

# Modelizado metabólico del proceso de digestión anaeróbica y optimización de la producción de biogás mediante herramientas bioinformáticas.

María Teresita Castañeda

*Grupo de Control Aplicado*

*LEICI - CONICET - UNLP*

La Plata, Argentina

*castaneda@biotec.quimica.unlp.edu.ar*

Martín Jamilis

*Grupo de Control Aplicado*

*LEICI - CONICET - UNLP*

La Plata, Argentina

*martin.jamilis@ing.unlp.edu.ar*

Hernán De Battista

*Grupo de Control Aplicado*

*LEICI - CONICET - UNLP*

La Plata, Argentina

*deba@ing.unlp.edu.ar*

**Resumen**—En los últimos años, el proceso de digestión anaeróbica ha ganado interés por su potencial bioenergético para la producción de biogás. Dada la complejidad del sistema, resulta relevante conocer el metabolismo de los microorganismos que intervienen en el proceso para poder direccionar los recursos celulares a la producción de biogás. En este trabajo se presentan los resultados preliminares del modelizado metabólico del proceso de digestión anaeróbica. El modelo de comunidad se construyó empleando el enfoque de compartimentalización y crecimiento balanceado, a partir de 6 modelos metabólicos reducidos depurados. La optimización del modelo se llevó a cabo mediante Análisis de balance de flujos y los resultados obtenidos se contrastaron con resultados experimentales publicados y simulaciones de otro modelo de la bibliografía. El modelo propuesto y la metodología empleada en este trabajo logró predecir las tasas de producción de metano y dióxido de carbono a diferentes diluciones con una buena exactitud teniendo en cuenta la complejidad del proceso. Además, mediante el cálculo de los flujos intracelulares y de comunidad, se logró dilucidar los procesos bioquímicos que ocurren dentro de la comunidad. Este tipo de modelo aportará un mayor conocimiento de lo que ocurre microscópicamente y, con ello, permitirá definir estrategias para la optimización y control del proceso.

**Palabras Clave**—Digestión anaeróbica, Biogás, Modelizado metabólico, FBA, Optimización, herramienta bioinformática.

## I. INTRODUCCIÓN

El proceso de digestión anaeróbica (DA) se ha empleado tradicionalmente en las plantas de tratamiento de efluentes para disminuir la carga orgánica presente en estos. En los últimos años, de la mano de la bioeconomía y el desarrollo sustentable, se ha puesto especial énfasis en la generación de energía renovable a partir del proceso de DA [1]. En este sentido, podemos definir a la digestión anaeróbica como un proceso bioquímico en el cual una comunidad microbiana degrada la materia orgánica con el objetivo de producir biogás (compuesto principalmente de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ ). Conceptualmente, el proceso de DA puede dividirse en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Fig. 1). Brevemente, en la etapa de hidrólisis se degrada por acción microbiana polímeros insolubles (polisacáridos, lípidos, proteínas) en compuestos solubles de bajo peso molecular (azúcares, ácidos grasos de cadena larga y aminoácidos). A continuación,

un grupo de bacterias acidogénicas transforman los productos de la hidrólisis en ácidos grasos volátiles (VFAs, principalmente ác. acético, butírico y propiónico), ácidos orgánicos (ác. succínico, fórmico y láctico entre otros) y alcoholes. En la etapa de acetogénesis, bacterias acetogénicas transforman los VFAs en acetato,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ . Finalmente, en la etapa de metanogénesis, grupos de bacterias y arqueas metanogénicas producen  $\text{CH}_4$  a partir de dos rutas fundamentales: (i) vía acetoclástica (produce  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  a partir de acetato) y (ii) vía hidrogenotrófica (produce  $\text{CH}_4$  a partir de  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ ) [2].

Para el estudio, diseño y control de procesos de digestión anaeróbica tradicionalmente se utilizan modelos no estructurados de complejidad baja o media que tienen en cuenta la dinámica extracelular de sustratos y productos con rendimientos constantes [3], [4]. Si bien estos modelos dan una adecuada descripción del desempeño de factores abióticos, las predicciones respecto a las comunidades microbianas no siempre son acertadas [5]. En particular, por no tener en cuenta la flexibilidad en el metabolismo de los microorganismos involucrados. Estos trabajan juntos en sintrofia lo que significa que uno produce un metabolito que el otro consume. Debido a ello, cambios en uno de los grupos metabólicos descritos anteriormente puede alterar el proceso de DA y consecuentemente los rendimientos y productividad en biogás [1]. Por todo esto, resulta relevante complementar la información de los enfoques tradicionales con el conocimiento de las comunidades microbianas para mejorar los modelos de DA [6].

