

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE AIREACIÓN EXTERNO EN LA
FERMENTACIÓN CON *Lactococcus lactis***

ANDREA PATRICIA SOLER GALINDO

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D. C.
2009**

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE AIREACIÓN EXTERNO EN LA
FERMENTACIÓN CON *Lactococcus lactis***

ANDREA PATRICIA SOLER GALINDO

**Tesis para optar el título de
Magíster en Ingeniería Química**

**DIRECTOR
GUSTAVO BUITRAGO HURTADO
Ingeniero Químico MSc.**

**CODIRECTOR
CARLOS MARTINEZ RIASCOS
Ingeniero Químico MSc. Dr. Ing.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D. C.
2009**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Ing. Gustavo Buitrago Hurtado
Director del proyecto

Ing. Carlos Martínez Riascos
Codirector del proyecto

Ing. Rubén Darío Godoy
Jurado

Ing. Mario Velásquez
Jurado
Director del Postgrado

Al eterno Dios, que me ha favorecido durante toda la vida.
A mis Padres, que son la representación en la tierra de mis ángeles protectores,
a mi muñequita linda que compartió su tiempo con éste proyecto,
Monica, Carlos y la familia Páez Espitia, por brindarme ánimo y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia – IBUN-, por permitirme desarrollar éste proyecto de grado en la línea de biopolímeros.

A la Universidad Nacional de Colombia.

A la Dirección de Investigación Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo financiero.

Al Ing. Gustavo Buitrago Hurtado, por la dirección y colaboración constante tanto en éste proyecto como en todos en los que me ha permitido participar. Al Ing. Carlos Martínez y jurados por sus aportes al documento.

A la Dra. Sonia Amparo Ospina Sánchez Directora del laboratorio de Tecnología de Enzimas.

A mis compañeros de laboratorio Yohn Flórez, Jorge Cortazar, Dionicio Malagon, Luz Ángela y pasantes del Colegio Mayor de Cundinamarca, por su aportes en experiencia y animo, por ser mis amigos y alegrarme los días de laboratorio. A Yolanda Pardo, por su gran disposición de servicio como auxiliar de laboratorio y amabilidad, haciendo de mis días en el laboratorio una experiencia agradable

A mis compañeros de Maestría por su constante apoyo académico, por ser excelentes compañeros de camino en esta etapa de mi vida.

A los demás profesionales, profesores, técnicos, estudiantes y personal administrativo del IBUN, del Laboratorio de Ingeniería Química y a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
JUSTIFICACIÓN	16
ANTECEDENTES	18
1. OBJETIVOS	20
2. MARCO TEORICO	21
2.1. ASPECTOS AMBIENTALES EN EL CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS	21
2.2. TRANSFERENCIA DE OXÍGENO	22
2.2.1. <i>Relación del coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}) con las variables operacionales del sistema</i>	24
2.2.2. <i>Determinación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno</i>	25
2.2.3. <i>Valores reportados para el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.</i>	27
2.3. BIORREACTORES	28
2.3.1. <i>Tanque agitado</i>	29
2.3.2. <i>Columna de burbujeo</i>	29
2.3.3. <i>Reactores de corrientes</i>	29
2.3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y EXOPOLISACÁRIDOS	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. MICROORGANISMO	33
3.1.1. <i>Conservación del microorganismo.</i>	33
3.1.2. <i>Activación</i>	33
3.2. MEDIO DE FERMENTACIÓN E INÓCULO	34
3.3. CONFIGURACIÓN DE LOS SISTEMAS FERMENTATIVOS Y EQUIPOS	34
3.3.1. <i>Ensayos en fermentador convencional</i>	34
3.3.2. <i>Ensayos en fermentador con dispositivo de aireación externo y recirculación de medio de cultivo.</i>	35
3.3.3. <i>Equipos</i>	35

3.4. EVALUACIÓN DE LOS CULTIVOS Y DEL SISTEMA	37
3.4.2 <i>Determinación de la actividad enzimática</i>	37
3.4.3 <i>Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}) en agua</i>	38
3.4.4 <i>Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}) por la técnica dinámica</i>	39
3.4.5. <i>Determinación del tiempo de respuesta del electrodo^l</i>	42
3.5 METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	42
3.5.1. <i>Fermentación convencional</i>	42
3.5.2. <i>Diseño, construcción y caracterización del prototipo de aireador externo</i>	44
3.5.3. <i>Evaluación del sistema de aireación externo en el cultivo con <i>Lactococcus lactis</i>.</i>	46
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	47
4.1. ANÁLISIS DEL SISTEMA CONVENCIONAL	47
4.1.1. <i>Fermentación convencional</i>	47
4.1.2. <i>Determinación del k_{La} en agua para el sistema convencional</i>	51
4.1.3. <i>Determinación del tiempo de respuesta del primer electrodo</i>	52
4.2. DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PROTOTIPO:	53
4.2.1. <i>Diseño del dispositivo de aireador externo</i>	53
4.2.2. <i>Caracterización hidrodinámica</i>	53
4.2.3. <i>Determinación del tiempo de respuesta del segundo electrodo</i>	58
4.2.4. <i>Análisis Adimensional</i>	59
4.3. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE AIREACIÓN EXTERNO EN EL CULTIVO CON <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> .	61
4.3.1 <i>Fermentaciones en condiciones de operación variables</i>	61
4.3.2 <i>Fermentaciones en condiciones de operación fijas</i>	63
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
BIBLIOGRAFIA	68

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Valores de k_La reportados en la literatura. Técnica de eliminación de oxígeno.	27
Tabla 2. Valores de k_La reportados en la literatura. Técnica dinámica.	28
Tabla 3. Medio de fermentación para el crecimiento de la cepa <i>Lactococcus</i> 34.1.	34
Tabla 4. Especificaciones del biorreactor Biolab®.	36
Tabla 5. Descripción del biorreactor Biolab®.	36
Tabla 6. Condiciones y diseño de experimentos con el sistema convencional.	43
Tabla 7. Condiciones de evaluación para la determinación del k_La en agua con el sistema convencional.	43
Tabla 8. Condiciones para la caracterización del prototipo de aireador externo.	44
Tabla 9. Diseño experimental en la caracterización del prototipo de aireador externo.	45
Tabla 10. Error experimental en los ensayos con el sistema convencional.	50
Tabla 11. Valores del k_La en agua con el sistema convencional.	51
Tabla 12. Tiempo muerto y de respuesta del primer electrodo de oxígeno disuelto.	52
Tabla 13. Tiempo muerto y de respuesta del segundo electrodo de oxígeno disuelto.	58
Tabla 14. Error experimental en la caracterización del prototipo de aireador externo.	59
Tabla 15. Demanda de oxígeno y k_La en fermentaciones con el prototipo de aireador externo.	60
Tabla 16. Consolidado de resultados de la caracterización del prototipo de aireador externo.	84

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Transferencia de un componente en fase gaseosa desde el centro de la burbuja hasta el interior de la célula.	23
Figura 2. Desempeño de diferentes contactores.	29
Figura 3. Configuración de diferentes contactores.	30
Figura 4. Reacciones catalizadas por glucansacarosas.	31
Figura 5. Curva para el cálculo del k_{La} por la técnica de desgasificación.	38
Figura 6. Diagrama de flujo para la aplicación de la técnica dinámica.	41
Figura 7. Curva en la obtención del k_{La} empleando la técnica dinámica .	41
Figura 8. Esquema del diseño experimental en la caracterización del prototipo de aireador externo.	45
Figura 9. Cinéticas de crecimiento y variación de pH en las fermentaciones convencionales con el <i>Lactococcus lactis</i> .	48
Figura 10. Variación del porcentaje de saturación de oxígeno disuelto en las fermentaciones convencionales con el <i>Lactococcus lactis</i> .	49
Figura 11. Actividades hidrolítica, de transferencia y biomasa obtenidas en las fermentaciones convencionales con el <i>Lactococcus lactis</i> .	50
Figura 12. Determinación del k_{La} en agua con el sistema convencional.	51
Figura 13. Determinación del tiempo de respuesta del primer electrodo de oxígeno disuelto.	52
Figura 14. Dispositivo externo al tanque de fermentación soporte del difusor.	54
Figura 15. Concentración de oxígeno disuelto en la determinación del k_{La} en agua en los ensayos con el difusor externo en la línea base de ensayos variando FR y FA.	55
Figura 16. Variación del k_{La} con el flujo de recirculación y el flujo de aire.	56
Figura 17. Variación del k_{La} con la presión en el aireador externo, bajo un flujo de recirculación de 0.45 Re/m. y flujo de aire de 0.65 v.v.m.	56
Figura 18. Variación del k_{La} con la agitación bajo un flujo de aire de 1 v.v.m.	57
Figura 19. Variación del k_{La} con la temperatura, bajo un flujo de recirculación de 0.45 Re/m. y flujo de aire de 0.65 v.v.m.	57

Figura 20. Determinación del tiempo de respuesta del segundo electrodo de oxígeno disuelto.	58
Figura 21. Determinación del error experimental en la caracterización del prototipo de aireador externo.	59
Figura 22. Determinación del k_La por la técnica dinámica -régimen no permanente- en fermentaciones con el prototipo de aireación externo.	61
Figura 23. Cinéticas de crecimiento microbiano y variación del porcentaje de oxígeno disuelto en fermentaciones con el prototipo de aireador externo.	64
Figura 24. Curva de calibración para determinación de azúcares reductores.	73
Figura 25. Esquema en la determinación de la actividad transferasa.	77
Figura 26. Curva de calibración del variador del agitador.	79
Figura 27. Curva de calibración del rotámetro para gases en el rango de 0 a 1.2 L/min.	80
Figura 28. Curva de calibración del rotámetro para gases en el rango de 0 a 5 L/min.	80
Figura 29. Curva de calibración del rotámetro para líquidos.	81
Figura 30. Curvas para la determinación del k_La en agua en los ensayos con el difusor externo en la línea base de ensayos para FR y FA.	83
Figura 31. Regresión de las curvas para la determinación del k_La en agua en los ensayos con el difusor externo en la línea base de ensayos para FR y FA.	84
Figura 32. Regresión en la determinación del k_La por la técnica dinámica en la zona de reaireación FR(Re/m) 0,87; FA(v.v.m.) 0,65, Agitación (r.p.m.): 154, Temperatura (°C): 30.	86
Figura 33. Normalización en la determinación del k_La en la zona de reaireación FR(Re/m) 0,87; FA(v.v.m.) 0,65, agitación (r.p.m.): 154, temperatura (°C): 30.	86
Figura 34. Regresión en la determinación del k_La por la técnica dinámica FR(Re/m) 0,87; FA(v.v.m.) 0,65, agitación (r.p.m.): 154, temperatura (°C): 30.	87
Figura 35. Determinación de la actividad glucosiltransferasa.	89
Figura 36. Determinación de la actividad hidrolítica.	89

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1.	71
PROTOSCOLOS ANÁLISIS DE LABORATORIO	71
PROTOSCOLO 1. MÉTODOS COLORIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES ACIDO DINITROSALICILICO (DNS)	72
PROTOSCOLO 2. MÉTODOS COLORIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA	74
PROTOSCOLO 3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: GLUCOSILTRANSFERASA E HIDROLÍTICA.	75
PROTOSCOLO 4. TINCIÓN DE GRAM	78
ANEXO 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LA INSTRUMENTACIÓN	79
VARIADOR AGITADOR MODULO REACTOR BIOLAB	79
ROTÁMETROS PARA GASES	79
ROTAMETROS PARA LÍQUIDOS	81
REPORTE DEL AJUSTE Y CALIBRACIÓN MANÓMETRO	81
ANEXO 3. MUESTRAS DE CÁLCULO	83
MUESTRA DE CÁLCULO EN LA DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO EN AGUA POR LA TÉCNICA DE DESGASIFICACIÓN	83
MUESTRA DE CÁLCULO EN LA DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO EN FERMENTACIONES POR LA TÉCNICA DINÁMICA	85
MUESTRA DE CÁLCULO EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	88
ANEXO 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS VARIABLES	90
ANEXO 5. INFORME AVANCE DE PRÁCTICA DE EXTENSIÓN –PASANTÍA PREGRADO INGENIERÍA QUÍMICA I-2009.^[1] -	93
ANEXO 6. PLANOS DE CONSTRUCCIÓN Y CONFIGURACIÓN DEL DISPOSITIVO.	100
ANEXO 7. EQUIPOS	104

RESUMEN

En fermentaciones aerobias uno de los nutrientes que comúnmente se constituye en limitante es el oxígeno, cuya transferencia está afectada por variables como el tamaño de burbuja, la temperatura, la presión, las propiedades del medio líquido, la concentración de oxígeno en el gas, la potencia transferida por la agitación, entre otras. En la fermentación del *Lactococcus lactis* para la producción del complejo enzimático que genera un biopolímero a partir de glucosa, se presenta extrema limitación de oxígeno. En éste trabajo se estudia la transferencia de oxígeno durante la fermentación, se diseña e implementa un sistema de aireación externo con un microburbujeador de acero sinterizado y recirculación de medio de cultivo, acoplado a fermentadores del tipo tanque agitado; encontrándose que las variables que mayor efecto tienen sobre la transferencia de oxígeno son los cambios en el flujo de recirculación, la agitación, la presión en el aireador externo y el diámetro de la burbuja. Se encuentra que la agitación tiene un efecto significativo tanto en el biorreactor con aireador externo como en el convencional de tanque agitado con difusor interno. Los cambios en la transferencia de oxígeno desde un k_{La} de 20.16 h^{-1} para el biorreactor convencional del tipo tanque agitado hasta valores de k_{La} de 90 h^{-1} con el aireador externo, muestran que el sistema de aireación externo favorece la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida, presentando valores similares a los reportados para biorreactores del tipo *Airlift*. Sin implicar grandes cambios en las tecnologías actuales de producción con tanque agitado.

Como complemento al trabajo experimental, se desarrolló un modelo matemático del sistema de aireación externo estudiado empleando análisis adimensional. La caracterización del sistema y su modelo permitirán su implementación en otras escalas, con microorganismos aerobios que presenten alta demanda de oxígeno o cultivos con células de mamíferos sensibles a esfuerzos de corte.

El estudio comprende las cinéticas de crecimiento obtenidas y los valores de k_{La} empleando la técnica dinámica para diferentes condiciones en la fase exponencial de crecimiento. Se encontraron diferentes condiciones para las que se hace despreciable la limitación de oxígeno, sin embargo, esta condición tuvo una incidencia sobre la actividad enzimática del complejo enzimático, al generarse mayor polímero durante la fermentación, posiblemente se encuentran obstruidos los sitios activos.

INTRODUCCIÓN

La Biotecnología desde el punto de vista industrial tiene la misión de generar y aplicar nuevos conocimientos al desarrollo de técnicas, insumos y productos para la industria, en los que se tenga el máximo aprovechamiento de recursos naturales renovables, se utilicen procedimientos limpios, se optimice la tecnología, el recurso humano y económico, o bien se genere valor agregado en beneficio de la salud humana, el medio ambiente y en general de la calidad de vida. En cumplimiento de éste objetivo existen entidades como el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia –IBUN- y su laboratorio de tecnología de enzimas, donde se ha venido realizando numerosas investigaciones para la producción y caracterización de un exopolisacárido soluble en agua llamado BiLac®, el cual es sintetizado por un complejo enzimático extracelular con actividad glucansacarasa. Sobre este proceso la Universidad Nacional de Colombia solicitó una patente y es ganador del premio Ventures 2000 organizado por la Revista Dinero.

El complejo enzimático es producido por la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis*, cepa IBUN 34.1 y presenta una doble actividad, de hidrólisis y de transferencia, que hidroliza la sacarosa en fructosa y glucosa y posteriormente trasfiere la glucosa a la estructura que conforma el biopolímero. Éste complejo enzimático presenta una alta actividad glucansacarasa -4.17 U/mL-, obteniéndose en su acción con el sustrato un polímero lineal con peso molecular promedio de 800.000 Da ^[2], compuesto por unidades de α -D-glucopiranosil (2→6) glucopiranosas. La estructura fue elucidada por resonancia magnética nuclear y su comprobación realizada por hidrólisis con enzimas comerciales del tipo dextranasas.

Este biopolímero es completamente seguro para su uso en productos alimenticios y farmacéuticos, es soluble en agua, biodegradable, en su producción se emplea tecnologías limpias, es una molécula nueva y el microorganismo del cual se parte es considerado seguro (GRAS), constituyéndose en contribución a la valoración de componentes de la diversidad genética de Colombia.

El polímero purificado presenta propiedades físicas y químicas que lo hacen apto para ser empleado en la industria de alimentos como estabilizante, aportante de fibra funcional, prebiótico, resaltador del sabor y retenedor de humedad. En la industria farmacéutica es de gran interés en la obtención de películas para capsulas y recubrimiento de tabletas^[2].

El proceso de obtención del biopolímero se divide en dos etapas, la primera de ellas es la obtención del complejo enzimático por fermentación aerobia con el *Lactococcus* IBUN 34.1 y la segunda es la producción del biopolímero por reacción enzimática en presencia de sustrato –sacarosa-, con su correspondiente sistema de separación y purificación posterior^[3]. En los estudios de la fermentación se observa que bajo las condiciones de operación establecidas para producción del complejo enzimático se presenta limitación de oxígeno, aún en etapas tempranas del cultivo, esto debido a la alta velocidad de crecimiento^[4-7], por lo que se planteó para este trabajo estudiar la transferencia de oxígeno durante la fermentación, diseñar e implementar un sistema de aireación externo con un microburbujeador de acero sinterizado y recirculación de medio de cultivo, aumentando la presión y disminuyendo el diámetro de la burbuja, que no implicara grandes cambios en los equipos de producción.

La evaluación de un sistema de aireación externo al reactor, mediante la caracterización hidrodinámica y uso de variables adimensionales, proporciona una herramienta versátil para la implementación del sistema en otras escalas, en cultivos que demanden una alta transferencia de oxígeno, en configuraciones de lote alimentado, oxigenación de medios puros por filtración previa de los microorganismos, en reactores de lecho empacado, entre otras aplicaciones. En éste trabajo se desarrolla una evaluación detallada de la transferencia de oxígeno del cultivo con *Lactococcus* sp, tanto en la configuración del biorreactor convencional como en la operación del dispositivo diseñado, generando unas condiciones base en la eliminación de la limitación de oxígeno en el cultivo.

El presente estudio aporta al conocimiento de la etapa de fermentación del *Lactococcus* sp, mediante el estudio de la respuesta de los parámetros de evaluación del cultivo, al mejorar la transferencia de oxígeno con el uso de un sistema de aireación externo novedoso, con un diseño versátil y de fácil control de operación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Bajo las condiciones de producción del complejo enzimático establecidas para la planta piloto desarrollada por el Instituto de Biotecnología, se presenta limitación de oxígeno en la fermentación con *Lactococcus* sp, incluso en etapas tempranas del cultivo. Aunque bajo estas condiciones se obtiene un complejo enzimático con los niveles de actividad requeridos por el proceso, es necesario evaluar las condiciones de aireación, agitación o la implementación de un sistema adecuado para el suministro de oxígeno, tal que no se presente limitación de este nutriente y que permita correlacionar la transferencia de oxígeno con la actividad enzimática y demás variables de respuesta.

Muchos microorganismos aerobios son altamente dependientes de la disponibilidad de oxígeno, la cual es determinada por la transferencia del mismo, los mecanismos para la producción de metabolitos pueden ser orientados al ejercer control sobre la transferencia de oxígeno, suministrándolo en las cantidades requeridas por el cultivo.

Los cultivos con *Lactococcus lactis* para la producción del biopolímero, tradicionalmente se desarrollan en fermentadores de tanque agitado, los cuales cuentan con sistemas de aireación del tipo flauta que generan áreas superficiales específicas menores a las posibles con aireadores porosos, con áreas de 650 m^2 para los perforados y de 2000 m^2 para los porosos y con unos k_{La} de 0.09 s^{-1} y de 1.25 s^{-1} correspondientemente al ser evaluados en columnas de burbujeo^[8]. Asimismo, en reactores pequeños que no cuentan con baffles como el Bioflo® de 2 litros, con relaciones 1:1 entre el diámetro del tanque con la altura de líquido, donde los tiempos de residencia del aire pueden ser cortos y los patrones de mezclado aún no determinados; se genera una disminución de la retención de gas (“*hold-up*”), condición desfavorable para la difusión del oxígeno en el medio de fermentación.

En el presente trabajo. Considerando la posibilidad de usar un difusor de acero sinterizado que provee una alta tasa de oxigenación, se diseña un dispositivo de aireación externa con recirculación de medio y células, con su caracterización hidrodinámica se espera encontrar la posibilidad de mejorar las condiciones de producción del complejo enzimático, al desarrollar los cultivos sin limitación de oxígeno.

JUSTIFICACIÓN

Los fenómenos de transferencia de masa que ocurren durante el crecimiento de microorganismos en medio líquido, implican disolución de nutrientes, transferencia de productos y uno de los más importantes corresponde a la transferencia de oxígeno. Este factor representa en algunos cultivos limitaciones debidas a la baja solubilidad del oxígeno en los medios de cultivo con sales disueltas y alta viscosidad^[9].

Los procesos y técnicas de fermentación en biotecnología son objeto de múltiples estudios con el fin de mejorar las condiciones de producción en cuanto a los mecanismos de transferencia de oxígeno, éstos normalmente se enfocan a idear configuraciones y reactores que llevan a la necesidad de disponer de instrumental específico. El sistema de fermentación con aireador externo estudiado, se diferencia de los reactores reportados por la literatura como las columnas de burbujeo y *Airlift*, porque en este nuevo sistema inciden variables como la presión, los tiempos de residencia, la relación de flujos de líquido y de gas, en el contacto gas líquido. La configuración propuesta se constituye en un mecanismo versátil y eficiente para algunos cultivos aerobios, ya que provee alta tasa de transferencia de oxígeno en biorreactores.

Tradicionalmente el método para mejorar la transferencia de oxígeno se basa en el incremento de la velocidad de agitación^[9-11] y/o de la velocidad de aireación, con el fin de producir un régimen de turbulencia que además de mejorar el mezclado, incremente la velocidad de transferencia de masa gas-líquido, disminuyendo la viscosidad en productos pseudoplásticos y por tanto los efectos de coalescencia en la fase gaseosa que reducen el área de contacto. Sin embargo, el consumo de energía se aumenta al cubo con la velocidad y a la quinta potencia con el diámetro del agitador^[12, 13], limitando el escalado del proceso. Además, debe tenerse en cuenta que altas velocidades de agitación pueden tener un efecto negativo en la producción por fermentación de complejos enzimáticos, debido al incremento de los esfuerzos de corte sobre el cultivo^[14]. La eficiencia en la aireación de un sistema fermentativo depende de la solubilidad del oxígeno, de la velocidad de difusión en los cultivos y la capacidad del biorreactor de satisfacer la demanda de oxígeno de la población microbiana^[9]. Considerando estas tres características, y teniendo en cuenta que para el proceso se cuenta sólo con equipos tradicionales de fermentación de tanque agitado, en éste trabajo se plantea abordar tres condiciones en la operación que conduzcan a una mejor transferencia de oxígeno.

1. Instalación de un sistema aireador externo al biorreactor, bajo condiciones controladas, con el fin de incrementar la presión y con ésta la solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo.
2. Uso de un microburbujeador de acero sinterizado, que provee una alta área interfacial gas-líquido.
3. Manipulación del tiempo de residencia de la burbuja en contacto con el medio.

El estudio sistemático del efecto de las velocidades de aireación y agitación sobre la transferencia de oxígeno, en el sistema convencional de tanque agitado y difusor interno, provee los valores base de comparación, a partir de los cuales se evalúa la capacidad del sistema propuesto. Los microburbujeadores en tanques agitados son recomendados para cultivos con microorganismos sensibles al estrés mecánico, ya que disminuyen los requerimientos en flujo de aire y velocidades de agitación^[11, 13-15]. Con estos dispositivos se reduce el tamaño de burbuja, incrementando el área superficial total y el área de contacto con la fase líquida. Adicionalmente, si se incrementa la presión del sistema, la solubilidad y la difusividad se promueven, aumentando la transferencia de oxígeno y

disminuyendo la formación de espuma. El espumado en fermentadores en ocasiones constituye una limitación de los sistemas de aireación tradicionales de tanque agitado, donde ante la imposibilidad de aumentar las velocidades de agitación para no inducir estrés mecánico, se opta por aumentar los flujos de aire en pro de mantener disponible oxígeno para el cultivo. La determinación de las condiciones de operación del prototipo propuesto está condicionada al aumento de la transferencia de oxígeno sin dar lugar a un estrés mecánico excesivo sobre las células.

ANTECEDENTES

En el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), en su laboratorio de Tecnología de Enzimas, se han venido realizando investigaciones para la producción y caracterización de un exopolisacárido soluble en agua, denominado *BiLac*®. Desde 1998 por Cardozo y Gomez^[5] cuando se aislaron e identificación 25 cepas con actividad levansacarasa, se han desarrollado diferentes investigaciones encaminadas al estudio de la producción y caracterización de un Biopolímero obtenido a partir del complejo enzimático recuperado de cultivos con *Lactococcus lactis*. Posteriormente, Florez en 1988 realizó el estudio del efecto de la temperatura, el pH y la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática^[4] y García y Gómez en el 2000 seleccionaron las condiciones óptimas de producción del biopolímero, en cuanto a la concentración de sacarosa y tiempo de reacción^[6].

Una vez establecido el proceso de producción del biopolímero y ante la necesidad de producir volúmenes de biopolímero necesarios para la evaluación de sus potenciales usos, se emprendió en el 2004 el proyecto para construir una Planta Piloto especializada en este producto, en convenio con la empresa Procaps S.A. Esta iniciativa se encaminó a la consecución de los recursos físicos a nivel de planta piloto para la validación del proceso, recopilación de información para el escalado y producción de suficiente polímero para los ensayos de uso del mismo. El proyecto cuenta entonces con una planta piloto para la obtención de 160 Kg de polímero por lote, con calidad para uso farmacéutico. Durante su operación en forma continua entre el 2004 y 2005, se validó la tecnología, se estudió la reproducibilidad del proceso, se recopiló la información para el escalado industrial y se establecieron los parámetros de optimización.

Paralelamente a estos trabajos, el IBUN ha desarrollado proyectos de investigación en áreas transversales encaminados a la caracterización y optimización del proceso en las diferentes etapas y la identificación de usos del producto, bajo la modalidad de pasantía^[1, 7], en la optimización del proceso y recuperación del biopolímero, a nivel de pregrado^[16] en la caracterización de las propiedades de hidrofiliidad del polímero^[17]; a nivel de maestría y doctorado se ha trabajado en cuanto al estudio bioquímico y genético, en la evaluación de la purificación de la enzima dextransacarasa, condiciones de uso del polímero en procesos de extrusión y propiedades reológicas de las mezclas acuosas del polímero.

En cuanto a la cepa y su estabilidad^[18], se encontró que en un vigésimo replique, no se afectan las características morfológicas y de actividad producida por la cepa. La fermentación ha sido estudiada en lo referente a composición del medio de cultivo y capacidad amortiguadora -Soler, 2005-, y composición de las fuentes de carbono y nitrógeno en el 2006^[7], donde se encontró que una sustitución parcial de la fuente orgánica de nitrógeno por una fuente inorgánica, resultaba en una mayor actividad enzimática, con un nivel similar de productividad en biomasa. Otros estudios en el 2007 se encaminaron a la caracterización y purificación del complejo enzimático, donde preliminarmente mediante purificación y actividad en gel de electroforesis se indica que la cepa estudiada produce una sola enzima glucansacarasa con un peso molecular de 160 kDa^[19].

En el transcurso de los trabajos sobre la producción del biopolímero y la operación de la planta piloto, se observó la reiterante limitación de oxígeno, incluso desde las primeras horas de fermentación,

siendo un posible parámetro de variabilidad del producto obtenido, aunque no se ha desarrollado con anterioridad un estudio de la transferencia de oxígeno en la fermentación con el *Lactococcus lactis*. Siendo concientes de la importancia del suministro de oxígeno en el proceso de producción de la enzima glucansacarasa por fermentación, es necesaria su estandarización, estudio y optimización, con la hipótesis de que el aumento de la transferencia y mantenimiento del cultivo sin limitación de oxígeno, mejorará la productividad del mismo.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la transferencia de oxígeno en la fermentación con *Lactococcus lactis* para la producción de un complejo enzimático, mediante la caracterización e implementación de un prototipo de aireador externo con recirculación de medio de cultivo al fermentador.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer el comportamiento de la concentración de oxígeno en cultivos con *Lactococcus lactis*, evaluando el efecto de las condiciones de aireación y agitación, en un fermentador de 1.5 litros bajo la configuración tradicional de tanque agitado, con el propósito de eliminar la limitación de oxígeno.
- Proponer y definir la configuración del prototipo de aireador externo, a partir de un microburbujeador de acero sinterizado disponible.
- Determinar el comportamiento hidráulico y los parámetros de operación del prototipo.
- Evaluar el sistema de aireación externo en el cultivo con *Lactococcus lactis* y establecer el efecto de las variables relacionadas con la transferencia de oxígeno en la productividad del cultivo.

2. MARCO TEORICO

2.1. ASPECTOS AMBIENTALES EN EL CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS

Dentro de las operaciones más empleadas en la Biotecnología se encuentra la fermentación y es en ésta operación y en las anteriores o “upstream” y posteriores o “downstream” que conllevan éstos procesos, donde la Ingeniería Química provee herramientas de diseño, control de biorreactores y equipos para el desarrollo de las operaciones unitarias requeridas.

En los procesos biológicos aerobios o anaerobios, gran parte de las especies que conforman la población microbiana son seleccionadas por la interacción con el ambiente. Para controlar y asegurar el manejo de la actividad de los microorganismos y dar o no oportunidad de proliferar en determinado entorno, se requiere conocer los ambientes en los cuales crecen. La alta velocidad de crecimiento que tienen los microorganismos, hace que un pequeño cambio impuesto por fuerzas externas u ocasionadas por los mismos microorganismos, pueda conferir una gran ventaja selectiva. El conocimiento de los efectos de los factores físicos y nutricionales en el crecimiento microbiano, es esencial para entender y controlar la actividad de los microorganismos pobladores de un ambiente.^[20]

En un proceso de fermentación se deben evaluar una serie de variables para conocer y controlar el curso de la fermentación; entre las que están la temperatura, velocidad de agitación y aireación, presión, pH, oxígeno disuelto y formación de espuma; que se pueden establecer y medir directamente y las que son parámetros de productividad del cultivo como: velocidad de crecimiento, biomasa final, obtención del producto y consumo de sustratos, básicamente. Los efectos y condiciones óptimas de crecimientos en cuanto a temperatura y pH, clasifican a los microorganismos en Psicrófilas, Mesófilos o Termófilos. La importancia de la temperatura ambiental radica en su efecto sobre los lípidos y proteínas de la membrana celular y sus propiedades de transferencia. Con altas temperaturas la membrana lipídica puede disolverse en el medio acuoso y las moléculas proteicas de la célula que tienen función enzimática en el crecimiento se ven afectadas, la cual es resultante de la alteración en la conformación de la molécula, causando desnaturalización térmica y una alteración del arreglo espacial que es usualmente irreversible.^[20, 21]

Un segundo factor ambiental que influye en la actividad y velocidad de crecimiento de los microorganismos es la concentración del ión hidrógeno. Cada especie microbiana se caracteriza por los valores mínimos y máximos del pH, en que el crecimiento es posible; estos usualmente difieren en tres o cuatro unidades. Muchas actividades metabólicas de los microorganismos dan como resultado la variación del pH del medio; esto ocurre por ejemplo con microorganismos involucrados en los procesos anaerobios, que al descomponer los compuestos orgánicos como carbohidratos en una oxidación parcial, generan ácidos como productos intermedios de su metabolismo^[22]. Otro caso de variación de pH puede ser el de la oxidación de los compuestos orgánicos produciendo suficiente dióxido de carbono que disminuye el pH a valores bastante bajos si el ambiente acuoso no tiene una concentración suficiente del buffer. También cuando hay presencia de suficiente oxígeno durante el crecimiento aerobio normal, varios microorganismos pueden generar ácidos orgánicos como productos. El pH del ambiente no siempre es un resultado de la actividad microbiana, pues muchas sales inorgánicas presentes en el medio pueden influir en el pH.

El tercer factor determinante es la disponibilidad de los nutrientes, entre los que están las fuentes de carbono y nitrógeno, micronutrientes y el oxígeno

Los organismos que requieren oxígeno, son clasificados como aerobios estrictos u obligados, aquellos que no pueden crecer en presencia de oxígeno son los anaerobios estrictos u obligados, y aquellos que pueden crecer con o sin oxígeno, son anaerobios facultativos. Varios microorganismos clasificados como microaerófilos, requieren bajas concentraciones de oxígeno y no crecen en atmósferas con alta presión de oxígeno y los anaerobios aerotolerantes pueden crecer con o sin oxígeno pero su metabolismo es siempre fermentativo, por ejemplo el *Lactobacillus*^[23]. El principal uso que los microorganismos aerobios dan al oxígeno es como aceptor final de electrones en las reacciones de oxidación, que permiten la generación de energía^[20]. Es por esto que en los procesos fermentativos aerobios es necesario mantener una concentración de oxígeno suficientemente alta alrededor de las células para que estas sean capaces de utilizar al máximo la fuente de carbono^[24]. En este estudio se desarrollan cultivos con *Lactococcus lactis*, microorganismo con alta demanda de oxígeno debido a su alta velocidad de crecimiento.

