

Escalado Del Tamaño De Pellet Obtenido En La Fermentación Sumergida De Sacarosa Con *Aspergillus Niger*, Desde Un Reactor De 2 L Hasta Uno De 14 L, Con El Coeficiente $K_{L,A}$ De Transferencia De Masa Constante

Pérez G.*; Guerra G.**

*Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química
Quito, Ecuador (Tel: 593-2-2507-144; e-mail: gaby_77v@hotmail.com)

** Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química
Quito, Ecuador (Tel: 593-2-2507-144; e-mail: gasteaux@hotmail.com).

Resumen: Hoy en día la fermentación sumergida con *Aspergillus niger*, que se basa en la formación de pellets, constituye uno de los métodos más importantes para obtener ácido cítrico. En el presente trabajo se comprobó que la morfología de los pellets, que puede controlarse optimizando la composición del medio, el pH, el tamaño del inóculo, y la velocidad de agitación, es determinante en la productividad de la fermentación. Por esto se abordó el estudio de la influencia de estas variables, en dos partes. La primera parte de la investigación, se realizó en Erlenmeyers de 500 ml, donde se comprobó que el medio para obtener el mayor número de pellets de menor diámetro correspondió a la siguiente composición: Sacarosa, 150g/L; NH_4NO_3 , 2,40 g/L; KH_2PO_4 , 0,919 g/L; pH de 6,5; inóculo de $(4,20 \pm 0,55) \cdot 10^6$ esporas. La segunda parte de la investigación consistió en un análisis de la influencia de la velocidad de agitación sobre la estabilidad, compactación, número y diámetro de pellets, que se llevó a cabo en un biorreactor modelo MAP-002 Brunswick de 2 litros, donde se determinó que la velocidad óptima para llevar a cabo el escalado a partir del reactor de 2 litros fue de 600 rpm. Con las variables de operación así establecidas, se obtuvo un protocolo para el escalado del diámetro del pellet desde la escala de 2 hasta 14 litros, con base en los resultados experimentales obtenidos en el reactor de 2 litros, a una tasa de aireación de 0,7 vvm. Para estimar la velocidad de agitación en la escala superior se formuló un modelo matemático, y se realizó la simulación digital respectiva, manteniendo constante el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de masa de la escala menor, que correspondió a $1,95 \times 10^{-2} s^{-1}$.

Los resultados de la simulación digital indicaron que la velocidad de agitación en la escala mayor debía ser una función continua del tiempo, lo que habría necesitado de un esquema de control de velocidad a set-point variable, del que no se disponía, por lo que se debió recurrir a un esquema manual de control por valores constantes escalonados. Las variables de operación así estimadas permitieron escalar el tamaño del pellet obtenido en la escala de 2 litros al agitar en la escala de 14 litros en un rango de entre 420 hasta 380 rpm con lo que pudo validar el modelo de escalado..

Palabras claves: Fermentación sumergida; *Aspergillus niger*; crecimiento en pellet; escalado; coeficiente volumétrico de transferencia de masa.

Abstract: Nowadays *Aspergillus niger* submerged fermentation is one of the most important processes used to synthesize citric acid. This type of fermentation is based on the formation of pellets, and on its morphology. The morphology of the pellet has a strong impact on the productivity of the acid. Proper values of medium composition, pH, size of inoculum and stirring speed can influence productivity. For this reason the influences of these variables were studied in the context of this project, in two parts. At first, an analysis of the above-mentioned variables was carried out, excepting stirring speed, in Erlenmeyer flasks, establishing a medium comprised of 150g/L of Sucrose; 2,40 g/L of NH_4NO_3 , and 0,919 g/L of KH_2PO_4 , with an adjusted pH value of 6,5 inoculated with $(4,20 \pm 0,55) \cdot 10^6$ spores obtained the greatest amount of pellets with the smallest diameter. Afterwards, an analysis of the influence of stirring speed on the stability, compaction, number and diameter of pellets was carried out in a 2-liter Brunswick bioreactor model MAP-002 allowing the determination of the optimal stirring velocity for scaling between 2 and 4 liters as 600 rpm. With the operating variables thus determined, and on the basis of the experimental results obtained in the 2 liter reactor, a scaling process of the diameter of the pellet from the 2 to the 14 liter reactor it was carried out, in the 2 liter reactor at a stirring speed of 600 rpm and an aeration rate of 0.7 vvm. To determinate the stirring speed for the 14 liter scale, a mathematical model was developed, and a simulation was carried out at a constant volumetric coefficient of mass transfer value of $1,95 \times 10^{-2} s^{-1}$, obtained in the experiments carried out at the 2 liter reactor. The digital simulation results showed that the stirring speed that should be used in the 14 liter reactor was a function of time, a matter which –given the fact that no variable set-point stirring speed

controller was available- had to be resolved by manually increasing the agitation speed stepwise. The operating variables thus estimated allowed to scale the pellet size obtained in the 2 liter scale by means of stirring the fermentation at the 14 liter scale in a range from 380 to 420 rpm, obtaining a successful scaling process.

Key words: Submerged fermentation; *Aspergillus niger*; pellet's growth; scaling up; volumetric coefficient of mass transfer

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación cítrica mediante *Aspergillus niger* en medio sumergido es una de las fermentaciones más importantes, ya permite satisfacer el 80 % de la demanda mundial de ácido cítrico, que se emplea en la industria alimenticia, farmacéutica, de plásticos, y cosméticos, entre otras. ^{[10] [17] [21]}

Por este motivo, esta fermentación se ha convertido en objeto de muchas investigaciones. Sin embargo, existe muy poca información sobre la influencia de la velocidad de agitación y la transferencia de oxígeno en el crecimiento del pellet, que es donde se produce dicho ácido ^[15]

La escasez de publicaciones respecto a la fermentación sumergida se debe a que el proceso de formación del pellet resulta en un aumento de la viscosidad del medio, y en una transformación de su comportamiento reológico de newtoniano a no newtoniano; y a que este cambio afecta el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de masa, que al ser el criterio de escalado debe mantenerse constante durante el proceso. ^[24]