En este trabajo se propone abordar este problema mediante el estudio de las redes metabólicas implicadas en el proceso de DA. En este sentido, la Biología de Sistemas como disciplina y particularmente la ingeniería metabólica permiten estudiar un microorganismo en forma global como un sistema integrado de metabolitos (m) y reacciones (n) bioquímicas que en conjunto dan lugar a procesos biológicos [7]. En el caso particular de la digestión anaeróbica, existe una amplia variedad de microorganismos que intervienen en las diferentes etapas. En los últimos años se han desarrollado modelos metabólicos de los microorganismos que intervienen en el proceso de DA, para diseñar cepas y optimizar la producción de biogás [5]. Si bien el empleo de estos modelos ha ayudado a definir caminos racionales para la optimización, los resultados obtenidos mediante el estudio de cultivos puros raramente

Este trabajo ha sido financiado con fondos obtenidos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2019-03635, PICT 2019-03476), de CONICET (PIP-0331, PIP-2595) y de la Universidad Nacional de La Plata (PPID-I015, UNLP-11/253).

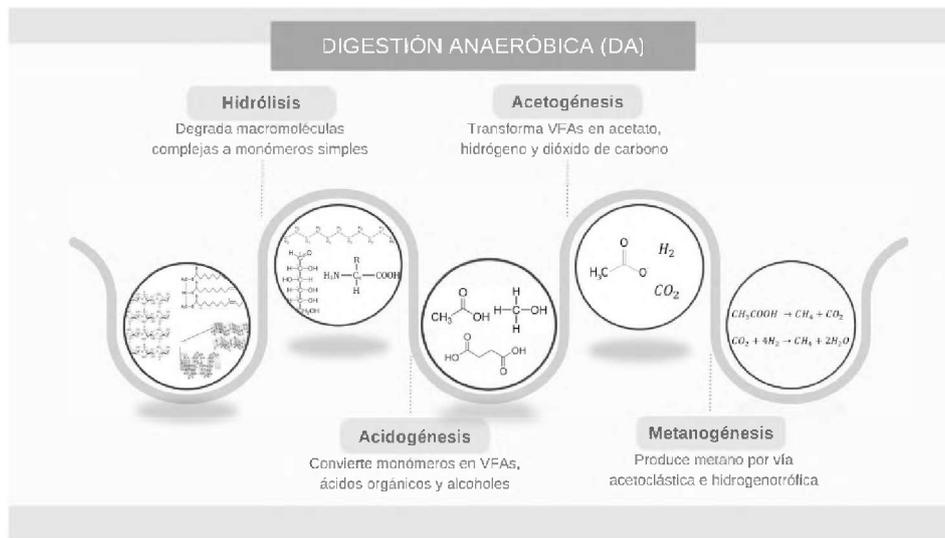


Figura 1. Etapas del proceso de digestión anaeróbica (DA)

son extrapolables a los biodigestores, los cuales operan con cultivos mixtos. Un mejor acercamiento a la realidad se logra mediante modelos metabólicos de comunidades microbianas, aún cuando son más complejos que los modelos metabólicos de especies individuales. Uno de los aportes más relevantes en materia de modelado metabólico del proceso de DA son los modelos reducidos de comunidad de Koch y col. [8]. En estos modelos, en lugar de la totalidad de las reacciones internas de los microorganismos de la comunidad, se obtienen un número acotado de reacciones netas de conversión de sustratos en productos a partir de la elección de algunos vectores de flujo elementales [9]. En términos sencillos, estos vectores de flujos elementales representan caminos mínimos posibles entre los sustratos y productos intercambiados entre las especies, bajo ciertas restricciones metabólicas. Este tipo de enfoque es muy interesante para analizar la composición de la comunidad y las interacciones metabólicas (reacciones de intercambio) entre los microorganismos. Además, al ser un modelo reducido, es apto para metodologías que requieren un acotado número de reacciones. Sin embargo, se pierde información relevante de cada microorganismo, por ej. la rigidez o flexibilidad metabólica de algunas vías y la capacidad metabólica de cada individuo de la comunidad es acotada a la elección de los vectores de flujos elementales. Si se requiere un estudio más detallado de lo que ocurre internamente en cada miembro de la comunidad y su efecto en el proceso de DA, se requiere de un enfoque más global.

