

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

**Desarrollo de un programa de computador para el diseño del
proceso de producción por lotes de la levadura *Saccharomyces
cerevisiae***

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
QUÍMICO**

ANDRÉS ALEJANDRO ROMERO BARRETO
andres.romero.barreto@gmail.com

DIRECTOR: ING. EDWIN VERA PhD.
edwin.vera@epn.edu.ec

Quito, enero 2016

© Escuela Politécnica Nacional (2016)

Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Andrés Alejandro Romero Barreto, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Andrés Romero Barreto

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Andrés Alejandro Romero Barreto, bajo mi supervisión.

Ing. Edwin Vera PhD
DIRECTOR DE PROYECTO

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN.....	xii
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Producción de biomasa	1
1.1.1 Biorreactores	1
1.1.1.1 Tipos de biorreactores	2
1.1.1.2 Modalidad de operación	4
1.1.2 Cinética de producción de biomasa.....	6
1.1.2.1 Estequiometría de la producción de biomasa	6
1.1.2.2 Velocidad específica de crecimiento	7
1.1.2.3 Modelos cinéticos para la producción de biomasa.....	8
1.1.3 Condiciones de operación	11
1.1.3.1 Temperatura	11
1.1.3.2 pH	12
1.2 Transferencia de masa en bioprocesos	13
1.2.1 Difusión molecular	13
1.2.2 Transferencia de masa por convección	14
1.2.3 Transferencia de oxígeno en cultivos microbianos	14
1.2.3.1 Demanda de oxígeno	15
1.2.3.2 Transporte de oxígeno desde la burbuja.....	15
1.2.4 Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	17
1.2.4.1 Potencia de agitación por unidad de volumen.....	18
1.2.4.2 Velocidad superficial de aire	19
1.3 Modelación y simulación de bioprocesos	20
1.3.1 Modelo de un sistema.....	20
1.3.2 Tipos de modelos	21
1.3.2.1 Modelos estocásticos, empíricos y deterministas.....	21
1.3.2.2 Modelos dinámicos y estáticos.....	22
1.3.2.3 Modelos de tiempo continuo y discreto	22
1.3.2.4 Modelos de parámetros agrupados y de parámetros distribuidos.....	23
1.3.3 Simulación de procesos.....	23
2 METODOLOGÍA.....	24

2.1	Formulación del modelo matemático.....	24
2.2	Determinación de los parámetros del modelo y definición del modelo matemático.....	25
2.2.1	Diseño experimental de crecimiento microbiano.....	26
2.2.1.1	Parámetros de operación.....	27
2.2.1.2	Variables medidas	29
2.2.2	Cálculo de variables del modelo	29
2.2.2.1	Cálculo de la potencia consumida	29
2.2.2.2	Calculo del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.....	30
2.3	Implementación del modelo matemático	34
2.3.1	Módulo I: diseño del biorreactor.....	35
2.3.2	Módulo II: simulación del proceso de producción de biomasa.....	35
2.3.3	Módulo III: optimización del proceso.....	35
2.4	Comparación de resultados	36
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
3.1	Formulación del modelo matemático.....	37
3.1.1	Relaciones de similitud geométrica estandar	37
3.1.2	Cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.....	39
3.1.2.1	Cálculo de la potencia de agitación	40
3.1.3	Correlación entre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y la velocidad específica de crecimiento microbiano	42
3.1.4	Cinética de crecimiento microbiano.....	42
3.2	Determinación de los parámetros del modelo.....	43
3.2.1	Parámetros de la expresión de Cooper	43
3.2.2	Velocidad específica de propagación de levadura	56
3.2.3	Dependencia de la velocidad de crecimiento microbiano con el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	60
3.3	Implementación del modelo matemático	64
3.4	Comparación de resultados	69
3.4.1	Desviación en el coeficiente de transferencia de oxígeno.....	69
3.4.2	Desviación en la velocidad específica de crecimiento microbiano.....	70
3.4.3	Desviación en los perfiles de crecimiento microbiano.....	71
4	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
4.1	Conclusiones	73
4.2	Recomendaciones.....	74
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1:	Valores referenciales de velocidad específica de crecimiento para diferentes microorganismos en cultivo sumergido por lotes	8
Tabla 1.2:	Modelos cinéticos no estructurados para la producción de biomasa	9
Tabla 2.1:	Combinaciones del diseño experimental factorial mixto	27
Tabla 2.2:	Composición del sustrato para los ensayos de producción de biomasa	28
Tabla 2.3:	Combinaciones de condiciones de operación empleados en los ensayos de comparación de resultados	36
Tabla 3.1:	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire en las escalas de 2, 17 y 150 L	47
Tabla 3.2:	Potencias de agitación calculadas y medidas en el biorreactor de 2 L para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y velocidad superficial de aire	48
Tabla 3.3:	Potencias de agitación calculadas y medidas en el biorreactor de 17 L para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y velocidad superficial de aire	48
Tabla 3.4:	Potencias de agitación calculadas y medidas en el biorreactor de 150 L para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y velocidad superficial de aire	49
Tabla 3.5:	Coefficientes del modelo de Cooper original para las escalas de 2, 17 y 150 L	52
Tabla 3.6:	Coefficientes y parámetros del modelo de Cooper modificado para las escalas de 2, 17 y 150 L	54
Tabla 3.7:	Velocidad específica de crecimiento microbiano en el biorreactor de 2 L para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y velocidad superficial de aire	59
Tabla 3.8:	Velocidad específica de crecimiento microbiano en el biorreactor de 17 L para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y velocidad superficial de aire	59