Para controlar el proceso fermentativo es necesario conocer los mecanismos de formación y de mantenimiento de la morfología del pellet, que pueden controlarse por medio del ajuste de diversos factores como son la velocidad de agitación, el pH, la composición del medio de cultivo y el inóculo ^{[6] [1]}

A pesar de que el ácido cítrico se usa extensamente en el Ecuador, este no lo produce teniendo que importarlo de varios países como Alemania, Brasil, Colombia, China, Estados Unidos y Uruguay. ^[2]

Desde el año 2008 hasta el 2011, Ecuador ha importado 11 641,87 Ton de ácido con un costo total de 13 422 608 dólares, observándose un incremento del 13,46% en la masa importada. ^[2] Por esta razón se considera pertinente realizar un estudio que permita obtener las mejores condiciones para escalar el tamaño del pellet entre dos bioreactores de 2 y 14 L, estudio preeliminar que permitiría, una vez conocido el comportamiento reológico y definido el modelo de escalado, ajustar o encontrar las condiciones óptimas para la generación de ácido cítrico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

La sacarosa, NH_4NO_3 y KH_2PO_4 empleados para el medio de fermentación fueron de calidad analítica. El agua se destiló antes de su utilización.

El hongo *Aspergillus Niger* empleado se obtuvo del Laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional.

La formación de espuma se controló mediante un agente antiespumante estéril, constituido por una emulsión de silicona 20% v/v.

2.2. Métodos

Según Madigan, *et al*, el proceso de fermentación está directamente relacionado con la composición del medio de cultivo, su pH y la magnitud del inóculo. Por este motivo, en el presente estudio se evaluó la influencia que tienen dichas variables en la formación y morfología del pellet. ^[18]

2.2.1. Diseño del experimento

Para analizar la influencia de distintos medios de cultivo en la formación y crecimiento del pellet del *Aspergillus niger* se emplearon tres sustratos, cuya composición se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de los sustratos empleados para la generación del pellet en el proceso de fermentación sumergida con *Aspergillus niger*

Sustancia	Concentración (g/l)		
	Cadavid ^[5] Medio 1	De Argáez ^[7] Medio 2	Prescott ^[22] Medio 3
Sacarosa	190	150	140
NH_4NO_3	2,3	2,40	2,23
MgSO_4	0,3	-----	-----
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-----	-----	0,23
KH_2PO_4	1,0	0,919	-----
K_2HPO_4	-----	-----	1,0

Antes de la fermentación tanto los medios de crecimiento microbiano como los equipos empleados fueron esterilizados a 121°C y 20,0 psig durante 20 minutos en un autoclave automático marca BOYN, modelo LDZX-75KBS

Con los medios de la tabla 1 se realizaron 54 experimentos con pruebas por duplicado, en Erlenmeyers de 500 mL con 150 mL de medio para cada prueba y de 48 horas de duración. Cada medio se manejó a 3 niveles de pH (5,8; 6,0 y

6,5) y a 6 niveles de esporas inoculadas ($6,26 \pm 0,74 \cdot 10^7$; $5,25 \pm 0,64 \cdot 10^7$; $4,29 \pm 0,51 \cdot 10^7$; $6,26 \pm 0,85 \cdot 10^6$; $5,36 \pm 0,50 \cdot 10^6$; $4,20 \pm 0,55 \cdot 10^6$ esporas), con un factor de respuesta cuantitativo de número y diámetro de los pellets obtenidos, y de la concentración de biomasa; y con un factor de respuesta cualitativo correspondiente a la homogeneidad y apariencia del pellet.

Cada experimento se realizó en un shaker marca Thermo con baño termostático incorporado, a $28,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. El movimiento longitudinal que el shaker imprimió a los Erlenmeyers, a su vez, se convirtió en un movimiento rotacional del fluido contenido en ellos, equivalente a 160 rpm. Estos experimentos se realizaron con el objeto de determinar la mejor combinación de entre las 54 utilizadas, para emplearla en los experimentos en el reactor de 2 L. Para obtener los factores de respuesta mencionados, se siguieron los siguientes procedimientos:

a) *Determinación de los parámetros físicos del microorganismo*

➤ *Número de pellets*

Para determinar el número de pellets se tomó una alícuota que varió desde 3 mL hasta 10 mL de medio, dependiendo de la abundancia de pellets en el sistema. Esta alícuota se diluyó con agua destilada a fin de facilitar el conteo del número de pellets y el resultado se reportó como número de pellets/mL.

➤ *Biomasa*

Para determinar la biomasa producida se filtraron y secaron las muestras en una estufa marca BOEKEL modelo 132000 a 105°C durante 2 horas, según el método de Haq y Daud descrito por Ali, *et al.*, con lo que se obtuvo el peso de biomasa en base seca.^[1]

➤ *Diámetro del pellet*

Antes de secar las muestras y después de filtrarlas se determinó el diámetro del pellet con un calibrador digital marca Buffalo Tools.

b) *Análisis cualitativo de los pellets*

Para determinar la homogeneidad y apariencia de los pellets se tomó una alícuota de 30 mL del Erlenmeyer, y en ella se observaron las diferencias significativas de tamaño y de forma de los pellets, así como la cantidad de hifas en su contorno y en el medio de cultivo.

c) *Selección de las condiciones de operación*

Para seleccionar las condiciones con las cuales se llevarían a cabo las fermentaciones en los reactores de 2 y 14 litros, se individualizaron las combinaciones que obtuvieron resultados cualitativos que se consideraron satisfactorios. Luego se condensaron las combinaciones que obtuvieron los menores diámetros de pellet, el mayor número de pellets; y, por

último, la mayor cantidad de biomasa. De estos resultados, se tomó el que presentaba buenas características tanto cualitativas como cuantitativas.

2.2.2. *Selección del método de inoculación en el reactor de 2 litros*

Utilizando el medio, el pH y la concentración de esporas que obtuvieron las mejores características del pellet se inoculó el reactor de 2 litros de dos formas alternativas.