2.2. TRANSFERENCIA DE OXÍGENO.

Según la teoría de Lewis y Whitman en (1942) que es la más ampliamente utilizada, se puede decir que en fermentaciones aerobias, existe un conjunto de resistencias al paso del oxígeno desde la fase gaseosa hasta el interior de la célula, las cuales comprenden^[25, 26]:

1. Transferencia difusiva a través de la capa límite de gas en la burbuja.
2. Transferencia a través de la interfase gas – líquido.
3. Transferencia a través de la película líquida que rodea la burbuja
4. Transferencia en la fase líquida
5. Transferencia a través de la película líquida que rodea la célula
6. Penetración a la célula y al citoplasma
7. Reacción bioquímica

Si la célula se encuentra en aglomerados –pellets- o inmovilizada se tendrá una resistencia adicional a la transferencia dentro del pellet.^[27]

Cuando las células se encuentran dispersas en el líquido y el medio de fermentación se encuentra en mezcla perfecta, la mayor de estas resistencias y por consiguiente determinante es la tercera, entre la interfase y el seno del líquido –ver figura 1^[21]. Debido a que la concentración de oxígeno -por su baja solubilidad- en el seno del líquido es relativamente menor que en la capa límite alrededor de la burbuja, en la cual es cercana a la del equilibrio -aproximadamente 7 ppm en agua a condiciones normales-, existe un flux continuo (J_{O_2} mol/m²*s) de oxígeno disuelto hacia el líquido, cuya magnitud depende de la difusividad.

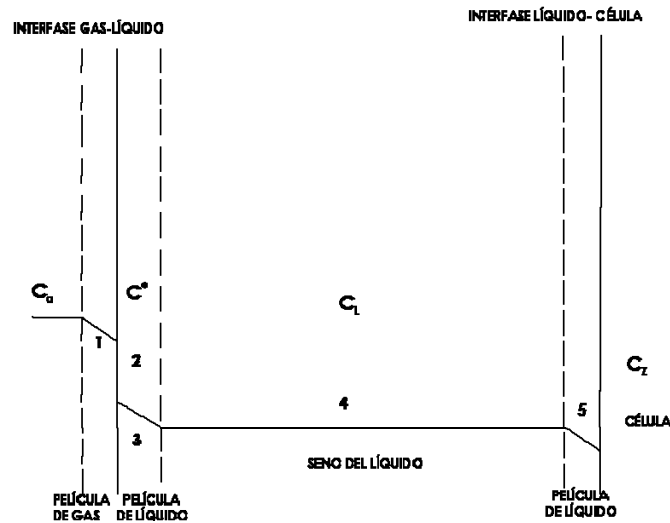


Figura 1. Transferencia de un componente en fase gaseosa desde el centro de la burbuja hasta el interior de la célula^[21]

La velocidad de transferencia de oxígeno depende del microorganismo y de su ambiente. El proceso involucra dos instancias, el consumo de oxígeno por parte del microorganismo, el cual, en el proceso evaluado es muy alto y el suministro de oxígeno desde las burbujas hasta el medio líquido. Dado que el oxígeno que abandona la fase gaseosa pasa en su totalidad a la fase líquida, el flux en el gas será igual al flux en el líquido^[21, 27].

$$J_{O_2g} = k_g (p - p_i) = J_{O_2l} = k_L (C_i - C_L) = K_L (C^* - C_L) \quad (1)$$

Donde p es la presión parcial de oxígeno y el subíndice i se refiere a la condición de la interfase gas-líquido, establecida por la ley de Henry. C_L es la concentración de oxígeno en el seno del líquido y C_i es la concentración en la interfase que no es directamente medible, por lo que se considera un flux global de oxígeno desde la burbuja a la fase líquida, con un coeficiente global $-K_L$, por la fuerza impulsora en la fase líquida. La ecuación que describe el índice de transferencia total entre las dos fases al considerar que la resistencia en el gas es despreciable, y obteniendo una velocidad de transferencia de oxígeno –OTR oxigen transfer rate- por unidad de volumen del reactor, corresponde a la expresión 2, eliminando así la dificultad en la determinación independiente de k_L y el área interfacial por unidad de volumen de líquido $-a$ (m^2/m^3)^[27].

$$OTR = k_L a (C^* - C_L) \quad (2)$$

Los factores que la determinan son^[10]:

k_L : Es el coeficiente de transferencia de masa que mide la velocidad a la cual las moléculas se mueven a través de la capa límite interfacial, depende de los factores combinados de la velocidad del fluido, de la geometría del sistema, condiciones del mezclado -velocidad y diseño del agitador-, y de propiedades del fluido como la viscosidad, naturaleza, tamaño de las moléculas y la difusividad^[21]. Dentro de las condiciones ambientales, el coeficiente está determinado por la temperatura, altas temperaturas incrementan las velocidades de difusión, aunque por encima de 40°C la solubilidad del oxígeno disminuye considerablemente. En general, moléculas más grandes difunden más lentamente y la velocidad de difusión se reduce con incrementos de la viscosidad del líquido. Alta turbulencia reduce el espesor de la capa límite, lo que aumenta el coeficiente.

a: El área interfacial es determinada por el tamaño y número de burbujas. Entre los factores que influyen en el tamaño de las burbujas se incluyen la velocidad del agitador y el tipo de paleta, el diseño del reactor, el mecanismo por el cual el material gaseoso se introduce en la fase acuosa -velocidad del gas, configuración del difusor-, y la composición del medio -la presencia de agentes tensoactivos y sales, tienen un efecto opuesto a los aceites y antiespumantes que permiten la coalescencia-. Al disminuir el tamaño de las burbujas se genera un aumento del área interfacial, aunque existe unos límites en la disminución del tamaño, aún más sensible para medios viscosos, en general burbujas menores a 3 mm resultan inconvenientes por efectos de superficie, al generar “esferas” sin movimiento en la interfase, donde los efectos de la tensión superficial dominan el comportamiento, dependiendo también de las propiedades del fluido.^[21]

$(C^* - C_L)$ La fuerza impulsora es el gradiente de concentración entre la capa límite y el seno del líquido o concentración media. Los factores que la afectan son la solubilidad del oxígeno y la actividad metabólica. Una solubilidad más alta aumentara la concentración de saturación (C^*), la solubilidad aumenta al incrementar la presión, varios autores han estudiado el efecto de la presión en el metabolismo y disponibilidad de oxígeno en microorganismos tanto en reactores agitados como en reactores del tipo *Airfit* encontrando que a presiones mayores a 2 bares aumenta la biomasa y el rendimiento sustrato en biomasa^[14, 28]. Por otro lado, la actividad metabólica consume el oxígeno, disminuyendo la concentración en el seno del líquido (C_L) y aumentando la fuerza impulsora a través de la capa límite^[10]. La concentración en el líquido se considera homogénea en todo sistema bien agitado. En el transcurso de la fermentación, la variación de la concentración en el líquido con el tiempo estará afectada por la demanda de oxígeno del microorganismo.

2.2.1. Relación del coeficiente de transferencia de oxígeno (k_La) con las variables operacionales del sistema

El k_La puede correlacionarse con las variables de operación del sistema: agitación, aireación, potencia aplicada, etc; con las propiedades del fluido: densidad, viscosidad, peso específico, y con la geometría del sistema: diámetro del agitador/ diámetro del fermentador, etc.

Esas correlaciones son empíricas, surgidas de información recogida de un gran número de experimentos, y permiten:

- Predecir la transferencia al modificar las condiciones de operación.
- Calcular el k_La sin necesidad de efectuar mediciones.
- Hacer el cambio de escala.
- Diseñar reactores.

Por ejemplo, se pueden tener expresiones del tipo^[21] :

$$k_La = k \cdot (P/V)^\alpha (u_g)^\beta \quad (3a)$$

En esta expresión se relaciona k_La con la potencia (P), volumen (V) y la velocidad del gas (u_g). Los exponentes (α , β) son menores que la unidad, por lo que el aumento del k_La por aumento de dichos factores resulta cada vez menos eficiente y más costoso a medida que se aumenta su valor.

Otras limitaciones de la expresión 3a son:

1. *Validez sólo para fluidos newtonianos, con viscosidad (μ) constante:* En general, los caldos de fermentación se comportan como fluidos no newtonianos, con viscosidad variable a lo largo del proceso fermentativo. En estos casos, las correlaciones adoptan formas más complejas donde deben intervenir otras variables: D (diámetro del impulsor); D_{O_2} (Difusión de oxígeno); μ_{ap} (viscosidad aparente); σ (tensión superficial), N (velocidad de agitación); ρ (densidad del líquido) y velocidad superficial del gas (u_g).

2. *Validez para intervalos de volúmenes determinados, normalmente estrechos*

3- *Válida para potencias aplicadas (P) desde 500 a 10,000 W*

4- *Expresiones obtenidas en soluciones de electrolitos de baja viscosidad (sin azúcares, sólidos, etc)*

En general para sistemas viscosos las correlaciones son de la forma^[29]:

$$\frac{k_L a D^2}{D_{O_2}} = 0.06 \left(\frac{\mu_{ap}}{\rho D_{O_2}} \right)^{0.5} \left(\frac{\mu_{ap} V_s}{\sigma} \right)^{0.6} \left(\frac{D^2 N \rho}{\mu_{ap}} \right)^{1.5} \left(\frac{D N^2}{g} \right)^{0.19} \left(\frac{D N}{V_s} \right)^{0.19} \quad (3b)$$

En estas relaciones complejas se prefiere emplear el análisis dimensional que permite reducir significativamente el número de ensayos con fines de proponer modelos matemáticos. Algunos números adimensionales serían:

$$C = C_L / C^* ; V_{ad} = V / V_{-ref.}$$

$V_{-ref.}$: Volumen de referencia

$$\text{Numero de Reynolds} = \left(\frac{D^2 N \rho}{\mu_{ap}} \right)$$

Otros números adimensionales importantes son: el número de potencia -Np- que establece la relación entre, potencia de agitación (P) y variables operativas del sistema; los números relacionados con el flujo de gas, como el número de Weber; los números relacionados con el grado de mezclado como el número de Pecllet, y los que relacionan el $k_L a$ como los números de Sherwood y Schmidt^[11, 14]

$$Np = \left(\frac{P}{\rho N^3 D^5} \right)$$

2.2.2. Determinación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

Los métodos más utilizados para la determinación experimental del $k_L a$ son^[24, 30]:

- Oxidación de una solución de sulfito de sodio – método indirecto-
- Eliminación de gas – método indirecto-
- Balance de oxígeno
- Técnica dinámica

Método de oxidación del sulfito^[24, 30, 31]

El fundamento de este método es la oxidación del sulfito sódico a sulfato en presencia de un catalizador como el Cu^{++} y aún cuando ha sido utilizado ampliamente, su uso hoy no es frecuente, ya que dependen de la pureza de los reactivos y al reproducibilidad de los resultados depende del operador^[24] y generalmente se obtienen valores de $k_L a$ mayores que con otras técnicas. Existe un método de sulfito modificado, el cual es una combinación del método del sulfito y del método de desgasificación^[30]; en este por costos y aumento de la precisión, la eliminación del oxígeno se realiza inicialmente mediante la adición del sulfito y el catalizador hasta obtener determinado valor de oxígeno disuelto, para luego hacer llegar la concentración hasta el valor mínimo con la adición de nitrógeno a la fase líquida.

Método del balance de oxígeno^[31]

En este método se mide el contenido de oxígeno en las corrientes gaseosas hacia y desde el fermentador. De un balance de materia en estado estacionario, entre la entrada y la salida, se determina la velocidad de transferencia de oxígeno desde el gas hacia el líquido para determinar C^* y C , el parámetro $k_L a$ puede calcularse a partir de la expresión (2). Este método es el más confiable para medir $k_L a$, además de permitir su determinación con tan sólo una medida y puede aplicarse a los fermentadores durante su operación, sin afectarlos.

Método de eliminación de oxígeno^[15, 31, 32]

No se lleva a cabo durante fermentaciones reales, sino con agua o medios simulados. Como no existe demanda de oxígeno, la ecuación para la transferencia corresponderá a la ecuación 2. Se realiza mediante la eliminación del oxígeno disuelto con nitrógeno, luego se determinan las concentraciones de oxígeno disuelto hasta la saturación a determinadas condiciones. Entre las ventajas y limitaciones están que es un método rápido, puede usarse directamente con el medio de fermentación, se requieren volúmenes grandes de nitrógeno por lo cual no es conveniente a gran escala, considera que el electrodo de oxígeno es permeable al gas y mide el impulso eléctrico producto de la reacción con el electrolito, proporcional a la presión parcial de oxígeno en la capa límite en la membrana y no concentraciones, por lo que hay que considerar el tiempo de respuesta y tiempo muerto del electrodo.

Método dinámico^[24, 31, 33]

Este método utiliza la respuesta transitoria a los cambios de concentración medidos por un electrodo de oxígeno disuelto y se basa en un balance en estado no estacionario para el oxígeno. Inicialmente el fermentador se halla con células consumiendo oxígeno, en un determinado instante se corta el suministro de oxígeno, por lo que la concentración de éste disminuye, hasta un valor no menor que la concentración crítica y posteriormente se inyecta aire con caudal constante, haciendo el seguimiento a la restitución de la concentración de saturación.

Esta técnica debe efectuarse en forma rápida, de modo que los parámetros fisiológicos –respiración- y cinéticos -biomasa, C^* - puedan considerarse constantes. En estas condiciones tenemos un cultivo en estado estacionario no continuo. Al igual que en la eliminación de oxígeno, se requiere un electrodo con un tiempo de respuesta adecuado; de no ser así el método no ofrecerá resultados precisos. El tiempo de respuesta del electrodo debe ser menor que el tiempo de respuesta de la transferencia de materia ($1/k_L a$). Estas mediciones están igualmente afectadas por la oxigenación superficial, para lo cual puede agregarse factores de corrección por el tiempo de respuesta y la aireación superficial.

Considerando, que la técnica de desgasificación ofrece datos más homogéneos y el consumo de nitrógeno en un reactor de 2 litros no es excesivo, en éste trabajo se determinará el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en la caracterización con agua mediante ésta técnica. Durante

las fermentaciones se realiza el procedimiento de acuerdo con la técnica dinámica, la cual tiene menor afectación hacia el cultivo.

2.2.3. Valores reportados para el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

En las tablas 1 y 2 se presentan valores reportados para el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en tanques agitados, correspondientes a trabajos realizados tanto a nivel nacional como internacional, en estos se emplean las técnicas de eliminación de oxígeno y dinámica. Para los reportes por la técnica dinámica, debe hacerse la salvedad que sus resultados son afectados por las características del medio usado.

Tabla 1. Valores del k_La reportados en la literatura. Técnica de eliminación de oxígeno

Volumen (L)	Agitación (Turbina de disco) (r.p.m.)	Aireación (vvm)	k_La (h ⁻¹)	Medio	Fuente
-	600	0,1	86,7	Agua	Becerra y Peña, 1991. Tomado de [34]
10	400	1	36 – 61		
100	250	1	90 – 151		
-	300	1,5	175,28		
-	400	1,5	236,08		
-	500	1,5	530		
5	200	1	90	Agua	Y.M. Lo, C.H. Hsu 2001
5	400	1	158		
5	400	1	14,4	Xantana 1,2%	Czermak 2005
5	100	0,1	10	Dulbecco's Modified Eagle's ^a con Suero bovino	
5	100	0,1	50 ^b		
5	200	1	29,88	Medio de fermentación	Rodríguez y Silva 2000
3	200	1	27	Medio de fermentación	Demirtas 2003
3	300	1	57.8		
5	100-500	0,2	4,57 - 76,44	Medio de fermentación	Torres y Rojas 1999
5	100-500	0,5	8,55 - 101,61		

a: Medio Gifco. b: Uso de un microburbujeador en cerámica y agitador de hélice marina

Según lo reportado, aunque es difícil la comparación al encontrar gran variedad en los valores de los parámetros de operación aún en tanques agitados, se encuentra que para la caracterización por la técnica de desgasificación –tabla 1-, los valores reportados por Y.M. Lo y C. H. Hsu del 2001 son mucho mayores que los demás, aún bajo las mismas condiciones de operación. Se puede observar que los medios de mayor viscosidad, generan mayor resistencia a la transferencia de oxígeno y que el uso de microburbujeadores mejora en gran medida los k_La obtenidos.

En la tabla 2 se reporta el k_La para sistemas fermentativos con diferentes microorganismos en tanques agitados, presentando variabilidad aún entre los mismos microorganismos, lo cual se asocia al medio utilizado en las fermentaciones, tipo de reactor y volumen de operación. También es importante resaltar que los valores reportados por la técnica de desgasificación son mayores a los reportados por la técnica dinámica, bajo las mismas condiciones de operación.^[24, 34, 35]

Las referencias para reactores *Airlift* presentan valores aún más variables en los parámetros y condiciones de operación evaluadas. Los trabajos nacionales^[30, 31, 36] reportan valores entre 27–90 h⁻¹, aunque en reportes extranjeros^[35, 37] se tienen valores de hasta 180 -234 h⁻¹

2.3. BIORREACTORES

Los biorreactores no convencionales son actualmente el objeto de estudio en muchos laboratorios de ingeniería bioquímica; el éxito de un proceso de fermentación industrial depende altamente del desempeño del reactor. Particularmente la transferencia de oxígeno y la correspondiente energía necesaria para cubrir la demanda del oxígeno, afectan fuertemente la eficiencia y los costos de producción^[37].

Tabla 2. Valores del k_La reportados en la literatura. Técnica dinámica

Microorganismo	Volumen	Agitación (Turbina de disco)	Aireación	k_La	Fuente
	(L)	(r.p.m.)	(vvm)	(h ⁻¹)	
<i>A. niger</i>	0,9	50-120	0,5	65-154	Becerra y Peña. 1991 Tomado de [34]
<i>A. niger</i>	3	300-700	1	90-200	
<i>B. thuringiensis</i>	1,5	300-500	1	1,9-6,7	
<i>B. thuringiensis</i>	1,5	300-500	2	2,7-9,0	
<i>K. fragilis</i>	3	200-500	1,5	40-235	
<i>Ps. ovalis</i>	0,9	50-120	0,5	90-197	
<i>Ps ovalis</i>	3	300-700	1	95-216	
<i>S. cerevisiae</i>	0,9	50-120	0,5	118-221	
<i>S. cerevisiae</i>	3	300-700	1	90-216	
<i>E. cloacae</i>	5	200	1,25	9,72	Bandaipheth 2006
	5	200	0,5-2	2,63 - 9,72	
	5	200-800	0,5	9,72 - 19,10	
<i>B. thuringiensis</i>	5	200	1	21,55	Rodríguez y Silva 2000
<i>C diphteriae</i>	5	300-500	0,2	11,9 - 51,6	Torres y Rojas 1999
	5	100-500	0,5	1,24 - 65,26	

Dentro de las configuraciones más empleadas en fermentación están el tanque agitado, la columna de burbujeo, el Airlift, los lechos empacados y fluidizados, entre otros. Los tanques agitados se mantienen como los tradicionales de la industria bioquímica, debido a su flexibilidad y a sus bien definidas características de escalamiento. El birreactor Airlift, así como la columna de burbujeo, son reactores sin agitación mecánica, en los que la aireación y la mezcla se realizan mediante la inyección de gas^[12], estos sistemas son de difícil escalado. Como alternativa se puede considerar el uso de microburbujeadores, que aunque involucran un costo de capital relevante, la inversión se puede recuperar en el escalado de la producción por los bajos costos de operación.

Una gran cantidad de procesos químicos o bioquímicos en ingeniería se basan en reacciones que ocurren entre moléculas que se encuentran separadas por una fase gaseosa y una líquida. Los dispositivos utilizados para cumplir con la operación, recibe el nombre de aireadores, contactores gas-líquido, absorbedores, etc. La propiedad más importante de estos equipos es la de mejorar el contacto gas-líquido para que la reacción pueda ser llevada a cabo.^[38] Estos equipos se dividen en dos según la forma en que ocurre la transferencia a la fase líquida: contactores de superficie y contactores de

volumen, (o aireadores de superficie y volumen respectivamente). Y según su eficacia en la aireación: contactores de bajo desempeño (todos los que no requieren energía mecánica interna de disipación) y contactores de alto desempeño; (poseen disipación mecánica, la transferencia es mucho mayor y el volumen del equipo disminuye).

Actualmente encontramos una amplia variedad de contactores gas-líquido, para los que se conocen ecuaciones empíricas que modelan su comportamiento, a continuación se resumen los más importantes y en la figura 2 se muestra la eficiencia en términos del $k_L a$ alcanzado.

La figura 2 muestra la transferencia de masa en contactores de laboratorio del mismo volumen respecto a la energía disipada por volumen de líquido, indicando que las columnas de burbujeo con platos -reciprocating jet- tienen un pequeño aumento de la transferencia con la misma energía utilizada en un tanque agitado, mientras que los de mayor eficiencia son los de Flujo incidente – impinging-stream- y los de recirculación forzada -Jet loop-, descritos a continuación – ver figura 3-.

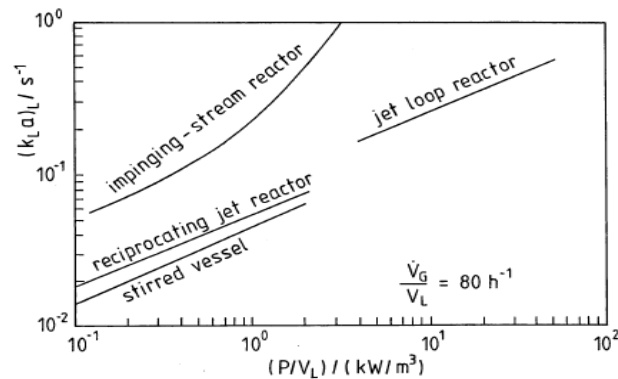


Figura 2. Desempeño de diferentes contactores, ^[38]

2.3.1. Tanque agitado

Reactor con agitación mecánica interna y entrada del gas en el fondo por medio de una flauta u otro tipo de dispersor –Figura 3 a-. En éste grupo se incluye el tradicional tanque agitado –STR-.

2.3.2 Columna de burbujeo

Es el equipo de contacto gas-líquido más sencillo que podemos encontrar –figura 3 b-, consiste en un tubo largo con una boquilla de entrada del gas en el fondo, pueden contener platos perforados para la redistribución de la fase gaseosa^[11, 29].

2.3.3 Reactores de corrientes

En este tipo encontramos todos aquellos que poseen lazos internos de recirculación:

Reactores de corrientes con impulsor

Son aquellos en que el movimiento se produce por el uso de un impulsor que genera un lazo interno de recirculación –figura 3 c-.

Reactores Airlift

En esta categoría se incluyen las columnas de burbujeo que poseen recirculación, la cual es producida por el movimiento fluido de la fase gaseosa dispersa –Figura 3 d-. Los reactores *Airlift* están agitados

neumáticamente y la circulación tiene lugar en un modelo cíclico definido a través de un conducto que divide el reactor en dos zonas: una de flujo ascendente y una de flujo descendente. La zona de difusión de gas del aro, tiene mayor retención de gas que la zona relativamente libre de gas, donde el flujo es descendente[30, 31, 35-37].

La simplicidad de su diseño y construcción, los modelos de flujo bien definidos, bajos consumos de energía, bajos esfuerzos cortantes, buen mezclado y el funcionamiento aséptico, debido a la ausencia de agitador, son ventajas importantes de los reactores *Airlift* para su aplicación en fermentaciones. La literatura reciente reporta resultados, para la transferencia de masa en los reactores *Airlift* con amplia variación y contradicción, debido a que los reactores y los procedimientos experimentales son diferentes^[31, 37].

Reactores jet-loop

Son aquellos que utilizan una bomba para recircular el medio, incluso en lechos empacados centrífugos^[32] –CPBR- o los *Gas-lift* en que se tienen dos tubos verticales con un separador superior^[39]. Incluso el ingreso del gas puede hacerse externo al tanque, al mezclarse con el líquido recirculado –figuras 3 e y f, este tipo de reactores en especial se asemeja a la configuración del prototipo propuesto de aireador externo. Estas configuraciones presentan un buen mezclado y evitan la aparición de volúmenes muertos^[38]. Gaddis 1999, reporta una ecuación para la estimación del k_La en este tipo de reactores, dependiente de la potencia disipada por unidad de volumen de líquido (P/V_L) y del flujo volumétrico de gas (Q_G/V_L).

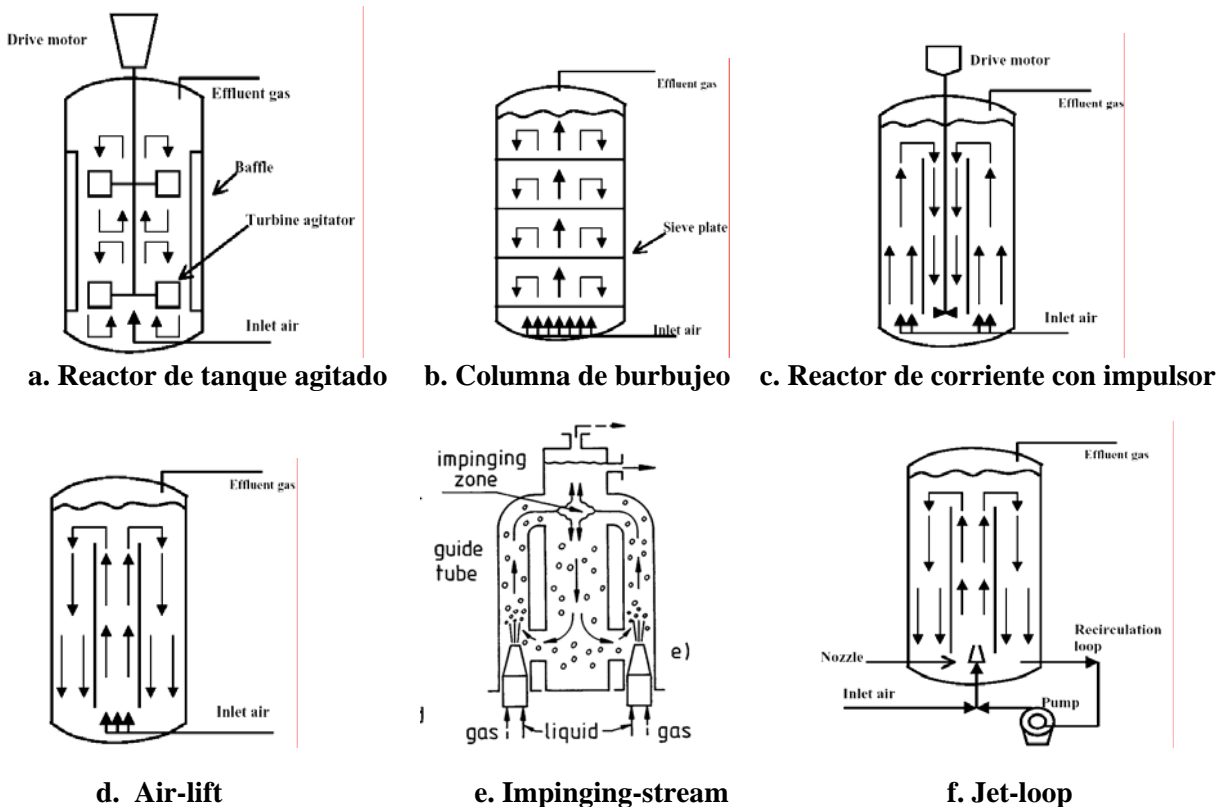


Figura 3. Configuración de diferentes contactores^[37, 38]

2.3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y EXOPOLISACÁRIDOS^[40-42]

Las bacterias ácido lácticas producen una amplia variedad de exopolisacáridos que están principalmente asociados a la protección y al crecimiento celular. Al final de la fase exponencial se obtiene la máxima concentración del exopolisacárido en el sobrenadante, la presencia de sacarosa actúa como inductor. Hasta hace poco, el interés industrial radicaba en sus propiedades físico-químicas, pero actualmente estos polisacáridos han generado un nuevo interés debido a su potencial aplicación en la nutrición y la salud^[40].

Además de heteropolisacáridos compuestos por glucosa, galactosa, ramnosa y fructosa, las bacterias ácido lácticas producen homopolisacáridos que contienen un solo tipo de monosacáridos, fructosa o glucosa, denominados fructanos y glucanos respectivamente. De hecho, la mayoría de estos homopolisacáridos comparten la característica de ser sintetizados por glucansacarosas extracelulares, utilizando sacarosa como el glicosil aceptor -fructosa o glucosa-.

Junto con la síntesis de homopolisacáridos de alto peso molecular, generalmente las glucansacarosas catalizan la síntesis de oligosacáridos o glicoconjugados de bajo peso molecular cuando se añaden al medio de reacción aceptores como la maltosa. Si bien la síntesis enzimática de fructanos -levana e inulina- no está bien documentada a nivel molecular, las glucansacarosas -glucosiltransferasas y dextransacarosas- a partir de *Streptococcus* y *Leuconostoc*, han sido bien estudiadas^[19].

El mecanismo catalítico en la síntesis de los glucanos como el BiLac® implica la polimerización enzimática de la cadena simple del polímero. La enzima posee dos actividades enzimáticas, una actividad hidrolítica que se caracteriza por hidrolizar el enlace glicosídico de la molécula de sacarosa actuando como sustrato al liberar una molécula de fructosa, la segunda es actividad de transferencia, transfiere los diversos grupos glucosil a la molécula aceptor (generalmente glucosa) sintetizando el polímero.

La síntesis de los diferentes productos depende del destino de las unidades glucosídicas, figura 4.

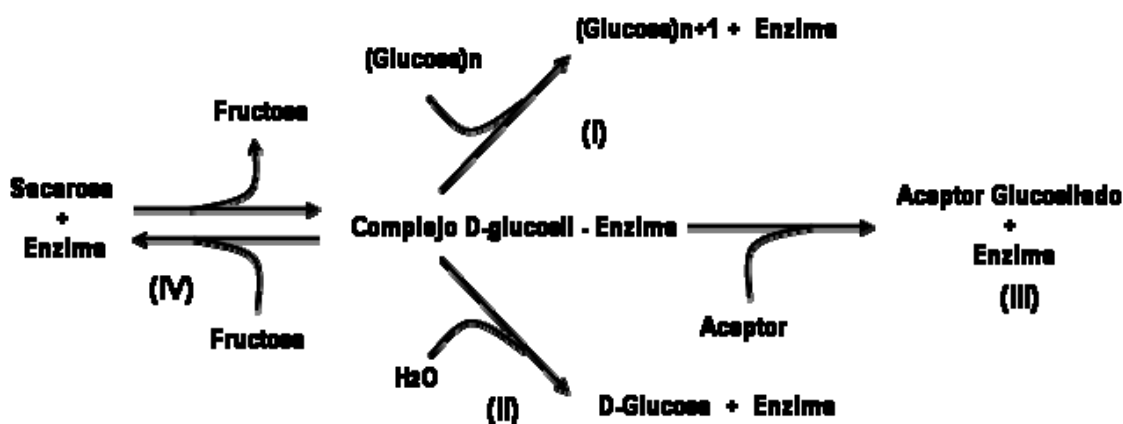


Figura 4. Reacciones catalizadas por glucansacarosas. I síntesis de glucano por transferencia sucesiva de unidades glucosil. II Hidrólisis de la sacarosa transfiriendo un grupo glucosil al agua como aceptor. III Síntesis del oligosacárido transfiriendo unidades glucosil a la molécula del polímero. IV Reacción reversa por introducción de unidad fructosil.^[41]

La cepa de *Lactococcus lactis* IBUN 34.1 produce una sola enzima de doble actividad, con un peso molecular de 160 kDa, lo cual fue establecido por medio de purificación y actividad en gel de electroforesis^[19]

Las bacterias ácido lácticas de mayor interés para alimentos son de los géneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Weissella*, los que presentan la ventaja de ser microorganismos de grado alimenticio, generalmente reconocidos como seguros –GRAS- y que podrían ser alternativa para producir biopolímeros en la industria de alimentos^[42, 43]. Estos son biopolímeros de cadena larga y de alto peso molecular que se disuelven o se dispersan en agua como modificador reológico o para proporcionar propiedades como emulsificantes, estabilizantes, encapsulación y formación de películas^[19].

