

**DISEÑO Y SIMULACION DE UN FERMENTADOR AEROBIO PARA PRODUCIR
ETANOL A PARTIR DE JARABE DE GLUCOSA USANDO LEVADURAS
NATIVAS**

DIANA IBAÑEZ PINZON

HADDY MORALES DUARTE

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA**

2009

**DISEÑO Y SIMULACION DE UN FERMENTADOR AEROBIO PARA PRODUCIR
ETANOL A PARTIR DE JARABE DE GLUCOSA USANDO LEVADURAS
NATIVAS**

DIANA IBAÑEZ PINZON

HADDY MORALES DUARTE

Trabajo presentado como requisito para optar al titulo de ingeniero Químico

Director

Crisóstomo Barajas Ferreira

Ing. Químico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Codirector: José Andrés Pérez Mendoza

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS

ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

BUCARAMANGA

2009

AGRADECIMIENTOS

Al GIBIP grupo de investigación en bioquímica e ingeniería proteica por facilitarnos los recursos para facilitar este proyecto de grado.

Al ingeniero Crisóstomo Barajas Ferreira por su colaboración y paciencia

Al Ingeniero José Andrés Pérez Mendoza por su dedicación

Al Ingeniero Alexander Quitian por compartir sus conocimientos

A los técnicos de laboratorio Wilson, Eduardo y Guillermo.

A nuestros amigos Olga Amaris, Andrea Cipagauta, Tony coba, Laura Donado, Yasneidy Flórez, María del Rosario González, Liz Ibarra, Ingrid Miranda, Rosaura Orozco, Libia zurique por su amistad.

Al Ingeniero Saulo Rico.

A los ingenieros Roxana Villareal, Jasón Romero y Juan Pablo Jaimes, gracias por su motivación.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme finalizar esta etapa tan importante en mi vida, a mi padre Antonio Ibáñez y mi madre Flor Edilia Pinzón por ser fuente de amor, cariño, apoyo, en resumen por ser las personas mas importantes en mi vida, a mis hermanos Paola Ibáñez y Luis Ibáñez por ser mis cómplices y mis compañeros en todas las aventuras que he emprendido hasta ahora.

A mis tías en especial a Luz Marina González y Rosalba González por impulsarme en los momentos en los que las fuerzas se iban agotando.

A mis amigos.

A Haddy Morales por su paciencia y apoyo constante en la finalización de este proyecto.

A todas las personas que conocí en mi vida universitaria, todos formaron parte de todo lo bueno y lo malo que sucedió hasta hoy en que llego a la meta.

DIANA MARCELA IBAÑEZ PINZON

DEDICATORIA

AL SEÑOR JESUSCRISTO,

*A MIS PADRES FREDDY MORALES Y ELAINE DUARTE POR SU
PERSEVERANCIA GRACIAS,*

A MIS HERMANOS JORGE Y JOHN,

A TOPOTITO,

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS,

A MIS COMPAÑEROS Y PROFESORES.

HADDY M. MORALES DUARTE

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION	1
2. CONCEPTOS TEORICO	4
2.1. Componentes básicos de un fermentador	4
2.2. Modelo de fermentación	6
2.2.1. Modelo Cinético de Monod	6
2.3. Aireación y agitación	7
2.4. Control	7
2.5. Esterilización	9
2.5.1. Esterilización del fermentador	9
2.6. Fenómenos de transporte en un fermentador	9
2.6.1. Transferencia de masa de oxígeno	9
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	11
3.1. Diseño del reactor	12
3.1.1. Selección de una cepa	12
3.1.2. La selección de una configuración de fermentador apropiada	13
3.1.3. Dimensionamiento de dispositivos de mezcla	14
3.1.4. Necesidad de potencia	14
3.1.5. Selección de materiales de construcción	15
3.1.6. Controladores	15
3.1.7. Factores de seguridad	16
3.2. Simulación del fermentador	16
3.2.1. Selección de variables experimentales para simular a 2,5L	16
4. RESULTADOS Y ANALISIS	17
4.1. Cinética: Inhibición Por Producto	17
4.1.1. Fermentador De Tanque Agitado	17

4.1.2. Rendimientos Fraccionales Instantáneos	17
4.1.3. Reacción Global De Fermentación	17
4.2. Balances de materia y energía	18
4.2.1. Balance de Biomasa	18
4.2.2. Balance de Sustrato	19
4.2.3. Balance de Energía	19
4.2.4. Resolviendo por Runge kutta	20
4.3. Agitación	20
4.4. Diseño Estándar Números dimensionales agitador tipo turbina	20
4.5. Régimen De Flujo	21
4.5.1. Régimen turbulento	22
4.6. Velocidad De Transferencia De Oxígeno Volumétrica	22
4.6.1. Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno área interfacial	23
5. CONCLUSIONES	24
6. RECOMENDACIONES	25
7. BIBLIOGRAFÍAS	26
8. ANEXOS	27

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fermentador industrial mostrando la construcción y las Instalaciones para la aireación y el proceso de control	4
Figura 2. Diagrama de bloques	11
Figura 3. Cultivo de la levadura nativa de la caña	58
Figura 4. Caldo de fermentación	58
Figura 5. Esterilización de los medios	59
Figura 6. Biorreactor GIBIP	59
Figura 7. Agitador impeler tipo turbina plana	60
Figura 8. Pasos para el desarrollo de un biocombustible a partir de Levaduras	61
Figura 9. Diagrama del proceso	62
Figura 10. Ecuaciones matemáticas que pueden ser usadas en la Construcción de un modelo matemático	63
Figura 11. Propuesta para el proceso de selección del modelo para la Región de control	64
Figura 12. Medidas de un agitador de turbina	65
Figura 13. Vectores de velocidad en el extremo de una pala en un Rodete de turbina	65
Figura 14. Simulación del biorreactor en Aspen Tech 2006.5	66
Figura 15. Diagrama de flujos	66
Figura 16. Perfil de composición	67

Figura 17. Perfil de reacción	67
Figura 18. Biorreactores a diferentes escalas sin chaqueta	68
Figura 19. Consumo de glucosa por levaduras nativas	68
Figura 20. Curva de crecimiento de biomasa	69
Figura 21. Predicción del modelo cinético	70
Figura22. Cinética a partir de datos experimentales	

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Sistemas de medida y control mas comunes en Laboratorios de fermentadores	8
Tabla 2. Flujos máxicos y energéticos obtenidos de la simulación	24
Tabla 3. Control de bioprocesos	57
Tabla 4. Datos experimentales	85
Tabla 5. Calculo de $(1/s)$ y $(1/\mu)$ modelo Lineweaver-Burk	86

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Ventajas, desventajas y supuestos de un cultivo Batch	28
ANEXO B. Informe de resultados GIBIP	31
ANEXO C. Cinética enzimática	50
ANEXO D. Lazos de control	51
ANEXO E. Preparación del inóculo y caldo fermentativo	58
ANEXO F. Diagrama global del proceso de obtención de etanol	62
ANEXO G. Algoritmo para la selección del modelo matemático	63
ANEXO H. Parámetros para un rodete de turbina	65
ANEXO I. Simulación en ASPEN TECH 2006.5	66
ANEXO J. Predicción del modelo cinético	86

TÍTULO: DISEÑO Y SIMULACION DE UN FERMENTADOR AEROBIO PARA PRODUCIR ETANOL A PARTIR DE JARABE DE GLUCOSA USANDO LEVADURAS NATIVAS*

AUTOR: MORALES DUARTE, Haddy y IBAÑEZ PINZON, Diana Marcela **

PALABRAS CLAVES: fermentación, glucosa, diseño fermentador, producción de etanol, levadura, cultura semi-batch.

RESUMEN

Los biocombustibles han experimentado una espectacular expansión en poco tiempo debido a las incertidumbres que plantea el futuro de la energía y el obligado cumplimiento de los acuerdos de Kioto.

En este estudio se plantea el diseño de un fermentador utilizando una levadura nativa aislada de la caña en cultivo batch aerobia sin inyección de aire; la cual mostró resultados favorables en la obtención de etanol a escala de laboratorio tomando como materia prima jarabes de glucosa extraídos de yuca.

Se simuló y validó el modelo matemático del fermentador aerobio con mezclador teniendo en cuenta las propiedades descritas por la levadura nativa en el laboratorio para lo cual se desarrollaron balances de masa y energía que contribuyeron y algunos supuestos para cultivo batch, y un minucioso análisis para el diseño del biorreactor.

Se demostró que el jarabe de glucosa extraído de yuca es un medio de cultivo que proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo de las cepas de levaduras nativas empleadas, así como para la biosíntesis de etanol.

Debe ser muy cuidadoso con los residuales de este proceso que en ocasiones deben ser esterilizados antes de someterlos al procedimiento de depuración que permita verterlos a cualquier curso de agua.

La depuración será tal que la demanda biológica de oxígeno (DBO) sea reducida a los niveles que establezcan las normas vigentes, al ser desechado un residual que contenga materias biodegradables.

* Proyecto de Grado

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Director Ing. BARAJAS, Crisóstomo

TITLE: DESIGN AND SIMULATION OF A FERMENTOR AEROBIC TO PRODUCE ETHANOL FROM GLUCOSE SYRUP USING NATIVE YEAST⁺

AUTHOR: MORALES DUARTE, Haddy y IBAÑEZ PINZON, Diana Marcela^{**}

KEYWORDS: fermentation, glucose, ethanol production, yeast, semi-batch culture.

ABSTRACT:

Biofuels have experienced a dramatic expansion in a short time due to the uncertainties posed by the future of energy and the binding of the Kyoto Agreement.

This study raises the design of a fermentor using yeast isolated from native isolated cane in aerobic batch culture without air injection, which showed favorable results in the acquisition of ethanol in the laboratory using as a raw material extracted from glucose syrups cassava.

Was simulated and validated a mathematical model of the aerobic fermentation with mixing, taking into account the properties described by the native yeast in the lab which developed from mass and energy balances, and certain assumptions for batch culture and a thorough analysis for the design the bioreactor.

It was demonstrated that the glucose syrup is extracted from cassava culture medium that provides nutrients for the development of native yeast strains used, and for the biosynthesis of ethanol.

It must be very careful with the residuals of this process that sometimes must be sterilized prior to their cleaning process that allows to dump any watercourse.

The purification is such that the biological oxygen demand (BOD) is reduced to levels that set the rules, to be a residual waste containing biodegradable materials.

* Project of grade

** Industrial University of Santander. Ability of Physiochemical Engineering's. Director Eng. BARAJAS Crisóstomo

1. INTRODUCCION

Actualmente, existe una necesidad creciente para la industria de mejorar y expandir la producción de bioetanol como consecuencia de los altos precios del petróleo. La búsqueda de fuentes limpias y renovables de energía ha desarrollado nuevas tecnologías alternativas en los procesos convencionales. Los biocombustibles nos han demostrado gran potencial para una sustitución a gran escala de los derivados de petróleo. Existen diversas fuentes disponibles para una producción de estos nuevos tipos de combustibles, y como se trata de fuentes vegetales, se puede garantizar continuidad de producción y con esto evitar una eventual crisis de abastecimiento energético.

En Colombia, De acuerdo con el plan de oxigenación de los combustibles (Ministerio del Medio Ambiente, Colombia, 2001) y según lo establecido en la Ley 693 de septiembre de 2001, se hace obligatorio el uso de alcohol carburante como aditivo en la gasolina que se utiliza en las principales ciudades del país. La reglamentación de la Ley señala que a más tardar el 27 de Septiembre de 2005 la gasolina de Bogotá, Cali, Medellín y Barranquilla, deberá contener alcoholes carburantes en un 10% de su volumen. La misma condición se establece un año más tarde en las ciudades de Bucaramanga, Cartagena y Pereira. En la medida que se desarrollen los proyectos agroindustriales, se extenderá el uso en el resto del territorio nacional.¹

Esta reglamentación ha generado la búsqueda de materia prima fermentable para producir bioetanol, hasta ahora se ha producido a partir de caña de azúcar, utilizado como combustible, de forma anhidra adicionado a la gasolina. Debido a la

¹ JALLER, Miguel y PATERNINA, Carlos. **Optimización de la cadena de valor del bio-etanol a partir de la caña de azúcar y de la yuca en Colombia.** Universidad el Norte. Barranquilla

gran cantidad de carbohidratos, la yuca se presenta como fuente potencial para la generación de etanol. Mientras que la producción de etanol a partir de caña de azúcar es perfeccionado la yuca sigue sin obtener suficiente inversión e investigación, Colombia ocupa el octavo lugar en el mundo con 1'850.000 ton por año de cultivos de yuca.

La yuca debe ser metabolizada por los agentes de fermentación, el almidón, necesita ser hidrolizado por azúcares fermentables, como glucosa o maltosa, entre otros. El proceso de transformación de almidón de yuca en azúcares fermentables por la levadura alcohólica implica el calentamiento de suspensión del almidón para la gelatinización, con el fin de facilitar la acción de las amilasas. La hidrólisis del almidón puede ser hecha de forma ácida ó enzimática, siendo la última la que presenta mayores ventajas. Esta hidrólisis es desarrollada por las enzimas amilasas, que pueden ser encontradas en tejidos animales, vegetales y microorganismos.

El microorganismos tradicional mas usado para las fermentaciones productoras de etanol es *Saccharomyces cerevisiae* de igual modo las *Zymomonas mobilis* que son probablemente los microorganismos mas adecuados para la producción comercial de etanol combustible e industrial. Esta bacteria alcanza rendimientos de etanol cercanos al valor estequiométrico de 0,51 g de etanol/g de glucosa.²

El diseño en bioingeniería no es solo la aplicación de conceptos básicos y teóricos que conlleven a lograr un prototipo; para la realización integral de un modelo, otra gran parte, trata de la adaptación creativa y de la utilización del ingenio propio para lograr el objetivo de conjuntar el ambiente biológico de un cultivo vivo con el ambiente artificial de un dispositivo controlado; este es el resultado denominado biorreactor o reactor biológico. Un biorreactor es por tanto

² QUINTERO, Olga Lucia y SCAGLIA, Gustavo. **Control basado en métodos numéricos para la obtención de un biocombustible**. AADECA 2008

un dispositivo biotecnológico que debe proveer internamente un ambiente controlado que garantice y maximice la producción y el crecimiento de un cultivo vivo; esa es la parte biológica. Externamente el biorreactor es la frontera de protege ese cultivo del ambiente externo: contaminado y no controlado. El biorreactor debe por tanto suministrar los controles necesarios para que la operación se lleve a cabo con economía, alto rendimiento (productividad) y en el menor tiempo posible; esa es la parte tecnológica.

En el segundo capítulo encontrará fundamento teórico detallado del diseño de biorreactores, en el tercer capítulo mediante un bosquejo que le servirá de guía se explicaran los pasos que se efectuaron para llevar a cabo el diseño, y por último encontrará en el capítulo cuarto los resultados obtenidos, adjuntando en el capítulo cinco y seis; las conclusiones y las recomendaciones respectivamente que le ayudaran a organizar sus ideas.

En este trabajo se diseñara un biorreactor aerobio utilizando la cinética obtenida a escala de laboratorio con levaduras nativas en jarabe de glucosa para la producción de bioetanol combustible.

Se evaluara el diseño en una simulación con los datos cinéticos experimentales encontrados para el sustrato y la levadura nativa.

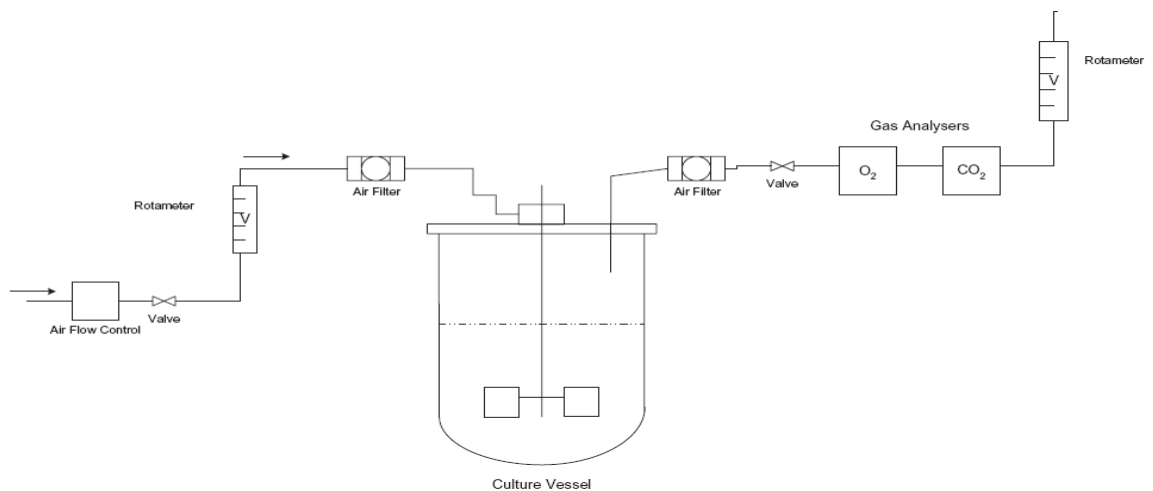
2. CONCEPTOS TEORICO

2.1. Componentes básicos de un fermentador

Un típico proceso de fermentación puede incluir las siguientes etapas:

- Un medio de preparación (el alimento fuente para el microorganismo-usualmente un liquido).
- Esterilización del medio, biorreactor, auxiliares (exclusión de organismos no deseados).
- Desarrollo de un inculo de tamaño adecuado (la semilla de cultivo para el biorreactor).
- Fermentación (crecimiento del microorganismo deseado y la formación del producto).
- Disposición de efluentes de proceso (bioproceso raramente generan subproductos).

Figura 1. Fermentador industrial mostrando la construcción y las instalaciones para la aireación y para el proceso de control.



Fuente: Fermentation and biochemical engineering handbook

Fundamental para el proceso es el biorreactor, sin embargo, todas las etapas del proceso son importantes e influyen la elección y diseño del biorreactor. Esto es particularmente cierto en los procesos batch, que componen la vasta mayoría de los bioproceso [1].

- En general los bioprocesos incluyen:
- Producción de células microbianas (biomasa)
- Producción de enzimas microbianas

El Fouling (propagación celular) puede afectar la esterilidad y eficiencia del biorreactor, especialmente en los intercambiadores de calor. Para evitar esto, el biorreactor debe ser fácilmente limpiable y con acabados lo más sanitario posible (de ahí sus formas redondeadas). Se requiere de un intercambiador de calor para mantener el bioproceso a temperatura constante. La fermentación biológica es una fuente importante de calor, por lo que en la mayor parte de los casos, los biorreactores requieren de agua de enfriamiento. Pueden ser refrigerados con una chaqueta externa o, para recipientes sumamente grandes, con serpentines internos.

En un proceso aerobio, la transferencia óptima de oxígeno es tal vez la tarea más difícil de lograr. El oxígeno se disuelve poco en agua (y aún menos en caldos fermentados) y es relativamente escaso en el aire (20,8 %). La transferencia de oxígeno usualmente se facilita por la agitación, que se requiere también para mezclar los nutrientes y mantener la fermentación homogénea. Sin embargo, existen límites para la velocidad de agitación, debidos tanto al alto consumo de energía (que es proporcional al cubo de la velocidad del motor) como al daño ocasionado a los organismos debido a un esfuerzo de corte excesivo.

Los biorreactores industriales usualmente emplean bacterias u otros organismos simples que pueden resistir la fuerza de agitación. También son fáciles de

mantener ya que requieren sólo soluciones simples de nutrientes y pueden crecer a grandes velocidades.

La función principal de un fermentador es la de proporcionar un medio ambiente controlado que permita el crecimiento eficaz de las células y la formación del producto. [2]

2.2. Modelo de fermentación

2.2.1. Modelo Cinético de Monod

Cuando el crecimiento de un cultivo batch sólo está limitado por la cantidad inicial de sustrato, la curva de crecimiento puede expresarse en términos de los parámetros de crecimiento. la ecuación de Monod describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento, μ , y la concentración del nutriente limitante, S , en un cultivo microbiano. [7]

El modelo de Monod expresa:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{k_s + s} \quad (2)$$

$$x - x_0 = Y(s_0 - s) \quad (3)$$

Donde x_0 y s_0 son los valores iniciales de la concentración de biomasa y del sustrato limitante, respectivamente. k_s Se obtiene cuando $\mu = \mu_{\text{máx}}$ Sustituyendo μ y s en la ecuación (1) se obtiene:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_{\text{máx}}(Ys_0 + x_0 - x)x}{k_s Y + s_0 Y + x_0 - x} \quad (4)$$

Donde:

Y = Rendimiento celular

k_s = Constante de Michaelis Menten (g/l)

$\mu_{\text{máx}}$ = Velocidad específica máxima de crecimiento.

2.3. Aireación y agitación

Aireación y agitación son implementados en la mayoría de procesos de fermentación. La palabra aerobio se refiere a la clase de microorganismo que necesita oxígeno molecular para su crecimiento y metabolismo aeróbico es la condición de organismos vivos sobreviviendo solamente en la presencia de oxígeno molecular. La bacteria aeróbica requiere oxígeno para su crecimiento y puede ser incubada en aire atmosférico. El oxígeno es un fuerte agente oxidante el cual tiene la habilidad de aceptar electrones, un proceso llamado respiración. Un biorreactor es un recipiente de reacción, en el cual un organismo es cultivado de forma controlada para producir cuerpos de célula u otro producto. Inicialmente el término fermentador usado para describir estos recipientes, pero en términos estrictos, la fermentación es un proceso anaeróbico, mientras que, la mayor proporción de fermentadores usan procesos aeróbicos. Así, en términos generales, biorreactor significa un recipiente en el cual organismos crecen bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Si un biorreactor o un recipiente de reacción operan bajo condiciones aireadas, el sistema es llamado un biorreactor aeróbico [3].