La primera forma de inocular consistió en determinar la cantidad de pellets que existirían en el reactor de 2 litros en caso de tener igual crecimiento que en los Erlenmeyers. Para esto se multiplicó el volumen de operación del reactor por el número de pellets/mL obtenidos en los Erlenmeyers. De esta cantidad de pellets se tomó el 5% según lo recomendado por De Argáez y se lo inoculó en el reactor de 2 litros.^[7]

La segunda forma de inocular consistió en colocar directamente en el medio de cultivo el número de esporas con el cual se obtuvieron los mejores resultados de pellet en los 54 experimentos y sus paralelas realizados en los Erlenmeyers.

En ambos casos el proceso de fermentación se llevó a cabo durante 8 días, que es el tiempo recomendado para que se produzca el máximo crecimiento del pellet.^{[13][14]}

La fermentación se llevó a cabo en un microfermentador marca New Brunswick y durante este proceso se controló tanto la temperatura a $28,0^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ como el nivel de espuma mediante la adición de 1 mL/h de antiespumante y la aireación se mantuvo a 0,7 vvm^[11]

2.2.3. *Influencia de la agitación en el tamaño del pellet en el reactor de 2 litros*

A fin de determinar la influencia de la velocidad de agitación en el tamaño y estructura del pellet se trabajó con dos niveles de agitación en el reactor de 2 litros.

El primer nivel según lo recomendado por Byung-Hwan *et al.*, y Ola Gomaa, se empleó con el fin de no alterar la estructura esférica del pellet por su extremada fragilidad y correspondió a velocidades de agitación bajas de 60, 100, 120 y 140 rpm.^{[4] [10]}

El segundo nivel abarcó niveles de agitación altos de 500, 600, 700 y 800 rpm, debido a la recomendación de Tought, *et al.*, en el sentido de que estos niveles darían mejores propiedades al pellet.^[24]

En cada uno de estos niveles se determinaron los parámetros físicos del microorganismo 2 veces por día.

2.2.4. *Proceso de generación de biomasa en los reactores de 2 y 14 litros*

Para las fermentaciones en los reactores de 2 y 14 litros a partir de las cuales se obtuvieron los datos que se emplearon en el proceso de escalado se inoculó únicamente con el método que en el reactor de 2 litros permitió obtener los mejores pellets y se trabajó con el nivel de agitación que permitió obtener pellets estables.

En cada una de estas fermentaciones se determinó tanto la concentración como la densidad de la biomasa, el número y diámetro de los pellets, la densidad del sustrato, la viscosidad aparente del medio, el esfuerzo cortante, el índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento del fluido (n). Además, se determinó el rendimiento microbiano en función del azúcar consumido y la velocidad específica de crecimiento.

2.2.5. Influencia de la agitación en la transferencia de masa

Para determinar la influencia entre la agitación y la transferencia de masa, se midió el coeficiente de transferencia de masa k_{La} con el nivel de agitación que permitió obtener pellets estables en el reactor de 2 litros. Para esto, se evaluó la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo mediante el método dinámico de Taguchi y Humphrey^[24], teniendo en cuenta que debido a los requerimientos del *Aspergillus niger* las concentraciones de oxígeno disuelto en el medio no podrían ser inferiores al 40% de la concentración de saturación.^[11]

2.2.6. Formulación del modelo matemático empleado en el escalado

A fin de obtener un modelo matemático que relacione la potencia transferida al medio por unidad de volumen, la velocidad superficial del aire y la viscosidad aparente del medio, se empleó la ecuación (1) dada por Linden^[16] y manejada en el escalado realizado por Guerra, Izurieta y Páez.^[12]

$$k_{La} = b * \left(\frac{P_g}{V_m} \right)^c * V_s^e * \mu_a^f \quad (1)$$

La velocidad superficial del aire se calculó como el cociente entre el flujo volumétrico de aireación y el área transversal del reactor. Con el fin de calcular los coeficientes b, c, e y f de la ecuación (1), se realizó una gráfica de k_{La} versus $\frac{P_g}{V} * V_s * \mu$ y los valores deseados se procesaron mediante el paquete estadístico Statgraphics® Centurion XV.

La velocidad de agitación está relacionada con la potencia por unidad de volumen que se transfiere al reactor tanto en el sistema aireado como en el no aireado, que se obtiene cuando

se ha cerrado el suministro de aire, lo que se describe mediante la ecuación (2).^{[18][20][23]}

$$\frac{P_g}{P} = 0,1 * \left(\frac{g * W * V^{2/3}}{N^2 * d^4} \right)^{0,2} * \left(\frac{N * V}{Q} \right)^{0,25} \quad (2)$$

Para el escalado, los parámetros k_{La} , V_s y μ_a de la ecuación (1) fueron los que se obtuvieron del reactor de 2 litros, mientras que los exponentes b, c, e y f que actúan sobre dichos parámetros fueron los obtenidos del reactor de 14 litros. La relación entre la ecuación (1) y (2) permitió determinar la dependencia que existe entre el coeficiente k_{La} del reactor de 2 litros y la velocidad de agitación del reactor de 14 litros. A fin de relacionar el crecimiento microbiano con la velocidad de agitación, se llevó a cabo una simulación digital del proceso mediante el programa Visual Basic Applications de MS ExcelTM, cuyo algoritmo de simulación, se presenta en la fig. 1.

2.2.7. Determinación de la variación entre los datos experimentales y los obtenidos mediante la simulación digital

Para determinar el grado de significación de las variaciones entre los datos experimentales de diámetro de pellet y de concentración de biomasa, y los resultados de la simulación digital, se construyó el estimador chi cuadrado (valor calculado) de acuerdo a lo indicado por Espallargas.^[9] Para esto se empleó la ecuación (3).

$$\sigma_D^2 = \frac{(D_s - D_{Exp})^2}{D_{Exp}} ; \sigma_X^2 = \frac{(X_s - X_{Exp})^2}{X_{Exp}} \quad (3)$$

El valor de este estimador se comparó con los grados de libertad (valor esperado) del conjunto en estudio. Como el valor calculado del estimador fue menor al valor esperado se pudo deducir que la desviación entre los datos experimentales y los calculados mediante la simulación no fue significativa y que la simulación representaba adecuadamente el experimento.