Tabla 3.9:	Velocidad específica de crecimiento microbiano en el biorreactor de 150 L para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y velocidad superficial de aire	60
Tabla 3.10:	Comparación de los resultados experimentales y por simulación obtenidos respecto al $k_L a$ en los biorreactores de 17 a 550 rpm y 12,4 L/min y 150 L a 450 rpm y 35,5 L/min	70
Tabla 3.11:	Comparación de los resultados experimentales y por simulación obtenidos respecto a la velocidad específica de crecimiento en los biorreactores de 17 y 150 L	71

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.1:	Biorreactores para la producción de biomasa en cultivo sumergido. (A) Tanque agitado (B) Columna burbujeadora (C) Air-lift (D) Air-lift con lazo externo	3
Figura 1.2:	Perfiles cinéticos característicos de los modelos (A) exponencial (B) logístico y (C) Monod para la modalidad de operación por lotes	10
Figura 1.3:	Resistencias para el transporte de oxígeno desde la burbuja hacia el medio de cultivo y al interior de la célula	16
Figura 1.4:	Número de potencia en función del número de Reynolds para sistemas agitados y con diferentes tipos de agitador (Towler y Sinnott, 2007, p. 618)	19
Figura 2.1:	Equivalencias geométricas estándar para el dimensionamiento de biorreactores tipo tanque agitado	26
Figura 2.2:	Equivalencias geométricas estándar para la disposición de los agitadores en biorreactores tipo tanque agitado	27
Figura 2.3:	Esquema de la variación de la concentración de oxígeno disuelto durante la aplicación del método dinámico para la determinación del kLa	31
Figura 3.1:	Relaciones de similitud geométrica estándar para el dimensionamiento de biorreactores tipo tanque agitado	38
Figura 3.2:	Variación de la concentración de oxígeno disuelto durante el método dinámico de Taguchi y Humphrey para el biorreactor de 150 L a diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire	44
Figura 3.3:	Variación de la concentración de oxígeno disuelto durante el método dinámico de Taguchi y Humphrey para el biorreactor de 17 L a diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire	44
Figura 3.4:	Variación de la concentración de oxígeno disuelto durante el método dinámico de Taguchi y Humphrey para el biorreactor de 2 L a diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire	45
Figura 3.5:	Linealización del método dinámico de Taguchi y Humphrey para el biorreactor de 150 L a diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire	46

