

**DISEÑO CONCEPTUAL DE UN FERMENTADOR PARA LA PRODUCCIÓN DE
N- BUTANOL A PARTIR DE GLUCOSA EMPLEANDO *Clostridium*
acetobutylicum ATCC 824**

**CINDY DAYANA ROJAS ANNICCHIÁRICO
NANCY CONSUELO GONZÁLEZ GONZÁLEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

**DISEÑO CONCEPTUAL DE UN FERMENTADOR PARA LA PRODUCCIÓN DE
N- BUTANOL A PARTIR DE GLUCOSA EMPLEANDO *Clostridium*
acetobutylicum ATCC 824**

**CINDY DAYANA ROJAS ANNICCHIÁRICO
NANCY CONSUELO GONZÁLEZ GONZÁLEZ**

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero Químico**

Director

Ing. Qco. JOSÉ ANDRÉS PÉREZ MENDOZA

Codirector

Ph.D. LUIS JAVIER LÓPEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida de la mejor manera. A mi Familia, Luz Marina, José Alfredo, Ivan, Elizabeth y Chocolo, por el apoyo brindado a lo largo de mi vida. Gracias por demostrarme una vez más lo importante que soy para sus vidas, este merito se los dedico especialmente a ustedes. A mis Profesores, José Andrés y Luis Javier, por todo el conocimiento transmitido. A mis amigos, Alex, Nancy, Juliana, Duverlys, Catalina e Ivan, por brindarme su amistad, conocimiento y apoyo incondicional en todo momento. A todas las personas que de una u otra manera me colaboraron en la realización de este proyecto (Lina, Guillermo, Ivan y Yuliana).

Finalmente, dedico gran parte de este logro a Omar Guerra por guiarnos, enseñarnos y apoyarnos en todo momento. Solo me resta decirte que este sentimiento va más allá de lo que puedo expresar a través de estas palabras. En realidad me enseñaste a luchar por mis sueños y a no decaer si en algún momento se presenta una dificultad. Nuevamente GRACIAS.

Pindy Rojas Annicchiárico

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios por su ayuda, fidelidad y misericordia en todo momento.

A mis queridos padres: Daniel y Lola, mis hermanos: Milena, Jackeline y Harby por apoyarme en toda circunstancia, y ser el motor de mi vida.

A Cindy, Alex, Deissy, Rocío por su amistad incondicional.

A mi familia, en especial a Toña, Tatiana, Andrés, Doña Fidelina por su apoyo, comprensión y confianza en todo momento.

A Luz Marina, Henson, Juliana, y Lina por su motivación y compromiso con éste proyecto.

A Omar Guerra por su amistad, incondicional apoyo, y guía en la ejecución de éste trabajo.

Nancy González

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirnos culminar esta etapa de nuestras vidas.

Al Ministerio de Agricultura por la financiación del proyecto.

A nuestros directores (José y Luis Javier), por guiarnos y por el conocimiento transmitido.

A nuestras Familias por el apoyo brindado en todo momento.

A Yuliana, Guillermo y José por su colaboración durante las pruebas experimentales.

Agradecemos de una manera especial a Omar Guerra por su valiosa colaboración.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. GENERALIDADES	19
1.1 FERMENTADOR	19
1.2 FERMENTACIÓN ABE (ACETONA, BUTANOL, ETANOL)	20
1.2.1 Factores que afectan la fermentación ABE	21
1.3 SISTEMAS DE AGITACIÓN EMPLEADOS EN FERMENTADORES	22
1.3.1 Fermentadores de tanque agitado	23
1.4 CAMBIO DE ESCALA DEL PROCESO	24
2. METODOLOGÍA	26
2.1 SELECCIÓN MODO DE OPERACIÓN DEL FERMENTADOR	27
2.2 PRUEBAS EXPERIMENTALES	27
2.3 MODELO MATEMÁTICO: SENSIBILIDAD PARAMÉTRICA Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS	28
2.3.1 Validación del modelo	32
2.4 DISEÑO MECÁNICO	33
2.4.1 Configuración geométrica del fermentador	33
2.4.2 Sistema de agitación	33
2.4.3 Criterio de cambio de escala	34
2.4.3.1 Cálculo de la Potencia de Agitación.	34
2.4.4 Sistema de enfriamiento	34
2.4.5 Materiales de Construcción	34
2.4.6 Distribución de orificios en el fermentador	35

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	36
3.1 MODELO AJUSTADO: SENSIBILIDAD PARAMÉTRICA Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS	36
3.2 ESPECIFICACIONES DEL FERMENTADOR ESCALA PILOTO LABORATORIO (50 L)	42
3.3 CÁLCULO DE LA POTENCIA Y VELOCIDAD DE AGITACIÓN	44
3.4 CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL FERMENTADOR	45
3.5 MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN	46
4. CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	54

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Perfil de producción de biocombustibles en Centro y Sur América	17
Figura 2. Ruta metabólica de la <i>Clostridium acetobutylicum</i>	21
Figura 3. Esquema de etapas metodológicas	26
Figura 4: Perfiles encontrados fermentación ABE para fermentador de 2 L (volumen de reacción)	38
Figura 5. Validación del modelo cinético para la fermentación ABE	40
Figura 6. Análisis gráfico de residuos para n-butanol	41
Figura 7. Análisis gráfico de residuos para la Glucosa	41
Figura 8. Fermentador diseñado en SolidWork (licencia académica)	43
Figura 9. Relaciones geométricas del fermentador 50 L (volumen de trabajo)	44

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Ventajas y desventajas de tres tipos de fermentadores	19
Tabla 2. Condiciones favorables para la <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	22
Tabla 3. Intervalos de operación de agitadores con respecto a la viscosidad	23
Tabla 4. Composición medio de cultivo utilizado para la fermentación ABE experimental	28
Tabla 5. Velocidades de reacción de cada metabolito en la fermentación ABE	30
Tabla 6. Casos estimación de parámetros	32
Tabla 7. Relación de dimensiones estándares de fermentadores	33
Tabla 8. Criterios estadísticos encontrados para seleccionar mejor ajuste del modelo	36
Tabla 9. Parámetros ajustados que tienen mayor influencia sobre el modelo según análisis de sensibilidad paramétrica	37
Tabla 10. Coeficiente de determinación ajustado calculados para todos los metabolitos de la fermentación ABE	38
Tabla 11. Desviación Media Cuadrática (RMSD) y Desviación Media Cuadrática Normalizada (NRMSD) para los metabolitos principales	39
Tabla 12. Velocidad de agitación para fermentador (50 L)	45
Tabla 13. Condiciones de operación del fermentador	45
Tabla 14. Materiales de construcción recomendados para las partes fermentador	46

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Preparación del preinóculo y las técnicas analíticas empleadas para la cuantificación de los metabolitos de fermentación ABE	54
Anexo 2: Cálculo potencia y velocidad de agitación fermentador 50L	56
Anexo 3: Perfiles de concentración encontrados para los diferentes casos de estimación de parámetros	58
Anexo 4: Análisis gráfico de residuos para metabolitos principales fermentación ABE	62
Anexo 5: Perfiles de concentración encontrados en el proceso de fermentación ABE al estimar 10 parámetros con todas las pruebas experimentales	63

RESUMEN

TÍTULO: DISEÑO CONCEPTUAL DE UN FERMENTADOR PARA LA PRODUCCIÓN DE N-BUTANOL A PARTIR DE GLUCOSA EMPLEANDO *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824*

AUTORES: Nancy Consuelo González González
Cindy Dayana Rojas Annicchiarico.**

PALABRAS CLAVES: diseño conceptual, fermentador, Fermentación Acetona-Butanol-Etanol (ABE)

El propósito de este trabajo fue hacer el diseño conceptual de un biorreactor batch multipropósitos (volumen de reacción de trabajo = 50L) para la producción de n-Butanol a partir de glucosa mediante el uso de la bacteria *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. El diseño operacional se basó en un modelo cinético para la fermentación ABE. Este modelo fue ajustado usando datos experimentales (concentración de metabolitos mayores formados en el proceso) desde un biorreactor de pequeña escala (volumen de trabajo del reactor = 2L). El diseño mecánico se basó en similitudes geométricas para diferentes tipos de reactores para obtener un diseño flexible que pudiese ser adaptado para diferentes procesos (anaerobios, aerobios y facultativos). Se llevó a cabo la selección del sistema de agitación, el sistema de enfriamiento, la distribución de accesorios de huecos y se tuvieron en cuenta los materiales para el proceso.

Este trabajo es parte del macroproyecto en áreas estratégicas “Escalamiento de los Procesos de Producción de Bio-alcoholes y Procesamiento de Subproductos Provenientes de la Producción de Biocombustibles por Vía Fermentativa” código 5452, apoyado por la Vicerrectoría de Investigación y extensión de la Universidad Industrial de Santander y desarrollado por el grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología en colaboración con el Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA)

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química.

Director: Ing. Químico. José Andrés Pérez Mendoza. Codirector: Ph.D. Luis Javier López Giraldo.

ABSTRACT

TITLE: CONCEPTUAL DESIGN OF A BATCH BIOREACTOR FOR N-BUTANOL PRODUCTION FROM GLUCOSE USING *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824*

AUTHORS: Nancy Consuelo González González
Cindy Dayana Rojas Annicchiarico.**

Keywords: Conceptual design, Bioreactor, Fermentation, Acetone/ Butanol-Ethanol (ABE).

The aim of this work was the conceptual design of a batch multipurpose bioreactor (working reactor volume =50 L) for n-butanol production from glucose using *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Operational design was based on a kinetic model of rigorous process for the fermentation ABE. This model was adjusted and validated using experimental data (concentrations of major metabolites formed in the process) from a small-scale bioreactor (working reactor volume =2 L). On the other hand, the mechanical design was based on geometrical similarities for different types of bioreactor in order to obtain a flexible design which can be adapted for several processes (anaerobics, aerobics, and facultatives). In addition, the selection of the agitation system, the cooler system, distribution of holes accessories and materials was carried out.

This work is a part of a bigger project in strategic areas “Escalamiento de los Procesos de Producción de Bio alcoholes y Procesamiento de Subproductos Provenientes de la Producción de Bio combustibles por Vía Fermentativa” code 5452, supported by the Dean of Research and Extension of the Universidad Industrial de Santander and developed by the Research group in Biochemistry and Microbiology in collaboration with the Research Center of Science and Food Technology (CICTA).

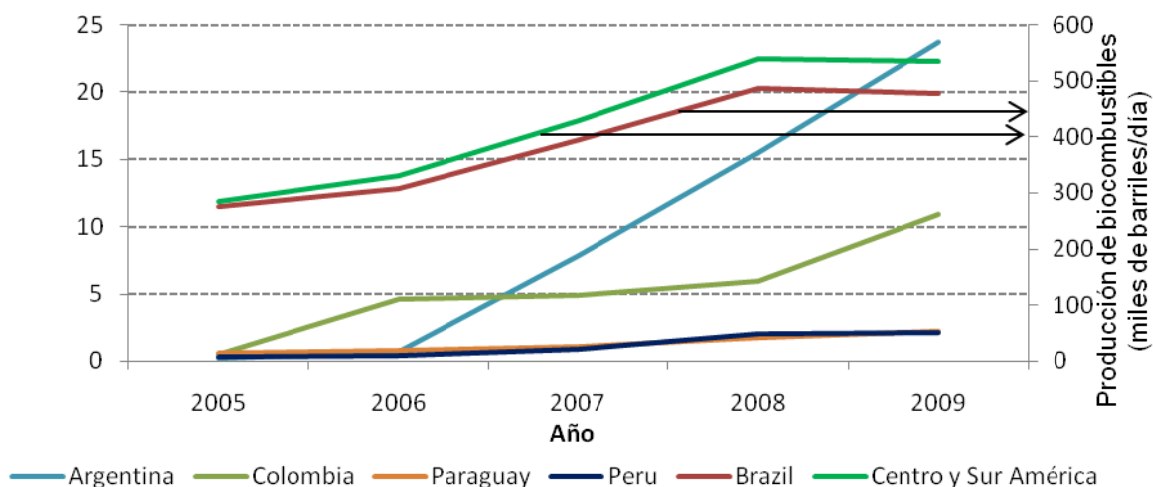
* Undergraduate Thesis.

** Physical – Chemical Engineering College. Chemical Engineering Department. Advisors: Ing. Qco. José Andrés Pérez Mendoza and Ph.D. Luis Javier López Giraldo.

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de fuentes de energías amigables con el medio ambiente hace de los biocombustibles (etanol, n-butanol, biodiesel, etc.) una alternativa promisoría para el suministro de energía en una sociedad cada día más exigente en lo que se refiere a las emisiones de gases contaminantes a la atmósfera. En el caso de Suramérica, Colombia es el tercer productor de biocombustibles después de Brasil y Argentina [1]. En el contexto colombiano existe un notable incremento en la producción de biocombustibles (básicamente etanol y biodiesel) conforme lo muestra la figura 1.