2.4. Control

El control de incubación requiere un control preciso de la influencia de varios parámetros: ³

- Temperatura
- pH
- Presión
- Nutrientes
- Agitación
- Oxígeno disuelto
- Flujo de aire
- Redox

Control del proceso de la fermentación. (Ver tabla 3)

Tipos de controladores:

Controladores feed-back

Controladores feed-forward

Controladores adaptables

Estas son las principales variables de proceso de crecimiento y condiciones. El pH es normalmente controlada por ácido / canales alcalinos. Oxígeno disuelto y loops redox se controlan como una cascada loops, utilizando el flujo de aire, agitación, presión, o de un auxiliar de alimentación o una combinación de estos controladores. El control de estos y de otros parámetros más se suele hacer en el fermentador diseñado específicamente para el propósito y compromiso con diferentes volúmenes de trabajo, en función de los requisitos de rendimiento y producción [3].

³N. Echeverry, O. Quintero, M. Ramírez Y H. Álvarez* **Control De Un Biorreactor Para Fermentación Alcohólica En Continuo.** *Universidad Nacional de Colombia,*
*Grupo de Automática de la Universidad Nacional (GAUNAL),

Tabla 1. Sistemas de medida y control más comunes en laboratorios Fermentadores

Parámetro	Medida	Control
Temperatura	Termómetro de resistencia de platino o termistor	Chaqueta de agua o bobinas, elemento de calentamiento eléctrico
pH	Autoclave electrodo pH	Acido, alcalino o adición de nutriente
Presión parcial del oxígeno	Electrodo de oxígeno polar gráfico	Rata de aireación, velocidad de agitación, composición cambiante del gas de
Espuma	Sonda de conductancia o capacitancia	Adición de antiespumante

Fuente: Practical fermentation and technology

2.5. Esterilización

Los factores más frecuentes que causan la contaminación microbiana son: (i) los materiales de construcción, (ii) los sellos y válvulas, (iii) la complejidad de la planta, (iv) errores de los operarios, (v) errores de instrumentación (vi) aireación del proceso (vii) la transferencia y líneas de alimentación, (viii) la contaminación del pre cultivo.[2]

2.5.1. Esterilización del fermentador

Condiciones para operar en medio aséptico; Los biorreactores tiene que trabajar en condiciones asépticas utilizando un inóculo puro del microorganismo y excluyendo los organismos contaminantes; por consiguiente, el biorreactor, al igual que la red de tuberías asociadas, ha sido diseñado como un recipiente a presión de tal forma que tanto el sistema como el medio que contenga puede esterilizarse a la temperatura /presión adecuadas, un mínimo de 121° C/15 psi así durante 15-30 minutos. Las válvulas utilizadas en las secciones esterilizables deben ser utilizadas en condiciones asépticas. Las válvulas de estrangulamiento y las de diafragma son particularmente adecuadas, puesto que su mecanismo de operación esta separado del medio líquido o gaseoso por un tubo o un diafragma

flexible. Los puntos de entrada al recipiente y el proceso para añadir y eliminar gases o líquidos al/del reactor durante la fermentación también deben estar diseñados de forma que mantengan las condiciones asépticas [4].

2.6. Fenómenos de transporte en un fermentador

2.6.1. Transferencia de masa de oxígeno

- La transferencia de oxígeno a la célula durante la aireación del fermentador implica la transferencia de oxígeno desde las burbujas de aire a la solución, desde la solución a la célula y la absorción del oxígeno por parte de la célula.
- La transferencia de oxígeno a partir de las burbujas de aire a la solución es la etapa limitante del proceso, debido a la baja solubilidad del oxígeno en fase líquida.
- La transferencia de masa del oxígeno N_A puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$N_A = \frac{dC_L}{dt} = k_{1a}(C - C_L) \quad (5)$$

C_L = es la concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido t es el tiempo.

$\frac{dC_L}{dt}$ = es el cambio de concentración de oxígeno con el tiempo.

k_{1a} , = es el coeficiente de transferencia de masa, a es la superficie interfacial gas-líquido por volumen de [4]

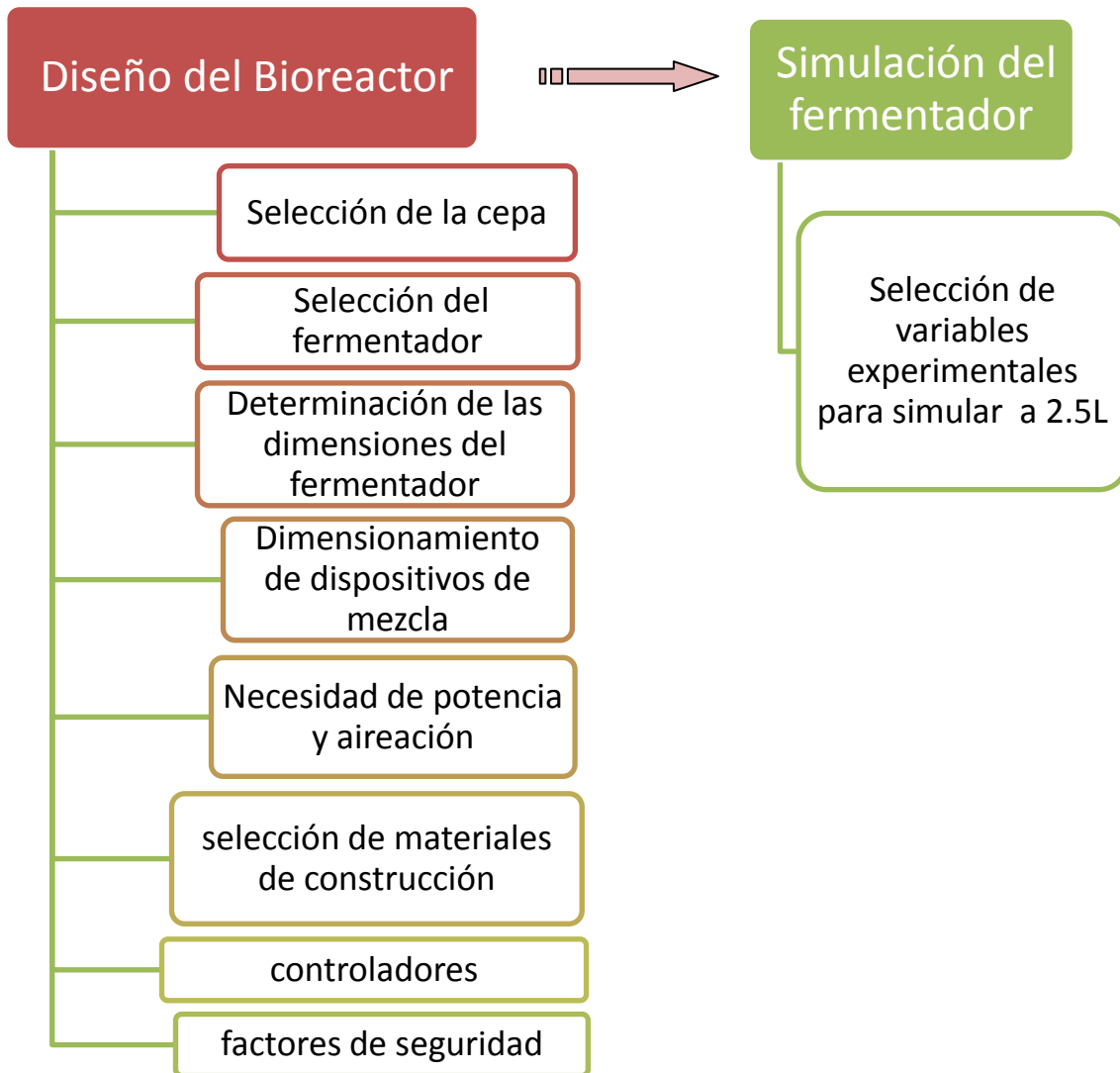
Factores que influyen en k_{1a} , coeficiente de transferencia de masa de oxígeno:

- Velocidad de flujo de aire
- Grado de agitación
- Viscosidad del cultivo.
- La formación de espuma y el uso de antiespumantes.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Este trabajo se desarrollo en dos etapas: a) Diseño del reactor utilizando datos experimentales a escala de laboratorio. b) Simulación del fermentador. Los componentes de cada etapa se esquematizan así.

Figura 2. Diagrama bloques



Fuente: Propia

3.1. Diseño del reactor

3.1.1. Selección de una cepa Organismos

Levadura nativa aislada de caña de azúcar (Ver anexo C).

Medio de cultivo y condiciones del inoculo

- Glucosa: ~150 g/L.
- Peptona: 10 g/L.
- Extracto de Levadura: 10 g/L.
- Temperatura: 32 °C
- Agitación: 120 rpm.
- pH: 6,7

Mantenimiento de la cepa

El organismo fue inoculado a intervalos regulares de 3 días y preservados a 4 °C.

Diseño experimental para la selección de una combinación adecuada de extracto de levadura y peptona

Extracto de levadura y peptona se escogió por otros estudiantes quienes realizaron este estudio en el GIBIP⁴.

Estimación de etanol Headspace Cromatografía de Gases (GC)

⁴ Grupo de investigación en bioquímica e ingeniería de proteínas (GIBIP). UIS

Cuantificación del Etanol.

El etanol, es identificado por Headspace-cromatografía de gases (GC) y comparado con los datos obtenidos por medio de una curva de calibración de soluciones de etanol, la cual se analiza bajo las mismas condiciones de operación que la muestra de interés. La composición de la muestra es calculada por comparación de la altura o por las áreas de los picos, o ambos, con los valores correspondientes a la curva de calibración.

Condiciones de operación HEADSPACE:

Ciclo GC: 50 min.

Agitación: media.

Tiempo de equilibrio vial: 10 min.

Tiempo de presurización: 0,03 min.

Tiempo de llenado del loop: 0,1 min.

Tiempo de equilibrio del loop: 0,1 min.

Tiempo de inyección: 0,5 min.

Volumen del loop: 1ml.

Condiciones de operación de la columna CROMATOGRAFIA DE GASES (GC).

Gas de arrastre: Helio.

Flujo del gas de arrastre: 2 ml/min.

Tipo de columna: DB-WAX. 60m*0,25mm*0,25µm.

Temperatura inicial: 35°C (8min)

Velocidad: 5°C/min. Hasta 100°C (2min).

Velocidad: 15°C/min. Hasta 24°C (2min).

Este método es propuesto por la escuela nacional de cromatografía, facultad de ciencias de la UIS (Ver anexo B).

3.1.2. La selección de una configuración de fermentador apropiada

Para la elección del reactor a diseñar y simular se tuvo en cuenta los diferentes tipos de reactores utilizados en procesos químicos; viabilidad económica, propiedades descritas por la levadura nativa, manejo y condiciones del inóculo para el cultivo con este fin se seleccionó el reactor batch.

El principal objetivo de este trabajo es desarrollar mediante balances un diseño para detallar las condiciones óptimas para obtener un mejor rendimiento.

Los supuestos generales seleccionados en el moldeamiento de cultivos batch son:

- Los cultivos microbianos están vivos, estos son homogéneos en tamaño, morfología, fisiología, y otras características físicas-químicas-biológicas que pueden ser tratadas como una masa simple de células vivas.
- Proceso totalmente aerobio.
- El volumen de líquido es mezclado de tal manera que las propiedades intensivas, tales como concentraciones, temperatura, pH son uniformes en el volumen líquido.
- Las propiedades de los compuestos no varían con la temperatura durante el proceso.
- Volumen constante.
- Reacción exotérmica.
- Se considera mezclado perfecto y el agitador no produce trabajo para el sistema.

Se seleccionaron las propiedades anteriormente descritas para el inóculo como Ph, temperatura concentración inicial y se diseñó una nueva velocidad de mezcla.

3.1.3. Dimensionamiento de dispositivos de mezcla

Se seleccionó agitación por paletas debido a que el microorganismo resiste velocidad de agitación de 110 rpm a escala de laboratorio; proponer una agitación por aire aumentaría los costos del fermentador.

3.1.4. Necesidad de potencia

Se seleccionó un agitador impeler tipo turbina plana pues este nos ofrece la velocidad de revolución apropiada para evitar el daño ocasionado a los organismos debido a un esfuerzo de corte excesivo.

3.1.5. Selección de materiales de construcción

En este estudio se seleccionó un recipiente de vidrio de Boro Silicato que ayudara al microorganismo con las condiciones apropiadas de pureza. Es indispensable determinar primero la capacidad, la presión del biorreactor para seleccionar el material. Para biorreactores a Mayor escala de 20 litros y más, su material de construcción es determinado por la presión y las consideraciones de la manipulación manual. Exclusivamente debe ser de acero inoxidable. Para biorreactores a menor escala las excepciones para no usar vidrio serán una sobrepresión o un cultivo que sea propenso a que se adhiera al vidrio Boro Silicato (Ver figura 18).

3.1.6. Controladores

Se seleccionó varios sistemas en cascada para trabajar conjuntamente y lograr su meta. Existen cuatro posibilidades para la fermentación, y otras cuatro opciones para el cultivo celular, si está utilizando el controlador de la mezcla de gases.

El diseño de la fermentación concibe determinados valores de temperatura, pH, oxigenación, por citar los parámetros más comunes a controlar.

Aún cuando en la formulación del medio de cultivo se haya logrado un pH adecuado la propia fermentación al modificar el sustrato origina cambios de pH que usualmente son reguladas automáticamente por adiciones de H_2SO_4 ó $NaOH$ o agregando al medio sustancias con capacidad buffer desde el mismo inicio del proceso. Es indispensable un controlador para regular la temperatura, un controlador de pH debido a que el microorganismo necesita las condiciones apropiadas, un controlador de velocidad de mezcla (Ver anexo. E).

3.1.7. Factores de seguridad

Se seleccionó trabajar con un coeficiente de seguridad de 0,8; si este reactor se cargase con 2,5 L que es su carga máxima real, estaríamos trabajando con el reactor propenso a accidentes por esta razón se recomienda trabajar con la carga de uso o de diseño.

3.2. Simulación del fermentador

Se simuló el reactor batch aerobio con mezclador en Aspen Tech 2006.5 (Ver figura.14).

3.2.1. Selección de variables experimentales para simular a 2,5L

- Cinética de crecimiento de la levadura ajustada mediante datos experimentales.
- Datos de rendimiento
- Condiciones iniciales del proceso.

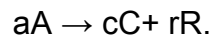
4. RESULTADOS Y ANALISIS

4.1. Cinética: Inhibición Por Producto

Las células se multiplican libremente; sin embargo independientemente de la cantidad de alimento al final se llega a un punto donde las células se amontonan desplazándose entre si, o bien sus productos de desecho inhiben su crecimiento esto se denomina inhibición por producto.

4.1.1. Fermentador De Tanque Agitado:

En este caso las células se encuentran en un medio ambiente uniforme, no se necesita ninguna adaptación y la multiplicación de las células tiene lugar a una velocidad constante. Distribución De Producto y Rendimientos Fraccionales



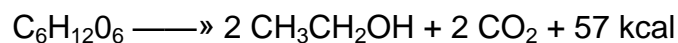
4.1.2. Rendimientos Fraccionales Instantáneos

$$C/A = dC \text{ formado} / dA \text{ usado}$$

$$R/A = dR \text{ formado} / dA \text{ usado}$$

$$R/C = dR \text{ formado} / dC \text{ usado}$$

4.1.3. Reacción Global De Fermentación



De acuerdo con los datos experimentales obtenidos en el GIBIP⁵ se encontró las proporciones adecuadas de glucosa, peptona y levadura para darle las condiciones apropiadas al microorganismo (Ver Anexo J)

GLUCOSA [g/mol]	ETANOL [g/mol]	CO ₂ [g/mol]
300	153,33	146,66

$$\frac{R}{A} = \frac{153,33 \text{ g C}_2 \text{ H}_5 \text{ OH formado}}{300 \text{ g de C}_6 \text{ H}_{12} \text{ O}_6 \text{ usado}} \quad (5)$$

$$\frac{R}{C} = \frac{153,33 \text{ g C}_2 \text{ H}_5 \text{ OH formado}}{146,66 \text{ g CO}_2 \text{ usado}} \quad (6)$$

$$r_{c=-r_A} = \frac{C}{A} = \frac{146,66 \text{ g CO}_2}{300 \text{ g C}_6 \text{ H}_{12} \text{ O}_6} \quad (7)$$

$$r_{R=-r_A} = \frac{R}{A} = \frac{153,33 \text{ g C}_2 \text{ H}_5 \text{ OH formado}}{300 \text{ g de C}_6 \text{ H}_{12} \text{ O}_6 \text{ usado}} \quad (8)$$

$$r_{R=r_c} = \frac{R}{C} = \frac{153,33 \text{ g C}_2 \text{ H}_5 \text{ OH formado}}{146,66 \text{ g CO}_2 \text{ usado}} \quad (9)$$

Para los microorganismos:

$$r_R = \frac{k C_C C_A}{C_A + C_M} \quad (10)$$

C_C = concentración de c en el alimento = 146,66 g/l

C_A = concentración de A en el alimento = $\frac{300 \text{ g}}{1}$

C_M = constante de monod 1,1658

⁵ Grupo de investigación bioquímica e ingeniería proteica.

4.2. Balances de materia y energía

4.2.1. Balance de Biomasa

$$FX_1 - FX + \mu xv - k_d Xv = \frac{dXv}{dt} \quad (11)$$

4.2.2. Balance de Sustrato

$$FS_0 + \alpha F_S - (1 + \alpha)F_S - \frac{\mu xv}{Y_{xs}} - \frac{q_{px}}{Y_{ps}}V - m_s xv = \frac{dsv}{dt} \quad (12)$$

4.2.3. Balance de Energía

$$\sum ciVcpi \frac{dT}{dt} + \sum HiV \frac{dc}{dt} - Q_{rxn} \quad (13)$$

Donde:

$v = \text{volumen del reactor} = 2.5 \text{ l}$

$ci = \text{concentración para cada componente al inicio}$

$T = \text{temperatura de operación } 32^\circ$

$Hi = \text{calor de reacción para cada componente}$

$Q_{rxn} = \text{calor liberado por la reacción exotérmica.}$

4.2.4. Resolviendo por Runge kutta

Se encontró el calor de la reacción es 56 kcal, se obtuvo los perfiles de concentración y temperatura (Ver figura.12).

4.3. Agitación

Se seleccionó un diseño estándar de turbina. Elecciones sobre el tipo y localización del agitador proporción de la altura del tanque y dimensión de las placas deflectoras cada una de estas decisiones afecta:

- Velocidad de circulación del líquido
- Modelos de velocidad y consumo de potencia

4.4. Diseño Estándar

En este diseño seleccionó un agitador tipo turbina debido a la facilidad de operación que presenta este agitador para las condiciones de cultivo que requieren nuestras levaduras.

Tabla 2. Flujos másicos y energéticos obtenidos de la simulación.