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MICROORGANISMO

El microorganismo empleado para la producción del complejo enzimático es el *Lactococcus lactis subsp. lactis* aislado y catalogado como cepa 34.1^[44] en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), perteneciente a la familia *Streptococaceae* y fue aislado de muestras de suelo del municipio de Moniquirá (Boyacá)^[19]. Se encontró que esta cepa produce un complejo enzimático del tipo glucosiltransferasa que presenta una alta actividad enzimática de hidrólisis y transferencia asociada a la producción de un biopolímero del tipo glucano denominado BiLac®.

3.1.1. Conservación del microorganismo.

Para garantizar idoneidad de la cepa se siguió el protocolo desarrollado por el grupo de investigación que contempla dos formas de conservación: liofilizado y crío preservado^[44].

Liofilización

1 mL de la cepa original provista por el grupo de investigación -crío preservada- se descongela lentamente a temperatura ambiente y se activa en 50 mL de medio sacarosa a 30°C por 12 horas, y 180 r.p.m. de agitación. Los 50 mL se inoculan en 950 mL de medio sacarosa -tabla 3-, se incuba a 30°C haciendo seguimiento a la cinética de crecimiento por densidad óptica a 600 nm, cuando alcanza la máxima densidad celular (final de la fase exponencial) se disminuye la temperatura a 4°C. Se prepara una solución al 20% de leche descremada estéril, resuspendiendo leche en polvo en agua destilada. En condiciones asépticas, se transvasa a los frascos de liofilización la solución láctea y el medio de cultivo con las células viables en una proporción de 1:1 sin exceder las $\frac{3}{4}$ partes del recipiente. Se congela a -70°C por 24 horas, se liofilizar y almacena a 4°C.

Crío preservación

El medio de fermentación se transvasa en forma aséptica a micro-tubos estériles que contienen glicerol al 20% v/v, se homogenizan y almacenan a -70°C. La activación y los repiques se deben efectuar en condiciones asépticas, en cabina de flujo laminar, utilizando sistemas cerrados previamente estériles para realizar pases (biofermentadores) de una operación a otra, o en su defecto en ambientes pequeños con fuentes directas de calor (mechero).

3.1.2. Activación

Es el proceso mediante el cual la cepa se establece nuevamente en condiciones físicas y bioquímicas adecuadas para iniciar el crecimiento. La cepa proveniente del criovial se inocula en el medio de fermentación estéril -tabla 3- contenido en un frasco de hasta un litro de medio y se mantiene en agitación orbital a 200 r.p.m. por un periodo de 12 h a una temperatura de 30°C. De este cultivo se verifica su pureza por tinción de Gram y la concentración de biomasa -anexo 1-. Dependiendo del volumen de la fermentación final, se activan inóculos y/o preinóculos, empleando como volumen de siembra el 5% en cada etapa.

3.2. MEDIO DE FERMENTACIÓN E INÓCULO

El medio de cultivo empleado en la producción de la enzima es el diseñado por el grupo de investigación en trabajos previos [3], cuya composición se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Medio de fermentación para el crecimiento de la cepa *Lactococcus lactis* IBUN 34.1

<i>Componentes</i>	<i>Concentración (g/L)</i>
<i>Sacarosa</i> ^b	60
<i>Extracto de Levadura</i> ^b	10
<i>CaCl₂ · 2H₂O</i> ^a	0,14
<i>MgSO₄ · 7H₂O</i> ^a	0,04
<i>FeSO₄ · 7H₂O</i> ^a	0,04
<i>MnSO₄ · H₂O</i> ^a	0,02
<i>Ácido Fosfórico H₃PO₄</i> ^c	13,8 mL/L ^d
<i>KOH</i> ^c	20
<i>Agua Destilada c.s.p</i>	1 Litro

^a Grado analítico.

^b Grado comercial USP “grado alimenticio”.

^c H₃PO₄ al 85% y una densidad de 1.695 g/mL

^d Estas cantidades son base, se registra en la bitácora las cantidades finales al ajustar el pH

El procedimiento para la preparación del medio de cultivo es el siguiente:

- Colocar el 75 % del volumen de agua destilada en un frasco de volumen según necesidad.
- Adicionar el H₃PO₄ y el KOH con agitación continua, verificando que el pH sea cercano a 7.
- Adicionar uno a uno hasta su disolución total con agitación constante en el siguiente orden: MnSO₄, MgSO₄, FeSO₄, CaCl₂, extracto de levadura y sacarosa
- Completar a volumen con agua destilada.
- Ajustar el pH a 7, utilizando una solución 1M de KOH.
- La esterilización se lleva a cabo a una temperatura de 121°C por un tiempo de 15 minutos.
- Bajar la temperatura hasta 30°C, adicionar la cepa crioconservada e incubar por 12 horas a 30°C y 200 r.p.m. de agitación.
- El inóculo se prepara en 50 mL del medio de cultivo estéril en un Erlenmeyer de 250 mL, a éste se adicionan 40 µL de la cepa conservada. El inóculo se mantiene a 30°C y 200 r.p.m. por 12 h, al cabo de las cuales se verifica un crecimiento microbiano que corresponda a una densidad óptica mayor que 0.6, medida por espectroscopia a una longitud de onda de 600 nm.

3.3. CONFIGURACIÓN DE LOS SISTEMAS FERMENTATIVOS Y EQUIPOS

3.3.1. Ensayos en fermentador convencional

Las fermentaciones son realizadas en un fermentador Biolab® de 2 L, con 1 litro de medio de cultivo. El fermentador cuenta con un difusor de oxígeno del tipo flauta en forma de L, con 5 orificios, no cuenta con baffles y ésta equipado con electrodos de pH y oxígeno disuelto y con controles de temperatura y espuma -tabla 5-. La fermentación se inocula con 50 mL de inóculo y se desarrolla a

30°C y pH inicial cercano a 7.0¹, sin controlar el pH ni el oxígeno disuelto –OD- permitiendo que caigan libremente durante el desarrollo. En ensayos bajo este modelo de fermentación se estudio el efecto de la agitación y la aireación, en valores que obedecen al diseño experimental. La instrumentación empleada fue calibrada previamente elaborando las correspondientes curvas para rotámetros y velocidad de agitación –anexo 2-.

3.3.2. Ensayos en fermentador con dispositivo de aireación externo y recirculación de medio de cultivo.

Se adapta al fermentador convencional un puerto para la succión de medio con bomba peristáltica, impulsarlo a presión hacia el aireador externo y retornarlo al fermentador por un puerto de descarga en la parte inferior del agitador. El dispositivo cuenta con un difusor de micro burbujeo de 17 cm de largo y 1 cm de diámetro fabricado en acero sinterizado, en este se ponen en contacto la fase líquida con la corriente de gas -aire, aire enriquecido u oxígeno- y del dispositivo retorna el medio aireado al fermentador agitado. Los detalles del diseño y configuración se presentan en los resultados de la etapa dos y anexos.

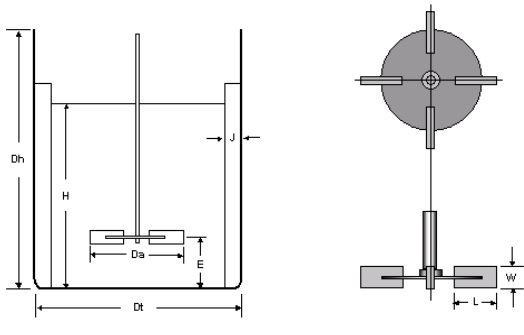
3.3.3. Equipos

Fermentador: Reactor para fermentaciones Biolab®, ubicado en el Laboratorio de Tecnología de Enzimas del IBUN. Las principales características de este fermentador se muestran en las tablas 4, 5 y las figuras de los equipos empleados se presentan en el anexo 7. Los equipos adicionales empleados fueron:

- **Microscopio** ZEISS 1098, Lentes 10X, 40X y 100X,
- **Potenciómetro** pH Oackton serie 510 con electrodo de vidrio.
- **Espetrofotómetro** Spectronic 20 Genesys, celdas Brand de PS desechables, volumen de muestra 1.5 mL.
- **Centrífuga** Eppendorf para microtubos 5410, 4800 r.p.m fija..
- **Shaker** Lab- line plataforma de 31x42 cm, entre 50-300±2 r.p.m.
- **Autoclave** horizontal Sterilof de 25 litros.
- **Incubadoras**, cuartos atemperados IBUN, 30 °C
- **Balanza analítica** Mettler AE 260 Delta Range
- **Nevera**, Whirpool
- **Congelador** a -70°C So Low Embiromental Co. Modelo AB-100
- **Cuartos atemperados** a 4°C IBUN
- **Balanza** Mettler Toledo Pb 3001 SNR, rango 5 – 3100 gr
- **Vortex** Mistral TM mixer .
- **Plancha de calentamiento** Corning stirrer / hot plate
- **Baño termostataado con recirculación** Cole-Palmer Modelo 1266-02
- **Bomba peristáltica** Heidolph pumpdrive 5006
- **Rotámetro para líquidos.** Intervalo entre 0.5 -3.5 L/min, Millipore -ver calibración anexo 2-

¹ En trabajos anteriores del grupo de investigación y de la autora y, se determinó que iniciar fermentaciones con pH menores que 7.0 induce una lectura de actividad menor, puesto que el pH óptimo para la reacción es cercano a 5, si esto se presenta en el cultivo la enzima producida cataliza la formación de polímero, creando una competencia.

Tabla 4. Especificaciones del reactor Biolab®^[45]



DIMENSIONES		VALOR (mm)
Diámetro impulsor	Da	56
Diámetro del tanque	Dt	117
Altura del impulsor	E	25
Ancho hoja del impulsor	L	19
Alto hoja del impulsor	W	16.5
Ancho baffles	J	0
Altura líquido	H	88 ^a (1 litro); 110 (1.2 litros)
Altura Total	Dh	198

^a incluye los accesorios de tapa

Tabla 5. Descripción del biorreactor Biolab®

Modulo medidor y controlador de temperatura		Modulo medidor y controlador de pH (Mettler Toledo)
Modulo control de espuma		Modulo medidor y controlador de oxigeno disuelto (Mettler Toledo)
Modulo de agitación		Compresor
Vaso	Volumen total	2L
	Vol. operación	Entre 0.5 y 1.5 L
Temperatura	Intervalo	T. amb. + 5 °C hasta 80 °C
	Sensor y control	RTD de platino, microprocesador basado control PID con modulación de pulsos para calentamiento y enfriamiento
Flujo de aire	Medidor de flujo	Entre 100 y 1200 cm ³ /min. Alterno de 1000 -5000 cm ³ /min -ver calibración anexos-
	Filtro	Regulador de aire en línea, prefiltro en lana de vidrio, Filtro de 0.2 µm esterilizable intercambiable
	Difusor	Difusor de flauta removible
Agitación	Velocidad	50 a 750 r.p.m.. ± 1 r.p.m..
	Sensor	Decodificador óptico acoplado al motor
	Precisión	± 0.5 % del set point o ± 2 r.p.m..
Salida, gases	Condensador	Condensador de acero inoxidable refrigerado acoplado a la tapa
Control pH	Estándar	Microprocesador Transmitters pH 2050 Mettler Toledo, control PID ajustable entre pH de 2 a 10 + 0.01, respuesta on-off, bombas peristálticas para ácido y base
Control O.D.	Estándar	Microprocesador Transmitters O2 4050 e Mettler Toledo, control PID para valores ajustables entre 5 y 100% con respuesta on-off a compresor
Control de espuma	Estándar	Microprocesador con control PID para espuma de 2 a 10 + 0.01 con bombas peristálticas para ácido y base
Accesorios estándar	Sensor pH	Electrodo Ingold®3200/225/pt100 Mettler Toledo con conector AK9
	Sensor O.D.	Electrodo polarográfico con cartucho de membrana reemplazable InPro®6800 /12/220 Mettler Toledo con conector VP y adaptador
	Bomba peristáltica	Adición de antiespumante y/o nutrientes para lote alimentado o cultivo continuo

3.4. EVALUACIÓN DE LOS CULTIVOS Y DEL SISTEMA ^[3, 7, 46]

Durante las fermentaciones se realiza seguimiento en cuanto a pH, biomasa y oxígeno disuelto; finalizada la fermentación se determina la productividad del cultivo, mediante la medición de la actividad enzimática. La caracterización de los sistemas se realiza mediante la determinación del $k_L a$ a diferentes condiciones de operación.

3.4.1 Seguimiento de las fermentaciones

El seguimiento de la fermentación se realiza determinando de la biomasa obtenida por densidad óptica a 600 nm y siguiendo la variación del pH y el oxígeno disuelto en porcentaje -%OD-, los cuales no se controlan. El pH se deja caer libremente y para el %OD se fija el suministro al inicio de la fermentación y varía según demanda del cultivo. La toma de muestra se realiza cada 60 minutos en las primeras cuatro horas y cada 30 minutos en la fase final, diluyendo la muestra 10 veces en agua isotónica destilada para lectura de absorbancia por espectrofotometría a 600nm, longitud de onda donde el barrido experimental arroja la mayor absorbancia. Se realiza la gráfica Biomasa contra tiempo, deteniendo la fermentación al final de la fase exponencial y comienzo de la fase estacionaria entre la hora 5 y 5.5. La fermentación se detiene bajando la temperatura a 4 °C o centrifugando el producto inmediatamente termina, evitando así que la enzima producida polimerice el sustrato restante, lo que afectaría la medición de actividad enzimática. El control de contaminación se realiza al inóculo, en el transcurso y al producto final de la fermentación, mediante visualización en el microscopio por tinción de Gram –anexo 1-. Una vez recuperado el extracto enzimático por centrifugación se evalúa su actividad.

3.4.2 Determinación de la actividad enzimática

Se determinan dos tipos de actividad enzimática: hidrolítica y de transferencia. Las unidades de actividad enzimática se definen como:

Actividad hidrolítica: una unidad de actividad hidrolítica es definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de glucosa en un minuto.

Actividad de Transferencia: una unidad de actividad de transferencia es definida como la cantidad de enzima necesaria para transferir un μmol de Glucosa en un minuto.

Para determinar la actividad enzimática se desarrolla la reacción enzimática con una solución en relación 1:1 (sustrato al 16 % sacarosa : extracto enzimático), a una temperatura de 30°C en un *buffer* fosfato 50 mM a pH 7, según se establece en los protocolos de evaluación y producción del biopolímero -anexo 1 -^[3]. Su cálculo se define para la *Actividad hidrolítica* como la diferencia de los azúcares reductores totales determinados por el método del ácido dinitro-salicílico (DNS) y la glucosa total obtenida por el método enzimático de Boehringer.-anexos 1 y 3-^[3] y para la *Actividad de transferencia* como la diferencia de la glucosa total obtenida por método enzimático de Boehringer y la fructosa proveniente de la hidrólisis. La fructosa de hidrólisis es equivalente a la glucosa libre, por consiguiente se puede determinar la glucosa transferida- ver muestra de cálculo y análisis del error experimental en el anexo 3- .

3.4.3 Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno (k_La) en agua [30, 38, 47]

Con el fin de tener en cuenta sólo dos fases en el sistema al no realizar la medición con técnicas que utilizan sustratos sólidos y poder comparar los resultados con los obtenidos en otras investigaciones en las que se evalúan velocidades de agitación y aireación en sistemas fermentativos similares al sistema convencional o con otro tipo de aireador^[24, 33, 34, 36, 47], se utiliza la técnica de desgasificación con nitrógeno, trabajando con agua y aire como fase gaseosa, en la segunda etapa se permite al sistema restituir la condición de saturación a las diferentes condiciones de evaluación, obteniendo la curva características de la figura 5.

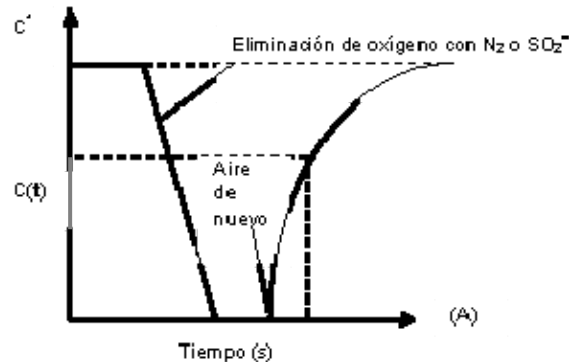


Figura 5 Curva para el cálculo del k_La por la técnica de desgasificación

Al realizar el balance de materia para el oxígeno en el biorreactor durante la reaireación.

$$Entra + Produce = Acumula + Consume + Sale$$

Debido a que no hay términos de salida, consumo ni producción^[21, 30], se obtiene la ecuación 4:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C^* - C_L) \tag{4}$$

- Donde: $k_L a$: Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.
- C^* : Concentración de saturación en la interfase gas-líquido.
- C_L : Concentración de oxígeno en el líquido.
- dC_L/dt : Razón de cambio de la concentración con respecto al tiempo.

Reorganizando la ecuación:

$$\frac{dC_L}{(C^* - C_L)} = k_L a dt \tag{5}$$

e integrando con $C_L = C_{t=0}$ para $t = 0$
 $C_L = C_L$ para $t = t$

$$\ln \left[\frac{C^* - C_L}{C^* - C_{t=0}} \right] = -k_L a * t \tag{6}$$

Al graficar los datos obtenidos en la zona de reaireación según la ecuación 6, se puede obtener el valor del $k_L a$ como la pendiente de la recta obtenida. El cálculo del $k_L a$ supone que la composición del aire

es constante, si se desarrolla con oxígeno puro el k_La variará. Adicionalmente se debe garantizar un buen mezclado de la fase líquida y que la dinámica² del electrodo de oxígeno disuelto no afecte la medición, lo que en parte se garantiza al cumplir los requerimientos para el tiempo de respuesta del electrodo -ver sección 3.4.5- y tener la precaución de polarizar³ la membrana con una antelación mínima de 3 horas. Si bien el pH no es significativo en la medición del oxígeno, porque no hay iones H^+ involucrados en la secuencia de la reacción^[34], si lo es en el sistema fermentativo afectando la demanda de oxígeno asociada al crecimiento microbiano.

3.4.4 Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno (k_La)^[35, 47] por la técnica dinámica

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno determina la productividad de un reactor y su valor depende de las características físicas y operacionales del mismo. Cuando la concentración celular de un cultivo en crecimiento cambia con el tiempo, la transferencia de oxígeno está dada por la ecuación:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_La(C^* - C_L) - OURx \quad (7)$$

Donde C^* es la concentración de saturación de oxígeno disuelto en el tiempo t , k_La es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1}), OUR es la velocidad específica de consumo de oxígeno ($mmol O_2/g \text{ célula-h}$) y x es la biomasa (g/L). OUR es una característica propia de cada especie microbiana y varía dependiendo del estado metabólico en que se encuentren las células, $OURx$ es la demanda bioquímica de oxígeno. Aunque muchos factores influyen en la demanda total de oxígeno, los más importantes son la especie celular, la fuente de carbono, el pH y la naturaleza del proceso. Es con base en la demanda total de oxígeno que se fija el valor mínimo de transferencia de oxígeno necesario para el diseño del proceso. Por lo tanto la determinación de tales condiciones es importante para el diseño final y escalado del proceso de fermentación.

El fundamento del método es la introducción de una perturbación en el sistema cuando se encuentra en estado estacionario, analizando la respuesta generada^[36]. La aplicación de la técnica dinámica se realiza de la siguiente manera -ver figura 6-: El sensor de oxígeno disuelto se calibra al inicio de la fermentación, el cero corresponde al sensor desconectado del electrodo o mediante la desoxigenación del medio con nitrógeno y el 100% corresponde al medio estéril saturado después de su aireación por doce horas. Se suspende el suministro de oxígeno presentándose un descenso en la concentración de oxígeno disuelto $-C_L-$ en función del tiempo, debido a la respiración del cultivo, se cumple que:

$$\frac{dC_L}{dt} = -OURx \quad (8)$$

La demanda de oxígeno $-OURx-$ se determina hallando la pendiente de la gráfica en la zona de corte del oxígeno -figura 7, etapa I-. La concentración de oxígeno disuelto no debe disminuir a valores cercanos a la concentración crítica de saturación de oxígeno disuelto, en el cual la deficiencia genera daño irreversible o muerte celular, variando la biomasa viable presente durante la experimentación. Integrando la ecuación 8 se obtiene:

$$\%OD = -(OURx)*t + b \quad (9)$$

² Tipo de membrana

³ Se requiere mantener el electrodo en medio acuoso en presencia de una fase gaseosa, lo que permite estabilizar las reacciones catódica y anódica y homogenizar la membrana permeable

El valor de $k_L a$ se obtiene de los datos proporcionados en la zona de reaeración del cultivo en función del tiempo -figura 7, etapa II-, empleando la ecuación (7) y el valor de OUR_x ya obtenido:

$$(C^* - C_L) = \left(\frac{1}{k_L a} \right) \left(\frac{dC_L}{dt} + OUR_x \right) \quad (10)$$

Al integrar la expresión anterior se obtiene una ecuación de la forma:

$$\%OD = A + B \exp(\alpha t) \quad (11)$$

donde: A, B : constantes
 α : constante, correspondiente a $-k_L a$ (s^{-1})

El ajuste se hace en el programa Data Fit 9 (Oakdale Engineering, versión libre 2002)

La técnica dinámica se realiza con fermentaciones reales, tanto continuas como por lotes, permite la determinación de $k_L a$ en diferentes etapas de la fermentación de forma rápida y sencilla, obteniéndose un indicativo realista de la eficiencia en la transferencia de oxígeno en el cultivo. Esta técnica presenta algunas restricciones tales como la dependencia del tiempo de respuesta del sensor de oxígeno disuelto, el cual debe ser menor a $1/k_L a$, en el presente trabajo se verifica que el sensor cumple esta condición. Esta técnica no puede ser aplicada para condiciones en las que el oxígeno disuelto sea inferior o cercano a las condiciones críticas de saturación de oxígeno disuelto de la fermentación. Se entiende como la concentración crítica de saturación de oxígeno disuelto, el valor mínimo para el cual el crecimiento y las funciones metabólicas se ven afectadas; además, la medición puede ser alterada por la aireación superficial durante la etapa de corte del suministro, lo que provoca que la línea recta esperada se convierta en una curva cóncava hacia arriba.

El método dinámico es ampliamente usado pero el intervalo de medida es restringido por la viscosidad y el crecimiento celular y el resultado es afectado por la presencia de pequeñas burbujas en los medios viscosos. Una medida inicial del coeficiente $k_L a$, por el método estático de desgasificación, normalmente genera valores mayores a los encontrados por la técnica dinámica en fermentación, bajo las mismas condiciones. En el presente trabajo se analiza cada grupo de resultados independientemente y sólo como indicativos de la proporción de cambio en el coeficiente por las condiciones evaluadas.

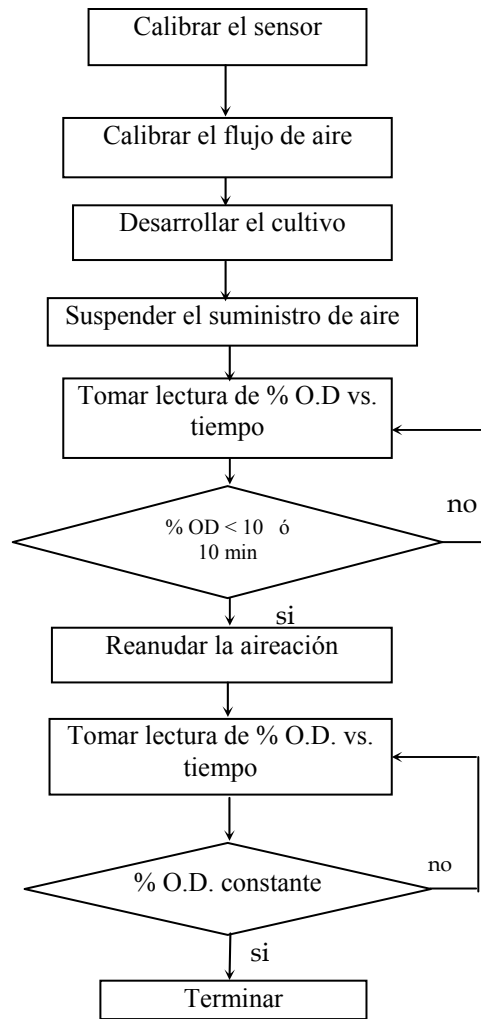


Figura 6. Diagrama de flujo para la aplicación de la técnica dinámica.

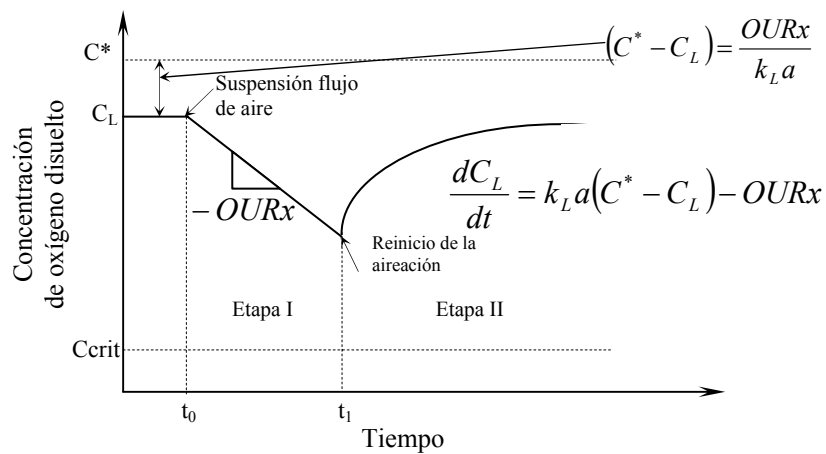


Figura 7. Curva en la obtención del $k_L a$ empleando la técnica dinámica -régimen no permanente-

3.4.5. Determinación del tiempo de respuesta del electrodo^[47]

Para la determinación del tiempo de respuesta se procede de la siguiente manera:

- Se hace burbujear nitrógeno en un vaso de precipitados de 1000 mL con 500 mL de agua destilada durante dos horas y se calibra el cero de oxígeno disuelto.
- Otro volumen igual al anterior se satura burbujeadando aire durante el mismo tiempo y se calibra el sensor a 100% de oxígeno disuelto.
- El sensor se ubica en el recipiente con cero % hasta obtener una señal estable y en un instante definido t_0 se pasa al recipiente que está saturado con aire.
- Se toman datos del incremento de oxígeno disuelto cada cinco segundos hasta que la señal se estabilice cerca del 100%.
- Se grafican los datos de % O.D. vs. tiempo. Dada la semejanza de la respuesta del electrodo a la de un sistema de primer orden, τ corresponde al tiempo empleado en alcanzar el 63% de la concentración de saturación.

$$\%OD = 100\% \left(1 - \exp\left(\frac{T_m - t}{\tau} \right) \right) \quad (12)$$

Donde: T_m : Tiempo muerto (s).

t : Tiempo para cada concentración (s).

τ : Tiempo de respuesta (s).

Para determinaciones precisas del % de oxígeno disuelto del sistema y el cálculo del k_La , el criterio de selección del electrodo es el siguiente:

$$\begin{aligned} \tau > 1/k_La & \quad \text{respuesta pobre.} \\ \tau < 1/k_La & \quad \text{respuesta adecuada.} \end{aligned}$$

3.5 METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

3.5.1. Fermentación convencional

Para determinar las condiciones de aireación y agitación en el sistema convencional de tanque agitado y difusor interno, que correspondan a las mejores condiciones de transferencia de oxígeno bajo los parámetros de evaluación del cultivo, se realizan fermentaciones bajo la configuración tradicional del biorreactor, variando los niveles de agitación y aireación, con el fin de observar el comportamiento de la concentración de oxígeno en el transcurso de la fermentación y su relación con los parámetros de evaluación del cultivo -tabla 6-

Tabla 6. Condiciones y diseño de experimentos con el sistema convencional

Medio	Medio de cultivo estándar para la fermentación del <i>Lactococcus sp</i> Tabla 4 (1 litro)
Variables:	Niveles
Velocidad de aireación	1 y 2.5 vvm (volúmenes de aire por volumen de medio de cultivo por minuto)
Velocidad de agitación	200 a 300 r.p.m.
Condiciones para el punto central en la determinación del error experimental	
Velocidad de aireación	1.75 vvm
Velocidad de agitación	250 r.p.m.

Ensayo	Aireación vvm	Agitación r.p.m.
1	0.5	200
2	1	200
3	1	300
4	2.5	200
5	2.5	250
6	2.5	300
7	1.75	250
8	1.75	250
9	1.75	250

La selección de los niveles en el diseño experimental considera las condiciones base de producción de la enzima de los trabajos precedentes, - ensayo 1, tabla 6-, hasta niveles máximos en que se estima puede presentarse daño mecánico o la operación se dificulta en cuanto al manejo de espuma por altos flujos de aireación.

Determinación del k_La en agua para el sistema convencional

Con el fin de tener como línea base el sistema tradicional de tanque agitado y difusor interno, se realizaron ensayos de caracterización de éste sistema en cuanto al k_La a diferentes condiciones de agitación y aireación, según se describe en la tabla 7, utilizando la técnica de desgasificación con nitrógeno.

Tabla 7. Condiciones de evaluación para la determinación del k_La en agua con el sistema convencional.

Medio	Agua (1 litro)
Variables:	Niveles:
Velocidad de aireación	0.5 y 1 vvm
Velocidad de agitación	200 y 300 r.p.m.
Temperatura	Ambiente
Técnica	Desgasificación con nitrógeno

3.5.2. Diseño, construcción y caracterización del prototipo de aireador externo

Para ésta fase del proyecto se emplea con un difusor de acero sinterizado de 17 cm de largo y 1 cm de diámetro, microburbujeador de tamaño de poro desconocido, de alta eficiencia en la aireación de medios líquidos, disponible en el Instituto de Biotecnología. Para el cual se diseña y construye el soporte dentro de una carcasa con instrumentación de control y medición de flujos y presión en el área de contacto gas-líquido. La configuración del sistema de aireación externo, su diseño y dimensionamiento se presentan como planos constructivos en el -anexos 6 y 7-. Construido el dispositivo se realiza su caracterización por pruebas hidrodinámicas, calibración de la instrumentación y determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno $-k_La-$ por la técnica de desgasificación.

El análisis de los parámetros de operación que determinan la transferencia de oxígeno se realiza mediante un análisis dimensional de las variables correspondientes: flujo de gas y de líquido, temperatura, velocidad de agitación y presión de operación en el dispositivo, en relación con la concentración de oxígeno en el seno del líquido en el reactor.

Los criterios en el diseño del dispositivo de aireación externo son:

1. Presión máxima que depende de los valores que soportan las conexiones flexibles.
2. Flujos de recirculación, que proveen las bombas disponibles, determinando los niveles de acuerdo a los flujos de fácil medición en el rotámetro para líquidos.
3. Variables de operación e instrumentos para medición y monitoreo de las mismas.
4. Criterios de asepsia y manipulación, en cuanto a materiales y configuración.

Los valores de las variables para la caracterización hidrodinámica se presentan en la tabla 8, teniendo en cuenta la calibración del instrumental de medición de las variables -anexo2-.

Tabla 8. Condiciones para la caracterización del prototipo de aireador externo

Medio	Agua (1.2 L)
Variables:	Niveles
Flujo de aire (vvm):	0.65 y 1
Flujo de recirculación (LPM):	0.54, 1.05, 1.56 y 2.08.
Recambios por minuto (Re/m) ⁴ :	0.45, 0.87, 1.3 y 1.73
Presión manométrica en el Aireador (psi)	0, 10, 15 y 20
Agitación (r.p.m.):	154 y 283
Temperatura (°C):	18 y 30
Punto central para determinación de error experimental	
Variables:	Niveles:
Flujo de aire (vvm):	0.65
Flujo de recirculación (LPM):	1.05
Recambios por minuto (Re/m):	0.87
Presión manométrica en el Aireador (psi)	0,
Agitación (r.p.m.):	176
Temperatura (°C):	18
Técnica	Desgasificación con Nitrógeno

⁴ Flujo de recirculación / volumen de medio

Diseño experimental:

Para el desarrollo de la evaluación hidrodinámica del sistema de aireación externo, correlacionando las variables que afectan las condiciones de transferencia de oxígeno con el k_{La} , se plantea el modelo factorial no balanceado de efectos fijos, con dos factores: flujo de recirculación del líquido y flujo de aire -FR y FA-, y tres covariables, presión manométrica en el difusor, agitación y temperatura -PA, A y T-. Para esto se establecen todas las combinaciones posibles de los niveles en las variables FA y FR, mientras que para la evaluación de las covariables A, T y PA, se tiene en cuenta que el desarrollo del modelo completo implicaría un total de 128 ensayos, por tanto se sesga partiendo de algunas combinaciones iniciales de flujo de recirculación y flujo de aire, variando los parámetros de las covariables una a la vez. La figura 8 corresponde a un esquema de esta metodología de diseño experimental, que se muestra en detalle en la tabla 9.