Figura 1. Perfil de producción de biocombustibles en Centro y Sur América [1].



En Colombia los biocombustibles son mezclados con la gasolina (en el caso del etanol) y con diesel (en el caso del biodiesel) provenientes de la refineras de petróleo. Sin embargo, la adición de éstos, tiene ciertos efectos negativos en algunas propiedades de la mezcla combustible [2,3]. Por ejemplo, la adición del etanol a la gasolina derivada del petróleo tiene un impacto negativo en la estabilidad de la mezcla combustible debido al alto octanaje y volatilidad del etanol [2,3]. Como alternativa, se puede emplear el n-butanol, dado que posee mejores

propiedades como combustible que el etanol. Adicionalmente, presenta baja volatilidad (la presión de vapor del butanol es 7,5 veces menor que la del etanol), mayor contenido energético (similar al de la gasolina), es menos higroscópico y corrosivo [2,3]. Estas razones hacen atractiva la producción de butanol para su uso como alternativa en la mezcla de gasolina derivada de petróleo con biocombustibles.

El n-butanol puede obtenerse a partir de procesos fermentativos, empleando materias primas renovables como maíz, trigo, hidrolizado de yuca, jarabes de glucosa, entre otros [2,4].

En consideración a lo anteriormente expuesto, en este trabajo se realizó el diseño conceptual de un fermentador *batch* (multi propósito) para la producción de n-butanol a partir de glucosa utilizando el microorganismo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Se contempló el diseño operacional y el diseño mecánico. Aquí se presenta las generalidades del proceso y se describe la metodología empleada, los resultados y análisis, y finalmente las conclusiones y recomendaciones para trabajos futuros.

1. GENERALIDADES

1.1 FERMENTADOR

Un fermentador es un recipiente que provee condiciones adecuadas a una cepa microbiana para que pueda generar eficientemente un determinado metabolito. Actualmente el término fermentador o biorreactor pueden ser considerados como sinónimos [5]. La eficiencia de un fermentador depende de la concentración de biomasa, el mantenimiento de las condiciones asépticas, la transferencia de masa y energía, y del mantenimiento de las condiciones óptimas de operación [5,6].

Los fermentadores se distinguen por su configuración y diseño. En la tabla 1, se mencionan algunas ventajas y desventajas de tres tipos de fermentadores usualmente utilizados.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de tres tipos de fermentadores [7]

TIPO FERMENTADOR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Tanque Agitado	Flexible y adaptable. Amplia intensidad de mezclado. Maneja medios de alta viscosidad.	Alto consumo de energía. Destrucción de las células sensibles al cizallamiento. Alto costo.
Columna Burbuja	Simple, no posee partes móviles. Bajo costo. Alta concentración de células.	No garantiza un buen mezclado. Excesiva formación de espuma. Limitado a sistemas de baja viscosidad.
Air Lift	Simple, no posee partes móviles. Buena transferencia de calor. Alta eficiencia absorción de gas	No garantiza un buen mezclado. Excesiva formación de espuma. Limitado a sistemas de baja viscosidad.

1.2 FERMENTACIÓN ABE (ACETONA, BUTANOL, ETANOL)

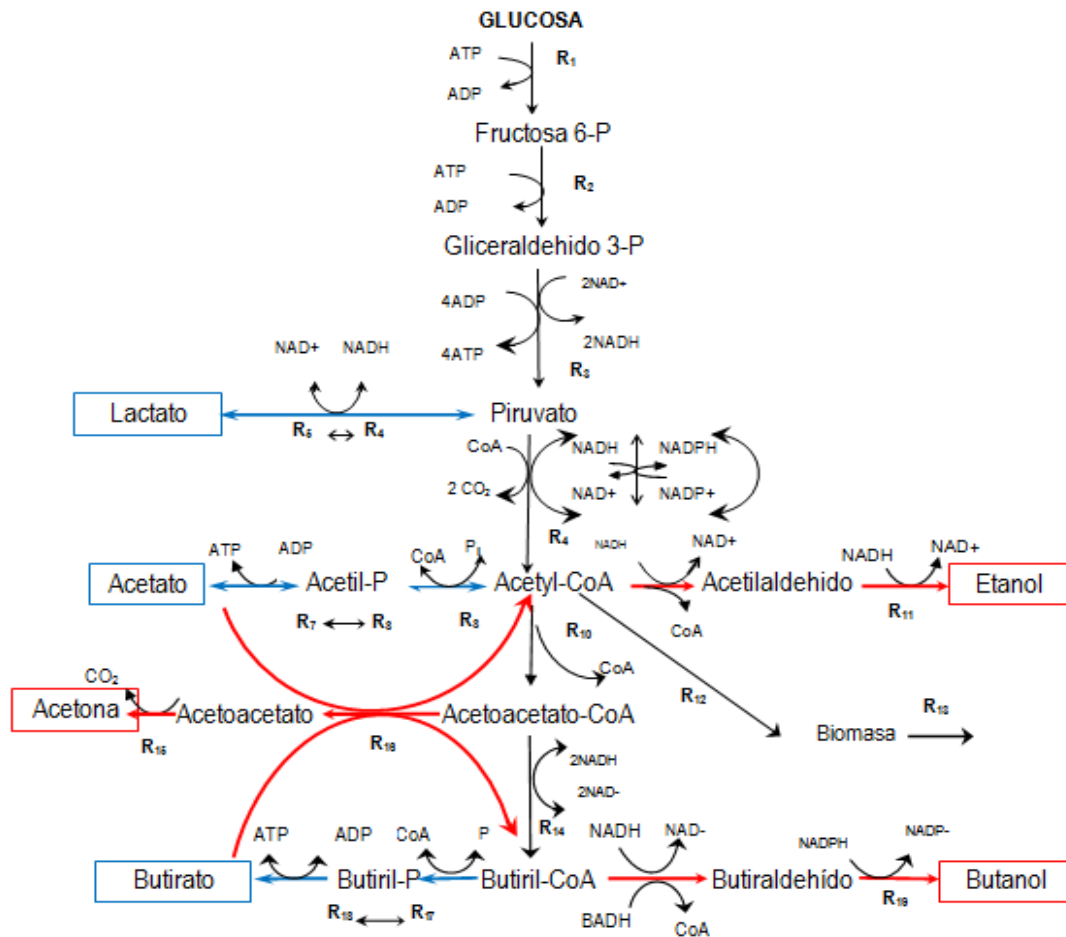
La fermentación ABE (acetona, butanol, etanol) es un proceso biológico anaerobio a partir del cual los azúcares, principalmente glucosa, se convierten en productos por medio de microorganismos como la *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii* y *C. pasteurianum*, entre otros [4,8,9].

La ruta metabólica (ver figura 2) del proceso fermentativo empleando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, consta de dos fases características: (i) la acidogénesis (ruta color azul) y (ii) la solventogénesis (ruta color roja) [10,11]. En la primera fase se forman los ácidos orgánicos (butírico, acético y láctico), el dióxido de carbono e hidrógeno. Como consecuencia de esta fase se presenta una disminución en el pH, lo cual es crucial para el crecimiento los microorganismos [10-14]. El pH aumenta durante la fase solventogénica, en donde, los ácidos (butírico y acético) son reasimilados, dando lugar a la formación acetona, etanol y n-butanol [8-14].

Dentro de los problemas claves asociados con la bioproducción de n-butanol se puede mencionar su toxicidad/inhibición sobre el crecimiento de los microorganismos. Estudios recientes se han enfocado en la modificación genética de los microorganismos y en diferentes técnicas de remoción simultánea del butanol [15,16].

En la literatura se han reportado varios modelos cinéticos que describen el comportamiento de la fermentación ABE, entre los que se destacan: (i) el modelo de Yang et al. que no considera la inhibición por sustrato que se presenta en el proceso y (ii). el de Shinto et al., el cual considera las inhibiciones por sustrato y por productos.

Figura 2. Ruta metabólica de la *Clostridium acetobutylicum* [10]



1.2.1 Factores que afectan la fermentación ABE

Entre las variables que afectan la fermentación ABE se encuentran el pH, la temperatura, la concentración de sustrato y la concentración de productos. En la tabla 2, se resumen las condiciones favorables para la fermentación ABE a partir del microorganismo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [4, 12,18-21].

**Tabla 2. Condiciones favorables para la Clostridium acetobutilycum ATCC 824
[4, 12,18-21]**

VARIABLES	CONDICIONES FAVORABLES	JUSTIFICACIÓN
pH	5,0	Obtención de una mayor concentración de n-butanol.
Temperatura	37 °C	Temperatura favorable para el crecimiento microorganismo.
Concentración de Sustrato(Glucosa)	60-80 g/L	Procesos <i>batch</i> A concentraciones superiores se ha evidenciado inhibición por sustrato
Concentración de Solventes	Concentraciones menores de 20 g/L	Procesos <i>batch</i> Por encima se presenta inhibición celular.
Concentración de Butanol	Concentraciones menores a: 14 g/L (máximo valor encontrado). Algunos autores reportan menor concentración (8 g/L y 13 g/L)	Procesos <i>batch</i> Por encima se presenta inhibición celular debido a la toxicidad del butanol
Anaerobiosis	Estrictamente anaerobio	El microorganismo es estrictamente anaerobio.

1.3 SISTEMAS DE AGITACIÓN EMPLEADOS EN FERMENTADORES

La agitación es un factor clave en el diseño de los fermentadores, pues con ella se logra la homogeneidad de la mezcla reaccionante y se favorecen los fenómenos de transferencia de masa y energía incrementando la conversión en el fermentador [7]. En algunos casos la agitación se garantiza con el burbujeo de aire (sistemas aerobios), mientras que en otras ocasiones (sistemas anaerobios y algunos aerobios) se utilizan agitadores mecánicos [7,23].

1.3.1 Fermentadores de tanque agitado

Este tipo de fermentadores es muy empleado en todas las escalas de producción. Generalmente, constan de un recipiente cilíndrico cerrado en su parte superior con una tapa que puede ser elipsoidal o semiesférica y suelen ser diseñados con el fondo redondeado para eliminar zonas de estancado [5]. Habitualmente sólo 70-80 % del volumen del fermentador se llena con líquido [22]. El mezclado se debe al movimiento rotatorio de los agitadores unidos a un eje situado concéntricamente con el recipiente (eje de potencia); éste eje es accionado con un motor [7].

La selección del tipo de agitador depende de varios factores, en especial la viscosidad del fluido y la sensibilidad del sistema al esfuerzo de corte [6, 7, 23]. En la Tabla 3 se muestran los intervalos de viscosidad para diferentes agitadores. Asimismo, el número de agitadores depende del volumen de trabajo del fermentador [24, 25].

Tabla 3. Intervalos de operación de agitadores con respecto a la viscosidad [6]

TIPO DE AGITADOR	TIPO DE AGITADOR (PATRÓN DE FLUJO GENERADO)	INTERVALO VISCOSIDAD (mPa s)
Turbinas	Flujo radial	1 - 50.000
Propelas	Flujo axial	1 - 10.000
Ancla	Flujo radial	100 - 5.000
Paletas	Flujo radial	100 - 50.000
Tornillo helicoidal	Flujo axial	5.000 - 500.000
Cinta helicoidal	Flujo axial	10.000 - 5'000.000

Para mejorar la agitación de fluidos poco viscosos ($\mu < 5$ Pa.s) se instalan baffles (deflectores) en el tanque [5-7,25]. Los baffles son segmentos verticales de metal, están ubicados radialmente a lo largo de la pared del tanque. Se utilizan tres, cuatro o seis deflectores por recipiente dependiendo del diámetro del tanque. La ausencia de baffles, puede dar lugar a la formación de vórtices [5-7, 25].

En los fermentadores de tanque agitado es importante tener en cuenta el diseño del dispositivo (sparger) de entrada de gases (aire, nitrógeno, dióxido de carbono, etc.) al medio, debido a que con éste se garantiza las condiciones aerobias o anaerobias que se requieran en el proceso [6, 19, 21].

Un problema a menudo en los sistemas aireados es la formación de espuma, la cual puede prevenirse con la adición de antiespumantes o la instalación de un cortador de espumas en la parte superior del eje de potencia [6].