Los avances en el modelado metabólico de cepas de interés han sido acompañados por el desarrollo de un conjunto de herramientas bioinformáticas capaces de simular, predecir y optimizar la distribución de flujos metabólicos. Entre ellos, el modelado de las redes metabólicas basado en restricciones (CBM) ha demostrado ser muy útil a la hora de evaluar el comportamiento de un microorganismo bajo diferentes perturbaciones externas, como pueden ser cambios

en el entorno [10]. Dentro de las CBM, el Análisis de Balance de flujos (FBA) es una técnica muy empleada ya que es capaz de predecir el comportamiento microbiano por medio de la optimización de una función objetivo elegida racionalmente [11]. En el caso de la digestión anaeróbica, hay muchos estudios sobre optimización de cultivos puros mediante CBM [5], [12], mientras que son pocos los casos de modelos de comunidades validados con éxito.

Nuestro grupo viene trabajando en desarrollar estrategias de control para la optimización de la producción de biogás en biodigestores escasamente instrumentados [13], [14]. Para ello, se han utilizado modelos no estructurados de gran relevancia y utilidad en el área de control [3], [4]. La posibilidad de complementar la información extracelular con el conocimiento de las rutas metabólicas implicadas en el proceso de DA puede resultar relevante para la optimización del proceso. En primer lugar, esto contribuiría a acotar la incertidumbre en parámetros y definir regiones o condiciones de operación óptimas. En segundo lugar, se podrían involucrar a los modelos en los controladores, por ejemplo, en la adaptación de parámetros estequiométricos y cinéticos tales como rendimientos o tasas específicas. Otro caso de interés es, mediante FBA dinámico [15], utilizar al modelo metabólico de comunidad como modelo del proceso en técnicas de control predictivo no lineal [16]. El objetivo del presente trabajo es desarrollar un modelo metabólico compartimentalizado que pueda describir el proceso de digestión anaeróbica, con la finalidad de optimizar la producción de biogás y estudiar la interrelación entre los microorganismos que conforman la comunidad.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II-A. Modelizado metabólico del proceso de DA

*II-A1. Depuración de modelos metabólicos reducidos de microorganismos involucrados en la DA:* Para la construcción del modelo metabólico de comunidad, se emplearon como

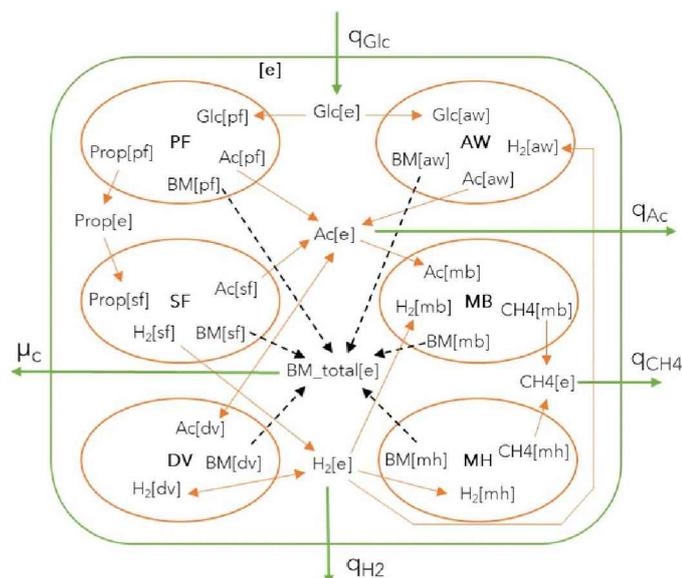


Figura 2. Esquema simplificado del modelo de comunidad. Cada compartimento simboliza un microorganismo contenido en un compartimento común, denominado [e]. Los sustratos y productos se excretan de cada célula mediante una reacción de transporte (flechas naranjas) y se exportan al medio mediante reacciones de intercambio (flechas verdes). La reacción de biomasa de la comunidad está conformada por las biomásas de cada microorganismo (línea negra punteada) y se exporta a una velocidad igual a  $\mu_c$ . Para simplificar el esquema se omitieron las reacciones intracelulares dentro de cada compartimento.

punto de partida modelos metabólicos reducidos de los microorganismos que intervienen en el proceso [8]. Particularmente, se emplearon 6 modelos metabólicos de las siguientes especies como microorganismos tipo que describen las etapas de la DA:

- Bacterias acidogénicas: *Propionibacterium freudenreichii* (PF) y *Desulfovibrio vulgaris* (DV).
- Bacterias acetogénicas: *Acetobacterium woodii* (AW) y *Syntrophobacter fumaroxidans* (SF).
- Arquea metanogénica acetoclástica: *Methanosarcina barkeri* (MB).
- Arquea metanogénica hidrogenotrófica: *Methanospirillum hungatei* (MH).

