

Estudio de las condiciones hidrodinámicas y de aireación para el escalamiento de la fermentación de ácido láctico a partir del glicerol crudo

Johana Andrea Álvarez Tasco, Michael Ernesto Moreno Caballero

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico

Director

Luis Javier López Giraldo

Ph.D Química, Bioquímica y Ciencia de Alimentos

Codirector

Laura Johana Castellanos Suárez

Ing. Químico

Escuela de Ingeniería Química

Facultad de Ingenieras Físicoquímicas

Universidad Industrial de Santander

Bucaramanga

2020

Agradecimientos

Quiero agradecerle a Dios y la vida por haberme guiado, acompañado y cuidado, trayendo a mi vida personas maravillosas.

A mis padres, Olga Tasco Meza y Jose Lorenzo Álvarez, por brindarme su cariño y su apoyo, de manera especial a la reina de mi vida mi madre por su amor incondicional y su confianza en mí.

A mi familia, quienes me apoyaron y creyeron en mis pasos.

A la Universidad Industrial de Santander por permitirme desarrollar mis estudios en su institución, en la cual pude crecer y aprender en todos los ámbitos de mi vida.

A nuestro director, Luis Javier López Giraldo, por habernos direccionado y guiado, así como a los miembros del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por brindarnos todo su apoyo y conocimiento en la ejecución de este proyecto.

A nuestra codirectora, amiga y mentora, Laura Johana Castellanos Suarez, por todo su amor, dedicación y dirección en el desarrollo de este proyecto, así como a nuestro casi codirector Johnny por enseñarnos y hacernos reír.

A mi compañero, Michael Ernesto Moreno Caballero, por haber trabajado conmigo en la consecución de este trabajo y haber tenido paciencia con mis terquedades y chocheras.

A mis amigas, Hellensita, Ingrid y Pauliña, y a todas las personas que ocupan un pedacito de mi corazón, gracias por su cariño y amor, por cuidarme y aconsejarme en su momento y compartir conmigo en mis locuras.

Y a ti que estas leyendo todo mi tremotete gracias...

JOHANA ANDREA ALVAREZ TASCO

Agradecimientos

Agradezco primero a Dios por poder culminar esta etapa de mi vida a pesar de todas las dificultades que se presentaron en el camino.

A mi papá, Julio Moreno QEPD, por ser un buen padre y apoyarme hasta el último momento con mi sueño de ser Ingeniero.

A mi mamá, Nancy Caballero, por estar siempre a mi lado aconsejándome, dándome ánimos en las dificultades, por todas las tasas de café en la noches de estudio y por siempre creer en mí.

A mi hermano Brayan Moreno, que siempre me ha enseñado a salir adelante y luchar por mis sueños. Gracias por ser mi ejemplo para seguir, el mejor hermano y por estar en todos los momentos importantes de mi vida.

A mis tías y abuelas, por estar pendientes de mí y apoyarme para cumplir mis metas. Gracias por todos sus concejos y cariño brindados.

A mis tíos Julio y Enrique, por acompañarme en todo momento, por sus consejos y por creer en mí.

A la universidad por brindarme los espacios necesarios para mi desarrollo personal y profesional.

A mis compañeros del laboratorio CICTA por compartir sus conocimientos y guiarnos en el desarrollo del proyecto cuando lo necesitábamos.

A nuestro director, Luis Javier López Giraldo, por guiarnos durante el desarrollo del proyecto y asesorarnos en los momentos claves. Gracias por sus consejos y brindarnos su experiencia

A nuestra codirectora y amiga, Laura Johana Castellanos Suarez, muchas gracias por todos los consejos, por su apoyo en el desarrollo del proyecto, por motivarnos a siempre dar lo mejor de nosotros y mostrarnos que todas las dificultades pueden ser superadas con un poco de paciencia y esfuerzo. También a nuestro amigo y casi codirector Jhonny por la paciencia que nos tuvo en los inicios en el laboratorio y por compartirnos todo su conocimiento.

A mi compañera, Andrea Álvarez, por ser una excelente compañera y amiga, Gracias por todos los momentos compartidos, por las onces saludables y las aromáticas y especialmente por motivarme a entregar más de lo que se espera en todos los trabajos realizados.

A mis amigas, Lissibeth, Tatiana, Alejandra, Paula, Diana y Hellen por compartir conmigo y aconsejarme durante estos años. A mi amigo David por toda los consejos y ayuda.

MICHAEL ERNESTO MORENO CABALLERO

Resumen

Título: Estudio de las condiciones hidrodinámicas y de aireación para el escalamiento de la fermentación de ácido láctico a partir del glicerol crudo *

Autores: Johana Andrea Álvarez Tasco, Michael Ernesto Moreno Caballero **

Palabras clave: Glicerol crudo, Ácido Láctico, simulación CFD, *Lactobacillus Rhamnosus*, fermentación, productividad, reología, aireación.

Descripción:

El ácido láctico (AL) es un compuesto versátil con distintas aplicaciones en la industria, que se puede obtener por distintos métodos, donde la síntesis por vía fermentativa es una de las más atractivas porque puede ser empleada a nivel industrial. Sin embargo, presenta retos importantes respecto a su escalamiento, debido a que en el cambio de escala surgen problemas asociados con la transferencia de masa y energía, que ocasionan una distribución no homogénea de los nutrientes y generan el distanciamiento de las condiciones óptimas encontradas a escala laboratorio, siendo común que se reduzca la productividad del proceso. Por lo tanto, en este trabajo se estudiaron las condiciones de agitación (190, 167 y 210 rpm) cuando existen cambios de escala en el volumen de fermentación (500, 2500 y 5000 mL), y aireación (25 mL) que favorecen el proceso fermentativo y la productividad de AL empleando la bacteria *Lactobacillus Rhamnosus* ATCC 7469 y glicerol crudo (GC) como fuente de carbono, utilizando parámetros reológicos e hidrodinámicos, analizando la dinámica computacional del fluido CFD y la productividad global de ácido láctico respectivamente.

Durante el desarrollo experimental se observó que las mejores productividades de AL se obtuvieron cuando el proceso se realizó en condiciones aerobias, usando el oxígeno residual presente en los viales de fermentación, obteniendo valores de $0,0516 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ en un volumen de fermentación de 25 mL.

Por último, la simulación de los biorreactores utilizando los parámetros adimensionales de número de Reynolds (500 mL), velocidad de punta de impulsor (2,5 L) y consumo de energía por volumen de fermentación (5 L) permitió concluir que las velocidades de agitación que favorecieron el proceso fermentativo fueron 190, 167 y 210 rpm respectivamente.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Luis Javier López Giraldo. Ingeniero Químico, PhD. Codirector: Laura Johana Castellanos Suárez. Químico, Ing.

Abstract

Title: Study of hydrodynamic and aeration conditions for scaling of acid lactic fermentation from crude glycerol*

Autors: Johana Andrea Tasco, Michael Ernesto Moreno Caballero**

Key words: Crude Glycerol, Lactic Acid, CFD simulation, *Lactobacillus Rhamnosus*, fermentation, productivity, reology, aeration.

Description

Lactic acid (LA) is a versatile compound with different applications in the industry, it can be obtained from different methods, fermentative synthesis is one of the most attractive because it can be used at the industrial level. However, it presents important challenges regarding its scaling, because in the scale change important problems associated with mass and energy transfer occur, causing a non-homogeneous distribution of the nutrients and generating different conditions from the optimal conditions found at the laboratory scale, reducing the process productivity. Therefore, in this work agitation conditions (190, 167 and 210 rpm) were studied when existing fermentation volume (500, 2500 and 5000 mL) scale changes and aeration (25 mL) that favor the fermentative process and productivity of AL using *Lactobacillus Rhamnosus* ATCC 7469 and crude glycerol (CG) as carbon source, using rheological and hydrodynamics parameters, analyzing the computational fluid dynamics (CFD) and the global productivity of lactic acid respectively.

During experimental development it was observed that best AL productivities were obtained when the process was done in aerobic conditions, using residual oxygen present in the fermentation vials, obtaining values of $0,0516 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ in a fermentation volume of 25 mL.

By last, the bioreactors simulation using dimensionless parameters of Reynolds number (500 mL), impeller tip speed (2,5 L), and energy consumption per fermentation volume (5 L) it allowed conclude that agitation speeds that favored the fermentative process were 190, 167, and 210 rpm respectively.

* Graduation Project

** Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Luis Javier López Giraldo. Chemical Engineer, PhD. Co-director: Laura Johana Castellanos Suárez. Chemist, Eng.

Tabla de contenido

	pág.
Introducción.....	11
1. Objetivos.....	14
1.1 Objetivo general.....	14
1.2 Objetivos específicos.....	14
2. Cuerpo del trabajo.....	15
2.1 Marco teórico y estado del arte.....	15
2.2 Metodología.....	22
2.2.1 Análisis de las condiciones de oxígeno que favorecen la producción de ácido láctico	23
2.2.2 Escalamiento.....	23
2.2.3 Análisis de los parámetros reológicos e hidrodinámicos.....	24
2.2.4 Análisis de CFD.....	24
2.3 Resultados.....	25
2.3.1 Análisis de condiciones de oxígeno que favorecen la producción de AL.....	25
2.3.2 Escalamiento.....	30
2.3.3 Análisis de comportamiento reológico e hidrodinámico.....	31
2.3.4 Análisis CFD.....	35
2.3.5 Estrategias de mejoramiento perfiles de velocidad en escalas de laboratorio....	40
3. Conclusiones.....	43
4. Recomendaciones.....	45
Referencias bibliográficas.....	46

Lista de tablas

	pág.
Tabla 1. Ecuaciones utilizadas en el escalamiento para la producción de AL.	20
Tabla 2. Productividades obtenidas de las pruebas para el análisis de las condiciones de aireación	25
Tabla 3. Resultados ANOVA Univariante Multifactorial Productividad de ácido láctico.....	27
Tabla 4. Test de Tukey para la productividad del ácido láctico.....	28
Tabla 5. Resultados ANOVA Multifactorial por Productividad biomasa y ácido láctico	29
Tabla 6. Resultados obtenidos del escalamiento matemático.	30
Tabla 7. Parámetros calculados para el escalamiento.....	31
Tabla 8. Parámetros reológicos e hidrodinámicos calculados	31
Tabla 9. Criterio de selección de propuesta de mejora para 5000 mL	41
Tabla 10. Comparación de los parámetros principales de los agitadores con volumen de 5000 mL	41
Tabla 11. Composición medio MRS.....	54
Tabla 12. Composición medio MRS-modificado	54
Tabla 13. Test de Levene's para homogeneidad de varianzas ANOVA unifactorial	55
Tabla 14. Valores observados, predecidos y residuales del ANOVA unifactorial	56
Tabla 15. ANOVA univariante unifactorial para evaluar el efecto significativo de los factores.....	57
Tabla 16. Test de Levene's para homogeneidad de varianzas ANOVA multifactorial	58
Tabla 17. Distribución normal PAL (izquierda), PX (derecha)	59
Tabla 18. Test multivariable de significancia.....	59
Tabla 19. Resultados de ANOVA multivariable multifactorial para cada variable dependiente.....	59
Tabla 20. Estimación del número de potencia, parámetro adimensional	60
Tabla 21. Mediciones y parámetros tomadas de los biorreactores	61
Tabla 22. Comprobación de las dimensiones reales con las teóricas.....	65
Tabla 23. Cálculo de configuración, inclusión de impeler, impeler equidistantes y altura fondo-impeler igual al diámetro del impeler	65
Tabla 24. Escalamiento utilizando tiempo de mezcla (tm) y consumo de potencia por volumen de fermentación (Po/V)	66
Tabla 25. Datos para la concentración de oxígeno	68

Lista de figuras

	pág.
Figura 1. <i>Rutas metabólicas por vía glucolítica de bacterias ácido-lácticas. Modificado de R. Hatti-Kaul, L. Chen, T. Dishisha, and H. El Enshasy (Hatti-Kaul et al., 2018).</i>	18
Figura 2. <i>Diagrama de flujo de la metodología utilizada en el trabajo de investigación.</i>	22
Figura 3. ANOVA Univariante Multifactorial Productividad.	28
Figura 4. Análisis multifactorial multivariable para cada variable dependiente.	29
Figura 5. Relación Tiempo de mezcla vs Volumen de fermentación	34
Figura 6. Modelos geométricos de los fermentadores de izquierda a derecha de los volúmenes de fermentación de 500, 2500 y 5000 mL con malla de tamaño normal.....	35
Figura 7. Biorreactores New Brunswick Bioflo 110 con vasos de volúmenes de 1,3, 4 y 7 L...	36
Figura 8. Perfil de velocidad para biorreactor con volumen de fermentación de 500 mL	37
Figura 9. Perfil de velocidad para biorreactor con volumen de fermentación de 2500 mL	38
Figura 10. Perfil de velocidad para biorreactor con volumen de fermentación de 5000 mL	39
Figura 11. Perfil de velocidad para biorreactor con volumen de fermentación de 5000 mL con la mejora implementada.	42
Figura 12. Histograma datos residuales ANOVA unifactorial	56
Figura 13. ANOVA univariante unifactorial para evaluar el efecto significativo de los factores	57
Figura 14. Dimensiones recomendadas del impeler Rushton.....	63
Figura 15. Relación de configuraciones de acuerdo con las dimensiones.....	64

Lista de apéndices

Apéndice A. Medio MRS (Agar de Man, Ragosa y Sharpe) y MRS-Modificado	54
Apéndice B. Análisis para la validación de ANOVA unifactorial	54
Apéndice C. Análisis para la validación de ANOVA multivariante multifactorial	58
Apéndice D. Estimación de número de potencia	60
Apéndice E. Mediciones y parámetros para tener en cuenta para el diseño de los Biorreactor New Brunswick Bioflo 110.....	61
Apéndice F. Propuestas para el mejoramiento del mezclado.....	63

Lista de símbolos

A_c = Área de sección transversal ó área disponible para intercambio de oxígeno, m^3

D_i = Diámetro del impulsor, m

D_{int} = Diámetro interno del vaso, m

d_f = Diámetro interior mayor del matraz agitado, m

d_o = Diámetro de agitación en el matraz, m

Fr = Número de Froude, adimensional.