1.4 CAMBIO DE ESCALA DEL PROCESO

Se define como el conjunto de técnicas, metodologías y procedimientos que permitan transferir a la escala industrial o planta piloto, los datos obtenidos en los experimentos a escala reducida [26,27]. En procesos anaerobios con agitación mecánica los criterios de cambio de escala más utilizados son:

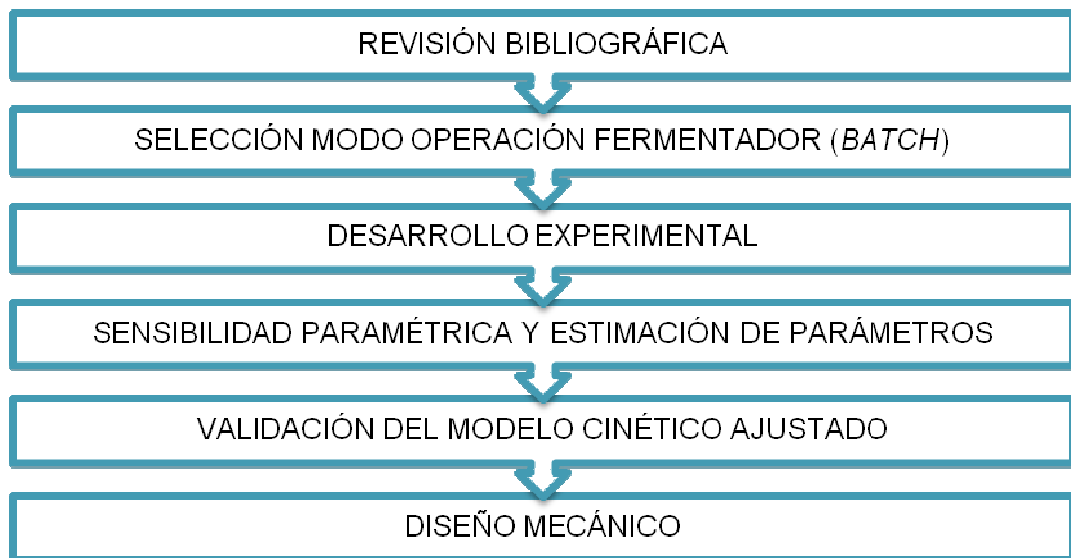
- **Potencia por unidad de volumen:** resulta el criterio clásico de cambio de escala y permite mantener el nivel de agitación. Al momento de aplicarlo se debe tener cuidado de no sobrepasar los límites tanto de esfuerzo de corte máximo y nivel de transferencia de oxígeno mínima [26].
- **Velocidad periférica de agitación:** permite mantener la razón de cizalladura máxima en la zona del agitador y también la intensidad de mezclado. Esta variable debe ser siempre evaluada dado que se puede estar trabajando con microorganismos o micelas que no resistan esfuerzos de corte mayores que los establecidos. Al momento de escalar con otros criterios puede ocurrir que se sobrepasen los esfuerzos de corte máximo aceptable, en ese caso debe prevalecer este criterio [26].

Considerando lo anteriormente expuesto, en las secciones siguientes se plantearán las metodologías y se discutirán los principales resultados que permiten elaborar el diseño conceptual de un fermentador (volumen de trabajo 50 L) para la producción de n-butanol a partir de glucosa empleando el microorganismo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

2. METODOLOGÍA

Inicialmente se realizó una revisión bibliográfica con la finalidad de documentarse acerca del proceso de fermentación ABE con *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 y seleccionar un modelo cinético que describa este proceso. Se realizaron pruebas experimentales por duplicado en modo de operación discontinuo, con el propósito de ajustar y validar el modelo a los resultados obtenidos en el laboratorio. El diseño operacional se refiere a los perfiles de concentración (glucosa y productos principales) obtenidos a partir del ajuste y validación del modelo. Por último se realizó el diseño mecánico básico del fermentador (ver figura 3).

Figura 3. Esquema de etapas metodológicas



Fuente: Autores

2.1 SELECCIÓN MODO DE OPERACIÓN DEL FERMENTADOR

El modo de operación escogido fue discontinuo (*batch*) debido a las ventajas que ofrece en fermentaciones anaerobias, entre las que se pueden destacar: (i) su fácil manejo y construcción [23, 24, 28] y (ii) la minimización de los riesgos de contaminación por microorganismos externos [23, 24, 28].

2.2 PRUEBAS EXPERIMENTALES

Se realizaron dos experimentos (por duplicado) de fermentación ABE con una duración de 48 horas cada uno [9]. Uno de ellos permitió ajustar el modelo cinético propuesto, el otro se empleó para la validación. Los experimentos se realizaron en un fermentador discontinuo (BIOFLO 110) en condiciones estrictas de anaerobiosis. En ambos experimentos las condiciones de operación empleadas fueron las siguientes: (i) temperatura (37°C), (ii) pH (5), (iii) velocidad de agitación (200rpm), (iv) concentraciones de glucosa grado industrial similares (338y 376 mmol/L). En ambos casos la concentración del inóculo fue de 10%V/V en un medio de fermentación de 2L. Finalmente, en la Tabla 4 se resumen detalladamente la composición final del medio empleado.

Es importante mencionar que los autores de este trabajo tuvieron una participación directa durante la etapa de fermentación, en la cual se tomaron muestras del medio cada 3 horas. La preparación del preinóculo y las técnicas analíticas empleadas para la cuantificación de los metabolitos se presentan en el ANEXO 1. El control de pH fue realizado automáticamente por el equipo empleando NaOH (1.5 N). La viscosidad del medio a una temperatura de 37°C, se midió con un viscosímetro BROOKFIELD DV III más reómetro.

Tabla 4. Composición medio de cultivo utilizado para la fermentación ABE experimental [11]

MEDIO DE FERMENTACIÓN	Glucosa	60 g/L
	Peptona	10 g/L
	Extracto de Carne	10 g/L
	Extracto de levadura	10 g/L
	NaCl	10 g/L
	Almidón Soluble	1 g/L
	L-cisteína	0,5 g/L
	Acetato de Sodio	3 g/L
	Resarsurina	1 mg/L
	Inóculo	10%V/V

2.3 MODELO MATEMÁTICO: SENSIBILIDAD PARAMÉTRICA Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS

El modelo matemático del proceso de fermentación está basado en el balance de masa de cada uno de los metabolitos y de la cinética de todas las reacciones de la ruta metabólica para la formación de ABE [10]. A continuación se presentan las ecuaciones de balance de masa (mmol/L) del proceso fermentativo:

- Balance de Glucosa

$$\frac{d[Glucosa]}{dt} = -r_1 \text{ (Ec.1)}$$

- Balance F6P

$$\frac{d[F6P]}{dt} = r_1 - r_2 \text{ (Ec.2)}$$

- Balance G3P

$$\frac{d[G3P]}{dt} = r_2 - r_3 \text{ (Ec.3)}$$

- Balance de Piruvato

$$\frac{d[Piruvato]}{dt} = r_3 + r_4 - r_5 - r_6 \text{ (Ec.9)}$$

- Balance de Lactato

$$\frac{d[Lactato]}{dt} = r_5 - r_4 \text{ (Ec.10)}$$

- Balance de ACoA

$$\frac{d[ACoA]}{dt} = r_6 + r_7 + r_8 - r_9 - r_{10} - r_{11} - r_{12} \text{ (Ec.11)}$$

➤ Balance de Biomasa

$$\frac{d[Biomasa]}{dt} = r_{12} - r_{13} \text{ (Ec.4)}$$

➤ Balance Acetato

$$\frac{d[Acetato]}{dt} = r_9 - r_7 - r_8 \text{ (Ec.5)}$$

➤ Balance de Etanol

$$\frac{d[Etanol]}{dt} = r_{11} \text{ (Ec.6)}$$

➤ Balance de Butanol

$$\frac{d[Butanol]}{dt} = r_{19} \text{ (Ec.7)}$$

➤ Balance de Acetona

$$\frac{d[Acetona]}{dt} = r_{16} \text{ (Ec.8)}$$

➤ Balance BCoA

$$\frac{d[BCoA]}{dt} = r_{14} + r_{15} + r_{17} - r_{18} - r_{19} \text{ (Ec.12)}$$

➤ Balance de Butirato

$$\frac{d[Butirato]}{dt} = r_{18} - r_{15} - r_{17} \text{ (Ec.13)}$$

➤ Balance BCoA

$$\frac{d[BCoA]}{dt} = r_{14} + r_{15} + r_{17} - r_{18} - r_{19} \text{ (Ec.14)}$$

➤ Balance Acetoacetato

$$\frac{d[Acetoacetato]}{dt} = r_8 + r_{15} - r_{16} \text{ (Ec.15)}$$

➤ Balance AACoA

$$\frac{d[AACoA]}{dt} = r_{10} - r_8 - r_{14} - r_{15} \text{ (Ec.16)}$$

Donde las expresiones para r_1 - r_{19} se muestran en la tabla 5 y representan las velocidades de reacción (mmol/L) de cada metabolito (ver figura 2). F es un factor que asume valores de 1 ó 0 ($F=1$, si la concentración de glucosa es mayor a 1mM y $F=0$, si la concentración de glucosa es menor que 1 mM). V_{maxi} , K_{mi} , K_{ii} , K_{isi} , K_{miB} y K_{miA} , son parámetros del modelo.

Los balances de masa (Ec 1-16) se solucionaron empleando el método de Runge Kutta 4 Orden [29], con ayuda del programa Matlab 7.0.4. Durante la simulación se utilizaron las mismas condiciones iniciales de las pruebas experimentales.

Tabla 5. Velocidades de reacción de cada metabolito en la fermentación ABE [10]

$r_1 = \frac{V_{max1}[Glucosa][Biomasa]}{K_{m1}(1 + [Glucosa]/K_{is1}) + [Glucosa](1 + [Butanol]/K_{ii1})} \times F$	
$r_8 = V_{max8} \left(\frac{1}{1 + (K_{m8A}/[Acetato])} \right) \times \left(\frac{1}{1 + (K_{m8B}/[AACoA])} \right) [Biomasa]$	
$r_2 = \frac{V_{max2}[F6P][Biomasa]}{K_{m2} + [F6P]} \times F$	$r_{10} = \frac{V_{max10}[ACoA][Biomasa]}{K_{m10} + [ACoA]} \times F$
$r_3 = \frac{V_{max3}[G3P][Biomasa]}{K_{m3} + [G3P]}$	$r_{11} = \frac{V_{max11}[ACoA][Biomasa]}{K_{m11} + [ACoA]} \times F$
$r_4 = \frac{V_{max4}[Lactato][Biomasa]}{K_{m4} + [Lactato]} \times F$	$r_{13} = K_{13}[Biomasa]$
$r_5 = \frac{V_{max5}[Piruvato][Biomasa]}{K_{m5} + [Piruvato]} \times F$	$r_{14} = \frac{V_{max14}[AACoA][Biomasa]}{K_{m14} + [AACoA]} \times F$
$r_6 = \frac{V_{max6}[Piruvato][Biomasa]}{K_{m6} + [Piruvato]} \times F$	$r_{16} = \frac{V_{max16}[Acetoacetato][Biomasa]}{K_{m16} + [Acetoacetato]} \times F$
$r_7 = \frac{V_{max7}[Acetato][Biomasa]}{K_{m7} + [Acetato]} \times F$	$r_{17} = \frac{V_{max17}[Butirato][Biomasa]}{K_{m17}(1 + K_{a17}/[Biomasa]) + [Butirato]} \times F$
$r_9 = \frac{V_{max9}[ACoA][Biomasa]}{K_{m9} + [ACoA]} \times F$	$r_{18} = \frac{V_{max18}[BCoA][Biomasa]}{K_{m18} + [BCoA]} \times F$
$r_{12} = \frac{V_{max12}[ACoA][Biomasa]}{K_{m12} \left(1 + \frac{[Butanol]}{K_{ii12}} + [ACoA](1 + [Butanol]/K_{ii12}) \right)}$	
$r_{15} = V_{max15} \left(\frac{1}{1 + (K_{m15A}/[Butirato])} \right) \times \left(\frac{1}{1 + (K_{m15B}/[AACoA])} \right) [Biomasa]$	
$r_{19} = \frac{V_{max19}[BCoA][Biomasa]}{K_{m19}(1 + K_{a19}/[Biomasa]) + [BCoA](1 + K_{ii19}/[Biomasa])} \times F$	

Con base en los datos experimentales obtenidos, se realizó la estimación de parámetros. Para ello, inicialmente se realizó un análisis de sensibilidad paramétrica para identificar los parámetros que más afectan el modelo y con ello priorizar la estimación de aquellos parámetros para los cuales el modelo presente

mayor sensibilidad [10,30]. Para evaluar la sensibilidad paramétrica se fijaron cambios del -5% y $+5\%$ en el valor de los parámetros del modelo. Seguidamente, se procedió con el ajuste del modelo a los datos experimentales, utilizando como función objetivo la suma del error relativo cuadrático [31]. Esta optimización (minimización del error relativo total) se efectuó en MATLAB versión 7.0.4 usando el algoritmo de optimización multivariable restringida implementado en la función *fmincon*, se usó una tolerancia de $1E-2$ en el valor de los parámetros con el fin de dar rapidez a la rutina de optimización.