		ALIMENTO	ETANOL	VENTCO2
From				
To		BIOREACT	BIOREACT	BIOREACT
Substream: MIXED				
Phase:		Liquid	Liquid	Vapor
Component Mole Flow				
WATER	MOL/HR	0,00	0,00	0,00
ETHANOL	MOL/HR	0,00	84,96	2,74
SUCROSE	MOL/HR	0,00	0,00	0,00
DEXTROSE	MOL/HR	43,85	0,00	0,00
CARBO-01	MOL/HR	0,00	1,05	86,65
OXYGE-01	MOL/HR	0,00	0,00	0,00
Mole Flow	MOL/HR	43,85	86,01	89,39
Mass Flow	KG/HR	7,90	3,96	3,94
Volume Flow	CUM/SEC	0,00	0,00	0,00
Temperature	C	31,00	31,09	17,00
Pressure	ATM	1,00	1,00	1,00
Vapor Fraction		0,00	0,00	1,00
Liquid Fraction		1,00	1,00	0,00
Solid Fraction		0,00	0,00	0,00
Molar Enthalpy	J/KMOL	-1255601000	-278136900,0	-388950500,0
Mass Enthalpy	J/KG	-6969454,00	-6040689,00	-8825153,00
Enthalpy Flow	WATT	-15294,08	-6645,17	-9658,12
Molar Entropy	J/KMOL-K	-1089591,00	-339630,50	-3995,72
Mass Entropy	J/KG-K	-6047,98	-7376,23	-90,66
Molar Density	KMOL/CUM	6,49	17,22	0,04
Mass Density	KG/CUM	1169,28	792,97	1,85
Average Molecular Weight		180,16	46,04	44,07

Fuente: Propia

4.4.1. Números a dimensionales para un agitador tipo turbina

$$\frac{Da}{D} = \frac{1}{3}$$

$$\frac{J}{Dt} = \frac{1}{12}$$

$$\frac{W}{Da} = \frac{1}{5}$$

$$\frac{H}{Dt} = 1$$

$$\frac{E}{Da} = 1$$

$$\frac{L}{Da} = \frac{1}{4}$$

Para este biorreactor se selección adecuadamente cuatro placas deflectoras debido a la agitación tanto para el sustrato como para el microorganismo (Ver anexo H). Los reactores de tanque (autoclaves) son los tipos de reactores que más prevalecen, pues se adaptan bien a la operación discontinua o continua y a velocidades de producción pequeña o medias, dentro de un amplio intervalo de presiones y temperaturas. Los recipientes cilíndricos son los más comúnmente empleados predominando los de tipo vertical.

$$V = \pi r^2 h \quad (14)$$

Donde:

$$V = \text{volumen del bioreactor} = 2,5 \text{ l}$$

$$h = \text{altura del bioreactor} = 0,4 \text{ m}$$

$$r = \text{radio del bioreactor} = 0,0446 \text{ m}$$

4.4.2. Numero De Flujo

$$N_Q = \frac{q}{nDa^3} \quad (15)$$

Donde:

$$N_Q = \text{número de flujo} = 0,38$$

$$q = \text{caudal} = 0,012244 \frac{\text{cm}^3}{\text{s}}$$

$$Da = \text{diámetro del rodete} = 0,2 \text{ cm}$$

$$n = 4 \text{ s}^{-1}$$

4.5. Régimen De Flujo

Para conocer el régimen de flujo se encontró el número de Reynolds.

$$Re = \frac{\rho v_s D}{\mu} \quad (16)$$

Donde:

$$\rho = \text{densidad del fluido} = 1800 \text{ kg/m}^3$$

$$Vs = \text{velocidad característica del fluido} = 10 \frac{\text{m}}{\text{s}}$$

$$D = \text{diámetro de la tubería} = 0,0223 \text{ m}$$

$$\mu = \text{viscosidad dinámica} = 0,05 \frac{\text{kg}}{\text{ms}}$$

$$Re = \text{número de Reynolds} = 8028$$

4.5.1. Régimen turbulento

$$Np = \frac{Pg}{\rho n^3 Da^5 c} \quad (17) \quad Np = 5,2$$

4.6. Velocidad De Transferencia De Oxígeno Volumétrica

$$N_A = KLa(C^* - C) = HKLa(p - p^*) \quad (18)$$

Donde:

kLa = coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno por área interfacial

C^* = concentración de oxígeno en el equilibrio

C = concentración de oxígeno disuelto en el líquido

p^* = presión de oxígeno en el equilibrio

p = presión de oxígeno en la fase gas

H = constante de Henry

$N_A = 32,634$

4.6.1. Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno por área interfacial

En la literatura existen muchas correlaciones para calcular este coeficiente pero para nuestro caso la más adecuada fue la correlación de Cooper:

$$KLa = cte \frac{p^\alpha}{v^\alpha} (v_s^\beta) \quad (19)$$

Donde:

$cte = 0,0635$

volumen del reactor $2,5^{-3}m^3$

v_s = velocidad superficial del fluido

$v = 1579 \frac{kgm}{h}$ de acuerdo a la teoría cinética de los gases

$\alpha = 0,95$

$\beta = 0,67$

5. CONCLUSIONES

El modelamiento matemático de la biocinética demostró ser una potente herramienta para la simulación del proceso de fermentación al describir adecuadamente el crecimiento de la biomasa y la formación de bioetanol. Estos modelos son de gran utilidad durante el diseño del proceso y constituyen el primer paso para la simulación de la transferencia de masa, de calor y las condiciones hidráulicas del cultivo en biorreactores.

Con el presente trabajo se demuestra que el jarabe de glucosa extraído de yuca es un medio de cultivo que proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo de las cepas de levaduras nativas empleadas, así como para la biosíntesis de etanol.

6. RECOMENDACIONES

Se debe ser muy cuidadoso con los residuales de este proceso que en ocasiones deben ser esterilizados antes de someterlos al procedimiento de depuración que permita verterlos a cualquier curso de agua.

La depuración será tal que la demanda biológica de oxígeno (DBO) sea reducida a los niveles que establezcan las normas vigentes, al ser desechado un residual que contenga materias biodegradables.

Se deben hacer las pruebas en el biorreactor teniendo en cuenta los resultados del diseño de este trabajo de grado junto con los de la simulación y verificar con los controladores de pH, temperatura, transferencia de oxígeno si es posible aumentar la eficiencia de la fermentación.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] VOGEL, Henry; TODARO Celeste L. Fermentation and Biochemical Engineering Handbook principles, process design, and equipment Westwood, N.J. Noyes Publications,c1997. 2nd ed.ISBN 0815514077. Pág 67-120.
- [2] MCNELI, Brian; HARVEY, Linda. Practical Fermentation Technology. Páginas : 392 Editorial : John Wiley & Sons Fecha de Publicación : 22/02/2008 ISBN: 978-0-470-01434-9 Pág 3-37:167-231.
- [3] NAJAFPOUR, Ghasem; Biochemical Engineering and Biotechnology. 438 Editorial : ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS Fecha de Publicación : 01/10/2006 ISBN: 978-0-444-52845-2Pág 15:22-43:82:142.
- [4] LEE, James M. Biochemical engineering Lee, (1992.) ISBN 0-13-085317-8 *Basic biotechnology /edited by Colin Ratledge and Bjorn Kristiansen.2nd ed., repr.* (2002.) ISBN 0521770742. Cap. 3:4.
- [5] FOGLER, Scott. Elementos de ingeniería de la reacción química. FOGLER SCOTT, H. PRENTICE HALL 2001 3ª ed. ISBN: 978-970-26-0079-4 EAN: 9789702600794
- [6] ATKINSON, B. Biochemical Reactors Ed. Reverté. Barcelona (1986).
F.C.Webb. "Ingeniería Bioquímica". Ed. Acribia. Zaragoza (1966).
- [7]QUINTERO, Rodolfo. Ingeniería Bioquímica Teoría Y Aplicaciones Ed.Alambra. Mexico, 1981.. Pág. 81-94.

[8] LEVENSPIEL, Octave. Ingeniería de las reacciones químicas. Editorial Reverté May 2000 ISBN: 9686708294 660 páginas Pág. 611-649

[9] RAMASAMY Amutha and PARAMASAMY Gunasekaran: "Production of Ethanol from Liquefied Cassava Starch Using Co-Immobilized Cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. J. BIOSCI. BIOENG., Vol. 92, 560-564 (2001)

[10] McCABE, Warren; SMITH, Julian; HARRIOT, Peter. Operaciones unitarias en ingeniería química. Ed Mc Graw Hill 4ta edición Pág.251-29. [11] IZQUIERDO, Jose Felipe. Cinética de las reacciones químicas. 304 pags Lengua: CASTELLANO Encuadernación: Tapa blanda ISBN: 9788483384794 Colección: N° Edición:1ª Año de edición:2004Pág. 269-303.

[12] www.unicamp.com. tesis de grado del 2002

[13] www.uam.es/personal_pdi/ciencias/ssantoyo/fermentacion/disenodefermentaciones.pdf

[14] www.proyectoplantafermentacion.blogspot.com/

[15] www.worldcat.org/oclc/57618145?page=viewport

[16] <http://www.scribd.com/doc/6992122/Resumen-Fermentacion>.

[17] <http://www.promusmex.com> monografías de cinética de crecimiento microbiano.

[18] <http://www.microbiología.com> conceptos generales acerca de lo micro y su uso.

[19] <http://www.biol.unlp.edu.ar/alimentos/ASIGNFERMEN.htm>.

[20] <http://www.uib.es/depart/dba/microcore>

[21] www.nbsc.com PO Box 4005 Edison, NJ 08818-4005 USA
•bioinfo@nbsc.com 732-287-1200 • 800-631-5417 2007-2009 New Brunswick
Scientific

[22] PADMANABAN, Kesavan; LAW Victor J.. Parameter estimation of monod kinetics without biomass data and initial substrate concentration. Chemical Engineering Communications, 1563-5201, Volume 167, Issue 1, 1998, Pages 107.

[23] ALVÁREZ, R.M. Y COL. (1992). "Efecto de la Temperatura sobre la producción de alcohol en levaduras." II Seminario Internacional sobre azúcar y derivados de la caña. diversificación'92. Comunicaciones cortas. Tomo I, p. 120-122.

[24] ALVÁREZ, R.M. Y COL. (1993). "Efecto del tamaño del inóculo en la fermentación alcohólica por lotes." Rev. Latin-American de Microbiología 35: 33-38.

[25] BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. (1994). Edit. Wilkinscompany, 8th edition. ISBN: 0387241450. ISBN-13: 9780387241456 (30/09/2005).

[26] BERNARD, H. (1983). "Energy for renovable resources." Rev. Biotechnology 13, 24-29. Facultad de Ingeniería - Universidad Rafael Landívar Boletín Electrónico No. 08 URL_08_ING01.pdf 13 de 17.

[27] BIART, J. Y COL. (1982). "Estudio de las mieles finales de la caña de azúcar." / J. Biart. Editorial Científico Técnica.

[28] BLANCO, G. (1987). "La producción de alcohol a partir de la industria química y sus posibilidades." Rev. ICIDCA. 21, 2, 12-18.

- [29] CACHOT, T. ET. AL. (1991). "Mejoramiento de la fermentación alcohólica en mieles de caña y remolacha por suplementación." J. Ferment. And Bioeng. 71, 1, 24-27.
- [30] CROSS, V. Y COL. (1993). "Comportamiento de un reactor biofilm con *Z. mobilis*". Biotech. and Bioeng; Univ. de Arkansas.
- [31] DAENIDHEVA, V.A. Y PODLESNIJ, G. A. (1982). "Efectividad económica en la introducción de una nueva técnica en la industria alcoholera rusa." Memorias 12 congreso Inst.Alim. Kiev, Ucrania.
- [32] POSADA David E. (1968). "Aceite de fusel: fenómenos que determinan su producción." Rev. Cuba Azúcar. 2, 10-19.
- [33] DE MINIAC, M. (1989). "Contamination of industrial alcoholic fermentation of yeast of the *Brettanomyces* genus." Ind. Alim. Agric. 106, 559-63.
- [34] DE VASCONCELOS, J. N. (1987). "Influence of complementation of nitrogen and phosphate nutrients on the industrial alcohol fermentation process." Brasil açuc. 105, 416, 41-48.
- [35] DEL CASTILLO, L. Y COL. (1997). "Aspectos genéticos de la tolerancia alcohólica de las levaduras." Trabajo presentado en TIPAL'97, Universidad de Matanzas.
- [36] DEVINE, S. J. ET. AL. (1980). "The effect of medium composition on the production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol. Letters. 9, 1, 19-21.
- [37] DOMÍNGUEZ, V. E. Y COL. (1998). "Influencia de la harina de maíz y el salvado de arroz en la formación de productos derivados en la fermentación alcohólica." Int. Sug. JNL. 100,1197, 474.
- [38] DUBOIS, P. ET. AL. (1975). *Annales de Technologie Agricole* 24: 307-309.
- EL TABEY SHEHATA, A. M. (1970). *Applied Microbiology*. 8,73-76. ESTÉVEZ, R. (1997). "Fundamentos de la generación de levadura en destilerías." Memorias. I Seminario de producción de levadura *Torula*. MINAZ.

- [39] FABELO, J. Y COL. (1998). "Determinación de los costos de producción de la etapa de fermentación alcohólica con la utilización de diferentes sustratos" Rev. Centro Azúcar 3, 12-15.
- [40] FABELO, J. Y COL. (1998). "Estudio estadístico de la etapa de fermentación alcohólica para diferentes sistemas de sustratos." Rev. Centro Azúcar 2, 27-30.
- [41] FABELO, J. Y COL. (1998). "Modelación y optimización de la etapa de fermentación alcohólica utilizando diferentes sistemas de sustratos." Rev. Centro Azúcar 2, 32-34
- [42] VIEGAS, Caldeira Marcelo otimização de sistema de fermentação alcoólica continua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes 1996 Unicamp Brasil.
- [43] BONILLA, Miguel, GUARIN Carlos, MAHECHA Rodrigo, OTENCION DE ACIDO LACTICO POR FERMENTACION CON LACTOBACILLUS DELBRUECKII BULGARICUS Departamento de farmacia. Facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia .A.A 14490.Santa fe de Bogotá Colombia.
- [44] VARGAS, Edgar Mauricio , GÓMEZ Clara Juliana, PARRA Mónica Eliana, ROMERO , María A. PRODUCCIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS COMO ADITIVO PARA ALIMENTOS CONCENTRADOS PARA GANADO VACUNO Centro de Investigaciones de la Facultad de Ingeniería (CIFI) de la Universidad de los Andes.
- [45] ECHEVERRI, O. QUINTERO, M. RAMÍREZ y H. ÁLVAREZ CONTROL DE UN BIORREACTOR PARA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA EN CONTINUO Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín Facultad de Minas carrera 80 barrio Robledo. - Medellín –COLOMBIA Grupo de Automática de la Universidad Nacional (GAUNAL), Instituto de Automática y Procesos Industriales (IAPI)

ANEXOS

ANEXO A. VENTAJAS, DESVENTAJAS Y SUPUESTOS DE UN BIORREACTOR BATCH

Ventajas de cultivo batch

- Simplicidad de uso. Un cultivo batch puede ser preparado fácilmente, y, dependiendo del microorganismo usado, puede terminar en menos de 24 horas.
- Operatividad y confiabilidad. Menos probabilidad de falla en algún instrumento en corridas batch cortas.
- Producción de metabolitos secundarios que no están relacionados con el crecimiento (producidos cuando el organismo entra a la fase estacionaria).
- Menos posibilidades de contaminación: todos los materiales requeridos para el bioproceso están en recipientes y son esterilizados antes que comiencen las corridas. El único material adicionado (con la excepción del inóculo al comienzo del bioproceso) y removido durante el curso de la fermentación es el gas de intercambio, y si se usa un biorreactor, antiespumante estéril y soluciones de control de pH si son requeridas. Es fácil asignar un número único batch a cada corrida, generando una alta confianza en la historia de cada batch de producto. Esto es importante en un ambiente muy regulado.

Desventajas del cultivo batch.

- Envejecimiento del cultivo, y una diferenciación más importante, pueden ser un problema específico, especialmente, con productos relacionados con el envejecimiento.

- El crecimiento de metabolitos tóxicos pueden restringir el crecimiento de la celda y la formación del producto.
- Producción de metabolitos microbianas (etanol, ácido cítrico, vitaminas, antibióticos);
- Producción de productos recombinantes, resultantes de ingeniería genética para producir proteínas.
- Producción de anticuerpos monoclonales.
- Biotransformaciones, en las cuales un componente adicionado a la fermentación es transformado en un producto más valioso, las celdas o enzimas siendo usadas como catalizadores específicos, biotransformaciones pueden también incluir la degradación de componentes tóxicos.
- Producción de vacunas.
- Tratamiento de desechos (agua, suelo).
- Cada vez mas los biorreactores son usados también para lo siguiente:
- Producción de células animales.
- Tejido artificial y cultivo de órganos.
- Producción de células de plantas para la producción de fármacos, pigmentos y otros químicos especiales también como semillas a través de embriogénesis somática.

Excepto por la producción de biomasa y tratamiento de agua de desecho, muchos de estos procesos incluyen biorreactores batch. Aunque las productividades de operaciones continuas pueden ser altas, en general las operaciones batch son preferidas para reducir el riesgo de contaminación, reducir pérdidas financieras debido a los cultivos estropeados, por proveer mejor contención y acumular productos de manera que las concentraciones de productos inherentemente baja puede ser aumentada, lo cual entonces ayuda con la proceso downstream.

Supuestos

Los supuestos generales en el moldeamiento de cultivos batch son:

- Cultivos microbianos están vivos o muertos.
- Dentro de estas clases de células vivas o muertas, son homogéneas en tamaño, morfología, fisiología, y otras características físicas-químicas-biológicas que pueden ser tratadas como una masa simple de células vivas o muertas. Este supuesto no es apropiado para algunos hongos o cultivos de Actinomycece. En los modelos de sistemas heterogéneos, necesitamos usar modelos estructurados que se relacionen con la naturaleza heterogénea del sistema.
- El volumen de líquido es mezclado de tal manera que las propiedades intensivas, tales como concentraciones, temperatura, pH son uniformes en el volumen líquido. Esto implica que el volumen líquido puede ser elegido como la región de control.
- Estos supuestos también implican que las células están libremente suspendidas. Los modelos de biopelículas, agregados de células, y células inmovilizadas incluyen sistemas heterogéneos donde la región de control es normalmente infinitesimal en tamaño. [1]

ANEXO B. INFORME GIBIP⁶⁶

FERMENTACIÓN DE GLUCOSA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL MEDIANTE ESTUDIO DEL PROCESO EL USO DE LEVADURAS NATIVAS.

METODOLOGIA

I. Suministro del microorganismo/aislamiento productor de bioetanol.

Los microorganismos a emplear en la sección experimental fueron suministrados por el grupo de investigación en Bioquímica e ingeniería de proteínas (GIBIP) de la Universidad Industrial de Santander, los cuales fueron aislados a partir de bebidas típicas de fermentación: Manzana, caña y panela.

II. Selección del microorganismo/aislamiento productor de Etanol.

La selección del aislamiento, se realizó de acuerdo a la mayor productividad de etanol, durante el proceso también fueron considerados el consumo de glucosa y producción de biomasa y etanol en el tiempo.

a). Curva de crecimiento microbiano. Análisis turbidimétrico.

- Sembrar por agotamiento en un medio sólido el microorganismo al cual se desea conocer la cinética de crecimiento.
- Después de 48 horas de crecimiento a 37°C tomar dos o tres colonias e inocular en un Erlenmeyer que contenga 50 ml del caldo de cultivo seleccionado (o pre inculo): 10 g/L de peptona, 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de glucosa. Permitir el crecimiento durante aproximadamente 12 horas.
- Simultáneamente preparar en un biorreactor 250 ml del caldo de cultivo anterior e inocular el pre inculo. Incubando el biorreactor a 37°C por 48 horas o hasta una producción de biomasa considerable.

⁶⁶ Grupo de investigación bioquímica e ingeniería proteica

- Agitar el contenido del cultivo en crecimiento y extraer una muestra de 100 ml del biorreactor, agregarlos en tubos Falcon (2 tubos de 40 ml y 1 tubo de 20 ml). Este proceso se realiza por duplicado.
- Centrifugar a 10000 G por 15 minutos a 4°C y descartar el sobrenadante y re suspender el pellet con agua destilada al mismo volumen anterior.
- Centrifugar nuevamente con las condiciones anteriores, descartar el sobrenadante y re suspender el pellet con agua destilada en el menor volumen posible.
- En una caja limpia, seca y previamente pesada adicionar la suspensión de células. Dejar secar a 100°C por 12 horas. Pesar nuevamente la caja. Registrar los pesos y determinar la concentración de biomasa de la caja por diferencia de peso.
- Preparar diferentes diluciones a partir del medio de cultivo inicial. Medir sus respectivas absorbancia a 650 nm.
- Establecer la relación entre la absorbancia, las diluciones y las respectivas concentraciones de biomasa.

b). Curva de calibración de Glucosa. Método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).

- Preparar una solución de glucosa de concentración conocida (1mg/ml). A partir de la misma preparar diluciones de concentración entre 0,1 a 1mg/ml.
- Preparar el blanco en un tubo de ensayo adicionando 1ml agua destilada y 1ml de reactivo de DNS.
- Tomar en 10 tubos diferentes previamente marcados 1 ml de cada una de las diluciones preparadas anteriormente, adicionar a cada uno 1 ml del reactivo de DNS.
- Someter a calentamiento cada una de las muestras durante 5min a una temperatura de 100°C en un baño de agua, incluido el blanco.
- Retirar del calentamiento y someter inmediatamente a baño hielo por 15 minutos para detener la reacción.

- Diluir cada tubo con 10ml con agua destilada y leer la respectiva absorbancia a 540 nm.
- Establecer la relación entre la absorbancia y la respectiva concentración de glucosa.
- c). Determinación de la concentración de Etanol. Headspace - Cromatografía de Gases (GC)
- Cuantificación del Etanol.

El analito de interés, el etanol, es identificado por headspace-cromatografía de gases (GC) y comparado con los datos obtenidos por medio de una curva de calibración de soluciones de etanol, la cual se analiza bajo las mismas condiciones de operación que la muestra de interés. La composición de la muestra es calculada por comparación de la altura o por las áreas de los picos, o ambos, con los valores correspondientes a la curva de calibración.

- Preparación de las muestras para el análisis por Headspace-cromatografía de gases(GC)

Cada una de las muestras destinadas al análisis de etanol, se centrifuga a 10000 G por 10 minutos a 4 °C, posteriormente se toman 10 ml de cada una de ellas y se envasan en viales. Para la muestra patrón se toma 10 ml del medio de cultivo seleccionado sin inocular en el cual se lleva a cabo el proceso de fermentación y se envasa en un vial cerrado a presión. De igual manera ha de prepararse 10 ml de una muestra enriquecida de etanol, de concentración conocida.

- Análisis Headspace-Cromatografía de Gases (GC).

Con el objetivo de cuantificar el etanol producto de la fermentación de la glucosa con microorganismos nativos se empleo la técnica de Headspace-Cromatografía de gases (GC), empleando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890

Condiciones de operación HEADSPACE:

Ciclo GC: 50 min.

Agitación: media.

Tiempo de equilibrio vial: 10 min.

Tiempo de presurización: 0,03 min.

Tiempo de llenado del loop: 0,1 min.

Tiempo de equilibrio del loop: 0,1 min.

Tiempo de inyección: 0,5 min.

Volumen del loop: 1ml.

Condiciones de operación de la columna CROMATOGRAFIA DE GASES (GC).

Gas de arrastre: Helio.

Flujo del gas de arrastre: 2 ml/min.

Tipo de columna: DB-WAX. 60m*0.25mm*0.25µm.

Temperatura inicial: 35°C (8min)

Velocidad: 5°C/min. Hasta 100°C (2min).