N_p = Número de potencia para tanque agitado, adimensional.

N = Velocidad de rotación del impulsor, rpm

n = Frecuencia de agitación, rpm

Ph = Número de fase, adimensional.

Ph = Consumo de energía para el matraz agitado, W

Re_i = Número de Reynolds del impulsor, adimensional.

Re_f = Número de Reynolds para matraz agitado, adimensional.

V_L = Volumen de trabajo, m^3

v_{tip} = Velocidad de la punta del impulsor, ms^{-1}

ρ = Densidad del fluido, kgm^{-3}

η = Viscosidad dinámica del fluido, $kgm^{-1}s^{-1}$

ν = Viscosidad cinemática del fluido, m^2s^{-1}

ε = Tasa de disipación de energía por unidad de masa de fluido, Wkg^{-1}

γ = Tasa de cizallamiento, s^{-1}

τ = Tensión cortante, Nm^{-2}

k = Parametro adimensional propio del agitador

Introducción

El ácido láctico (AL) es un compuesto orgánico utilizado en la industria alimentaria como aditivo y conservante de productos cárnicos, lácteos, cereales, bebidas y en la producción de plásticos biodegradables (Fernández & Rendueles De La Vega, n.d.), (Okano et al., 2010). La síntesis de este compuesto puede darse por fermentación o síntesis química. Ésta última no es fácil de implementar debido a que los procesos no son viables ni técnica, ni económicamente. (John et al., 2007) En contraste, se han implementado bioprocesos que involucran la fermentación de distintos tipos de materia orgánica como fuente de carbono, entre los cuales se destaca el glicerol crudo (GC), el cual es el principal subproducto de la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales (Dobson et al., 2012). Así mismo, en el proceso de obtención del AL se emplean diferentes tipos de microorganismos (MO), como es el caso de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 que en estudios anteriores demostró sintetizar el metabolito de interés con conversiones de hasta 94,5% (Gamboa-Rueda et al., 2015).

La fermentación para obtención de AL a escala industrial presenta retos importantes con respecto a su escalamiento debido a que, durante el cambio de volumen de trabajo, surgen problemas asociados con la hidrodinámica de los biorreactores, como lo son la distribución no homogénea de los nutrientes, problemas asociados con transferencia de calor y masa, entre otros. Lo anterior, genera un distanciamiento de las condiciones óptimas encontradas a escala laboratorio lo que afecta de manera negativa la productividad del bioproceso (Bylund et al., 1998), (Hewitt et al., 2000). Un escalamiento exitoso depende de la selección correcta de parámetros de agitación y aireación efectivos de los fluidos presentes, propiciando la distribución uniforme de los nutrientes durante el proceso fermentativo (Gelves et al., 2013). Para cumplir este propósito, existen distintos

tipos de aproximaciones de escalamiento, los cuales dependen de las variables adimensionales que describen el comportamiento hidrodinámico (Marques et al., 2010).

Hiruta *et al.* (Hiruta et al., 1996) realizó un escalamiento de 30 L a 1 m³, para la producción de un lípido con alto contenido de ácido γ -linolénico, manteniendo constante la velocidad de la punta del impulsor, se logró aumentar 18.3% el valor de γ -ácido linolénico en los lípidos. Para el caso de Esra (Imamoglu & Sukan, 2013), se realizó el escalamiento de 100 mL a 10 L para la producción de bioetanol, empleando como criterio de escalamiento el número de Reynolds (Re) y la velocidad de la punta de impulsor, obteniendo una productividad volumétrica de 0,21 gL⁻¹h⁻¹, 88% mayor en el reactor de 10 L en comparación con el valor alcanzado en el reactor de 100 mL. Las metodologías empleadas en los estudios anteriores demuestran que los parámetros seleccionados son apropiados para la evaluación del escalamiento.

Por otro lado, el comportamiento hidrodinámico de los procesos fermentativos también es analizado por dinámica computacional de fluidos (CFD), la cual permite obtener aproximaciones del fluido cuando se modifican variables como el tipo de agitador (Buss et al., 2017), las condiciones de mezclado (Aballay et al., 2012), comparación entre equipos (Aslanbay Guler et al., 2019), entre otros. Este tipo de análisis también puede ser usado en procesos donde se realizan cambios de escala utilizando parámetros reológicos e hidrodinámicos como criterios de escalado (Rana, 2015), debido a que se pueden realizar aproximaciones previas de los equipos para determinar las mejores condiciones de diseño y operación sin generar costos adicionales.

En conclusión, en el presente trabajo se determinaron las mejores condiciones de agitación y aireación en diferentes volúmenes de fermentación para el bioproceso de síntesis de ácido láctico, utilizando variación de condiciones en el proceso fermentativo, seguimiento de metabolitos por

HPLC y dinámica computacional de fluidos, tomando como parámetros de escalamiento el número de Reynolds y la velocidad de la punta de impulsor.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Determinar las condiciones de aireación y agitación que favorecen la producción de ácido láctico utilizando como fuente de carbono glicerol para volúmenes de 25, 500, 2500 y 5000 mL

1.2 Objetivos específicos

- Analizar las condiciones de aireación que favorecen la producción de ácido láctico.
- Estudiar los parámetros reológicos e hidrodinámicos para el escalamiento matemático con el número de Reynolds y la velocidad de punta de impulsor
- Evaluar las condiciones de mezclado en diferentes volúmenes de fermentación empleando dinámica computacional de fluidos (CFD)

2. Cuerpo del trabajo

2.1 Marco teórico y estado del arte

La fermentación se define como el proceso en el que los microorganismos (MOs) producen metabolitos y/o biomasa, a partir de la asimilación de sustancias orgánicas utilizando enzimas producidas por los mismos, en ausencia o presencia de oxígeno (Hernandez, 2005). La producción fermentativa del AL ha ido en aumento en los últimos años, debido a sus múltiples aplicaciones industriales. Sin embargo, desde el punto de vista económico la fermentación a gran escala del AL se ha visto limitada debido a sus altos costos de producción, los cuales pueden ser reducidos mediante la utilización sustratos de bajo costo que, usualmente, se eligen por su disponibilidad geográfica y la mejora en la producción y productividad (Abdel-Rahman et al., 2013).

Dentro de las fuentes de carbono que se pueden emplear para la producción microbiana de AL, están los azúcares en forma pura como la glucosa, sacarosa, lactosa, etc. Estos se usan generalmente a nivel de laboratorio, pero son poco atractivos a escala industrial por sus altos costos (Karp et al., 2011), (Anuradha et al., 1999). Como alternativa, se han desarrollado investigaciones donde se utilizan desechos agroindustriales que contienen azúcar (melaza, bagazo de caña de azúcar, entre otros) (Abdel-Rahman et al., 2011), subproductos de la industria láctea (Young-Jung Wee, Hyang-Ok Kim, 2006), (Li et al., 2010) y GC (Mazumdar et al., 2010), (Hong et al., 2009).

Actualmente en Colombia se producen grandes cantidades de GC debido a que es un subproducto de la industria del biodiesel, y el uso de éste como biocombustible ha crecido de forma exponencial. En el año 2017 la producción de biodiesel en el país alcanzó las 540000 toneladas métricas (*Manuelita Estrategia de negocio y Bioenergía*, 2018), de las cuales se obtiene en promedio un 10% en peso de GC (Dobson et al., 2012), (Madigan & Clark, 2009). Además, para

el año 2020 se estima que su manufactura sea 6 veces mayor que la demanda en el mercado generando una sobreproducción del mismo, convirtiéndolo así en un sustrato atractivo, con alta disponibilidad y de bajo costo (Gamboa-Rueda et al., 2015), (Lizcano-Gonzalez, Victor Alexis, Escalante Hernández, Humberto, Quintero Silva, 2017).

Por otro lado, en la producción de AL los MOs más utilizados se clasifican en bacterias (ácido lácticas, *Bacillus*, Cepas *E.coli*), hongos, levaduras, microalgas y cianobacterias (Abdel-Rahman et al., 2013). Específicamente, en investigaciones anteriores se han reportado varios MOs capaces de convertir glicerol puro en AL, entre ellos se encuentran *Klebsiella Clostridium* y *Lactobacillus* (Biebl, 2001), (El-Ziney et al., 1998). Así mismo, en el empleo de GC como fuente de carbono, Kishimoto (Kazuda Kishimoto, 2008) desarrolló un método para producir AL usando *Achromobacter Denitrificans* NBRC 12669. Sin embargo, sólo $3,9 \text{ gL}^{-1}$ de AL fue producido a partir de $9,4 \text{ gL}^{-1}$ de GC. En otros resultados, Hong et al. (2009) y Mazumdar et al. (2010) emplearon distintas cepas modificadas de la bacteria *E.coli* y obtuvieron productividades de 0,94 y $0,44 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respectivamente (Mazumdar et al., 2010), (Hong et al., 2009).

Cabe destacar, que en estudios anteriores llevados a cabo por el grupo de investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos - CICTA, se comparó un consorcio conformado por *Lactobacillus Fermentum* y *Lactobacillus Paracasei* con una cepa de referencia *L. Rhamnosus* usando GC, obteniendo como resultado que la bacteria *Lactobacillus Rhamnosus* ATCC 7469, sintetizó el metabolito de interés con conversiones de hasta 94,5%. (Diaz Ruiz & Prada Palomo, 2012).

Dentro de los factores que afectan la eficiencia del proceso de fermentación de AL se encuentran la temperatura, pH, agentes neutralizantes y la concentración de los nutrientes como la

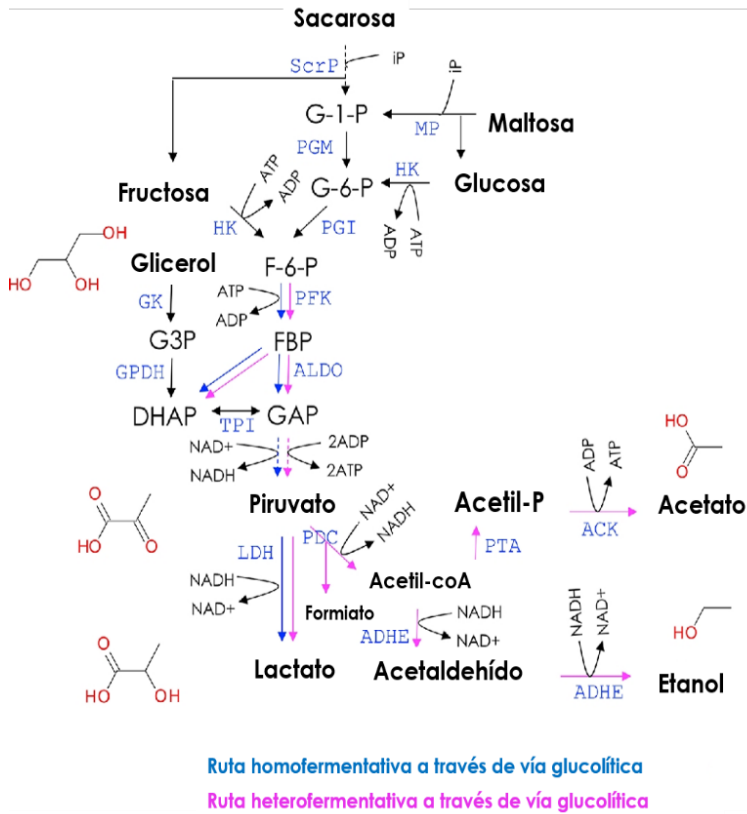
fuelle de nitrógeno, sustrato y oxígeno. (Abdel-Rahman et al., 2013), (Gaden, 1959). Según la literatura los MOs industriales manejan temperaturas óptimas de crecimiento y producción de metabolitos entre 20 y 40 °C (Prieto David & Rojas Leidy, 2011). En relación con el pH, las bacterias pueden crecer en intervalos de 4 a 8, teniendo como óptimo entre 6,5 y 7,5, en los cuales se genera un efecto positivo en las productividades volumétricas. Sin embargo, la disminución del mismo por aumento de AL no disociado, se considera como inhibidor del proceso de fermentación (Eş et al., 2018) . Por lo tanto, para atrapar el AL no disuelto durante el proceso de fermentación se adicionan agentes neutralizantes, tales como hidróxido de sodio, hidróxido calcio, hidróxido potasio, carbonato de calcio entre otros. Frente a este fenómeno, García Ochoa (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009) empleó hidróxido de potasio para mantener constante un pH de 7 y su concentración máxima fue de 106 gL⁻¹ y una productividad de 0,54 gL⁻¹h⁻¹ de AL. Finalmente, una concentración óptima de nutrientes garantiza una productividad alta, y asegura la energía suficiente para la síntesis de metabolitos, al igual que el mantenimiento celular (Hernandez, 2005). De esta manera, las condiciones de agitación y aireación guardan una estrecha influencia en los gradientes de temperatura y de concentración de oxígeno; así como la distribución homogénea de los nutrientes en los biorreactores que también aseguran el éxito del bioproceso (Pansuriya & Singhal, 2011).

Dependiendo del MO que se escoja dentro de un bioproceso y otros factores como la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, disponibilidad de oxígeno, entre otros, este puede tomar distintas rutas metabólicas obteniendo productos homo o hetero-fermentativos (Pansuriya & Singhal, 2011). La Figura 1 muestra las rutas metabólicas por vía glucolítica empleando como fuentes de carbono glucosa, maltosa, fructosa y el glicerol USP (puro) en las bacterias ácido-lácticas, las flechas azules indican las reacciones de fermentación homolácticas y las purpura las reacciones hetero-lácticas, mostrando los sustratos y productos principales y los productos intermedios

obtenidos por las distintas rutas (Hatti-Kaul et al., 2018).

Figura 1.

Rutas metabólicas por vía glucolítica de bacterias ácido-lácticas. Modificado de R. Hatti-Kaul, L. Chen, T. Dishisha, and H. El Enshasy (Hatti-Kaul et al., 2018).