Los modelos reducidos fueron depurados para poder ser utilizados en la construcción del modelo de comunidad. En principio, se agregaron las reacciones de intercambio con el medio o *exchange*, las cuales permiten incluir los metabolitos extracelulares en el sistema y cumplir con los requisitos de FBA. Una vez agregadas estas reacciones se generaron los modelos en formato COBRA [17], que es el toolbox que se empleó para implementar FBA. A continuación, mediante algunas funciones de COBRA se diagnosticaron los modelos en busca de inconsistencias. En primer lugar, se hallaron algunos *gaps* resultantes de la pérdida de información (probablemente durante la reducción de los modelos) lo que ocasionó la presencia de metabolitos *dead-end*, o sea, metabolitos que no son producidos o consumidos. En segundo lugar, se encontraron algunas reacciones bloqueadas, o sea, reacciones que no pueden tomar un valor de flujo diferente

de cero. Estas inconsistencias fueron resueltas evaluando caso por caso. En casos puntuales se requirió verificar la cota de las reacciones para desbloquearla, mientras que en los casos donde la reacción o metabolito no eran relevantes para el análisis fueron excluidos del modelo.

**II-A2. Construcción del modelo metabólico de comunidad:** En la Fig. 2 se esquematiza de manera muy resumida el modelo de comunidad propuesto. Para la construcción del modelo de comunidad se emplearon los modelos metabólicos depurados individuales y se utilizó un enfoque de compartimentalización análogo al utilizado en modelos de microorganismos eucariotas [18], [19]. De acuerdo con este enfoque, se generó un compartimento por cada microorganismo de la comunidad ([pf], [dv], [aw], [sf], [mb] y [mh]). Dentro de cada compartimento se encuentran las reacciones y metabolitos que dan lugar a las diferentes rutas metabólicas propias de cada microorganismo. Además, se incluyó un compartimento extra que contenga a todos los demás ([e]), en el cual se permitirá el intercambio de metabolitos “de uso común” entre las especies, mediante reacciones de transporte.

A su vez, el modelo contempla el intercambio con el medio circundante permitiendo el ingreso de sustratos y la liberación de productos desde la comunidad hacia el medio. Para ello, se definieron reacciones de *exchange* o intercambio de la comunidad. Para describir la reacción de biomasa de la comunidad, se empleó el concepto de crecimiento balanceado [20] el cual establece que los microorganismos de la comunidad necesitan crecer a la misma velocidad específica en cultivo continuo para que de este modo el microorganismo más rápido no termine sobrepasando al resto de los microorganismos. Por otro lado, para simplificar el análisis, en este trabajo se consideró que la abundancia de las especies, esto es, cuanta biomasa aporta el microorganismo a la comunidad es la misma para todos los microorganismos. Finalmente, la biomasa de comunidad se exporta al medio con una tasa de producción igual a  $\mu_c$ .

#### II-B. Optimización mediante FBA de la producción de biogás en un biodigestor trabajando en continuo

Para el cálculo de los flujos metabólicos, o sea, la velocidad a la cual ocurren todas las reacciones, se empleó FBA implementado en COBRA toolbox. Esta metodología permite predecir el comportamiento del microorganismo mediante la incorporación de restricciones metabólicas y la optimización de una función objetivo racionalmente escogida. El problema de optimización lineal se plantea de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \max. \quad & Z = w^T \cdot v \\ \text{sujeto a} \quad & S \cdot v = 0 \\ & v_{min} \leq v \leq v_{max} \end{aligned} \quad (1)$$

Donde  $w$  es el vector de coeficientes que define a  $Z$  como una combinación lineal de flujos  $v$ ,  $S$  es la matriz estequiométrica de dimensiones  $m \times n$  y  $v_{min}$  y  $v_{max}$  son las cotas inferiores y superiores de cada uno de los flujos de las reacciones del modelo. Estas últimas restricciones permiten acotar el número de soluciones posibles mediante el

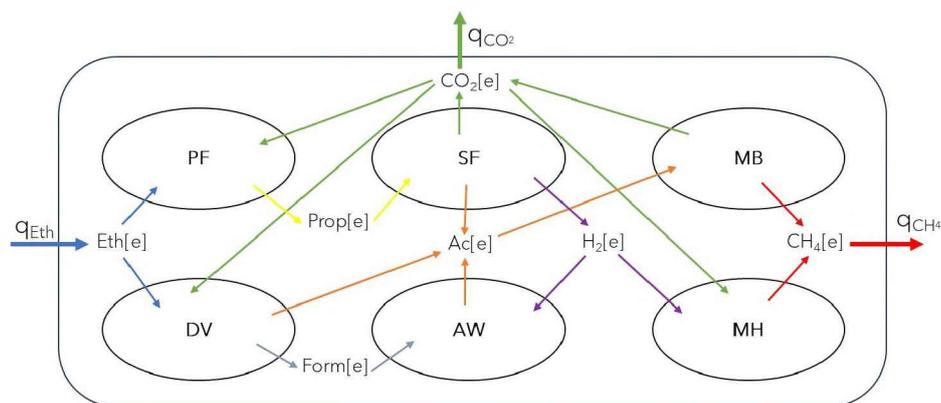


Figura 3. Intercambio de metabolitos extracelulares entre los diferentes microorganismos que componen la comunidad a  $D = 0.0017 \text{ h}^{-1}$ . Los colores de las flechas indican los flujos de las reacciones de transporte e intercambio activos para cada metabolito.