De acuerdo a la jerarquización de parámetros basada en el análisis de sensibilidad paramétrica se plantearon cinco casos de estimación de parámetros: (i) se estimaron los primeros cinco parámetros más significativos con la finalidad de estimar los parámetros que más afectan las predicciones del modelo, (ii) se estimaron los 10 parámetros (incluidos los 5 del caso (i)) más significativos con la finalidad de evaluar el efecto del número de parámetros a estimar sobre el ajuste del modelo, (iii) se ajustaron los dos parámetros más significativos por cada balance de masa de los metabolitos de interés (glucosa, biomasa y productos fermentación) con la expectativa de mejorar los perfiles de tendencia para todos los productos involucrados en el proceso, (iv) se estimaron todos los parámetros V_{max} del modelo con el fin de evitar posibles problemas numéricos y de convergencia durante la estimación, es preciso notar que los parámetros V_{max} aparecen en el numerador de las expresiones de velocidades de reacción mientras que el resto de parámetros aparecen en el denominador, con lo cual se esperarían menos problemas numéricos y de convergencia en la rutina de estimación de parámetros, (v) se ajustaron todos los parámetros del modelo cinético que describe la fermentación ABE, esto con el fin de poder comparar todos los casos anteriores con el caso general y determinar cuál sería el más adecuado. Los parámetros de ajuste considerados se muestran en la tabla 6. La selección del mejor caso, se determinó con criterios estadísticos como el R^2 y R^2 ajustado [33].

Tabla 6. Casos estimación de parámetros

CASOS	NÚMERO DE PARÁMETROS AJUSTADOS	PARÁMETROS A AJUSTAR
I	5	$V_{maxi} ; i = 1, 10, 19$ $k_{mi} ; i = 1, 10$
II	10	$V_{maxi} ; i = 1, 4, 10, 14, 19$ $k_{mi} ; i = 1, 4, 10, 12, 19$
III	2 parámetros por cada producto (16 parámetros en total)	$V_{maxi} : i = 1, 4, 9, 11, 12, 15, 16, 19$ $k_{mi} : i = 1, 4, 9, 11, 12, 16, 19$ $k_{mbi} : i = 15$
IV	Todos los V_{max} del modelo (18 parámetros en total)	$V_{maxi} : i = 1 - 19 \neq 13$
V	Todos los parámetros (45 parámetros en total)	Todos los parámetros del modelo

2.3.1 Validación del modelo

Una vez ajustado el modelo matemático, se realizó la simulación de la fermentación ABE para las condiciones iniciales del segundo experimento, obteniendo los perfiles de concentración teóricos que describen la fenomenología del proceso. Mediante el análisis gráfico de residuos para cada metabolito de la fermentación, el cálculo de la desviación media cuadrática (RMSD) y el cálculo de la desviación media cuadrática normalizada (NRMSD), se observó si el ajuste del modelo cinético a los resultados de este experimento fue representativo.

2.4 DISEÑO MECÁNICO

2.4.1 Configuración geométrica del fermentador

En esta etapa del trabajo se tomó como base de partida del diseño el biorreactor de 2L en donde se realizaron las pruebas experimentales. A partir de las relaciones geométricas de éste último se llevó a cabo el cambio de escala a un fermentador de 50L. El diseño mecánico básico del fermentador 50 L (volumen de trabajo) consideró el cálculo del diámetro, la altura y las demás relaciones geométricas del fermentador basados en factores de forma estándares (ver tabla 7) para el diseño de diferentes tipos de fermentadores [7, 22, 23, 34-36].

Tabla 7. Relación de dimensiones estándares de fermentadores [7, 22, 23, 34-36]

RELACIÓN		VALORES TÍPICOS	OBSERVACIÓN	
V _t /V	V _t	Volumen Trabajo	0,7-0,8	Aplica para Tanques con agitación mecánica.
	V	Volumen Fermentador		
H _i /H	H _i	Altura Líquido	0,7-0,8	Depende de la cantidad de espuma producida en la fermentación.
	H	Altura Fermentador		
H/T	H	Altura del Fermentador	1	Para Tanque sin Aireación Para Tanque con Aireación Para Tanque con Agitación Mecánica Biorreactor Air Lif
	T	Diámetro del Fermentador	2 - 3 3 - 4 10	

2.4.2 Sistema de agitación

La especificación del sistema de agitación para el fermentador de 50 L se realizó seleccionando primero el tipo de agitador de acuerdo con criterios basados en la viscosidad del fluido del medio de fermentación y la sensibilidad del sistema al esfuerzo de corte [6, 7, 23]. Seguidamente se eligieron el sistema de baffles, el

“sparger” y el cortador de espuma. Por último, se calcularon las dimensiones de cada uno de ellos de acuerdo con los factores de forma establecidos en la literatura [18, 23, 34].

2.4.3 Criterio de cambio de escala

2.4.3.1 Cálculo de la Potencia de Agitación. El cambio de escala del fermentador de 2 L a una escala piloto de 50L se hizo considerando los criterios de: (i) Velocidad Periférica Constante y (ii) Potencia por Unidad de Volumen [26,27]. Las ecuaciones y el cálculo de la velocidad de agitación (N) y de la potencia (P) que debe suministrar el motor, se detalla en el ANEXO 2.

2.4.4 Sistema de enfriamiento

La fermentación ABE es un proceso exotérmico, por lo tanto la temperatura (37 °C) debe estar controlada [11]. Lo que hace indispensable realizar un diseño del sistema de enfriamiento.

Con base en lo anterior, se seleccionó una chaqueta simple como sistema de enfriamiento teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- Sistemas que requieren limpieza frecuentemente [28, 35].
- Volumen del reactor menor a 1.89 m³ [38].
- Disminución de los costos del material, pues al estar por fuera del fermentador puede fabricarse en un acero inoxidable de menor costo [38].
- Bajos requerimientos de energía en procesos microbiológico [23,38].

2.4.5 Materiales de Construcción

La selección de los materiales de construcción es fundamental en el diseño de un equipo de proceso. Esta depende de las condiciones de operación (temperatura,

presión, pH, etc.) a las cuales estará expuesto el material [6, 22, 23]. Otro aspecto importante en la selección del material son los costos de los mismos, dado que los materiales pueden elevar innecesariamente el valor final de los equipos. En este trabajo, la selección de los materiales de construcción para el sistema de reacción se basó en los dos aspectos anteriormente mencionados.

2.4.6 Distribución de orificios en el fermentador

En el diseño de los equipos, la distribución de orificios es muy importante desde el punto de vista de la instrumentación [34]. Aquí se consideraron diferentes aspectos como: instalación de medidores de presión, sensores de temperatura, sensores de pH, sensores de nivel, inyectoros de gases y toma muestras. La ubicación de los diferentes orificios se hizo con base en fermentadores diseñados (capacidad similar) [39] y teniendo en cuenta el tipo de instrumento a ser instalado. Por ejemplo, los medidores de presión deben ser instalados en la parte superior, en el cual se encuentra la fase gaseosa. Para esta parte se propone una distribución con miras a diferentes modos de operación. La configuración final del fermentador se realizó empleando el programa SolidWork 2007 (licencia académica).

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 MODELO AJUSTADO: SENSIBILIDAD PARAMÉTRICA Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS

De los cinco casos estudiados (ver tabla 8), el mejor ajuste corresponde al caso II. En efecto, en la tabla 8 se aprecia claramente que los valores del coeficiente de determinación (R^2) y coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}) son los más altos para este caso.

Tabla 8. Criterios estadísticos encontrados para seleccionar mejor ajuste del modelo

CRÍTERIO ESTADÍSTICO	CASOS				
	I	II	III	IV	V
R^2	0,797	0,9144	0,875	0,881	0,920
R^2 ajustado	0,787	0,9053	0,858	0,856	0,857

Fuente: Autores

Es oportuno ahora señalar que el criterio principal seleccionado para comparar las estrategias de estimación de parámetros es el coeficiente de correlación ajustado [33]. Para todos los casos, como se ilustra en la tabla 8, la tendencia es que su valor es menor comparado con el coeficiente de determinación (R^2). También puede afirmarse para el caso II, que el 91 % de la variación observada es explicada por este criterio (ver tabla 8), lo que nos lleva a concluir que la calidad del ajuste es satisfactoria.

Los valores de los diez parámetros ajustados (caso II) y la jerarquización de parámetros según la sensibilidad paramétrica son mostrados en la tabla 9. En la figura 4 se observan los perfiles calculados por el modelo (caso II) y los experimentales. Según los valores calculados de R^2 ajustado para cada uno de los metabolitos (ver tabla 10), se puede afirmar que el modelo tiene una buena capacidad de predicción para la formación de n-butanol, acetona, y etanol.

Tabla 9. Parámetros ajustados que tienen mayor influencia sobre el modelo según análisis de sensibilidad paramétrica

	Jerarquización parámetros	Valor de literatura	Valor ajustado		Jerarquización Parámetros	Valor de literatura	Valor ajustado
1	V_{max1}	3,2	4,336	24	V_{max7}	0,3	--
2	V_{max10}	20	21,027	25	k_{ii1}	67,5	--
3	k_{m1}	46	45,181	26	k_{m7}	50	--
4	k_{m10}	1	0.682	27	k_{ii19}	67,5	--
5	V_{max19}	3,15	4,401	28	k_{ii12}	23	--
6	k_{m19}	5	6,627	29	V_{max18}	100	--
7	V_{max4}	7,5	4,595	30	V_{max17}	35	--
8	k_{m4}	177	800,01	31	k_{m18}	6,1	--
9	V_{max14}	10	27,33	32	k_{a13}	0,017	--
10	k_{m12}	1.1	2,215	33	k_{ma15}	15	--
11	V_{max12}	8.10	--	34	V_{max8}	19	--
12	k_{m14}	5.2	--	35	k_{mb8}	70	--
13	V_{max15}	80	--	36	k_{ma8}	40	--
14	k_{mb15}	50	--	37	k_{m17}	4,9	--
15	k_{m9}	51	--	38	k_{a19}	2,2	--
16	V_{max9}	26,5	--	39	V_{max2}	40	--
17	k_{m11}	30	--	40	k_{m3}	26,5	--
18	V_{max11}	7,45	--	41	k_{a17}	2,2	--
19	V_{max6}	180	--	42	k_{m2}	10	--
20	k_{m5}	500	--	43	V_{max3}	120	--
21	k_{m6}	1,5	--	44	V_{max16}	12	--
22	V_{max5}	9,7	--	45	k_{m16}	10	--
23	k_{is1}	55,6	--				

Fuente: Autores

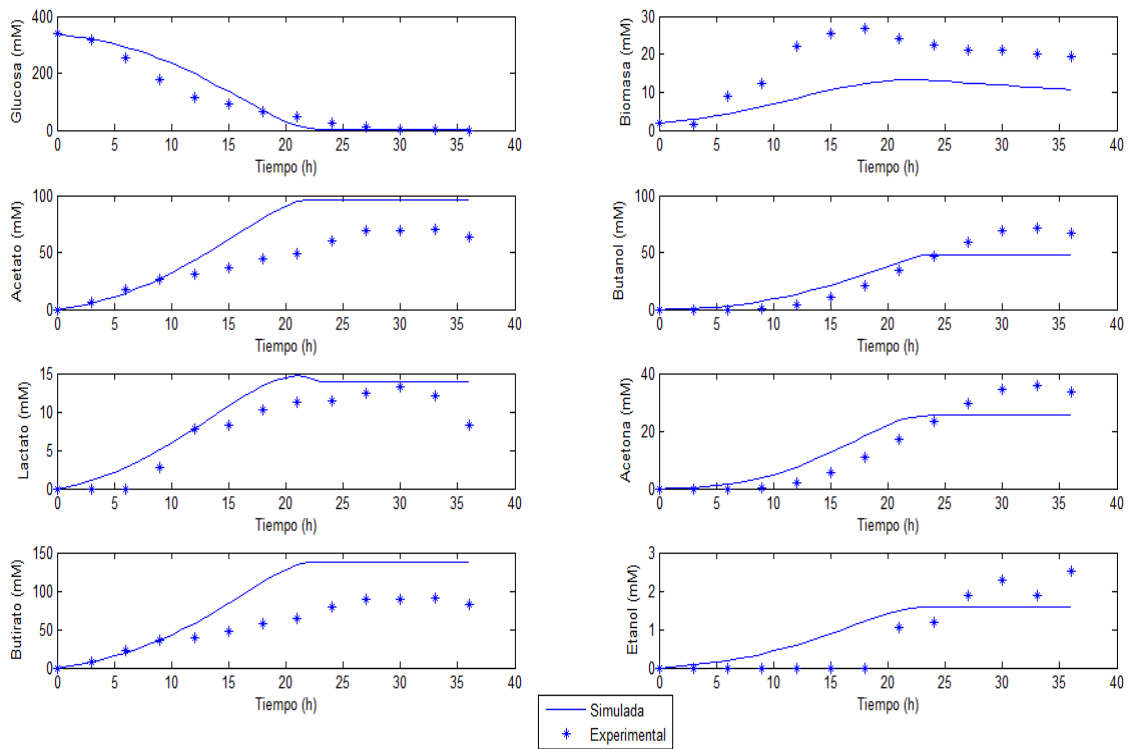
Tabla 10. Coeficiente de determinación ajustado calculados para todos los metabolitos de la fermentación ABE

Metabolito	Butanol	Acetona	Etanol	Acido Acético	Acido Butírico	Acido Láctico	Glucosa	Biomasa
CRITERIO ESTADÍSTICO								
R^2 ajustado	0,97	0,97	0,92	0,75	0,74	0,70	0,62	0,41

Fuente: Autores

Por otro lado, comparando los parámetros estimados en este trabajo y los calculados por Shinto et al. bajo condiciones similares, se observó que los valores están en el mismo orden de magnitud.

