

Evaluación de modelos no estructurados en las cinéticas microbianas generadas con *Plotdigitizer*

Donaji Jiménez-Islas ^{1,*}, Miriam E. Pérez-Romero ² y Ignacio Ventura-Cruz ³

¹ TecNM/campus ITS Huichapan, División de Ingeniería en Energías Renovables, México.

² TecNM/campus ITS Huichapan, División de Ingeniería en Gestión Empresarial, México.

³ TecNM/campus ITS Huichapan, División de Ingeniería Mecatrónica, México.

* Correspondencia: djimenez@iteshu.edu.mx

Resumen: La producción de etanol como biocombustible mediante la fermentación de glucosa por *Saccharomyces cerevisiae* es un proceso clave en la competitividad de los combustibles líquidos. Este documento tiene como objetivo obtener parámetros cinéticos precisos de este proceso a partir de la digitalización de gráficos experimentales utilizando el software *Plotdigitizer*. Los modelos cinéticos de Gompertz, Pirt y Luedeking-Piret fueron empleados para describir el crecimiento celular, la producción de etanol y la relación entre el consumo de sustrato y la generación de metabolitos. Se digitalizaron gráficos de concentraciones de biomasa, glucosa y etanol reportados en una investigación. Los datos extraídos fueron ajustados a los modelos mencionados mediante regresión no lineal. El modelo de Gompertz se utilizó para modelar la fase de crecimiento microbiano, mientras que los modelos de Pirt y Luedeking-Piret se aplicaron para cuantificar el rendimiento en etanol y la tasa específica de consumo de sustrato. Los resultados muestran que la digitalización con *Plotdigitizer* genera datos con alta fidelidad respecto a los valores experimentales originales, lo que permitió ajustar con precisión los modelos cinéticos. El modelo de Gompertz describió adecuadamente el crecimiento de *S. cerevisiae*, mientras que los modelos de Pirt y Luedeking-Piret reflejaron la eficiencia del proceso de conversión de glucosa en etanol. La combinación de técnicas proporciona una metodología eficiente para la caracterización y optimización de procesos fermentativos, con aplicaciones directas en la producción sostenible de biocombustibles a partir de recursos renovables.

Jiménez-Islas, D.; Pérez-Romero, M. E.; Ventura-Cruz, I. Evaluación de modelos no estructurados en las cinéticas microbianas generadas con *Plotdigitizer*.
REIA 2024, 8, (7), 71-78.

Keywords: Velocidad Específica de crecimiento ; bioetanol; crecimiento microbiano.

Recibido: 16/09/2024

Aceptado: 15/11/2024

Publicado: 29/11/24

1. Introducción

La producción de etanol depende principalmente de la fermentación anaeróbica de los azúcares, siendo *Saccharomyces cerevisiae* el microorganismo más utilizado debido a su alta tolerancia al etanol, su rápido crecimiento y su capacidad para metabolizar varios azúcares [1,2]. Sin embargo, la optimización de los procesos de fermentación es crucial para mejorar la productividad y la eficiencia. Los avances recientes destacan la importancia del diseño de los procesos, la modelización y las estrategias operativas para mejorar los rendimientos del bioetanol [3]. Las tecnologías emergentes, como el aprendizaje automático y la metodología de superficies de respuesta, han demostrado ser prometedoras para optimizar las condiciones de fermentación y abordar la naturaleza no lineal y multivariante de los procesos microbianos [4]. Además, la exploración de microorganismos alternativos, como ciertos hongos filamentosos, ofrece oportunidades para obtener mayores rendimientos de etanol y utilizar diversos sustratos, incluidos los materiales lignocelulósicos [1,5].

La caracterización y optimización de los procesos de fermentación requiere un conocimiento profundo de la cinética del crecimiento microbiano y la producción de metabolitos. Varios modelos cinéticos, incluidos los modelos de Gompertz, Pirt y Luedeking-Piret, son fundamentales en este sentido. El modelo de Gompertz describe la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos, mientras que los modelos de Pirt y Luedeking-Piret son adecuados en cuantificar el rendimiento del etanol y las tasas de consumo del sustrato, lo que facilita la optimización de las condiciones de fermentación para aumentar la producción de etanol [6,7].

