos. Para ello se emplean como entorno los biorreactores, recipientes o sistemas que mantienen un ambiente biológicamente activo, en los que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. En términos generales, un biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etcétera) al organismo o sustancia química que se cultiva. Este proceso puede ser aerobio o anaerobio. (Torregrosa López, 2018)

### 1.1 Importancia de los biorreactores dentro de los procesos de producción

Los procesos biotecnológicos se pueden dividir en diferentes fases o momentos, cada una de las cuales supone un coste que repercute en el coste global de producción. Cada proceso puede divergir en sus características, pero se mantiene como constante el hecho de que el proceso de fermentación o reacción (*upstream*) es el que marca el precio final del coste de la producción. Esto se debe a que, en comparación, el resto de las fases del proceso suponen un aporte mínimo en el sumatorio final. En algunos casos, la reacción o fermentación puede suponer hasta el 90% del coste final. (Doran, 2013)

Para ello es necesario que en la fase de investigación y desarrollo se optimice al máximo la producción y el coste de la segunda fase. Para ello, resulta sumamente útil emplear modelos de

simulación que corren bajo los algoritmos correctos en los cuales se tengan en cuenta las numerosas variables que pueden intervenir en un sistema biológico. Los procesos de estudio se computan mediante softwares que solucionan las ecuaciones de balances de materia y energía, tanto en estado estacionario o dinámico. (Torregrosa López, 2018)

Las dinámicas llevadas a cabo dentro de biorreactores pueden ser clasificadas en dos términos diferentes: según su modo de operación o su tipo de proceso.

## 1.2 Tipo de proceso

El tipo de proceso se refiere a la naturaleza del catalizador, es decir, al elemento que facilita la transformación de sustrato en producto, y puede ser enzimática o celular.

En el caso de que el proceso sea de tipo enzimático este se regirá mediante el modelo cinético de Michaelis-Menten, el cual propone que las reacciones catalizadas constan de dos etapas, una primera en la que se forma el complejo enzima sustrato y otra en la que este complejo se transforma en producto y enzima. Empleando los cálculos del modelo de Michaelis-Menten se pueden calcular las velocidades de reacción del proceso.

$$\text{Ecuación (1)} \quad V = \frac{V_{m\acute{a}x} \times S}{K_m + S}$$

*V*: velocidad de reacción g/Lh

*V<sub>máx</sub>*: Velocidad máxima de reacción. g/L·h

*K<sub>m</sub>*: Constante de Michaelis-Menten. g/L

*S*: concentración de sustrato. g/L

Existen tres grupos principales de reacciones enzimáticas: enzima soluble-sustrato insoluble, enzima insoluble-sustrato soluble, enzima soluble-sustrato soluble, siendo estas últimas las empleadas en bioprocesos ya que son reacciones homogéneas en fase líquida.

En el caso contrario de que el proceso sea de tipo celular, las dinámicas de este sistema se fundamentarán en cinéticas de Monod, cuya ecuación es similar a la del modelo cinético.

$$\text{Ecuación (2).} \quad \mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \times S}{K_s + S}$$

*μ*: velocidad específica de crecimiento. g/g·h(h<sup>-1</sup>)

*μ<sub>máx</sub>*: Velocidad específica máxima de crecimiento. g/g·h (h<sup>-1</sup>)

*K<sub>s</sub>*: Constante de Afinidad. g/L

*S*: concentración de sustrato. g/L

El modelo de Monod para la velocidad de crecimiento es matemáticamente análoga a la ecuación de Michalis-Menten.

### 1.3 Modo de operación

El modo de operación hace referencia a como el sustrato es alimentado al tanque, que puede ser batch, feed-batch o continuo.

#### 1.3.1 Batch

El reactor en batch (*por lotes* en su traducción literal del inglés) es un tipo de sistema que se caracteriza por no tener entradas ni salidas de material líquido o sólido, y en el cual el sustrato de la reacción se agrega al comienzo del proceso, y los productos se eliminan al final. Funcionan,

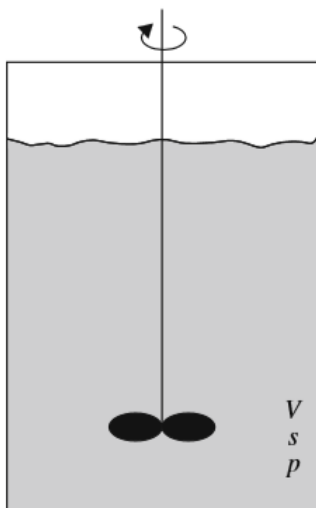


Figura 1. Esquema biorreactor en Batch. (Doran, 2013)

por tanto, a volumen constante. Cabe señalar que las reacciones aeróbicas no se pueden considerar operaciones en batch en el sentido estricto de la palabra, debido al requerimiento constante de oxígeno y eliminación de dióxido de carbono y otros gases residuales. De todas formas, debido al hecho de que la entrada es la fase gas (aporte de oxígeno), se mantiene igualmente la clasificación como batch para las reacciones aeróbicas, al considerar únicamente el balance de la fase líquida.

Para evitar agregaciones o gradientes diferenciales de concentraciones dentro del biorreactor, se establece el concepto de reactor mixto, que es aquel que contiene algún elemento que mantenga las concentraciones de sustrato, catalizador y producto uniformes en todo el volumen del recipiente. El más común en batch es por tanque agitado, aunque también se pueden emplear columna de burbujas o air-lift.

El coste que conlleva la operación en este tipo de reactor depende del tiempo de batch, es decir, del tiempo que se tarde en alcanzar la concentración de producto deseada o el nivel de

conversión del sustrato. Es, por lo tanto, un recurso altamente útil la predicción de dicho tiempo, ya que a menor tiempo de batch, menor coste de la operación.

### 1.3.2 Feed-batch

En este tipo de equipo, tal y como su nombre indica, se establece una alimentación (continua o no) en el reactor de tipo batch. No existe salida del sistema, y el producto se recoge al final de la operación, tal y como ocurre en el caso anterior. Este tipo de alimentación permite que no se

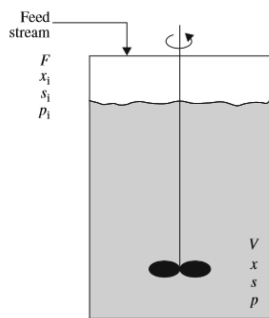


Figura 2. Esquema de biorreactor en feed-batch.

alcancen altas tasas de crecimiento, cualidad altamente positiva en el caso de fermentaciones con altas tasas de requerimiento aerobio o cuando altas concentraciones de sustrato inhiben la reacción.