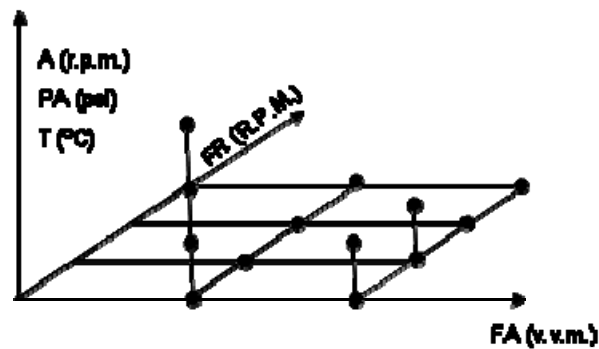


Figura 8. Esquema del diseño experimental en la caracterización del prototipo de aireador externo.

Tabla 9. Diseño experimental en la caracterización del prototipo de aireador externo.

Corrida	FR (Re/M)	FA (vvm)	Agitación (r.p.m.)	Presión (psi)	Temperatura (°C)
1	1,73	0,65	154	SC	18
2	1,30	0,65	154		18
3	0,87	0,65	154		18
4	0,45	0,65	154		18
5	1,73	1,00	154		18
6	1,30	1,00	154		18
7	0,87	1,00	154		18
8	0,45	1,00	154		18
9	0,45	1,00	283	0	18
10	0,87	1,00	283	0	18
11	0,45	0,65	154	10	18
12	0,45	0,65	154	15	18
13	0,45	0,65	154	20	18
14	0,45	0,65	154	0	30
15	0,45	0,65	154	10	30

SC: para éstos ensayos no se controla ésta variable

Análisis dimensional y modelamiento

Con el fin de generar un estudio minucioso de las variables de incidencia en la transferencia de oxígeno en el sistema fermentativo evaluado, y mediante éste estudio y los datos obtenidos en la caracterización hidrodinámica, aplicando el análisis dimensional y teorema π de Buckingham, se pretende modelar el comportamiento mediante una ecuación característica, formulando un modelo preliminar para el escalamiento del dispositivo. Para ésta fase del proyecto se cuenta con el aporte del trabajo del estudiante de pregrado Jormagn Israel Abril Murillo del Departamento de Ingeniería Química en Modalidad de Pasantía bajo la dirección en laboratorio de la autora, quien participa en la toma de datos de laboratorio y desarrollo del teorema π de Buckingham

El desarrollo matemático y las expresiones resultantes del análisis adimensional de las variables se presentan en el Anexo 5.

3.5.3. Evaluación del sistema de aireación externo en el cultivo con *Lactococcus lactis*.

Tomando como base los resultados encontrados en la caracterización del prototipo, se plantea realizar fermentaciones para evaluar los parámetros que afectan la transferencia de oxígeno y su efecto sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno $-k_{La}-$ determinado mediante la técnica dinámica en la fase de crecimiento exponencial. Posteriormente se establecen condiciones promisorias, bajo las cuales se realizan fermentaciones manteniendo los parámetros de operación constantes durante el transcurso de la fermentación.

Fermentaciones a condiciones de operación variables

Se realizan fermentaciones con el medio de fermentación estándar bajo los protocolos ya descritos para inoculación y desarrollo de la fermentación, evaluando diferentes condiciones de las variables determinantes en la transferencia de oxígeno, priorizadas según lo encontrado en la caracterización hidrodinámica. Para la determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno se utiliza la técnica dinámica y se realizan mediciones en diferentes momentos de la fermentación, mientras aún se mantiene el cultivo en la fase exponencial. Con el fin de comprobar la reproducibilidad de las metodologías seguidas en las fermentaciones, se realizan ensayos de determinación del coeficiente a las mismas condiciones de operación, en cada lote a diferentes edades del cultivo, comparando los coeficientes obtenidos en cada lote y entre lotes. De igual manera, se tiene el análisis comparativo de las cinéticas de crecimiento obtenidas en las fermentaciones.

Validación de las condiciones de fermentación

En esta etapa se pretende validar las condiciones de fermentación encontradas como promisorias en los ensayos anteriores, al realizar toda la fermentación bajo las mismas condiciones de operación. Se evalúan la concentración de oxígeno disuelto y parámetros de productividad del cultivo, como biomasa final y actividad enzimática, como factores a optimizar en este bioproceso.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1. ANÁLISIS DEL SISTEMA CONVENCIONAL

4.1.1. Fermentación convencional

Enmarcados en el desarrollo de la experimentación para la evaluación del primer objetivo, se desarrolla una serie de ensayos para determinar el efecto de la aireación y agitación en el sistema convencional de tanque agitado y difusor interno, como condición de referencia en el propósito de eliminar la limitación de oxígeno.

Las condiciones a evaluar se exponen en el aparte 3.5.1 tabla 6 y se resumen a continuación:

- *Medio*: Medio de cultivo estándar para la fermentación del *Lactococcus lactis* diseñado en trabajo previo por el grupo de investigación –tabla 4-.
- *Variables*: velocidad de aireación, velocidad de agitación.
- *Niveles*: 1 y 2.5 vvm; 200 y 300 r.p.m.
- *Diseño de experimentos* factorial 2²
- *Punto central para determinación de error experimental*: 1.75 vvm y 250 r.p.m.

La fermentación que se toma como línea base es la desarrollada a 0.5 vvm y 200 r.p.m., por ser las condiciones establecidas en el proyecto para la producción del biopolímero.

Los criterios de evaluación del cultivo y del sistema se describen en el aparte 3.4. y los niveles para la instrumentación se determinan según las curvas de calibración de los rotámetros de aire y del controlador del agitador, descritas en el anexo 2.

Los resultados de las fermentaciones con la configuración convencional, variando el flujo de aireación y la velocidad de agitación, se presentan en la figura 9. Para la fermentación en el punto central, se presenta uno de los ensayos como representativo de la cinética, los resultados de las repeticiones se emplean en la determinación del error experimental y determinación de los percentiles de 25% y 75%, marcadores de la dispersión y significancia de los datos. Las cinéticas en estas fermentaciones presentan una variación al inicio de los cultivos, con biomasa entre 0,15 y 0.33 mg/ml para las diferentes condiciones, los resultados muestran que ésta variación aparentemente no tiene un efecto significativo luego de terminada la fase de adaptación. En la figura 9, se presentan las etapas características del crecimiento microbiano, con una fase lag variable y corta -hasta de 1 hora-, una fase exponencial entre la hora 1 y 3, una de desaceleración desde la hora 3 y una estacionaria desde la hora 5. Las concentraciones de biomasa finales, indican que ésta depende de los valores de los parámetros evaluados, encontrándose un máximo con una aireación de 1.75 vvm y agitación de 250 r.p.m.

En cuanto al cambio de pH en el transcurso de la fermentación, en la figura 9 se observa que no existe afectación en los niveles evaluados, manteniendo un comportamiento similar para la totalidad de experimentos, descendiendo por la producción de ácidos característica de las bacterias ácido lácticas heterofermentativas, las cuales producen ácido láctico a partir de glucosa y manitol a partir de fructosa^[19] y la solubilización a ácido carbónico del CO₂ producto de la respiración. Lo observado se ajusta a los resultados de Matarragas del 2003^[22], al trabajar con bacterias ácido lácticas que tienen un óptimo crecimiento en pH de 6-6.5 y son autorreguladas o inhibidas en pH's menores a 5.

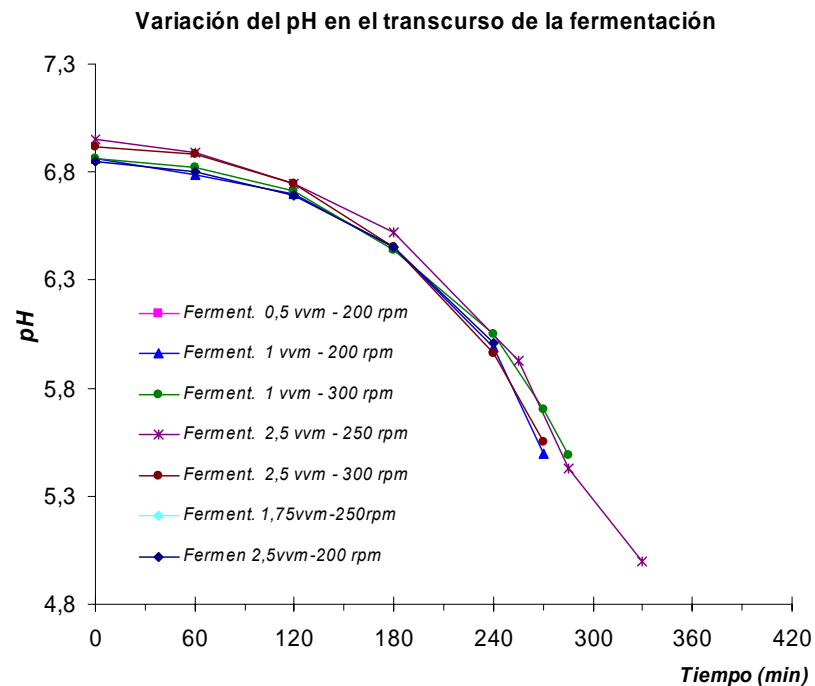
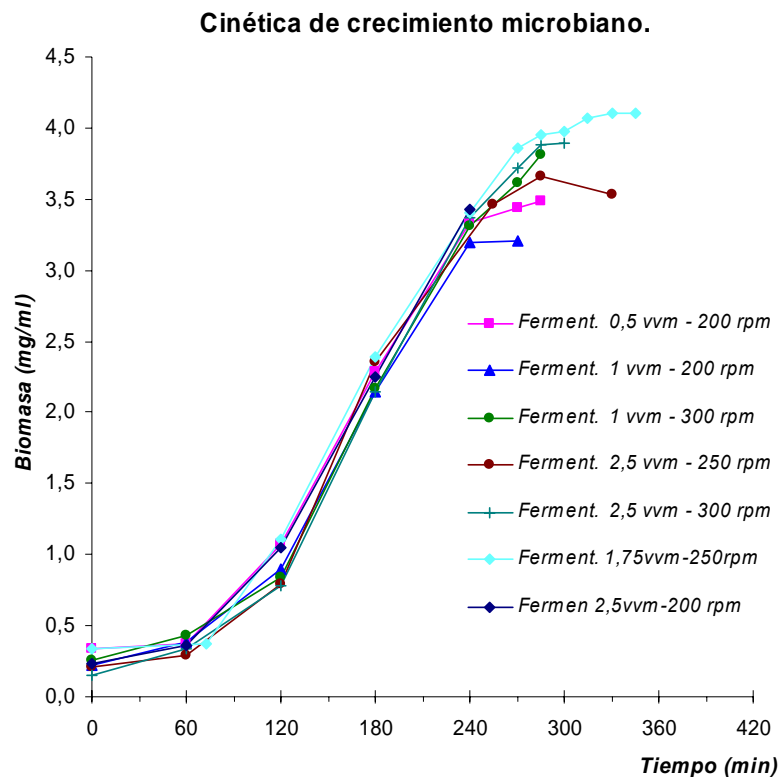


Figura 9. Cinéticas de crecimiento y variación de pH en las fermentaciones convencionales con el *Lactococcus lactis*.

El seguimiento del porcentaje de oxígeno disuelto –OD- en el transcurso de la fermentación -figura 10- muestra que para estos cultivos la limitación de oxígeno persiste aún bajo las condiciones extremas, donde el %OD llega a cero en la tercera hora de fermentación aun durante la fase exponencial.

Se concluye que con las condiciones evaluadas no se logra suplir los requerimientos de oxígeno exigidos por el cultivo, ni se mantiene una concentración mínima de éste. Se encuentra una mayor incidencia en la transferencia de oxígeno por cambios en la agitación al compararlos con cambios en la aireación, resultados acordes con lo reportado en la literatura para niveles similares^[9]. Se debe tener en cuenta que el aumento de los parámetros debe evaluarse también con la productividad del cultivo asociada a la actividad enzimática del extracto, tal y como lo sugiere Bandaipheth 2006^[9], quien indica que aún con altos valores de k_La , y altas velocidades de agitación, se tiene un efecto adverso en la productividad del biopolímero.

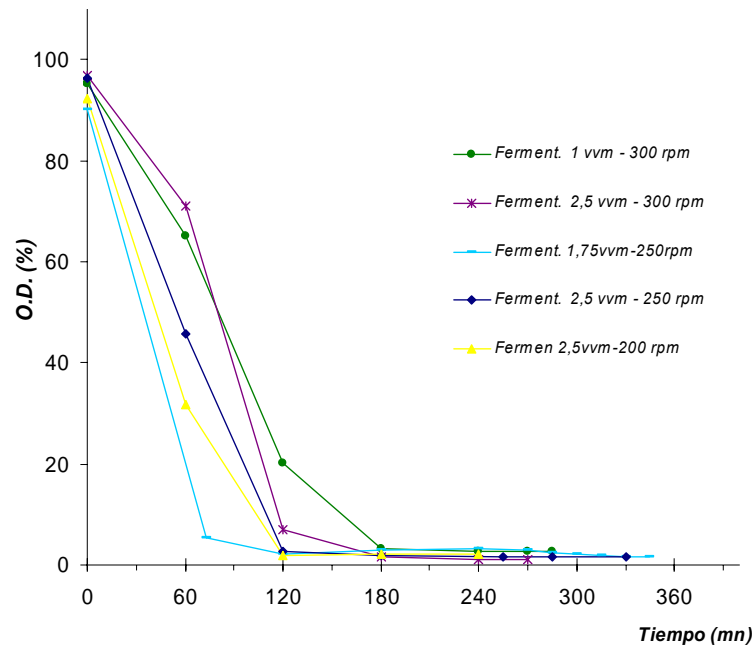


Figura 10. Variación del porcentaje de saturación de oxígeno disuelto en las fermentaciones convencionales con el *Lactococcus lactis*.

Los resultados de la figura 11 muestran que, la actividad hidrolítica y de transferencia tienen una estrecha relación con cambios en la aireación y la agitación y por lo tanto en la velocidad de transferencia de masa; el mayor valor alcanzado en actividad glucosiltransferasa se presentó en el cultivo con 1.75 vvm de aireación y 250 r.p.m. de agitación, condición en la cual la actividad de transferencia aumenta de 5.9 U/ml a 6.75 U/ml respecto a la fermentación base de producción desarrollada a 0.5 vvm y 200 r.p.m. En un valor muy cercano se encuentra el ensayo con 2.5 vvm de aireación y 200 r.p.m. de agitación, pero su diferencia con el dato mayor se encuentra entre los datos de no significancia –caja de percentil 25% a 75% en la distribución de las repeticiones -, lo que indica que aún con aumento en la aireación la actividad enzimática no tiene un aumento estadísticamente significativo.

El aumento de la productividad, medida como actividad enzimática, se da aún cuando la biomasa se ve afectada con el aumento de los niveles de aireación, lo que indica que al mejorar las condiciones de oxigenación, efectivamente se mejora la productividad del cultivo. El valor de concentración de

biomasa tomado, corresponde al definido en la metodología, es decir el valor obtenido al inicio de la fase estacionaria.

Considerando que uno de los fines principales es eliminar la limitación de oxígeno, se debe implantar un sistema que provea efectivamente oxígeno, sin generar estrés oxidativo o mecánico sobre las células o la enzima, para lo cual en las siguientes etapas se evalúa la implementación del prototipo de aireador externo.

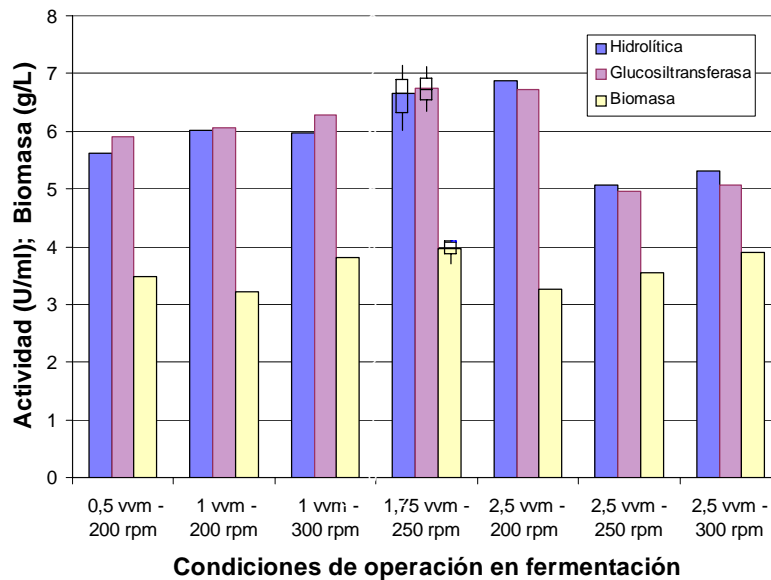


Figura 11. Actividades hidrolítica, de transferencia y biomasa obtenidas en las fermentaciones convencionales con el *Lactococcus lactis*.

Error Experimental:

Debido a que la realización de todas las fermentaciones por duplicado genera una gran cantidad de ensayos que implican tiempos considerables en alistamiento y análisis, en la matriz de experimentación se plantea realizar el punto central por triplicado, correspondiendo a una aireación de 1.75 v.v.m. y una agitación de 250 r.p.m., lo cual determina el porcentaje de error relativo:

Tabla 10. Error experimental en los ensayos con el sistema convencional.

Ensayo	Actividad Hidrolítica U/mL	Actividad Glucosiltransferasa U/mL	Biomasa g/L
1	6,77	6,75	3,71
2	6,03	6,37	4,09
3	7,17	7,13	4,11
Promedio o valor verdadero	6,66	6,75	3,97
Error Absoluto promedio	0,42	0,25	0,17
% de error relativo	6,26	3,72	4,37

El porcentaje de error encontrado muestra la confiabilidad de la metodología y de los resultados experimentales. Aunque, el error aumenta con la escala, el encontrado se considera aceptable.

4.1.2. Determinación del k_{La} en agua para el sistema convencional

Con el fin de tener como punto base el sistema tradicional de tanque agitado y difusor interno, se realizan ensayos de caracterización de éste sistema en cuanto al k_{La} , siguiendo la metodología descrita en el aparte 3.4.3.

Condiciones de Evaluación:

- *Medio:* Agua
- *Reactor:* Bioflo de 2 L con 1 L de medio
- *Temperatura:* Ambiente
- *Variables:* Aireación, Agitación
- *Niveles:* 0.5 y 1 vvm; 200 y 300 r.p.m.
- *Técnica:* Desgasificación con Nitrógeno.

La figura 12 muestra los datos de reaireación, la muestra de cálculo se presenta en el anexo 3. A partir de éstos datos en la ecuación 6 se determina el k_{La} asociado a cada condición del diseño experimental, obteniéndose los resultados de la tabla 11. Cabe aclarar que los primeros datos son afectados por el tiempo de mezcla, tiempo muerto y de respuesta del electrodo, por lo que no son tenidos en cuenta en la linealización; de igual manera, el calculo a partir de las mediciones finales al acercarse a la concentración de saturación, resulta muy sensible a pequeños cambios en la tendencia, e igualmente se eliminan de la linealización.

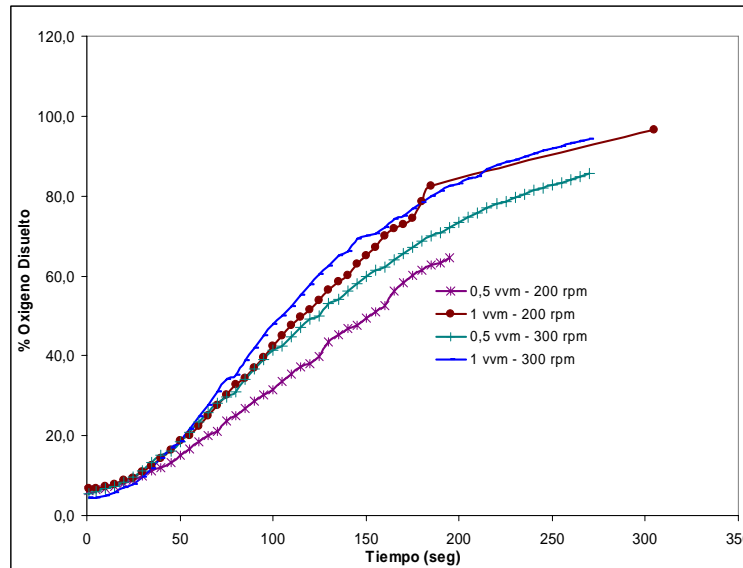


Figura 12. Determinación del k_{La} en agua con el sistema convencional.

Tabla 11. Valores del k_{La} en agua con el sistema convencional.

ENSAYO	k_{La} (h^{-1})
0,5 vvm - 200 r.p.m.	20.16
1 vvm - 200 r.p.m.	32.40
0,5 vvm - 300 r.p.m.	28.44
1 vvm - 300 r.p.m.	40.68

Los resultados anteriores denotan que efectivamente el valor del k_La tiene una estrecha relación con las condiciones de aireación y agitación. El valor máximo alcanzando corresponde a las condiciones extremas de 1 vvm y 300 r.p.m., con un coeficiente de transferencia de 40.68 (h^{-1}). Los resultados muestran que a estas condiciones se sigue presentando limitación de oxígeno en el cultivo, indicando que estas no son aptas para la producción del biopolímero. Los valores presentados para el sistema convencional son base de comparación para el dispositivo propuesto.

Comparando los valores obtenidos para el k_La con los reportados en la literatura para tanques agitados de 5 litros, empleando la misma técnica -tabla 1-, con aireación de 1vvm y agitación de 200 r.p.m., se obtienen valores de $90h^{-1}$ [32] o $27 h^{-1}$ [48] en referencias extranjeras y de $29.88 h^{-1}$ [34] reportados para investigaciones realizadas localmente. Para 0.5 vvm y 300 r.p.m. se reportan valores de $20.91 h^{-1}$ [24], con lo que podemos establecer que los valores obtenidos se ajustan a los reportes nacionales y a algunos reportes de la literatura internacional. Aún contando con un reactor sin baffles, se obtienen valores mayores a éstos reportes, lo que es acorde con la indicación de que en el escalado al mantener las mismas condiciones de operación se obtendrán menores valores del k_La .

4.1.3. Determinación del tiempo de respuesta del primer electrodo

Siguiendo la metodología consignada en el aparte 3.4.5 se determina el tiempo muerto y el tiempo de respuesta del electrodo por duplicado, con lo que se tiene una apreciación de que tan adecuada son la respuesta y precisión de los instrumentos.

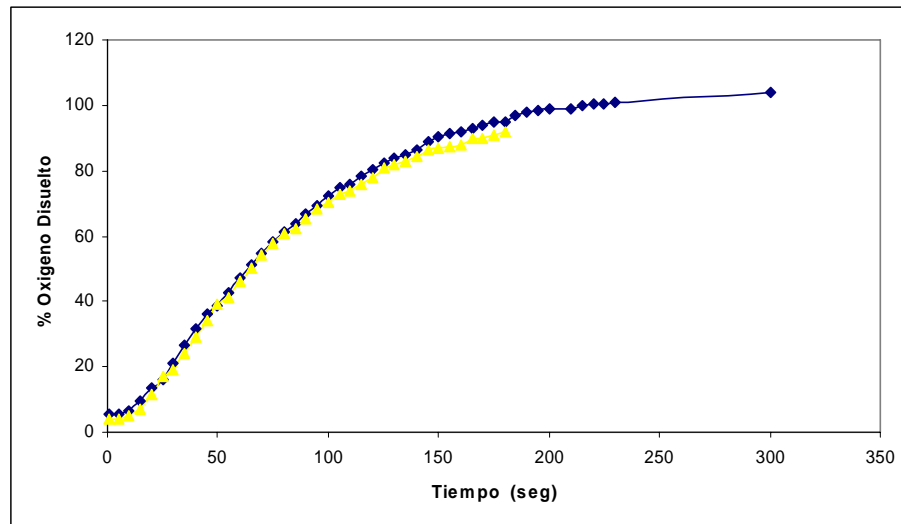


Figura 13. Determinación del tiempo de respuesta del primer electrodo de oxígeno disuelto.

Tabla 12. Tiempo muerto y de respuesta del primer electrodo de oxígeno disuelto.

Temperatura (°C)	Tiempo muerto (s)	Tiempo de respuesta (s)
16	0.419	75

Criterio: Se escogieron las condiciones extremas entre un tiempo de respuesta de 75 (s) y un k_La de $1.13 \cdot 10^{-2} s^{-1}$.

$$\begin{matrix} \tau & < & 1/k_La & & \text{respuesta adecuada} \\ 75 \text{ (s)} & < & 82 \text{ (s)} & & \end{matrix}$$

Considerando que el criterio, aunque aceptado se encuentra muy cercano al límite, en las experimentaciones posteriores se usan membranas nuevas, a las cuales se les realiza la misma evaluación.

4.2. DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PROTOTIPO:

En esta sección se presentan las condiciones operacionales y parámetros en el dimensionamiento del prototipo y se analizan los resultados obtenidos durante la implementación y caracterización de mismo.

4.2.1. Diseño del dispositivo de aireador externo

Para el diseño del soporte del aireador disponible, se analizaron sus características dimensionales, el material que garantice asepsia y los demás accesorios necesarios en el control de las variables de operación, por lo que es construido en acero inoxidable 316 calibre 10, con conexiones sanitarias en SMS roscado, válvulas de bola en acero inoxidable 304 con soldaduras en argón pulidas y conexiones para manguera en la entrada del gas, conducción en manguera de la fase líquida y gas-líquido desde y hacia el reactor. Con el estudio de la operación se establecen las variables de operación, las condiciones que se mantendrán constantes, las variables de respuesta ha medir y la configuración del sistema.

VARIABLES PARA EL CONTROL DE PROCESO: Flujo de gas, flujo de líquido, agitación, presión en el contacto gas líquido y temperatura.

CONDICIONES CONSTANTES: Volumen de medio, configuración geométrica del reactor –eliminando el difusor interno-.

VARIABLES RESPUESTA: Oxígeno disuelto, pH, biomasa, actividad enzimática y coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno $-k_La-$

CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA: El diseño y dimensionamiento del sistema de aireación externo se presenta como planos constructivos, en el anexo 6. La figura 14 y el diagrama 1 presentan la configuración final y el diagrama de flujo del sistema de fermentación con aireador externo.

4.2.2. Caracterización hidrodinámica

Condiciones de Evaluación:

- *Medio:* Agua
- *Reactor:* Bioflo de 2 Litros, con aireador externo y volumen de operación de 1.2 litros.
- *Variables:* Aireación, Flujo de recirculación, Presión total, Agitación y Temperatura.
- *Niveles:*
 Flujo de aire (vvm): 0.65 y 1
 Flujo de recirculación (LPM): 0.54, 1.05, 1.56, 2.08.
 Recambios por minuto (Re/m^5): 0.45, 0.87, 1.3 y 1.73
 Presión manométrica en el Aireador: 0, 10, 15 y 20 psi
 Agitación (r.p.m.): 154 y 283
 Temperatura (°C): 18 y 30
- *Técnica:* Desgasificación con Nitrógeno

⁵ Flujo de recirculación / volumen de medio

- *Punto central para determinación de error experimental:* FR(r.p.m.) 0.87; FA(vvm) 0,65; Agitación (r.p.m.) 176 y Temperatura (°C) 18.



Figura 14. Dispositivo externo al tanque de fermentación soporte del difusor.

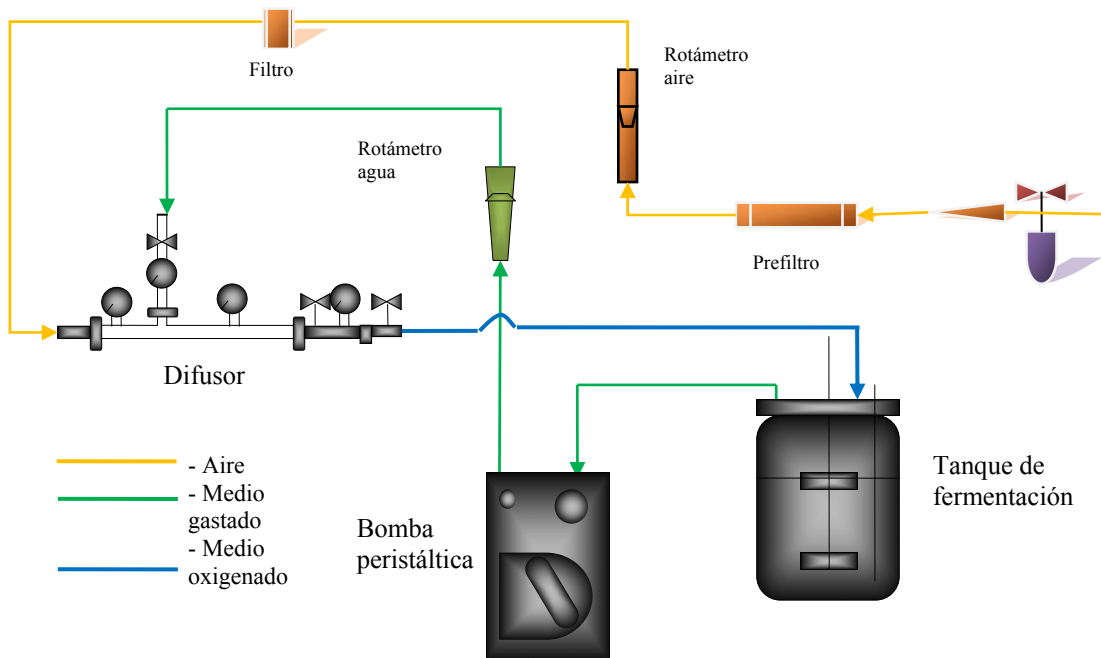


Diagrama 1. Configuración del sistema

Mediante la técnica de desgasificación con nitrógeno descrita en el aparte 3.4.3 y las mediciones durante la fase de incremento de la concentración de oxígeno disuelto a las diferentes condiciones de evaluación, se obtienen las curvas que se presentan en la figura 15.

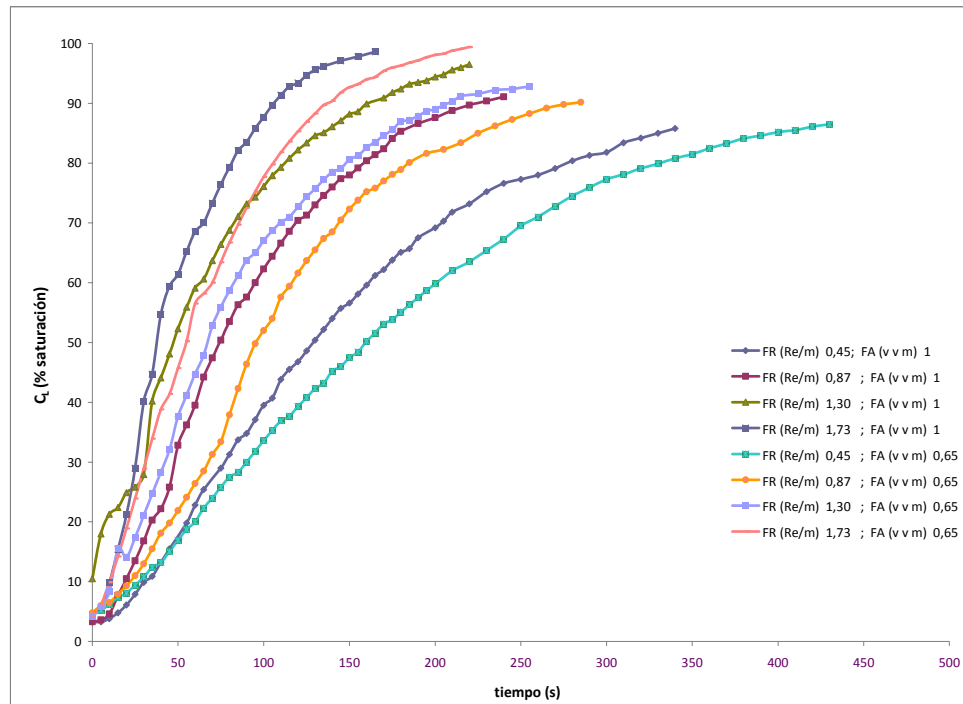


Figura 15. Concentración de oxígeno disuelto en la determinación del k_{La} en agua en los ensayos con el difusor externo en la línea base de ensayos variando FR y FA

Con las curvas anteriores y mediante la ecuación 6 derivada de la velocidad de transferencia, según la muestra de cálculo descrita en el anexo 3, se determina el k_{La} asociado a cada condición del diseño experimental, hallándose los coeficientes consolidados en la tabla 16 del anexo 3, cuyas tendencias se analizan a continuación.

La figura 16 muestra que la variable flujo de recirculación tiene efecto significativo sobre la transferencia de oxígeno, obteniéndose valores de k_{La} de hasta 90 h^{-1} . Por el contrario, los niveles de aireación no son determinantes posiblemente porque los flujos de líquido pueden resultar bajos para los flujos de aire que se manejan en la zona de contacto gas-líquido. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Czermak 2005^[15] con microburbujeadores en cerámica, quien trabajó con reactores similares de dos y cinco litros, pero con burbujeador interno, donde se reportan valores de k_{La} entre $25\text{-}50 \text{ h}^{-1}$ a máximos de 0.1 vvm de aireación a condiciones estándar de temperatura y presión en la línea de gas y 100 r.p.m. de agitación.