Las investigaciones indican que los modelos matemáticos no estructurados, como la ecuación logística para el crecimiento y el modelo modificado de Luedeking-Piret para el consumo de sustrato, han demostrado su eficacia para predecir los resultados de la fermentación tanto en matraces como en biorreactores [6]. Además, los avances en la tecnología de inmovilización de las células de levadura han demostrado ser prometedores para mejorar la productividad del etanol y la cinética de fermentación, destacando la importancia de los métodos de estimación de parámetros cinéticos para optimizar estos procesos [7].

La digitalización de gráficos experimentales para la producción de etanol, reportada por herramientas como Plotdigitizer, mejora significativamente la extracción de datos de la literatura existente, lo que facilita la creación de amplias bases de datos para los ajustes del modelo cinético. Este enfoque es particularmente beneficioso en el caso de la biotecnología, donde los costos y la complejidad de los experimentos son altos. Las investigaciones indican que las técnicas de inteligencia artificial (IA), especialmente las redes neuronales artificiales (ANN), son fundamentales para modelar y optimizar los procesos de producción de bioetanol, abordando los desafíos que se presentan en las etapas de pretratamiento, fermentación y conversión [8,9]. Además, la integración de sombras digitales y sensores blandos en los procesos de fermentación permite la monitorización y la optimización en tiempo real, lo que mejora la previsibilidad y la eficiencia operativa [10]. Al aprovechar los datos históricos y las técnicas avanzadas de modelización, los investigadores pueden acelerar la optimización de la producción de etanol, lo que conduce a soluciones de biocombustibles más sostenibles y eficientes [11].

Los avances recientes en la ingeniería metabólica y la biología sintética han mejorado las capacidades de *S. cerevisiae*, lo que ha permitido mejorar la producción de etanol mediante estrategias como la ingeniería evolutiva y la optimización de las condiciones de fermentación basada en el aprendizaje automático [12,13]. Además, se ha demostrado que la exploración de diversos sustratos, incluida la biomasa lignocelulósica, aumenta la eficiencia de la producción de bioetanol, con cepas modificadas genéticamente capaces de fermentar mezclas complejas de azúcares [14,15]. La investigación futura debería priorizar la mejora continua de las cepas de levadura y la integración de tecnologías de fermentación avanzadas, que podrían contribuir significativamente a un panorama energético más sostenible al reducir la dependencia de los combustibles fósiles [13,16]. Además, la aplicación de modelos para estimar los parámetros cinéticos se presentan como alternativas de exploración de cinéticas reportadas que requieren herramientas de digitalización de datos para definir las condiciones de producción bioquímicamente necesarias para mejorar los rendimientos.

2. Materiales y Métodos

Para el desarrollo del artículo se plantearon dos etapas:

2.1. Etapa 1. Adquisición de datos experimentales

La disponibilidad de datos a través del mecanismo Open Access permite a la comunidad académica el uso de la información para demostrar su reproducibilidad y validar los resultados reportados por los autores.

Para la generación de datos cinéticos se recurrió a la búsqueda de información en plataformas que reportan el crecimiento del microorganismo, el consumo de sustrato y producción del metabolito. En la plataforma de Science Direct se ubicó el documento titulado “Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales”, el cual fue publicado en 2014 [17]. La figura 1 fue descargada y procesada a través del software Plotdigitizer.

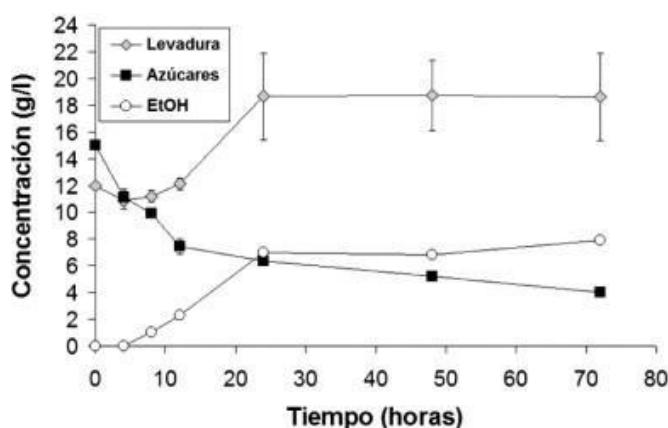


Figura 1. Cinética de *S. cerevisia* utilizada para la digitalización de datos

En la Figura 2 se muestra la alineación de los ejes a través de las coordenadas de la imagen, en la que se define el eje “x” como tiempo con dos puntos de referencia, similar caso para el eje “y” que corresponde a concentraciones.