conocimiento de algunos flujos metabólicos, ej. la velocidad específica de consumo o producción de metabolitos que se intercambian con el medio. Para implementar FBA en nuestro sistema se utilizó como función objetivo la reacción de intercambio de metano (Ver Fig 2) y se fijó el flujo de la reacción de intercambio de la biomasa de comunidad ( $\mu_c$ ) en un valor igual al de la tasa de dilución ( $D$ ). Para poder utilizar etanol (Eth) como única fuente de carbono y energía se limitó el ingreso del resto de los sustratos poniendo en 0 la cota inferior de las reacciones de intercambio de los mismos. Solo se permitió el ingreso irrestricto de amonio (N), el cual se utilizó como fuente de nitrógeno.

Para la validación de los resultados obtenidos se emplearon resultados experimentales publicados de dos biodigestores operando en paralelo [8]. Se utilizó la  $D$  media experimental y la velocidad específica de consumo de etanol media ( $q_{Eth}$ ) como datos para la simulación y se calculó mediante FBA la tasa de producción de metano ( $q_{CH_4}$ ) y dióxido de carbono ( $q_{CO_2}$ ), la relación  $CH_4:CO_2$  y el rendimiento de metano en etanol ( $y_{CH_4/Eth}$ ). Además, se contrastaron los resultados obtenidos con resultados publicados de simulaciones realizadas a partir de un modelo de comunidad reducido de Koch y col [8].

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III-A. Modelos metabólicos depurados y modelo metabólico de comunidad

Como resultado de la depuración de los modelos individuales podemos decir que en general, el número de metabolitos disminuyó debido a la eliminación de *gaps* y metabolitos *dead-end*, mientras que el número de reacciones se incrementó por el agregado de reacciones de intercambio y el desbloqueo de algunas reacciones. En lo que respecta a los metabolitos que se intercambian con el medio (sustratos y productos), en algunos modelos se lograron desbloquear reacciones que impedían el empleo o producción de metabolitos reportados en literatura, lo cual permitirá representar más fehacientemente lo que ocurre *in vivo*. Además, en todos los modelos se agregó el amonio como metabolito extracelular, el cual es un sustrato presente en

todos los efluentes y un precursor de biomasa. Esto permitirá evaluar por ej. la influencia de la relación C/N del efluente en la producción de biogás, el cual es un análisis muy interesante desde el punto de vista del manejo del biodigestor.

En definitiva, por medio de la depuración de los modelos individuales se aseguró el cumplimiento de una de las restricciones de la Eq. (1) que es que se cumpla estado pseudoestacionario para todos los metabolitos que conforman la red metabólica ( $S \cdot v = 0$ ).

Con los modelos depurados individuales se construyó el modelo metabólico de comunidad compuesto de 595 metabolitos y 660 reacciones<sup>1</sup>. Al igual que con los modelos individuales, se verificó la ausencia de *gaps*, metabolitos *dead-end* y reacciones bloqueadas. Para las reacciones de intercambio o *exchange* del modelo se agregaron cotas inferiores o superiores de acuerdo con la Eq. (1), teniendo en cuenta algunas velocidades específicas obtenidas de bibliografía.

#### III-B. Optimización de la producción de biogás empleando FBA.

**III-B1. Análisis de los flujos internos:** Una de las ventajas del uso de modelos metabólicos es la posibilidad de analizar la distribución de flujos metabólicos que llevan a la producción de biogás a partir de determinado sustrato. En la Fig. 3 se grafican los resultados obtenidos por FBA para una dilución  $D = 0.0017 \text{ h}^{-1}$ . Para simplificar el diagrama solamente se muestran los flujos activos de las reacciones de transporte intra-comunidad y los flujos de intercambio activos entre la comunidad y el medio. Como puede verse en dicha figura, el etanol ingresó a la comunidad a una velocidad específica  $q_{Eth}$  y fue asimilado por las bacterias acidogénicas (PF y DV), las cuales cuentan con las rutas metabólicas internas para producir ácidos orgánicos y VFAs, particularmente Propionato (PF), Fórmico (DV) y Acetato (DV). Los ácidos orgánicos fueron utilizados luego como sustratos por parte de las bacterias