Símbolo	Significado
ScrP	Sacarosa fosforilasa
MP	Maltosa fosforilasa
HK	Hexoquinasa
PGM	Fosfoglucomutasa
PGI	Isomerasa de fosfoglucosa
GK	Glicerol quinasa
PFK	Fosfofructoquinasa
GPDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
ALDO	Fructosa-bisfosfato aldolasa
TPI	Isomerasa de triosefosfato
LDH	Lactato deshidrogenasa
PDC	Complejo de piruvato deshidrogenasa
PTA	Fosfotransacetilasa
ADHE	Aldehído bifuncional y alcohol deshidrogenasa
ACK	Acetado quinasa
G-1-P	Glucosa-1-fosfato
G-6-P	Glucosa-6-fosfato
F-6-P	Fructosa-6-fosfato
G3P	Glicerol-3-fosfato
DHAP	Fosfato de dihidroxiacetona
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
G3P	Glycerol-3-phosphate
ATP	Adenosín trifosfato
NAD+	Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida
ADP	Adenosín difosfato

La influencia del oxígeno fue evaluada en el trabajo realizado por Estela (Estela et al., 2007) en donde se empleó el MO *Lactobacillus plantarum* L10 en la producción de ácido láctico, en éste se concluyó que las condiciones extremadamente aerobias o anaerobias afectan negativamente los parámetros de producción; por el contrario, la incorporación de cantidades mínimas de oxígeno tuvieron un efecto favorable alcanzando productividades de hasta $6,5\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$.

El escalamiento de bioprocesos es un tema de suma importancia en la industria, pues de él depende la producción en grandes volúmenes de un producto de interés y la rentabilidad de éste. Sin embargo, existen desafíos importantes debido a que es necesario estudiar, identificar y valorar los parámetros clave que influyen en la dinámica del proceso. La tarea es compleja, debido a las variables involucradas en los fenómenos de transporte, la cinética química y los MOs, por nombrar algunas principales. Estas a su vez, controlan la distribución de los nutrientes, los gradientes de temperatura y de concentración y otros parámetros, que finalmente, difieren de las condiciones óptimas en escala laboratorio. En consecuencia, la mayoría de los procesos de fermentación a gran escala obtienen rendimientos y productividades menores a los esperados.

De forma general existen distintos métodos de escalamiento en fermentadores que se clasifican de acuerdo con su nivel de dificultad, dentro de éstos están las reglas de oro, los métodos de análisis dimensional, análisis semifundamentales y fundamentales. Cuando se realiza un escalamiento por métodos de análisis dimensional, se eligen valores constantes de grupos adimensionales como criterios de escalamiento que describan el comportamiento del proceso entre las dos escalas de operación. Así, se tienen por ejemplo los siguientes: coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, potencia de agitación por unidad de volumen, velocidad de agitación, número de Reynolds, velocidad de punta del impulsor y tiempos de mezcla [9]. Se destaca el caso de Esra (Imamoglu & Sukan, 2013) en el cual se realizó el escalamiento de 100 mL a 10 L empleando como criterio de escalamiento el número de Reynolds y la velocidad de la punta del impulsor, obteniendo mejor productividad volumétrica a mayor volumen.

El escalamiento con la metodología de número de Reynolds (Re_i) es comúnmente utilizado cuando la geometría entre el matraz de agitación y el biorreactor no son comparables, razón por la

cual es necesario utilizar un factor diferente el cual pueda ser utilizado entre los fermentadores que, para este caso es el régimen del flujo de las fermentaciones (Imamoglu & Sukan, 2013). Para los biorreactores de tanque agitado, en el presente estudio, el escalamiento se realizó utilizando la metodología de velocidad de punta de impulsor. Para este parámetro, se obtiene información sobre las dimensiones del fermentador y a partir de una curva de número de potencia en función del número de Reynolds (Geankoplis & Straulino Muñoz, 1998) y el tipo de turbina se obtienen los datos necesarios para realizar el escalamiento de la fermentación (P. M. Doran, 2007). Las ecuaciones matemáticas del proceso de escalamiento para los biorreactores de tanque agitado, los números de potencia y demás parámetros reológicos e hidrodinámicos como número de potencia modificado, consumo de energía, velocidad de punta del impulsor y demás se encuentran relacionados en las ecuaciones 1 a 17 (Imamoglu & Sukan, 2013). El significado de los términos presentados en la Tabla 1 se muestran en la lista de símbolos.

Tabla 1.

Ecuaciones utilizadas en el escalamiento para la producción de AL.

Ecuación	#	Ecuación	#
$Re_i = \frac{N_i \rho D^2}{\eta}$	1	$\lambda = \left(\frac{v^3}{\varepsilon}\right)^{1/4}$	10
$Re_f = \frac{nd_f^2}{v}$	2	$\gamma = kN_i$	11
$v = \frac{\eta}{\rho}$	3	$\tau = -\eta\gamma$	12
$\vartheta_{tip} = \pi N_i D_i$	4	$\tau_f = \left(\frac{\varepsilon}{v}\right)^{1/2} n$	13
$P_o = N_p \rho N_i^3 D_i^5$	5	$Fr_i = \frac{N_i^2 D_i}{g}$	14
$P_f = N'_p \rho n^3 d_f^4 V_L^{1/3}$	6	$Fr_f = \frac{(2\pi n)^2 d_o}{2g} > 0.4$	15

$N'_p = 70Re_f^{-1} + 25Re_f^{-0.6} + 1.5Re_f^{-0.2}$	7	$Ph = \frac{d_o}{d_f} \left\{ 1 + 3 \log_{10} \left[\frac{\rho(2\pi n) d_f^2}{\eta} \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \left[\frac{V_l^{0.33}}{d_f} \right]^2} \right)^2 \right] \right\}$	16
$A_c = \frac{\pi D_{int}^2}{4}$	8	$t_m = \frac{1.54 * v}{D^3 * N_i}$	17
$\varepsilon = N_p N_i^3 D_i^2$	9		

El escalamiento de los bioprocesos también puede hacerse utilizando la dinámica computacional de fluidos (CFD), la cual consiste en el uso de software para obtener una aproximación de la hidrodinámica del fluido utilizando diseños de los biorreactores en 3D. Esta aproximación permite simular como varía el comportamiento hidrodinámico de la fermentación, empleando diferentes configuraciones y variables del proceso. Como el comportamiento físico de los fluidos está gobernado por los tres principios fundamentales (conservación de masa, energía y segunda ley de Newton) es necesario utilizar ecuaciones matemáticas que en la mayoría de los casos se presentan como ecuaciones diferenciales parciales. En el caso de los sistemas isotérmicos se utiliza las ecuaciones denominadas Navier-Stokes (P. M. Doran, 2007)

Las ecuaciones de Navier-Stokes son utilizadas cuando se tiene un flujo laminar; en el caso de los flujos turbulentos existen diferentes modelos que permiten modelar el comportamiento del fluido. Para el flujo en reactores de tanque agitado el modelo más utilizado es el k-ε, el cual es una

modificación que incluye la energía cinética de turbulencia (k) y la velocidad de disipación de la energía cinética de turbulencia (ϵ) (P. Doran, 2013).

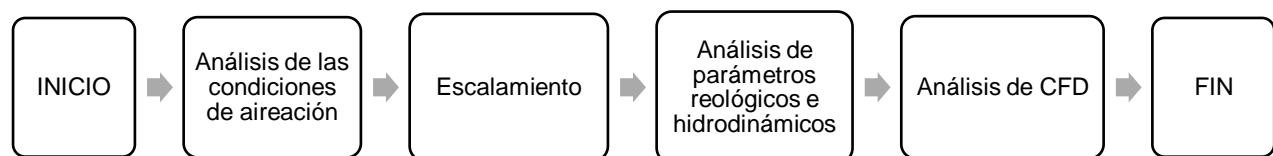
Dado lo anterior, en el presente trabajo se determinaron las condiciones hidrodinámicas y de aireación que favorecen la fermentación de AL usando GC como fuente de carbono para volúmenes de fermentación 25, 500, 2500 y 5000 mL, empleando la bacteria *Lactobacillus Rhamnosus* ATCC 7469, utilizando CFD y tomando como criterios de escalamiento el número de Reynolds y la velocidad de la punta del impulsor.

2.2 Metodología

La metodología desarrollada en el presente trabajo consta de 5 secciones; análisis de las condiciones óptimas de aireación, análisis de los parámetros reológicos e hidrodinámicos, escalamiento y análisis de CFD, tal como se muestra en la figura 2.

Figura 2.

Diagrama de flujo de la metodología utilizada en el trabajo de investigación.



2.2.1 Análisis de las condiciones de oxígeno que favorecen la producción de ácido láctico

Para determinar estas condiciones, se realizaron fermentaciones por duplicado a 37°C, 200 rpm y pH inicial de 6.5, en tres volúmenes de control (10, 25 y 50 mL) en dos condiciones definidas (aerobia y anaerobia) en medio MRS modificado con glicerol USP durante 12 horas, utilizando un preinóculo de 10 % V/V en medio MRS, la composición de los medios es mostrada en el Apéndice A. Las fermentaciones se llevaron a cabo en viales transparentes de volumen total de 120 mL y en un shaker con incubadora marca LABTECH. Durante esta fermentación se realizaron tomas de muestras (inicial y final) para realizar análisis de biomasa por densidad óptica (DO) y metabolitos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Una vez obtenidos estos datos se procedió a realizar un ANOVA utilizando el programa STATISTICA para determinar si existen cambios significativos en la producción de AL cuando se realiza fermentaciones con presencia o ausencia de aire y los volúmenes de fermentación. Las comprobaciones estadísticas para el uso del ANOVA se muestran en el Apéndice B y C.

2.2.2 Escalamiento

El escalamiento se realizó en dos partes, en la primera se seleccionó el número adimensional de Reynolds (Re_i) como parámetro de escalamiento manteniéndose constante, esto debido a que la geometría del vial de 100 mL y el vaso del fermentador Bioflo 110 New Brunswick de 1.3 L no son comparables. A continuación, con la Ecuación 1 se determinaron las condiciones de agitación teniendo en cuenta la relación de diámetros impulsor-vial y que los parámetros físicos del fluido (densidad y viscosidad) se mantuvieron constantes dado a que no existen diferencias significativas entre los caldos de fermentación utilizados. En la segunda parte, para el escalamiento entre los biorreactores donde existe similitud geométrica, se usó la velocidad de punta de impulsor

(V_{tip}) de la Ecuación 2, manteniéndose constante en los diferentes volúmenes de fermentación para determinar la velocidad de agitación.

2.2.3 Análisis de los parámetros reológicos e hidrodinámicos

Se calcularon los parámetros reológicos y números adimensionales importantes en el escalado empleando las Ecuaciones 1 a 17, tomando las dimensiones del vial y del biorreactor Bioflo 110 New Brunswick (1.5 y 7.5 L) con un calibrador pie de rey digital Sata ST91512SC (0 a 200 mm). Para determinar la viscosidad el caldo de fermentación se empleó viscosímetro Anton Paar Physica MCR 302, con curvas de flujo donde se varió la velocidad de deformación. El número de potencia se estimó a partir de una gráfica de acuerdo con el número de Reynolds como se muestra en el Apéndice D.

2.2.4 Análisis de CFD

Para el análisis de CFD fue necesario modelar en el programa COMSOL multiphysics v5.5 (versión de prueba) los biorreactores CSTR New Brunswick BioFlo 110 con volúmenes de fermentación de 500, 2500 y 5000 mL en 3D, utilizando el módulo Mixer con las dimensiones propias de cada fermentador (incluyendo sensores y tubería de alimentación), y ajustando la altura a la cual se encontraba el fluido, la geometría y parámetros clave que se presentan en el Apéndice E. Dentro de las condiciones de este diseño, se aplicaron booleanos para generar la unión del eje del impeler con los agitadores Rushton y la exclusión de esta unión del tanque de fermentación, esto fue realizado para poder definir la superficie rotatoria del equipo. Luego, se definió el dominio rotatorio, el cuál fue seleccionado como la superficie interna del biorreactor y la unión generada por los agitadores y el impeler. Dentro de las especificaciones del dominio se ajustó la velocidad

rotacional especificada en revoluciones por tiempo, utilizando los valores obtenidos de los escalamientos dimensionales para cada volumen de fermentación.

Una vez obtenido el diseño con sus respectivas dimensiones y definiciones de dominio, se construyó la representación geométrica de cada equipo utilizando una malla predefinida de tamaño normal (objetos entre 0.00372 y 0.0125 m). El paquete físico utilizado para la solución del sistema fue el modelo para flujo turbulento k-ε, dentro del cual se definieron las propiedades del fluido seleccionando como material el agua, debido a su similitud con el caldo de fermentación. También se agregó el contorno de pared interior definiéndolo como los agitadores Rushton, restricciones de puntos de presión de todo el biorreactor, tomando la presión inicial como cero y finalmente se adicionó simetría entre las paredes superiores del biorreactor. Para esta investigación se usó el estudio de rotor congelado, ya que es útil para calcular perfiles de velocidad, presión, turbulencia entre otros.

2.3 Resultados

2.3.1 *Análisis de condiciones de oxígeno que favorecen la producción de AL*

Los datos obtenidos en términos de productividades volumétricas globales de ácido láctico y biomasa fueron clasificados por volúmenes de fermentación (VOL FER) y la ausencia o presencia de oxígeno (SO/O) como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.