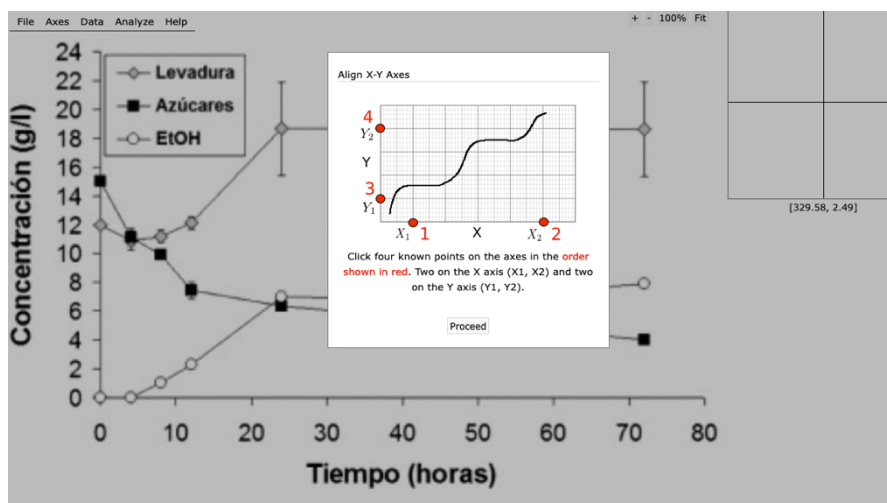


Figura 2. Definición de coordenadas para la digitalización de datos en el software Plotdigitizer

Posteriormente, se definieron los valores de cada eje, Figura 3, donde cada punto de las cinéticas fue marcado con el cursor para establecer las coordenadas y su equivalente concentración, obteniéndose un conjunto de datos de tiempo y concentración de biomasa, consumo de azúcar y producción de etanol. Los datos fueron descargados en formato .csv para su posterior procesamiento.