Los efectos de las covariables se muestran de manera independiente, aunque para el análisis estadístico –Anexo 4– se integran las cinco variables frente a la variable respuesta k_{La} .

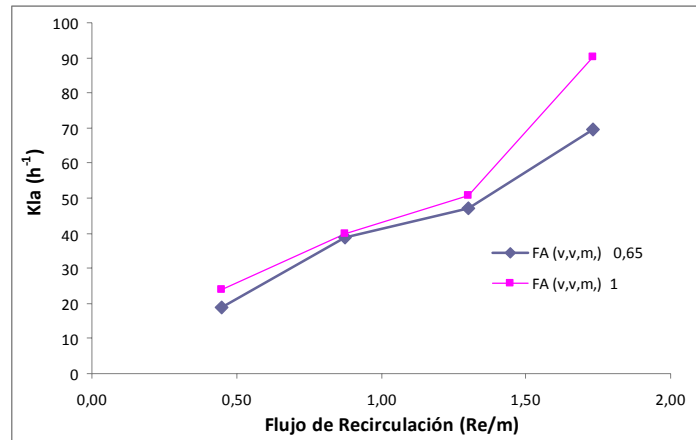


Figura 16. Variación del k_{LA} con el flujo de recirculación y el flujo de aire

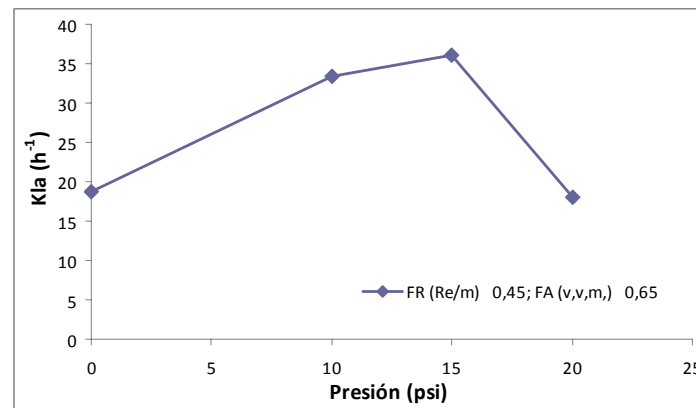


Figura 17. Variación del k_{LA} con la presión en el aireador externo, bajo un flujo de recirculación de 0.45 Re/m. y flujo de aire de 0.65 v.v.m.

Como se aprecia en la figura 17, con el aumento de la presión la transferencia de oxígeno tiende a aumentar hasta un máximo en 15 psi, permitiendo mantener una mayor concentración de oxígeno y aumento en la velocidad de suministro. El decremento que se presenta para la presión manométrica de 20 psi, podría explicarse por la estabilidad del sistema, puesto que para mantener la presión en la cámara de contacto se debe también incrementar la presión de la línea de gas y si el flujo de recirculación es bajo, se crean baches en el bombeo y deshomogeneidad del sistema, indicando nuevamente que el flujo del líquido es insuficiente para el flujo de aire disponible, por tanto se plantea como recomendación realizar corridas con mayores flujos de recirculación y menor flujo de aireación de alta presión, aclarando que se tienen límites de operabilidad del sistema por disponer de ductos y conexiones flexibles⁶.

La figura 18 muestra el efecto de la agitación, el cual resulta ser muy marcado sobre la transferencia de oxígeno, similar al obtenido en el análisis de la configuración convencional, confirmando la importancia de esta variable en el sistema de aireación externa. Lo observado coincide con el hecho de que la disponibilidad de oxígeno en el seno del líquido depende de la capacidad del reactor de

⁶ Se refiere a que las conexiones entre el reactor, rotámetro de líquidos y el dispositivo son mangueras siliconadas, conexiones clam y abrazaderas que resisten un máximo de 20 psi en presión manométrica.

homogenizar rápidamente el líquido luego de la difusión del medio gaseoso en él. Los resultados indican que el efecto de la agitación es independiente del flujo de recirculación, manteniendo la misma tendencia al realizarse el ensayo a otras condiciones de FR, lo que indica que no hay efectos combinados entre estas dos variables –ver análisis estadístico anexo 4- .

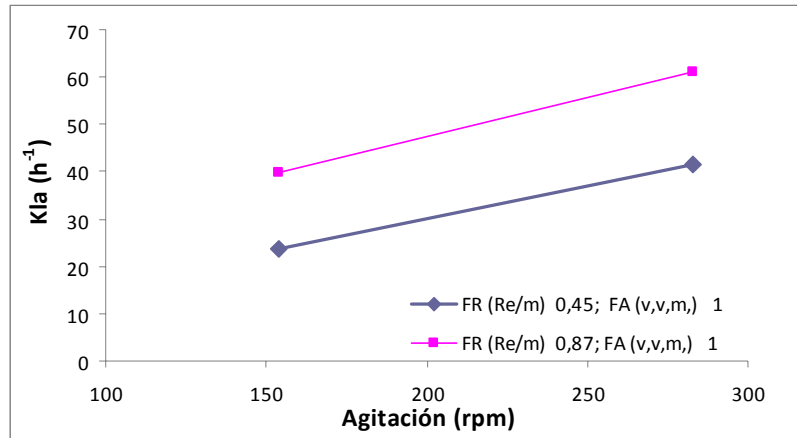


Figura 18. Variación del k_La con la agitación, bajo un flujo de aire de 1 v.v.m.

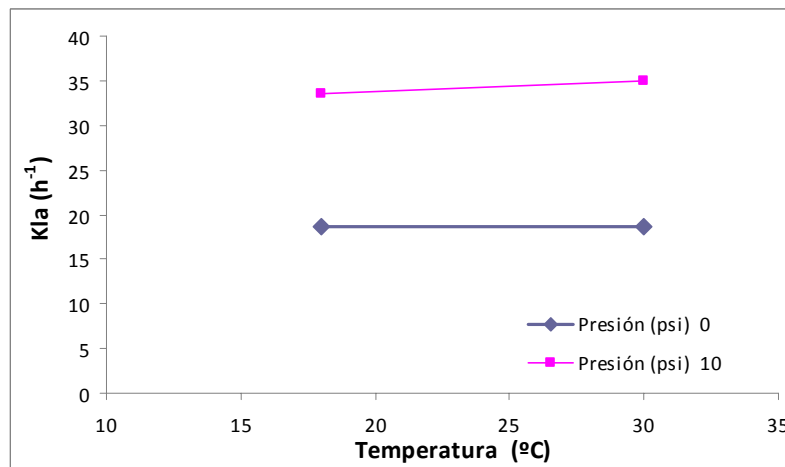


Figura 19. Variación del k_La con la temperatura, bajo un flujo de recirculación de 0.45 Re/m y flujo de aire de 0.65 v.v.m.

A diferencia de la agitación, en las condiciones evaluadas la temperatura no tiene significancia con el parámetro respuesta –figura19-, con apenas un leve aumento del coeficiente de transferencia bajo las condiciones de 10 psi en el aireador y 30 °C.

Los valores del coeficiente de transferencia de oxígeno obtenidos muestran la alta efectividad del dispositivo propuesto respecto al sistema tradicional de difusor interno, aumentándolo desde valores de entre 20.16 y 40.68 h^{-1} , hasta valores de entre 18 y 90.36 h^{-1} , con menores esfuerzos cortantes y menores flujos de aireación, que permiten obtener coeficientes similares a los reportados en literatura para difusores en cerámica -50 h^{-1} tabla 1-^[15] y reactores *Airlift* ^[30, 36] con valores entre 27–90 h^{-1} .

4.2.3. Determinación del tiempo de respuesta del segundo electrodo

Para la segunda etapa se cuenta con membranas nuevas, a las cuales se les realiza la misma evaluación realizada en la etapa uno siguiendo la metodología consignada en el aparte 3.4.5.

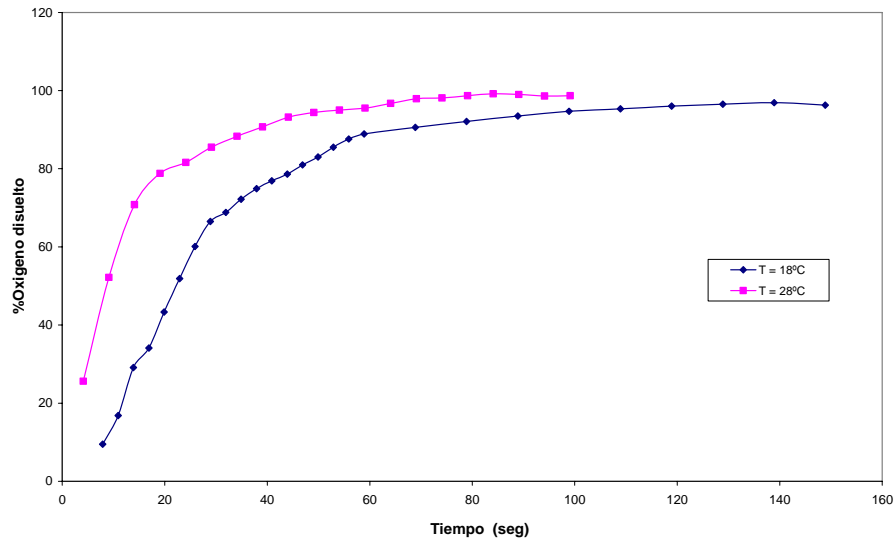


Figura 20. Determinación del tiempo de respuesta del segundo electrodo de oxígeno disuelto.

Tabla 13. Tiempo muerto y de respuesta del segundo electrodo de oxígeno disuelto.

Temperatura (°C)	Tiempo muerto (s)	Tiempo de respuesta (s)
18	1.8	25.9
28	4.2	11.01

Criterio:

Evaluando las condiciones extremas entre un tiempo de respuesta de 25.9 (s) y mayor k_La obtenido bajo las condiciones de FR(Re/m.) 1.73; FA(vvm) 1; agitación (r.p.m.) 154 y temperatura (°C) 18, correspondiente a 0.0251 s^{-1}

$$\tau < 1/k_La \quad \text{respuesta adecuada}$$

$$25.9 \text{ (s)} < 39.84 \text{ (s)}$$

Error Experimental:

En la matriz de experimentación se plantea realizar el punto central por triplicado, correspondiendo a FR(Re/m) 0.87; FA(vvm) 0,65; agitación (r.p.m.) 176 y temperatura (°C) 18, con los cuales y siguiendo la metodología del aparte 3.4.3, se hacen los cambios entre nitrógeno y aire tres veces seguidas, y su porcentaje de error relativo corresponde a lo consignado en la tabla 14.

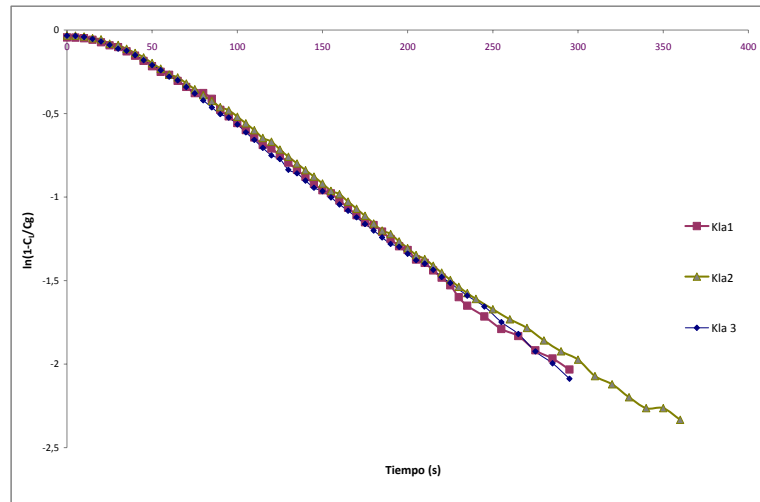


Figura 21. Determinación del error experimental en la caracterización del prototipo de aceptor externo.

Tabla 14. Error experimental en la caracterización del prototipo de aceptor externo.

Repetición	$k_L a$ (s ⁻¹)	$k_L a$ (h ⁻¹)
1	0,0076	27,36
2	0,0075	27
3	0,0076	27,36
Promedio o valor verdadero		27,24
Error Absoluto promedio		0,16
% de error relativo		0,6

Como se establece en la tabla 14, el error relativo es suficientemente bajo para asegurar la estabilidad del sistema durante la técnica de desgasificación, luego de establecer unas condiciones de flujo de recirculación y flujo de aireación en la operación.

4.2.4. Análisis Adimensional^[1, 12, 49, 50]

El fenómeno de aireación en este sistema considera 3 tipos de variables: variables operacionales, propiedades de los fluidos y dimensiones geométricas. A partir del desarrollo matemático del teorema π de Buckingham se obtiene la expresión de la ecuación 13

$$\frac{k_L a h_L^2}{D_L} = A \left(\frac{P h_L}{\sigma} \right)^B \left(\frac{F_R D_L}{h_L^2 \sigma} \right)^C \left(\frac{F_A D_L}{h_L^2 \sigma} \right)^D \left(\frac{W}{\sigma D_L} \right)^E \left(\frac{[\rho_L - \rho_G] D_L^2}{h_L \sigma} \right)^F \left(\frac{\mu_L D_L}{h_L \sigma} \right)^D N_P^H N_T^I \quad (13)$$

Donde P: Presión manométrica en el Difusor, F_R : Flujo de recirculación de líquido, F_A : Flujo de aireación, A: Agitación en el reactor, W: Potencia suministrada por el agitador, ρ_L : Densidad de fase líquida, μ_L : Viscosidad de la fase líquida, D_L : Difusividad de la fase líquida, σ : tensión Superficial de la fase líquida, ρ_G : Densidad de fase gaseosa, D_E : Diámetro externo dentro de la cámara del difusor, D_i :

Diámetro interno dentro de la cámara del difusor, L_p : Longitud efectiva del Difusor, D_T : Diámetro del tanque, z : altura del fondo del tanque al agitador, h_L : Nivel del líquido y , los factores de forma para el tanque y el prototipo son:

$$N_T = \frac{D_T}{z} \tag{14}$$

$$N_P = \frac{D_E - D_I}{L_P} \tag{15}$$

Y los coeficientes determinados en la regresión se muestran en la tabla 15, usando un ajuste obtenido en el programa Data Fit 9 -Oakdale Engineering, versión libre 2002-

Tabla 15 Valores hallados de los coeficientes en las ecuaciones (13)

Coefficientes	Valor
A	32814236,7
B	0,12999
C	0,84921
D	0,37449
E	0,19205
F	-0,60181
G	0,53298
H	-1,11369
I	1,71055
R2(%)	0,90

Los resultados anteriores indican que el ajuste encontrado presenta valores satisfactorios para el pequeño número de datos experimentales -n=15- y el elevado número de variables que afectan el sistema. El encontrar el menor valor de los coeficientes para B = 0,12999, indica que al aumentar el valor de la presión adimensional su efecto en el $k_L a$ es cada vez menor. Comparando los valores de los coeficientes asociados al Flujo de recirculación y al flujo de aireación C y D, se comprueba nuevamente la mayor influencia que ejerce ésta primera variable. La conclusión de sí el uso del dispositivo representa una ventaja en el escalado, requiere la simulación de los parámetros de forma, la determinación de los correspondientes $k_L a$ y determinación de su significancia estadística. El desarrollo matemático y las expresiones resultado del análisis adimensional de las variables se presentan en detalle en el anexo 5.

4.3. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE AIREACIÓN EXTERNO EN EL CULTIVO CON *Lactococcus lactis*.

4.3.1 Fermentaciones en condiciones de operación variables

Condiciones de Evaluación:

Medio: Medio de cultivo estándar para la fermentación con *Lactococcus sp.* Diseñado en trabajo previo por el grupo de investigación –tabla 4-. Las demás condiciones de las variables son las establecidas en la caracterización hidrodinámica de la etapa dos, manteniendo constante la agitación en 154 r.p.m. y la temperatura en 30°C.

Las fermentaciones transcurren dentro del curso normal obteniendo curvas de crecimiento características de éste cultivo y niveles de biomasa final, muy similares a los encontrados en cultivos anteriores para el sistema convencional de aireador interno. Durante la fase exponencial se determinan los k_La a diferentes condiciones de operación mediante la técnica dinámica, en la cual se retira el suministro de aire hasta llegar a un valor cercano a la concentración estimada como crítica, se permite la reaireación bajo las condiciones de operación evaluadas, obteniendo curvas que se presentan en la figura 22.

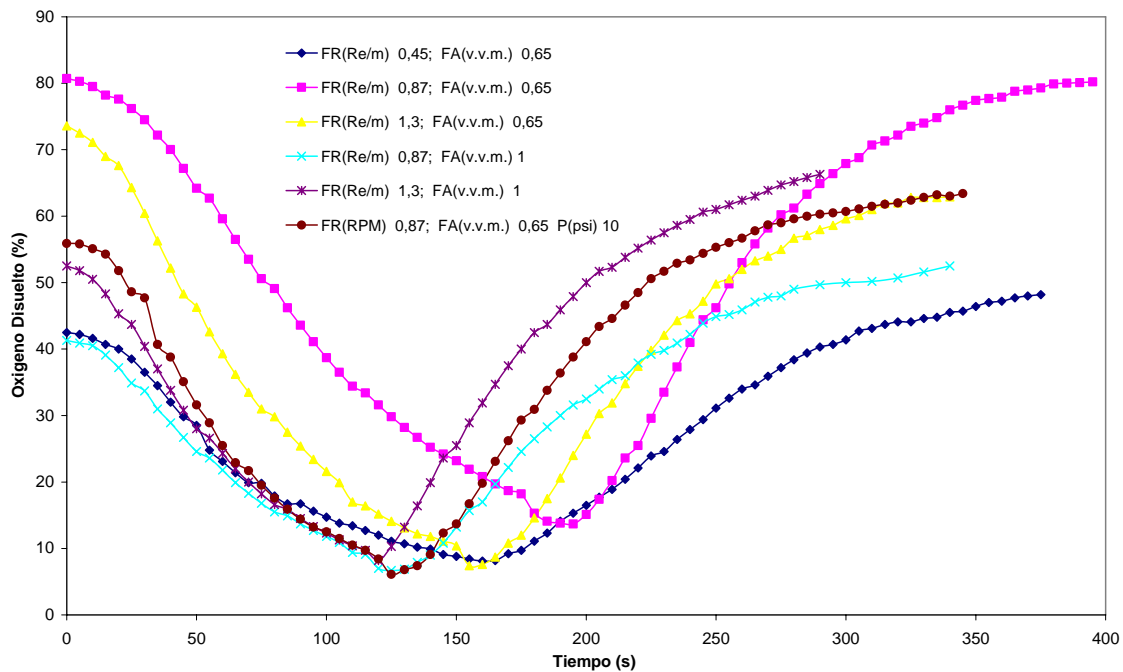


Figura 22. Determinación del k_La por la técnica dinámica -régimen no permanente- en la fermentación con el prototipo de aireación externo.

En la determinación del k_La por la técnica dinámica se obtuvieron el tipo de curvas características de la figura 7, las cuales fueron modeladas tanto en la etapa I para la determinación de la demanda de oxígeno OUR_x como al integrar la expresión de la etapa de reaireación –etapa II- para obtener el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno- k_La - en una ecuación de la forma:

$$\%OD = A+B \exp(\alpha t)$$

donde: A,B : constantes
 α : constante, correspondiente a k_{La} (s^{-1})

El ajuste se hace en el programa Data Fit 9 Oakdale Enginnering, versión libre 2002

Los resultados obtenidos se encuentran consignados en la Tabla 15. El orden establecido, tanto en el lote 1 como en el 2, obedece al consecutivo de los ensayos en el transcurso de la fase exponencial. En la determinación de la demanda de oxígeno en la etapa de desoxigenación, no se evaluó la afectación que puedan introducir factores como, la aireación superficial, cambios en la viscosidad del medio o la concentración inicial de biomasa en cada ensayo. Para el primer factor la velocidad de agitación y tipo de impulsor la afectan, sin embargo, ésta se mantuvo constante por lo que su efecto sobre los valores de demanda de oxígeno y del coeficiente será de magnitud similar en los ensayos. Con el fin de determinar la afectación por el cambio en la viscosidad durante la fase exponencial y determinación de la reproducibilidad entre los ensayos de un lote y el siguiente, se realiza nuevamente el ensayo 6 en un momento diferente de la etapa exponencial, obteniéndose un error del 1.6% en la determinación del k_{La} , lo que indica que el modelo experimental presenta una reproducibilidad dentro de los rangos de aceptabilidad y así mismo que el efecto de la viscosidad sobre los valores de k_{La} es relativamente bajo.

La demanda de oxígeno muestra una tendencia normal, tabla 15 y figura 22, aumentando a medida que transcurre la fermentación, sólo siendo dependiente de la biomasa viable. Hay una disminución de la misma en los ensayos a partir del cuarto ensayo en la misma fermentación, que puede obedecer a la muerte de parte de la biomasa luego de haber suspendido en varias ocasiones la aireación y de cambiar las condiciones de operación a que se somete el cultivo. Para el sexto ensayo, en el que se presenta el mayor valor de biomasa viable, la demanda aumenta nuevamente a una edad de cultivo cercana a la finalización de la fase exponencial. Ésta carga acumulativa no incide en la determinación de cada coeficiente, puesto que en el modelamiento puntual de la etapa de reaireación se incluye la demanda de oxígeno instantánea y la determinación del k_{La} es suficientemente rápida, por lo tanto es respuesta directa de la eficiencia del reactor y el sistema a las condiciones de operación evaluadas.

Tabla 15. Demanda de oxígeno y k_{La} en fermentaciones con el prototipo de aireador externo.

Lote	Ensayo	Condiciones de operación			Biomasa (mg/ml)	Etapa I	Etapa II			
		FR (Re/m)	FA (v,v,m)	Presión (psi)		OURx (%OD/s)	R ²	A	B	k_{La} (h^{-1})
1	1	0,45	0,65	1 ^a	0,8	0,2428	0,995	59,9	-52,15	28,54
	2	0,87	0,65	1 ^a	1,25	0,4892	0,995	87,88	-77,08	46,88
	3	1,30	0,65	3 ^a	1,9	0,5527	0,998	70,47	-60,18	48,84
	4	0,87	1,00	3 ^a	2,3	0,3294	0,999	61,77	-53,55	36,53
	5	1,30	1,00	3 ^a	2,8	0,3968	0,999	74,43	-65,54	45,97
	6	0,87	0,65	10	3,25	0,5424	0,995	68,33	-64,89	48,10
2	6	0,87	0,65	10	0,75	0,4458	0,996	68,42	-48,99	49,75
	7	1,30	0,65	10	2,2	0,4373	0,998	81,75	-63,53	63,18
	8	0,87	0,65	14	3,46	0,5315	0,997	75,15	-56,79	52,92

^a Variable medida y no manipulada.

Con los ensayos de determinación del k_{La} dinámico y en concordancia con lo obtenido en la caracterización del dispositivo, se encuentra que las variables determinantes continúan siendo el flujo

de recirculación, y en menor medida la presión, condiciones que en los niveles altos, presentan dificultades de estabilidad del sistema, por cuanto se tienen conexiones flexibles y operación del sistema de bombeo en condiciones extremas. Por lo anterior se establece que la condición promisorio corresponde a un nivel medio que aporte un valor de k_{La} mayor a los obtenidos en las condiciones estándar y bajo condiciones que sean soportadas por el sistema ensamblado, de esta manera se mantuvieron las condiciones del ensayo 6 durante las 5 horas de una nueva fermentación. Con el objeto de comparar, se desarrollo una fermentación con los niveles más bajos en las variables estudiadas.

4.3.2 Fermentaciones en condiciones de operación fijas

Condiciones de Evaluación:

- *Medio*: Medio de cultivo estándar para cultivos de *Lactococcus sp.* obtenido de proyecto anterior sobre la producción del biopolímero Tabla 4.
- *Niveles*:
 - Flujo de aire (vvm): 0.65
 - Flujo de recirculación (Re/m): 0.45 y 0.87
 - Presión Manométrica en el Aireador (psi): 10
 - Agitación (r.p.m.): 154
 - Temperatura (°C): 30

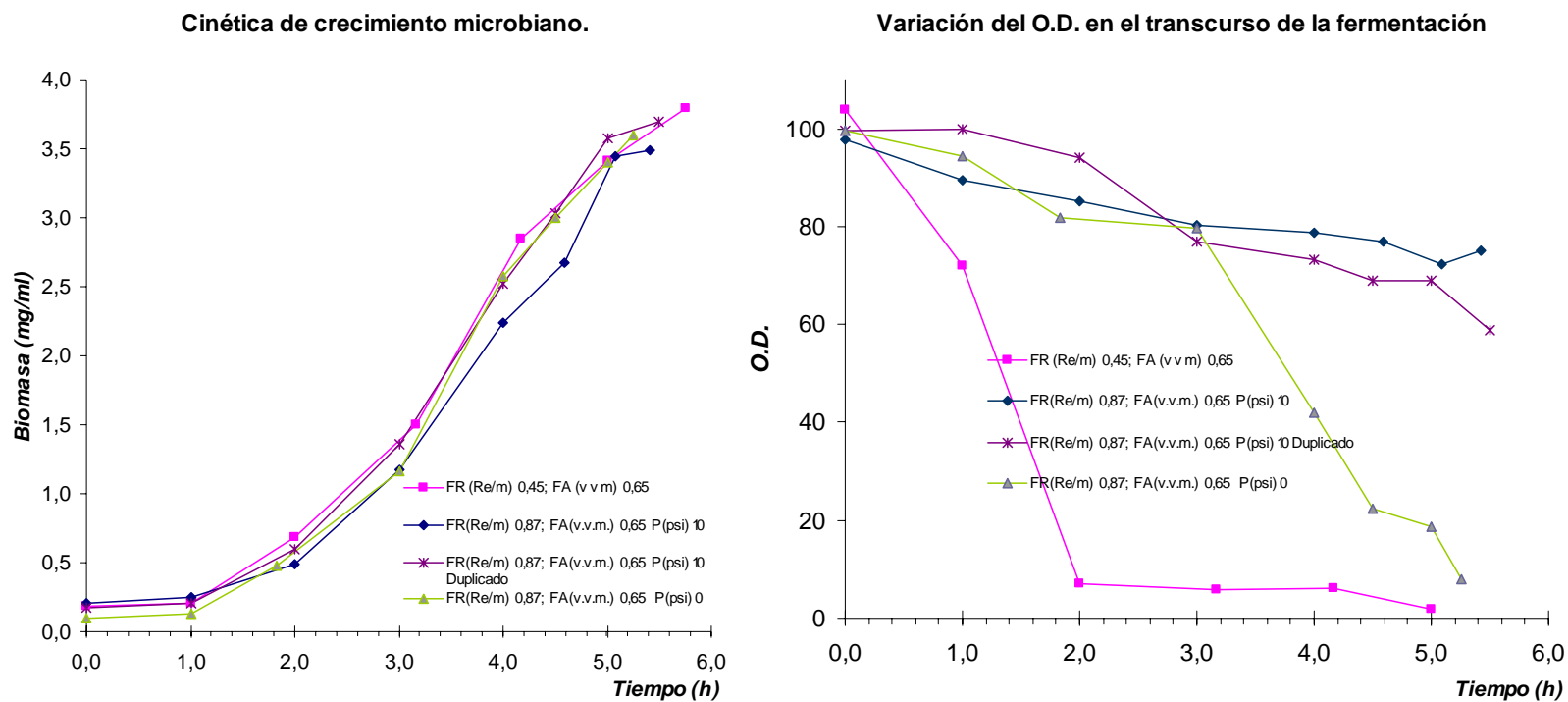


Figura 23. Cinéticas de crecimiento microbiano y variación del porcentaje de oxígeno disuelto en fermentaciones con el prototipo de aireador externo

Como se observa en la figura 23, las curvas de crecimiento mantienen la misma tendencia y etapas características obtenidas con el sistema convencional y no presentan diferencias significativas para las condiciones evaluadas. Con los niveles de las variables en el menor valor aún se presenta en el cultivo limitación de oxígeno a partir de la segunda hora, mientras que con la condición propuesta se logra mantener niveles mayores al 60 % durante toda la fermentación, eliminando la limitación que se venía teniendo. Los extractos enzimáticos obtenidos bajo las condiciones propuestas de: FA (vvm) de 0.65, FR (Re/m) de 0.87 y 10 psi en el aireador, presentaron una baja actividad tanto hidrolítica como de transferencia, con valores de 1.49 y 1.42 U/mL correspondientemente, frente a valores de alrededor de 5 U/mL obtenidas en los cultivos estándar. Adicionalmente se realiza una fermentación a condiciones intermedias sin incluir la variable de presión en el aireador, la cual mantiene la misma tendencia en las cinéticas y de igual manera la actividad obtenida es baja, con valores de 1.7 y 1.78 U/mL correspondientemente.

Considerando que no se afecta la biomasa obtenida, y mediante la comprobación de tener mayor presencia de polímero al final de la fermentación, al realizar un ensayo de precipitación con etanol aplicado a la enzima obtenida, el fenómeno se puede atribuir a una posible mayor presencia de enzima, que sumado a una mejor mezcla, permite mayor probabilidad de encuentro enzima sustrato, haciendo que se procese rápidamente el azúcar residual. La presencia de éste polímero obstruye los sitios activos de la enzima, lo que indica que la lectura de actividad enzimática es sólo la residual. La comprobación de ésta hipótesis requiere la purificación de la enzima final y determinación posterior de la actividad sin presencia de polímero.

Con base en los resultados de actividad obtenidos en las fermentaciones con condiciones variables, en los que se tienen actividades de 3.62 U/mL hidrolítica y 3.55 U/mL glucosiltransferasa, se puede establecer que realizando un cultivo alimentado con control tanto del suministro de sacarosa como de oxígeno, aumentando los flujos durante la fase exponencial, se induciría la fermentación a la obtención de enzima sin la formación simultánea del polímero, lo que permitiría mantener la tecnología de producción actual. Con ésta estrategia se pueden mantener los niveles de oxígeno disuelto durante todo el cultivo fuera de la limitación, e incluso habría disminución en la materia prima necesaria, generando además un extracto enzimático con menores contaminantes, lo cual es una ventaja comparativa con el proceso de producción actual por incidir favorablemente en la etapa que concentra el mayor costo por de purificación del biopolímero.

En la actualidad se vienen realizando investigaciones a nivel de Doctorado en cuanto a la purificación del extracto enzimático, lo que permitiría contar con una metodología de eliminación del polímero formado en la fermentación, y poder así establecer la actividad real obtenida al realizarse las fermentaciones a las condiciones de operación propuestas. Estas operaciones, si bien pueden inducir costos extras, se encaminan a la posibilidad de inmovilización de la enzima purificada.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Para el sistema convencional con aireación interna, se establece que mejorar la transferencia de oxígeno se refleja en un incremento de los parámetros característicos del cultivo –actividad enzimática y biomasa final-. Con ésta configuración se tienen valores de actividad Glucosiltransferasa máxima de 6.75 U/mL bajo una aireación de 1.75 vvm y agitación de 250 r.p.m., niveles a partir de los cuales la actividad decae considerablemente. De igual manera, se determinó que la velocidad de agitación tiene un efecto mayor sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno que la velocidad de aireación, obteniéndose valores similares a los característicos del k_La reportados en las investigaciones de la literatura nacional.

Los resultados muestran que en el sistema convencional de reactor con tanque agitado y difusor interno, la limitación de oxígeno es persistente aunque se aumente la velocidad de agitación y el flujo de aireación durante las fermentaciones. Las condiciones de operación que permiten obtener los mayores valores del coeficiente de transferencia de oxígeno para este sistema convencional, no logran el suministro de oxígeno que requiere el cultivo, lo que se ve reflejado en la disminución de la concentración de oxígeno desde las primeras horas y una concentración cercana a cero durante la fase exponencial.

El prototipo propuesto presenta una alternativa tecnológica para el suministro de oxígeno en procesos fermentativos aerobios y una de sus ventajas es su fácil implementación en biorreactores de diverso tipo y escala. Con el prototipo se aumenta el k_La desde valores de 20.16 (h^{-1}) para el sistema convencional en las condiciones estándar de producción del biopolímero, hasta valores de 90 (h^{-1}) con el aireador externo, comprobando así que el dispositivo es un sistema efectivo para la transferencia de oxígeno. En la caracterización hidrodinámica se encuentra que las variables determinantes en la transferencia de oxígeno son el flujo de recirculación (FR) y la velocidad de agitación en el reactor, mientras que la presión ejerce un efecto menor sobre la transferencia en tanto que el de la temperatura es despreciable. Por el contrario el cambio en el flujo de aireación, para los valores evaluados, no es determinante porque los flujos de líquido resultan ser bajos para la capacidad del difusor de proveer la fase gaseosa en la zona de contacto gas-líquido.