Figura 4: Perfiles encontrados fermentación ABE para fermentador de 2 L (volumen de reacción)



Fuente: Autores

3.1.1 Validación del Modelo

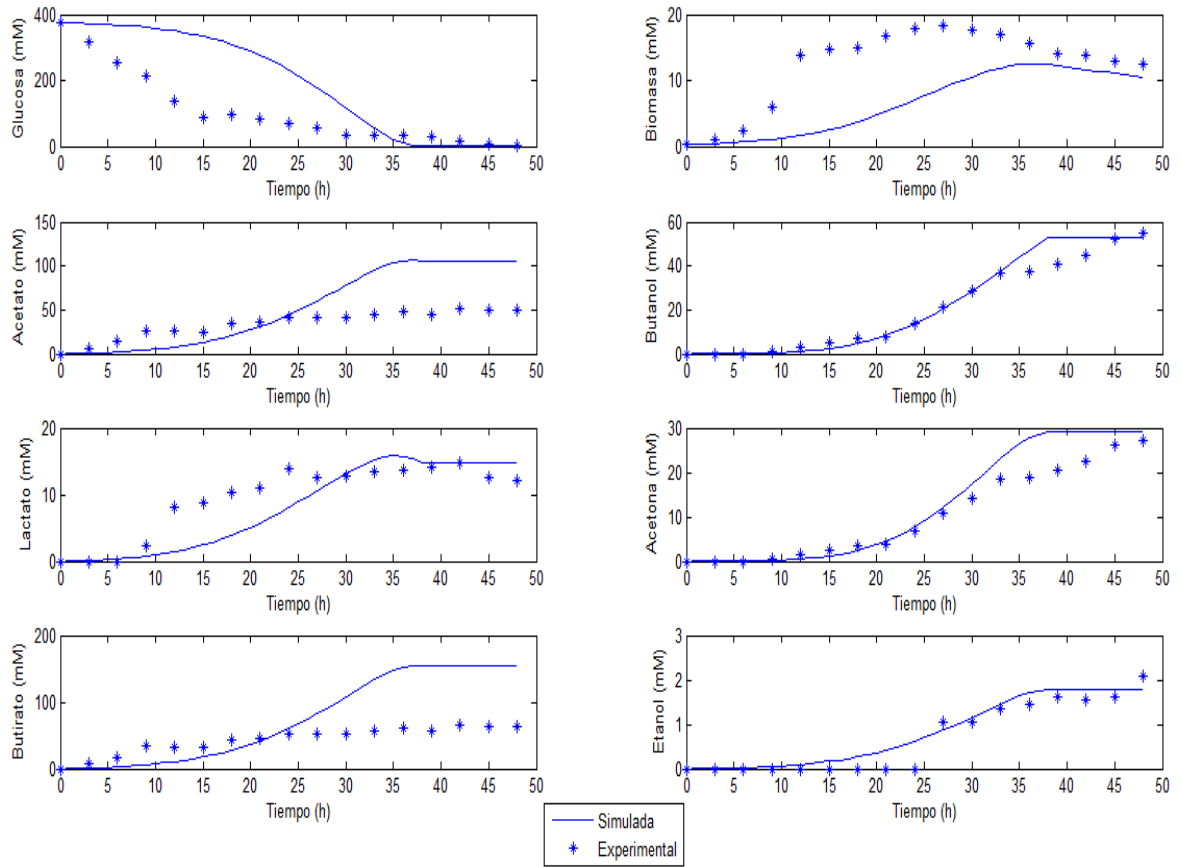
Para la validación del modelo se emplearon, las siguientes concentraciones iniciales de glucosa (376 mmol/L) y biomasa (0,35 mmol/L), manteniendo la temperatura a 37°C y el pH 5. Se observa que el modelo ajustado, presenta una predicción representativa para n-butanol, etanol, y acetona, pues la evaluación de los siguientes criterios estadísticos (i) RMSD y (ii) NRMSD para estos metabolitos presenta los valores más bajos (ver tabla 11). Por otro lado, para el resto de productos se observaron algunas desviaciones significativas entre los perfiles teóricos y datos experimentales, indicando un bajo grado de ajuste del modelo. Sin embargo, como se observa en la figura 5, el modelo predice en el caso de la biomasa y glucosa, concentraciones finales muy próximas.

Tabla 11. Desviación Media Cuadrática (RMSD) y Desviación Media Cuadrática Normalizada (NRMSD) para los metabolitos principales

Metabolito CRÍTERIO ESTADÍSTICO	Butanol	Etanol	Acetona	Acido Láctico	Biomasa	Acido Acético	Acido Butírico	Glucosa
RMSD	4,35	0,24	3,83	5,60	7,31	35,87	56,52	127
NRMSD	0,08	0,11	0,14	0,24	0,41	0,70	0,87	0,33

Fuente: Autores

Figura 5. Validación del modelo cinético para la fermentación ABE

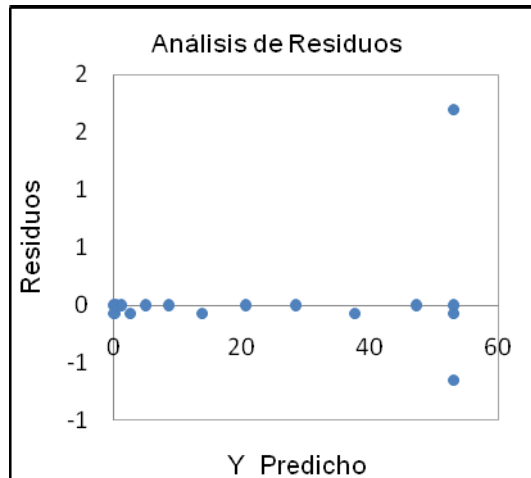


Fuente: Autores

Como complemento a lo discutido anteriormente se realizó un análisis gráfico de residuos como se presentan en la figura 6 y 7. A modo de ejemplo empleamos n-butanol por ser nuestra sustancia de interés dentro del conjunto de los metabolitos de ajuste del modelo y la glucosa como representante de las sustancias de regular capacidad de ajuste. De la figura 6 se infiere que los puntos no siguen ningún patrón y que, por lo tanto, están distribuidos más o menos aleatoriamente, esto es una evidencia que el modelo para n-butanol se ajustó satisfactoriamente. Un caso opuesto se aprecia para la glucosa (figura 7) para la cual existe una tendencia en los puntos, indicativo de una baja capacidad de ajuste del modelo. Adicionalmente,

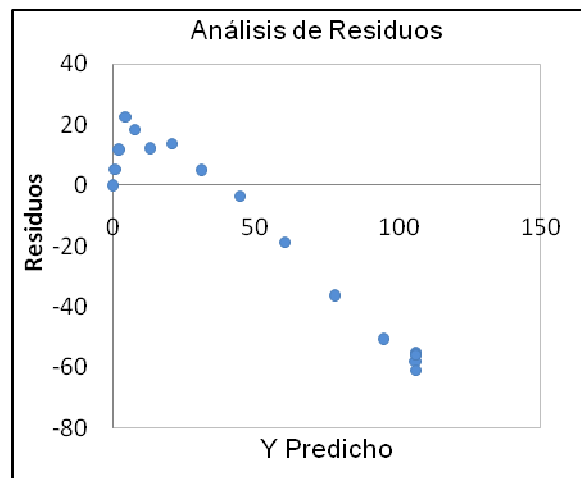
en el ANEXO 4 se presentan el análisis gráfico de residuos para las demás sustancias.

Figura 6. Análisis gráfico de residuos para n-butanol



Fuente: Autores

Figura 7. Análisis gráfico de residuos para la Glucosa



Fuente: Autores

Dentro de este contexto, para tener una mejor apreciación de la capacidad del modelo ajustado en la fermentación ABE se realizó la estimación de diez parámetros (Caso II), teniendo en cuenta ambos resultados experimentales. Se

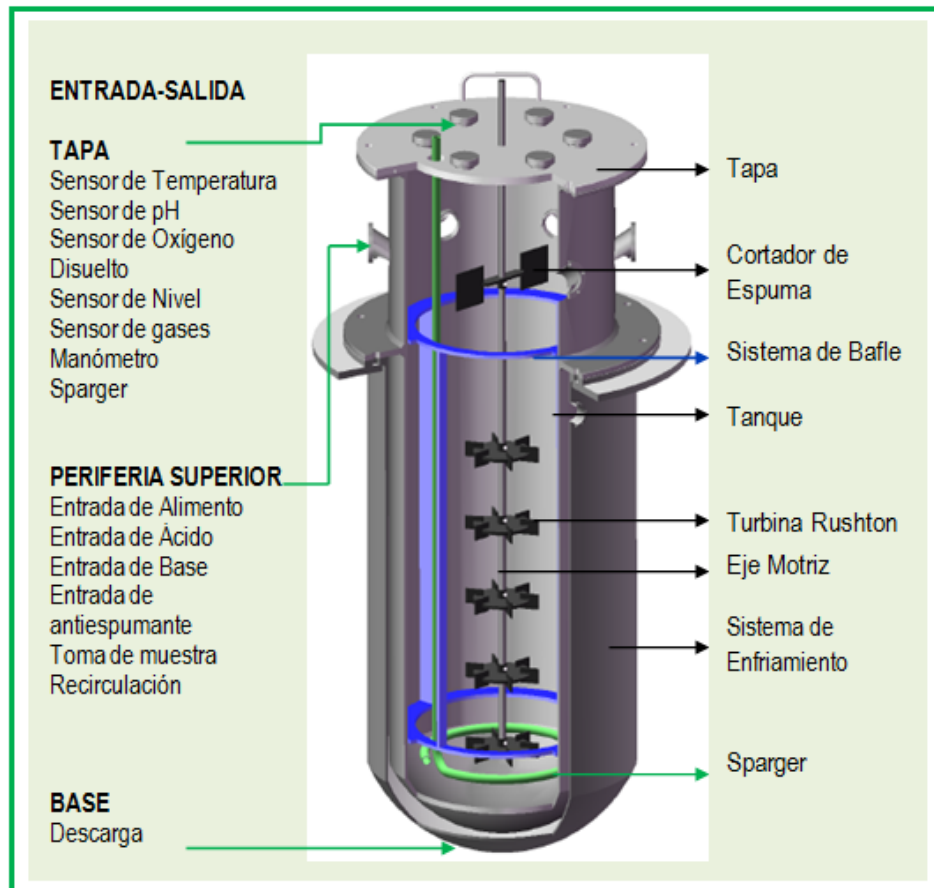
observó que el modelo ajustado con los dos experimentos presenta un valor R^2 ajustado de 0,80 mayor que el calculado (0,74) con la validación usando los datos del segundo experimento, lo que conlleva a decir que se mejora la predicción de los perfiles de concentración de los productos para nuestras condiciones experimentales (ANEXO 5). Asimismo y como era de esperarse, ésta leve disminución en los errores de predicción de los perfiles experimentales para las condiciones iniciales, muestra que el ajuste del modelo puede ser mejorado usando un mayor número de experimentos con lo cual los resultados de la validación serían mejores. No obstante, para el diseño del fermentador se puede usar dicho modelo usando un experimento para la estimación de parámetros y otro para la validación pues en esta etapa del diseño sólo se requiere de un modelo que reproduzca tendencias generales del proceso.