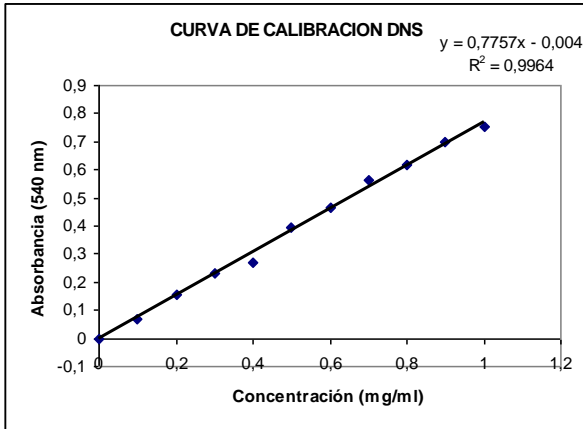
Velocidad: 15°C/min. Hasta 24°C (2min).

Este método es propuesto por la escuela nacional de cromatografía, facultad de Ciencias de la universidad industrial de Santander.

RESULTADOS

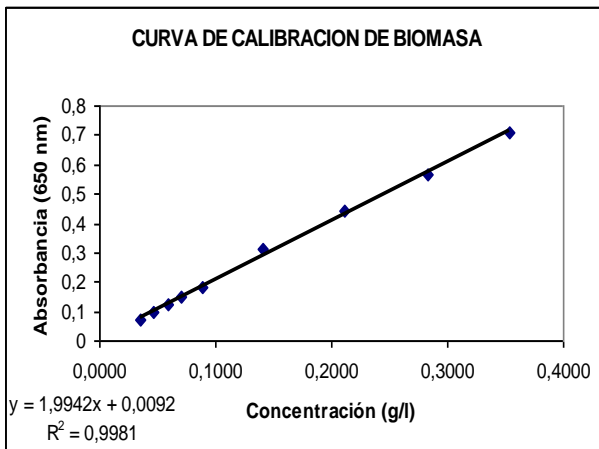
a).Realización de las curvas de calibración.

Fig1: Curva de calibración de Glucosa



Fuente: Propia

Fig. 2: Curva de calibración de biomasa.



Las curvas de calibración muestran un factor de correlación confiable, superior a 0,99.

b). Selección del microorganismo/aislamiento productor de etanol.

Para la selección del microorganismo/aislamiento productor de etanol se elaboró por duplicado un ensayo en el que se evaluó la producción de éste y la biomasa, así como el consumo de glucosa en el tiempo, por parte de los diferentes aislamientos de levadura a seleccionar.

La fermentación se realizó en 150 ml de un medio de cultivo de composición conocida que contenía: peptona (10g/l), extracto de levadura (10g/l), y glucosa (117,106 y 113 g/l, según el aislamiento en estudio), pH 6.57, temperatura 32°C y 110 rpm por un tiempo de fermentación de 25 horas.

Las muestras fueron extraídas del biorreactor en tiempos definidos: 0, 3, 7, 10 y 25 horas.

Los parámetros de interés (Biomasa, Glucosa y Etanol) fueron determinados según la metodología propuesta:

Concentración de Biomasa: Turbidimetría.

Concentración de Glucosa: ácido 3,5 Dinitrosalicílico.

Concentración de Etanol: Headspace-Cromatografía de gases.

Tabla 1. Crecimiento de Biomasa.

Aislamiento	MANZANA	CAÑA	GUARAPO
Tiempo(h)	Biomasa(g/l)		
0	0,0106	0,0728	0,0126
3	0,0206	0,1023	0,0086
7	0,1916	0,49	0,0607
10	1,219	2,1082	0,2051
25	2,8693	5,1861	3,9926

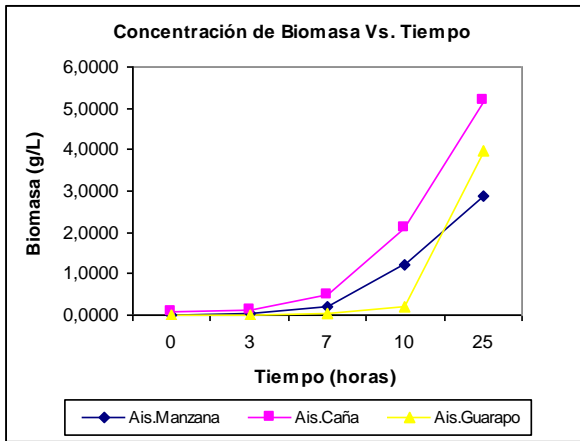


Fig.3. Curva de crecimiento de biomasa.

Si bien un medio rico en nutrientes como el seleccionado, permite que los microorganismos tengan excelentes fuentes para sus procesos bioquímicos. Es así como los aislamientos de estudio tienden a producir grandes cantidades de biomasa, dentro los que se destaca el aislamiento de caña con su mayor producción de biomasa 5,1861 g/l.

Tabla 2. Consumo de glucosa

Aislamiento	MANZANA	CAÑA	GUARAPO
Tiempo(h)	Glucosa(g/l)		
0	117,249	106,114	113,319
3	105,022	89,854	109,389
7	94,105	73,353	85,808
10	44,476	35,581	66,907
25	17,564	10,453	6,358

La figura 2 deja ver el continuo y rápido consumo de glucosa en el tiempo por parte de los tres aislamientos en estudio, en donde el aislamiento de caña presenta una tendencia hacia un consumo un poco mas acelerado.

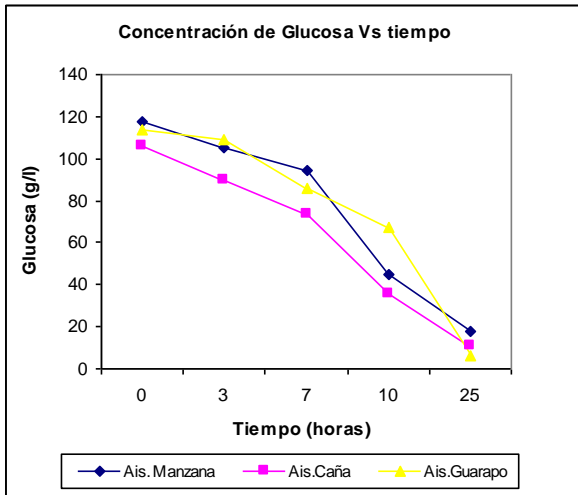


Fig.4. Curva del consumo de Glucosa.

Tabla 3. Producción de Etanol.

Aislamiento	MANZANA	CAÑA	GUARAPO
<u>Tiempo(h)</u>	<u>Etanol(g/l)</u>		
0	0	0	0
3	0,32	1,18	0,47
10	8,43	17,69	1,82
25	37,61	51,62	37,54

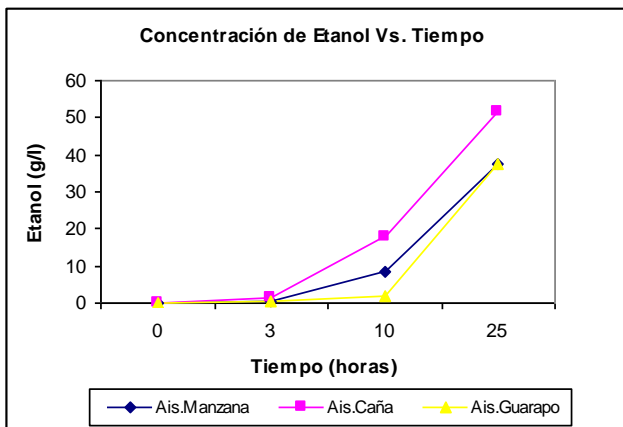


Fig.5. Curva de producción de etanol.

La curva de producción de etanol muestra la tendencia del aislamiento de caña hacia la mayor productividad del analito de interés. Por su parte el aislamiento de guarapo presenta la menor tendencia hacia la producción de etanol.

Tabla 4. Parámetros de productividad de etanol.

	Yx/s	Yp/s	Yp/x	Qp
MANZANA	0,0287	0,3773	13,1557	1,5043
CAÑA	0,0535	0,5396	10,0957	2,0649
GUARAPO	0,0372	0,351	9,4324	1,5016

Para los tres tipos diferentes de aislamiento fueron considerados los parámetros de: la producción de células, productividad de etanol respecto al sustrato y productividad de etanol respecto a la biomasa así como la productividad volumétrica, obteniéndose que el microorganismo que permite la mayor productividad de etanol es el aislamiento proveniente de la bebida de fermentación de la caña, mientras que la productividad de los aislamientos de manzana y guarapo presentan una productividad muy similar.

De acuerdo a ello el microorganismo proveniente del aislamiento de caña presenta la siguiente tendencia durante una cinética de fermentación bajo los parámetros establecidos inicialmente.

Tabla 5. Cinética de fermentación. Aislamiento de caña.

CAÑA			
Tiempo(h)	Biomasa(g/l)	Glucosa(Kg./l)	Etanol(g/l)
0	0,07	0,11	0
3	0,1	0,09	1,18
10	2,11	0,04	17,69
25	5,19	0,01	51,62
38	12,5	0	71,43

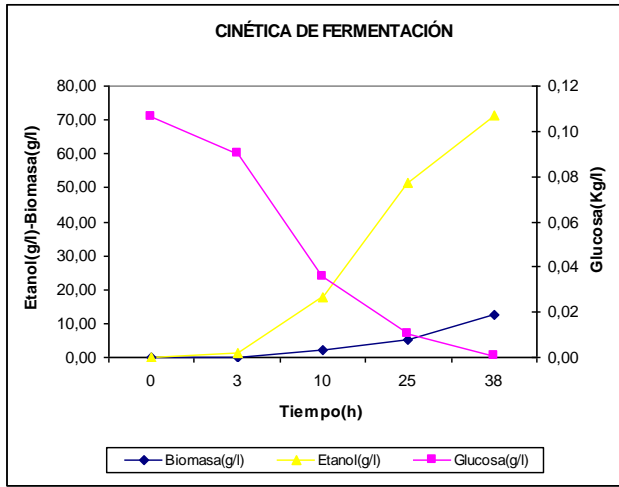


Fig6. Cinética de fermentación. Aislamiento de caña

En esta curva observamos la cinética de crecimiento, el consumo de glucosa y la producción de etanol del aislamiento proveniente de la caña, en el cual a las 3 horas se observa un incremento considerable en la producción de etanol, y a su vez un ligero aumento en la biomasa.

Comparando los resultados de los 3 aislamientos, en los cuales el microorganismo proveniente de la bebida de fermentación de caña, se selecciona como el microorganismo a seguir en estudio por su mayor productividad de etanol hasta las 25 horas dicho anteriormente.

ANEXOS 1. CURVA DE CALIBRACION DE ETANOL.

Method C:\CHEM32\1\METHODS\FERMENTACION2NA.M

Calibration Table

Calibración etanol - Nivel alto

Calib. Data Modified : 02/06/2009 09:50:08 a.m.
 Calculate : External Standard
 Based on : Peak Area
 Rel. Reference Window : 0.000 %
 Abs. Reference Window : 1.000 min
 Rel. Non-ref. Window : 0.000 %
 Abs. Non-ref. Window : 1.000 min
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Uncalibrated Peaks : not reported
 Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
 Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks
 Curve Type : Linear
 Origin : Forced
 Weight : Equal
 Recalibration Settings:
 Average Response : Average all calibrations
 Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :
 Printout of recalibrations within a sequence:
 Calibration Table after Recalibration
 Normal Report after Recalibration
 If the sequence is done with bracketing:
 Results of first cycle (ending previous bracket)

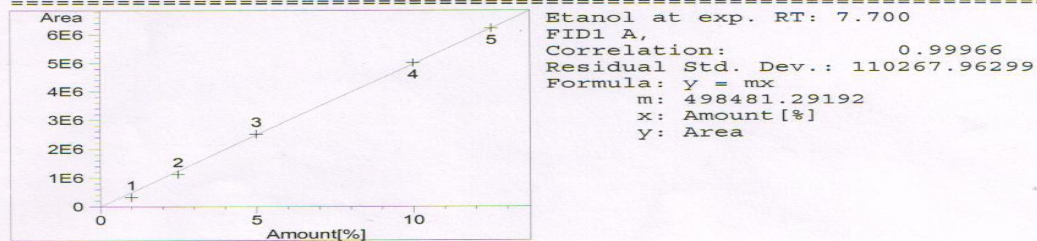
Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [%]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
7.700	1	1.00000	3.22142e5	3.10422e-6	Etanol
	2	2.50000	1.12155e6	2.22905e-6	
	3	5.00000	2.51080e6	1.99139e-6	
	4	10.00000	5.02560e6	1.98981e-6	
	5	12.50000	6.23007e6	2.00640e-6	

Peak Sum Table

No Entries in table

Calibration Curves

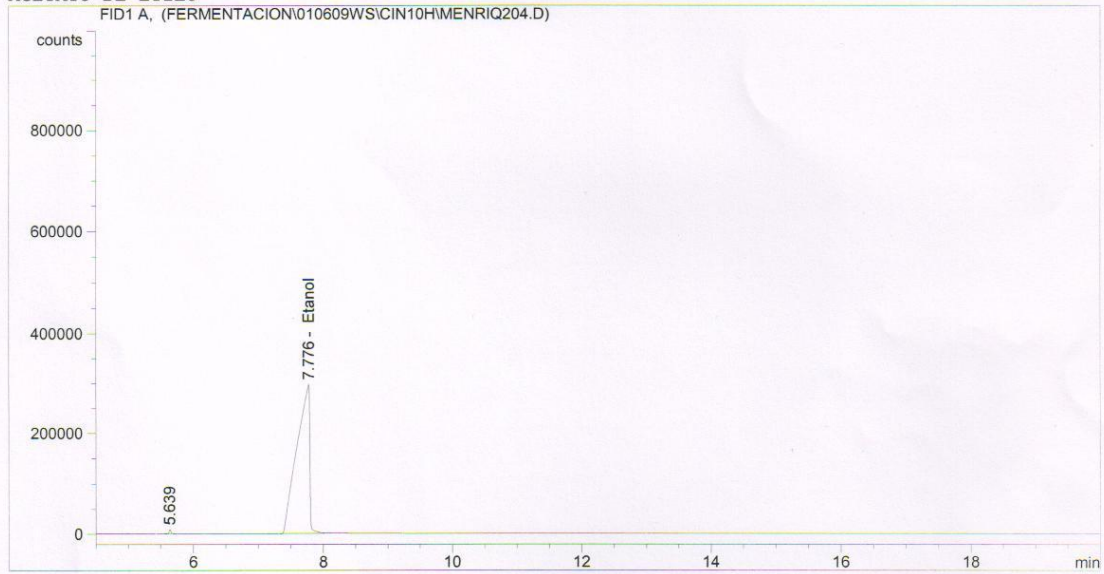


ANEXO 2. CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA ENRIQUECIDA CON ETANOL

Data File C:\CHEM32\1\DATA\FERMENTACION\010609WS\CIN10H\MENRIQ204.D

```
=====  
Injection Date : 01/01/1988 05:55:28 a.m.  
Sample Name : Location : -  
Acq. Operator : Elena E. Stashenko - UIS  
Acq. Instrument : HP 5890 No 1 Inj Volume : Manually  
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\HSETAN.M  
Last changed : 02/01/1988 12:47:52 p.m. by Elena E. Stashenko - UIS  
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\FERMENTACION2.M  
Last changed : 02/06/2009 09:50:03 a.m.  
(modified after loading)
```

ACETATO DE ETILO



External Standard Report

```
=====  
Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 02/06/2009 09:50:08 a.m.  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

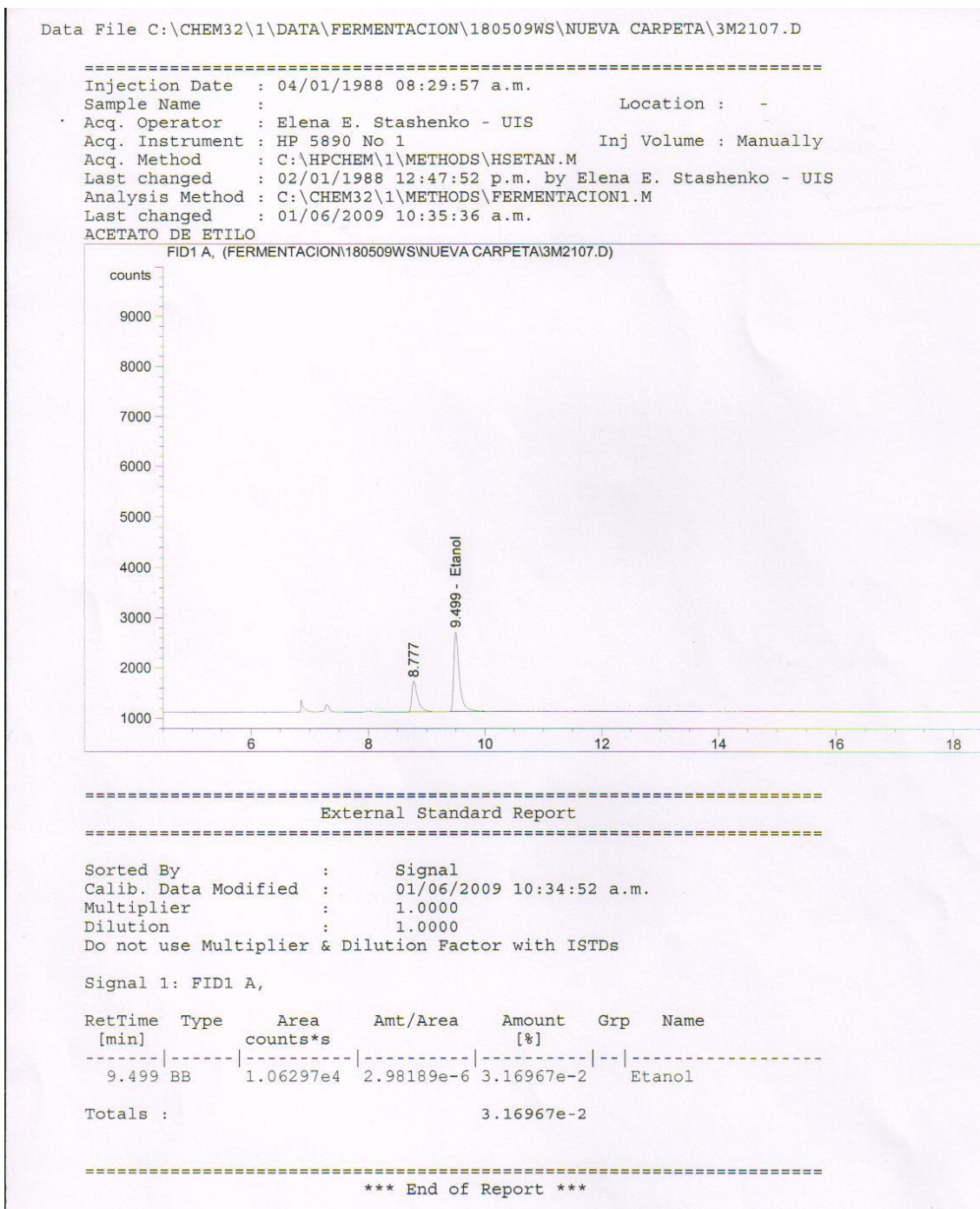
Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
7.776	VV	4.10437e6	2.00609e-6	8.23374		Etanol

Totals : 8.23374

=====
*** End of Report ***

ANEXO 3. CONCENTRACION DE ETANOL (AISLAMIENTO DE MANZANA; 3 HORAS)



ANEXO 4. CONCENTRACION DE ETANOL (AISLAMIENTO DE MANZANA; 10 HORAS)

Data File C:\CHEM32\1\DATA\FERMENTACION\010609WS\CIN10H\10M1206.D

```

=====
Injection Date   : 01/01/1988 07:36:24 a.m.
Sample Name     :                               Location :   -
Acq. Operator   : Elena E. Stashenko - UIS
Acq. Instrument : HP 5890 No 1                 Inj Volume : Manually
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\HSETAN.M
Last changed    : 02/01/1988 12:47:52 p.m. by Elena E. Stashenko - UIS
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\FERMENTACION2.M
Last changed    : 02/06/2009 09:50:03 a.m.
                  (modified after loading)
    