Figura 3.6:	Ejemplo de la dispersión de datos de k_La obtenidos de la linealización para el biorreactor de 150L a diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire	46
Figura 3.7:	Variación del k_La con la potencia de agitación consumida por unidad de volumen para diferentes flujos de aire en los biorreactores de 2, 17 y 150 L	49
Figura 3.8:	Modelo de Cooper original versus resultados experimentales en el biorreactor de 150 L	50
Figura 3.9:	Modelo de Cooper original versus resultados experimentales en el biorreactor de 17 L	51
Figura 3.10:	Modelo de Cooper original versus resultados experimentales en el biorreactor de 2 L	51
Figura 3.11:	Modelo de Cooper modificado versus resultados experimentales en el biorreactor de 150 L	52
Figura 3.12:	Modelo de Cooper modificado versus resultados experimentales en el biorreactor de 17 L	53
Figura 3.13:	Modelo de Cooper modificado versus resultados experimentales en el biorreactor de 150 L	53
Figura 3.14:	Regresión sobre los datos del coeficiente C con la escala del proceso	55
Figura 3.15:	Regresión sobre los datos del coeficiente α con la escala del proceso	55
Figura 3.16:	Regresión sobre los datos del coeficiente β con la escala del proceso	56
Figura 3.17:	Curva de calibración para la determinación de la concentración de levadura a partir de la absorbancia ($\lambda = 540 \text{ nm}$)	57
Figura 3.18:	Curvas de crecimiento de levadura para los reactores de 150, 17 y 2 L con sus respectivos coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno	58
Figura 3.19:	Variación de la velocidad específica de crecimiento en función del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en la producción de levadura por lotes	61
Figura 3.20:	Regresión potencial para los datos de variación de la velocidad específica de crecimiento en función del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	62

Figura 3.21:	Regresión logarítmica para los datos de variación de la velocidad específica de crecimiento en función del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	62
Figura 3.22:	Regresión hiperbólica para los datos de variación de la velocidad específica de crecimiento en función del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	63
Figura 3.23:	Diagrama de flujo global del algoritmo de simulación	65
Figura 3.24:	Diagrama de flujo del algoritmo de simulación en el módulo I	66
Figura 3.25:	Diagrama de flujo del algoritmo de simulación en el módulo II	67
Figura 3.26:	Diagrama de flujo del algoritmo de simulación en el módulo III	68
Figura 3.27:	Perfiles de crecimiento de levadura experimental y por simulación aplicando el modelo logístico de La Motta para las escalas de 17 y 150 L	71
Figura 3.28:	Perfiles de crecimiento de levadura experimental y por simulación aplicando el modelo de Monod para las escalas de 17 y 150 L	72

LISTA DE ABREVIATURAS

A_i	ancho del deflector
C^*	concentración de saturación de oxígeno disuelto
C	constante de la correlación de Cooper
C_L	concentración de oxígeno disuelto en el sistema
C_{L0}	concentración inicial de oxígeno disuelto en el sistema
D_i	diámetro del agitador
D_t	diámetro del reactor
g	aceleración de la gravedad
H_i	ancho de la paleta del agitador
I	corriente generada en el motor de agitación
k_{La}	coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
L_i	alto de la paleta del agitador
N	velocidad de agitación
N_P	número adimensional de Potencia
N_{RE}	número adimensional de Reynolds de agitación
P/V	potencia de agitación con aireación por unidad de volumen
P	potencia de agitación con aireación
P_0	potencia de agitación sin aireación
q	flujo de gas a través del orificio del aspersor
Q	flujo de gas de operación
Q_{O_2}	tasa específica de respiración microbiana
R	radio interno de la chaqueta
v	voltaje generado en el motor
V	volumen de operación
V_s	velocidad superficial del aire en el reactor
X	concentración de microorganismo en el medio
Z	factor de corrección de la potencia de agitación con aireación para sistemas de agitación múltiple

Letras Griegas

μ	tasa de crecimiento microbiano
α	exponente de la correlación de Cooper para la influencia de la agitación en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
β	exponente de la correlación de Cooper para la influencia de la aireación en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