Con motivo de la integración del caudal afluente, en las ecuaciones de diseño se ha de tener en cuenta la entrada de nuevo caudal al volumen establecido, pero en la cual se contemple que no existe salida del reactor.

### 1.3.3 Quimioestato

El reactor en quimioestato implica un flujo constante de entra y salida del sistema, y una teórica agitación perfecta. Por tanto, se determina que en todos los puntos del reactor se establece una uniformidad de composición y propiedades físicas. Esta uniformidad justifica que las concentraciones y propiedades en el flujo de salida sean iguales a las del interior del reactor, permitiendo así que los cálculos sean representativos y que los resultados se acerquen a los parámetros reales.

Al tener igual composición en la salida de producto que en el interior del sistema, se infiere que el catalizador de la reacción está continuamente eliminándose del reactor. En el caso de los cultivos celulares esto no resulta un problema ya que el catalizador son los propios microorganismos, los cuales están en constante crecimiento. En cuanto al caso enzimático, esto supone una deficiencia en el sistema, ya que la reacción no produce más catalizador. De este modo, los quimioestatos se usan ampliamente para cultivos celulares o para reacciones enzimáticas cuyo catalizador no tenga un coste elevado y pueda ser introducido en la corriente de entrada al sistema.

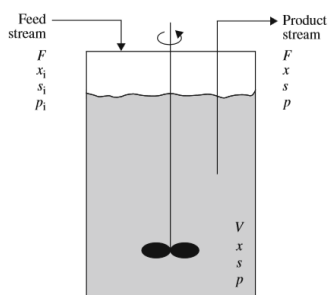


Figura 3. Esquema de biorreactor en continuo. (Doran, 2013)

En la ecuación de balance del sistema, la cual se presentará posteriormente, el término de generación tendrá un valor de cero, debido a que las condiciones de operación son en estado estacionario. En el estado estacionario todos los puntos del reactor tienen las mismas propiedades y el volumen se mantiene constante, por tanto el parámetro tiempo no participa de la ecuación.

## 1.4 Ingeniería de biorreactores

En los estudios de grado en los que se imparten materias relacionadas con la ingeniería de biorreactores se presenta frecuentemente la dificultad de los alumnos a la hora de entender cómo las diferentes variables biológicas afectan al proceso y a las tendencias de formación de producto y consumo de sustrato. Los balances de masas en los que se fundamentan las ecuaciones de diseño introducen, además, sistemas de ecuaciones diferenciales, lo que dificulta todavía más el proceso de comprensión.

Para poder analizar las propiedades del sistema se ha de poder describir en términos matemáticos. Resulta esencial comprender y diferenciar el tipo de parámetro, como este influye en el sistema, y existen tres tipos principales.

### 1.4.1 Los parámetros de operación

Son aquellos que, en su ausencia o intensidad, determinan las condiciones de operación, y por tanto permiten la clasificación en continuo, discontinuo o semicontinuo.

Tabla 1. Parámetros de operación y sus unidades.

Constante	Nombre	Observaciones	Unidades
$t$	Tiempo	Variable física, dimensional	h
$C_A$	Concentraciones	Ratio de masa-volumen de los componentes influyentes o iniciales de la reacción	g/L
$F$	Caudal de alimento	Ratio de litros por hora que entran dentro del sistema.	L/h
$V$	Volumen	Medida del espacio que ocupan los elementos de la reacción dentro del biorreactor.	L



#### 1.4.2 Parámetros estequiométricos

Al producirse una reacción química los átomos y moléculas se reordenan para formar los nuevos compuestos, lo que infiere un cambio de relaciones molares y de masa entre los reactivos y productos. Estas variaciones permiten realizar los cálculos estequiométricos, de los que se deriva el concepto de rendimiento.

De forma general, el rendimiento se define como el ratio establecido entre la masa de producto formado y la masa de producto consumido. Debido a la existencia de reacciones paralelas y la complejidad intrínseca del sistema metabólico, es un parámetro de gran importancia para el análisis de procesos biológicos o enzimáticos. (Doran, 2013)

$$\text{Ecuación (3).} \quad \text{Rendimiento observado o aparente} = \frac{\text{masa o moles de producto presente}}{\text{masa total o moles de reactivo consumido}}$$

El concepto de rendimiento se afina en el caso del crecimiento celular, ya que se pueden calcular en función de los múltiples elementos que participan de la reacción, como el rendimiento de biomasa producida en función de sustrato ( $Y_{XS}$ ), el rendimiento de producto en función de sustrato ( $Y_{PS}$ ) o el rendimiento de producto en función de biomasa ( $Y_{PX}$ ).

Su importancia radica por tanto en que aporta diversa información sobre los requerimientos nutricionales y las características de producción de los microorganismos.

#### 1.4.3 Parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos son aquellos que interfieren en las ecuaciones de velocidad de reacción. La cinética de una reacción depende de numerosos factores como la concentración inicial de sustrato o la temperatura (ecuación de Arrhenius) siendo este último despreciable ya que se asume que dentro del biorreactor la temperatura se mantiene constante.

En el caso de las dinámicas enzimáticas se observan los parámetros de:

Tabla 2. Parámetros cinéticos en reactores enzimáticos y sus unidades.

Constante	Nombre	Observaciones	Unidades
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten	Expresa la afinidad del enzima por el sustrato.	g/L
$V_0$	Velocidad inicial	Velocidad instantánea en el momento que comienza la reacción.	g/L·h (h <sup>-1</sup> )
$K_d$	Constante de desactivación	Parámetro que tiene en cuenta el deterioro de la estructura del enzima y la pérdida de fuerza iónica o mecánica de la unión.	h <sup>-1</sup>
$\eta_T$	Coefficiente de transferencia de masa	Relación de velocidad de difusión del componente, área de difusión y variación de concentraciones.	Adimensional, expresado en tanto por 1.