```

ACETATO DE ETILO



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 02/06/2009 09:50:08 a.m.
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

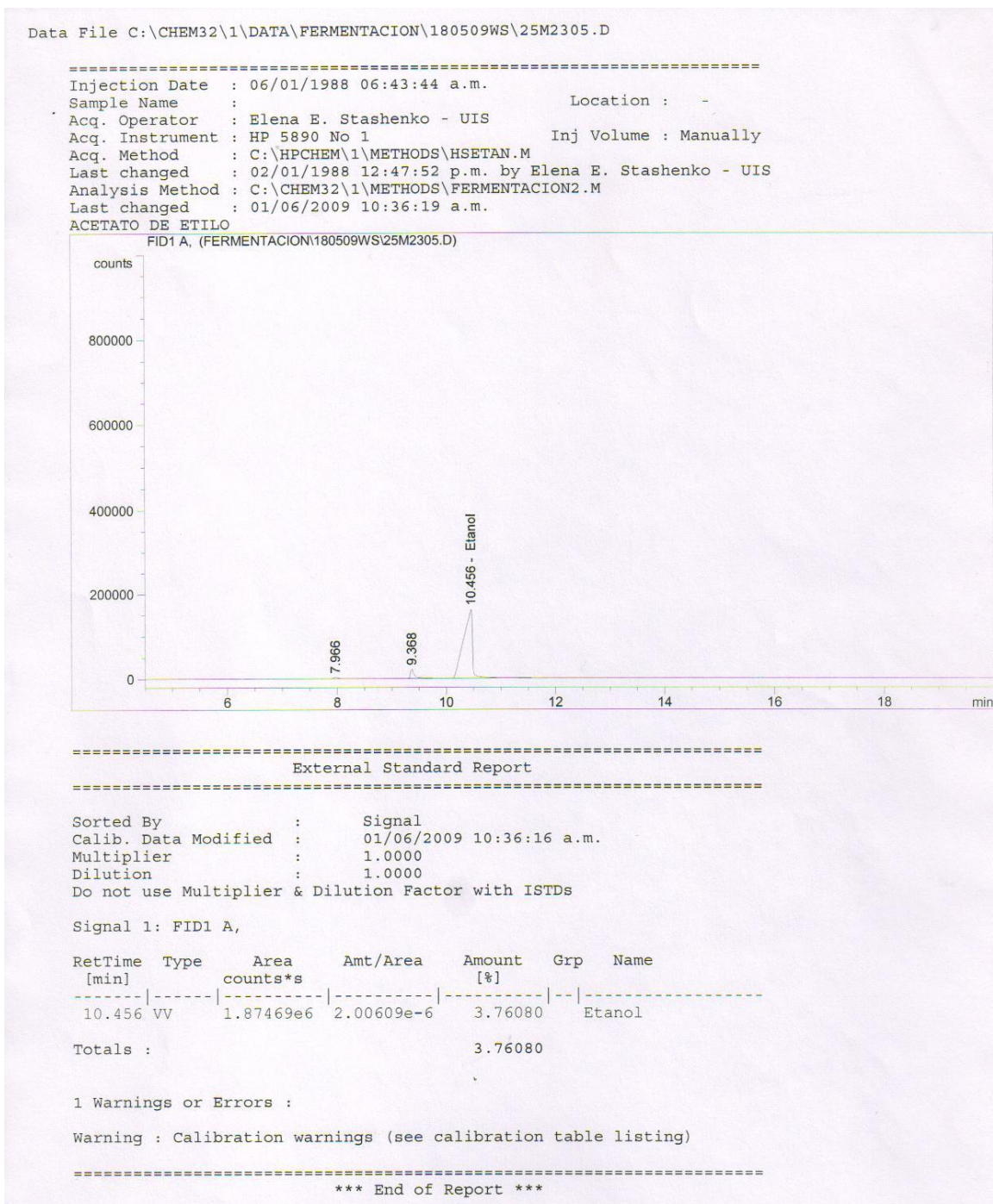
Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
7.413	VV	4.20194e5	2.00609e-6	8.42947e-1		Etanol

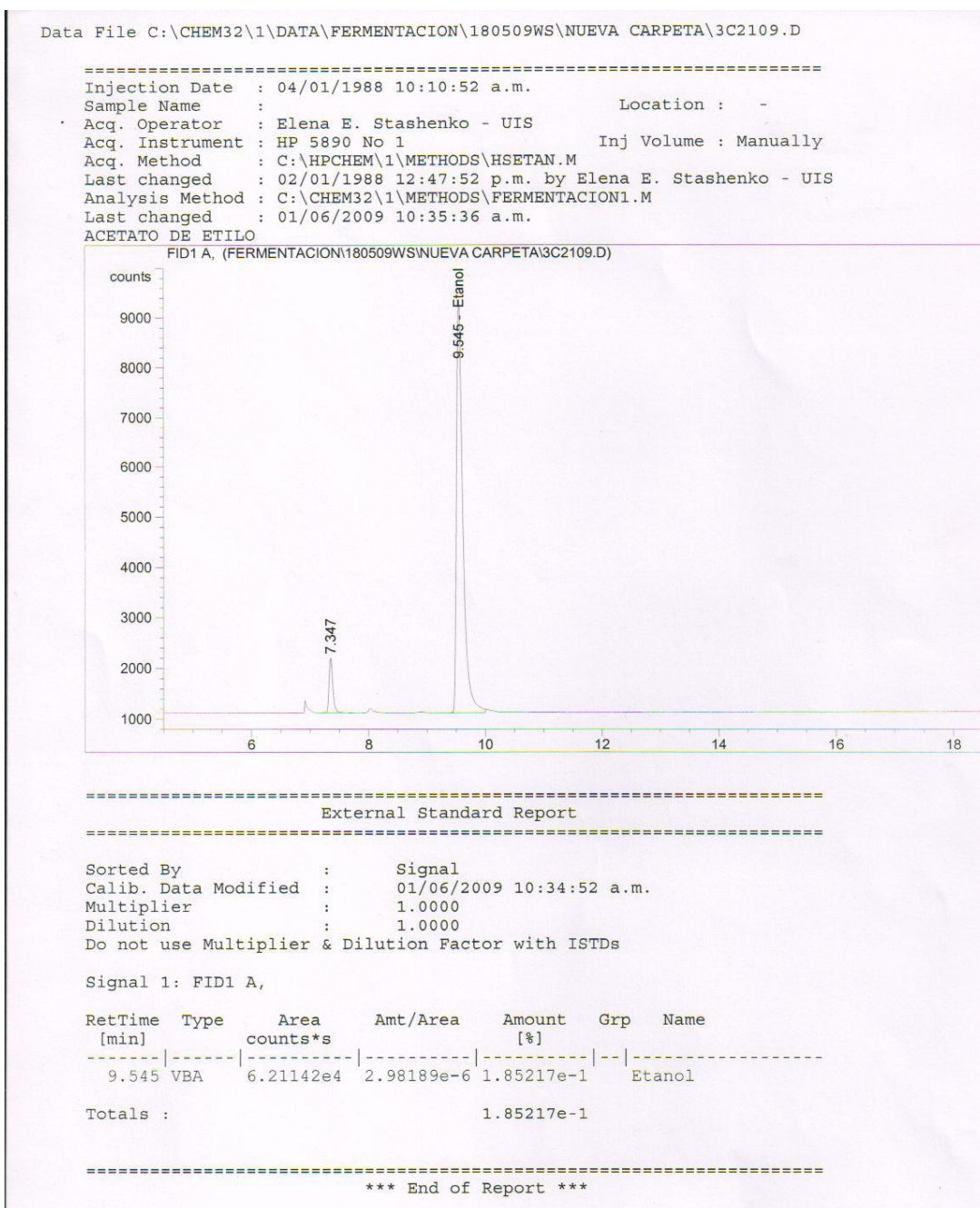
Totals : 8.42947e-1

*** End of Report ***

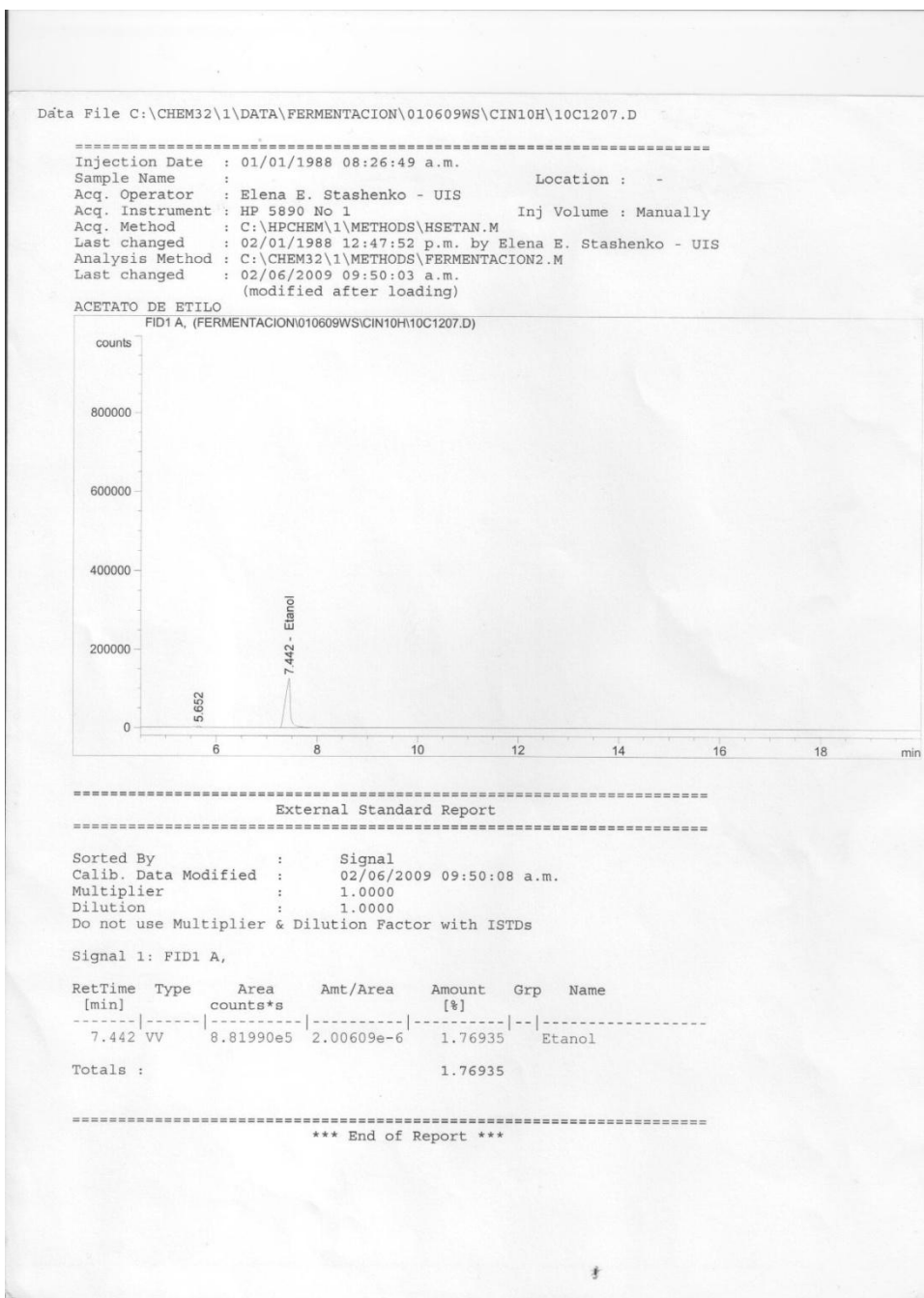
ANEXO 5. CONCENTRACION DE ETANOL (AISLAMIENTO DE MANZANA; 25 HORAS)



ANEXO 6. CONCENTRACION DE ETANOL (AISLAMIENTO DE CAÑA; 3 HORAS)



ANEXO 7. CONCENTRACION DE ETANOL (AISLAMIENTO DE CAÑA; 1HORAS)

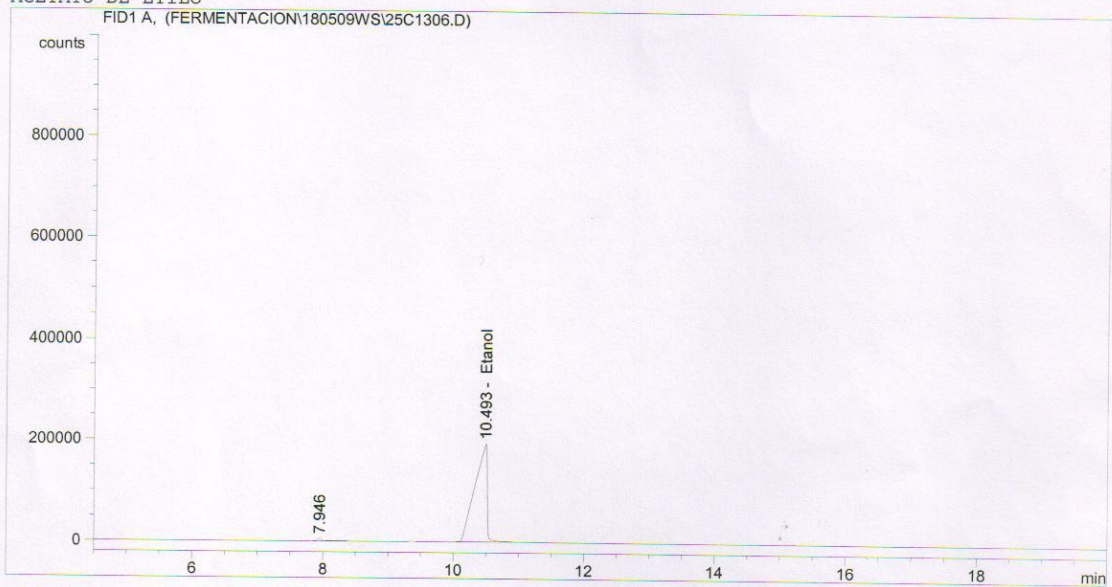


ANEXO 8. CONCENTRACION DE ETANOL (AISLAMIENTO DE CAÑA; 25 HORAS)

Data File C:\CHEM32\1\DATA\FERMENTACION\180509WS\25C1306.D

```

=====
Injection Date   : 06/01/1988 07:34:08 a.m.
Sample Name     :
Acq. Operator   : Elena E. Stashenko - UIS      Location   : -
Acq. Instrument : HP 5890 No 1                  Inj Volume  : Manually
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\HSETAN.M
Last changed    : 02/01/1988 12:47:52 p.m. by Elena E. Stashenko - UIS
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\FERMENTACION2.M
Last changed    : 01/06/2009 10:36:19 a.m.
ACETATO DE ETILO
  
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 01/06/2009 10:36:16 a.m.
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
10.493	BV	2.57335e6	2.00609e-6	5.16237		Etanol

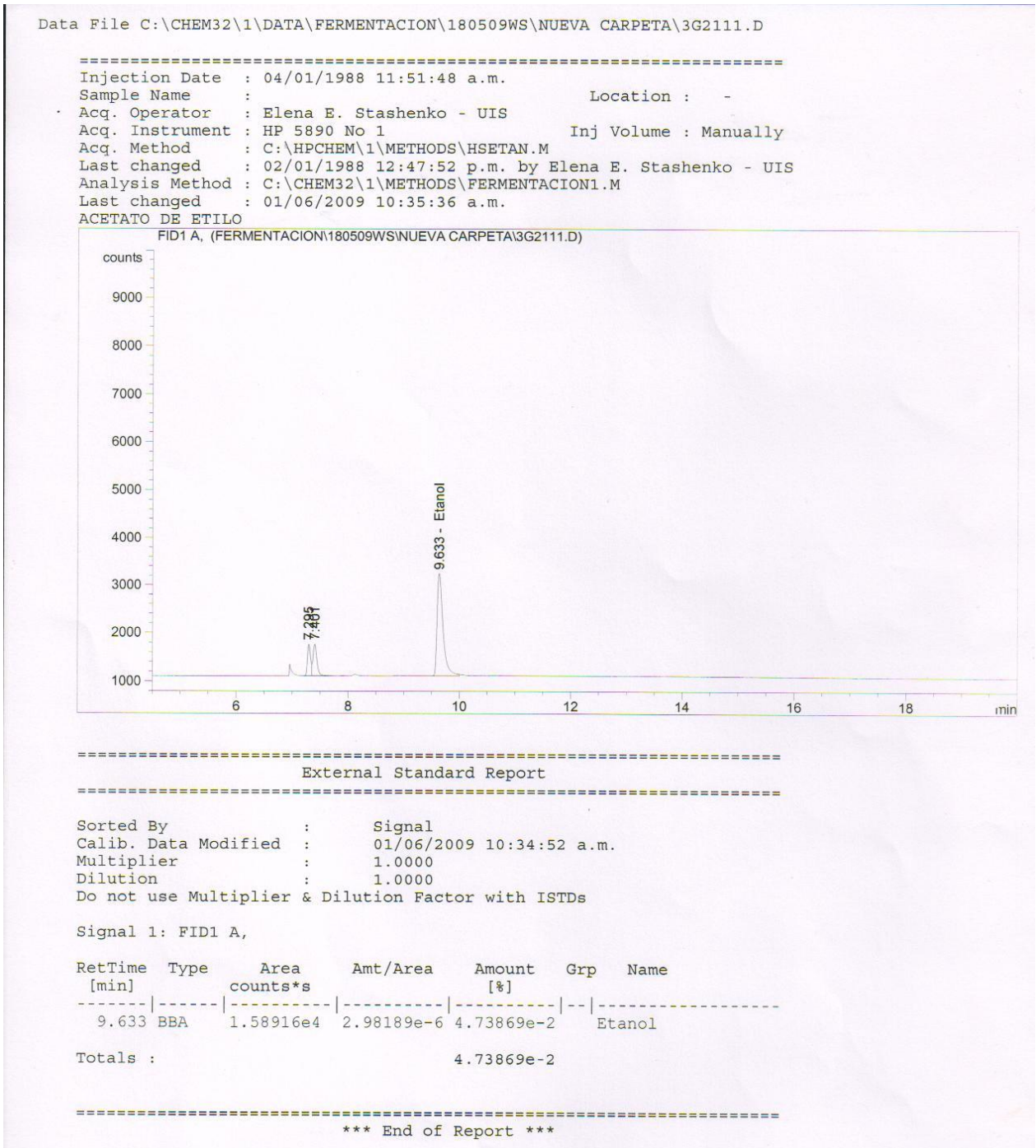
Totals : 5.16237

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

*** End of Report ***

ANEXO 9. CONCENTRACION DE ETANOL (AISLAMIENTO DE GUARAPO; 3 HORAS)



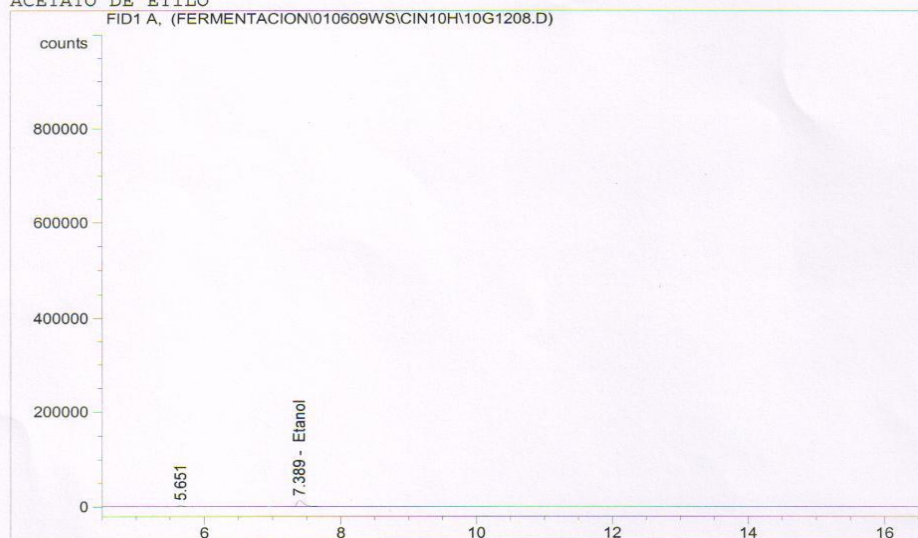
ANEXO 10. CONCENTRACION DE ETANOL (AISLAMIENTO DE GUARAPO;10HORAS)

Data File C:\CHEM32\1\DATA\FERMENTACION\010609WS\CIN10H\10G1208.D

```

=====
Injection Date : 01/01/1988 09:17:20 a.m.
Sample Name : Location : -
Acq. Operator : Elena E. Stashenko - UIS
Acq. Instrument : HP 5890 No 1 Inj Volume : Manually
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\HSETAN.M
Last changed : 02/01/1988 12:47:52 p.m. by Elena E. Stashenko - UIS
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\FERMENTACION2.M
Last changed : 02/06/2009 09:50:03 a.m.
                (modified after loading)
    
```