RESUMEN

En este trabajo se presenta una investigación detallada sobre cómo la velocidad de agitación y flujo de aire afectan al crecimiento microbiano en el proceso de fermentación de levadura de panificación. Esto, mediante el uso del modelado matemático y simulación de: el proceso de transferencia de oxígeno, la cinética del crecimiento microbiano y de la interacción entre estos dos fenómenos. Como primer paso, se seleccionaron las ecuaciones que permitirían determinar la velocidad del crecimiento microbiano a partir de las condiciones de operación ya mencionadas, y entre las más destacadas están la correlación de Cooper, el modelo cinético de Monod y el modelo cinético de la Motta. Seguido, se realizaron experimentos de fermentación en reactores de 2, 17 y 150 L a diferentes rangos de velocidad de agitación y flujo de aire, con el objetivo de determinar los parámetros de las ecuaciones que conforman el modelo matemático y hallar las ecuaciones fenomenológicas que describan las interacciones entre el volumen de operación con la velocidad de transferencia de oxígeno, y de la velocidad de transferencia de oxígeno con la velocidad de crecimiento microbiano. Con el modelo completo, se procedió a realizar otros experimentos de fermentación a condiciones de agitación y aireación diferentes y comparar la concentración final de levadura obtenida con la determinada a partir de simulación. Se determinó que la concentración final de levadura hallada por simulación al usar el modelo de la Motta tiene una desviación menor al 2% respecto al valor encontrado experimentalmente, en tanto que la desviación encontrada al utilizar el modelo de Monod se encuentra alrededor del 15%.

INTRODUCCIÓN

La velocidad con que avanza el sector industrial está directamente ligada a los recursos que se invierten en investigación y desarrollo. Sin embargo, realizar una constante experimentación directa sobre los fenómenos que dirigen un proceso puede llegar a ser costoso en términos de tiempo y materiales, por lo que el modelado y simulación se convierten en una alternativa muy atractiva al momento en que se desea predecir los resultados de un proceso (Matei y Bock, 2012, p. 1). Por otro lado, los fenómenos de transporte y las condiciones de operación, son siempre foco de atención cuando hablamos del análisis de un proceso de transformación, debido a que mientras más conozcamos sobre cómo interactúan estas variables en el proceso, se podrá conseguir mejores tiempos de producción, con consumos de materiales y energía más rentables. Además, no se puede ignorar el amplio rango y aplicabilidad que se puede dar a las tecnologías de fermentación. Las variedades de microorganismos trabajando con diferentes sustratos han dado como resultado cientos –si no miles– de productos derivados de estos procesos. Algunos sectores dignos de destacar son el farmacéutico y el alimenticio (Stanbury, 1995, p. 1). Bajo estas premisas, se ha propuesto este estudio con el objetivo de incursionar en el modelado y simulación del proceso de fermentación de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y conseguir un modelo matemático que relacione algunos parámetros de operación con la cinética de crecimiento microbiano y la velocidad de transferencia de oxígeno en el fermentador.

1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA

La producción de biomasa constituye uno de los grupos más importantes que conforman los procesos fermentativos comerciales, entre los cuales se encuentran también la producción de enzimas y metabolitos, así como la obtención de productos recombinantes (Stanbury, Whitaker y Hall, 1995, p. 1).

Desde la perspectiva del proceso biotecnológico, la producción de biomasa es un proceso fermentativo aeróbico cuya finalidad es la propagación de masa celular a partir de la descomposición de compuestos orgánicos, principalmente carbohidratos. Esta descomposición es un proceso catabólico que genera energía, por lo tanto, se trata de un proceso exotérmico en el cual el producto principal aparece como resultado del metabolismo energético primario, esto quiere decir que se trata de un producto directo de la oxidación de la fuente de carbono (Gaden, 2000, p. 416).

Dentro de los procesos de obtención de biomasa, la producción de levadura de panificación es un proceso fundamental, que junto con la producción de proteína unicelular para uso animal se han practicado a escala industrial desde la Primera Guerra Mundial (Stanbury et al., 1995, p. 1). Desde sus inicios, estos procesos se han llevado a cabo en biorreactores, que son equipos con características operacionales y de construcción que permiten mantener las condiciones de operación óptimas y la asepsia requerida para el crecimiento microbiano, y por consiguiente tienen influencia sobre el rendimiento y la productividad del proceso (Chisti, 1999, p. 664).

1.1.1 BIORREACTORES

Los biorreactores son sistemas mecánicos en los que se efectúan transformaciones biológicas, ya sean referidas al cultivo de microorganismos para la producción de biomasa o a la conversión de un compuesto en otro, que incluye la degradación de residuos (Ratledge y Kristiansen, 2006, p. 162). En estos procesos biotecnológicos, el microorganismo constituye un biocatalizador y por lo tanto los biorreactores están diseñados específicamente para favorecer las reacciones biológicas mediante la eficiente transferencia de masa y calor en el medio de cultivo, independientemente de que sea un medio líquido o contenga sólidos en suspensión, razón por lo cual existen varios tipos de biorreactores que se adaptan a las condiciones del proceso (Williams, 2002, p. 35).