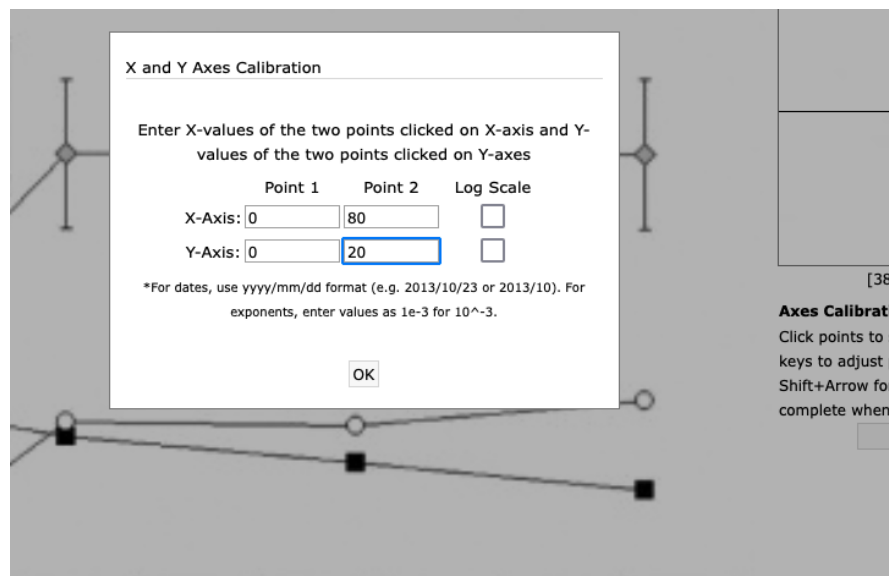


Figura 3. Definición de valores de tiempo y concentración en el software

2.1. Etapa 2. Estimación de parámetros cinéticos

Los datos obtenidos de la digitalización fueron ordenados para realizar la estimación de datos cinéticos. Para la estimación de biomasa se utilizó la ecuación logística [18] (ecuación 1) y la ecuación de Gompertz [18] (ecuación 2) por separado, los parámetros cinéticos se obtuvieron con la función de solver en el software Excel. También se estimó el coeficiente de determinación R^2 para tener una referencia del ajuste de datos experimentales y los proporcionados por el modelo evaluado.

$$X(t) = \frac{X_{max}}{1 + \left(\frac{X_{max}}{X_0} - 1\right) e^{-\mu t}} \quad (1)$$

$$X(t) = ae^{-be^{-\mu t}} \quad (2)$$

$$S(x) = S_0 - \frac{1}{Y_x} (X - X_0) - \frac{mX_{max}}{\mu} \ln\left(\frac{X_{max} - X_0}{X_{max} - X}\right) \quad (3)$$

$$P(x) = P_i + (X - X_0) - \frac{X_{max}}{\mu} \ln\left(\frac{X_{max} - X_0}{X_{max} - X}\right) \quad (4)$$

La estimación de parámetros cinéticos de coeficiente de mantenimiento (m) fue estimado con la ecuación de Pirt (ecuación 3). El coeficiente asociado y no asociado se determinó mediante la ecuación de Luedeking-Piret (Ecuación 4), también utilizando la función solver de excel [19].

3. Resultados

3.1. Obtención de datos experimentales

Los datos generados con el software permitieron un acercamiento gráfico a los datos reales experimentales, los cuales se pueden comparar en la Figura 1 de la sección de materiales y métodos y la Figura 4 de esta sección), la ventaja de documentar el uso de herramientas de digitalización de datos permite ahorrar en experimentos y costos asociados por que se pueden tener conclusiones importantes en el área de los bioprocesos. Las tablas de datos se pueden modelar desde diferentes objetivos de producción de biomasa o generación de metabolitos. La herramienta está disponible vía web sin necesidad de descargarse (<https://web.eecs.utk.edu/~dcostine/personal/PowerDeviceLib/DigiTest/index.html>).

3.2. Modelos cinéticos

Como se muestra en la Figura 4, la cinética se ajustó utilizando el modelo logístico, los datos tiene una velocidad específica de crecimiento de $0.062\ h^{-1}$, con un coeficiente de determinación R^2 de 0.8332 (Tabal 1). En relación a otros trabajos empleando *S. cerevisiae* en fermentación de agua de coco se reportó $\mu = 0.30\ h^{-1}$ [20].

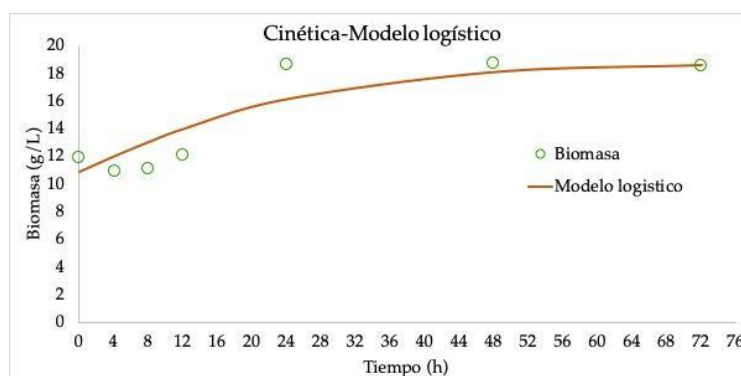


Figura 4. Ajuste del modelo logístico a los datos experimentales del crecimiento de *S. cerevisiae*

En la Figura 5 se realizó el modelado de los datos experimentales con el modelo de Gompertz, los resultados obtenidos son de $\mu = 0.052\ h^{-1}$, un valor menor al presentado en el modelo Logístico. Además, el ajuste de datos del modelo tiene un coeficiente de determinación R^2 de 0.8254, indicando que el mejor modelo que ajusta los datos es el Logístico.