2.2.8. Verificación de la idoneidad de los parámetros de escalado obtenidos del modelo matemático

Para verificar la idoneidad del escalado, se realizó una fermentación en el reactor de 2 litros con la velocidad de agitación a partir de la cual se llevó a cabo el escalado, y otra, en el reactor de 14 litros, a la velocidad de agitación obtenida de la simulación. Durante estas fermentaciones, que duraron 8 días se determinaron los parámetros físicos del microorganismo y el coeficiente k_{La} .

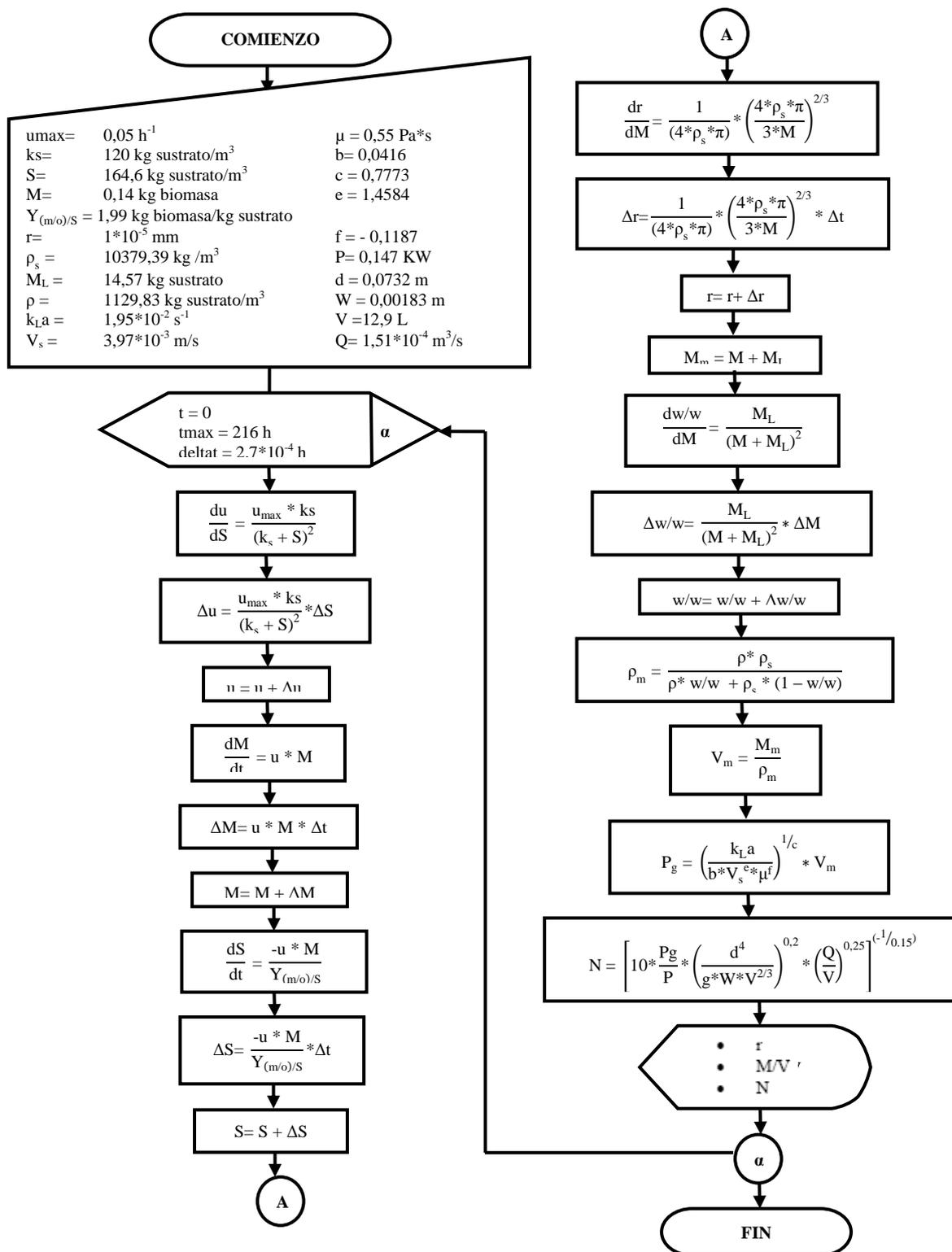


Figura 1. Algoritmo de simulación para el proceso de fermentación sumergida con *Aspergillus niger*

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Selección del mejor medio de cultivo para el crecimiento del pellet

En las experimentaciones se pudo observar que, en general, a mayor número de pellets mayor fue el nivel de homogeneidad en la distribución de sus diámetros, se tuvo

menor cantidad de hifas en el contorno de los pellets y mayor compactación de los mismos.

La combinación de medio, pH y concentración de esporas que permitió obtener buenas características tanto cualitativas como cuantitativas del pellet se obtuvo al trabajar con el Medio 2, a pH 6,5 y con $4,20 \pm 0,55 \cdot 10^6$ esporas de inóculo.

3.2. Selección del método de inoculación

La inoculación en el reactor con los pellets ya formados, que aquí se consigna como primer método de inoculación, obtuvo pellets amorfos y poco estables durante la fermentación, mientras que al inocular directamente las esporas de *Aspergillus niger* se obtuvieron pellets pequeños, esféricos y compactos, y menor cantidad de hifas libres, en el medio de cultivo y alrededor del pellet, como se observa en la microfotografía de la Figura 2. Sin embargo, al aplicar este método se pudo notar que la biomasa se pegó en las paredes del reactor.

Al analizar los pros y contras de cada uno de los métodos que se ensayaron, se escogió la inoculación directa de esporas (segundo método), porque se obtuvieron pellets estables y esféricos, que son los que se requieren para realizar el escalado.

La conveniencia de estas características se basó en que, según Linden, la transferencia de masa que ocurre en una partícula esférica de consistencia compacta es más predecible que la que ocurre en una partícula amorfa.^[16] Además, la esfericidad del pellet fue un parámetro empleado en la simulación del proceso de escalado.