Productividades obtenidas de las pruebas para el análisis de las condiciones de aireación

P. Biomasa [gL⁻¹h⁻¹]	P. Ácido Láctico [gL⁻¹h⁻¹]	Ausencia (SO) o presencia de oxígeno (O)	Volumen de Fermentación [mL]
0,0374	0,0457	O	10
0,0353	0,0330	SO	10

0,0279	0,0511	O	25
0,0307	0,0403	SO	25
0,0220	0,0369	O	50
0,0329	0,0304	SO	50
0,0343	0,0424	O	10
0,0371	0,0317	SO	10
0,0282	0,0516	O	25
0,0281	0,0315	SO	25
0,0216	0,0317	O	50
0,0379	0,0273	SO	50

Por medio de un análisis de varianza ANOVA univariante multifactorial mostrado en la Tabla 3 obtenido por el programa estadístico, donde solo se tuvieron en cuenta los datos de la productividad de ácido láctico (PAL), se determinó que existen diferencias significativas con $p < 0,05$ para ambos factores (datos en color rojo). El coeficiente entre varianzas (F) indica si las diferencias significativas fueron debidas al azar ($F=1$), en el análisis se obtuvo $F=33,49$ y $F=13,77$ entre las fermentaciones SO/O y VOL FER respectivamente. No se mostraron diferencias significativas en la interacción de los factores. De acuerdo con la figura 3, la PAL tuvo mejores resultados en fermentaciones aerobias en un volumen de fermentación de 25 mL.

Además, se realizó un análisis Tukey para la misma variable, PAL, con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los grupos formados por los factores y poder encontrar las mejores condiciones (Tabla 4). Así, para la PAL hubo diferencias significativas en pruebas en presencia de oxígeno entre los volúmenes de fermentación (25-50) mL, también se destaca que la prueba realizada en presencia de oxígeno en volumen de fermentación de 25 mL tuvo diferencias significativas sobre todos los volúmenes de fermentación en ausencia de oxígeno.

Para evaluar un panorama más amplio, se realizó un ANOVA multivariable multifactorial donde se encontró que existían diferencias significativas ($p < 0,05$, datos en rojo), entre las PAL y productividad de biomasa (PX) con respecto a SO/O y VOL FER. Como se esperaba, el factor SO/O tiene un mayor efecto que los VOL FER, sobre todo en la PAL ($F = 33,4$). Sin embargo, se destaca que únicamente la PX presentó diferencias significativas en cuanto a la interacción de los factores, de acuerdo con la Tabla 5.

Las fermentaciones aeróbicas se encuentran con una concentración aproximada de 1.3190 gL^{-1} (cálculos mostrados en el Anexo H), el volumen de 10 mL, tiene un porcentaje de volumen de gas por volumen de recipiente de 91.67%, por lo que es el sistema que se encuentra más saturado de oxígeno puesto que tiene un mayor espacio de cabeza.

Así mismo el volumen de 50 mL tiene un porcentaje de 58.33%, siendo el sistema más pobre de este nutriente. En consecuencia, el volumen de 25 mL con un porcentaje de 79.17% representa un sistema intermedio en el que no hay condiciones extremas en cuanto a la disponibilidad del oxígeno en el medio.

Tabla 3.

Resultados ANOVA Univariante Multifactorial Productividad de ácido láctico

Efecto	SS	MS	F	p
Intercepto	0.017146	0.01746	1621.123	2E-08
SO/O	0.000354	0.000354	33.494	0.001165
VOL FER	0.000291	0.000146	13.774	0.005721
SO/O*VOL FER	0.000051	0.000026	2.413	0.170241
Error	0.000063	0.000011		
Total	0.00076			

Figura 3.

ANOVA Univariante Multifactorial Productividad.

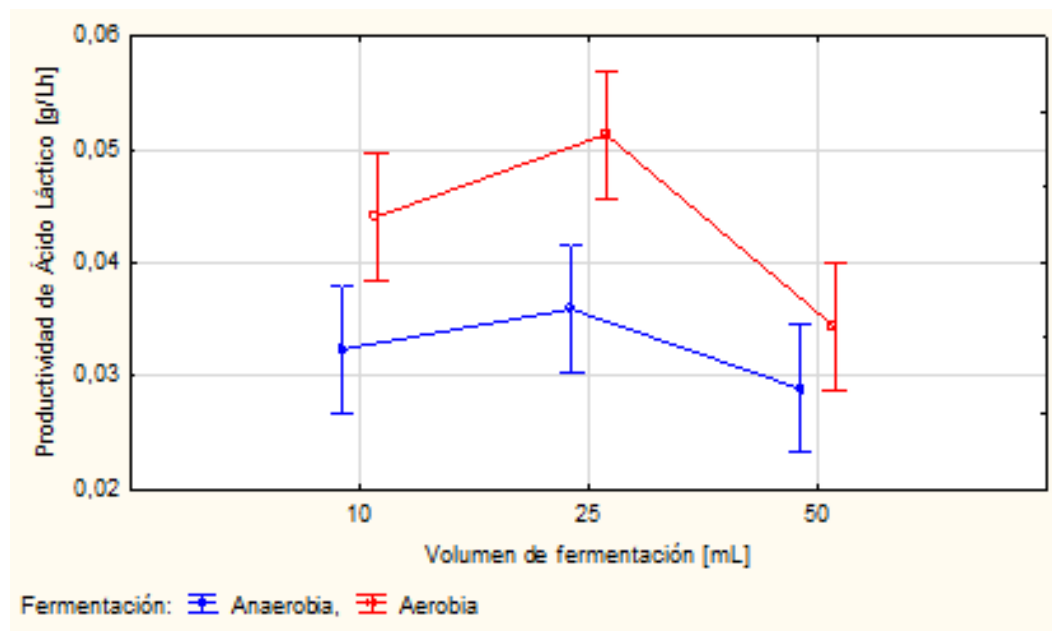


Tabla 4.

Test de Tukey para la productividad del ácido láctico

Grupo No.	SO/O	VOL FER	{1} 0.03235	{2} 0.03590	{3} 0.02885	{4} 0.04405	{5} 0.05135	{6} 0.03430
1	SO	10		0.868919	0.874895	0.075521	0.008455	0.98714
2	SO	25	0.868919		0.366072	0.254501	0.022886	0.994686
3	SO	50	0.874895	0.366072		0.02467	0.003597	0.587679
4	O	10	0.075521	0.254501	0.02467		0.337653	0.146949
5	O	25	0.008455	0.022886	0.003597	0.337653		0.01438
6	O	50	0.98714	0.994686	0.587679	0.146949	0.01438	

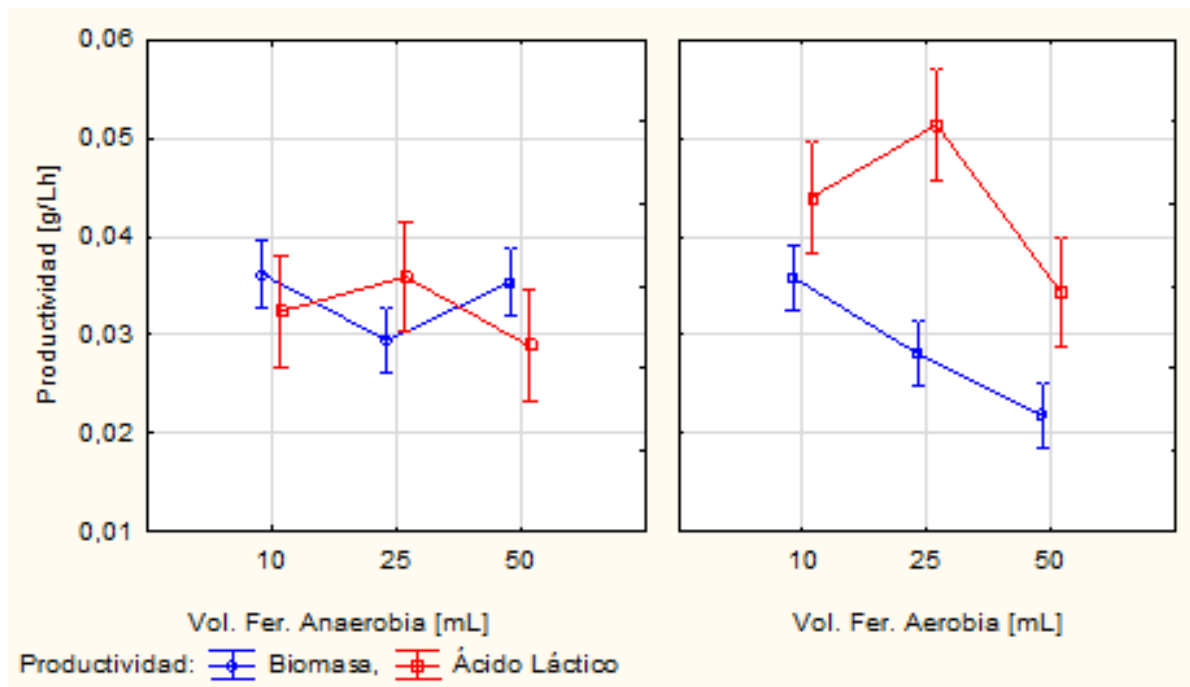
Tabla 5.

Resultados ANOVA Multifactorial por Productividad biomasa y ácido láctico

Efecto	Productividad de Biomasa				Productividad de ácido láctico			
	SS	MS	F	p	SS	MS	F	p
Intercepto	0.011619	0.011619	3108.06	2E-08	0.017146	0.01746	1621.123	2E-08
SO/O	0.000078	0.000078	20.873	0.003816	0.000354	0.000354	33.494	0.001165
VOL FER	0.000145	0.000072	19.338	0.002422	0.000291	0.000146	13.774	0.005721
SO/O*VOL FER								
FER	0.000109	0.000054	14.562	0.004985	0.000051	0.000026	2.413	0.170241
Error	0.000022	0.000004			0.000063	0.000011		
Total	0.000354				0.00076			

Figura 4.

Análisis multifactorial multivariable para cada variable dependiente.



De acuerdo con los análisis estadísticos, se encontró que las fermentaciones aeróbicas a 25 mL, tuvieron mejores resultados en términos de la PAL, esto coincide con lo encontrado por Quatravaux, en donde se evaluó el efecto de diferentes sistemas de aireación en la producción de ácido láctico empleando la bacteria *Lactobacillus plantarum* en tanques agitados con cultivos batch (Quatravaux et al., 2006), concluyendo que las condiciones extremadamente aeróbicas o anaeróbicas afectaron negativamente los parámetros de producción; por el contrario, la incorporación de cantidades mínimas de oxígeno en el sistema tuvieron un efecto favorable unido a la velocidad de agitación. Esto sugiere que, en las fermentaciones, empleado biorreactores, es conveniente emplear el oxígeno residual presente; es decir, que el suministro de oxígeno adicional en este medio puede tener efectos desfavorables en el metabolito de interés.

2.3.2 Escalamiento

Las dimensiones utilizadas, metodología de escalamiento y velocidades de agitación obtenidas se presentan en la tabla 6.

Tabla 6.

Resultados obtenidos del escalamiento matemático.

Volumen escalado [mL]	Metodología usada	Diámetro del impeler [cm]	Velocidad de agitación [rpm]
500	<i>Re_i</i>	5.259	190
2500	<i>v_{tip}</i>	5.973	167
5000	<i>v_{tip}</i>	5.973	167

Como se observa en la Tabla 6, los diámetros del impeler para el volumen de 2500 y 5000 mL son iguales debido a que es utilizado el Biorreactor (New Brunswick Bioflo 110 de 7 L) para

los dos escalamientos, esto implica que la velocidad de agitación para estos dos volúmenes se mantiene constante.

2.3.3 Análisis de comportamiento reológico e hidrodinámico

En el escalamiento de los bioprocesos es indispensable tener en cuenta las características del microorganismo, en el caso del *Lactobacillus Rhamnossus* ATCC 7469, se ha demostrado que es sensible a los cambios físicos y mecánicos del medio (Liew, 2004). Por lo tanto, se calcularon diferentes parámetros y números adimensionales que ayudaron a entender el comportamiento reológico e hidrodinámico en los volúmenes de fermentación.

Tabla 7.

Parámetros calculados para el escalamiento

Escalamiento con Reynolds y con velocidad de punta del impulsor.				
Volumen (mL)	25	500	2500	5000
Di (cm)	5,128	5,259	5,973	5,973
Dint (cm)	5,128	10,542	18	18
Ni (rpm)	200	190,160	167,430	167,43
Núm. Imp.	NA	2	2	2
v (m²s⁻¹)	1.04E-06	do (cm)	2	
ρ (kgm-3)	1000	k (impeler)	10	

Tabla 8.

Parámetros reológicos e hidrodinámicos calculados

Resumen del comportamiento reológico e hidrodinámico del caldo de fermentación				
Volumen (mL)	25	500	2500	5000
Re	8425,31	8425,310	9569,190	9569,190
Vtip (ms⁻¹)	Na	0,524	0,524	0,524
Fr	0,447	0,053	0,047	0,047
Ph	4,526	Na	Na	Na
Np	0,360	7,580	7,77	7,860
Po (W)	0,002	0,097	0,128	0,129
Po/V (Wm⁻³)	109,225	194,142	51,343	25,968

Ac (m²)	0,002	0,008	0,025	0,0254
ε (Wkg⁻¹)	0,035	0,667	0,602	0,6093
λ (um)	75,040	36,040	36,980	36,870
γ (s⁻¹)	80	33,333	31,693	27,904
τ (Nm⁻²)	0,192	0,034	0,033	0,0290
tm (s)	0,085	1,670	6,474	12,948

El número de fase fue de 4,526, este valor se calculó únicamente para el vial porque es la única configuración que presenta agitación orbital. Así, este número determina si el medio se encuentra "en fase" (Ph >1,26) estado en el cual el fluido se agita correctamente, o "Fuera de fase" (Ph <1,26) donde se crea un remolino en el centro radial de la agitación que reduce la eficiencia del mezclado y la transferencia de oxígeno (Mandenius, 2016).

De otra parte, el número de potencia se calcula empleando correlaciones empíricas con el Rei y el tipo de agitador; este valor aumentó veinte veces su valor del vial al biorreactor, luego presentó pequeños incrementos en los biorreactores con diferentes volúmenes de fermentación. De forma similar, la potencia requerida y tasa de disipación de energía por unidad de masa aumentaron su valor en la misma proporción, representando un mayor consumo de energía y poder suministrado por el agitador por unidad de masa respectivamente (P. M. Doran, 2007).