En el caso de las dinámicas celulares, los parámetros que interfieren de la ecuación son:

Tabla 3. Desarrollo de parámetros cinéticos celulares y sus unidades.

Constante	Nombre	Observaciones	Unidades
$\mu_{max}$	Velocidad específica máxima de crecimiento	Velocidad máxima a la que el microorganismo crece sin limitación de sustrato.	g/g·h (h <sup>-1</sup> )
$K_d$	Muerte celular	Parámetro que contempla la reducción de capacidad reproductiva y muerte del microorganismo.	g/g·h (h <sup>-1</sup> )
$K_s$	Constante de afinidad	Concepto análogo a $K_m$ , establece la capacidad de vinculación entre microorganismo y sustrato.	g/L

$m_s$	Coeficiente de mantenimiento	Variable que tiene en cuenta el consumo del propio microorganismo para su supervivencia, aunque este no presente crecimiento.		$g/g \cdot h$ ( $h^{-1}$ )
$q_p$	Velocidad específica de formación de producto	No necesariamente se mantiene constante durante el proceso de fermentación. Dependiendo del tipo de metabolismo se calculará en función de diferentes parámetros metabólicos.		$g/g \cdot h$ ( $h^{-1}$ )
		Formación de producto esté asociado al metabolismo del microorganismo:  Ecuación (4). $q_p = Y_{pX} \cdot \mu + m_s$	No asociado al metabolismo celular:  Ecuación (5). $q_p = \text{constante}$	

Cabe resaltar softwares como STELLA o Matlab, que, a pesar de no ser programas especializados para sistemas de bioprocesos, son ampliamente utilizados en los ámbitos de estudio y enseñanza. La pretensión inicial de este trabajo es la de crear una herramienta más sencilla de utilizar y visualizar, que no requiera de una formación previa para su manejo, pero que responda con eficacia a las necesidades técnicas del usuario.

Por los motivos expuestos en este apartado se plantea la necesidad de crear un software de simulación que facilite el estudio y aprendizaje de las dinámicas llevadas a cabo en ingeniería de biorreactores.

## 2 Ética y sostenibilidad

El hecho de disponer de una herramienta de simulación nos permite un estudio de los biorreactores "in silico". De esta forma se establece un ahorro tanto energético como de recursos, ya que se elimina la necesidad de llevar a cabo el proceso para realizar los estudios cinéticos y de rendimiento.

### 3 Objectives

The objective of this project was to create a bioreactor simulation software, with a clear and simple interface, towards facilitating learning and study of these dynamics grade students. To do this, the following two sub-objectives are defined:

- The development of a simulation platform for the main bioreactors (Batch, Feed-Batch and chemostate) where enzymatic or cell growth reactions take place.
- Apply R programming language with a large graphing potential, with the ability to generate web apps and compute the different calculations.

## 4 Metodología

En un primer momento, se intentó realizar el código de la app mediante un lenguaje básico y sencillo por bloques, el AppInventor desarrollado por el MIT (MIT, 2018). Este código fue elegido en primera instancia con el objetivo de dar salida y uso a nuevas formas de programación más divulgativas y con dificultad baja. El problema que revertía este tipo de sintaxis radicaba en su propia sencillez: no permitía realizar cálculos complejos ni su graficación.

Posteriormente se propuso la utilización del lenguaje R, que es un lenguaje dirigido al análisis estadístico y gráfico. Es un lenguaje interpretado (Matloff, 2011) que requiere un intérprete para ejecutar el código. Este software corre en distintas plataformas Linux, Windows, MacOS, e incluso en PlayStation (hecho que puede tener aplicaciones interesantes con las últimas aplicaciones de dicho lenguaje en Inteligencia Artificial). Es un lenguaje que permite realizar gráficos de alta calidad (los mejores en el campo de los lenguajes estadísticos) y cálculos complejos o con bases de datos de manera sencilla. En esta sencillez radica el hecho de que es necesario realizar un menor *debugging*, o depuración del programa, proceso mediante el que se identifican y corrigen errores en el código. Al ser de software libre además suponía una importante ventaja para evitar problemas de licencias.

Para que un lenguaje informático pueda ser escrito y ejecutado es necesario un entorno de programación en este caso fue utilizado R Studio, de manejo sencillo y fluido, y el cual permite utilizar los paquetes Shiny (Winston Chang, Joe Cheng, JJ Allaire, Yihui Xie, Jonathan McPherson, 2018) y ggplot2. (Wickham, 2018)

### 4.1 Lenguaje R y Shiny apps

R fue desarrollado como resultado de un proceso de diferenciación o evolución del lenguaje S, también destinado su uso para estudios estadísticos. (Santana, Julio Sergio; Mateos Farfán, Efraín, 2014). Tiene la propiedad binomial de ser lenguaje de programación y programa, orientado principalmente al análisis estadístico y la generación de gráficos. Se define como un lenguaje de “scripts” o guiones, por lo que controla la ejecución de otras aplicaciones, como en el caso de nuestro proyecto, aplicaciones web.

A grandes trazos, se puede definir que las pautas llevadas a cabo por un programa son un conjunto de códigos numéricos almacenados, conocidos como lenguaje máquina, el cual es muy

complejo. Por este motivo, los lenguajes de programación intentan ser herramientas que se asemejen al lenguaje humano y se corresponda en la mayor medida posible al proceso cognitivo humano. Una de estas aproximaciones son los lenguajes en los que se fundamenta la programación orientado a objetos, o POO.

R se considera dentro de esta clasificación debido a ciertas características como pueden ser la “encapsulación” de los datos relacionados bajo una misma instancia, lo cual permite generar códigos claros; las “clases polimórficas”, que implica que funciones puedan ser aplicadas a diferentes clases de objetos, gracias a la cuales se aporta el valor de la reutilización de funciones; y la “herencia”, la cual permite extender una clase dada a una clase más especializada. (Matloff, 2011)

Una de las ventajas que comporta la *POO* es la utilización de paquetes de programación. Estos se definen como un conjunto de clases e interfaces relacionadas entre sí de alguna forma, permitiendo encapsular funciones u ocultar los detalles de la programación, permitiendo así una mayor claridad y sencillez en el código.