ACETATO DE ETILO



External Standard Report

```

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 02/06/2009 09:50:08 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

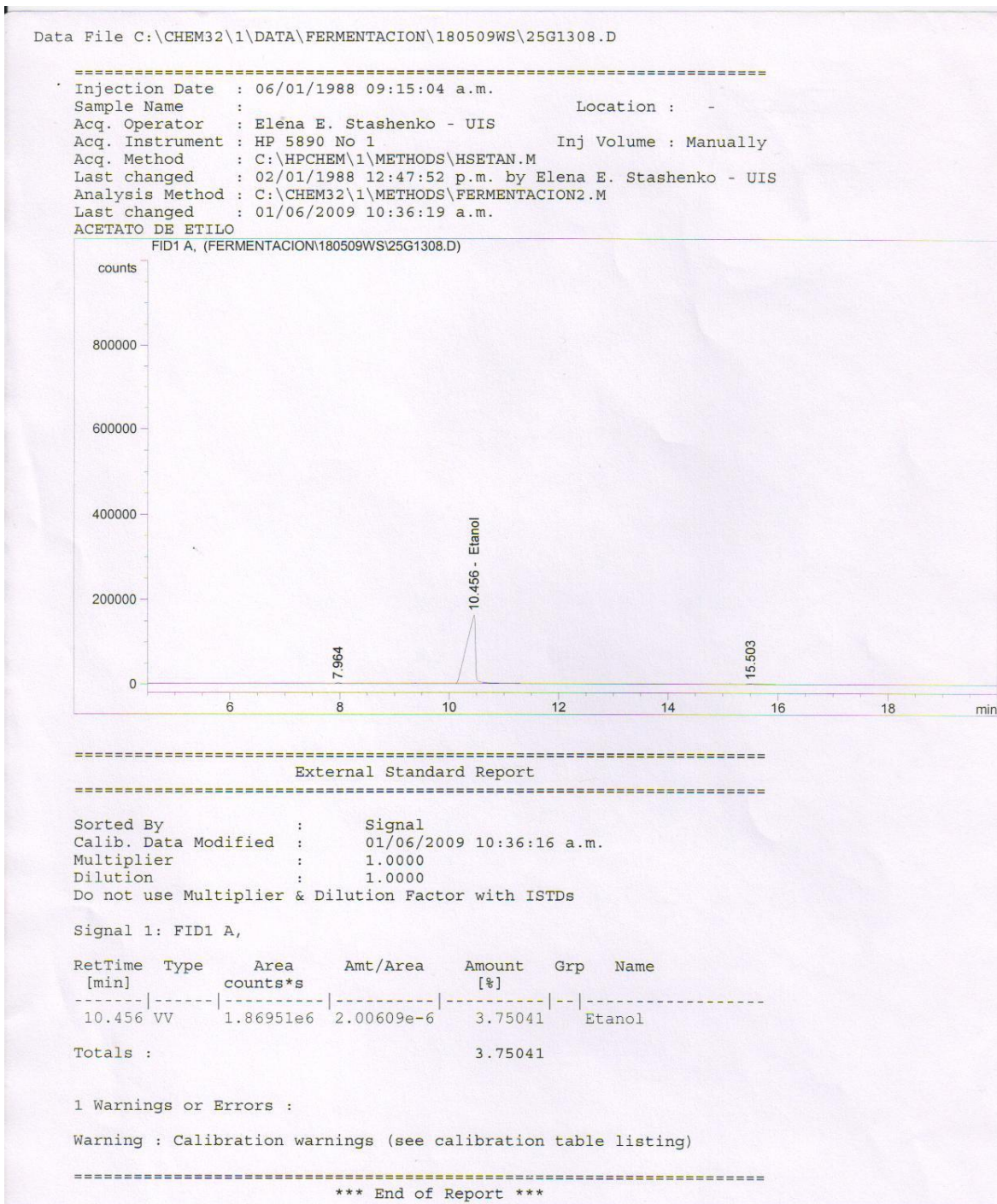
Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
7.389	BV	9.07120e4	2.00609e-6	1.81977e-1		Etanol

Totals : 1.81977e-1

*** End of Report ***

ANEXO 11. CONCENTRACION DE ETANOL (AISLAMIENTO DE GUARAPO; 25 HORAS)



ANEXO C. Cinética enzimática

Las enzimas son catalizadores biológicos que son moléculas de proteínas en la naturaleza. Son producidas por células vivas (animales, vegetales y microorganismos) y son absolutamente esenciales como catalizadores en las reacciones bioquímicas. Casi todas las reacciones en una célula requiere la presencia de una enzima específica. Una función importante de las enzimas en un sistema vivo es de catalizar la formación y ruptura de enlaces químicos. Por lo tanto, como cualquier otro catalizador, ellas aumentan la tasa de reacción química sin sufrir cambio permanente. La capacidad catalítica de las enzimas se debe a su particular estructura. Una reacción química específica es catalizada en una pequeña porción de la superficie de un enzima, que es conocido como el sitio activo. Algunas interacciones físicas y químicas se producen en este sitio para catalizar una determinada reacción química de ciertas enzimas.[4]

Las reacciones de las enzimas son distintas de las reacciones químicas, como sigue:

1. Una enzima catalizadora es muy específica, y cataliza sólo uno o un pequeño número de reacciones químicas. Existe una gran variedad de enzimas que puede catalizar una amplia gama de reacciones.
2. La tasa de una reacción enzima-catalizada por lo general es mucho más rápido que la misma reacción cuando se lleva a cabo por catalizadores no biológicos. Sólo una pequeña cantidad de enzima es necesaria para producir un efecto deseado.
3. Las condiciones de la reacción (temperatura, presión, pH, etc) para la enzima son muy leves.

ANEXO D. Lazos de Control en cascada para el fermentador.

Figure 54: dO2/pH Controller Schematics

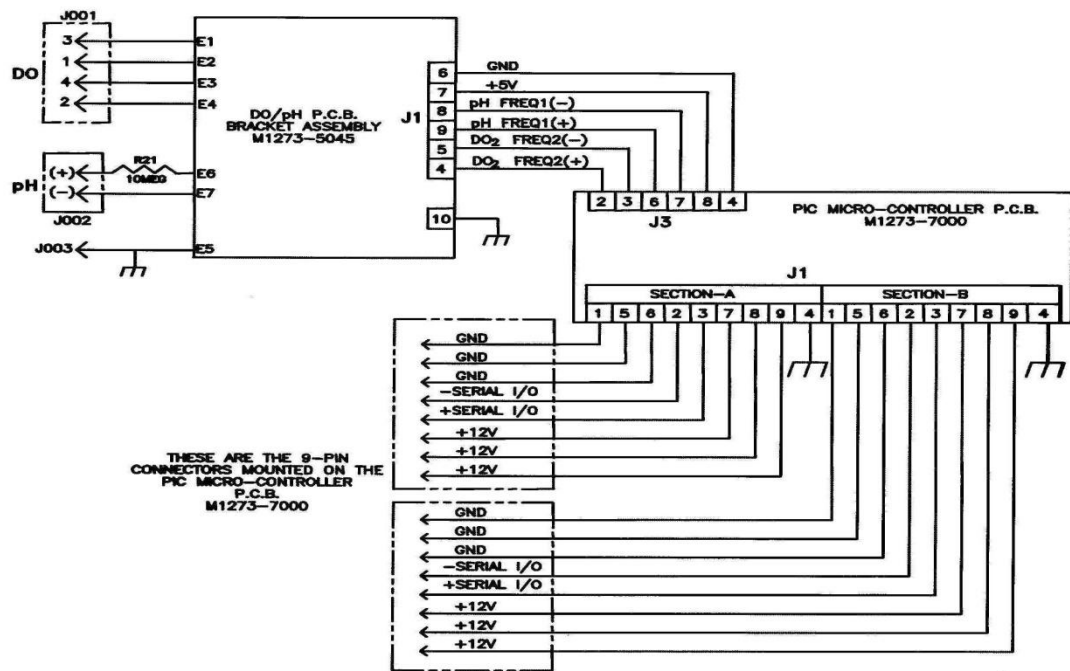


Figure 55: Level Controller Schematics

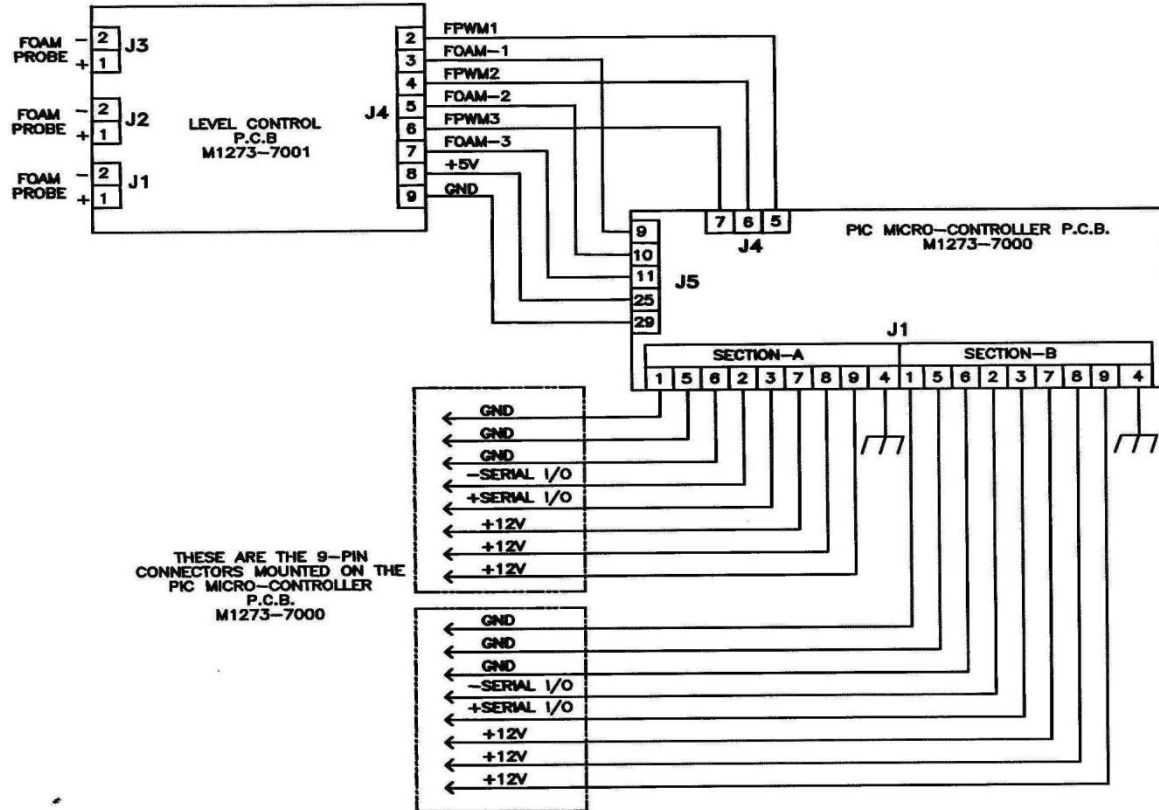


Figure 56: Gas Mix Controller Schematics

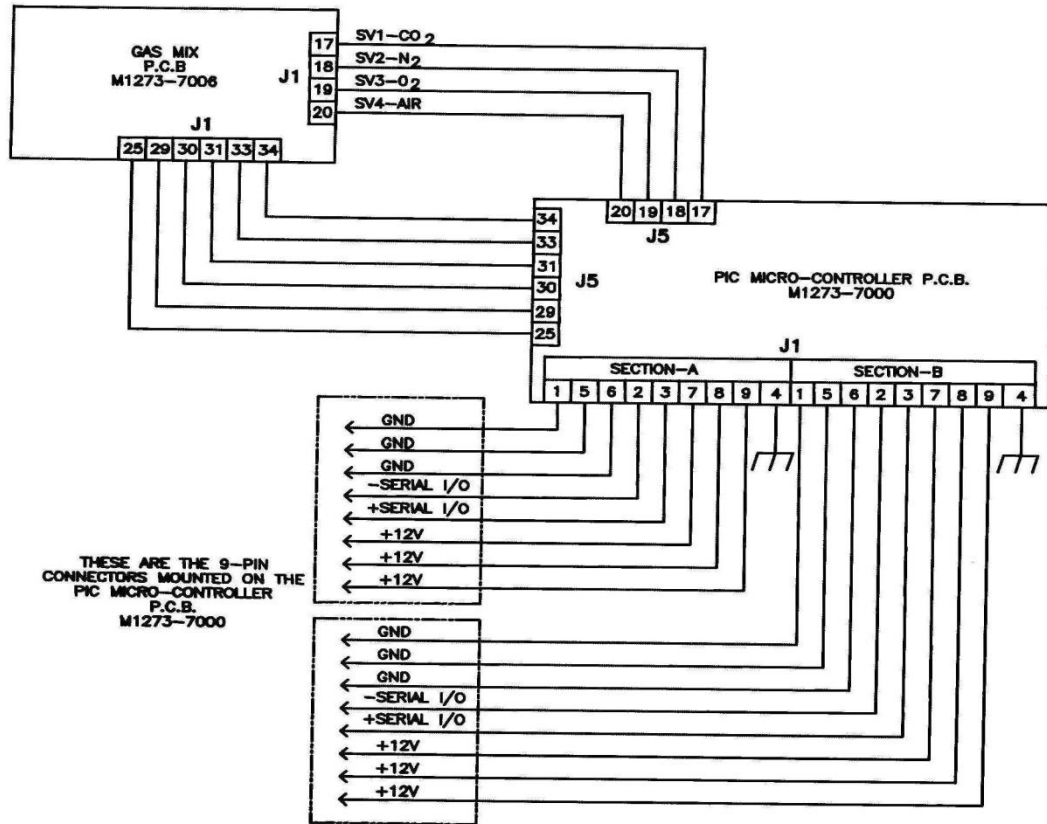
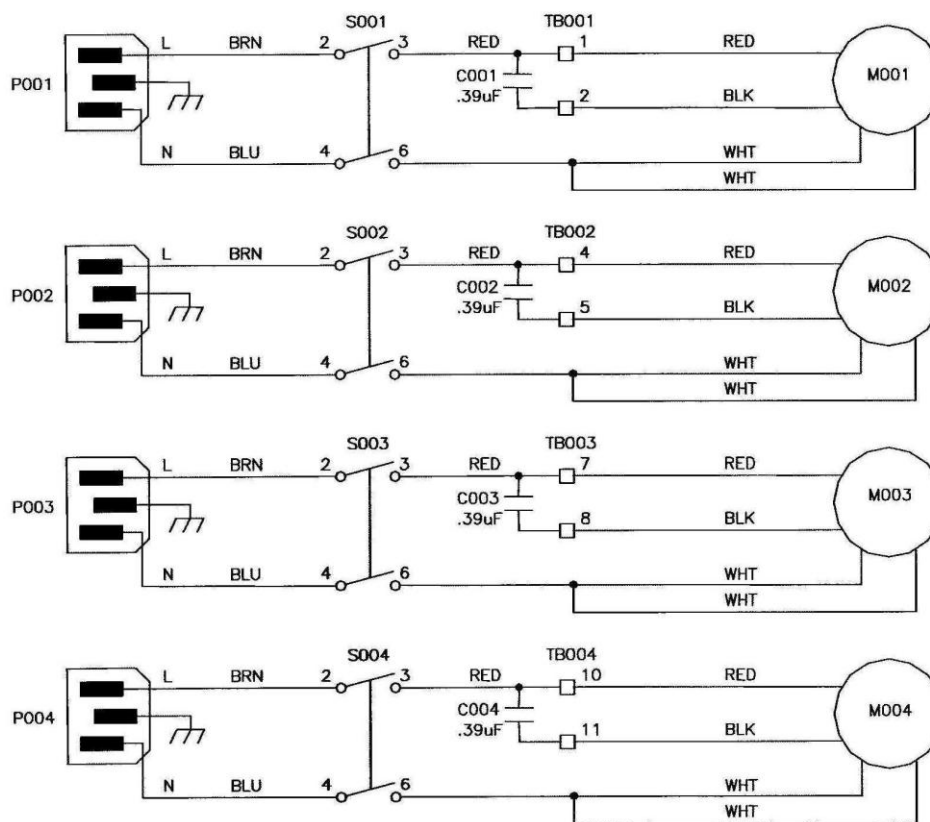
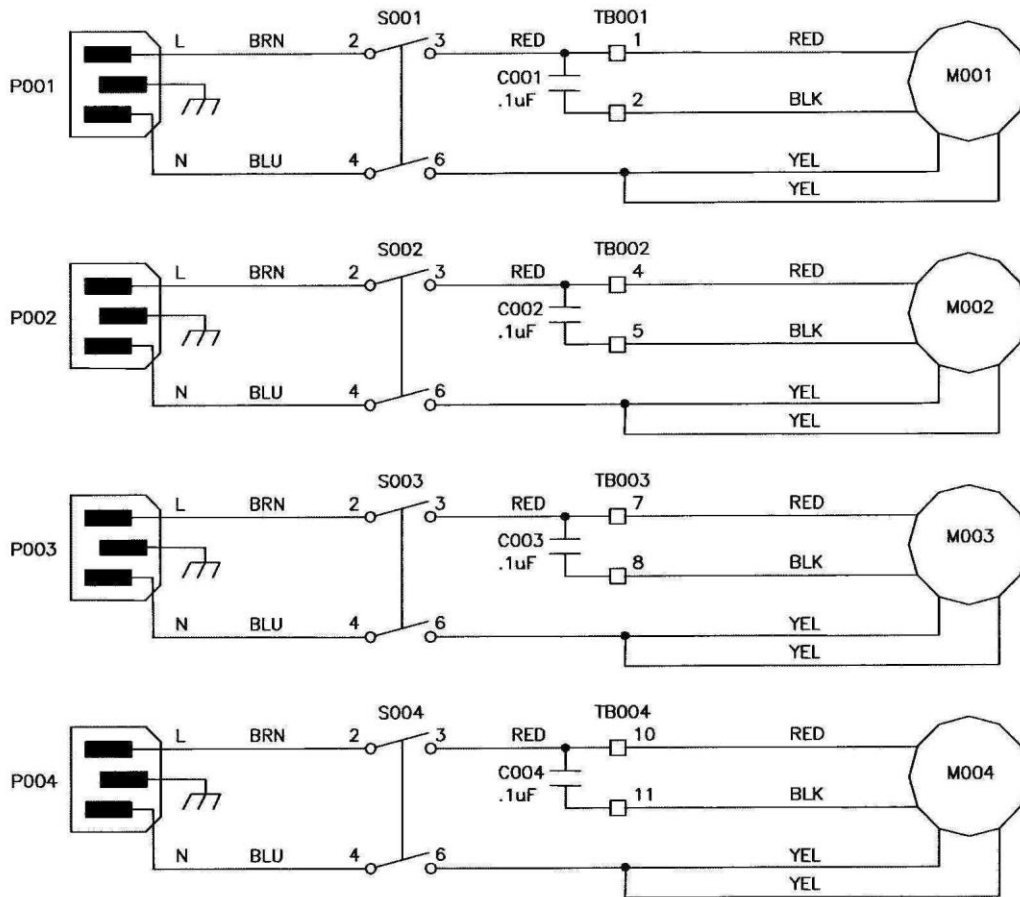


Figure 57: 4-Pump Module Schematics (110V)

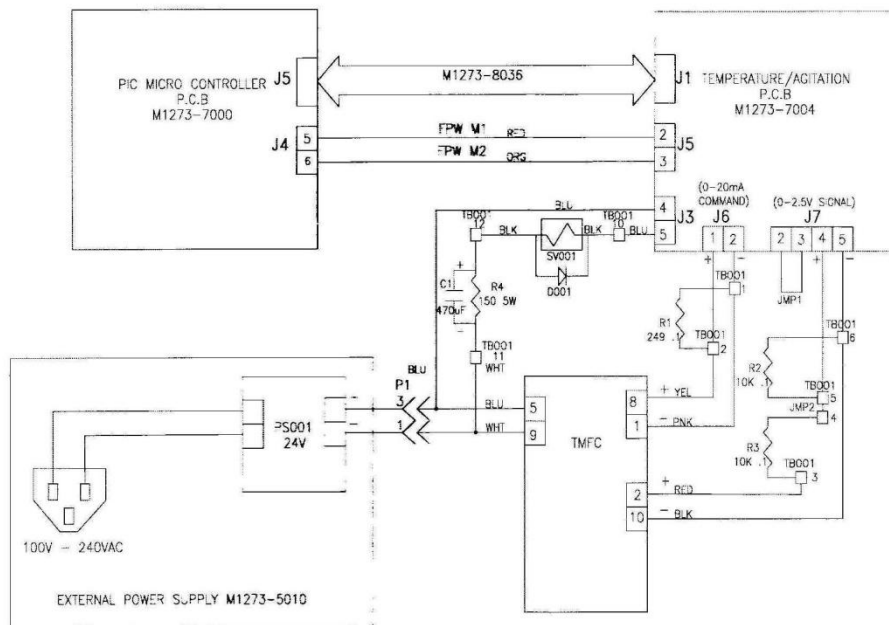
Fuente: www.nbsc.com

Figure 58: 4-Pump Module Schematics (220V)



Fuente: www.nbsc.com

Figure 59: Thermal Mass Flow Controller Schematics