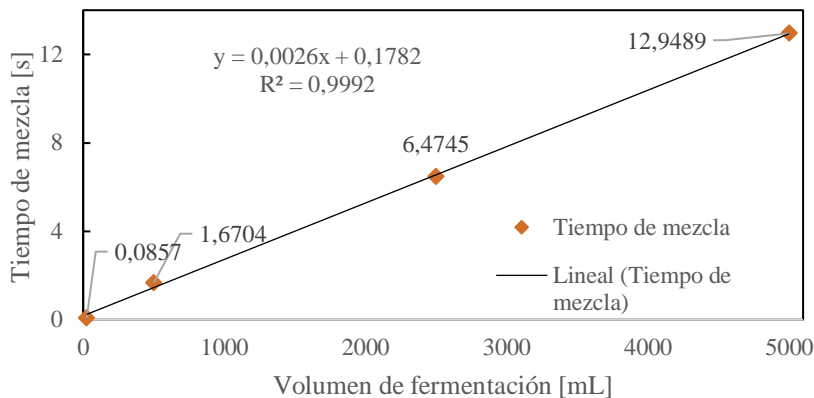
Ahora bien, el consumo de energía por volumen de fermentación (Po/V), se considera una medida de la intensidad de la mezcla y la tasa de transferencia de masa en el sistema. Se destaca que, para el volumen de 500 mL, este valor se duplicó en relación con el volumen de control (vial). En consecuencia, se esperan mejores resultados en cuanto a la producción de ácido láctico. En contraste, el Po/V en fermentaciones de 2500 y 5000 mL se redujo 3 y 5 veces respectivamente, por lo que se espera que disminuya la tasa de producción a medida que aumenta el volumen de fermentación (Deniz et al., 2015).

Así mismo, la escala de mezclado Kolmogorov representa el tamaño de los remolinos generados por la turbulencia del sistema y los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango para viscosidades bajas como el agua entre (30-100 μm) (P. M. Doran, 2007). Al respecto, se destaca que este parámetro se redujo a la mitad en el cambio escala del vial al biorreactor; lo anterior aumenta el riesgo de estrés celular debido a una mayor cercanía con el tamaño de las células (Mesquita et al., 2017). De forma similar, se redujo la velocidad de cizallamiento que representa la fuerza motriz para la transferencia de momento, esto quiere decir que existen menores gradientes de velocidad en los biorreactores. La tensión de cizallamiento se redujo cinco veces su valor desde el vial al biorreactor representando una reducción de la fuerza aplicada al sistema y mejores resultados en los mismos (P. M. Doran, 2007).

Es importante mencionar que el parámetro de tiempo de mezcla (t_m) en el presente estudio tiene una tendencia lineal con respecto al volumen de fermentación, con un R^2 de 0,99 como se muestra en la Figura 5. El aumento que presenta el t_m podría tener efecto desfavorable en la producción de ácido láctico debido a que un mayor tiempo de mezcla influye negativamente en la transferencia de masa produciendo zonas muertas en interior del biorreactor, aunque el efecto es mucho mayor en fermentaciones de dos o más fases el cual no es el caso (Deniz et al., 2015; P. M. Doran, 2007).

Figura 5.

Relación Tiempo de mezcla vs Volumen de fermentación



El análisis reológico e hidrodinámico mostró que la agitación es insuficiente, teniendo en cuenta que es menor que la del volumen de control de 25 mL. Esta misma conclusión la obtuvo Deniz *et al.* (Deniz et al., 2015), en un escalamiento de bioetanol desde un volumen de 2 a 8 L, empleando la velocidad de punta de impulsor, donde la tasa de agitación fue menor que la del volumen de control, obteniendo resultados desfavorables en cuanto los parámetros reológicos e hidrodinámicos. Además, comprobó experimentalmente que con este método se obtenía una menor productividad que con aquellos con los cuales se obtenían tasas de agitación mayores.

De acuerdo con lo anterior, se esperan mejores resultados en los volúmenes de fermentación de 500 y 25 mL respectivamente, y una reducción en la tasa producción de AL a medida que aumenta la escala, por lo que se recomienda usar metodologías como tiempo de mezcla y consumo de energía por volumen de fermentación en las cuales la tasa de agitación aumenta con

el cambio de escala para asegurar una mezcla adecuada y que no se produzca lisis celular (Deniz et al., 2015).

2.3.4 *Análisis CFD*

La representación de los modelos geométricos (ajustados al volumen de control) correspondientes al biorreactor Bioflo 110 con sus respectivas especificaciones (Ver Apéndice E) en volúmenes de fermentación de (500, 2500 y 5000 mL), son mostrados en la figura 6. Para dimensionar la similitud con los biorreactores reales, estos se muestran en la Figura 7.

Figura 6.

Modelos geométricos de los fermentadores de izquierda a derecha de los volúmenes de fermentación de 500, 2500 y 5000 mL con malla de tamaño normal

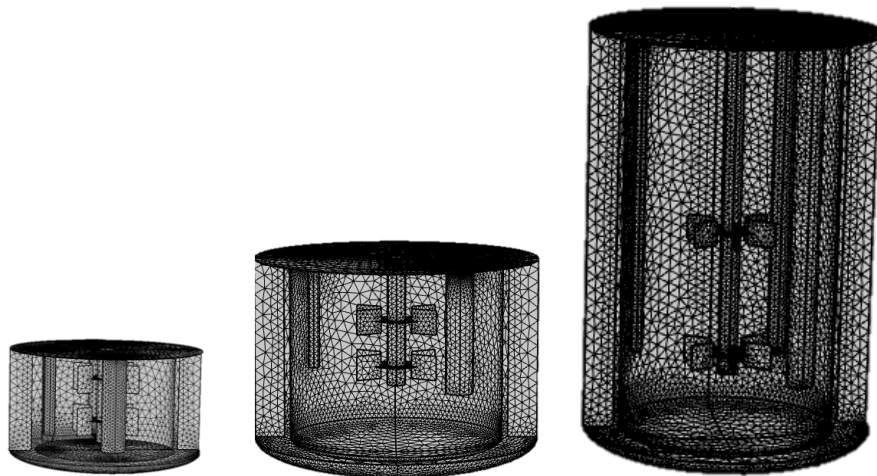
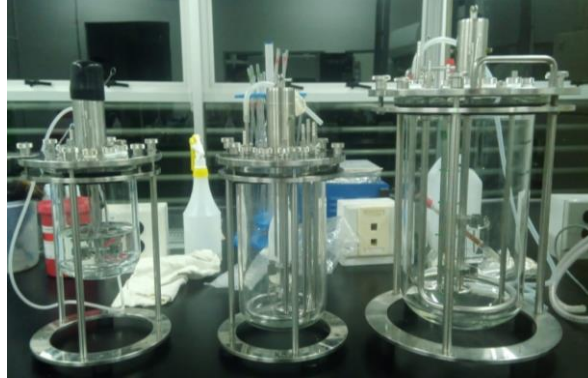


Figura 7.

Biorreactores New Brunswick Bioflo 110 con vasos de volúmenes de 1,3, 4 y 7 L



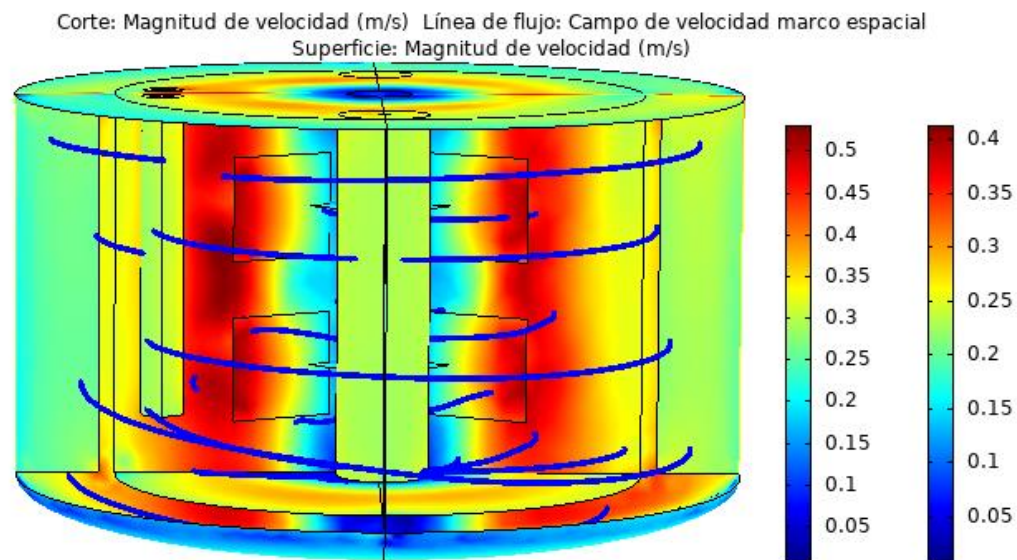
Después de completar la simulación empleando el modelo para flujo turbulento $k-\epsilon$ con el estudio de rotor congelado, se obtuvieron varios perfiles que describen el comportamiento del fluido al interior de los biorreactores.

En la figura 8, 9 y 10 se muestran los perfiles de velocidad que permiten analizar la vorticidad en el fenómeno de mezclado en dos modelos de biorreactor y en diferentes volúmenes de fermentación. Por un lado, la primera escala de colores (lado izquierdo), corresponde a la variación de la velocidad en el interior del biorreactor con un valor máximo esperado de $v_{tip} = 0,524 \text{ ms}^{-1}$, obtenido del cálculo teórico de esta variable, establecida como constante durante el escalamiento (ver tabla 8). De otra parte, la segunda escala (lado derecho), corresponde a las velocidades del fluido en contacto con las superficies del equipo. Para mostrar la sección transversal de los biorreactores se realizó un corte en el plano XZ, ocultando las paredes del frente para observar su interior. También, en las mismas se incluyeron las líneas de flujo resultantes (color azul) que indican la trayectoria del fluido durante el mezclado como resultado de la rotación de los impeler.

Como se observa en la figura 8, el modelo del volumen de 500 mL fue el que tuvo mejor distribución de velocidad a lo largo del biorreactor, manejando velocidades entre $0,35$ a $0,45 \text{ ms}^{-1}$, cerca de las paredes entre $0,25$ a $0,35 \text{ ms}^{-1}$. Además, no se visualizaron zonas muertas (velocidades cercanas a 0 ms^{-1}) gracias a los baffles, configuración que minimiza la formación de vórtices, como se comprueba con las líneas de flujo que se visualizan más homogéneas y equiespaciadas.

Figura 8.

Perfil de velocidad para biorreactor con volumen de fermentación de 500 mL

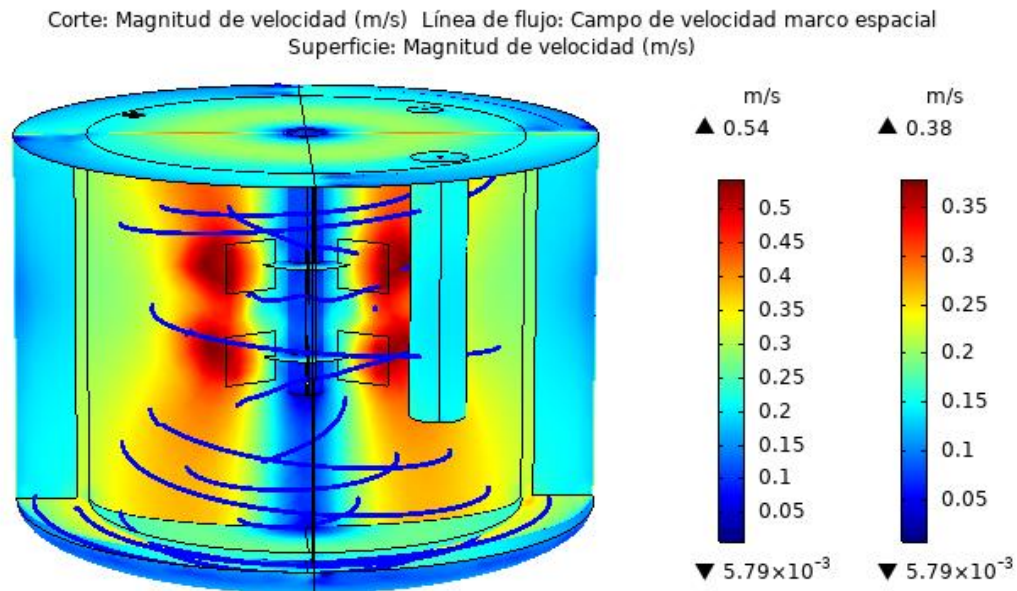


En el volumen de 2500 mL hay un aumento en el diámetro de los agitadores Rushton. Sin embargo, el modelado mostrado en la figura 9 presenta una mayor variación entre los rangos de la velocidad de $0,30$ a $0,45 \text{ ms}^{-1}$, y en las paredes del biorreactor entre $0,15$ a $0,25 \text{ ms}^{-1}$. Aunque no llega a la formación de zonas muertas y no se forman vórtices en la superficie del volumen, si

se presenta un pequeño vórtice en el fondo del tanque, que podría corregirse ajustando la distancia entre el impulsor y el fondo del biorreactor. En cuanto a las líneas de flujo, se muestra que el fluido se desplaza por todo el biorreactor, pero se observa que, con el aumento de escala y volumen de fermentación, el desplazamiento del fluido se torna menos homogéneo en la parte superior e inferior de los tanques.

Figura 9.