Durante el desarrollo de este proyecto se han utilizado diferentes paquetes de programación, los cuales aparecen entre paréntesis precedidos por la palabra “library” al comienzo del código.

#### 4.1.1 Shiny:

Es un marco de creación de aplicaciones web para R. Facilita considerablemente la creación de web apps interactivas, con una interfaz limpia, sencilla y clara, gracias a la existencia de *widgets* preconstruidos y versátiles. Además, uno de sus mejores atributos es la vinculación reactiva entre los valores de entrada y salida del algoritmo. Este tipo de programación reactiva, es decir, aquella que se refiere a una expresión cuyo resultado variará con el tiempo o el cambio en el entorno, aporta a shiny un importante valor positivo. Las fuentes reactivas son establecidas mediante el `input`, y los resultados reactivos se establecen mediante el `output`.

El paquete Shiny permite crear dos ficheros que se correspondan con la interfaz y el servidor (`ui.R` y `server.R`) que incluirán el código que hará referencia a la apariencia de la aplicación y al conjunto de acciones que esta ha de llevar a cabo, respectivamente.

Ambas partes se conectan mediante el establecimiento un serie de elementos, como las funciones *render*. Este tipo de funciones permiten llamar desde la interfaz a los resultados obtenidos en el servidor.

```

74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
19 > Sconsum= function(v,k,s,kd,nt,t){
38
39
40
41 > output$skyneticsPlot <- renderPlot({
65
66
67
68 > output$tabla1 <-renderDataTable({
72
73

fluidRow(
  box(title = "Graphic",
      status = "warning", solidHeader = TRUE,
      collapsible = TRUE, plotOutput("kyneticsPlot")),
  tabBox(
    id = "tabset1", height = "250px",
    tabPanel("operation parameters",
      sliderInput("tiempus",
        "Time:",
        min = 0,
        max = 50,

```

Figura 4. Servidor (izquierda) donde se establecen las funciones de cálculo. Los resultados obtenidos se enlazan con la interfaz (derecha) mediante la función *render*.

#### 4.1.2 ggplot2:

ggplot2 es un paquete destinado a la graficación, que, dentro del paradigma de programación se define de forma declarativa. Mediante la utilización de los marcos de datos (*data.frame*) resultantes de los sistemas de ecuaciones calculados, se declaran una serie de parámetros que establecen como se asocian las variables a la estética de la gráfica. Este paquete permite generar gráficos de mayor calidad que los que se crean por defecto, gracias al ajuste automático de los ejes en función de los resultados; las diversas posibilidades de representación; diferenciación cromática o por densidades cuando en una misma gráfica se sitúan varias ecuaciones; opción a introducir leyendas, notas, marcas o señales en el espacio delimitado por los ejes...

```

A
sconsum= function(v,k,s,kd,nt,t){
  output$skyneticsPlot <- renderPlot({
    df<-data.frame(Sconsum(input$vo,input$kpar, input$spar, input$kd, input$nt, seq(0,input$tiempus,by=0.1)))
    time= seq(0,input$tiempus,by=0.1)
    ggplot(df, aes(x=time,y=Sconsum))+
      geom_path(aes(time, s,color="red"))+
      ggtitle("Enzymatic kinetics")+
      ylim(0,input$spar)+
      theme(plot.title=element_text(hjust=1, vjust=0.5, face='bold'),
            legend.position = "bottom",
            legend.text = element_text(size = 10, colour = "Black"))+
      xlab("Time")+
      ylab("Substrate")+
      scale_colour_discrete(name = "Parameters:",
                            breaks=c("red"),
                            labels=c("Substrate"))
    B
  })
  C
}

```

Figura 5. (A) *data.frame* recoge los valores obtenidos del algoritmo. (B) Se declara que parámetros ocupan cada eje. (C) Declaración de valores estéticos.

### 4.1.3 deSolve:

Este paquete permite resolver problemas de valor inicial (IVP, por sus siglas en inglés) de ecuaciones diferenciales ordinarias, algebraicas y parciales. Las ecuaciones de diseño de los biorreactores son ecuaciones diferenciales ordinarias, por lo que posteriormente se profundizará únicamente en la explicación de este único tipo.

Este paquete, además, basa en rutas de integración fijas y no esenciales basadas en los códigos del paquete ODE de FORTRAN (lenguaje de programación matemática de alto nivel). La implementación de un problema de valor inicial se puede dividir en dos fases o momentos: la primera, en la que se realiza la especificación del método, y la segunda en la que se lleva a cabo la aplicación del modelo. (Soetaert, Karline; Petzoldt, Thomas; Setzer, Woodrow., 2018)

Se definen, en este orden, los parámetros, las variables del modelo, y las ecuaciones. (Fig.6)

```
shinyserver(function(input, output) {
  sconsum= function(v,k,s,kd,nt,t){
A parameters <- c(v = v, k = k, kd = kd, nt=nt)
B state <- c(s=s)
C Lorenz<-function(t, state, parameters) {with(as.list(c(state, parameters)),
      { # rate of change
          ds<- (-nt*(v*(s/(k+s))* exp(-kd*t)))
          list(c(ds)) }} }

  times <- t
  out <- ode(y = state, times = times, func = Lorenz, parms = parameters)
}
```

Figura 6. Señaladas en la imagen: (A) definición de los parámetros, (B) definición de la variable (C) definición de las ecuaciones del modelo.

Posteriormente, en la aplicación del modelo, se determinan los valores numéricos de los parámetros, el tiempo de simulación, el tipo de integración (A) y la representación gráfica (B) y numérica de los resultados (C). (Fig.7)



```

times <- t
A out <- ode(y = state, times = times, func = Lorenz, parms = parameters)

}

B output$skyneticsPlot <- renderPlot({})

C output$tabla1 <-renderDataTable({})

```

Figura 7. Parámetros de aplicación del modelo: "out", "Plot", "DataTable".

## 4.2 Balances:

Empleando la ley de conservación de la masa, se define un balance como un cómputo de las entradas y salidas de masa de un proceso o de una parte de este. Para poder aplicar el balance es necesario establecer los límites del sistema, que puede referirse a una sección del proceso o a todo su conjunto.