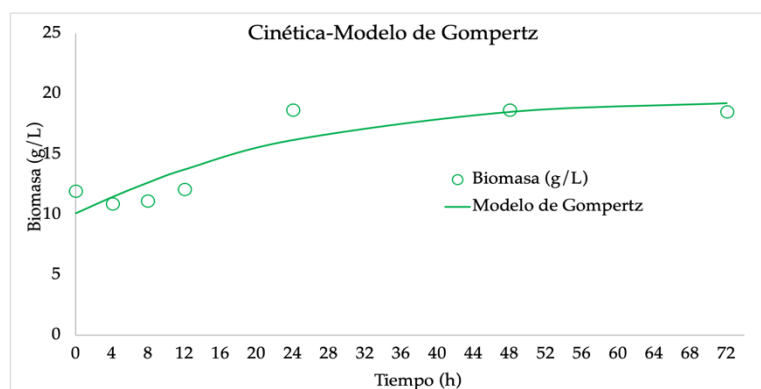


Figura 5. Ajuste del modelo de Gompertz a los datos experimentales del crecimiento de *S. cerevisiae*

Para la estimación de parámetros cinéticos del coeficiente de mantenimiento se utilizó el modelo de Pirt, teniendo condiciones iniciales de glucosa cercanas a 15 g/L y después de

72 h aproximadamente existen 5 g/L que no consume *S. cerevisiae*, Figura 6. El coeficiente de mantenimiento fue de 0, lo que indica que la producción de etanol fue prioritaria y las funciones biológicas de reparación celular fueron mínimas.

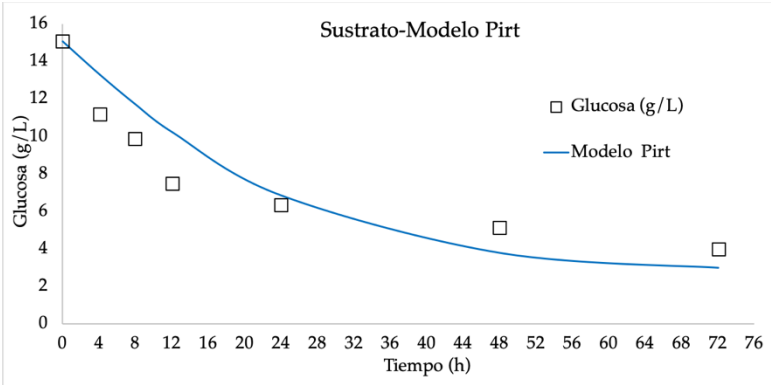


Figura 6. Consumo de glucosa por *S. cerevisiae*, modelado de los datos experimentales

Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos por el modelo para *S. cerevisiae*

Parámetro cinético	Coefficiente de determinación (R^2)	Significado
Xmax	18.71 (g/L)	Concentración máxima de biomasa
Xo	10.9 (g/L)	Concentración inicial de biomasa
μ	0.06206578 (h ⁻¹)	Velocidad específica de crecimiento
S0	15.1053717 (g/L)	Concentración de sustrato inicial
Y x/s	0.63247874	Rendimiento biomasa/sustrato
m	0	Coefficiente de mantenimiento
P	0.19706974 (g/L)	Concentración inicial de etanol
α	0.81633962	Producción asociado a crecimiento
β	0.00010868	Producción no asociado a crecimiento

* Tabla elaborada con datos del modelo .

El consumo de glucosa y las condiciones de crecimiento reportadas por el autor [17], permiten mantener una productividad $Q_p = 0.11$ g/h, además se puede determinar que por que el valor de β cercano a 0, la producción de etanol está asociada a crecimiento, Tabla 2.