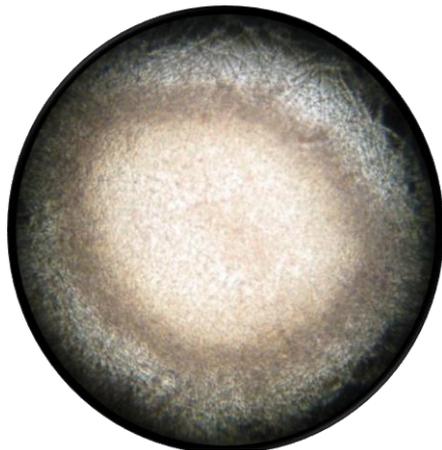


Figura 2. Pellet obtenido con el segundo método de inoculación a los 8 días de fermentación a 600 rpm, observado con un aumento 10X en un microscopio óptico

3.3. Influencia de la agitación en el tamaño del pellet

En las fermentaciones que se llevaron a cabo a velocidades de agitación de 60, 100, 120 y 140 rpm se obtuvieron pellets de baja estabilidad lo que produjo que, en su mayoría, los pellets se depositaran en el fondo del reactor después del primer día de fermentación. Se piensa que esto pudo deberse a que los pellets eran demasiado grandes, lo que concordando con lo manifestado por Tought, y Prosser, habría impedido una correcta transferencia de oxígeno y nutrientes desde el medio hasta el centro del pellet, generando la muerte microbiana y la formación del sedimento mencionado, compuesto por pellets de mohos muertos e hifas.^[24] Esta presencia de hifas libres en el medio según Baron *et al.* y Paul *et al.*, estaría asociada a la

baja agitación, que no permitió que las hifas formen pellets.^{[3] [20]}

Por otro lado, en las fermentaciones realizadas a 500, 600, 700 y 800 rpm se obtuvieron pellets esféricos y estables durante los 8 días del proceso fermentativo y no se obtuvo sedimentos. Por estas razones, en los experimentos referentes al escalado se decidió trabajar únicamente con las velocidades de agitación de 500, 600, 700 y 800 rpm.

3.4. Proceso de generación de biomasa para el escalado

El mayor rendimiento microbiano en función del azúcar consumido en el reactor de 2 litros se obtuvo con una velocidad de agitación de 600 rpm, y correspondió a 1,99 kg biomasa/ kg azúcares consumidos.

Como a esta velocidad de agitación se obtuvo también el menor tamaño y mayor número de pellets, y la mayor compactación de pellet, el proceso de escalado del reactor de 2 litros al de 14 litros se realizó a partir de esta velocidad de agitación.

El esfuerzo cortante determinado en cada reactor en función de la concentración de biomasa se presenta en la fig. 3 y fig. 4, respectivamente.

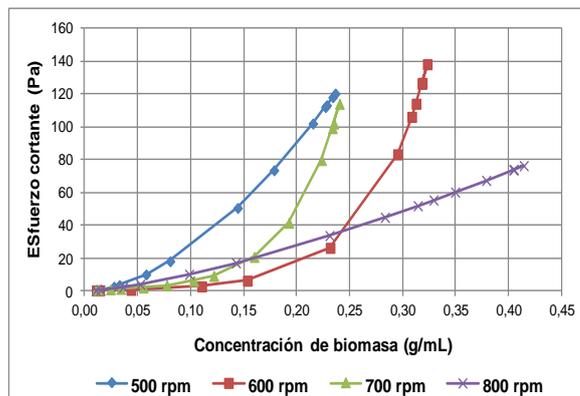


Figura 3. Efecto de la concentración de biomasa sobre el esfuerzo cortante en el reactor de 2 litros

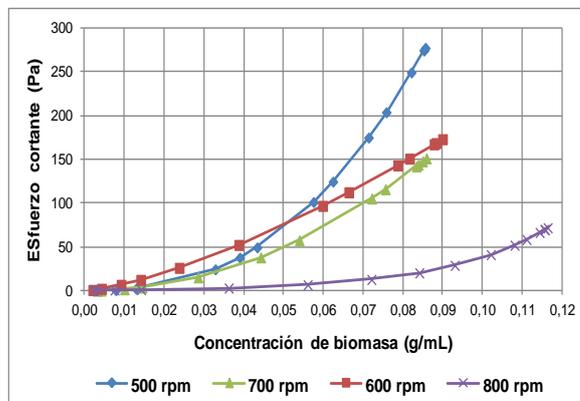


Figura 4. Efecto de la concentración de biomasa sobre el esfuerzo cortante en el reactor de 14 litros

Se puede notar que el esfuerzo cortante no resultó ser una función de la velocidad de agitación directamente, sino que fue influenciado mayormente por la viscosidad aparente del medio, la misma que se debió a la estabilidad microbiana alcanzada a una determinada velocidad de agitación. En todos los casos el esfuerzo cortante fue mayor para el reactor de 14 litros.

3.5. Influencia de la agitación en la transferencia de masa

El coeficiente volumétrico de transferencia de masa presentó disminuciones que se ajustaron a curvas potenciales y exponenciales en los dos reactores, como se observa en la fig. 5 y fig. 6, lo que indica que el coeficiente de transferencia de masa disminuyó fuertemente a medida que se incrementa el tiempo de fermentación.