*Ecuación (6).*            **SALIDA + ACUMULACIÓN = ENTRADA + GENERACIÓN**

Al considerar que los reactores funcionan en condiciones isotérmicas, debido a la naturaleza biológica del proceso, no es pertinente realizar balances de energía. Por otra parte, el término de generación en este balance representa la reacción. En el caso de que el balance se aplique al producto, el término de generación tiene un valor positivo, ya que se produce en la reacción. En el caso que el balance se realice en función de un elemento que se consume en la reacción, como el sustrato, el término de generación tendrá un valor negativo.

Debido a la naturaleza dinámica de estos procesos, se aplica la ecuación general del balance a cada sustancia que reacciona o varía dentro del reactor en función del tiempo. (López Cabanes, Antonio; Bódalo Santoyo, Antonio; Sáe Mercader, José; Valero Torres, J.M., 1985).

Para un reactivo A, se ejemplifica empleando la *Ecuación 7*.

*Ecuación (7).*             $\frac{dM_a}{dt} = M_a \text{ entrada} - M_a \text{ salida} + V_a \text{ generación} - V_a \text{ consumo}$

$\frac{dM_a}{dt}$  : Diferencial de masa de componente A en función de tiempo.

$M_a$  entrada: flujo de masa del componente A que entra dentro del reactor (g).

$M_a$  salida: flujo de masa del componente A que sale del reactor (g).

$V_a$  generación: velocidad de generación de componente A (g/h).

En un estado estacionario, el diferencial de la ecuación anterior es igual a cero, ya que no existe cambio en la masa del sistema. En cambio, en un estado no estacionario, existe variación de masa en el sistema, por lo que se ha de desarrollar la ecuación diferencial para solucionar el modelo. En este se ha de tener en cuenta la relación entre volumen y masa, ya que se los parámetros tienen en cuenta en todo momento la masa en función del volumen en el que se encuentran. De esta forma se establece el concepto de velocidad volumétrica, que puede ser aplicada a la biomasa, al producto y al sustrato. El volumen del sistema se mantiene constante, como ocurre en el caso de batch y quimioestato, por lo que la ecuación de ratio volumétrico puede deducirse como aparece en la ecuación 9, ya que la variable de volumen aparece integrada dentro del parámetro de concentración.

Ecuación (8).  $r_A = \frac{\text{masa de A que reaccionan (aparecen o desaparecen)}}{\text{unidad de volumen} \times \text{unidad de tiempo}}$

$$-r_A = \frac{1}{V} \left( \frac{dM_A}{dt} \right)_{\text{Reacción}}$$

Ecuación (9).  $-r_A = \frac{dC_A}{dt}$

$r_A$  : velocidad de aparición o consumo (g/L·h).

$V$ : volumen de operación del reactor (L)

$\frac{dM_a}{dt}$  : Diferencial de masa de componente A en función de tiempo.

$\frac{dC_A}{dt}$ : Diferencial de concentración de componente A en función de tiempo

Para cualquier componente en una reacción homogénea se tiene en cuenta el volumen total, sus moles, y el tiempo de reacción. En el caso de que el reactivo desaparezca a causa de dicha

reacción, el signo de la operación es negativo, y viceversa si el componente aparece a causa de la reacción.

En el caso de la reacción biológica, el término de generación puede variar de tres formas diferentes dependiendo de a cuál de los tres elementos implicados en la reacción se le aplique el balance (biomasa, sustrato o producto).

$$\text{Ecuación (10).Biomasa:} \quad r_x = (\mu - k_d) * x$$

$$\text{Ecuación (11).Sustrato:} \quad r_s = -\frac{1}{Y_{xs}} * x$$

$$\text{Ecuación (12).Producto:} \quad r_p = q_p * x$$

Los balances se implementa considerando el sistema en fase líquida y en condiciones de homogeneidad, es decir, mezcla completa.

#### 4.2.1 Batch: Cinética enzimática:

En este caso se tiene en cuenta la posibilidad de que exista desactivación enzimática, es decir que la reacción inhiba la acción catalítica ( $k_d$ ). Esta desactivación no depende de la estructura o la naturaleza del encima, si no del pH, la temperatura del medio o la fuerza iónica. Aparece también la variable del coeficiente de transferencia de masa ( $\eta_T$ ). Las ecuaciones se implementan para el sustrato como variable de estado.

$$\text{Ecuación (13). Sin desactivación:} \quad \frac{dS}{dt} = -\eta_T \cdot v_{max0} \cdot \frac{S}{K_S+S}$$

$$\text{Ecuación (14). Con desactivación:} \quad \frac{dS}{dt} = -\eta_T \cdot v_{max0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot \frac{S}{K_S+S}$$

#### 4.2.2 Batch: Cinética celular

Antes de plantear los sistemas de ecuaciones diferenciales es necesario tener en cuenta que la velocidad específica de reacción celular se determina por la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación (2).} \quad \mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S+S}$$

#### 4.2.2.a Sin formación de producto

Ecuación (15). Biomasa:  $\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d) \cdot X$

Ecuación (16). Sustrato:  $\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{XS}} + m_s\right) \cdot X$

#### 4.2.2.b Con formación de producto asociada al metabolismo

Ecuación (17).Biomasa:  $\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d) \cdot X$

Ecuación (18).Sustrato:  $\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{XS}} + m_s\right) \cdot X$

Ecuación (19). Producto:  $\frac{dP}{dt} = q_p \cdot X$

Debido a que la formación de producto está asociado a la masa celular, la velocidad específica de formación de producto se determina con la siguiente ecuación.

Ecuación (4).  $q_p = Y_{PX} \cdot \mu + m_s$

#### 4.2.2.c Con formación de producto no asociada al metabolismo

Ecuación (17). Biomasa:  $\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d) \cdot X$

Ecuación (20). Sustrato:  $\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{XS}} + \frac{q_p}{Y_{PS}} + m_s\right) \cdot X$

Ecuación (19). Producto:  $\frac{dP}{dt} = q_p \cdot X$

Debido al hecho de que el metabolismo de la biomasa no interfiere en la formación de producto, se determina un valor constante para la velocidad específica de formación de producto.