La agitación presenta un efecto significativo sobre la transferencia de oxígeno para el sistema de aireación externo, similar al obtenido para el biorreactor convencional. La alta velocidad de transferencia de oxígeno que se alcanza en el contactor debe ser complementada con una agitación que promueva una rápida dispersión del medio recirculado en el seno del líquido. Los resultados indican que el efecto de la agitación es independiente del flujo de recirculación, lo que indica que no hay efectos combinados entre estas dos variables.

El flujo de recirculación tiene efecto significativo sobre la transferencia de oxígeno en el sistema de aireación externo, obteniéndose valores de k_La que triplican los valores obtenidos para el biorreactor convencional. Para los flujos de aireación estudiados, no se presentó un efecto significativo sobre la velocidad de transferencia de oxígeno, esto puede deberse a que los flujos de líquido pueden resultar bajos para los flujos de aire que se manejan en la zona de contacto gas-líquido, haciendo suficiente un nivel bajo de aireación para hacer eficiente la transferencia.

Durante los ensayos con el prototipo operando a la presión máxima propuesta en el diseño experimental -20 psi- la operación del sistema fue difícil, debido a las conexiones flexibles con que se conducen los fluidos; adicionalmente, a éstas condiciones se produce intermitencia entre el flujo de gas y el de la mezcla gas-líquido, originando coalescencia y que el ingreso al reactor presente burbujas de mayor tamaño a las generadas por el difusor. Esto afecta la transferencia de oxígeno, disminuye la retención del gas y es una condición de alta variabilidad en la medición del oxígeno disuelto; para evitar que se presente esta condición no deseada se requiere un mayor flujo de recirculación y conexiones rígidas que soporten las presiones del sistema.

En la fermentación con el prototipo de aireador externo con un flujo de recirculación correspondiente a 0.87 (Re/m), aireación de 0.65 vvm y una presión de 10 psi, se tiene una condición de operación que elimina la limitación de oxígeno en cultivos con *Lactococcus lactis*; para estas condiciones la productividad del cultivo en biomasa no se ve afectada en tanto que la actividad enzimática presenta un descenso que se puede explicar en parte porque el extracto enzimático contiene mayor cantidad de polímero al compararlo con el extracto obtenido con el biorreactor convencional, lo que puede estar originando que al final de la fase exponencial se presente competencia por el sustrato entre el microorganismo y la enzima producida, posiblemente más activa ante el sustrato residual. Ensayos realizados paralelamente parecen estar indicando que el biopolímero afecta la actividad del complejo enzimático cuando este se produce durante la fermentación, lo que se ha demostrado parcialmente cuando se purifica el extracto enzimático y se obtiene un extracto con alta actividad. Lo anterior correspondería a una inhibición por producto ante la obstrucción de los sitios activos.

Aunque en la actualidad el grupo de investigación ya viene desarrollando una metodología de purificación para el extracto enzimático, basada en las técnicas evaluadas por Bogoya en el 2008^[19], surge como alternativa estudiar cultivos por lote alimentado, en los que la disponibilidad de sacarosa se controle y se adicione la que el microorganismo requiera para el crecimiento; esta estrategia no implica cambios en la tecnología de producción del biopolímero y si podría incidir favorablemente en los costos asociados a la purificación tanto del extracto enzimático como del biopolímero. Éste trabajo aporta una condición base que permite la fermentación sin limitación de oxígeno, a partir de la cual son necesarios estudios posteriores tendientes a definir las condiciones operacionales que eliminan la limitación de oxígeno y mantienen la actividad enzimática.

BIBLIOGRAFIA

1. Abril, J.I., *Aproximación al modelo del comportamiento de un aireador externo prototipo en la transferencia de oxígeno para la fermentación con Lactococcus lactis*. Avance Practica de extensión Pasantia, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional, , 2009.
2. Biotecnología., I.d., *Hoja técnica Biopolímero Bilac*. 2002.
3. Soler A. and Florez Y., *Protocolos de operación planta piloto biopolímeros. Producto de convenio Colciencias - Procaps-Instituto de Biotecnología* 2004.
4. Florez, A.M., *Estudio de levansacarasa producida por cepas nativas colombianas*. 1998, Proyecto de grado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
5. Gómez, A., *Aislamiento e identificación de cepas con actividad levansacarasa*. Proyecto de Grado, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca., 1998.
6. García, M.G., *Estudio de la producción y caracterización de Levana a partir de Lactococcus lactis, (cepa 34.1)*. 2000, Proyecto de grado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional: Bogotá.
7. Vanegas., O.L., *Evaluación de los componentes del medio de cultivo y su influencia sobre la producción de la enzima glucansacarasa obtenida por fermentación de la cepa IBUN 34.1* 2006, Proyecto de grado, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional: Bogota.
8. Shügerl K., Lücke J., and Oels U., *Bubble Column Bioreactor* 1976.
9. Bandaiphet C., P.P., *Efect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coe.cient, k_La in exopolysaccharide production from Enterobacter cloacae WD7* Carbohydrate Polymers, 2006.
10. Biochemical, E. *Frequently asked questions in mass transfer* -nota pagina web www.biochemicalengineering.com- [cited].
11. Cockx A., R.M., Line A., and Hebrard, *Modeling of mass transfer coefficient K_L in bubble columns*. Trans IChemE., 1995. **73**: p. Part A, Agosto 627-631.
12. MnCabe W., Smith J., and Harriott P., *Operaciones unitarias en Ingeniería Química*, ed. M. Hill. 1991, Madrid.
13. Weber J. and Agblevor F., *Microbubble fermentation of Trichoderma reesei for cellulase production*. Process Biochemistry 2005. **40**: p. 669-676.
14. Pinheiro R., Belo I., and Mota M., *Air pressure effects on biomass yield of two different Kluyveromyces strains*. . Enzyme and Microbial Technology 2000. **26**: p. 756-762.
15. Czermak P., Weber C., and Nehring D., *A ceramic microsparging aeration system for cell culture reactors*. Publication Series of Institute of Biopharmaceutical Technology, 2005. **1**.

16. Hernández, J., *Estudio del tratamiento y recuperación de glucosa a partir de la solución resultante en el proceso industrial de producción de levana*. . 2003, Proyecto de grado, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional: Bogotá.
17. Giraldo, S.E., *Caracterización de las propiedades de hidrofilidad de levana de origen biotecnológico*. 2002, Proyecto de grado, Facultad de ciencias, Universidad Nacional de Colombia.: Bogotá.
18. Porras W.A. and Sepulveda C.J., *Determinación de la estabilidad genética asociada a la actividad enzimática en el plasmido de la cepa Ibut 34.1*. 2007, Proyecto de grado, Microbiología, Colegio Mayor de Cundinamarca Bogotá.
19. Bogoya, W.O., *Evaluación de la purificación de la enzima glucansacarasa de Lactococcus lactis subsp. lactis. Cepa ibun 34.1 para la producción de un biopolímero*. 2007, Tesis de grado Msc Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia Bogotá.
20. Gallego, D., *Ambiente de los cultivos*. 2002, Primer simposio sobre biofabricas: Medellin.
21. Doran, P.M., *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. 1995, España: Editorial Acribia S.A.
22. Mataragas M. and Metaxopoulos L., *Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by Leuconostoc mesenteroides L124 and Lactobacillus curvatus L442*. Meat Science, 2003. **64**: p. 265-271.
23. Pedrique M. and Bastardo Y., *Producción de energía en los microorganismos*. 2001, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.
24. Torres L. and Galvis L., *Estudio de la transferencia de oxígeno en la producción de toxina en un fermentador de cinco litros*. 1999, Proyecto de grado, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
25. Algecira, E.A., *Estudio de la producción de Borbotella pertuassis en fermentador de cinco litros* 1998, Tesis de grado, Msc Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
26. Silva D. and Cortéz N., *Efecto de la transferencia de oxígeno sobre le cultivo de Aspergillus niger (cepa AN 166) para la producción de la enzima fructosiltransferasa* in 2003, Tesis de grado, Departamento Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia Bogotá.
27. Nielsen J. and Villadsen J., *Bioreaction Engineering Principles*. Kluwer Academic. 2002, New York: Plenum Publishers
28. Onken. U., Kiese. S., and Jostmann J., *An Airlift fermenter for continuous cultures at elevated pressures*. Biotechnology Letters, 1984. **6**: p. 283-288.
29. Deckwer W.D. and Schumpe A., *Improved tools for bubble column reactor design and scale-up*. Chemical Engineering Science, 1993. **48 N 5**: p. 889-911.
30. Benavides, J. and Z. Rosado., *Estudio del efecto de la configuración geométrica en un reactor Airlift sobre el grado de mezclado y la transferencia de oxígeno* in 2002, Tesis de grado, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
31. Noreña, O., *Evaluación de la influencia del volumen en un reactor Airlift*. 2003, Proyecto de grado, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional: Bogota.
32. Lo. Y. M., et al., *Oxygen transfer characteristics of a centrifugal, packed-bed reactor during viscous xanthan fermentation*. Bioprocess and Biosystem Engineering 2001. **24**: p. 187-193.

33. Bandaipheth, C. and P. Prasertsan, *Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, k_{LA} in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD* Carbohydrate Polymers, 2006.
34. Rodriguez W. and Silva M., *Evaluación de la concentración de oxígeno disuelto y estrategia de alimentación en un cultivo de *Bacillus thuringiensis* en reactor agitado*. 2000, Tesis de grado, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia Bogotá.
35. Merchuk J.C, et al., *A method for evaluation of mass transfer coefficients in the different regions of Airlift reactors*. Chemical Engineering Science, 1992. **47**: p. 2221-2226.
36. Díaz, A., *Caracterización hidrodinámica de un fermentador Airlift de 20 litros de lazo interno*. 2008, Tesis de grado, Maestría en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
37. Gouveia E. R., Hokka C.O., and Badino A.C, *The effects of geometry and operational conditions on gas holdup, liquid circulation and mass transfer In an Airlift reactor*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2003. **20 No 04**: p. 363-374.
38. Gaddis, E.S., *Mass transfer in gas-liquid contactors*. Chemical Engineering and Processing, 1999. **38**: p. 503-510.
39. Ghirardini M., Donati G., and Rivetti F., *Gas lift reactor: hydrodynamics, mass transfer, and scale up*. Chemical Engineering Science, 1992. **47 N 9-11** p. 2209-2214.
40. Monsan, P., et al., *Homopolysaccharides from lactic acid bacteria*. International Dairy Journal, 2001. **11**: p. 675-685.
41. Monchois V., Willemot R. M., and Monsan P., *Glucansucrases: Mechanism of action and structure-function relationships*. FEMS Microbiology Reviews, 1999. **23**: p. 131-151.
42. Cerning, J., *Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria*. Lait, 1995. **75**: p. 463-472.
43. Lyhs, U., *Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products*. 2002, University of Helsinki.
44. Biotecnología, I.d., *Tecnología de producción del biopolímero*. 2003.
45. Soler A. and Tellez P., *Reporte Proyecto "Escalamiento a nivel industrial de la producción de un biopesticida a base de la cepa nativa *Bacillus thuringiensis* (Berliner) 90.1.98"* 2002, Instituto de Biotecnología -Sena: Bogotá.
46. Biotecnología, I.d., *Protocolos de operación planta piloto biopolímeros* 2004.
47. Soler A. and Tellez P., *Reformulación del medio de cultivo para la obtención de alfa-endotoxina, a partir de *Bacillus thuringiensis**. 2002, Proyecto de grado, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional: Bogota.
48. Demirtas U. M., Kolhatker A., and Kilbane J. J., *Effect of Aeration and Agitation on Growth Rate of *Thermus thermophilus* in Batch Mode*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003. **95 No 2**: p. 113-117.
49. Munson, B.R., et al., *Fundamento de mecánica de fluidos Capítulo: Análisis Dimensional*. . Limusa, 1999.
50. Universidad de Oviedo, *Apuntes del curso de mecánica de fluidos. Tema 3: Análisis Dimensional*. Escuela Superior de Ingeniería de Gijón, Ing. Industrial, 2004.

**ANEXO 1.****PROTOSCOLOS ANÁLISIS DE LABORATORIO** Planta Piloto Biopolímeros
Adaptación a la presente investigación

Protocolo 1: *Determinación de azúcares reductores DNS.*

Protocolo 2: *Determinación de glucosa Kit GOD-PAD.*

Protocolo 3: *Determinación de actividad enzimática. glucosiltransferasa*

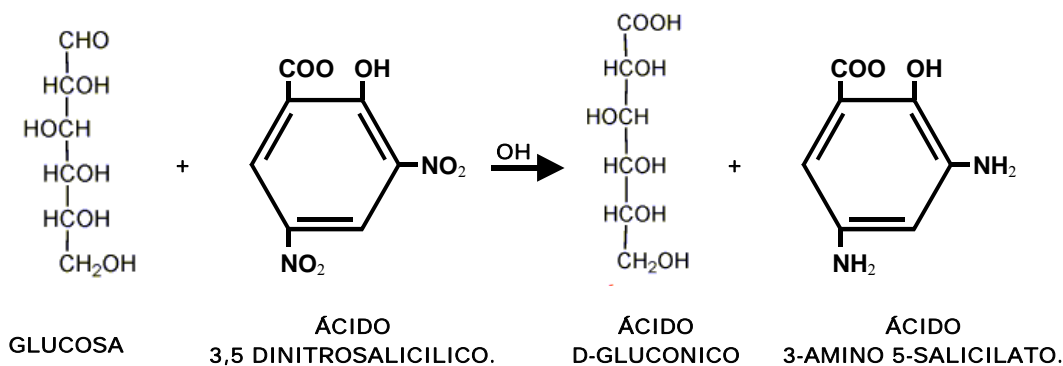
Protocolo 4: *Tinción de Gram.*

Elaborado Por: Ing. Jhon Glaehter Florez .

Adaptado y actualizado para el presente trabajo por : La autora

Protocolo 1. Método colorimétrico para la determinación de azúcares reductores ácido dinitrosalicílico (DNS)

Los azúcares reductores pueden ser medidos por medio del reactivo 3,5 dinitro salicílico, este se reduce en medio básico; la glucosa es oxidada a ácido glucónico, mediante la siguiente reacción:



REACTIVOS:

SOLUCION DNS: (A)

- 1.6 g. de NaOH.
 - 30 g. de tartrato de sodio y potasio.
 - 1 g. de ácido dinitrosalicílico (DNS).
- Aforar a 100 ml. con agua destilada.

SOLUCION STOCK DE GLUCOSA:⁷ (B)

- Pesar 100 mg de glucosa grado analítico y disolverlos en 25 ml de agua destilada. (4mg/ml.), almacenar a -20°C.

PROCEDIMIENTO:

I. Realizar las diluciones siguientes:

	BLANCO	1	2	3	4	5	6
<i>Solución B (µl)</i>	---	25	50	75	100	125	150
<i>Agua destilada (µl)</i>	500	475	450	425	400	375	350
<i>Volumen final (µl)</i>	500	500	500	500	500	500	500
<i>Concentración (mg/ml)</i>		0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2

⁷ Utilizar glucosa analítica como azúcar reductor.

2. A los 500 μ l de cada dilución incluyendo el blanco agregar 500 μ l del reactivo A (solución DNS).
3. Agitar las muestras.
4. Colocar los tubos en ebullición por 5 minutos utilizando un vaso de precipitado.
5. Enfriar inmediatamente con hielo.
6. Adicionar a cada tubo 5 ml de agua destilada.
7. Agitar y dejar en reposo por 15 min.
8. Leer absorbancia a 540 nm.
9. Realizar la curva de calibración absorbancia vs concentración (mg/ml).

CURVA PATRON

Concentración (mg/ml)	Absorbancia 1 (540 nm.)	Absorbancia 2 (540 nm.)	Absorbancia 3 (540 nm.)
0,2	0,072	0,081	0,067
0,4	0,168	0,177	0,152
0,6		0,277	0,284
0,8	0,382	0,387	0,392
1	0,493	0,499	0,491
1,2	0,606	0,569	0,629

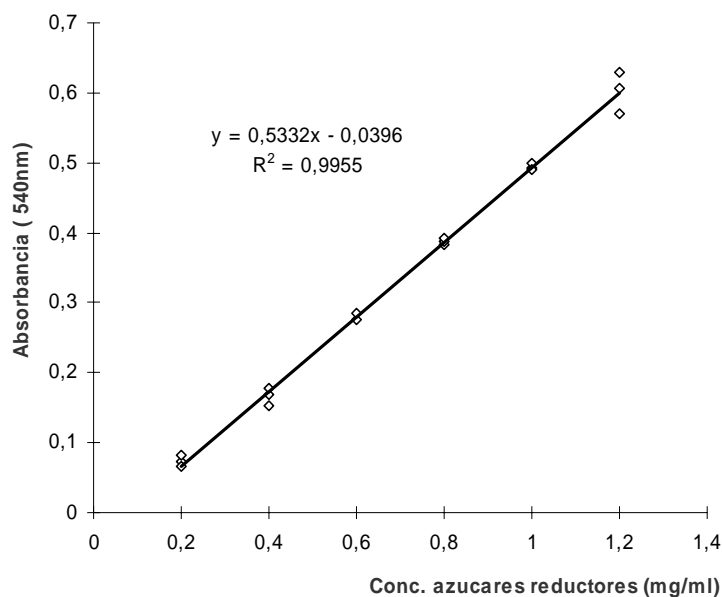


Figura 24. Curva de calibración para determinación de azúcares reductores.

Protocolo 2. Método colorimétrico para la determinación de glucosa

KIT DE BOEHRINGER

(ref. 166391 Glucosa GOD - PAP 5x 200 ml.)

Glucosa oxidasa

*Conjunto de enzimas que se utilizan para determinar cuantitativamente el total de glucosa en el suero.
Pertenece a los primeros métodos enzimáticos para determinación del monosacárido.*

p-HBS =P-hidroxibencensulfonato: sustituto del fenol (cromóforo)

Iminoquinona= Tinte rojo que adquiere gran intensidad con la concentración de α -glucosa, absorbe a 510 nm. Llamado también colorante hidroquinoleína. La intensidad de color es directamente porcional a la concentración de glucosa.

Se utiliza tubos: Blanco, estándar y control

Metodología

1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STANDAR

Preparar una solución de glucosa analítica de una concentración de 0.1mg/ml. (pesar 10 mg de glucosa, tarar a 100 ml con agua destilada desionizada.)

O del standar comercial (1g/l.) realizar una dilución 1:10 con agua destilada desionizada, para obtener una concentración de 0.1mg/ml.

2. SOLUCION REACTIVA

Disolver el contenido del frasco 1 (tampón/enzimas/cromógeno) en 200 ml. de agua destilada y añadir el contenido del frasco 1a (fenol). Conservar en un frasco ámbar a 4°C (Estable por 4 semanas).

Realizar las diluciones indicadas

	Blanco	Estandar	Muestra
Agua destilada (μ l)	100	---	---
Estándar(μ l)	---	100	---
Muestra problema(μ l)	---	---	100
Solución reactiva (μ l)	1000	1000	1000

- Agite las muestras e incube a 37°C por 25 minutos.
- Leer las muestras a 510 nm.

3. CALCULOS

Concentración de muestra = $100 \times \frac{\text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. estándar}}$ (mg/ml)

Protocolo 3. Determinación de actividad enzimática: Glucosiltransferasa e hidrolítica.

Determinación de la actividad enzimática expresada en micromoles de glucosa transferida por minuto, utilizando como sustrato sacarosa.

Una unidad de actividad (U) es definida como:

“La cantidad de enzima necesaria para transferir un micromol de glucosa por minuto a una temperatura de 30°C, pH 5 y una concentración de sustrato de 80 g/l.”.

Equipos, materiales y reactivos (actividad enzimática)

Equipos:

- Agitador magnético.
- Baño termostataado.
- Centrífuga.
- Plancha de calentamiento.
- Espectrofotómetro.
- Incubadora.

Materiales

- Celda reactiva.
- Agitador magnético.
- Vaso de precipitado 500 ml.
- Flotador para microtubos.
- Microtubos (Eppendorf).
- Micro pipetas de volumen variable, 1000µl, 200 µl y 50 µl.
- Tubos de vidrio.
- Pipetas de 5ml.

Reactivos:

- **Sustrato:** Preparar 50 ml de una solución buffer fosfatos 50 mM a pH 5, con una concentración de sacarosa de 160 mg/ml. Marcar y almacenar en congelación.
- **Reactivo DNS** (ver protocolo 1).
- **Reactivo glucosa GOD-PAD** (ver protocolo 2).
- **Extracto enzimático:** Producto obtenido de la separación celular con el medio de cultivo (enzima extracelular).

Procedimiento – Figura 25- :

Reacción enzimática:

Colocar 2 ml de sustrato en el reactor de vidrio, a una temperatura de 30°C con agitación magnética; atemperar por 5 min.

Transcurrido este tiempo, adicionar 2 ml de extracto enzimático al reactor; Cronometrar tomando el tiempo cero, como el momento de adición de la enzima

Inactivación de las muestras:

Con la ayuda de una micropipeta tomar una alícuota de 200 µl aprox, de la reacción en un microtubo de 1.5 ml. Tapar muy bien e inactivar inmediatamente al calor sumergiéndolo en agua a ebullición por 5 min.

Los tiempos de toma de alícuotas son: 0, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 min.

Marcar los microtubos correspondientes a cada uno y mantenerlos almacenados en agua con hielo mientras transcurren los 50 min.

Paralelamente, a medida que marcha la reacción enzimática, hay un aumento de viscosidad muy marcado, lo que dificulta la toma de muestra, para ello se puede hacer un pequeño corte a la punta a utilizar en la micropipeta, de tal manera que el orificio sea mayor, y permita una mayor succión.

Homogenización de las muestras:

Agite las muestras mediante vórtex

Diluciones:

Preparar 7 tubos de ensayo cada uno con 525µl de agua d.d. en una gradilla marcada como “*tubos para DNS*”. En otra, marcada como “*tubos para glucosa*” disponer 9 tubos, cada uno con 50µl de agua d.d.

En la gradilla “*tubos para DNS*” marcar¹ los 7 tubos como 0, 10, 15, 20, 30, 40 y 50.

En la gradilla “*tubos para Glucosa*” marcar 7 tubos como 0, 10, 15, 20, 30, 40 y 50, y los otros dos como blanco y estandar.

Adicionar 25µl del contenido del microtubo (reacción enzimática inactivada) al tubo correspondiente en la gradilla “*tubos para DNS*”, procurando no desalojar la muestra en las paredes, sino depositarla en el fondo (dilución 1:22). Con ayuda de un vortex agitar por 0.5 min.

Tomar 50µl de cada tubo de la gradilla de “*tubos para DNS*” y pasarlos a sus respectivos tubos en la gradilla “*tubos para glucosa*”. Agitar con ayuda de un vortex. (dilución 1:44).

Análisis:

Realizar el procedimiento indicado en el protocolo 1 para azúcares reductores y en el 2 para Glucosa. Según indica la etiqueta el Kit de glucosa su error relativo no supera el 0.1% y como se observa en la figura 24, la dispersión de datos en los duplicados para la determinación de azúcares no supera una diferencia de 0.032 en la absorbancia, correspondiente a 0.13 mg/ml, lo que representa un cambio en la actividad enzimática de 0.2 U/ml máximo, nivel entre los cuales estaría la no significancia entre tratamientos.

¹ Es importante utilizar un marcador indeleble, que no se borre cuando los tubos se encuentren en ebullición, para evitar confusiones.

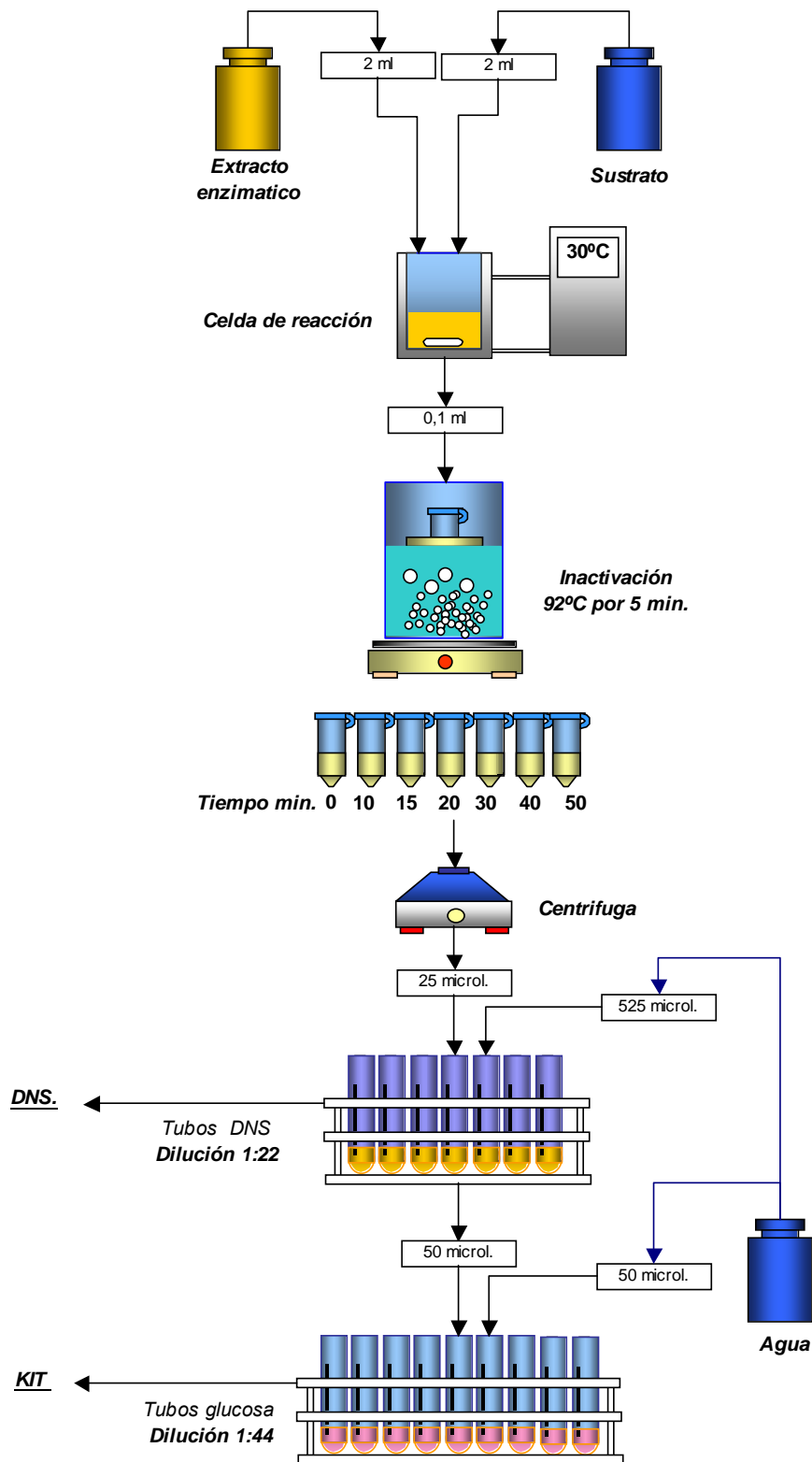


Figura 25. Esquema en la determinación de la actividad transferasa.

Protocolo 4. Tinción de Gram.**Equipos:**

- Microscopio óptico.

Materiales:

- Mechero.
- Asas microbiológicas.
- Laminas porta-objetos.
- Cronometro.

Reactivos:

- Solución Violeta de Gram.
- Solución de Lugol.
- Solución Alcohol-Acetona, 50-50 %v/v.
- Solución Safranina o fucsina de Gram.
- Solución salina NaCl (0.8 %p/v).

Procedimiento:*Preparación de muestra:*

En una lamina porta-objeto, limpia y desengrasada adicione, con ayuda del asa microbiológica redonda, una gota pequeña de solución salina al 0.8%. Esterilice la punta del asa en el mechero y tome una asada de la muestra en condiciones asépticas (si así se requiere) y únala con la gota de solución salina del porta-objeto; homogenice suavemente, y deje secar al ambiente; Se puede secar flameando al mechero, teniendo cuidado que sea rápido, para evitar lizar las células.

Luego que la muestra se encuentre completamente seca, adicione los reactivos mostrados en la siguiente tabla, respetando el orden y los tiempos establecidos:

Orden	Reactivo	Tiempo (seg.)
1	Solución violeta de Gram.	60
2	Lavar con agua.	
3	Solución lugol.	60
4	Lavar con agua.	
5	Solución alcohol- Acetona.	15
6	Lavar con agua.	
7	Solución safranina.	60
8	Lavar con agua y secar al ambiente	

ANEXO 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LA INSTRUMENTACIÓN

Variador Agitador modulo Reactor Biolab

r.p.m. - Modulo de variación	r.p.m. - Tacómetro
50	102
100	156.9
200	242.9
300	335.5
400	415.9
500	493.4
600	580.5
700	666.6

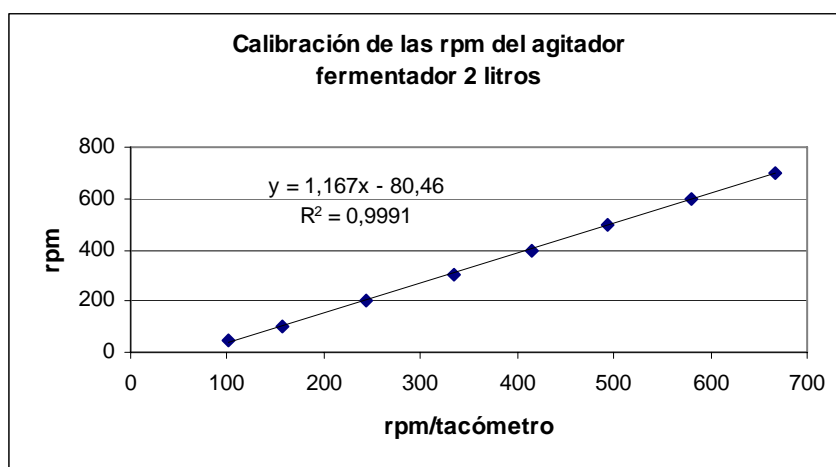


Figura 26. Curva de calibración del variador del agitador

Rotámetros para gases

Equipos:

Medidor de flujo variable

Cronometro

El Reactor Bilolab® cuenta con un rotámetro para gases de 0 a 1.2 L/min. En los ensayos con el sistema convencional se plantea la experimentación hasta 2.5 vvm, lo que con un litro de medio implica un flujo de aireación de 2.5 L/min, por lo que es necesario un rotámetro de mayor rango. Se provee entonces de uno con mediciones de 0 a 5 L/min, Para ambos instrumentos se cuenta con la curva de calibración del caudal contra los flujos indicados por un medidor de flujo variable patrón.