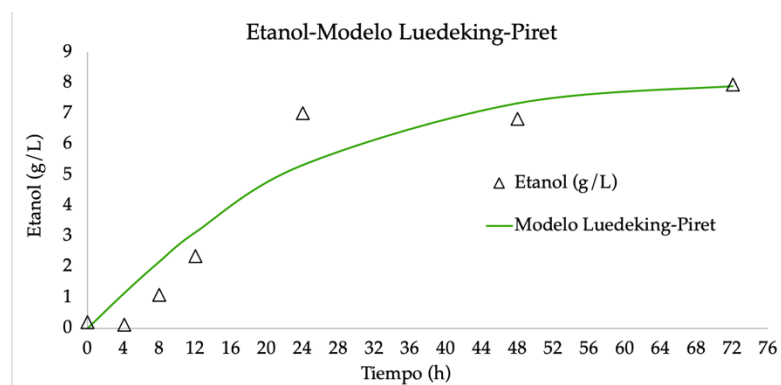


Figura 7. Producción de etanol por *S. cerevisiae*, modelado de los datos experimentales

Tabla 2. Coeficiente de determinación para el ajuste de datos experimentales

Modelo	Coeficiente de determinación (R^2)	Cinética
Logístico	0.8332	Crecimiento
Gompertz	0.8254	Crecimiento
Pirt	0.9004	Consumo
Luedeking-Piret	0.9283	Producto

* Tabla elaborada con datos estadísticos del modelo.

5. Conclusiones

La aplicación de software como Plotdigitizer promueve el intercambio de información de la comunidad científica a través de la adquisición de datos de gráficos validados experimentalmente, lo que permite reducir el número de experimentos por los investigadores para validar la reproducibilidad de la información. Los modelos de crecimiento Logísticos presentan mejor ajuste a datos cinéticos experimentales.

Las limitaciones del estudio son las variaciones de posición al momento de digitalizar los datos por el software, sin embargo como prospectiva se puede evaluar una serie de ensayos digitalizados para estimar el error de la propuesta.

Este estudio es una primera propuesta de herramientas de digitalización acopladas a experimentos reales, lo que beneficia a procesos biológicos que requieren de validación.

Contribución: “Conceptualización, D.J.I y I.V.C; metodología, M.E.P.R.; software, I.V.C: validación: D.J.I.

Financiamiento: No se recibió financiamiento para el presente artículo.

Agradecimientos: Al TecNM

Conflicto de interés: “Los autores declaran no tener conflicto de intereses”

Referencias

1. Satari, B.; Amiri, H. Production of alcohols by filamentous fungi. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* **2023**, 435–453. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91872-5.00016-8>
2. Jacobus, A. P.; Gross, J.; Evans, J. H.; Ceccato-Antonini, S. R.; Gombert, A. K. *Saccharomyces cerevisiae* strains used industrially for bioethanol production. *Essays in Biochemistry* **2021**, 65(2), 147–161. <https://doi.org/10.1042/ebc20200160>
3. Jayakumar, M.; Kuppusamy Vaithilingam, S.; Karmegam, N.; Gebeyehu, K. B.; Boobalan, M. S.; Gurunathan, B. Fermentation technology for ethanol production: Current trends and challenges. *Biofuels and Bioenergy* **2022**, 105–131. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-90040-9.00015-1>
4. Agboola, A. A.; Ishola, N. B.; Betiku, E. Bioethanol Production via Fermentation: Microbes, Modeling and Optimization. *Bioethanol: A Green Energy Substitute for Fossil Fuels* **2023**, 193–227. https://doi.org/10.1007/978-3-031-36542-3_8