Perfil de velocidad para biorreactor con volumen de fermentación de 2500 mL



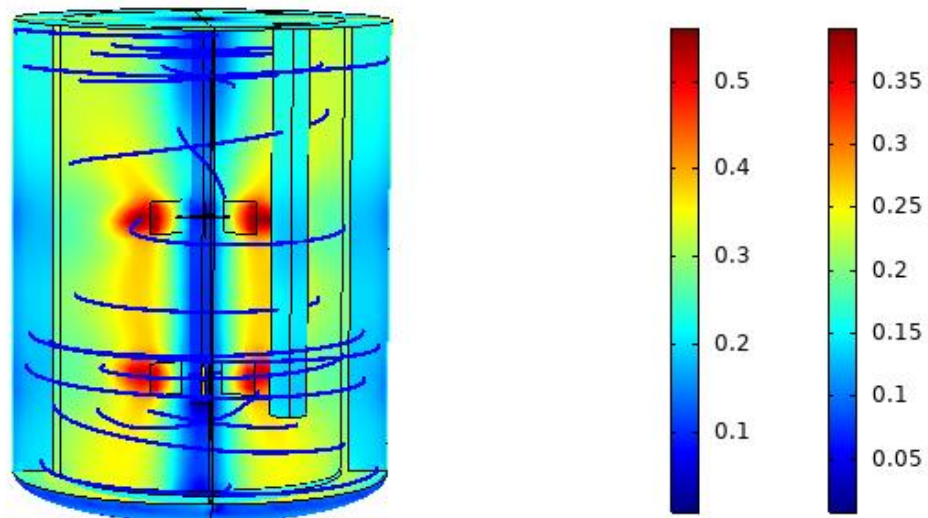
El modelo del volumen de fermentación de 5000 mL presentado en la figura 10 se simuló con las mismas dimensiones del biorreactor empleado en la escala anterior (cambiando la altura del fluido y la distancia entre los impulsor). En este volumen de fermentación se presenta una distribución no homogénea del perfil de velocidad, donde se alcanzan velocidades del fluido entre los rangos de 0,2 a 0,4 ms^{-1} , y en las paredes entre 0,1 a 0,2 ms^{-1} . En otras palabras, la mayor

parte del fluido no se agita a la máxima velocidad ($0,5 \text{ ms}^{-1}$) proporcionada por los agitadores. Además, se identifican pequeñas formaciones de vórtices sobre la superficie del líquido y el fondo del tanque que disminuyen significativamente el efecto positivo del mezclado.

Figura 10.

Perfil de velocidad para biorreactor con volumen de fermentación de 5000 mL

Corte: Magnitud de velocidad (m/s) Línea de flujo: Campo de velocidad marco espacial
Superficie: Magnitud de velocidad (m/s)



Dado los resultados anteriores, en el volumen de 500 mL se tienen condiciones de mezclado deseables en cuanto a la distribución homogénea del fluido, lo que nos indica que la configuración y la velocidad aplicada en esta configuración del biorreactor, beneficiarán el proceso fermentativo. Además, a medida que aumenta la escala, también incrementa el distanciamiento de estas condiciones óptimas. En el volumen de 2500 mL, se presenta un mezclado aceptable, que podría mejorarse como se mencionó anteriormente con el ajuste de las posiciones de los impeler.

Finalmente, para el volumen de 5000 mL las condiciones de mezclado no son aceptables, dada la formación de remolinos, la distribución heterogénea y la disminución de la velocidad en la mayor parte del fluido. En síntesis, para mejorar las condiciones de mezclado se propuso una alternativa de diseño y ajuste viable para el equipo del laboratorio, que mejore el perfil de velocidad mostrado en el escenario menos favorable, en la configuración de 5000 mL.

2.3.5 Estrategias de mejoramiento perfiles de velocidad en escalas de laboratorio

Para la selección de la estrategia se consideraron dos criterios: el primero está relacionado con relaciones dimensionales y configuraciones del biorreactor, de acuerdo con parámetros de diseño teóricos presentados por Doran (P. Doran, 2013) y que fueran viables para implementación en los equipos existentes del laboratorio. La segunda parte, está relacionada con parámetros o relaciones adimensionales de escalamiento que se podrían aplicar de acuerdo con la información disponible, variando únicamente la velocidad de agitación. El procedimiento fue el siguiente: se realizó el cálculo de las velocidades de agitación de acuerdo con la configuración propuesta en la primera parte como se muestra en el Apéndice F; estas se valoraron de acuerdo con las condiciones propias del microorganismo como la velocidad de agitación óptima a pequeña escala, y los valores máximos en los cuales se produce lisis celular. Así mismo, se tuvo en cuenta la conclusión obtenida en el análisis reológico que reza que, la velocidad de agitación debe ser mayor a medida que el volumen de control aumenta. En la Tabla 9, se resumen las propuestas encontradas con sus respectivos análisis y en la Tabla 10 se resumen las estrategias y mejoras implementadas comparadas con el modelo original.

Tabla 9.

Criterio de selección de propuesta de mejora para 5000 mL

Propuesta	Ventaja	Limitación
Comprobar los diámetros del impeler con criterios de diseño	Se obtienen los agitadores con el mejor diseño posible para mejorar el proceso de agitación	Se debe construir los impeler
Proponer un tercer impeler con posiciones equiespaciadas en el volumen del líquido	Se mejora la agitación agregando un tercer impeler y la implementación de este al sistema es sencilla	Se debe comprar un impeler adicional para el equipo
Cambiar la agitación proponiendo otra estrategia de escalamiento usando el parámetro Po/V	El cálculo de este parámetro ya fue realizado en el análisis reológico e hidrodinámico, por lo cual la velocidad de agitación puede ser determinada.	No se presenta limitación el realizar la propuesta de mejora.

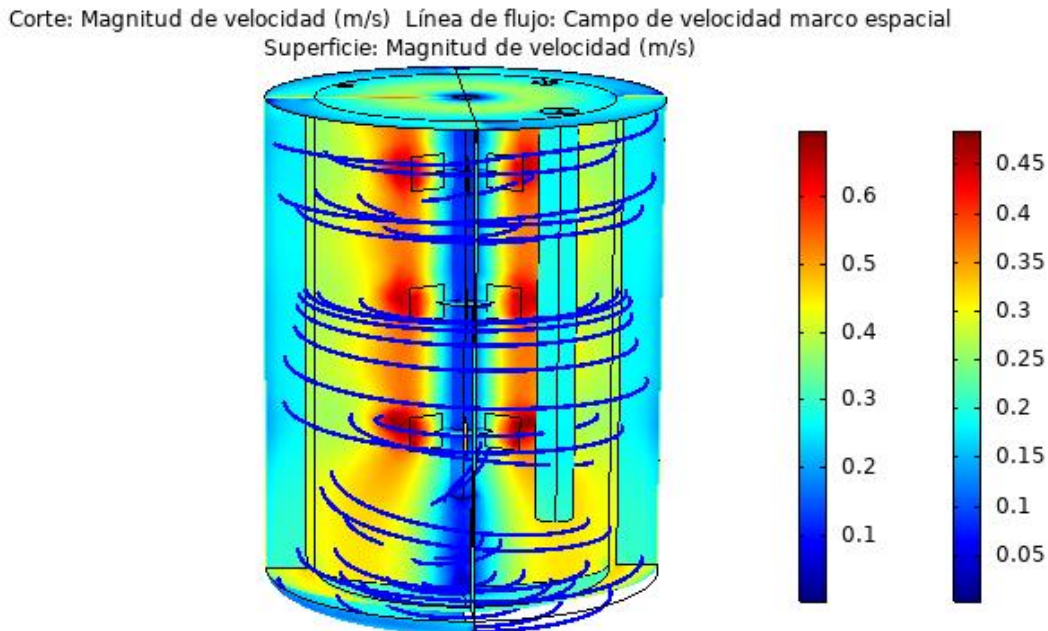
Tabla 10.

Comparación de los parámetros principales de los agitadores con volumen de 5000 mL

Parámetro	5000 mL sin modificar	5000 mL modificado
Altura de volumen de fermentación [mm]	245	245
Diámetro del impeler [mm]	59,730	59,730
Cantidad de impeler	2	3
Altura del fondo al primer impeler [mm]	40,00	59,730
Longitud del agitador [mm]	185,270	185,270
Distancia entre impeler [mm]	80	61,76
Velocidad de agitación [rpm]	167	210

Figura 11.

Perfil de velocidad para biorreactor con volumen de fermentación de 5000 mL con la mejora implementada.



Como se observa en la figura 11, al realizar las modificaciones mencionadas se obtuvo un perfil de corte de velocidad del fluido con rangos entre $0,4$ a $0,5 \text{ ms}^{-1}$ y en las superficies entre $0,2$ a $0,3 \text{ ms}^{-1}$ es decir que tiene reducción mínima, las líneas de flujo están distribuidas de forma uniforme por todo el biorreactor lo que indica un mezclado homogéneo en el cual no se presentan zonas muertas, como es el caso de los volúmenes de fermentación de 500 y 2500 mL . Se destaca que la formación del vórtice superficial fue eliminada, y el fenómeno desfavorable del fondo del tanque se redujo de forma considerable.

3. Conclusiones

La presencia de oxígeno tiene un efecto positivo en la productividad del ácido láctico por vía fermentativa, en contraste, en ausencia de oxígeno se ve favorecida la productividad de la biomasa.

En cuanto al volumen de fermentación con oxígeno, se obtuvo una mayor productividad de ácido láctico en el volumen de 25 mL, por lo que se concluye que el porcentaje de volumen de gas por volumen de recipiente de 79.17% aproximadamente sería el más adecuada para obtener mejores resultados.

De acuerdo con el análisis reológico e hidrodinámico en el cual se emplearon parámetros y números adimensionales importantes en el escalado de bioprocesos, se esperan mejores resultados en los volúmenes de fermentación de 500 y 25 mL respectivamente y una reducción en la tasa producción de ácido láctico a medida que aumenta la escala. Para evitar esta reducción, se debe emplear una metodología en la cual la tasa de agitación aumente con el cambio de escala para asegurar una mezcla adecuada, teniendo en cuenta un límite de agitación para evitar el fenómeno de lisis celular.

La metodología de modelamiento CFD permite realizar mejoras significativas en el desempeño y la productividad de las fermentaciones, especialmente en las configuraciones geométricas de los biorreactores y su comportamiento fenomenológico e hidrodinámico. A su vez, constituyen una gran ventaja debido a que representan un ahorro en términos de tiempos experimentales, reactivos y permiten dimensionar a priori los posibles problemas asociados con el escalamiento de un bioproceso. El presente estudio permitió generar mejoras alcanzables en el

diseño de los biorreactores existentes en el laboratorio como es la inclusión de un nuevo impeler en volúmenes de fermentación mayores a 2500 mL y un cambio en la velocidad de agitación en los mismos.

De acuerdo con el análisis CFD se concluye que en volumen de 500 mL se obtendrán las mejores condiciones de agitación para una distribución uniforme del fluido y que dichas condiciones positivas, se reducen a medida que se aumenta de escala si no se realizan los respectivos ajustes.

4. Recomendaciones

Evaluar las condiciones de agitación obtenidas en función de la productividad volumétrica.

Realizar los estudios de aireación en volúmenes de fermentación más grandes.

Utilizar metodologías de escalamiento usando otros parámetros adimensionales para determinar cuál es la mejor.

Referencias bibliográficas

- Aballay, P. M., Padoin, N., Ortiz, O., & Soares, C. (2012). *Fluid Flow Modeling in a Bioreactor Applied to Wine Production*. November.
https://www.comsol.eu/paper/download/293551/soares_presentation.pdf
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*, *156*(4), 286–301. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.017>
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, *31*(6), 877–902.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
- Anuradha, R., Suresh, A. K., & Venkatesh, K. V. (1999). Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. *Process Biochemistry*, *35*(3–4), 367–375.
[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00080-1)
- Aslanbay Guler, B., Deniz, I., Demirel, Z., Oncel, S. S., & Imamoglu, E. (2019). Comparison of different photobioreactor configurations and empirical computational fluid dynamics simulation for fucoxanthin production. *Algal Research*, *37*(May 2018), 195–204.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.019>
- Biebl, H. (2001). Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* - Batch and continuous culture studies. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000155>
- Buss, A., Suleiko, A., Rugele, K., & Vanags, J. (2017). CFD Analysis of a Stirred Vessel

- Bioreactor with Double Pitch Blade and Rushton Type Impellers. *2017 COMSOL Conference, 1*, 2017.
- Bylund, F., Collet, E., Enfors, S. O., & Larsson, G. (1998). Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. *Bioprocess Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s004490050427>
- Deniz, I., Imamoglu, E., & Sukan, F. V. (2015). Escherichia coli KO11 suşundan biyoetanol üretimi için ölçek büyütme parametrelerinin değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Biochemistry*, *40*(1), 74–80. <https://doi.org/10.5505/tjb.2015.33603>
- Diaz Ruiz, P. M., & Prada Palomo, Y. (2012). ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TRANSFORMACIONES DEL GLICEROL CRUDO PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA DEL BIODIESEL EN ÁCIDO LÁCTICO POR UNA CEPA NATIVA DE *Lactobacillus sp Y Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469*. *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Dobson, R., Gray, V., & Rumbold, K. (2012). Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Vol. 39, Issue 2, pp. 217–226). <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1038-0>
- Doran, P. (2013). Cap 8.1 Functions of Mixing. *Bioprocess Engineering Principles*, 255–332. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220851-5.00008-3>
- Doran, P. M. (2007). Fluid Flow and Mixing. In *Bioprocess Engineering Principles*. <https://doi.org/10.1016/b978-012220855-3/50007-9>
- El-Ziney, M. G., Arneborg, N., Uyttendaele, M., Debevere, J., & Jakobsen, M. (1998).

- Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnology Letters*, 20(10), 913–916. <https://doi.org/10.1023/a:1005483215378>
- Eş, I., Mousavi Khaneghah, A., Barba, F. J., Saraiva, J. A., Sant'Ana, A. S., & Hashemi, S. M. B. (2018). Recent advancements in lactic acid production - a review. *Food Research International*, 107(January), 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.001>
- Estela, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., & Egoavil, E. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 271–275. <https://doi.org/10.15381/rpb.v14i2.1797>
- Fernández, M., & Rendueles De La Vega, F. ; (n.d.). *PLANTA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO ALIMENTARIO. DESARROLLO DE LA INGENIERÍA DEL PROCESO Y DEL PROYECTO INDUSTRIAL*. Retrieved April 9, 2019, from https://www.aepro.com/files/congresos/2003pamplona/ciip03_0772_0780.2183.pdf
- Gaden, E. L. (1959). Fermentation process kinetics. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1(4), 413–429. <https://doi.org/10.1002/jbmte.390010407>
- Gamboa-Rueda, J. A., Lizcano-Gonzalez, V. A., Ordoñez-Supelano, M. A., Perez-Mendoza, J. A., Guzman-Luna, C., & López-Giraldo, L. J. (2015). Unstructured kinetic model of batch fermentation of usp glycerol for lactic acid production. *CTyF - Ciencia, Tecnología y Futuro*.
- García-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153–176.