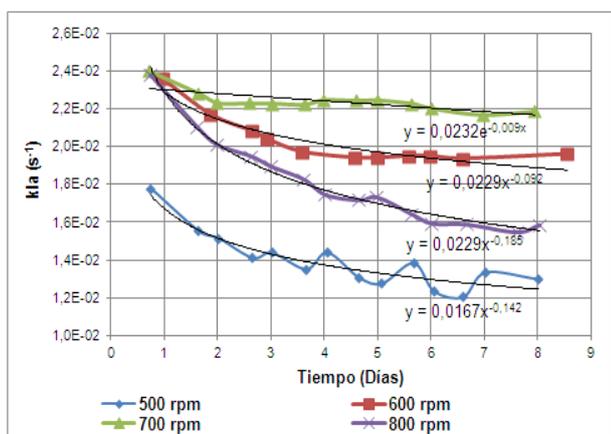


Figura 5. Variación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_{L,a}$ durante el proceso fermentativo en el reactor de 2 litros

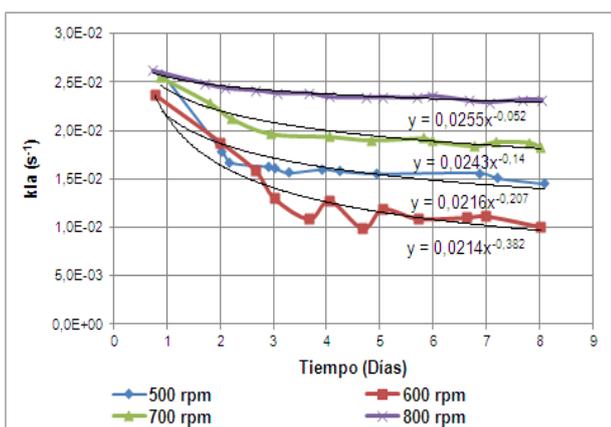


Figura 6. Variación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_{L,a}$ durante el proceso fermentativo en el reactor de 14 litros

3.6. Modelo matemático empleado en el escalado

Los coeficientes de escalado obtenidos mediante la regresión multinomial se presentan en la Tabla 2, donde se nota que el mayor coeficiente en las dos escalas es el coeficiente e , que como se observa en la ecuación (1) es el que actúa sobre la velocidad superficial del aire. Esto indica que en las dos escalas la aireación del sistema tiene

mayor incidencia sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_{L,a}$, en comparación con los otros parámetros de escalado (potencia por unidad de volumen y viscosidad).

Tabla 2. Coeficientes de escalado para las dos escalas

Coefficientes de escalado	Reactor de 2 litros	Reactor de 14 litros
b	0,163626	0,041587
c	0,430364	0,777313
e	1,067322	1,458381
f	-0,169224	-0,118656

El coeficiente f , que es el que actúa sobre la viscosidad aparente, es negativo en ambos casos, lo que indica que la viscosidad tiene un efecto adverso sobre la transferencia de oxígeno al medio.

3.6.1. Resultados obtenidos de la simulación digital

El modelo matemático y la simulación digital permitieron estimar la velocidad de agitación que debía emplearse en la escala de 14 litros, para escalar el diámetro del pellet y por ende la concentración de biomasa desde el reactor de 2 litros al reactor de 14 litros.

En la fig. 7 se presentan los resultados de la simulación de la velocidad de agitación en el rango de 415 rpm a 387 rpm en función del tiempo. Se nota que la variación de concentración de biomasa con el tiempo es opuesta a la tendencia de la variación de la velocidad de agitación, lo que corrobora la influencia de la misma en el crecimiento microbiano.

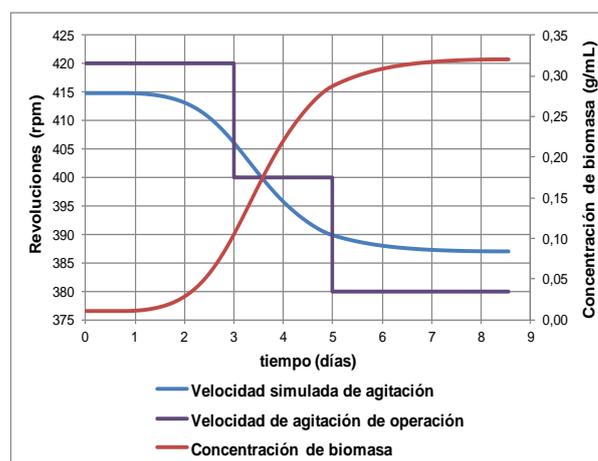


Figura 7. Velocidad simulada de agitación, velocidad de agitación de operación y concentración de biomasa obtenida de la simulación digital

Como indicó anteriormente, en este estudio no se reprodujo el perfil de velocidades descrito por la simulación, sino que se realizó un ajuste manual de dicha velocidad, escalonado, como se puede observar en el trazo morado de la fig. 7.

3.6.2. Determinación de la variación entre los datos experimentales y los obtenidos en la simulación digital

Los resultados de la significación de la variación entre los datos experimentales del diámetro de pellet y la concentración de biomasa y sus respectivos valores simulados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Estimador de comparación entre el diámetro y la concentración experimental con el diámetro y la concentración obtenidos de la simulación, respectivamente

Parámetros comparados	Estimador	
	Valor esperado (Grados de libertad)	Valor calculado (Chi cuadrado)
Diámetro experimental-Diámetro de la simulación	11	0,432
Concentración experimental-Concentración de la simulación	11	0,156

Se observa que el valor calculado del estimador para cada caso es cercano a cero y mucho menor que el esperado, por lo que se infiere que los valores obtenidos experimentalmente y mediante la simulación pertenecen a un mismo conjunto. Por este motivo, se considera que la simulación es adecuada para el escalado.

3.7. Verificación de la idoneidad de los parámetros de escalado obtenidos del modelo matemático

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos para realizar el proceso de escalado del reactor de 2 a 14 litros.

Tabla 4. Condiciones para el escalado en el reactor de 14 litros

Parámetros	Valor	Unidades
Velocidad de agitación	420-380	rpm
Coefficiente volumétrico de transferencia de masa $k_{L,a}$	$1,95 \cdot 10^{-2}$	s^{-1}
Flujo volumétrico de aire	0,7	vvm

En la fig. 8, se presentan los resultados obtenidos del proceso de validación para el diámetro del pellet durante el proceso fermentativo en los reactores de 2 y 14 litros. Se aprecia que el diámetro del pellet varía con el tiempo de manera idéntica en las dos escalas con desviaciones que son despreciables, y que llega a un valor de $0,957 \pm 0,006$ mm al séptimo día de fermentación. Lo que indica que el proceso de escalado empleado es adecuado.