Fuente: www.nbsc.com

Tabla 3. Control de bioprocesos.

Variable	Función de control	Tipo de Control
Temperatura	Calentar/Enfriar	En base a un "set-point"
Espuma	Control de Espuma	
Flujo Alimentación	Cambio de flujo	
pH	<ul style="list-style-type: none">•Adición ácido o base•Cambio en la veloc. de adición de carbono	Control on-off
O ₂	Cambio en velocidad de alimentación	Control de cambio paulatino (stepping switches)
Análisis gas salida	Cambio en velocidad de alimentación	
Análisis del medio	Cambio en la composición del medio	

Fuente: Fermentation and biochemical engineering handbook.

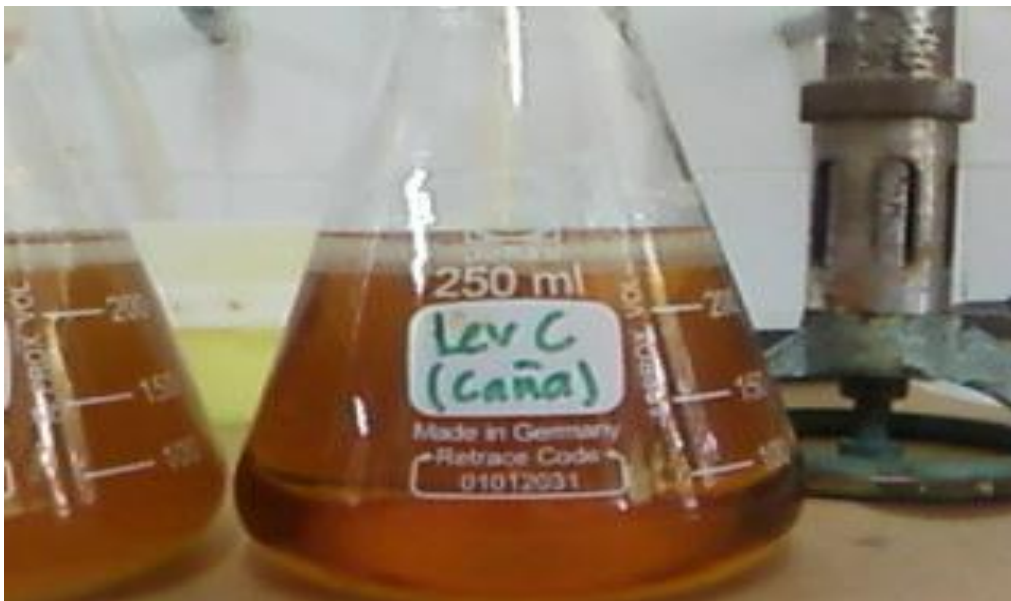
ANEXO E. Preparación del Inoculo y Caldo Fermentativo.

Figura 3. Cultivo de la levadura nativa de la caña.



Fuente: Propia

Figura 4. Caldo de fermentación.



Fuente: Propia

Figura 5. Esterilización de los medios.



Fuente: Propia

Figura 6. Bioreactor GIBIP.



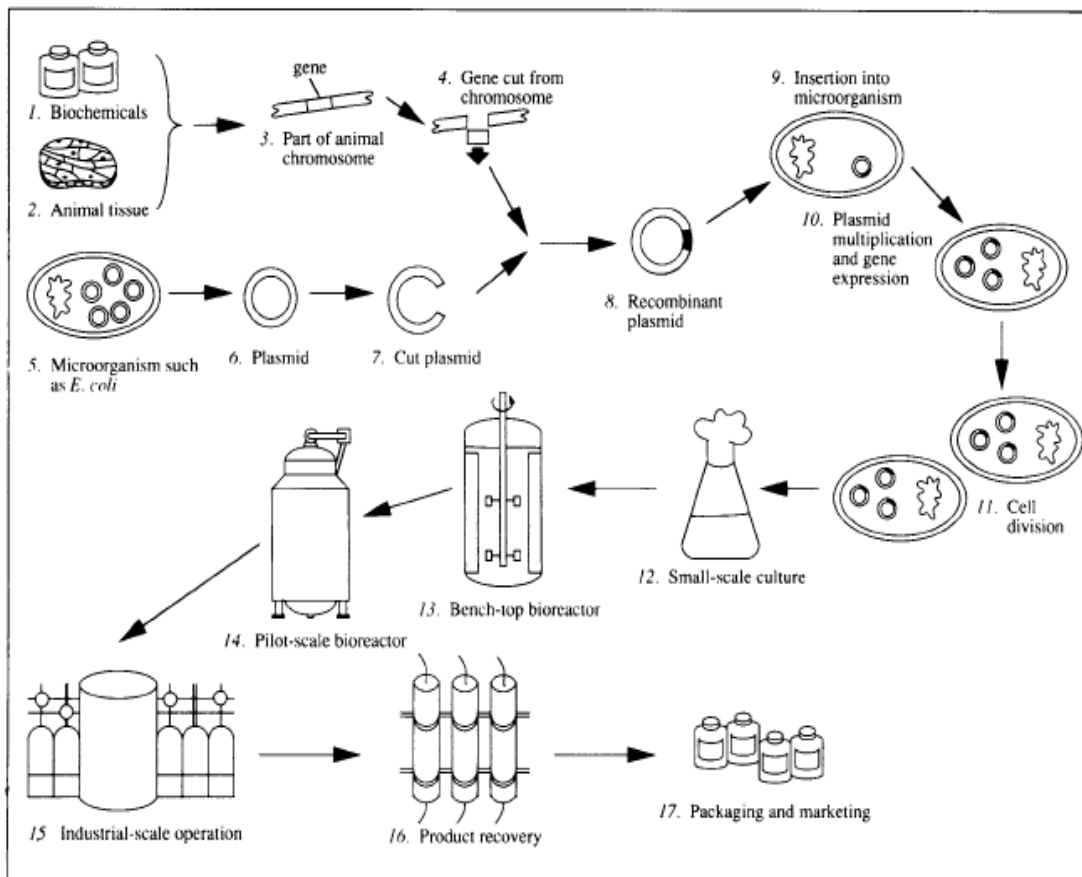
Fuente: Propia

Figura 7. Agitador impeller tipo turbina plana.



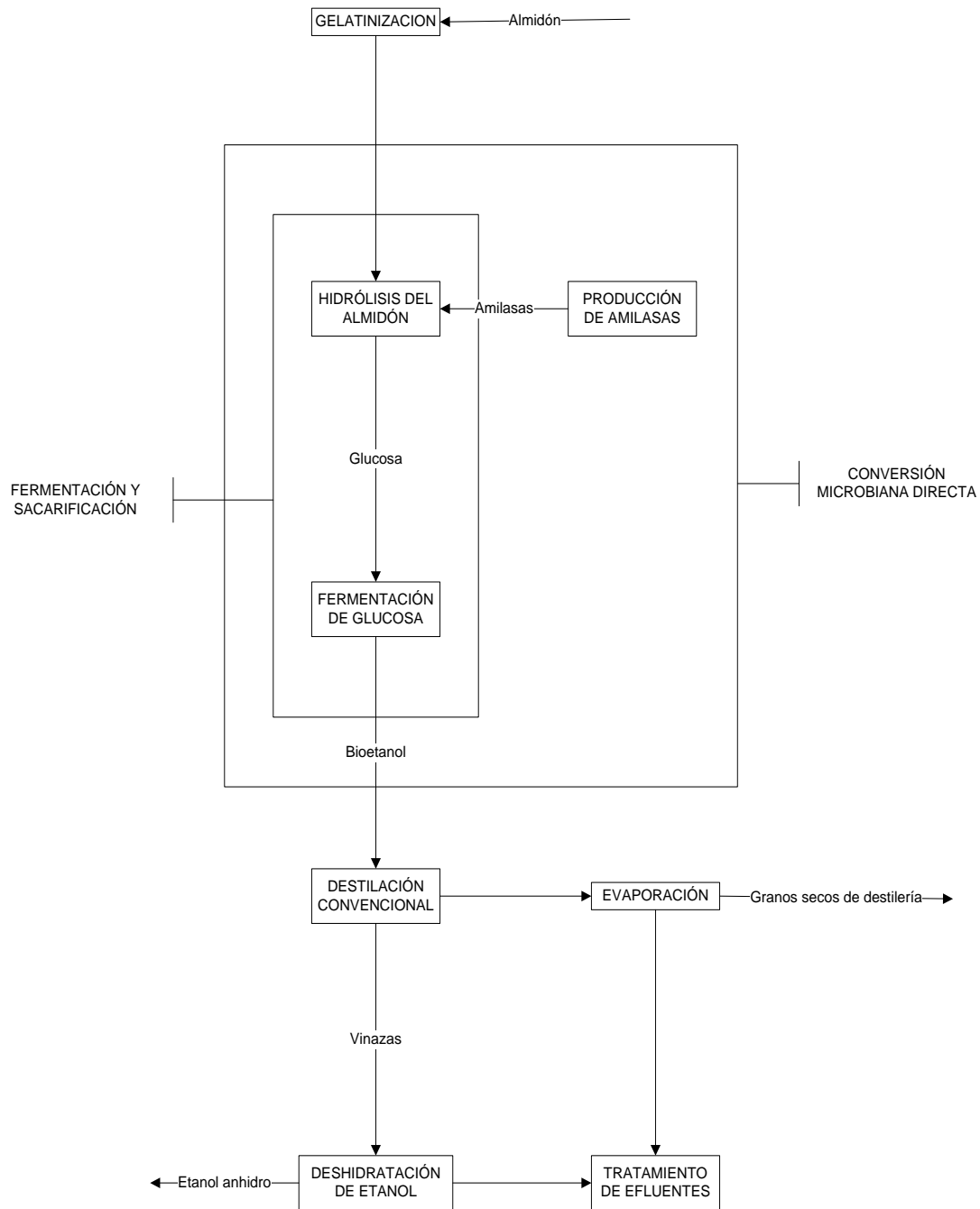
Fuente: Propia

Figura 8 . Pasos para el desarrollo de un biocombustible a partir de levaduras.



Fuente: Biochemical Engineering

ANEXO F. Diagrama global del proceso de obtención de etanol

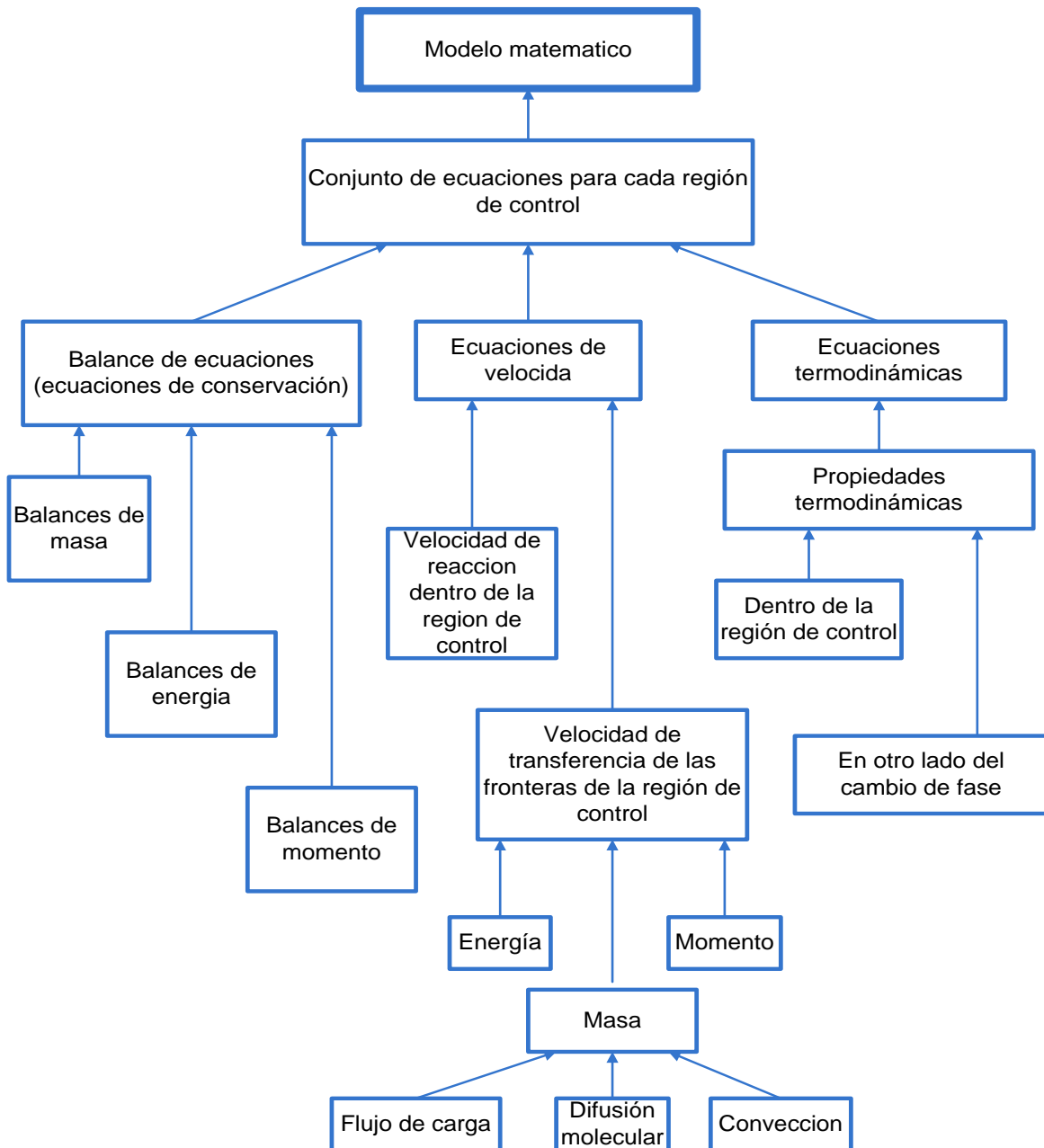


Fuente: Propia

Figura 9. Diagrama del proceso

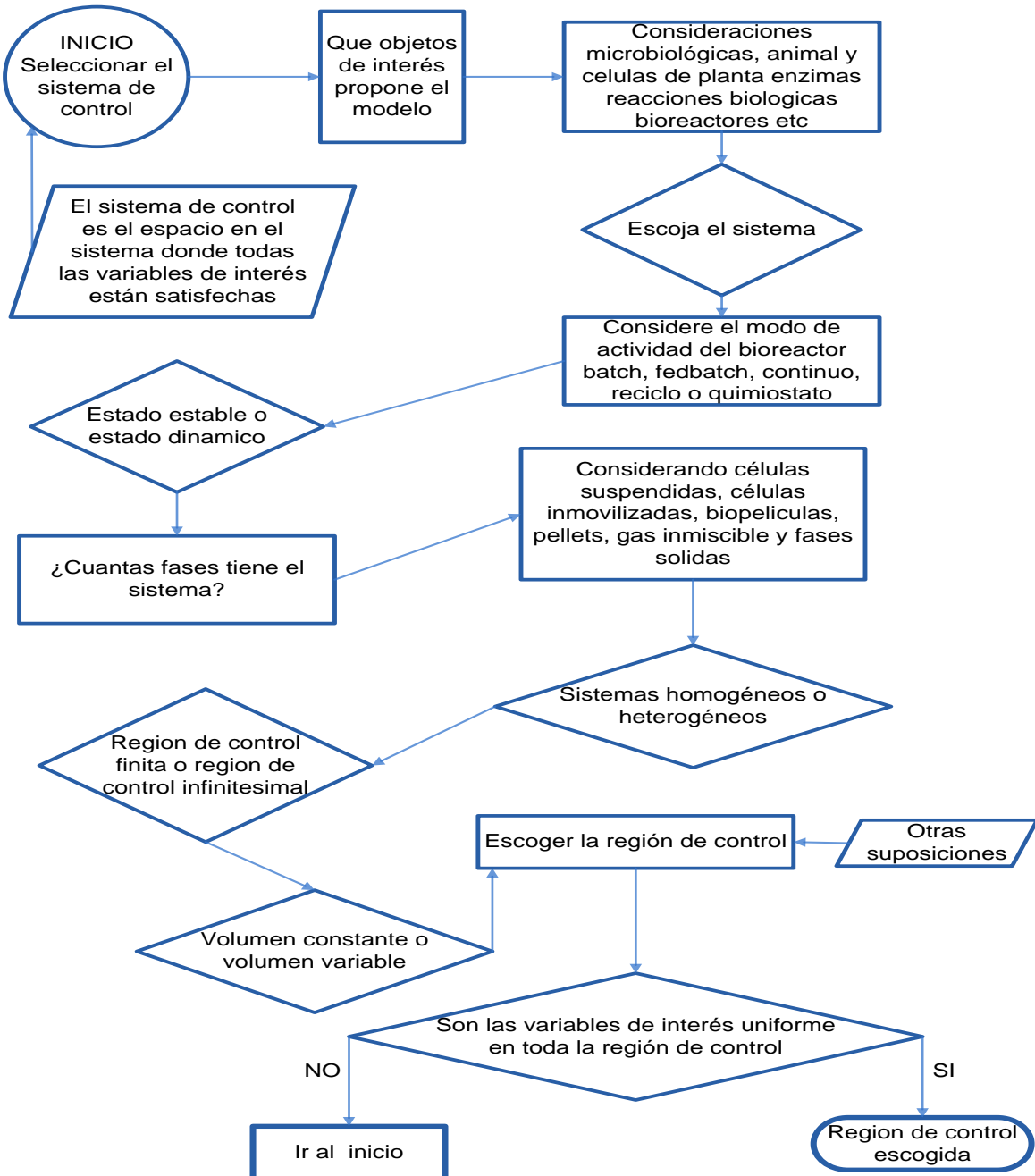
ANEXO G. Algoritmo para la selección del modelo matemático.

Figura 10. Ecuaciones matemáticas que pueden ser usadas en la construcción de un modelo matemático.



Fuente: Practical fermentation technology.

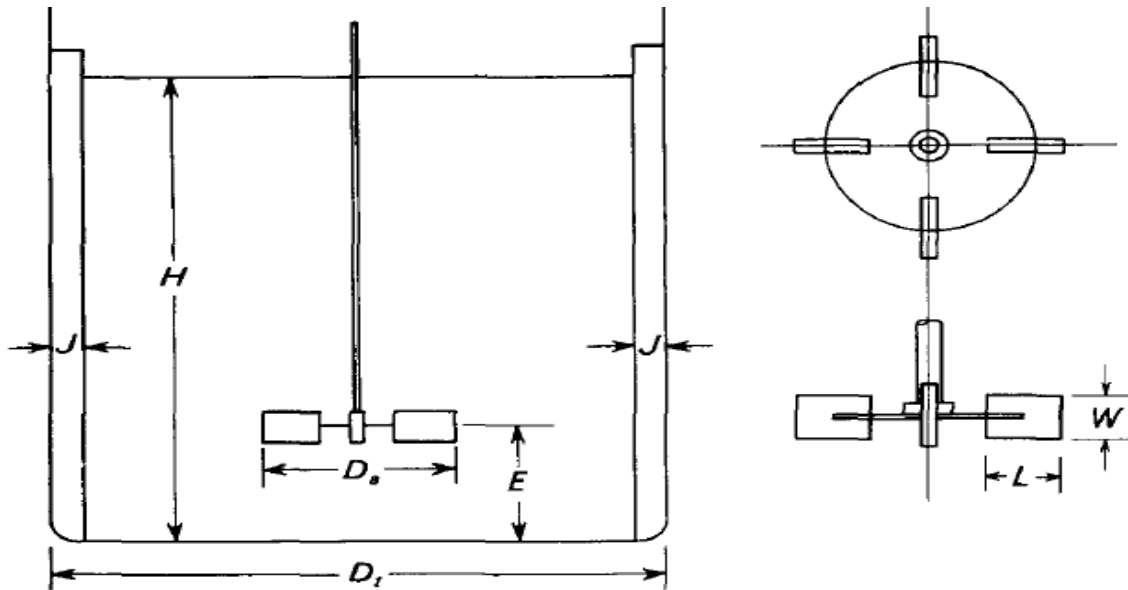
Figura 11. Propuesta para el proceso de selección del modelo para la región de control.



Fuente: Practical Fermentation Technology

ANEXO H. Parámetros para un rodete de turbina.

Figura 12. Medidas de un agitador de turbina.



Fuente: Operaciones unitarias en ingeniería química.

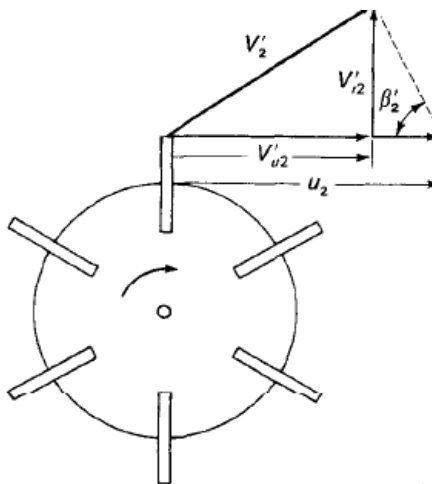
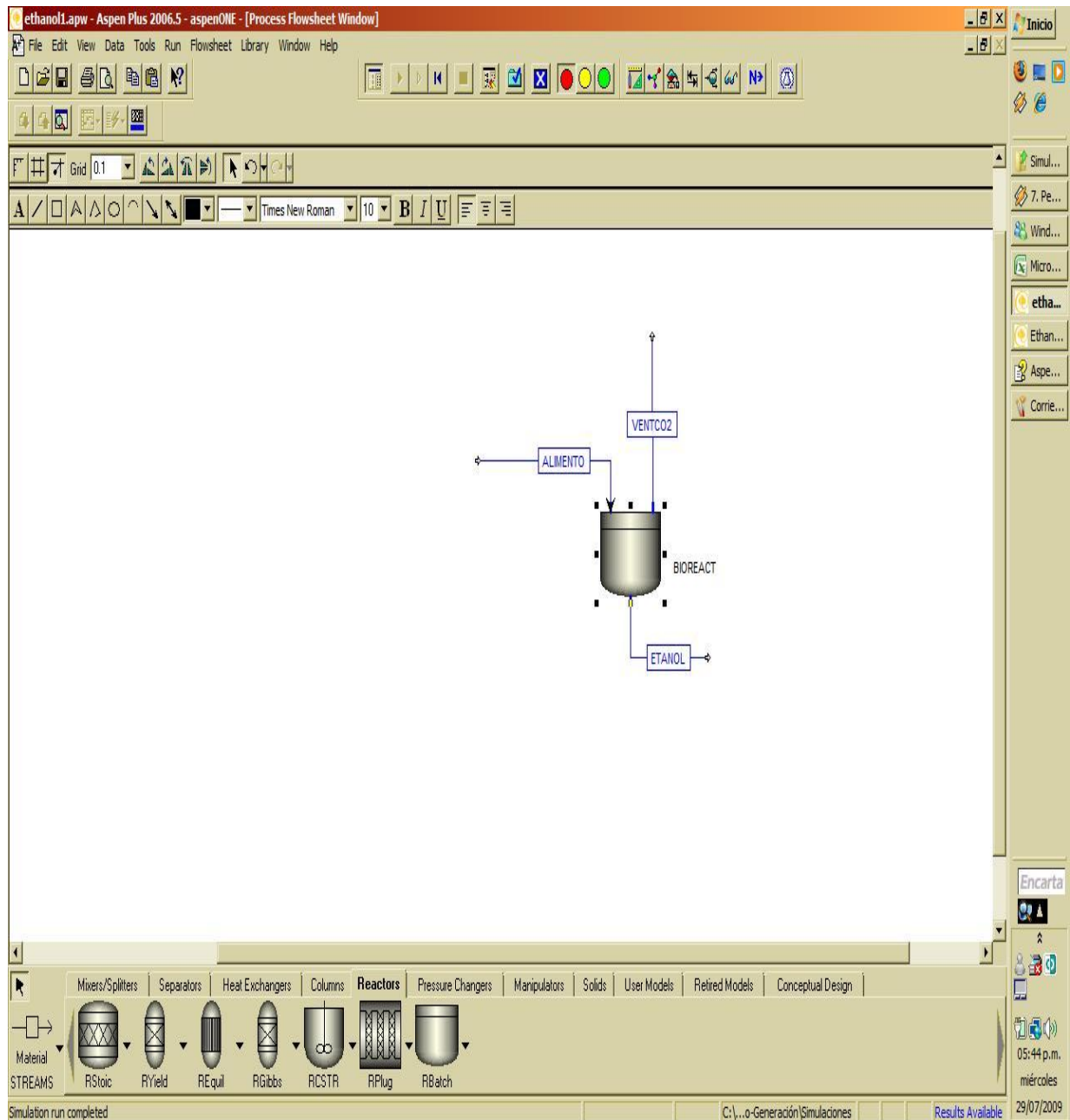


Figura 13. Vectores de velocidad en el extremo de la pala en un rodete de turbina.

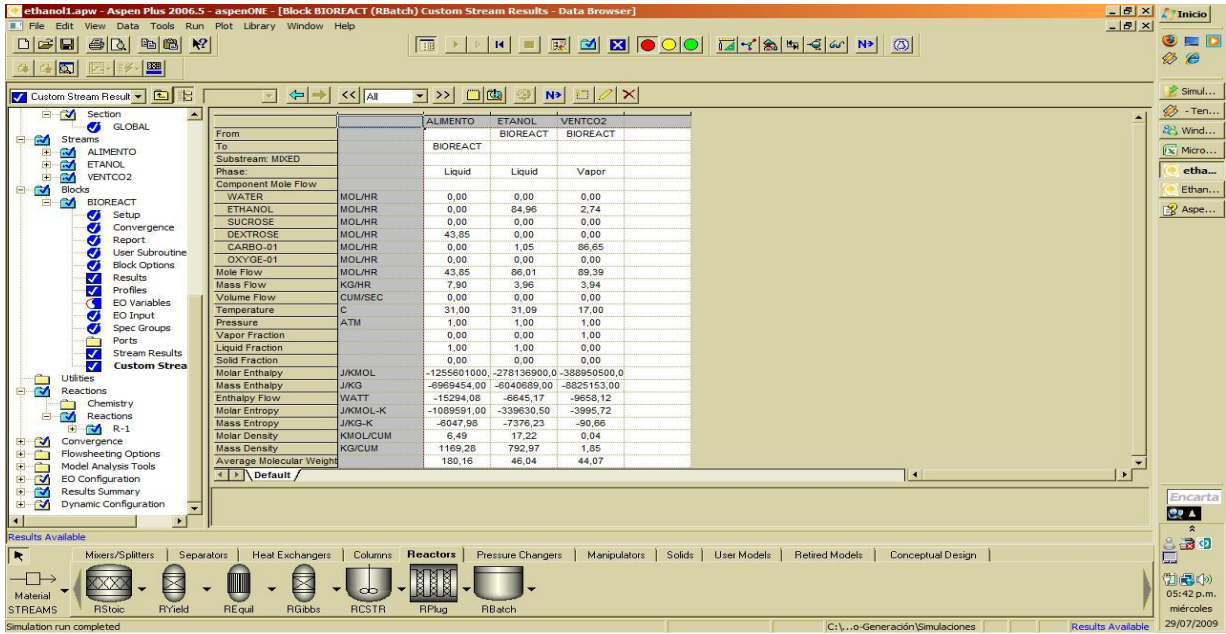
ANEXO I. Simulación en ASPEN TECH 2006.5

Figura 14. Simulación del Biorreactor en Aspen Tech 2006.5



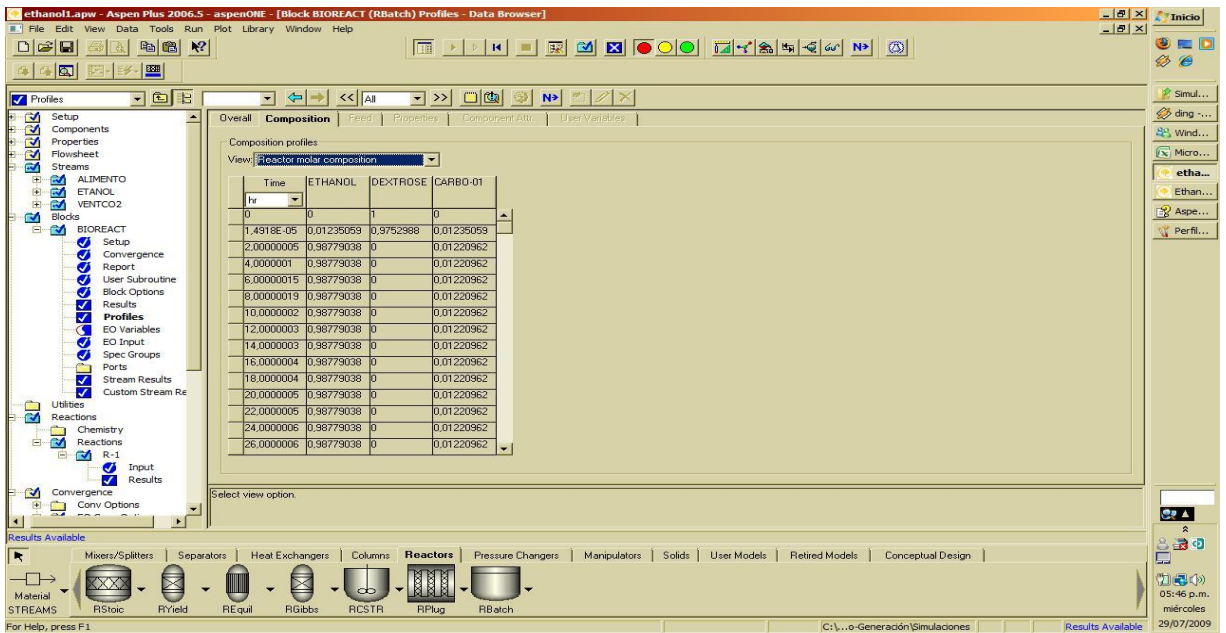
Fuente: Propia

Figura 15. Diagrama de flujos.



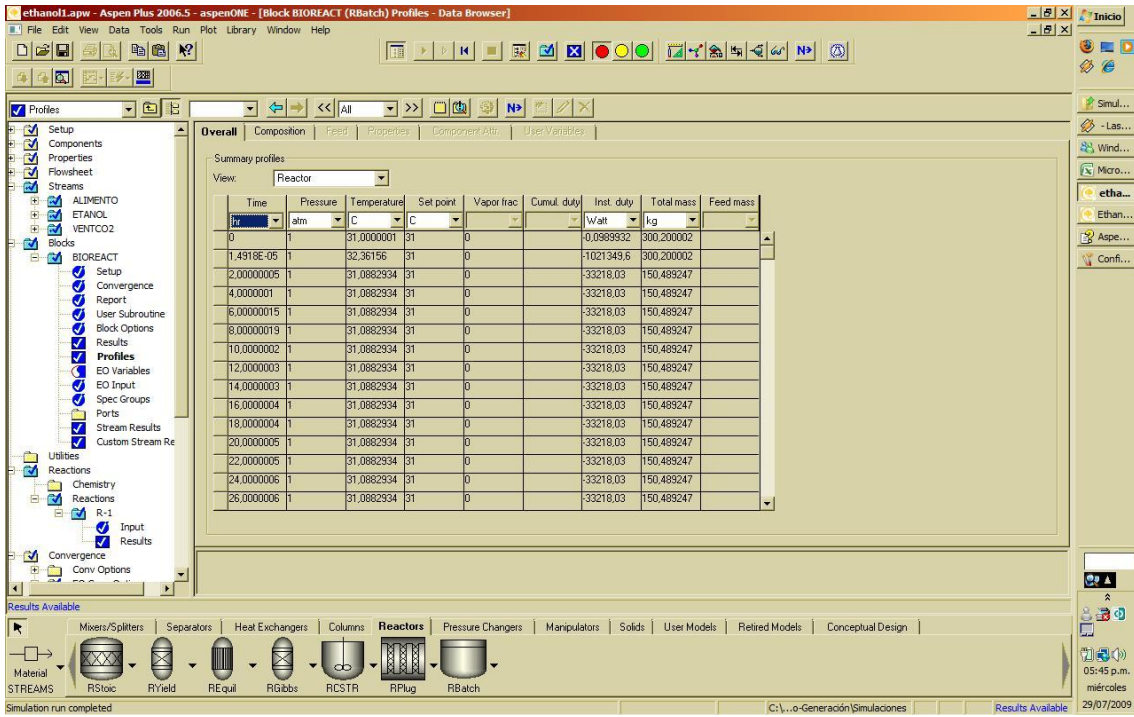
. Fuente: Propia

Figura 16. Perfil de composición.



Fuente: Propia

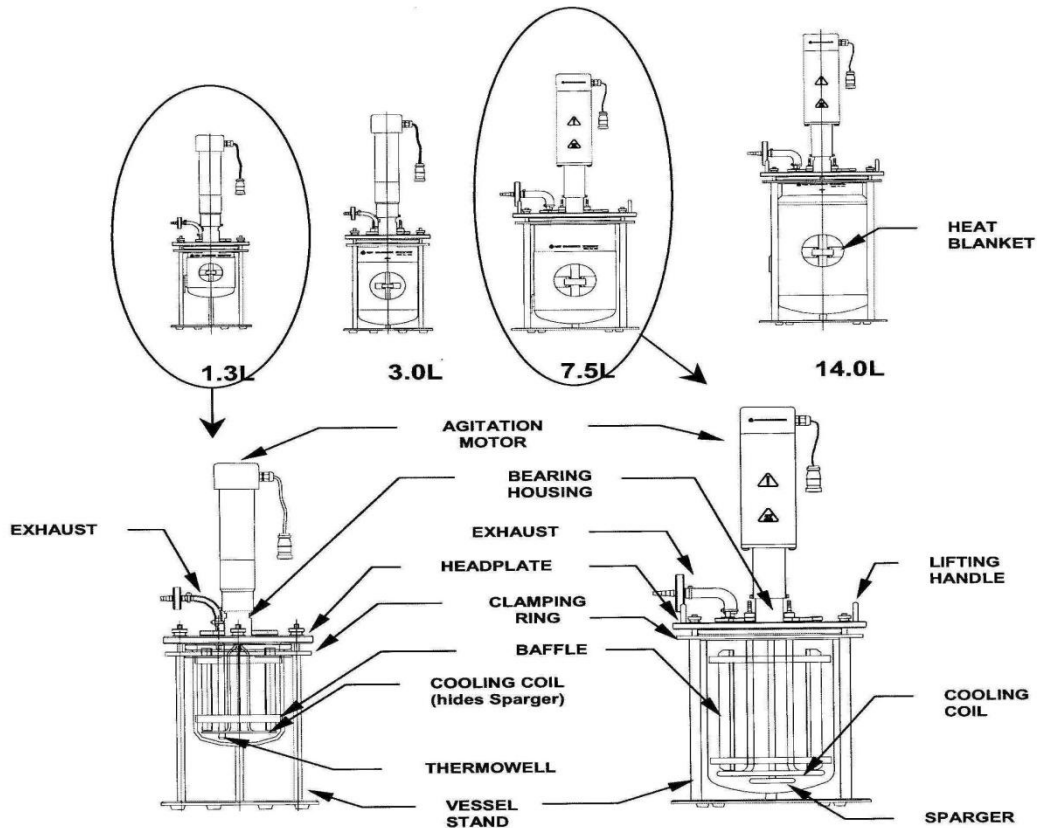
Figura 17. Perfil de reacción.



Fuente: Propia

Figura 18. Biorreactores a diferentes escalas sin chaqueta.