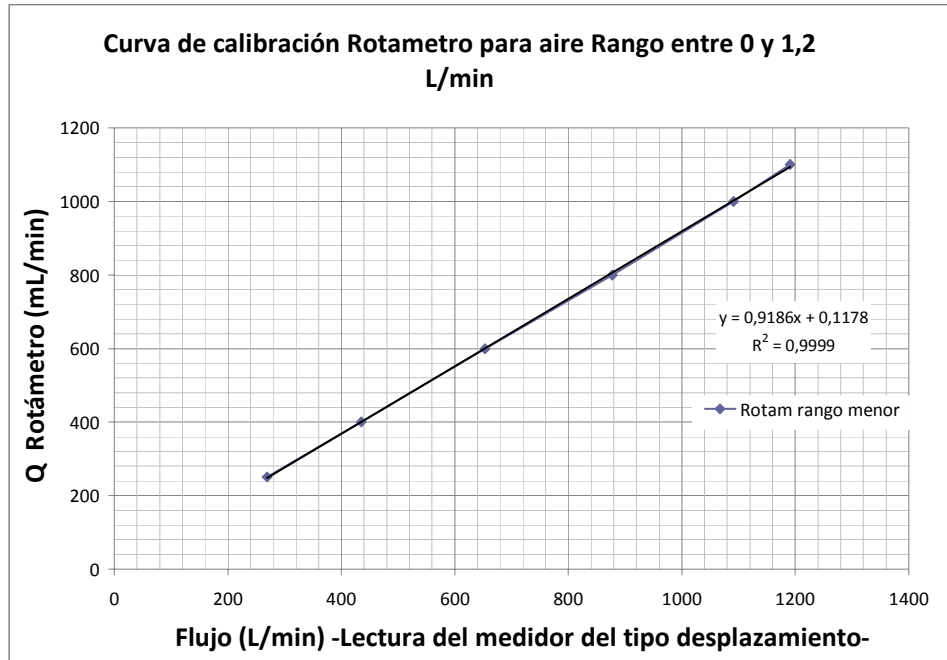


Figura 27. Curva de calibración del rotámetro para gases en el rango de 0 a 1.2 L/min

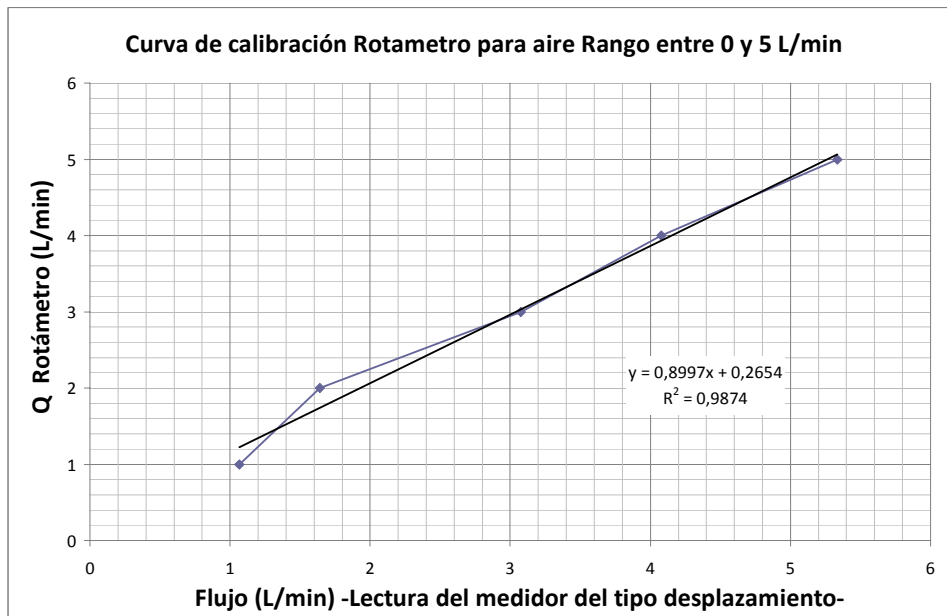


Figura 28. Curva de calibración del rotámetro para gases en el rango de 0 a 5 L/min

Rotámetros para líquidos

En línea de recirculación luego del bombeo y mediante conexiones flexibles y cierres clam, se instala un rotámetro de líquidos que hace parte de un sistema de microfiltración Millipore presente en el laboratorio de Enzimas del IBUN

Equipos:

Probetas graduadas

Cronometro

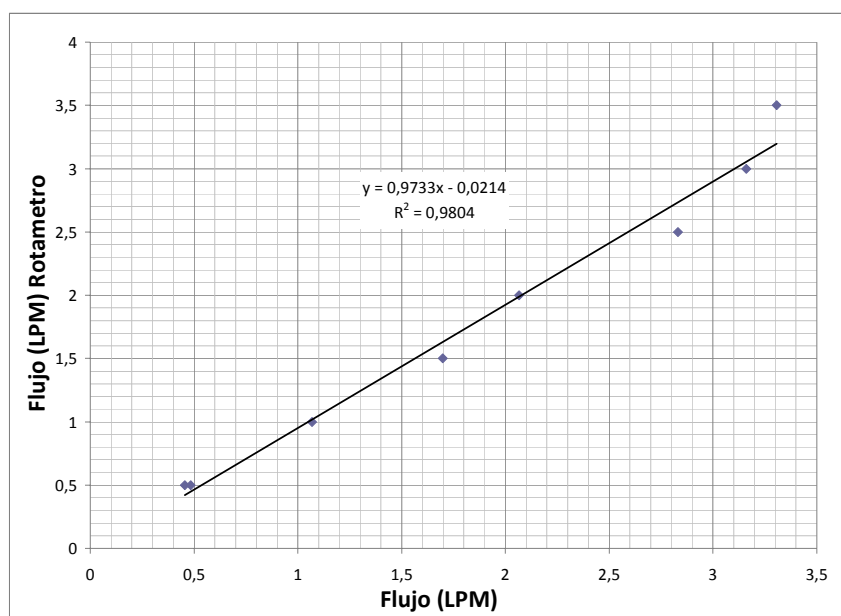


Figura 29. Curva de calibración del rotámetro para líquidos.

Reporte del ajuste y calibración manómetro

Con el fin de garantizar que en la zona de contacto gas líquido o cámara donde se encuentra el difusor se tiene una lectura confiable de la presión, se envía el manómetro a ajuste y reporte contra manómetros calibrados con el siguiente informe:



ROCHA Y LONDOÑO LTDA.
Distribuidores Industriales - Nit. 860.527.857-8



TABLA DE VERIFICACIÓN PARA MANÓMETROS		ISO 9001
Fecha de aprobación		13 de Diciembre de 2008
CONSECUTIVO	4199	
FECHA EMISION:	15 de Noviembre de 2008	<small>Conforme a la producción de unidades de manómetros de control de presión, sometidos a una Inspección Especializada de procesos de fabricación implementados para la calidad NTC-ISO 9001:2000</small>
CLIENTE	ANDREA SOLER	
RANGO	0 - 100 PSI	
MARCA	MILLIPORE	
CLASE	1,6	
DIAL	2 1/2"	
CONEXIÓN	CV 1/42 NPT	
LIQUIDO DE RELLENO	GLICERINA	
SERIE	9668	

PATRON	INSTRUMENTO	
	ENTRADA	SALIDA
0	0	0
10	10	10
20	19	19
30	29	29
40	39	39
50	49	49
60	59	59
70	70	70
80	79	79
90	90	90
100	99	99

MANOMETRO	NUEVO	USADO	CLASE	ERROR PERMITIDO
		X	1,6	+/- 2%
COMPARADO CON MANOMETRO PATRON	RANGO	MARCA	CLASE	
	0 - 100 PSI	NUOVAFIMA	0,25	
CERTIFICADO POR	ENTE CERTIFICADOR	CERTIFICADO NUMERO		
	PROGEN	7557		
COMENTARIO	Se verifica a una temperatura ambiente de 20° C +/-1° C Coincidiendo en todos los puntos anotados tanto ascendente como descendente. Los resultados obtenidos en el presente informe se refiere al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones.			

Cordialmente

LUIS EDUARDO ROCHA
 Ing. Electromecánico

Calle 17 No. 22-24
 PBX: (571) 360 0641
 Tels.: 360 0661 - 201 4378
 Fax: 277 7198 - A.A. 42377
 Email: rochalo@etb.net.co
 Web: www.rochaylondono.com
 Bogotá, D.C. - Colombia

ANEXO 3. MUESTRAS DE CÁLCULO

Muestra de cálculo en la determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno - k_{La} - en agua por la técnica de desgasificación

En el presente trabajo se determina el k_{La} para el sistema tradicional del reactor agitado con difusor interno en L de 5 huecos, siguiendo lo indicado en el párrafo 3.4.3 , los cuales son producto de la linealización al graficar los datos obtenidos en la experimentación según la ecuación 6 en las diferentes condiciones agitación y aireación –Figura 12 y Tabla 11 – , de igual manera se realizan los ensayos con el prototipo propuesto de aireador externo, para el cual se obtienen el tipo de graficas de oxígeno disuelto vs tiempo en la zona de reaireación de la figura 15. El ajuste de éstos datos a la expresión de la ecuación 6 como muestra de la determinación en solo la fila de ensayos del diseño experimental donde se varia flujo de recirculación-FR y flujo de aireación –FA- se presenta en la figura 30 y en la figura 31 su correspondiente regresión con coeficientes de correlación y pendientes que corresponden al k_{La} en s^{-1} . Los resultados de la aplicación de ésta técnica en el sistema tradicional se presentan en la tabla 11 del capítulo de resultados y análisis y para el reactor con el prototipo se consolidan en la tabla 16 en éste anexo y se presentan en las Figuras 16-19

$$\ln \left[\frac{C^* - C_L}{C^* - C_{t=0}} \right] = -k_{La} * t \quad (6)$$

Donde $C_{t=0} = 0$ completa eliminación del oxígeno presente.

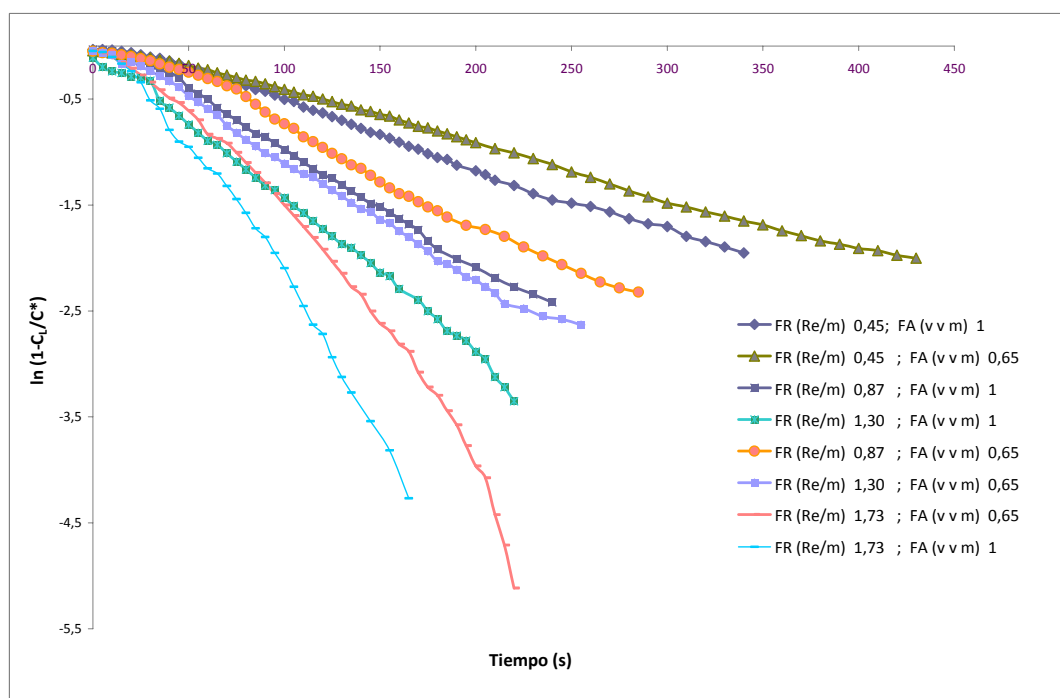


Figura 30. Curvas para la determinación del k_{La} en agua en los ensayos con el difusor externo en la línea base de ensayos para FR y FA

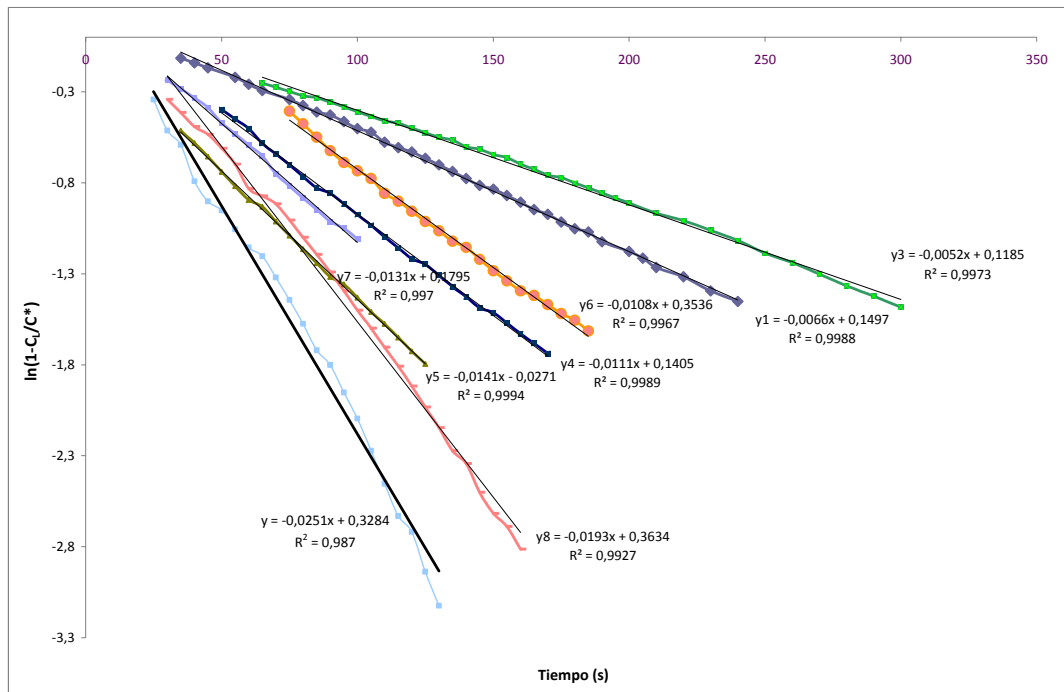


Figura 31. Regresión de las curvas para la determinación del k_La en agua en los ensayos con el difusor externo en la línea base de ensayos para FR y FA

Tabla 16. Consolidado de resultados de la caracterización del prototipo de aireador externo.

Corrida	$k_La(s^{-1})$	$k_La(h^{-1})$	FR (Re/m)	FA (vvm)	Agitación (rpm)	Presión (psi)	Temperatura (°C)
8	0,0193	69,5	1,73	0,65	154	3	18
7	0,0131	47,2	1,30	0,65	154	2	18
6	0,0108	38,9	0,87	0,65	154	0	18
3	0,0052	18,7	0,45	0,65	154	0	18
2	0,0251	90,4	1,73	1,00	154	4	18
5	0,0141	50,8	1,30	1,00	154	3	18
4	0,0111	40,0	0,87	1,00	154	0	18
1	0,0066	23,8	0,45	1,00	154	0	18
9	0,0115	41,4	0,45	1,00	283	0	18
10	0,017	61,2	0,87	1,00	283	0	18
11	0,0093	33,5	0,45	0,65	154	10	18
12	0,01	36,0	0,45	0,65	154	15	18
13	0,005	18,0	0,45	0,65	154	20	18
14	0,0052	18,7	0,45	0,65	154	0	30
15	0,0097	34,9	0,45	0,65	154	10	30

Muestra de cálculo en la determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno - $k_L a$ - en fermentaciones por la técnica dinámica

Mediante el procedimiento descrito el numeral 3.4.4, durante la fermentación con el prototipo de aireador externo se obtienen las curvas de la figura 22, las cuales son características para la determinación de coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, El tratamiento que se le da a los datos de cada una de las curvas, corresponde inicialmente a la linealización de la zona I bajo la ecuación 9 con lo cual se obtienen los datos de demanda de oxígeno.

$$\%OD = -(OURx)*t + b \quad (9)$$

Para la zona II de reaireación se utiliza la expresión de la ecuación 11 mediante la herramienta computacional que ofrece programa Data Fit 9 (Oakdale Engineering, versión libre 2002)

$$\%OD = A+B \exp(\alpha t) \quad (11)$$

donde: A,B : Constantes que deben inicializarse en la determinación colocando valores que pueden corresponder a los encontrados en otras investigaciones ^[24, 34, 47]
 α : constante, correspondiente a $-k_L a$ (s^{-1})

Como producto de lo anterior y como ejemplo se tomará la curva obtenida en el ensayo 2 Tabla 15 a FR(Re/m) 0,87; FA(v.v.m.) 0,65, Agitación (r.p.m.): 154, Temperatura (°C): 30 y Presión en el contacto gas – líquido leída⁸ de 1 psi, para la cual se tienen los siguientes ajustes:

$$\text{Zona I : } y = -0,4892x + 88,681 \quad R^2 = 0,9951$$

$$\text{Zona II : } \%OD = A+B \exp(\alpha t)$$

$$\%OD = 87.88 - 77.08 \exp(-0,013022 *t)$$

Ajuste que reporta el programa en la figura 32, con residuales de la figura 33

⁸ Variable no manipulada para éste ensayo

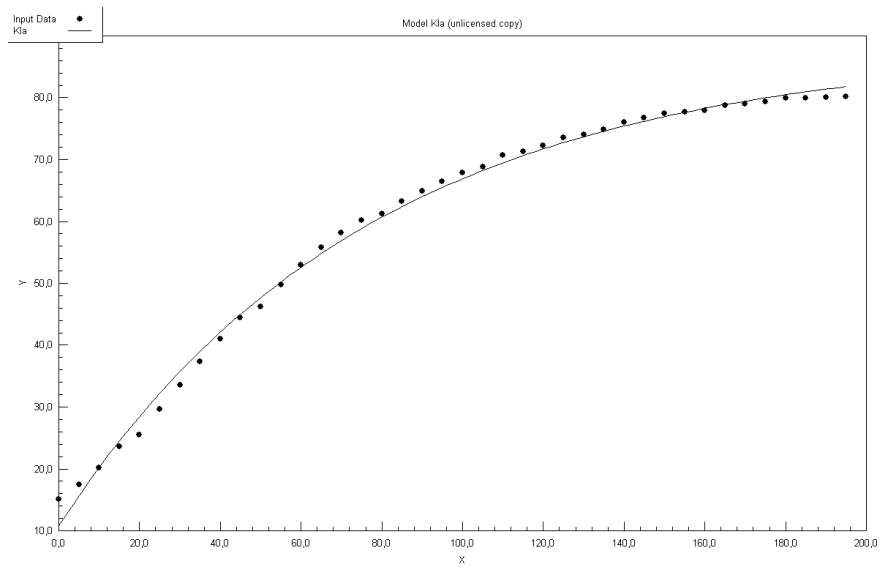


Figura 32. Regresión en la determinación del k_La por la técnica dinámica en la zona de reaireación FR(Re/m) 0,87; FA(v.v.m.) 0,65, Agitación (r.p.m.): 154, Temperatura (°C): 30

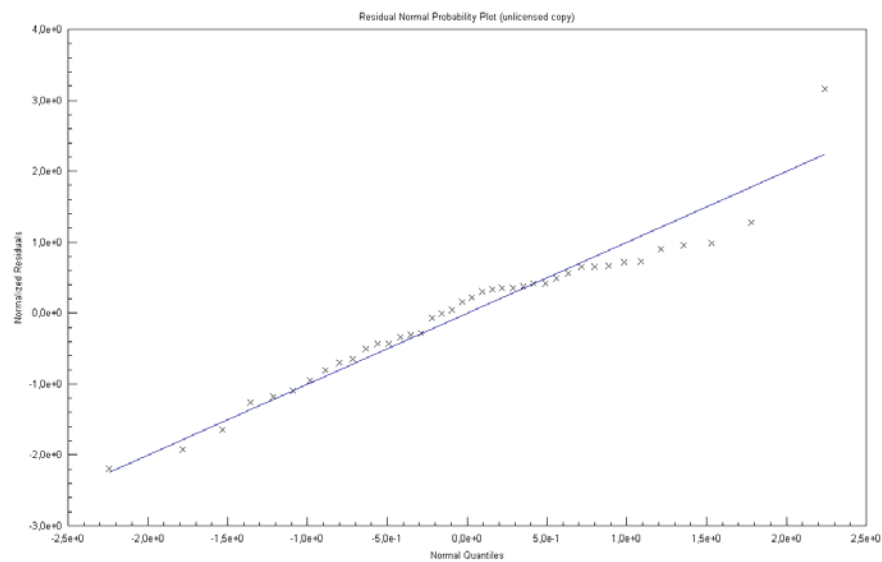


Figura 33. Normalización en la determinación del k_La por la técnica dinámica en la zona de reaireación FR(Re/m) 0,87; FA(v.v.m.) 0,65, agitación (r.p.m.): 154, temperatura (°C): 30

En la figura 34.se muestra la curva obtenida y las correspondientes regresiones.

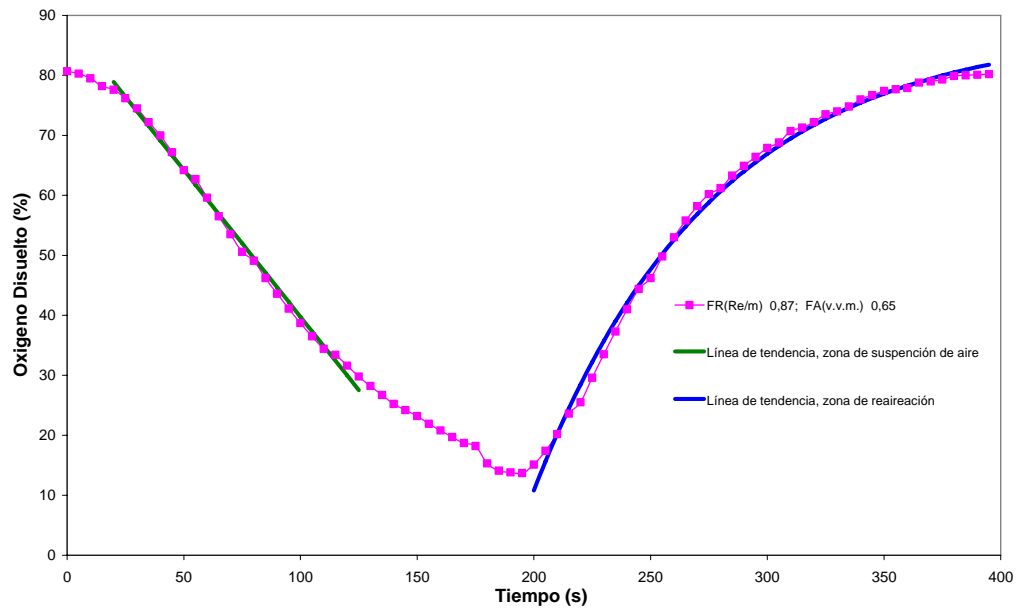


Figura 34 Regresión en la determinación del k_{LA} por la técnica dinámica $FR(Re/m)$ 0,87; $FA(v.v.m.)$ 0,65, agitación (r.p.m.): 154, temperatura (°C): 30

Muestra de cálculo en la determinación de la actividad enzimática

Actividad hidrolítica

Se calcula punto a punto dentro del ensayo de actividad enzimática anexo 1 protocolo 3- la diferencia entre la concentración de azúcares reductores determinada por el método colorimétrico DNS, -anexo1 protocolo 1 - y la concentración de glucosa determinada por el método enzimático Kit GOD-POD – anexo1 protocolo 2- expresándolos en mg/ml teniendo en cuenta la dilución que según el protocolo es de 1:22 en el DNS y de 1:44 en el KIT, lo que cuantifica la fructosa obtenida en la hidrólisis. Se determina la actividad hidrolítica como la pendiente de la curva de la diferencia mencionada versus tiempo en el inicio de la reacción enzimática

Actividad de transferencia

Inicialmente se determinó la diferencia de la fructosa proveniente de la hidrólisis y la glucosa libre obtenida por el método enzimático (Kit GOD-POD) para determinar la glucosa transferida. La fructosa de hidrólisis (Fh) es equivalente a la glucosa total (Gl + Gt). Finalmente se determinó la actividad de transferencia como la pendiente entre la diferencia mencionada y el tiempo de la velocidad inicial de reacción enzimática (0 - 50min.).

Donde: $DNS = Fh + Gl$

$KIT = Gl$

Fh = fructosa proveniente de la reacción de hidrólisis

Gt = glucosa transferida

Gl = glucosa libre

Tiempo (min)	DNS ^a mg/ml	KIT ^b mg/ml	DNS- KIT mg/ml	DNS- 2KIT mg/ml
0	11,27	2,87	8,4	5,53
10	15,93	3,2	12,73	9,53
15	19,21	3,18	16,03	12,85
20	25,9	3,89	22,01	18,11
30	30,06	4,04	26,02	21,97
40	31,39	3,66	27,73	24,08
50	11,27	2,87	8,4	5,53

a: obtener las concentraciones según curva de calibración y dilución –Anexo 1 protocolo 1

b: obtener las concentraciones según curva de calibración y dilución –Anexo 1 protocolo 2

Obtener los gráficos de DNS-2KIT (Glucosa transferida) y DNS- KIT (fructosa libre) en mg/ml contra tiempo. Linealizar y hallar la pendiente.

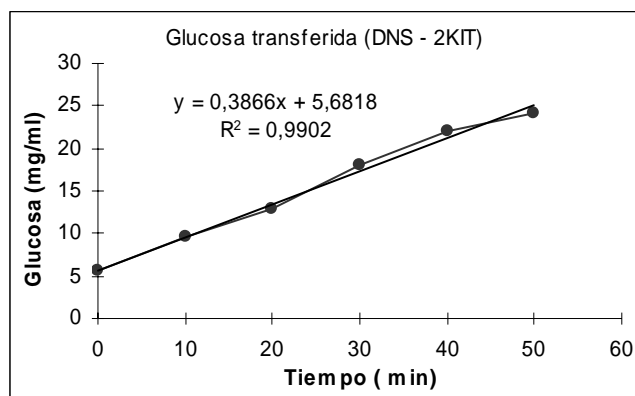


Figura 35. Determinación de la actividad glucosiltransferasa

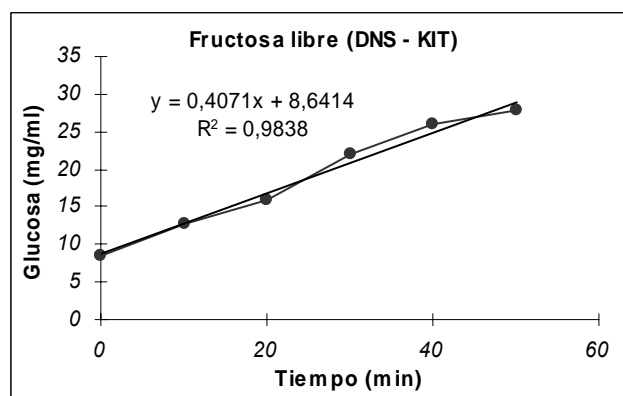


Figura 36. Determinación de la actividad hidrolítica.

Pendiente DNS - KIT..... **0,407** (mg/ml) / min.
 Pendiente DNS -2KIT..... **0,387** (mg/ml) / min.

Se realiza la conversión de mg a μmol de Glucosa y se establece la actividad enzimática como:

Actividad Glucosiltransferasa **4,30 U/mL**
Actividad Hidrolítica. **4,52 U/mL**

ANEXO 4

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS VARIABLES

Se planteó el modelo factorial no balanceado de efectos fijos, con dos factores:

FR (RPM): 0,45 0,87 1,30 1,73 (4 niveles)
FA (vvm): 0,65 1,00 (2 niveles)

y tres covariables

Agitación (rpm)
Presión (psi)
Temperatura (°C)

La tabla de análisis de varianza permite determinar qué efectos son estadísticamente significativos. En la tabla se muestra la fuente de variabilidad, los grados de libertad asociados, las sumas de cuadrados del error (Seq SS) y ajustada (Adj SS) y el error cuadrado medio ajustado (Adj MS). Con esta última se calculan las estadísticas F que sirven para determinar los valores p (última columna). Una variable tiene efecto estadísticamente significativo, al 10% de significancia, si su valor p es menor a 0,1. En la tabla se observa que las únicas variables que tienen efecto significativo sobre el KLA son agitación y FR.

Analysis of Variance for KLa(h-1), using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Agitación (rpm)	1	220,73	325,96	325,96	4,77	0,065
Presión (psi)	1	152,04	129,26	129,26	1,89	0,211
Temperatura (°C)	1	416,81	29,62	29,62	0,43	0,531
FR (RPM)	3	4369,60	4110,31	1370,10	20,04	0,001
FA (vvm)	1	90,28	90,28	90,28	1,32	0,288
Error	7	478,51	478,51	68,36		
Total	14	5727,97				

Algunas medidas que determinan que tan bueno es el ajuste del modelo a los datos son el R-cuadrado y el R-cuadrado ajustado. Estos valores indican el porcentaje de variabilidad de la variable respuesta explicado por el modelo propuesto. En este caso el R-cuadrado ajustado es de 83%, indicando que el modelo ajusta adecuadamente los datos:

R-Sq = 91,65% R-Sq(adj) = 83,29%

En la siguiente tabla se muestran las estimaciones de los valores medios que toma la variable KLA para cada uno de los niveles de los dos factores. Con esto se puede afirmar que los valores más recomendables son FR=1,73 y FA=1 ya que producen en promedio los mayores valores para KLA (83,37 y 55,7 respectivamente).

Least Squares Means for KLa(h-1)

FR (RPM)	Mean	SE Mean
0,45	27,91	3,354
0,87	45,50	5,279
1,30	53,01	6,141
1,73	83,37	6,069
FA (vvm)		
0,65	49,20	3,626
1,00	55,70	4,119

Para el factor significativo FR se realizan comparaciones entre sus valores dos a dos de los valores promedio que produce cada nivel. Por ejemplo, en la primera fila se comparan la media de KLA para FR=0,45 y para FR=0,87. El intervalo de confianza para la diferencia de estas medias (últimas dos columnas) muestra que no hay evidencia para decidir cuál de los niveles produce mayor KLA. La regla de decisión en este caso es:

- Si el intervalo contiene a cero no hay diferencia entre las dos medias. Ejemplo: FR(I)=0,45; FR(J)=0,87
- Si está por encima de cero entonces el valor de FR que está marcado con (I) produce mayor KLA que el marcado con (J). Ejemplo: FR(I)=0,87; FR(J)=1,30
- Si está por debajo de cero entonces el valor de FR que está marcado con (J) produce mayor KLA que el marcado con (I). Ejemplo: FR(I)=0,45; FR(J)=1,73

Comparaciones por pares

Variable dependiente: KLA

(I) FR	(J) FR	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación(a)	Intervalo de confianza al 95 % para diferencia(a)	
					Límite inferior	Límite superior
,45	,87	-17,594	6,572	,190	-41,489	6,300
	1,30	-25,097	7,303	,065	-51,649	1,454
	1,73	-55,463(*)	7,193	,001	-81,616	-29,311
,87	,45	17,594	6,572	,190	-6,300	41,489
	1,30	-7,503	7,895	1,000	-36,207	21,200
	1,73	-37,869(*)	7,931	,012	-66,705	-9,033
1,30	,45	25,097	7,303	,065	-1,454	51,649
	,87	7,503	7,895	1,000	-21,200	36,207
	1,73	-30,366(*)	8,279	,048	-60,468	-,264
1,73	,45	55,463(*)	7,193	,001	29,311	81,616
	,87	37,869(*)	7,931	,012	9,033	66,705
	1,30	30,366(*)	8,279	,048	-,264	60,468

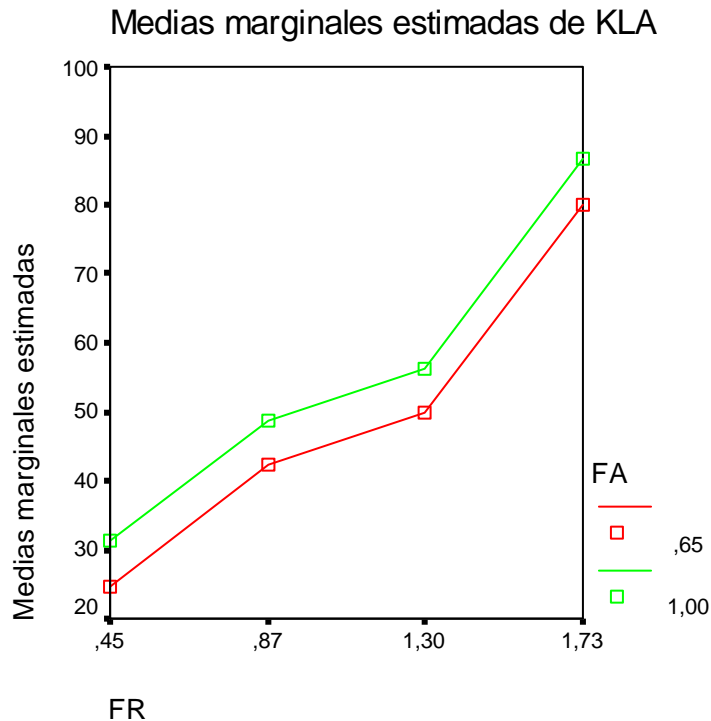
Basadas en las medias marginales estimadas.

* La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

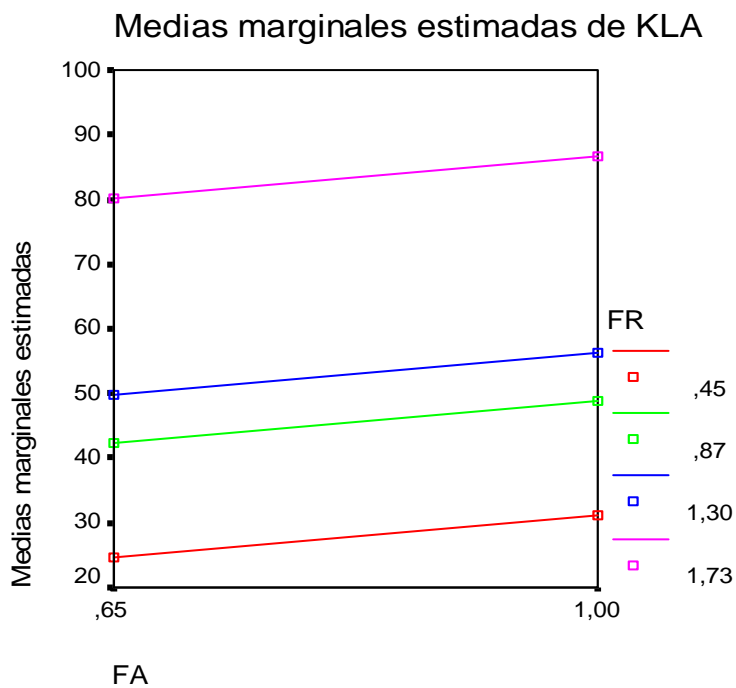
a Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

Las gráficas también muestran que :

- a distintos valores de FR, el FA=1 produce mayores valores de KLA



- a distintos valores de FA, el FR=1,73 produce mayores valores de KLA. Sin embargo, en este caso las medias estimadas no tienen un cambio notorio en los dos valores de FA que se midieron.