Ecuación (5).  $q_p = \text{constante}$

### 4.2.3 Feed-Batch: Cinética celular

De igual forma que en el caso anterior, antes de plantear los sistemas de ecuaciones diferenciales es necesario tener en cuenta que la velocidad específica de reacción celular se determina por la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación (2).} \quad \mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

Además, tal y como se ha explicado con anterioridad, es necesario tener en cuenta que en este tipo de operación existe una variación de volumen dentro del biorreactor (*Ecuación 21*) con dependencia del caudal afluente.

$$\text{Ecuación (21). Velocidad de dilución:} \quad \frac{dV}{dt} = F; \quad D = \frac{F}{V}$$

#### 4.2.3.a Sin formación de producto

$$\text{Ecuación (22).Biomasa:} \quad \frac{dX}{dt} = (\mu - k_d) \cdot X + \frac{F}{V} X_i$$

$$\text{Ecuación (23).Sustrato:} \quad \frac{dS}{dt} = D \cdot (S_i) - \left( \frac{\mu}{Y_{XS}} + m_s \right) \cdot X$$

#### 4.2.3.b Con formación de producto asociado al metabolismo

$$\text{Ecuación (24).Biomasa:} \quad \frac{dX}{dt} = (\mu - k_d) \cdot X + \frac{F}{V} X_i$$

$$\text{Ecuación (25).Sustrato:} \quad \frac{dS}{dt} = D \cdot (S_i) - \left( \frac{\mu}{Y_{XS}} + m_s \right) \cdot X$$

$$\text{Ecuación (19).Producto:} \quad \frac{dP}{dt} = q_p \cdot X$$

Debido a que la formación de producto está asociado a la masa celular, la velocidad específica de formación de producto se determina con la siguiente ecuación.

$$\text{Ecuación (4).} \quad q_p = Y_{PX} \cdot \mu + m_s$$

#### 4.2.3.c Con formación de producto no asociada al metabolismo

$$\text{Ecuación (24). Biomasa: } \frac{dX}{dt} = (\mu - k_d) \cdot X + \frac{F}{V} X_i$$

$$\text{Ecuación (19). Sustrato: } \frac{dS}{dt} = D \cdot (S_i) - \left( \frac{\mu}{Y_{XS}} + \frac{q_p}{Y_{PS}} + m_s \right) \cdot X$$

$$\text{Ecuación (26). Producto: } \frac{dP}{dt} = q_p \cdot X$$

Debido al hecho de que el metabolismo de la biomasa no interfiere en la formación de producto, se determina un valor constante para la velocidad específica de formación de producto.

$$\text{Ecuación (5). } \quad \quad \quad q_p = \text{constante}$$

#### 4.2.4 Quimioestato: Cinética celular

Las ecuaciones siguientes son la implementación del modelo para las variables de estado de sustrato, biomasa y productividad, en modo de operación continuo. Están representadas en función de la velocidad de dilución, en lugar del tiempo como ocurría en los casos anteriores.

$$\text{Ecuación (27). Sustrato: } \quad \quad \quad S = \frac{D \cdot K_s}{\mu_{max} - D}$$

$$\text{Ecuación (28). Biomasa: } \quad \quad \quad X = \left( S_i - \frac{D \cdot K_s}{\mu_{max} - D} \right) Y_{XS}$$

$$\text{Ecuación (29). Productividad: } \quad \quad \quad Q_X = D \cdot X$$

## 5 Resultados

Enlace web: <https://bioreactorengineering-sach.shinyapps.io/conjunto>

Como resultado de todo el estudio realizado, se procedió a implementar el algoritmo en lenguaje R. De esta forma aparece una interfaz clara y sencilla, con un menú desplegable en la zona izquierda de la pantalla en el que aparece cada tipo de modo de operación, y que a su vez engloban un suborden de diferentes tipos de dinámicas para cada tipo de operación.

La primera pantalla que aparece es la que muestra batch enzimático. En ella se puede observar las tres partes diferenciadas de la interfaz de la pantalla: el menú desplegable con los diferentes tipos de modo de operación, la parte central donde aparecen las graficaciones y los cálculos numéricos, y el margen derecho, zona en la que se introducen los valores para la resolución del modelo.



Figura 8. Pantalla inicial

Los “MenuItems” se definen en el desglose izquierdo de la pantalla. Aquí se representan los diferentes tipos de procesos que se pueden llevar a cabo en los diferentes tanques, y se corresponden con los expuestos anteriormente (Fig.9).

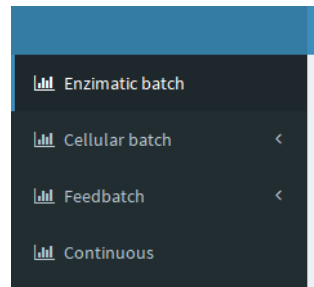


Figura 9. Menú desplegable izquierdo

Con el objetivo de que resultara sencilla y de fácil manejo, se utilizó como herramienta de entrada de los parámetros el *widget* “SliderInput” (Fig. 10), el cual permite establecer valores dentro de un rango concreto y más visual para el usuario.

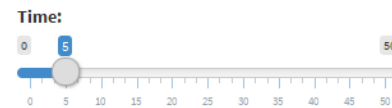


Figura 10. Slider Input

Si se introducen los nuevos parámetros variando los datos estequiométricos, cinéticos o de operación, se procederá entonces a clicar sobre el botón “Update View”, que generará los nuevos resultados en la tabla y la graficación. En pos de una mayor precisión numérica, en la tabla inferior se puede realizar una búsqueda exacta de los valores (Fig. 11)

time	s
0	10
0.1	9.76788273802618

Figura 11. Campos de búsqueda del valor numérico exacto.

Finalmente, se pueden observar los resultados calculados de forma gráfica en la imagen de la zona superior izquierda de la pantalla. Dicha imagen se puede descargar en formato .png. Por otra parte, en el *box* donde se representa el gráfico, se señala en los ejes qué parámetro se está representando, así como la leyenda para la asociación de colores. También se establece qué tipo de cinética se está calculando, es decir, si es a nivel enzimático o celular. Esto resulta útil cuando el usuario descarga diferentes graficaciones, ya que el título que cada una presenta en la parte superior derecha, así como las leyendas y etiquetas permiten un mejor manejo de los resultados en *offline*.