<sup>1</sup>El modelo de comunidad completo junto con los modelos depurados individuales pueden verse en el siguiente link: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1Qtb5ysRxdX6k4b3--sjZI9KC29HFCTg0/edit?usp=sharing&ouid=103102770282509797283&rtpof=true&sd=true>.

acetogénicas (SF y AW) para formar Acetato (AW y SF), CO<sub>2</sub> (SF) e H<sub>2</sub> (SF). Por último, los productos de las bacterias acetogénicas se emplean como sustratos por las arqueas metanogénicas (MB y MH) para generar CH<sub>4</sub>. En el caso de *M. barkeri* utilizó acetato para producir CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> por vía acetoclástica, mientras que *M. hungatei* produjo CH<sub>4</sub> a partir de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> por vía hidrogenotrófica. Es importante destacar que con el modelo propuesto, a diferencia del modelo de Koch, se pueden analizar los flujos internos dentro de cada microorganismo. A modo de ejemplo, se ha reportado que *P. freudenreichii* produce ácido propiónico a partir de SuccCoA mediante la ruta Metilmalonil-CoA. Los resultados obtenidos a partir de FBA con nuestro modelo predijeron un flujo no nulo a través de las 4 reacciones del modelo que describen esta vía en el compartimento [pf], indicando que efectivamente es la ruta utilizada para la producción de propionato. Esto no solo respalda los resultados obtenidos, sino que también permitirá simular el efecto de las condiciones de entorno (por ej. la presencia de un inhibidor enzimático) en rutas intracelulares y predecir como afectará en el desempeño de la comunidad.

**III-B2. Comparación de los resultados obtenidos a diferente D con datos experimentales:** Para probar la factibilidad del modelo para describir lo que ocurre macroscópicamente en un proceso de DA, se simuló el crecimiento y producción de biogás en un medio enriquecido con etanol (por ej. el efluente de una destilería). Los resultados obtenidos se contrastaron con datos experimentales publicados y con las simulaciones del modelo reducido de Koch [8] (Tabla I). En lo que respecta a la velocidad específica de producción de metano  $q_{CH_4}$ , en las mayoría de las *D* ensayadas los valores predichos por el modelo se encontraron dentro del rango de los valores experimentales, mientras que el resto tuvo errores porcentuales del 5 al 10 %. Es importante recordar en este sentido que el proceso de DA es un proceso muy complejo en el cual intervienen múltiples factores bióticos (microorganismos) y abióticos (temperatura, pH, acidez) y, por lo tanto, tiene asociada una gran incertidumbre. Por ello, poder predecir correctamente la cantidad de metano, aún con cierto grado de error admisible, es de gran importancia. De hecho, si comparamos con los valores obtenidos por modelos de comunidad validados y publicados como el de Koch, vemos que los errores obtenidos en nuestras simulaciones son aceptables. Es importante tener en cuenta también que en el proceso de DA intervienen muchos microorganismos de cada uno de los procesos que hemos descrito en la Fig. 1 y que en este modelo preliminar solamente estamos teniendo en cuenta 6 microorganismos que describen 3 de las etapas del proceso, con lo cual es prometedor obtener resultados que puedan describir con un error aceptable lo que se observa macroscópicamente.

Por otro lado, en referencia al dióxido de carbono, este es el segundo componente mayoritario en el biogás y es el resultado de los procesos bioquímicos que ocurren dentro de la comunidad. Como primer resultado relevante, es importante destacar que aún empleando como función objetivo el CH<sub>4</sub> en FBA, fue posible predecir la producción de CO<sub>2</sub>. El  $q_{CO_2}$  predicho por nuestro modelo resultó aceptable y dentro de los

Tabla I

COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR SIMULACIÓN CON EL MODELO PROPUESTO EN ESTE TRABAJO CON DATOS EXPERIMENTALES Y SIMULACIONES DE KOCH Y COL. [8]\*.