FACULTAD DE INGENIERÍA
 Departamento de Ingeniería Química
 Viernes 27 de marzo de 2009



ANEXO 5. AVANCE PRÁCTICA DE EXTENSIÓN – PASANTÍA PREGRADO INGENIERÍA QUÍMICA I-2009

Jormagn Israel Abril Murillo **Código: 243367**
Email: jabrilm@unal.edu.co **Teléfono: 316 858 85 51**
Modalidad: Prácticas de extensión – Pasantía

Director: Inq. Msc. Juan Guillermo Cadavid Estrada
Ingeniería Química y Ambiental
Codirector: Inq. Msc. Gustavo Buitrago Hurtado
Instituto de Biotecnología (IBUN)

Título del proyecto:

Aproximación al modelo del comportamiento de un aireador externo prototipo en la transferencia de oxígeno para la fermentación con *Lactococcus lactis*.

Objetivo General

Estudiar el comportamiento de un aireador externo prototipo en la transferencia de oxígeno para la fermentación de un complejo enzimático con *Lactococcus lactis*.

Objetivos Específicos

- Contribuir a la caracterización de un sistema de aireador externo para la fermentación con *Lactococcus lactis*.
- Proponer modelos matemáticos y/o estadísticos del sistema de aireador externo que correlacionen la concentración de oxígeno en el bioreactor con las variables de operación del aireador, como: presión total, flujo de medio de cultivo, flujo de aire y agitación.
- Comparación de las ecuaciones propuestas con valores experimentales.

Resumen de avances y resultados

Esta fase del proyecto incluye el desarrollo de un método para abordar el gran número de variables que presenta este complejo sistema de aireación, con el fin de encontrar una ecuación que pueda ser ajustada en sus parámetros, a partir del tratamiento de los datos encontrados experimentalmente el año pasado.

Metodología

Análisis de las variables que intervienen en el sistema

Análisis de las variables que intervienen en el sistema

Para entender cómo se comporta el fenómeno de aireación en este sistema se deben enumerar 3 tipos de variables: variables operacionales, propiedades de los fluidos y dimensiones geométricas.

Variables de Operación del sistema

Se cuentan, la presión (P), el flujo de recirculación de líquido (F_R), flujo de aireación (F_A), potencia suministrada por el agitador (W); y eventualmente la temperatura (T) pero esta variable se considera en las propiedades de los fluidos, así que no se tendrá en cuenta en ningún desarrollo.

Propiedades de los fluidos

Para el análisis del sistema sin fermentación vemos que, las propiedades para los dos fluidos, aire y agua, son la densidad (ρ_L), la viscosidad (μ_L). Todas estas que se incluyen en el análisis se toman a la P y T de cada ensayo, pero del aire solo se tomará la densidad (ρ_G), ya que la viscosidad del aire no afecta la transferencia del oxígeno en esta fase dado su pequeño valor. La difusividad (D_L) y la tensión superficial (σ) también deben ser reportadas para el agua.

En el caso del agua se puede tomar la viscosidad cinemática (ν_L) para así restar una variable menos al análisis.

Dimensiones geométricas

El sistema de aireación incluye dos operaciones individuales, el difusor prototipo de acero sinterizado y el tanque agitado. Los dos están conectados por mangueras sencillas y el flujo es generado por una bomba peristáltica (Ver figura 3). El tiempo de residencia necesario para llevar a cabo la aireación en cada operación depende del volumen que debe ocupar la mezcla y la retención del aire como burbujas en el líquido depende de la forma como este volumen está distribuido, la geometría.

Para el difusor tenemos dos tubos concéntricos de diámetros, externo (D_E) e interno (D_I) de una longitud definida (L_P), (ver figura 1). Una relación sencilla para el difusor que reduce el número de variables de 3 a 1 se propone como:

$$N_p = \frac{D_E - D_I}{L_p} \quad (1)$$

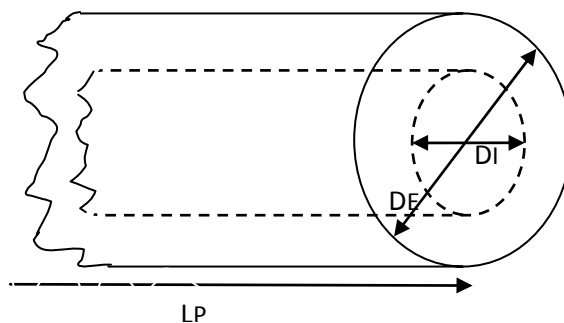


Figura 1 Geometría del prototipo

Esta relación será un modulo adimensional como más adelante se explica. Para el tanque agitado se propone una ecuación similar a la ec. (1), en la cual se reducen 3 variables geométricas a 1 sola relación adimensional que reúne la influencia del diámetro del tanque (D_T), el diámetro del agitador (D_A) y la distancia del fondo del tanque al agitador (z).

$$N_T = \frac{D_T - D_A}{z} \quad (2)$$

Pero debido a que la influencia del agitador esta reportada en la potencia suministrada se puede omitir esta variable quedando la ecuación (2) como:

$$N_T = \frac{D_T}{z} \quad (2)$$

Adicionalmente tenemos como variable para el tanque la altura de la columna de líquido (h_L) que condiciona la presión en el punto de descarga de la mezcla enriquecida proveniente del difusor (ver figuras 2 y 3).

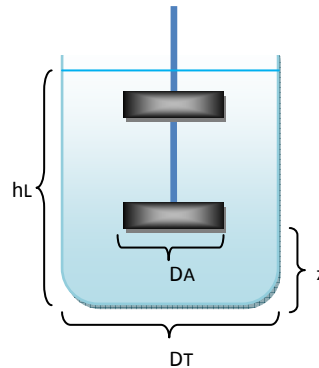


Figura 1 Geometría del tanque

Análisis Dimensional y Teorema II de Buckingham

Marco teórico

El teorema pi se resume como sigue: Si se tiene un problema cualquiera que reúne un total de k variables homogéneas dimensionales o adimensionales (ver referencia 1) incluyendo la variable dependiente $k=1$.

$$U_1 = f(U_2, U_3, \dots, U_r) \quad (3)$$

Este problema puede ser expresado en una función con $k-r$ variables adimensionales, producto de una combinación de r variables del problema¹ con las demás $k-r$ variables restantes.

$$\Pi_1 = \Phi(\Pi_2, \Pi_3, \dots, \Pi_{k-r}) \quad (4)$$

¹ Variables que llamaremos repetidas, tal que cada una sea dimensionalmente independiente, o sea cada una posee una dimensión básica que no existe en todas las demás.

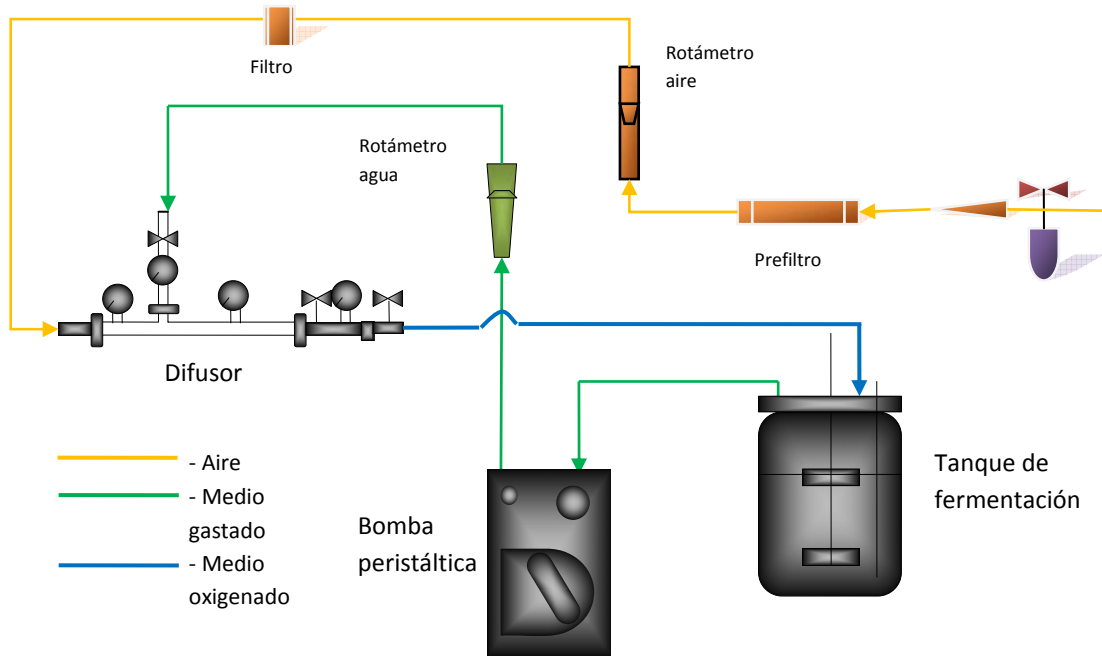


Figura 1 Diagrama del sistema

Para formar cada término se multiplica la dimensión de cada variable U_m con todas las r dimensiones de las variables repetidas escogidas, tal que:

$$[U_1]^{a_1} [U_2]^{a_2} \dots [U_r]^{a_r} [U_m] = M^0 L^0 t^0 \theta^0 \quad (5)$$

Al final se resuelve algebraicamente para cada coeficiente.

Análisis del sistema de estudio por el método de los números de Buckingham.

El problema de calcular el coeficiente de transferencia de oxígeno en este sistema es la elevada cantidad de variables que posee. Dada la dificultad de poder medir todos los parámetros que afectan al $K_L a$ en el sistema compuesto por dos operaciones independientes fue necesario realizar el análisis a todo el sistema en su conjunto. En este sentido el problema posee la siguiente dependencia.

$$K_L a = f(P, F_R, F_A, W, T, [\rho_L, \mu_L, \sigma, D_L], [\rho_G, \mu_G], [D_F, D_L, L_F], [D_T, D_A, z, h, D] \quad (6)$$

Cada grupo de variables mencionado se reúne entre corchetes, estas son de izquierda a derecha: *la variable dependiente, variables de operación del sistema, propiedades del líquido, propiedades del gas, geometría del prototipo y geometría del tanque.*

Donde:

K_{La} : Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en la fase líquida. [t^{-1}]

P : Presión manométrica en el difusor. [$ML^{-1}t^{-2}$]

F_R : Flujo másico de recirculación de líquido. [Mt^{-1}]

F_A : Flujo másico de aire. [Mt^{-1}]

W : Potencia suministrada por el agitador. [ML^2t^{-3}]

T : Temperatura en el tanque. [θ]

ρ_L : Densidad del líquido. [ML^{-3}]

μ_L : Viscosidad del líquido. [$ML^{-1}t^{-1}$]

σ : Tensión superficial. [Mt^{-2}]

D_L : Difusividad del oxígeno en la fase líquida. [L^2t^{-1}]

ρ_G : Densidad del gas. [ML^{-3}]

μ_G : Viscosidad del gas. [$ML^{-1}t^{-1}$]

D_E : Diámetro externo de la cámara de difusión. [L]

D_i : Diámetro interno de la cámara de difusión. [L]

L_p : Longitud del prototipo. [L]

D_T : Diámetro del tanque. [L]

D_A : Diámetro del agitador. [L]

z : Altura del fondo del tanque al agitador. [L]

h_L : Altura de la columna de líquido en el tanque. [L]

Con el ánimo de reducir el número de variables, consideremos lo siguiente:

- ✓ La Temperatura afecta directamente las propiedades de los dos fluidos, por lo solo se tendrá en cuenta su influencia en estas variables.
- ✓ La viscosidad del gas es despreciable por lo que no afecta la velocidad de transferencia en la fase gaseosa.
- ✓ Si permitimos que la influencia del agitador se presente solo en la variable W (potencia del agitador) generalizamos el problema para cualquier agitador que pueda producir dicho valor de potencia.
- ✓ Al tener en cuenta las relaciones dadas en las ecuaciones (1) y (2), reducimos las variables geométricas a tres.

El problema disminuye entonces el número de variables de 19 a 13, así.

$$K_{La} = f(P, F_R, F_A, W) [\rho_L, \mu_L, \sigma, D_L] [\rho_G] [N_p] [N_T, h_L] \quad (7)$$

Al utilizar el teorema tenemos que existen $r=3$ dimensiones básicas (M, L y t) entre las variables, así

que deben existir $13-3= 10$ términos Π adimensionales. Para encontrar cada término adimensional se

escoge un grupo de 3 variables tal que sean adimensionalmente independientes. De esta manera se realizó el ejercicio de tomar varias combinaciones de estas variables repetidas para obtener varios paquetes de números adimensionales y así escoger el paquete más conveniente posible.

La combinación de variables repetidas escogida será $([h_L], [\sigma], [D_L])$. Para la primera variable $K_L a$ tenemos según la ecuación (5).

$$\begin{aligned} [K_L a] [h_L]^a [\sigma]^b [D_L]^c &= M^0 L^0 t^0 \\ [t^{-1}] [L]^a [M t^{-2}]^b [L^2 t^{-1}]^c &= M^0 L^0 t^0 \\ M^b L^{a+2c} t^{-1-2b-c} &= M^0 L^0 t^0 \\ b &= 0 \\ a + 2c &= 0 \therefore a = -2(-1) = 2 \\ -1 - c &= 0 \therefore c = -1 \end{aligned}$$

Por lo que obtenemos el primer término Π_1 para la variable dependiente $K_L a$:

$$\Pi_1 = \frac{K_L a h_L^2}{D_L} = Sh \quad (8)$$

El cual sería análogo al número de Sherwood para el coeficiente de transferencia de oxígeno con la

altura de líquido como longitud característica. El resto de los términos Π_2 se hayan de igual manera.

Así la nueva expresión encontrada será:

$$\frac{K_L a h_L^2}{D_L} = A \left(\frac{\rho h_L}{\sigma} \right)^B \left(\frac{F_R D_L}{h_L^2 \sigma} \right)^C \left(\frac{F_A D_L}{h_L^2 \sigma} \right)^D \left(\frac{W}{\sigma D_L} \right)^E \left(\frac{\rho_L D_L^2}{h_L \sigma} \right)^F \left(\frac{h_L D_L}{h_L \sigma} \right)^G \left(\frac{\rho_G D_L^2}{h_L \sigma} \right)^H N_F^I N_T^J \quad (9)$$

Además podemos reducir un parámetro si utilizamos la diferencia de densidades entre las fases en el análisis dimensional.

$$\frac{K_L a h_L^3}{D_L} = A \left(\frac{P h_L}{\sigma} \right)^B \left(\frac{F_R D_L}{h_L^2 \sigma} \right)^C \left(\frac{F_A D_L}{h_L^2 \sigma} \right)^D \left(\frac{W}{\sigma D_L} \right)^E \left(\frac{[(\rho_L - \rho_G) D_L^3]}{h_L \sigma} \right)^F \left(\frac{\mu_L D_L}{h_L \sigma} \right)^G N_P^H N_T^I \quad (10)$$

Otra forma de reducir el número de variables es utilizar la viscosidad cinemática del líquido (ν_L) y no la diferencia de densidades, así.

$$K_L a = f([P, F_R, F_A, W], [\nu_L, \sigma, D_L], [\rho_G], [N_P], [N_T, h_L]) \quad (11)$$

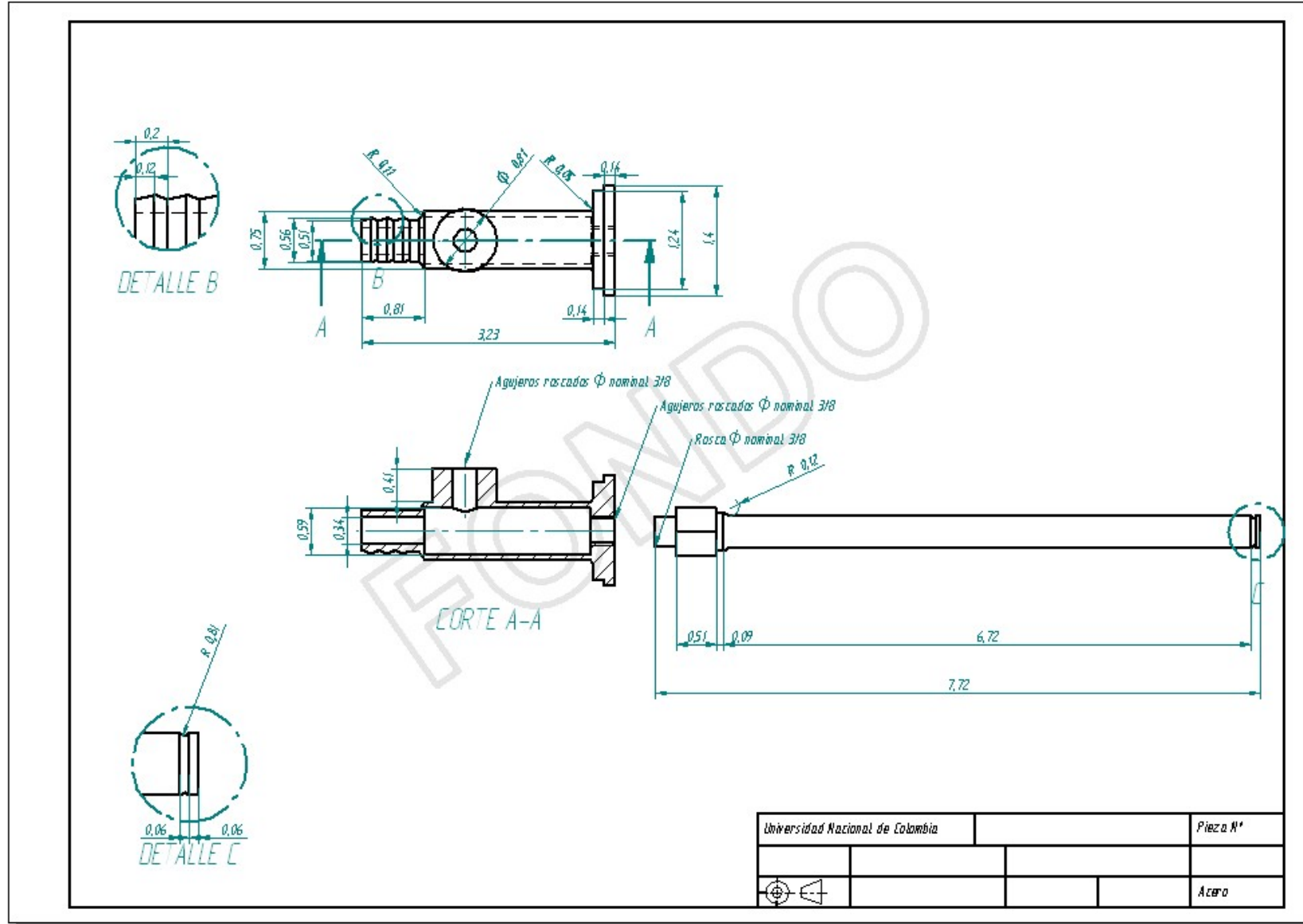
Así obtenemos un total de 9 términos adimensionales.

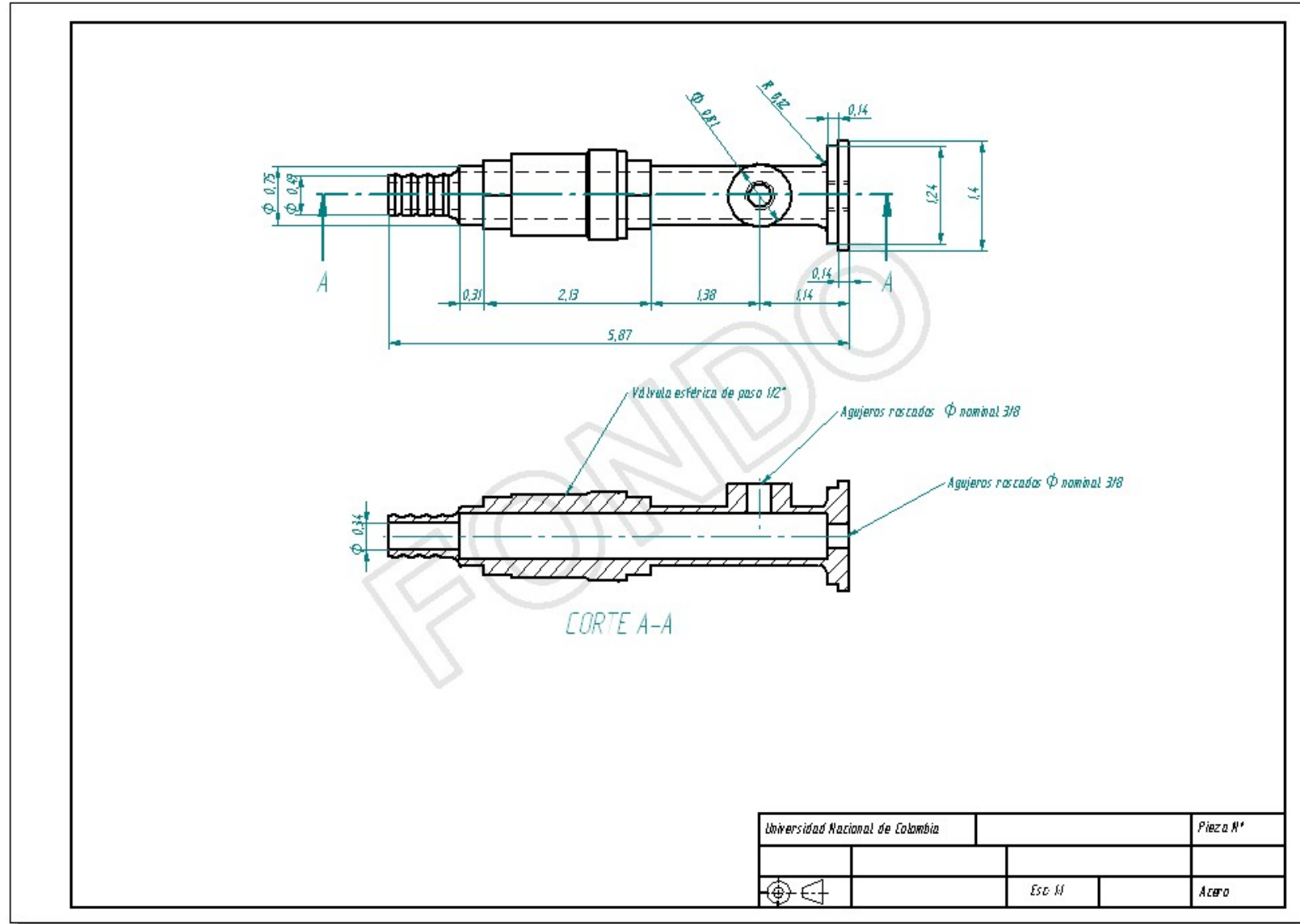
$$\frac{K_L a h_L^3}{D_L} = A \left(\frac{P h_L}{\sigma} \right)^B \left(\frac{F_R D_L}{h_L^2 \sigma} \right)^C \left(\frac{F_A D_L}{h_L^2 \sigma} \right)^D \left(\frac{W}{\sigma D_L} \right)^E \left(\frac{\nu_L}{D_L} \right)^F \left(\frac{\rho_G D_L^3}{h_L \sigma} \right)^G N_P^H N_T^I \quad (12)$$

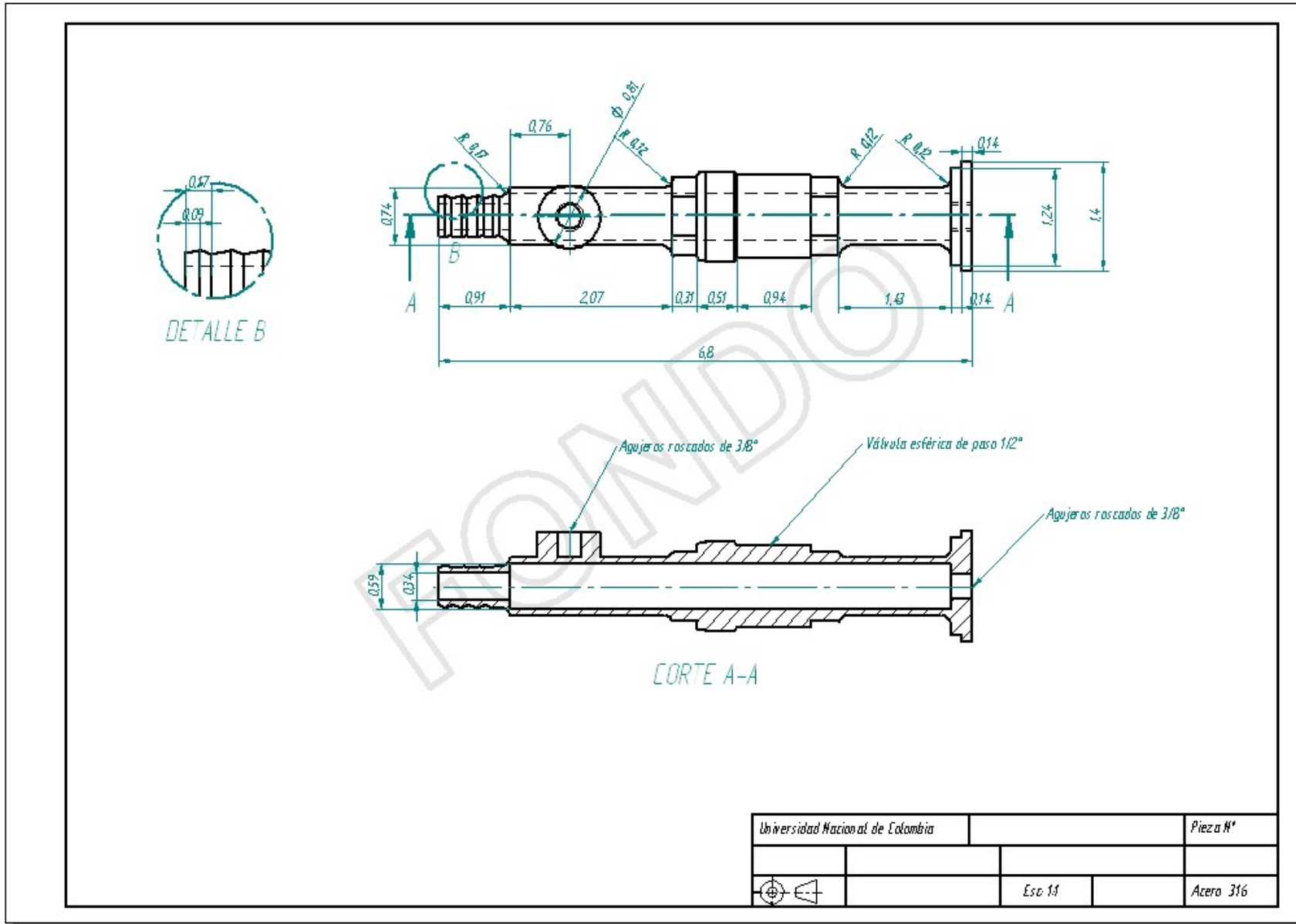
Las ecuaciones (10) y (12) pueden ser utilizadas para tratar de correlacionar los datos experimentales y así encontrar mediante una regresión no lineal los parámetros A, B, C, etc.

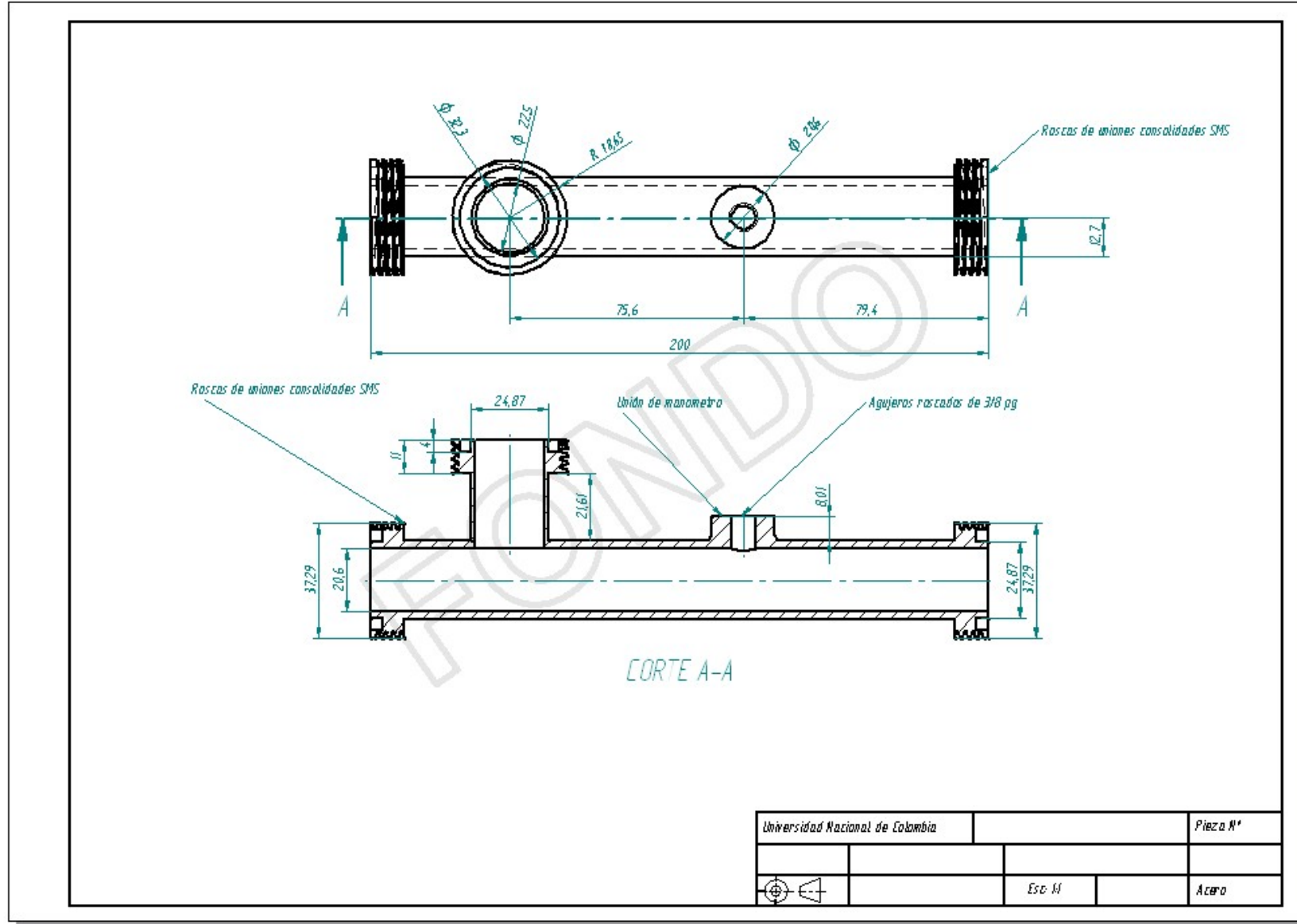
Referencias

- [1] Bruce R. Munson, Donald F. Young, Young Donald F Hugo Villagómez Velásquez, Theodore H. Okiishi, Okiishi Theodore H. Traducido por Hugo Villagómez Velásquez. FUNDAMENTOS DE MECÁNICA DE FLUIDOS, Capítulo: *Análisis Dimensional*. Limusa, 1999.
- [2] W.D. DECKWER, A. SCHUMPE: Improved Tools for bubble column reactor design and scale-up. Biochemical engineering div. GBF – Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, W-3300 Braunschweig, Germany. Chemical Engineering science, Vol 48. No 5, pp. 889-911. 1993.
- [3] <http://www.acienciasgalilei.com/fis/tablas/tabf-fis.htm>: Análisis dimensional. Unidades
- [4] White F.M. MECÁNICA DE FLUIDOS. McGrawHill.1979. pag 303.
- [5] Universidad de Oviedo. Escuela Superior de Ingeniería de Gijón: Ing. Industrial. APUNTES DEL CURSO MECÁNICA DE FLUIDOS. Tema 3: Análisis Dimensional. 2004
- [6] McCabe. OPERACIONES UNITARIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA. Circulación, Velocidades y consumo de potencia en tanques agitados. pg. 252. McGraw-Hill. 4ª Ed.









ANEXO 7 EQUIPOS



FERMENTADOR BIOLAB
F



DISPOSITIVO DE AIREACION EXTERNO



CONFIGURACION DEL SISTEMA
F



**MEDIDOR DE FLUJO DEL TIPO
DESPLAZAMIENTO**



BOMBAS PERISTALTICAS



EQUIPOS PARA DETERMINACION ACTIVIDAD ENZIMATICA



BIOPOLIMERO



MODULOS DE MEDICION Y CONTROL