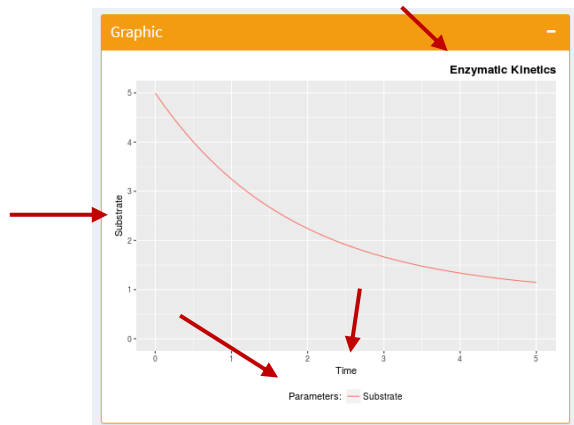


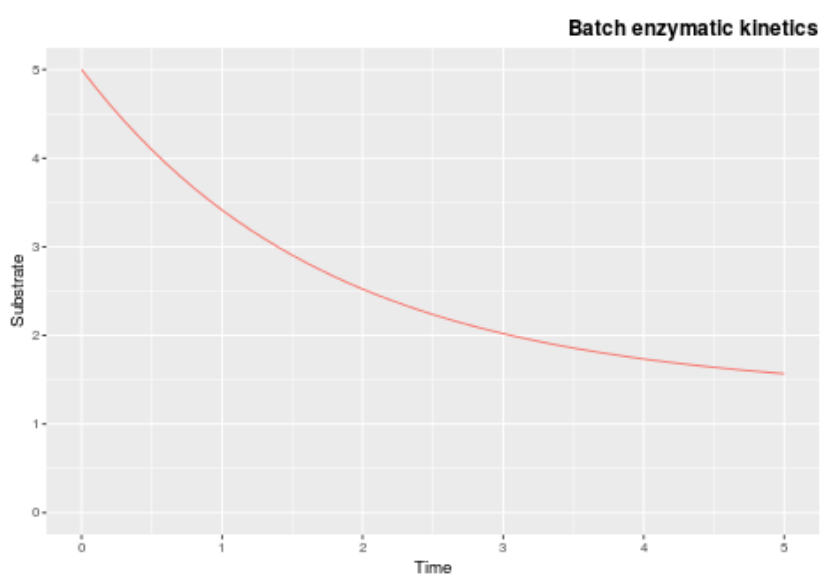
Figura 12. Señalización de las diferentes partes del área de graficación

Para este tipo de biorreactor en batch que aparece en la primera pantalla, se establecen unos valores para cada variable, diferenciados en parámetros de operación y parámetros cinéticos:

Tabla 4. Valores de los parámetros para el cálculo.

Operational parameters			Kinetic parameters		
Time (h)	Mass transfer coefficient (Adimensional)	Initial substrate (g/L)	Michaelis-Menten constant (g/L)	Initial rate (g/h)	Deactivation constant ( $h^{-1}$ )
5	0.5	5	1	5	0.5

Al introducir los anteriores valores y presionar sobre el botón “Update view” aparece la gráfica del modelo.



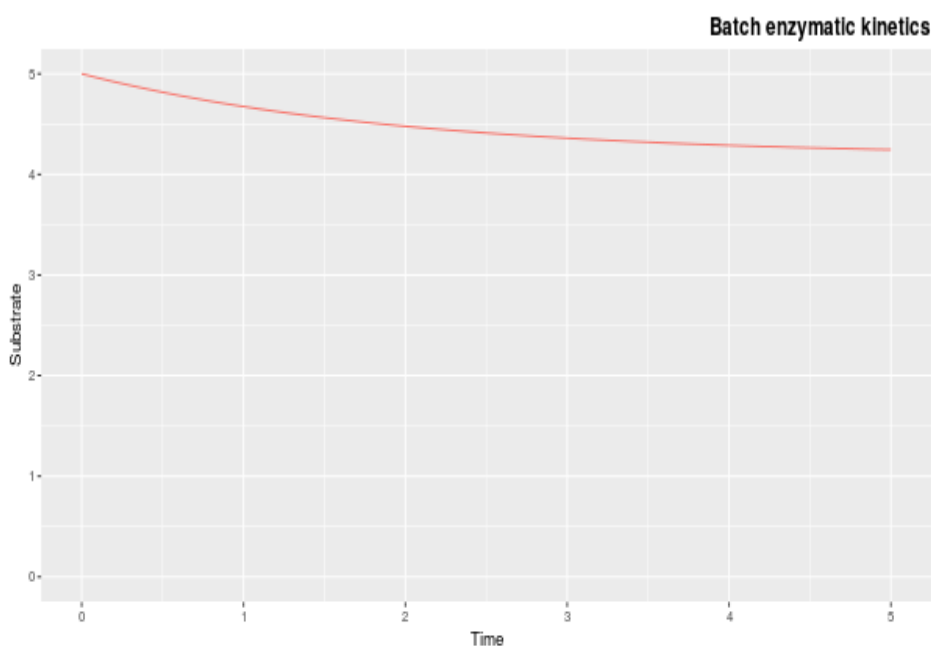
Gráfica 1. Tendencia cinética enzimática en Batch

## 5.1 Ejemplos de estudio:

Se proponen los siguientes cambios en variables concretas para visualizar como influye cada parámetro a las tendencias y producciones totales.