<https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2008.10.006>

Geankoplis, C. J., & Straulino Muñoz, P. (1998). *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. CECSA.

<http://bibliotecavirtual.uis.edu.co:2095/eds/detail/detail?vid=3&sid=68a04a9f-bae6-4bc8-968e-519a735cd79c%40pdc-v-sessmgr01&bdata=Jmxhbmc9ZXMmc2l0ZT1lZHMtbGl2ZQ%3D%3D#AN=BUIS.1-115078&db=cat00066a>

Gelves, R., Benavides, A., & Quintero, J. C. (2013). Predicción del comportamiento hidrodinámico en el escalado de un reactor de tanque agitado para procesos aerobios, mediante CFD. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*. <https://doi.org/10.4067/s0718-33052013000300005>

Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., & Enshasy, H. El. (2018). Lactic acid bacteria: From starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters*, 365(20), 1–20. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny213>

Hernandez, A. (2005). Microbiología Industrial. In *Revista Latinoamericana de Microbiología* (Vol. 48, Issue 2). <https://doi.org/996831255X>

Hewitt, C. J., Caron, G. N. Von, Axelsson, B., McFarlane, C. M., & Nienow, A. W. (2000). Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: Effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and Bioengineering*. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001120\)70:4<381::AID-BIT3>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001120)70:4<381::AID-BIT3>3.0.CO;2-0)

- Hiruta, O., Futamura, T., Takebe, H., Satoh, A., Kamisaka, Y., Yokochi, T., Nakahara, T., & Suzuki, O. (1996). Optimization and scale-up of γ -linolenic acid production by *Mortierella ramanniana* MM 15-1, a high γ -linolenic acid producing mutant. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89152-5](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89152-5)
- Hong, A.-A., Cheng, K.-K., Peng, F., Zhou, S., Sun, Y., Liu, C.-M., & Liu, D.-H. (2009). Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(10), 1576–1581. <https://doi.org/10.1002/jctb.2209>
- Imamoglu, E., & Sukan, F. V. (2013). Scale-up and kinetic modeling for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 144, 311–320. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.06.118>
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2007). Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3), 524–534. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0779-6>
- Karp, S. G., Igashiyama, A. H., Siqueira, P. F., Carvalho, J. C., Vandenberghe, L. P. S., Thomaz-Soccol, V., Coral, J., Tholozan, J.-L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2011). Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*, 102(2), 1765–1772. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.102>
- Kazuda Kishimoto. (2008). *Method for producing lactic acid*. <https://patents.google.com/patent/WO2008126667A2/en>

- Li, Z., Lu, J., Zhao, L., Xiao, K., & Tan, T. (2010). Improvement of l-lactic acid production under glucose feedback controlled culture by *Lactobacillus rhamnosus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8957-5>
- Liew, S. L. (2004). *Pilot-Scale Production of Lactobacillus Rhamnosus Atcc 7469*.
- Lizcano-Gonzalez, Victor Alexis, Escalante Hernández, Humberto, Quintero Silva, M. J. (2017). *Efecto de las concentraciones de Nitrógeno y Oxígeno en la producción de polihidroxibutirato por Bacillus megaterium B2 a partir de glicerol* (Universida). Publicaciones UIS.
- Madigan, M. T., & Clark, D. P. (2009). Broch Biología de Los microorganismos. In *Estrcutura y funcion en bacterias* (12th ed., p. 73). Pearson Educacion.
- Mandenius, C.-F. (2016). *Bioreactors Design, Operation and Novel Applications*. WILEY-VCH.
- Manuelita Estrategia de negocio y Bioenergía. (2018). <https://www.ccc.org.co/bion/wp-content/uploads/pdf/26-abril-2018/HaroldEderGrupoManuelita.pdf>
- Marques, M. P. C., Cabral, J. M. S., & Fernandes, P. (2010). Bioprocess scale-up: quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(9), 1184–1198. <https://doi.org/10.1002/jctb.2387>
- Mazumdar, S., Clomburg, J. M., & Gonzalez, R. (2010). Escherichia coli strains engineered for homofermentative production of D-lactic acid from glycerol. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00664-10>

- Mesquita, A. R. C. de, Silveira, L. P. da M., Cruz Filho, I. J. Da, Lima, V. F. de, Silveira Filho, V. D. M., Araujo, A. A., Silva, T. L. Da, Araújo, K. D. F., & Macedo, L. D. S. (2017). Metabolism and physiology of Lactobacilli: a review. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, 2(2), 115–136. <https://doi.org/10.24221/jeap.2.2.2017.1202.115-124>
- Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., & Kondo, A. (2010). Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 85, Issue 3, pp. 413–423). <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2280-5>
- Pansuriya, R. C., & Singhal, R. S. (2011). Effects of dissolved oxygen and agitation on production of serratiopeptidase by *Serratia marcescens* NRRL B-23112 in stirred tank bioreactor and its kinetic modeling. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.4014/jmb.1009.09031>
- Prieto David, & Rojas Leidy. (2011). *EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE GLICEROL CRUDO UTILIZANDO UN MICROORGANISMO NATIVO*. Universidad Industrial de Santander.
- Quatravaux, S., Remize, F., Bryckaert, E., Colavizza, D., & Guzzo, J. (2006). Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 903–912. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02955.x>
- Rana, H. (2015). Comparison of industrial agitation for simulated batch reactor vessel mixing in bioethanol fermentation. *Comsol*.

Young-Jung Wee, Hyang-Ok Kim, J.-S. Y. (2006). *Pilot-Scale Lactic Acid Production via Batch Culturing of Lactobacillus sp....: Universidad Industrial de Santander*. Food Technology & Biotechnology.

Apéndices

Apéndice A. Medio MRS (Agar de Man, Ragosa y Sharpe) y MRS-Modificado

Tabla 11.

Composición medio MRS

Sustancia	Sólido [gL^{-1}]	Líquido [gL^{-1}]
di-amonio hidrógeno citrato	2	2
Extracto de carne	8	8
Extracto de levadura	4	4
Glucosa	10	10
Magnesio Sulfato	0,2	0,2
Manganeso II Sulfato	0,05	0,05
Peptona bacteriológica	10	10
di-Potasio Hidrógeno fosfato	2	2
Acetato de sodio	5	5
Tween 80	1	1
Agar	10	0

Tabla 12.

Composición medio MRS-modificado

Sustancia	Sólido [gL^{-1}]	Líquido [gL^{-1}]
di-amonio hidrógeno citrato	2	2
Extracto de carne	8	8
Extracto de levadura	4	4
Glicerol	10	10
Magnesio Sulfato	0,2	0,2
Manganeso II Sulfato	0,05	0,05
Peptona bacteriológica	10	10
di-Potasio Hidrógeno fosfato	2	2
Acetato de sodio	5	5
Tween 80	1	1
Agar	10	0

Apéndice B. Análisis para la validación de ANOVA unifactorial

OBJETIVO:

Determinar si hay diferencias significativas en la productividad de ácido láctico entre fermentaciones con presencia o ausencia de oxígeno.

- Variable dependiente: Productividad de ácido láctico (P AL)
- Factor: Ausencia o presencia de oxígeno (SO/O)

La Tabla 13 muestra que el requisito de varianza a ($p > 0.05$), se cumple ($p > 0.1273$)

Tabla 13.

Test de Levene's para homogeneidad de varianzas ANOVA unifactorial

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Spreadsheet1 in Workbook1)				
Effect: "SO/O"				
Degrees of freedom for all F's: 1, 10				
	MS Effect	MS Error	F	p
P AL	0.000034	0.000012	2.764463	0.127358

La Tabla 14 muestra los valores, observados y residuales necesarios para realizar la verificar el requisito de que la distribución normal de los datos debe ser uniforme, como se muestra en la Figura 12 este criterio es aceptado.

Tabla 14.

Valores observados, predecidos y residuales del ANOVA unifactorial

Observed, Predicted, and Residual Values Sigma-restricted parameterization (Analysis sample)			
	PAL Observed	PAL Predicted	PAL Resids
1	0.04570	0.04323	0.00247
2	0.03300	0.03237	0.00063
3	0.05110	0.04323	0.00787
4	0.04030	0.03237	0.00793
5	0.03690	0.04323	-0.00633
6	0.03040	0.03237	-0.00197
7	0.04240	0.04323	-0.00083
8	0.03170	0.03237	-0.00067
9	0.05160	0.04323	0.00837
10	0.03150	0.03237	-0.00087
11	0.03170	0.04323	-0.01153
12	0.02730	0.03237	-0.00507

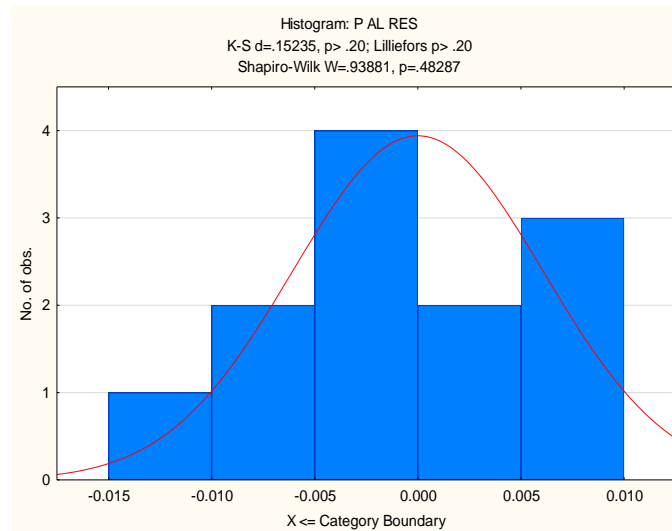


Figura 12. *Histograma datos residuales ANOVA unifactorial*

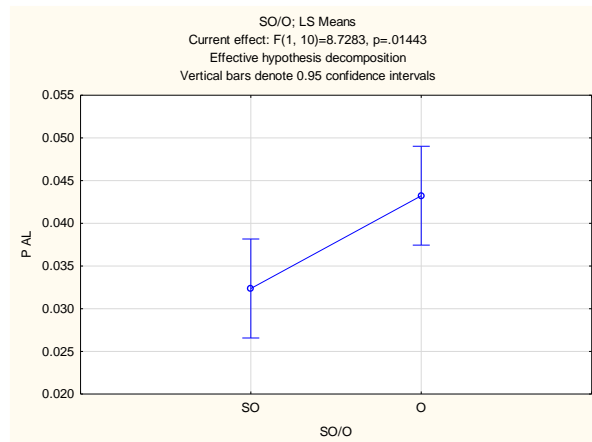
Tabla 15.

ANOVA univariante unifactorial para evaluar el efecto significativo de los factores

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1 in Workbook)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	Degr. of Freedom	P AL SS	P AL MS	P AL F	P AL p
Intercept	1	0.017146	0.017146	422.4560	0.000000
SO/O	1	0.000354	0.000354	8.7283	0.014426
Error	10	0.000406	0.000041		
Total	11	0.000760			

Figura 13.

ANOVA univariante unifactorial para evaluar el efecto significativo de los factores



Apéndice C. Análisis para la validación de ANOVA multivariante multifactorial

OBJETIVO:

Determinar si hay diferencias significativas en la productividad volumétrica de ácido láctico y biomasa entre los volúmenes de fermentación, presencia o ausencia de oxígeno y la interacción entre estos factores.

- Variables dependientes: Productividad de ácido láctico (P AL), Productividad de biomasa (P X)
- Factores: Volumen de fermentación (Vol Fer), ausencia o presencia de oxígeno (SO/O).
Requisito de varianzas homogéneas para la aceptación de la hipótesis nula ($p = 0.00$)

La Tabla 16 muestra que el requisito de varianzas a ($p > 0.05$), se cumple.

Tabla 16.

Test de Levene's para homogeneidad de varianzas ANOVA multifactorial

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Spreadsheet1 in Workbook1_(Recovered).Ruta_Metabolica_Andrea (1))				
Effect: "SO/O""VOL FER"				
Degrees of freedom for all F's: 5, 6				
	MS Effect	MS Error	F	p
P X	0,000002	0,000000	2,628548E+29	0,00
P AL	0,000004	0,000000	3,720177E+29	0,00

El requisito de que la distribución normal de los datos debe ser uniforme, como se muestra en la Figura 17 este criterio es aceptado.

Tabla 17.

Distribución normal PAL (izquierda), PX (derecha)

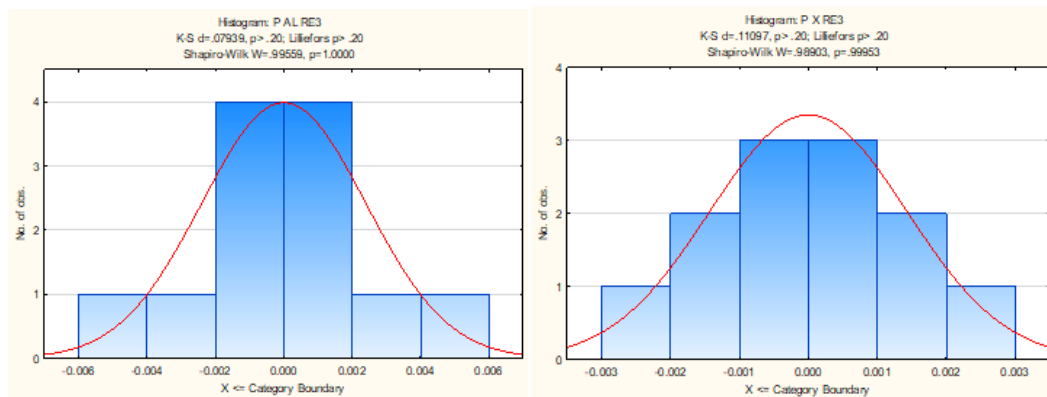


Tabla 18.