5. Gloria, M. S. V.; Alva-Sánchez, D. L.; Escareño, M. P. L.; Aguilar, C. N.; Balagurusamy, N.; Hernández-Almanza, A. Physiology of Ethanol Production by Yeasts. *Bioethanol* **2022**, 1–20. <https://doi.org/10.1201/9781003277132-1>
6. Ali, M. K.; Kaki, A. A.; Chaouche, N. K. Simulation of Yeast Fermentation Process Using Kinetic Unstructured Models. *Research Advances in Microbiology and Biotechnology* 2023, 2, 1–12. <https://doi.org/10.9734/bpi/ramb/v2/3682b>
7. Kuu, Wei-youh. "Fermentation Kinetics for the Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells (Biomass)." (1982). *LSU Historical Dissertations and Theses*. 3828. https://repository.lsu.edu/gradschool_disstheses/3828
8. Damian, C. S.; Devarajan, Y.; Thandavamoorthy, R.; Jayabal, R. Harnessing artificial intelligence for enhanced bioethanol productions: a cutting-edge approach towards sustainable energy solutions. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* **2024**, 22(7), 719–727. <https://doi.org/10.1515/ijcre-2024-0074>
9. Owusu, W. A.; Marfo, S. A. Artificial Intelligence Application in Bioethanol Production. *International Journal of Energy Research* **2023**, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2023/7844835>
10. Niaze, A. A.; Sahu, R.; Sunkara, M. K.; Upadhyayula, S. Model construction and optimization for raising the concentration of industrial bioethanol production by using a data-driven ANN model. *Renewable Energy* **2023**, 216, 119031. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.119031>
11. Rydal, T.; Frandsen, J.; Nadal-Rey, G.; Albæk, M. O.; Ramin, P. Bringing a scalable adaptive hybrid modeling framework closer to industrial use: Application on a multiscale fungal fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* **2024**, 121(5), 1609–1625. Portico. <https://doi.org/10.1002/bit.28670>
12. Topaloğlu, A.; Esen, Ö.; Turanlı-Yıldız, B.; Arslan, M.; Çakar, Z. P. From *Saccharomyces cerevisiae* to Ethanol: Unlocking the Power of Evolutionary Engineering in Metabolic Engineering Applications. *Journal of Fungi* 2024, 9(10), 984. <https://doi.org/10.3390/jof9100984>
13. Khamwachirapithak, P.; Sae-Tang, K.; Mhuantong, W.; Tanapongpipat, S.; Zhao, X.-Q.; Liu, C.-G.; Wei, D.-Q.; Champreda, V.; Runguphan, W. Optimizing Ethanol Production in *Saccharomyces cerevisiae* at Ambient and Elevated Temperatures through Machine Learning-Guided Combinatorial Promoter Modifications. *ACS Synthetic Biology* 2023, 12(10), 2897–2908. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.3c00199>
14. Minnaar, L. S.; Kruger, F.; Fortuin, J.; Hoffmeester, L. J.; den Haan, R. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for application in integrated bioprocessing biorefineries. *Current Opinion in Biotechnology* 2024, 85, 103030. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.103030>
15. Yan, N.; Luan, T.; Yin, M.; Niu, Y.; Wu, L.; Yang, S.; Li, Z.; Li, H.; Zhao, J.; Bao, X. Co-Fermentation of Glucose–Xylose–Cellobiose–XOS Mixtures Using a Synthetic Consortium of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Fermentation* 2023, 9(8), 775. <https://doi.org/10.3390/fermentation9080775>
16. Choi, B.; Tafur Rangel, A.; Kerkhoven, E. J.; Nygård, Y. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced metabolic robustness and L-lactic acid production from lignocellulosic biomass. *Metabolic Engineering* 2024, 84, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2024.05.003>
17. Zamora-Hernández, T.; Prado-Fuentes, A.; Capataz-Tafur, J.; Barrera-Figueroa, B. E.; Peña-Castro, J. M. Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. *Educación Química* **2014**, 25(2), 122–127. [https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(14\)70534-8](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(14)70534-8)
18. Jiménez-Islas, D.; Pérez-Romero, M. E.; García, J. Á.; Del Río-Rama, M. de la C. A Model Study of Growth of Publications on the Field of Biofuels. *International Journal of Design & Nature and Ecodynamics* **2023**, 18(1), 51–62. <https://doi.org/10.18280/ijdene.180106>
19. Jiménez-Islas, D.; Rivera-Ríos, J.; Venegas Sánchez, J. A.; Gracida Rodríguez, J. N. Hydrolysis of Red Beet Bagasse and Modeling of Hydrolysates for Bioethanol Production. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina* **2021**, 31(2), 135–147. <https://doi.org/10.18359/rcin.5699>
20. Ramírez, S. O.; Manuel M. C. Evaluación de parámetros cinéticos para la *Saccharomyces cerevisiae* utilizando agua de coco como sustrato. *Ingeniería* **2005**, 15 (1).