En la fig. 9, se presentan los resultados obtenidos del proceso de validación para la concentración de biomasa durante el proceso fermentativo en los reactores de 2 y 14 litros. Se observa que la concentración de biomasa varía con el tiempo de la fermentación de manera idéntica, con desviaciones que son despreciables, y que llega a un valor estable de $0,319 \pm 0,001$ g/mL a partir del 5,5 día.

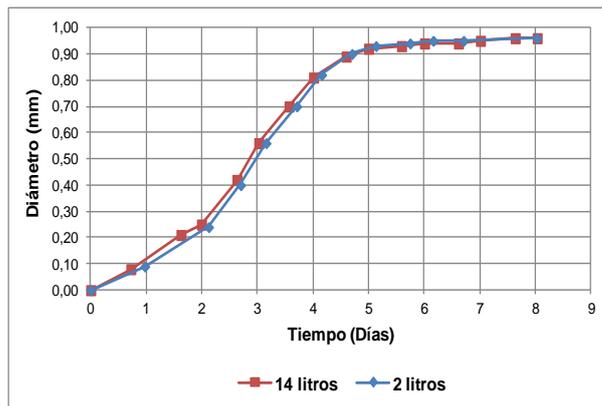


Figura 8. Incremento del diámetro de pellet a lo largo del proceso fermentativo en el reactor de 2 y 14 litros

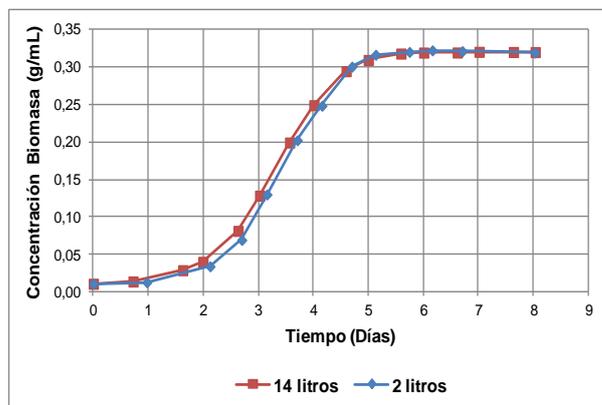


Figura 9. Incremento de la concentración de biomasa a lo largo del proceso fermentativo en el reactor de 2 y 14 litros

En la fig. 10, se presentan los resultados obtenidos del proceso de validación para el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno durante el proceso fermentativo en los reactores de 2 y 14 litros. Se nota que la variación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en el reactor de 14 litros es la misma que se da en el reactor de 2 litros, con pequeñas desviaciones que no repercuten en el valor general de dicho coeficiente.

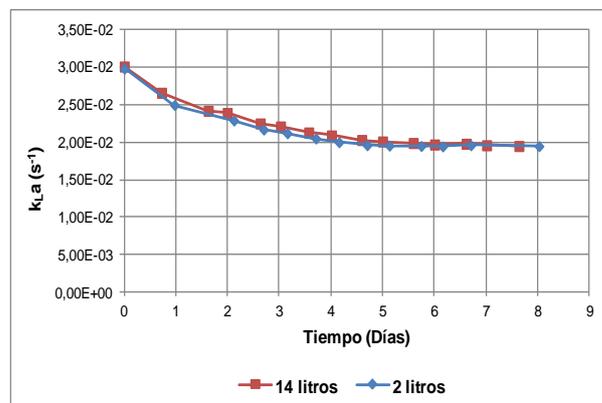


Figura 10. Variación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa a lo largo del proceso fermentativo en el reactor de 2 y 14 litros

4. CONCLUSIONES

El mejor medio de cultivo para el crecimiento del pellet estuvo constituido por la siguiente composición: 150g/L de Sacarosa, 2,40 de NH_4NO_3 y 0,919 de KH_2PO_4 .

Las variables de operación que permitieron obtener en los erlenmeyers el mayor número de pellets con el menor diámetro y la mayor concentración de biomasa fueron las siguientes: pH 6,5; $(4,20 \pm 0,55) \cdot 10^6$ esporas.

Se obtuvo una mejor estabilidad del pellet al inocular directamente el reactor con las esporas de *Aspergillus niger*

Velocidades de agitación de 60, 100, 120 y 140 rpm no permitieron realizar el proceso de fermentación debido a la no formación o mala formación del pellet.

La velocidad de agitación que permitió realizar el proceso de escalado a partir del reactor de 2 litros fue de 600 rpm.

El diámetro de pellet a partir del cual se realizó el escalado del reactor de 2 litros al de 14 litros fue de 0,96 mm.

El mayor valor de la constante cinética, así como también el mayor rendimiento de la biomasa producida en función del azúcar consumido en el reactor de 2 litros se obtuvo a 600 rpm.

El mantenimiento del valor del coeficiente volumétrico de transferencia de masa en $1,95 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, constituyó un adecuado criterio de escalado.

El rango de velocidad de agitación implementado para el escalado que fue de 420 a 380 rpm, fue adecuado.

ABREVIATURAS

b,c,e,f	Constantes propias de cada sistema
con	Concentración en peso de la biomasa en el medio de cultivo, kg biomasa/kg de mezcla
d	Diámetro del agitador, m
D_{Exp} :	Diámetro de pellet obtenido mediante la experimentación, mm
$\frac{dM}{dt}$	Tasa de incremento de biomasa en el tiempo, kg biomasa/s
$\frac{dS}{dt}$	Variación del consumo del sustrato en un corto intervalo de tiempo, kg sustrato/s
D_s :	Diámetro de pellet obtenido mediante simulación digital, mm
g	Gravedad, m/s^2
k_{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de masa, s^{-1}
k_s	Constante biológica del microorganismo, kg sustrato/m^3
M	Biomasa, kg de biomasa seca
M_L	Masa del medio de cultivo, kg de medio
M_m	Masa de la mezcla biomasa – medio de cultivo, Kg
N	Velocidad de agitación, rpm
P	Potencia sin aireación, kW
P_g	Potencia entregada al sistema por el motor mientras se suministra aireación al medio, kW
$\frac{P_g}{V_m}$	Potencia por unidad de volumen en un sistema aireado, kW/m^3
Q	Flujo volumétrico del aire, m^3/s
r	Radio del pellet, m
S	Concentración de sustrato, kg sustrato/m^3
u	Velocidad específica de crecimiento microbiano, s^{-1}