Test multivariable de significancia.

Multivariate Tests of Significance (Spreadsheet1 in Workbook1_(Recovered)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition						
Effect	Test	Value	F	Effect df	Error df	p
Intercept	Wilks	0.001227	1085.068	3	4	0.000003
SO/O	Wilks	0.046893	27.100	3	4	0.004058
VOL FER	Wilks	0.017216	8.829	6	8	0.003564
SO/O*VOL FER	Wilks	0.087947	3.163	6	8	0.067772

Tabla 19.

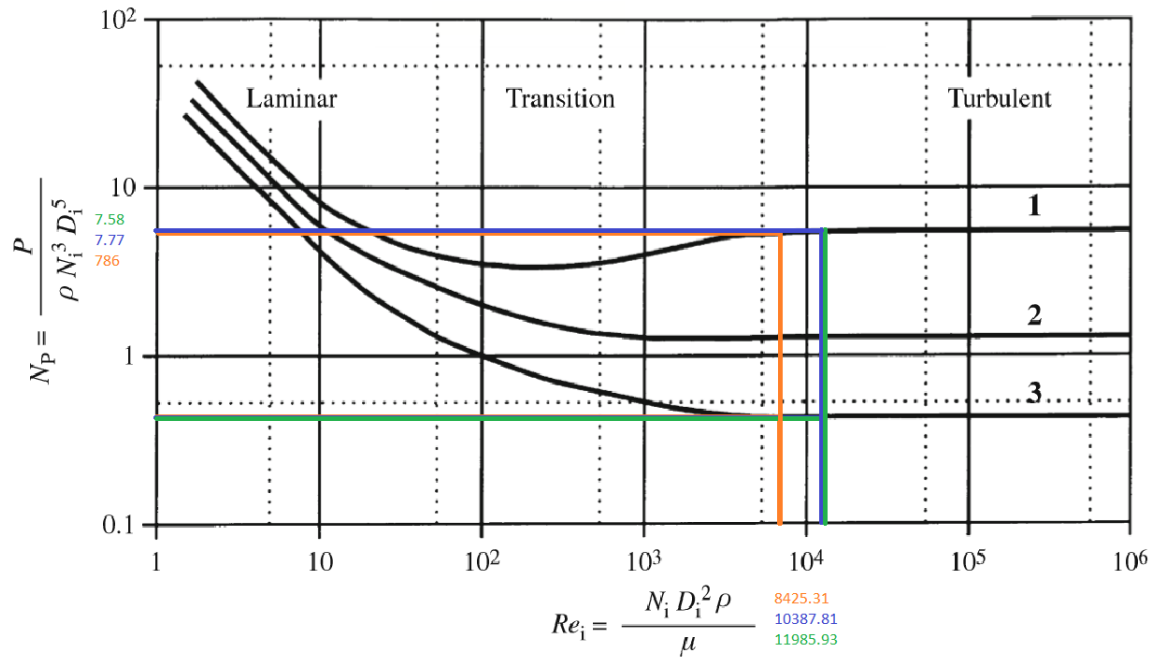
Resultados de ANOVA multivariable multifactorial para cada variable dependiente

Resultados Anova Univariante Multifactorial PX y PAL Parametrización restringida por Signa Descomposición efectiva de la hipótesis									
Effect	Degr. of Freedom	PX SS	PX MS	PX F	PX p	PAL SS	PAL MS	PAL F	PAL p
Intercept	1	0,011619	0,011619	3108,060	0,000000	0,017146	0,017146	1621,123	0,000000
SO/O	1	0,000078	0,000078	20,873	0,003816	0,000354	0,000354	33,494	0,001165
VOL FER	2	0,000145	0,000072	19,338	0,002422	0,000291	0,000146	13,774	0,005721
SO/O*VOL FER	2	0,000109	0,000054	14,562	0,004985	0,000051	0,000026	2,413	0,170241
Error	6	0,000022	0,000004			0,000063	0,000011		
Total	11	0,000354				0,000760			

Apéndice D. Estimación de número de potencia

Tabla 20.

Estimación del número de potencia, parámetro adimensional



Apéndice E. Mediciones y parámetros para tener en cuenta para el diseño de los Biorreactor New Brunswick Bioflo 110

Tabla 21.

Mediciones y parámetros tomadas de los biorreactores

PARTE	Medición	500 mL	2500 mL	5000 mL
TANQUE	Numero de deflectores	4,000	4,000	4,000
	Anchura del deflector [cm]	1,296	1,930	1,930
	Diámetro del impeler [cm]	10,542	18	18
	Diámetro del tanque [cm]	11,419	18,600	18,600
	Alto del tanque [cm]	7,000	13,927	27,854
IMPELER RUSHTON	Diámetro del buje del impeler [cm]	1,040	1,200	1,200
	Longitud de álabes del impeler [cm]	1,725	1,826	1,826
	Número de álabes del impeler	6	6	6
	Ancho del álabe del impeler [cm]	1,620	1,630	1,630
	Diámetro de disco para turbinas de Rushton y Smith [cm]	2,356	3,146	3,146
EJE DEL IMPELER	Diámetro del eje del impeler [cm]	1,040	1,200	1,200
	Diámetro del eje de impeler [cm]	1,040	1,200	1,200
	Longitud del eje de impeler [cm]	5,500	8,541	22,400
TUBERIA DE ALIMENTACIÓN 1	Radio interno [mm]	1,800	2,400	2,400
	Longitud [cm]	5,500	7,817	21,750
	Grosor de pared [mm]	1,480	1,230	1,230
	Radio interno [mm]	1,8	NA	NA
	Longitud [cm]	5,0	NA	NA

TUBERIA DE ALIMENTACIÓN 2	Grosor de pared [mm]	1,48	NA	NA
SENSOR DE TEMPERATURA	Radio interno [cm]	0,100	0,090	0,900
	Longitud [cm]	5,500	8,239	22,150
	Grosor de pared [cm]	0,600	0,792	0,792
SENSOR DE pH	Radio interno [mm]	0,015	0,900	0,900
	Longitud [cm]	5,500	8,239	22,150
	Grosor de pared [mm]	5,900	5,000	5,000

Apéndice F. Propuestas para el mejoramiento del mezclado

1. Comprobar que los diámetros del impeler sean los adecuados a los diámetros del vaso, si no ajustarla, Figura 14 y 15.

Figura 14.

Dimensiones recomendadas del impeler Rusthon

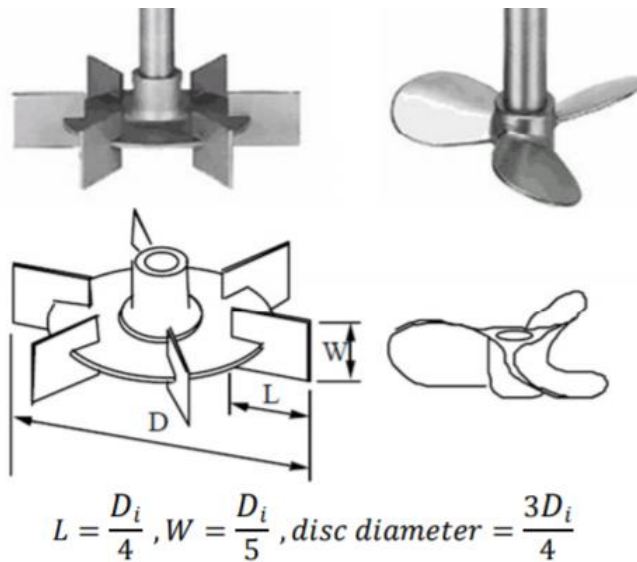
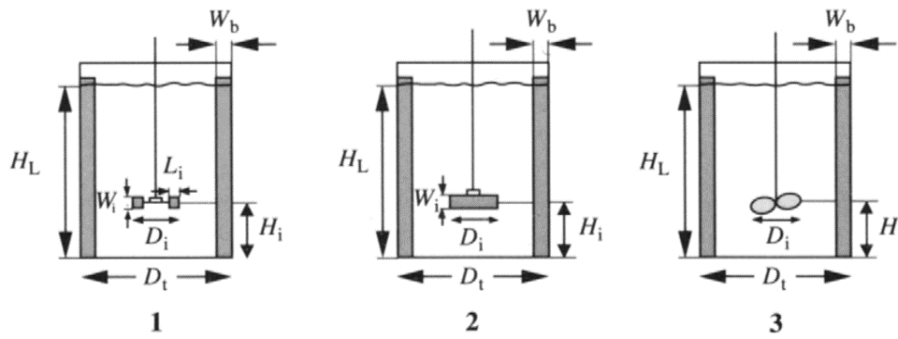


Figura 15.

Relación de configuraciones de acuerdo con las dimensiones



Impeller	D_t / D_i	H_L / D_i	H_i / D_i	Baffles	
				W_b / D_t	Number
1. Rushton turbine $W_i / D_i = 0.2, L_i / D_i = 0.25$	3	3	1	0.1	4

Como se muestra en la tabla 22, en el volumen de 500 mL el diámetro del impulsor (D_i) excede las medidas recomendados, para el volumen 2500 mL, está dentro del rango de las medidas teóricas, teniendo en cuenta que para las dimensiones del vaso para el volumen de 2500 y 5000 mL son iguales pero que la altura del volumen de fermentación aproximadamente se duplica, convendría tener en cuenta el diámetro del impeler calculado con la altura del líquido o un promedio entre ambos que sería de 71,83 mm.

Tabla 22.

Comprobación de las dimensiones reales con las teóricas

		Volumen 5000 ml	
Dimensiones [mm]		Teórico	Experimental
Dt	Diámetro vaso	186	186
HL	Altura del Volumen de fermentación	245	245
Wb	Ancho de baffles	18,600	19,300
Di, Dt	Diámetro del impeler Según Dt	62	59,730
Di, HL	Dia. Imp. Según HL	81,67	
Hi	Altura fondo-impeler	81,67	(40) (120)
Wi	Altura paleta	16,33	18,260
Li	Ancho paleta	20,42	16,030
Dd	Diámetro de disco	61,25	31,460

- Para el vaso 5 L se plantea mantener el mismo diámetro del impeler y aumentar su cantidad a 3 con posiciones equiespaciadas en el volumen de fermentación del líquido y una relación altura-fondo del impeler igual al diámetro del impeler. La tabla 23 presenta los cálculos obtenidos al realizar las modificaciones propuestas.

Tabla 23.

Cálculo de configuración, inclusión de impeler, impeler equidistantes y altura fondo-impeler igual al diámetro del impeler

Sin cambios en Di (Diámetro Impeler)		
Dimensiones [mm]		
HL	Altura del volumen de fermentación	245
Di	Diámetro impeler	59,730
#imp.	Número de Impeler	3,101
Hi	Altura fondo-impeler	59,730
HL-Hi	Altura restante	185,270
Hi-i	Altura entre impeler	61,760

3. Parámetros adimensionales de escalamiento : kLa , Po/V , Re , Ni y t_m

Ya se utilizaron los parametros de Re y Ni , kLa no se puede aplicar por limitaciones de los sensores presentes en el laboratorio; por lo cual se usaran los parámetros de t_m y Po/V : Para el escalamiento con el tiempo de mezcla se utilizaron el parámetro t_m del volumen de 2500 mL debido a que con el valor obtenido en el volumen de 500 mL se obtenia una velocidad de agitación que supera el limite para la lisis celular; para el escalamiento usando el parámetro Po/V se utilizó el valor obtenido en el volumen de 500ml, esto de debe a que el valor no supera los limites de lisis celular y además en este volumen se encontro mejor relación Po/V .

Tabla 24.

Escalamiento utilizando tiempo de mezcla (t_m) y consumo de potencia por volumen de fermentación (Po/V)

Escalamiento Sin cambios en D_i			
Volumen (mL)	500	2500	5000
D_i (cm)	5,259	5,973	5,973
D_{int} (cm)	11,419	18,6	18,6
Núm. Imp.	1	2	2
t_m (s)	1,666	6,490	12,9809
Ni, t_m (rpm)	189	650,569	334,032
Po/V (Wm^{-3})	194,1424	51,343	25,968
Ni, Po/V (rpm)	189	260,841	210,138

4. Propuesta seleccionada

Se manejará el mismo diámetro del impeler, porque no es factible cambiar este para que se adecue a la altura de los volúmenes de fermentación, pero se hará la inclusión de un impeler,

también se manejara un espaciado desde el fondo del vaso al primer impeler igual al diámetro del este y una distancia equidistante entre los impeler. En cuanto a la agitación que se implementará en la simulación se utilizará el parámetro de escalamiento consumo de energía/ volumen de fermentación (Po/V), el cual se mantendrá igual en los volúmenes de 2,5 y 5 L; una vez realizado el cálculo se obtuvo una velocidad de agitación de 210 rpm.

Apéndice H. Cálculo de *concentración* de oxígeno.

Se utilizo la ecuación de Van der Walls para describir el comportamiento del gas en el espacio de cabeza de los viales.

$$\left[P + a \left(\frac{n}{V} \right)^2 \right] \left(\frac{V}{n} - b \right) = RT$$

$$a = \frac{9 R^2 T_c^2}{8 P_c^2} Z_c$$

$$b = \frac{1 R T_c}{3 P_c} Z_c$$

P = Presión atmosférica

a = Parámetro de atracción

b = Parámetro de repulsión

n = Número de moles

V = Volumen de la mezcla de gases

R = Constante universal de los gases

T = Tempertura ambiente

T_c = Temperatura crítica

P_c = Presión crítica

Tabla 25.

Datos para la concentración de oxígeno

R	8.314		$J mol^{-1}K^{-1}$	
Tamb	27	°C	300.15	K
Patm	1.015	bar	101500	Pa
Oxígeno				
Tc1	118.38	°C	391.53	K
Pc1	50.8043	bar	5080430	Pa
Nitrógeno				
Tc2	146.89	°C	420.04	K
Pc2	33.9844	bar	3398440	Pa
V/n	0.02336375		$m^3 mol^{-1}$	