3.2 ESPECIFICACIONES DEL FERMENTADOR ESCALA PILOTO LABORATORIO (50 L)

En las figuras 8 y 9 se muestran las especificaciones (partes, distribuciones de orificios, relaciones geométricas y dimensiones) del fermentador diseñado. Se recomiendan dos tipos de agitadores, una turbina tipo Rushton de seis palas paralelas al eje de agitación, para mezclar medios de baja viscosidad característicos de la fermentación ABE (figura 8), y un agitador tipo hélice de tornillo para mezclar sistemas sensibles a esfuerzos de corte o cuando se requiera agitación de medios viscosos. Para asegurar homogeneidad en todo el volumen de trabajo, se recomienda instalar 5 turbinas a lo largo del eje de agitación (figura 8), las cuales se encuentran ubicadas de manera equidistantes. Así mismo, se sugiere instalar cuatro baffles removibles con la finalidad mejorar el sistema de agitación y facilitar la limpieza.

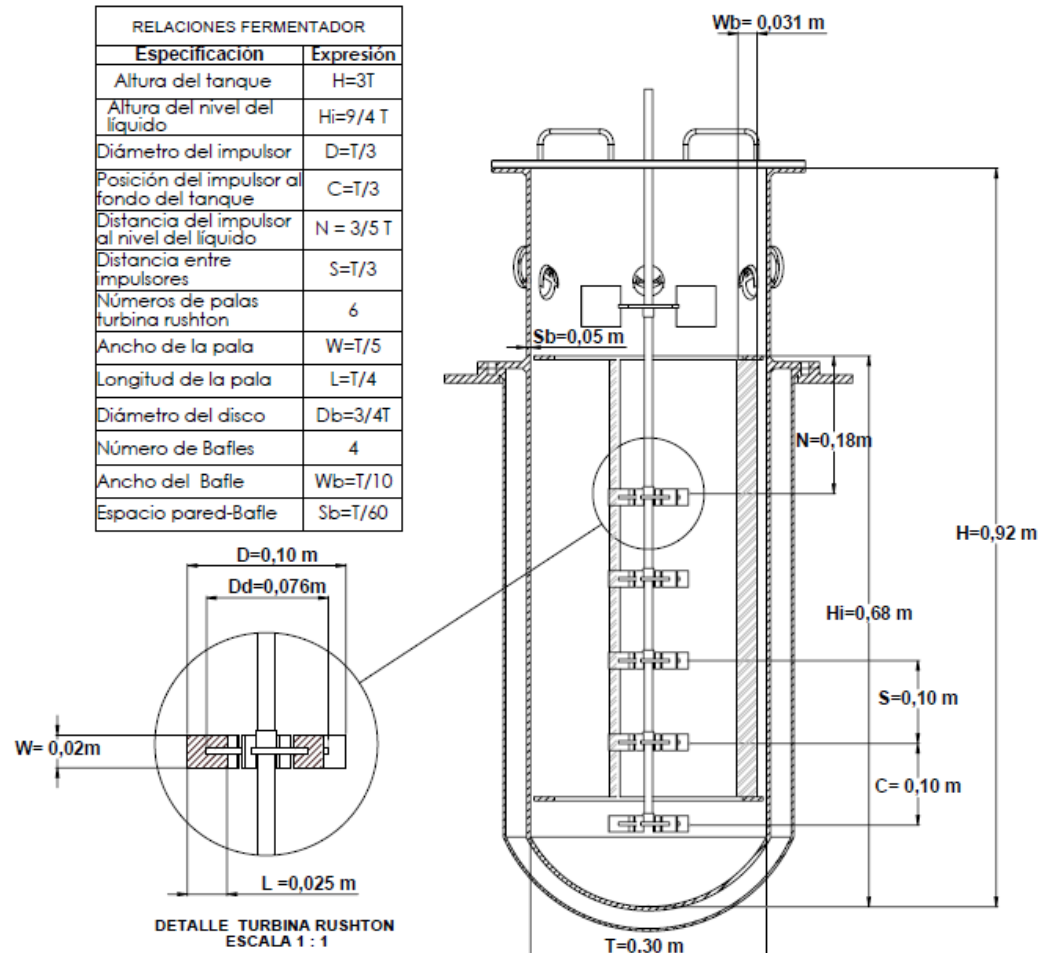
Para garantizar condiciones de aerobiosis y anaerobiosis en el sistema de fermentación, se recomienda utilizar un difusor tipo anillo (figura 8), que consigue dispersar altos flujos de gas, a través de perforaciones en la base del tubo, sin tendencia a obstruirse, lo que resulta beneficioso en la durabilidad del dispersor. Por otro lado, es aconsejable instalar disco o pala (cortador de espuma) en la parte superior del fermentador como se ilustra en la figura 8 para evitar la formación de espuma.

Figura 8. Fermentador diseñado en SolidWork (licencia académica)



Fuente: Autores

Figura 9. Relaciones geométricas del fermentador 50 L (volumen de trabajo)



Fuente: Autores

3.3 CÁLCULO DE LA POTENCIA Y VELOCIDAD DE AGITACIÓN

En la tabla 12 se muestran la velocidad de agitación y la potencia para el fermentador de 50 L. Dichos valores fueron calculados según como se describe en la sección 2.4.3.1. Teniendo en cuenta que una velocidad de agitación de 83 rpm requiere menos gasto energético que una de 97 rpm, se toma como base la menor para el proceso ABE. Sin embargo, se recomienda realizar experimentos en el

biorreactor de 50 L, con la finalidad de confirmar cuál de estos dos valores mejora la producción butanol.

Tabla 12. Velocidad de agitación para fermentador (50 L)

CRITERIO DE ESCALADO	VELOCIDAD DE AGITACIÓN (N) (rpm)	POTENCIA SUMINISTRADA POR EL MOTOR (P) (W)
VELOCIDAD PERISFERICA CONSTANTE	97	2
POTENCIA POR UNIDAD DE VOLUMEN	83	1,3

Fuente: Autores

3.4 CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL FERMENTADOR

En la tabla 13 se muestran las condiciones de operación del fermentador diseñado. Estas condiciones fueron tomadas con base en la literatura [6,18] y con base en diseños de fermentadores de capacidad similar [39].

Tabla 13. Condiciones de operación del fermentador [6,18,39]

TEMPERATURA MÁXIMA	160 °C
PRESIÓN MÁXIMA	3 BAR
TEMPERATURA ESTERILIZACIÓN	130 °C
TEMPERATURA FERMENTACIÓN ABE	37 °C
PRESIÓN ESTERILIZACIÓN	1 BAR
VELOCIDAD DE AGITACIÓN	4 - 540 RPM
POTENCIA DEL AGITADOR	¼ HP

3.5 MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN

Se recomienda acero inoxidable SS316L para el tanque y los accesorios en contacto con el medio de fermentación ya que cuenta con propiedades específicas de resistencia a la corrosión que justifica su uso a pesar de su elevado costo [40]. Los materiales de construcción recomendados para el tanque, el sistema de agitación y sistema de enfriamiento se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Materiales de construcción recomendados para las partes fermentador

PIEZA FERMENTADOR	MATERIAL
Tanque	Acero SS316 L
Sistema de enfriamiento (Chaqueta)	Acero SS304
Eje de Potencia y Agitadores	Acero SS316 L
Bafle y Dispensor de Gas	Acero SS316 L

Fuente: Autores

4. CONCLUSIONES

- Se seleccionó un modelo cinético (Shinto *et al.*) de la literatura basado en la ruta metabólica del microorganismo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 con glucosa como fuente de carbono, que representa todos los esquemas de reacción enzimáticas encaminadas a la producción de n- butanol. Una vez solucionado y ajustado, éste modelo permitió desarrollar el diseño operacional del fermentador. Este último puede ser considerado para iniciar pruebas que permitan la implementación del lazo de control de este proceso.
- Los resultados obtenidos del análisis de sensibilidad paramétrica permiten reducir el número de parámetros de ajuste de 45 a 10, sin afectar apreciablemente el grado de ajuste del modelo a los datos experimentales, mejorando de esta manera la eficiencia computacional de la estrategia de estimación de parámetros. Por otro lado, comparando los parámetros estimados en este trabajo y los calculados con el modelo cinético base (Shinto *et al.*), se observó que los valores de los parámetros son el mismo orden de magnitud.
- Se validó el modelo cinético ajustado con datos experimentales obtenidos en un fermentador con un volumen de trabajo de 2L. Con base en el parámetro RMSD (menor a 5) se infiere que el modelo obtenido en el intervalo de condiciones trabajadas predice de forma satisfactoria la formación de etanol, acetona y en especial n-butanol (sustancia de interés). Asimismo se evidenció en el análisis gráfico de residuos, su calidad de ajuste en el comportamiento predictivo del proceso de fermentación ABE.

- Los resultados del diseño mecánico básico del fermentador batch de 50L permitió la construcción e implementación del fermentador a escala piloto. La geometría y las condiciones de operación del fermentador 2L utilizado en las pruebas experimentales fueron empleadas para hacer el cambio de escala al fermentador de 50L.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Energy Information Administration. International Energy Statistics. Última consulta: 21/04/2011. <http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject>
- [2] LADISCH, M.R. 1991. "Evaluation of recent advances in butanol fermentation, upstream and downstream processing". *Enzyme and Microbial technology*. Vol.24, No.4, p. 280-283
- [3] LEE, S., PARK, J., JANG, S., NIELSEN, L. KIM, J., JUNG, K. 2008. "Fermentative Butanol Production by Clostridia". *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.101, No. 2, p. 209-210.
- [4] JONES, D., WOODS, D. 1986. "Acetone-Butanol Fermentation Revisited". *Microbiological Reviews*. Vol. 50, No. 4, p. 484-524.
- [5] HOCHFELD, W. 2006. "Producing Biomolecular Substances with Fermenters, Bioreactors, and Biomolecular Synthesizers". *CRC/Taylor&Francis*. Capítulo 9.
- [6] KARANTHAND G., RAJ, E. 2005. "Fermentation Technology and Bioreactor Design". 2^{da} edición. *Food Biotechnology*. Capítulo 1.03.
- [7] LEE, James M. 2008. "Biochemical Engineering". *Albright's Chemical Engineering Handbook : Lyle F. Albright*. Capítulo 19.
- [8] LEE, S., CHO, M., PARK, C., CHUNG, Y., KIM, J., SANG, B., UM, Y. 2008. "Continuous butanol production using suspended and immobilized Clostridium

beijerinckii NCIMB 8052 with supplementary butyrate”. *Energy & Fuels*. Vol. 22, No. 5, p. 3459–3464.

[9] LIU, Z., YING, Y., LI, F., MA, C., XU, P. 2010. “Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran”. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Vol.37, No.5, p. 495–501.

[10] SHINTO, H., TASHIRO, Y., YAMASHITA, M., KOBAYASHI, G., SEKIGUCHI, T., HANAI, T., KURIYA, Y., OKAMOTO, M., SONOMOTO, K. 2007. “Kinetic modeling and sensitivity analysis of Acetone-Butanol-Ethanol production”. *Journal of Biotechnology*. Vol.131, No.1, p.45–56.

[11] YANG, X. 1990. “A novel extractive fermentation for the production of acetone – butanol by *Clostridium acetobutylicum*”. Estados Unidos, Tesis Doctoral. Purdue University. Graduate School, p.100-217.

[12] EZEJI, T., BLASCHEK, H., QURESHI, N. 2005. “Industrially Relevant Fermentations”. *Handbook on Clostridia : CRC Press*. Capítulo 36

[13] PAPOUTSAKIS, E. 2008. “Engineering solventogenic clostridia”. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol.19, No.5, p.420–429.

[14] DÜRRE, P. 1998. “New insights and novel developments in clostridial Acetone/Butanol/Isopropanol fermentation”. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 49, No.6, p.639–648.

[15] HUANG W, RAMEY D, YANG S. 2004. “Continuous Production of Butanol by *Clostridium acetobutylicum* Immobilized in a Fibrous Bed Bioreactor”. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol.29, No.2, p.186–197.

- [16] EZEJI, T., QURESHI, H., BLASCHEK, H. 2007. "Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactor". *ELSEVIER*. Vol.18 , p. 220-227.
- [17] YANG, X., TSAO, G. 1994. "Mathematical modeling of inhibition kinetics in acetone – butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*". *Biotechnology Progress*. Vol.10, No.5, p.532–538.
- [18] MONOT, F., ENGASSER, J., PETITDEMANGE, H. 1984. "Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*". *France : Springer Verlag, Applied and Microbiology Biotechnology*. Vol.19, p.422-426.
- [19] BAHL, H., ANDERSCH, W., KONSTANTIN B., GOTTSCHALK, G. 1982. "Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture". *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol.14, No.1, p.17–20.
- [20] HOLT, R., STEPHENS, G., MORRIS, J. 1984. "Production of Solvents by *Clostridium acetobutylicum* Cultures Maintained at Neutral pH". *American Society for Microbiology*. Vol. 48, No.6, p.1166-1170.
- [21] MAO, S., LUO, Y., ZHANG, T., LI, J., BAO, G., ZHU, Y., CHEN, Z., ZHANG, Y., LI, Y., MA, Y. 2010. "Proteome Reference Map and Comparative Proteomic Analysis between a Wild Type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its Mutant with Enhanced Butanol Tolerance and Butanol Yield". *Journal of Proteome Research*. Vol.9, No.6, p.3046-3061.
- [22] NAJAFPOUR, G. 2007. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Oxford : Elsevier. Capítulo 3 y 6.