u_{max}	Constante cinética de crecimiento microbiano, s^{-1}
V	Volumen operativo del fermentador, m^3
V_m	Volumen de la mezcla biomasa – medio de cultivo, m^3
V_s	Velocidad superficial, m/s
W	Ancho de la paleta del agitador, m
X_{Exp}	Concentración de biomasa obtenida mediante la experimentación, $\text{kg de biomasa seca/m}^3$ de medio
X_s	Concentración de biomasa obtenida mediante simulación digital, $\text{kg de biomasa seca/m}^3$ de medio
$Y_{(m/o)S}$	Rendimiento del microorganismo en función a los azúcares consumidos, $\text{kg biomasa seca/kg sustrato consumido}$
ρ	Densidad del sustrato, $\text{kg de sustrato/m}^3$ de mezcla
ρ_m	Densidad de la mezcla biomasa – medio de cultivo, kg mezcla/m^3
ρ_s	Densidad de la biomasa, $\text{kg de biomasa seca/m}^3$ de mezcla
σ_D^2	Estimador chi cuadrado del diámetro de pellet
σ_X^2	Estimador chi cuadrado de la concentración de biomasa
μ_a	Viscosidad aparente del medio, $\text{Pa}\cdot\text{s}$

REFERENCIAS

- [1] S. Ali, Ikram-ul-Haq., J. Iqbal y M. Qadeer. (2003). The kinetic basis of the role of Ca^{++} ions for higher yield of citric acid in a repeated-batch cultivation system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19(8), 817-823.
- [2] Banco Central Del Ecuador, 2012, *Base de datos estadísticos de comercio exterior del Banco Central*, Dirección General de Estudios, Dirección de Estadística Económica.
- [3] G. Baron y R. Lejeune (1988). Modeling the Exponential Growth of Filamentous Fungi During Batch Cultivation. *Biotechnology and bioengineering*, 60(2), 169-179.
- [4] Byung-Hwan Um y T. R. Hanley (2008). A CFD model for predicting the flow patterns of viscous fluids in a bioreactor under various operating conditions. *Korean J. Chem. Eng.*, 25(5), 1094-1102.
- [5] A. Cadavid (2006). Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *Revista Universidad Eafit*(128), 33.
- [6] M. Chávez, O. González, G. Sánchez, M. Luz, G. Rodríguez, A. Elezar y E. Silva (2005). Mathematical description of bikaverin production in a fluidized bed bioreactor. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21(5), 683-688.
- [7] E. De Argáez. "Fermentación cítrica de melaza de caña". Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico, Dept. Alimentos, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador, 1969.
- [8] P. M. Doran, "Principios de ingeniería de los bioprocesos". Zaragoza, España: Acribia, p. 159, 1998.
- [9] D. Espallargas, "Estadística Matemática. En: Selección de guías de estudio: Contabilidad y finanzas". Cuba: Editorial Universitaria, 2011, pp. 92-93.
- [10] T.O. Femi-Ola, J.O. Oluyeye, A.O. Gbadebo (2009). Citric Acid production from pineapple waste. *Continental Journal Microbiology*, 3, 1-5.
- [11] J. Garrido, R. Gómez y I. J. Schnabel. (1988). Factores que afectan la producción de ácido cítrico en cultivo sumergido por *Aspergillus niger* 110. *Interferón y Biotecnología*, 5(1), pp. 18-30.
- [12] G. Guerra, B. Izurieta y M. Páez. (2011). Escalado de la producción industrial de levadura de panificación usando dos reactores modelo y un bio-reactor prototipo. *Revista Politécnica*, 30(1), pp. 1-9.
- [13] I. Henao, M. Correa y G. Marín. (2006). Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus Niger* con actividad enzimática amilolítica. *Red Universitas Scientiarum*, 11(2), pp. 51-60.
- [14] G. Jangnow y D. Wolfgang. "Biotecnología - Introducción con experimentos modelos". Stuttgart, Alemania: Ferdinand Enke Verlag, 1991, p. 92.
- [15] K. Kirimura, S. Yusa y S. Rugsaseel (1999). Amylose-like polysaccharide accumulation and hyphal cell-surface structure in relation to citric acid production by *Aspergillus niger* in shake culture. *Appl. Microbiology Biotechnology*(52), 421-428.

- [16] J. Linden, M. Matthey y B. Kristiansen. (2002). "Citric Acid Biotechnology". Londres, Inglaterra: Taylor & Francis Ltd, 2002, pp. 3, 69-74, 170, 422.
- [17] C. López, A. Zuluaga, S. Herrera y I. Medina (2006). Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche. *DYNA*, 1(150), pp. 39-57.
- [18] M. T. Madigan, J. M. Martinko y J. Parker. "Brock, Biología de los microorganismos" 10ª ed. Madrid, España: Pearson Prentice Hall, 2003, pp. 142-158.
- [19] M. Ola Gomaa y A. Heba El Bialy (2009). Pellet Morphology, Broth Rheology and Statin Production in Submerged Fermentation of *P. citrinum*. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4(2), pp. 75-83.
- [20] E. L. Paul, V. A. Atiemo-Obeng y S. M. Kresta "Handbook of Industrial Mixing : Science and Practice". Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Incorporated, 2004, pp. 1081, 1125.
- [21] L. Prescott, J. Harley y D. Klein, "Microbiología" 5ta ed. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana, 2004, pp. 1091-1092.
- [22] S. Prescott, "Microbiología Industrial". Madrid, España: Aguilar, 1960, p. 563.
- [23] P. Stanbury "Principles of fermentation technology". Gran Bretaña: Butterworth Heinemann, 1995, p. 259.
- [24] A. Tought y J. Prosser (1996). Experimental verification of a mathematical model for pelleted growth of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in submerged batch culture. *Microbiology*, 142, pp. 639-648.