$\bar{D}$ exp. ( $h^{-1}$ )	$\bar{q}_{eth}$ exp. (mmol/gh)	$q_{CH_4}$ (mmol/gh)		$q_{CO_2}$ (mmol/gh)		$CH_4 : CO_2$ (mol/mol)		$y_{CH_4/Eth}$ (mol/mol)					
		Experimental	Sim. Koch	Sim. modelo propuesto	Experimental	Sim. Koch	Sim. modelo propuesto	Experimental	Sim. Koch	Sim. modelo propuesto			
0.00054	0.5	0.59-0.76	0.94	0.74	0.17-0.22	0.31	0.24	3.45-3.47	3.07	3.08	1.33-1.37	1.48	1.48
0.00059	0.495	0.65-0.67	0.94	0.73	0.19	0.31	0.24	3.42-3.53	3.08	3.09	1.3-1.37	1.48	1.47
0.00072	0.625	0.75-0.88	0.95	0.92	0.22-0.26	0.31	0.30	3.38-3.41	3.09	3.09	1.29-1.31	1.47	1.47
0.00084	0.725	0.99-1.12	0.96	1.07	0.3-0.34	0.31	0.35	3.29-3.30	3.11	3.09	1.44-1.48	1.47	1.47
0.0010	0.585	0.61-1.12	0.97	0.86	0.19-0.34	0.31	0.27	3.21-3.29	3.13	3.14	1.45-1.49	1.46	1.46
0.0012	0.6	0.86-0.93	0.99	0.87	0.25-0.27	0.31	0.28	3.44	3.16	3.16	1.45-1.54	1.46	1.46
0.0017	0.66	0.93	1.02	0.95	0.29	0.32	0.30	3.21	3.22	3.21	1.41	1.44	1.44

\* celdas coloreadas indican que los resultados de simulaciones están por encima o por debajo del rango experimental. Las celdas se colorearon de acuerdo al error porcentual, de la siguiente manera: error  $\leq 5\%$  (verde), error  $\leq 10\%$  (celeste), error  $\leq 20\%$  (amarillo), error  $> 20\%$  (rojo).

errores esperables de acuerdo con las simulaciones del modelo de Koch.

La composición del biogás obtenido es muy importante en términos técnicos y económicos, ya que de ello dependerá el poder calorífico de la mezcla. En la práctica, se ha observado que el biogás producido en DA está compuesto de 45 a 70 % molar de  $\text{CH}_4$  y entre 25 a 45 % molar de  $\text{CO}_2$ , dependiendo de la alimentación, la temperatura y la tecnología empleada, entre otras cosas [21]. Si observamos la Tabla I, la relación  $\text{CH}_4:\text{CO}_2$  experimental varía entre 3.21 y 3.53 dependiendo de la  $D$ , lo que representa porcentajes  $\text{CH}_4$  de 76 - 78 %, mientras que para ambas simulaciones los valores rondan entre 3.08 a 3.21 (75-76 % molar). Esta diferencia se puede deber a una sobreestimación del  $\text{CO}_2$  por parte del modelo propuesto, ya que el mismo predice que son los únicos productos del metabolismo en estas condiciones. No obstante se sabe que en la práctica, la composición del gas no está formada únicamente por  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ , sino que además se encuentran en proporción minoritaria  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{H}_2$  [21].

Finalmente, en términos de capacidades metabólicas, traducida como el rendimiento alcanzable de un producto en determinado sustrato (en este caso  $y_{\text{CH}_4/\text{Eth}}$ ), se logró muy buena correlación entre las simulaciones con nuestro modelo y los datos experimentales. A su vez, se observó mucha similitud entre las simulaciones del modelo de Koch, lo que indicaría que ambos modelos son estequiométricamente análogos. Esto tiene sentido ya que si bien los enfoques empleados para la construcción de los modelos son diferente, partimos de modelos individuales reducidos similares. No obstante, es importante destacar la flexibilidad metabólica de nuestro modelo y la metodología de optimización empleada (FBA) a la hora de calcular los flujos de producción de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  a diferentes  $D$  y su similitud con las tendencias observadas experimentalmente.

#### IV. CONCLUSIONES

El modelizado metabólico de comunidades microbianas continúa siendo un desafío al día de hoy, sobre todo en procesos de elevada incertidumbre como lo es la digestión anaeróbica. En términos bioeconómicos, es fundamental el aprovechamiento óptimo de las capacidades microbianas para lograr un producto de elevado porcentaje de metano y, con ello, una mejor calidad de biogás. El modelo metabólico propuesto, y el uso de FBA como técnica de optimización, lograron predecir adecuadamente la tasa de producción de biogás y los rendimientos esperados en biodigestores operando en continuo a diferentes velocidades de dilución. A su vez, mediante el enfoque de compartimentalización empleado, se lograron evaluar los cambios metabólicos que ocurren dentro de los microorganismos que componen la comunidad y su impacto en los demás. Esto nos permitirá complementar la información suministrada por los modelos no estructurados usualmente empleados en el área de control. Como mejoras a futuro se trabajará en la incorporación de otras cepas de interés en la comunidad, así como otros metabolitos que permitan describir la composición de diferentes efluentes.