- [23] DORAN, P. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. s.l. : Elsevier Science & Technology Principles. Capítulo 4-13.
- [24] GAJANAN, V., DOBLE, M., KURNAR, A. 2004. *Biotransformations and Bioprocesses*. New York. : M Dekker, INC. p.278-356.
- [25] MORENO, G., BERNAL, J. 1996. *Diseño de Biorreactores y Enzimología*. España : Universidad de Murcia. p.75-96.
- [26] QUINTERO, R. 1993. *Escalamiento de Fermentaciones*. En *Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones*. Mexico : Alhambra Mexicana, p.97-113.
- [27] CACCIUTTOLO, Marco. 2005. *Scale up Considerations for Biotechnology-Derived Products*. New Jersey USA : Healthare USA. Capítulo 4.
- [28] WALAS, Stanley. 1990. *Chemical Process Equipment. Selection and Design*. USA : Butterworth-Heinemann. Capítulo 8.
- [29] CHAPRA, S., CANALE, R. 2007. *Métodos Numéricos para Ingenieros*. Mexico: McGraw-Hill. Capítulo 4 y 5.
- [30] ALVAREZ, M., ALCARÁZ, J. 2003. *Investigación Operativa: Modelos y Técnicas de Optimización*. España: Universidad Politécnica de Valencia. Capítulo 5.
- [31] BARD, Y. 1974. *Nonlinear Parameter Estimation*. New York : Academic Press. Capítulo 2
- [32] NELDER, J., MEAD, R. 1965. "A Simplex Method for Function Minimization". *Computer Journal*. Vol.7, p. 308 – 313.

[33] PULIDO, Humberto. 2008. Análisis y Diseño de Experimentos. 2ª edición. México: Editorial Mc Graw Hill, S. A, p.347-377.

[34] SCRAGG, L. 1997. Sistemas biológicos en procesos biotecnológicos. *Biotecnología para Ingenieros*. México : Limusa. p. 50-160.

[35] NING, Y., ZHI. L., MING, J. 2009. "Problems with the microbial production of butanol". *Society for Industrial Microbiology*. Vol.36, p.38-1127.

[36] COKER, A. 2001. *Modeling of Chemical Kinetics and Reactor Design*. Houston, Texas : Gulf Professional Publishing Company. Capítulo 6.

[37] TRAMBOUZE, P. 2002. "Chemical Reactor Design Engineering and Operation". Paris: Technip. Capítulo 4.

[38] SILLA, Harry. 2003. *Chemical Process Engineering*. New Jersey ,USA : Marcel Dekker, INC. Capítulo 96.

[39] Scientific, New Brunswick. Bioflo® Pro Fermentadores. Última consulta: 20/02/2011.
<<http://www.rtlbio.com/portal>>

[40] DRAPCHO, C. 2009. "Functional Food Ingredients and Nutraceuticals". *New York: Taylor & Francis Group*. Capítulo 10.

ANEXOS

Anexo 1: Preparación del preinóculo y las técnicas analíticas empleadas para la cuantificación de los metabolitos de fermentación ABE

El Preinóculo fue suministrado por el laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander, el cual se realizó en un tiempo de 36 horas, en un medio de mantenimiento cuya composición se muestra en la siguiente tabla y a una temperatura de 37°C. Inicialmente se prepararon 600 mL (del cual 30 mL eran tomados de un inóculo que se encontraba a 4°C y los restantes, de medio de mantenimiento) y se dejó durante 24 horas. Una vez alcanzado este tiempo se tomaron 30 mL y se aforó hasta 600 mL con el medio de mantenimiento, se dejó durante 12 horas. Esta etapa, se realizó con la finalidad de garantizar que el microorganismo se encontrará en su fase exponencial.

Medio de Mantenimiento	Glucosa	5 g/L
	Peptona	10 g/L
	Extracto de Carne	10 g/L
	Extracto de levadura	10 g/L
	NaCl	10 g/L
	Almidon Soluble	1 g/L
	L-cisteína	0,5 g/L
	Acetato de Sodio	3 g/L
	Resarsurina	1 mg/L

Las técnicas para su determinación de especies se resumen a continuación:

Glucosa: Las mediciones de glucosa se realizaron por una prueba enzimática de la glucosa oxidasa.

Biomasa: Para la biomasa, el método empleado fue el de peso seco. Una curva de calibración de concentración de biomasa fue realizada mediante diluciones seriadas de células resuspendidas, midiendo la densidad óptica de éstas a 600 nm y correlacionando el valor obtenido con la concentración del peso seco.

Metabolitos de Fermentación: La concentración de los metabolitos solubles en la fase líquida fue establecida después de la eliminación de las células por centrifugado. Los análisis fueron desarrollados por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) siguiendo la metodología propuesta por Pajuelo y colaboradores. El equipo de HPLC empleado está equipado con una columna supelcogel C-610H (dimensiones 300 x 7,8mm) y un detector de índice de refracción. Para el análisis, la fase móvil (ácido sulfúrico 0,5 mmol/L) fue bombeada isocráticamente durante 30 min a una velocidad de flujo de 0,8mL/min y una temperatura de 30°C. A cada uno de los metabolitos se le realizó su respectiva curva de calibración.

Anexo 2: Cálculo potencia y velocidad de agitación fermentador 50L

I. Cálculo de la velocidad de agitación utilizando como criterio de cambio de escala: Velocidad Periférica Constante

El cálculo de la velocidad de agitación (N) a partir de éste criterio se representa mediante la siguiente ecuación, donde D es el diámetro del agitador.

$$N_2 = N_1 \frac{D_1}{D_2}$$

Los subíndices 1 y 2 indican el cambio de escala de fermentador de 2L a 50L respectivamente.

		FERMENTADOR 2L	FERMENTADOR 50L
D	Diámetro de Turbina Rushton	0,049 m	0,102 m
N	Velocidad de Agitación	200 rpm	97 Rpm

II. Cálculo de la velocidad de agitación utilizando como criterio de cambio de escala: Potencia por unidad de Volumen Constante.

Se realizó según el procedimiento desarrollado por Aiba y col (1973) para fermentadores en condiciones turbulentas y anaerobios, mediante la siguiente ecuación:

$$N_2 = N_1 \left(\frac{D_1}{D_2} \right)^{2/3} \left(\frac{f c_1 n_1 a_2^2 b_2}{f c_2 n_2 a_1^2 b_1} \right)^{1/3}$$

ESPECIFICACIONES	SISTEMA 1	SISTEMA 2
	2L	50 L
Diámetro impulsor D (m)	0,05	0,1
Diámetro vaso T(m)	0,2	0,3
Altura vaso H (m)	0,31	0,9
Altura Liquido Hi (m)	0,23	0,7
Agitación N (rpm)	200	83
H/T	1,55	3,0
Número de Impulsores n	2	5
a=T/D	4,03	3,0
b= Hi/D	4,64	6,7
fc =(a*b/9)^1/2	1,44	1,5

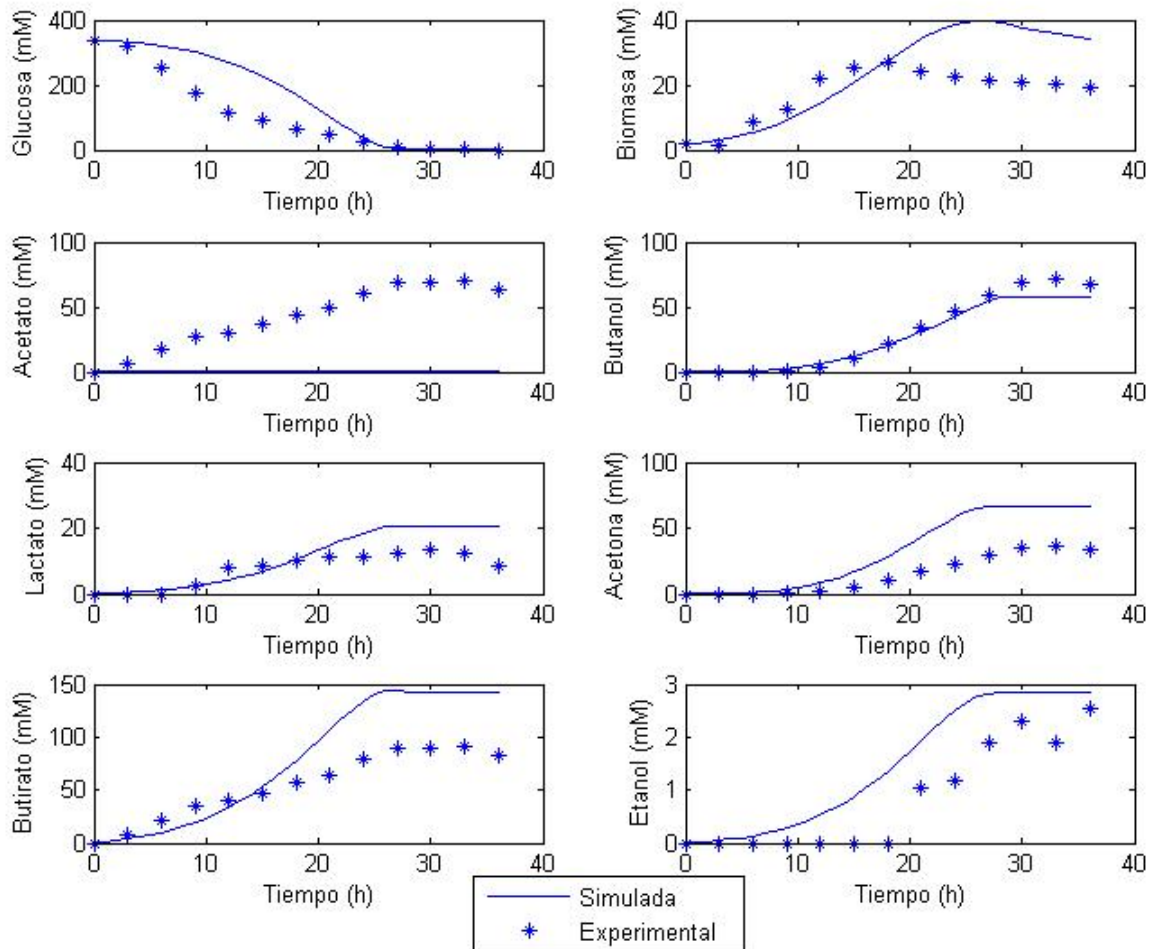
III. Cálculo de la Potencia de Agitación del Sistema

La potencia (P) total absorbida de agitación del sistema de 50L para cada criterio estudiado se muestra en la siguiente tabla.