Figure 10: Non-Jacketed Vessel Assembly



Familiarize yourself with the arrangement of the headplate ports, as shown in the following diagrams, before proceeding with the vessel assembly. You may find it more practical to change the arrangement; the variety of ports and adapters will easily accommodate your needs.

For easy reference, see Appendix E for a mix and match summary of port sizes and the types of adapters and inserts available.

ANEXO J. Predicción del modelo cinético

Tabla 4. Datos experimentales

TIEMPO (h)	BIOMASA	GLUCOSA(g/l)	ETANOL
0	0,07	0,11	0
2	0,09	0,096666667	0,7866
4	0,3871	0,082857142	3,5385
6	0,96142857	0,068571428	8,2557
8	1,53571429	0,054285714	12,972
10	2,11	0,04	17,69
12	2,52066667	0,036	21,53
14	2,93133333	0,032	25,367
16	3,342	0,028	29,2
18	4	0,024	33,04
20	4,1633333	0,02	36,88
22	4,574	0,016	40,72
24	4,98466667	0	44,56
26	5,75230769	9,23E-03	53,143
28	6,8769	7,69E-03	56,19
30	8	6,10E-03	59,24
32	9,12615385	4,62E-03	62,287
34	10,2507692	3,00E-03	65,33
36	11,3753846	1,50E-03	68,38
38	12,5	0	71,43

Fuente: Propia

Figura 19.Consumo de glucosa por levaduras nativas

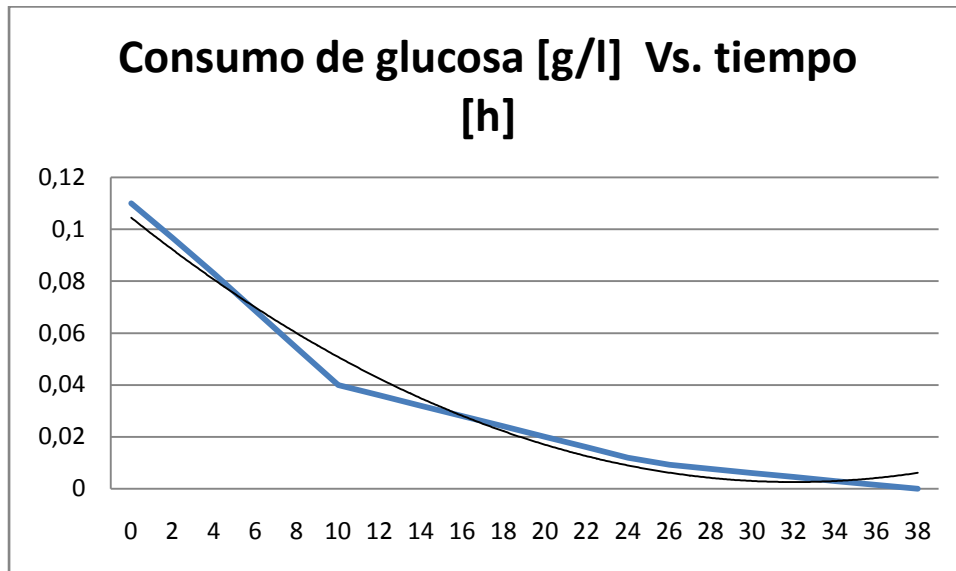
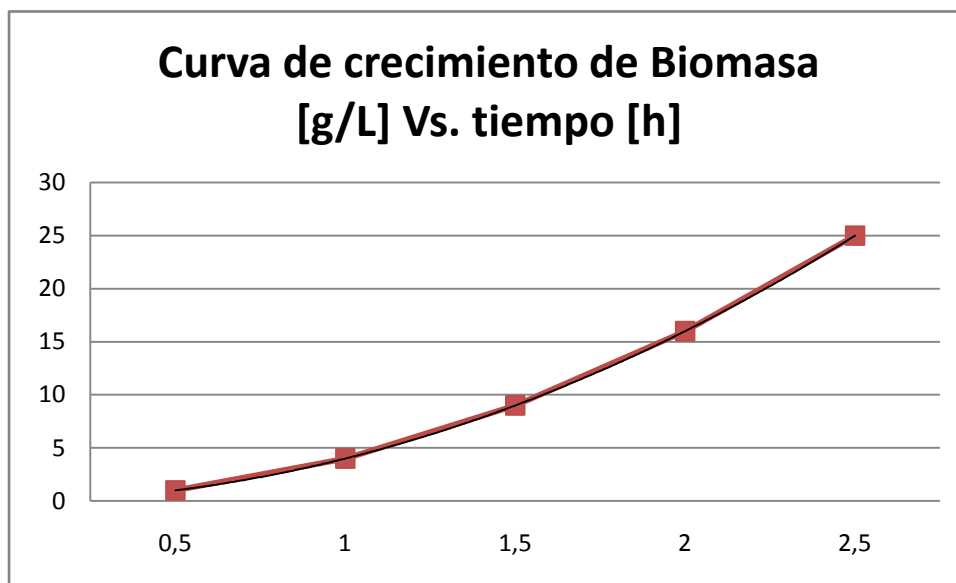


Figura 20.Curva de crecimiento de biomasa.



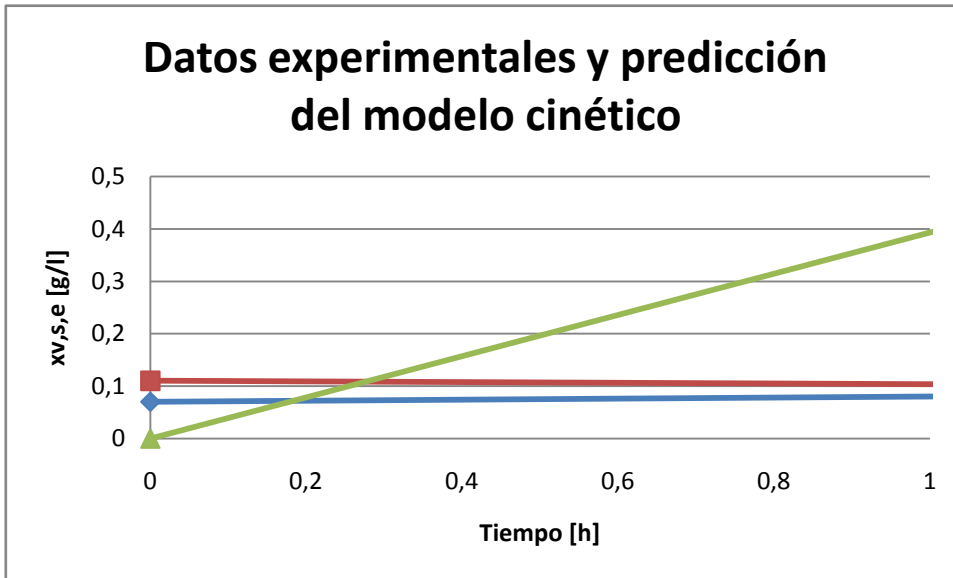
Fuente: Propia

Tabla 5. Cálculo de $(1/s)$ y $(1/\mu)$ Modelo Lineweaver-Burk

t [h]	Biomasa xv [g/l]	Glucosa s [g/l]	1/s	rx	$\mu=rx/xv$	1/ μ
0	0,07	0,11				
2	0,09	0,096666667	10,34483	0,14855	1,650556	0,605857
4	0,3871	0,082857142	12,06897	0,287164	0,741835	1,348009
6	0,961428571	0,068571428	14,58333	0,287143	0,298663	3,348259
8	1,535714286	0,054285714	18,42105	0,287143	0,186977	5,348259
10	2,11	0,04	25	0,205333	0,097314	10,27597
12	2,520666667	0,036	27,77778	0,205333	0,08146	12,27597
14	2,931333333	0,032	31,25	0,205333	0,070048	14,27597
16	3,342	0,028	35,71429	0,205333	0,06144	16,27597
18	4	0,024	41,66667	0,205333	0,054717	18,27598
20	4,16333333	0,02	50	0,205333	0,049319	20,27597
22	4,574	0,016	62,5	0,205333	0,044891	22,27597
24	4,984666667	0	83,33333	0,383821	0,077	12,98697
26	5,752307692	9,23E-03	108,3424	0,562296	0,097751	10,23003
28	6,8769	7,69E-03	130,039	0,56155	0,081657	12,24628
30	8	6,10E-03	163,9344	0,563077	0,070385	14,20765
32	9,126153846	4,62E-03	216,6847	0,562308	0,061615	16,22982
34	10,25076923	3,00E-03	333,3333	0,562308	0,054855	18,22982
36	11,37538462	1,50E-03	666,6667	0,562308	0,049432	20,22982
38	12,5	0				

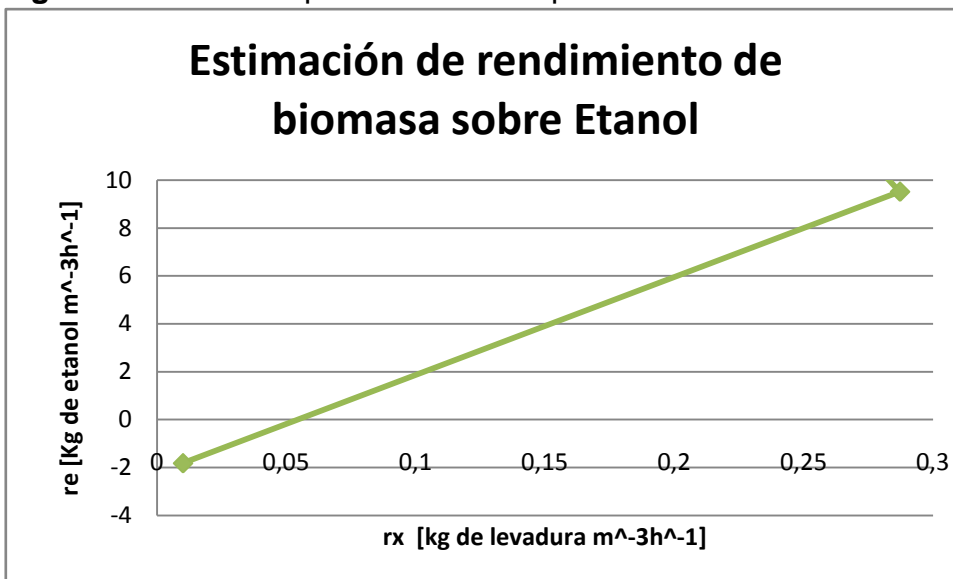
Fuente: Propia

Figura 21. Predicción del modelo cinético.



Fuente: propia

Figura 22. Cinética a partir de datos experimentales



Fuente: propia.