#### REFERENCIAS

- [1] L. N. Nguyen, A. Q. Nguyen, and L. D. Nghiem, "Microbial community in anaerobic digestion system: Progression in microbial ecology," *Water and wastewater treatment technologies*, pp. 331–355, 2019.
- [2] S. Sarker, J. J. Lamb, D. R. Hjelm, and K. M. Lien, "A review of the role of critical parameters in the design and operation of biogas production plants," *Applied Sciences*, vol. 9, no. 9, p. 1915, 2019.
- [3] D. J. Batstone, J. Keller, I. Angelidaki, S. Kalyuzhnyi, S. Pavlostathis, A. Rozzi, and et al., "The iwa anaerobic digestion model no 1 (adml)," *Water Science and Technology*, vol. 45, no. 10, pp. 65–73, 2002.
- [4] O. Bernard, Z. Hadj-Sadok, D. Dochain, A. Genovesi, and J.-P. Steyer, "Dynamical model development and parameter identification for an anaerobic wastewater treatment process," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 75, no. 4, pp. 424–438, 2001.
- [5] S. Weinrich, S. Koch, F. Bonk, D. Popp, D. Benndorf, S. Klamt, and et al., "Augmenting biogas process modeling by resolving intracellular metabolic activity," *Frontiers in microbiology*, vol. 10, p. 1095, 2019.
- [6] J. De Vrieze and W. Verstraete, "Perspectives for microbial community composition in anaerobic digestion: from abundance and activity to connectivity," *Environmental microbiology*, vol. 18, no. 9, pp. 2797–2809, 2016.
- [7] M. López, G. Ruiz, and M. V. García, *Biología de sistemas: informe de vigilancia tecnológica*. Genoma España, 2007.
- [8] S. Koch, F. Kohrs, P. Lahmann, T. Bissinger, S. Wendschuh, D. Benndorf, and et al., "Redcom: A strategy for reduced metabolic modeling of complex microbial communities and its application for analyzing experimental datasets from anaerobic digestion," *PLoS computational biology*, vol. 15, no. 2, p. e1006759, 2019.
- [9] R. Urbanczik, "Enumerating constrained elementary flux vectors of metabolic networks," *IET systems biology*, vol. 1, no. 5, pp. 274–279, 2007.
- [10] E. O'Brien, J. Monk, and B. Palsson, "Using genome-scale models to predict biological capabilities," *Cell*, vol. 161, no. 5, pp. 971 – 987, 2015.
- [11] J. D. Orth, I. Thiele, and B. Ø. Palsson, "What is flux balance analysis?" *Nature biotechnology*, vol. 28, no. 3, pp. 245–248, 2010.
- [12] G. R. Kumar and N. Chowdhary, "Biotechnological and bioinformatics approaches for augmentation of biohydrogen production: A review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 56, pp. 1194–1206, 2016.
- [13] M. Jamilis, S. Nuñez, F. Garelli, and H. De Battista, "Detectability and observability analysis of the anaerobic digestion process," in *2018 Argentine Conference on Automatic Control (AADECA)*, 2018, pp. 1–6.
- [14] M. Jamilis, T. Castañeda, and H. De Battista, "Optimización en línea de la producción de metano en biodigestores con instrumentación escasa," in *XIX Reunión de trabajo de procesamiento de la información y control*, 2021.
- [15] A. Varma and B. O. Palsson, "Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 60, no. 10, pp. 3724–3731, 1994.
- [16] L. Chang, X. Liu, and M. A. Henson, "Nonlinear model predictive control of fed-batch fermentations using dynamic flux balance models," *Journal of Process Control*, vol. 42, pp. 137–149, 2016.
- [17] L. Heirendt, S. Arreckx, T. Pfau, S. N. Mendoza, A. Richelle, A. Heinken, and et al., "Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the cobra toolbox v. 3.0," *Nature protocols*, vol. 14, no. 3, pp. 639–702, 2019.
- [18] M. B. Biggs, G. L. Medlock, G. L. Kolling, and J. A. Papin, "Metabolic network modeling of microbial communities," *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, vol. 7, no. 5, pp. 317–334, 2015.
- [19] S. Koch, D. Benndorf, K. Fronk, U. Reichl, and S. Klamt, "Predicting compositions of microbial communities from stoichiometric models with applications for the biogas process," *Biotechnology for biofuels*, vol. 9, pp. 1–16, 2016.
- [20] R. A. Khandelwal, B. G. Olivier, W. F. Röling, B. Teusink, and F. J. Bruggeman, "Community flux balance analysis for microbial consortia at balanced growth," *PLoS one*, vol. 8, no. 5, p. e64567, 2013.
- [21] G. Casanovas, F. Della, F. Reymundo, and R. Serafini, "Guía teórica-práctica sobre el biogás y los biodigestores," *FAO. Obtenido de <http://www.probiomasa.gob.ar>*, 2019.