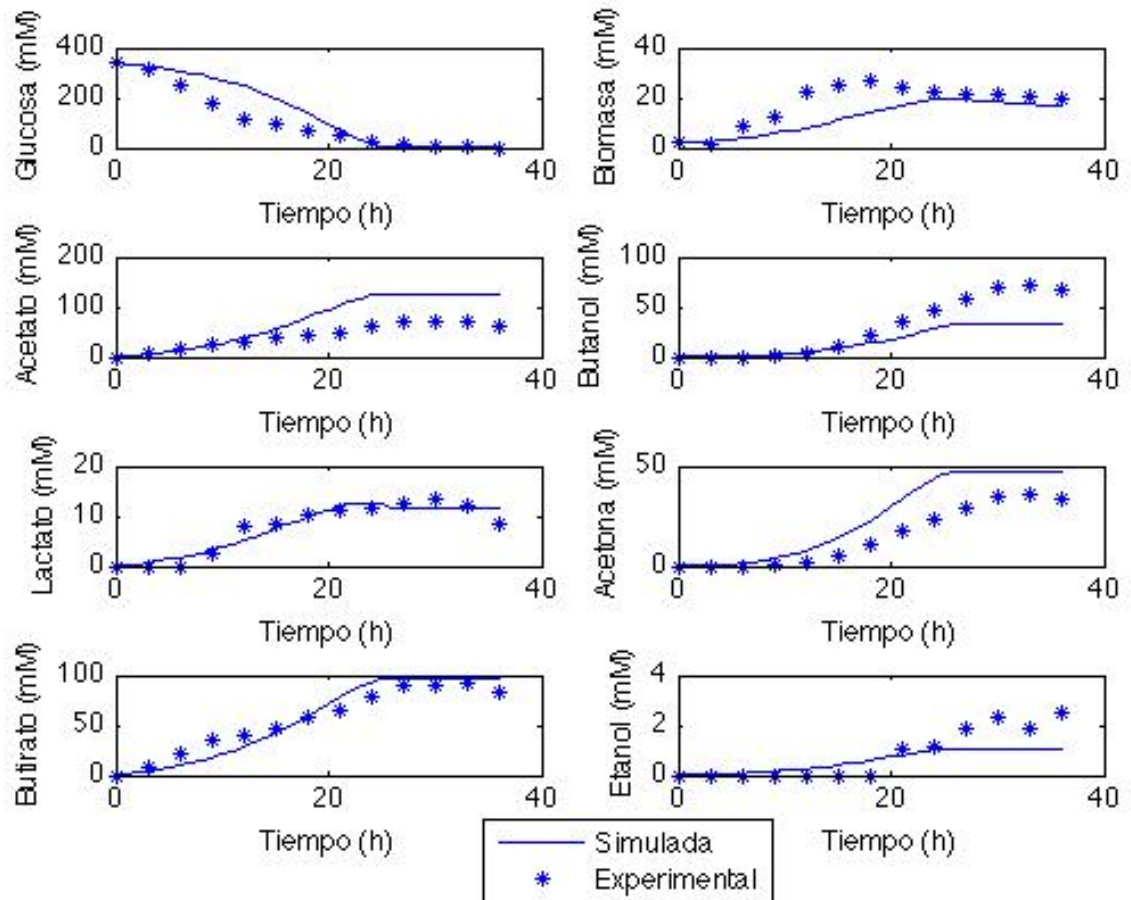
PARÁMETRO	ECUACIÓN	CRITERIO 1	CRITERIO 2
Número de Reynolds	$\frac{\rho D^2 N}{\mu}$	9413	8055
Número de Potencia Turbina Rushton	N_p	6,0	6,0
Potencia absorbida por un sola turbina (W)	$P = N_p \rho N^2 D^5$	0,3	0,2
Potencia absorbida por corrección (W)	$P_C = P * \sqrt{2}$	0,4	0,3
Potencia Total absorbida (W)	$P_T = (\# \text{ Agitadores } * P_C)$	2	1,2

Anexo 3: Perfiles de concentración encontrados para los diferentes casos de estimación de parámetros

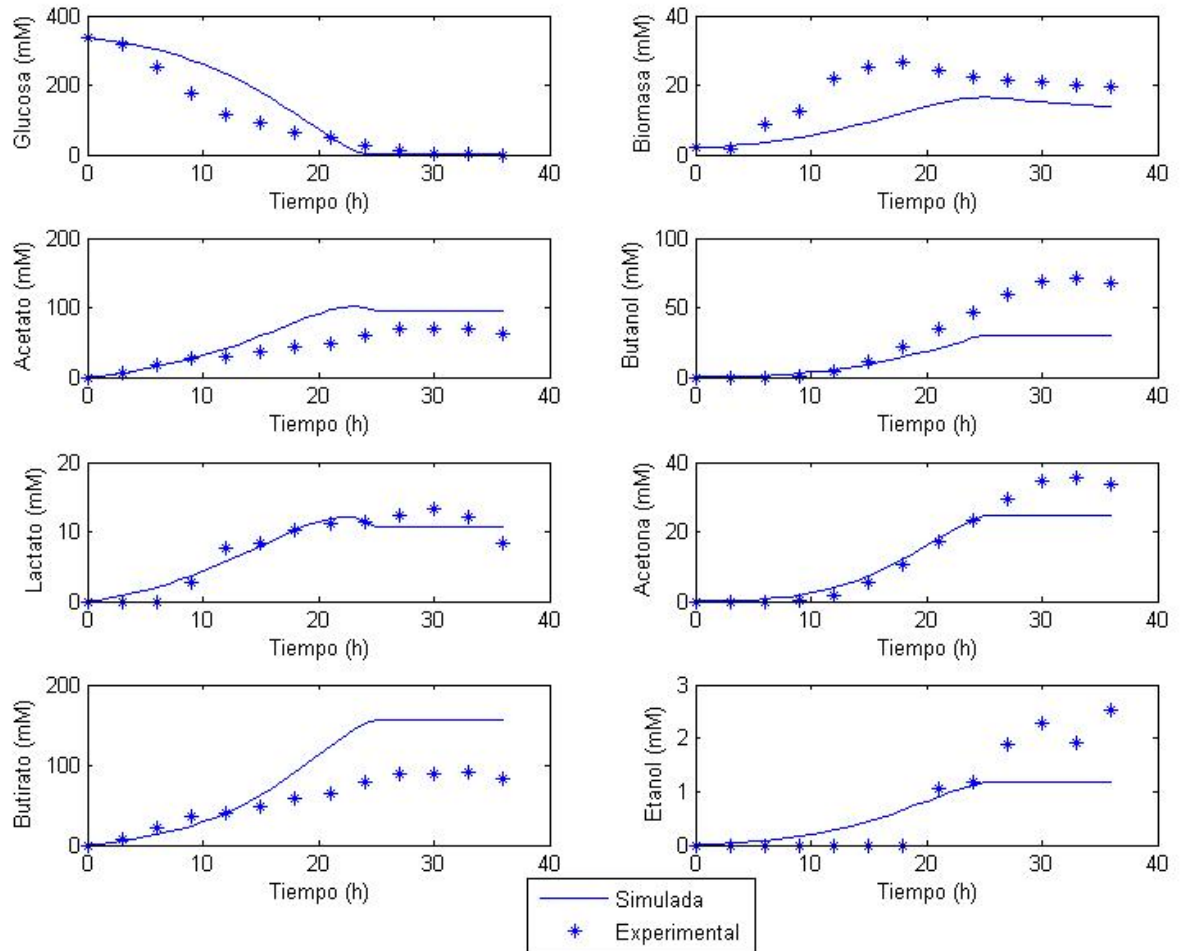
Caso I: 5 parámetros estimados, según el análisis de sensibilidad paramétrica.



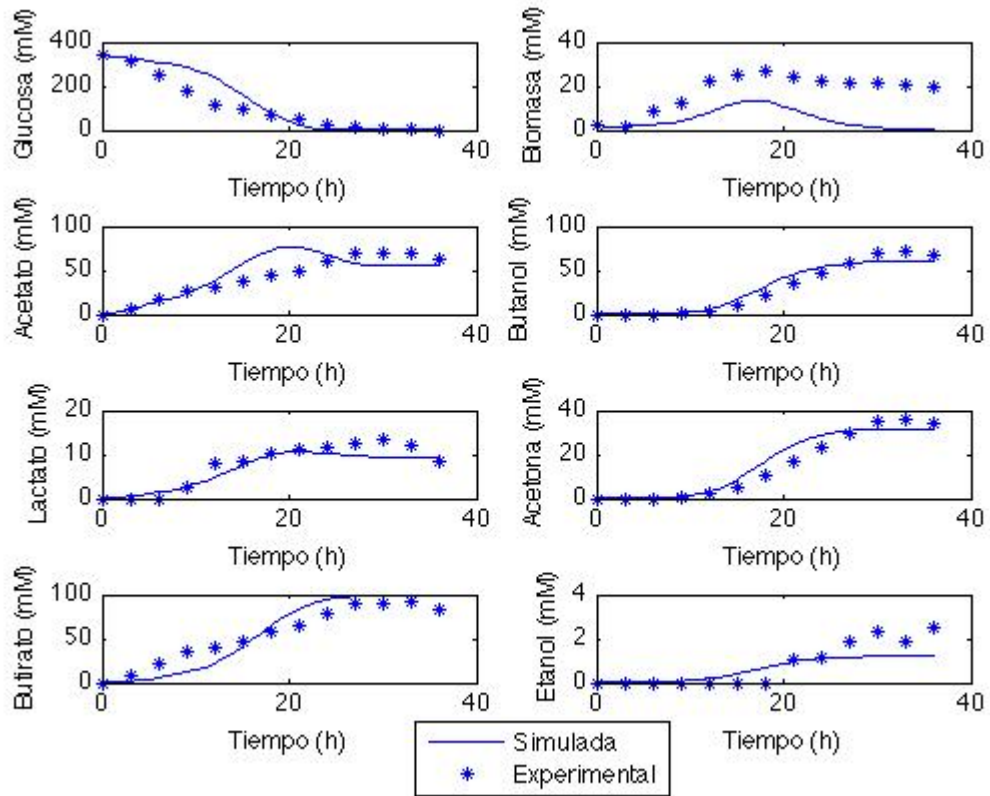
Caso III: 2 parámetros por rendimiento (16 parámetros en total), según el análisis de sensibilidad paramétrica.



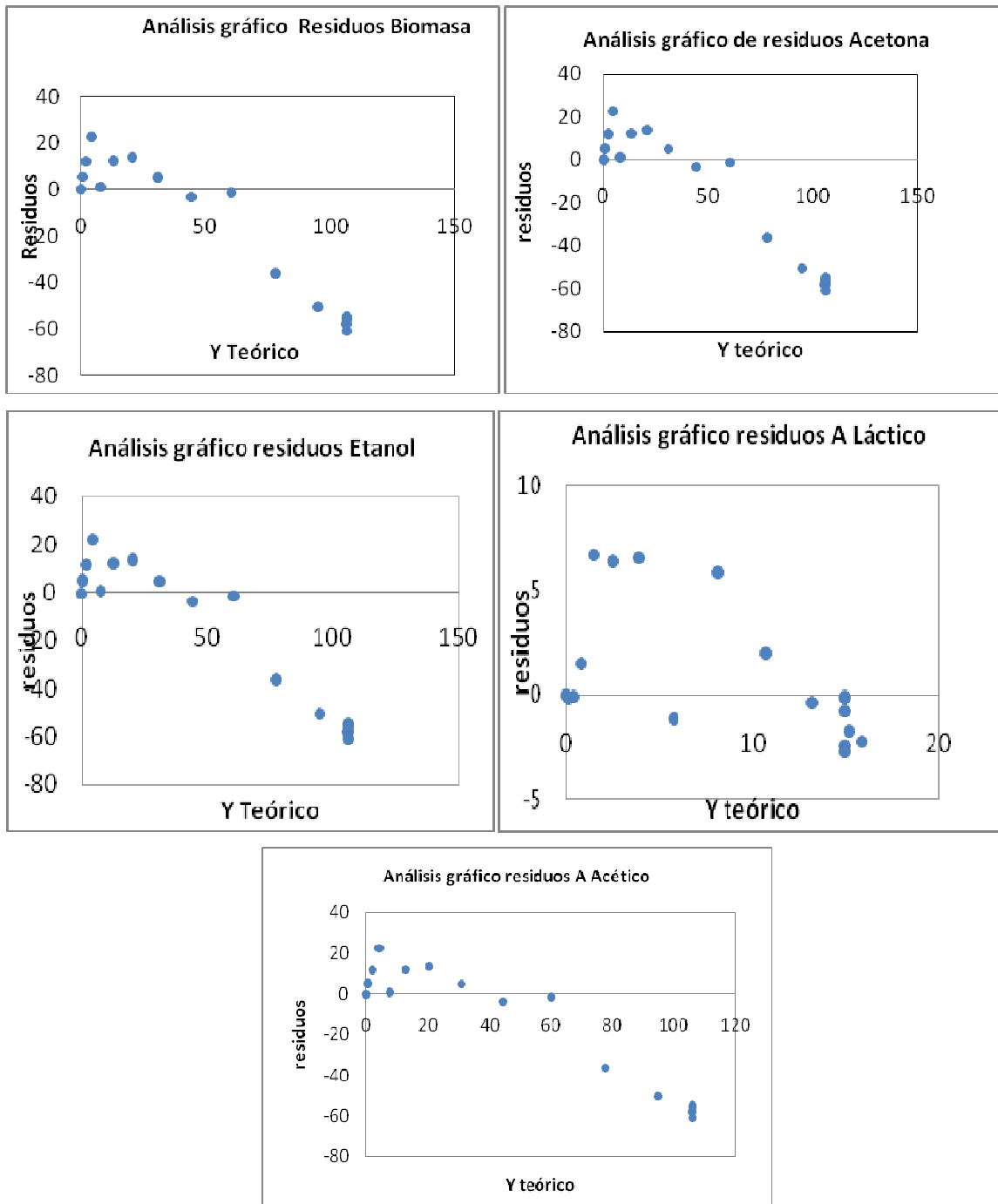
Caso IV: Todos los V_{max} del modelo, según el análisis de sensibilidad paramétrica.



Caso V: Todos los parámetros, según el análisis de sensibilidad paramétrica.



Anexo 4: Análisis gráfico de residuos para metabolitos principales fermentación ABE



Anexo 5: Perfiles de concentración encontrados en el proceso de fermentación ABE al estimar 10 parámetros con todas las pruebas experimentales