### 1. Efecto del coeficiente de transferencia de masa, $\eta_T$ :

La transferencia de masa es el fenómeno que ocurre cuando se produce un transporte de masa desde un punto A con una concentración elevada hasta un punto B con una concentración menor. Esto puede ocurrir en mezclas no homogeneizadas o, como en el caso representado en la aplicación, con enzimas inmovilizados. Esta transferencia de masa supone una limitación de disponibilidad de reactivo a la reacción, por lo que se ha de tener en consideración el efecto de esta sobre el rendimiento final del proceso. El coeficiente de transferencia de masa aúna la velocidad de transferencia del punto A al punto B mencionados anteriormente, el área donde se produce y la variación de las concentraciones en ambos puntos. Empleando los parámetros mostrados en la *tabla 4* se realiza una reducción de 0.5 a 0.1 del coeficiente de transferencia de masa:



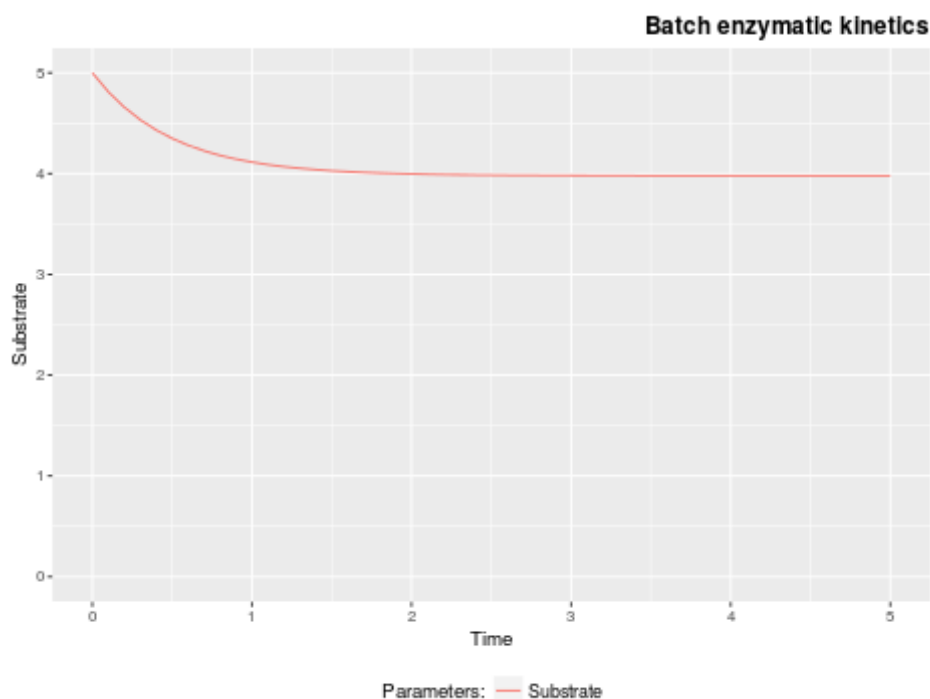
Gráfica 2. Tendencia cinética enzimática en Batch con coeficiente de transferencia de masa modificado.

De esta forma se puede observar como al reducir la transferencia, es decir, al minimizar la cantidad de sustrato disponible para el enzima, la curva representada en la gráfica tiene una tendencia mucho menos pronunciada que en la gráfica 1. Transcurridas tres horas, en la gráfica 2 el valor de la concentración de sustrato fuera del área del enzima inmovilizado es de 4.26 g/L, mientras que en el caso de la gráfica 1 el valor es de 1.56 g/L. Esto se debe a que cuanto menor

sea el coeficiente de transferencia de masa, menor disponibilidad de sustrato para la reacción y mayor concentración en el sistema.

## 2. Efecto de la constante de desactivación ( $K_d$ )

Como se ha señalado anteriormente en la *tabla 2*, la constante de desactivación es la variable mediante la que se representa la degradación del enzima y su consecuente reducción de actividad catalítica. Se realiza una variación de este valor para ejemplificar cómo este parámetro interfiere en la concentración de sustrato, manteniendo los mismos valores que la *tabla 4*, modificando únicamente la constante de desactivación de  $0.5 \text{ h}^{-1}$  a  $2 \text{ h}^{-1}$ .



Gráfica 3. Tendencia cinética enzimática en Batch con constante de desactivación modificada.

En comparación con la gráfica 1, en la que a tiempo 5 horas se establece una concentración de sustrato de  $1.59 \text{ g/L}$ , en la gráfica 3 se muestra una menor reducción de dicha concentración, con un valor de  $3.97 \text{ g/L}$  en el mismo tiempo. Esto se debe a que el efecto de desactivación al que se encuentran sometidos los enzimas es mayor, por lo que dejan de tener actividad a concentraciones más altas y a tiempos más bajos que en el primer caso.

## 6 Conclusions

This web application is presented as a simple and functional alternative to the different simulators currently used in the field of chemical engineering. The main positive values that it presents are the ability to search for exact numerical values, the possibility of saving the graphic values in .png format for further study or analysis, and the simplicity of handling the commands. On the other hand, the organization of the types of processes and the values that influence each one, is considered an advantage for the user, due to the fact that it eliminates the difficulty of having a prior knowledge of the subject of study.

## 7 Bibliografía

- Doran, P. M. (2013). *Bioprocess Engineering Principles*. Oxford: Elsevier.
- López Cabanes, Antonio; Bódalo Santoyo, Antonio; Sáe Mercader, José; Valero Torres, J.M. (1985). Aplicación de balances micrscópicos de materia y energía al diseño de reactores ideales. . *Anales de ciencias VOL.XLIV Universidad de Murcia.*, 57-62.
- Matloff, N. (2011). *THE ART OF R PROGRAMMING*. San Francisco: No Starch Press.
- MIT. (16 de 05 de 2018). Obtenido de MIT APP INVENTOR:  
<http://appinventor.mit.edu/explore/>
- Santana, Julio Sergio; Mateos Farfán, Efraín. (2014). El arte de programar en R. En J. S. Santana, *El arte de programar en R* (págs. 8-9). Mexico: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Soetaert, Karline; Petzoldt, Thomas; Setzer, Woodrow. (01 de 05 de 2018). *CRAN R Project*. Obtenido de <https://cran.r-project.org/web/packages/deSolve/vignettes/deSolve.pdf>
- Torregrosa López, J. I. (01 de 05 de 2018). *Repositorio Institucional de la Universitat Politècnica de València*. Obtenido de [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/29929/Art%C3%ADculoDocente\\_3.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/29929/Art%C3%ADculoDocente_3.pdf?sequence=1)
- Wickham, H. (02 de 06 de 2018). *CranR-Project*. Obtenido de <https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/ggplot2.pdf>
- Winston Chang, Joe Cheng, JJ Allaire, Yihui Xie, Jonathan McPherson. (10 de 04 de 2018). *CRAN R Project*. Obtenido de <https://cran.r-project.org/web/packages/shiny/shiny.pdf>