1.1.1.1 Tipos de biorreactores

La mayor parte de procesos de producción de biomasa se realiza en cultivos sumergidos, donde el biocatalizador se encuentra suspendido en el medio. Para este tipo de procesos, que es el caso de la producción de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se analiza en este trabajo, entre los biorreactores más utilizados se encuentran: tanque agitado, columna burbujeadora y reactor aeroelevado o air-lift (Waites, 2001, p. 99-108), cuyas configuraciones se esquematizan en la Figura 1.1.

El biorreactor tanque agitado es el equipo más común para procesos fermentativos aeróbicos principalmente a escala industrial. Se denomina tanque agitado porque está conformado por un sistema de agitación y de aspersion de aire que permiten operar con un principio de funcionamiento simple donde la corriente de aire ingresa por la parte inferior del tanque y por la acción del agitador se produce la ruptura de las burbujas y la mezcla homogénea del medio de cultivo. Para este efecto se pueden utilizar tanto agitadores de tipo axial como radial, sin embargo, el disco turbina de Rushton constituye el agitador más empleado porque se ha comprobado que mejora la hidrodinámica del sistema (Williams, 2002, p. 39). Además, los biorreactores tanque agitado para producción de biomasa están provistos de deflectores que tienen la función de impedir la formación de vórtices y optimizar la mezcla (Ratledge y Kristiansen, 2006, p. 163).

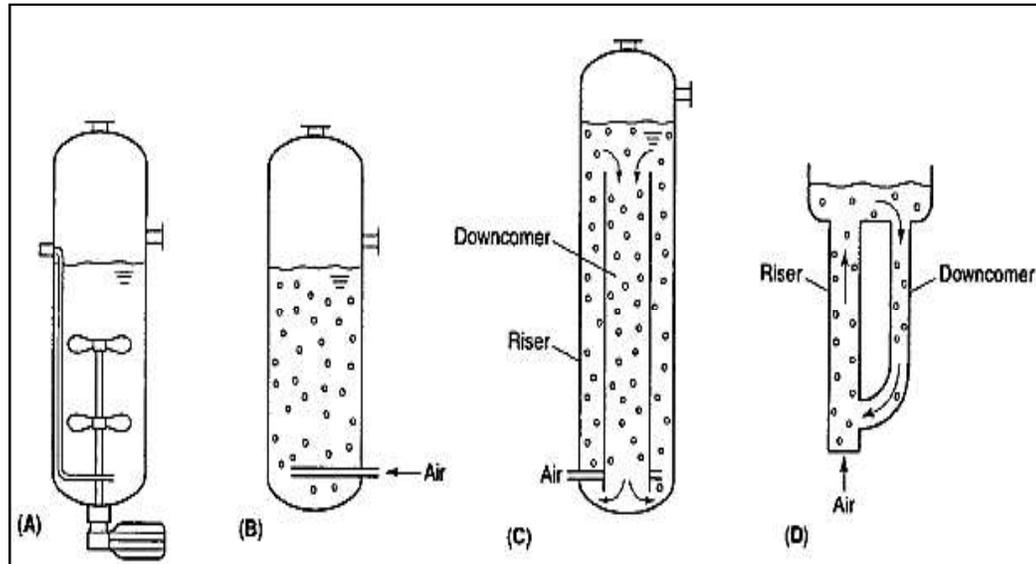


Figura 1.1. Biorreactores para la producción de biomasa en cultivo sumergido. (A) Tanque agitado (B) Columna burbujeadora (C) Air-lift (D) Air-lift con lazo externo (Doran, 1995, p. 336 - 337)

Entre las ventajas que se pueden mencionar al usar un biorreactor tipo tanque agitado se encuentran la alta eficiencia de transferencia de oxígeno y la flexibilidad para trabajar con fluidos viscosos. No obstante, las desventajas se relacionan principalmente con el esfuerzo cortante y el calor generados por la acción mecánica del sistema de agitación que pueden afectar la morfología del microorganismo (Huang y McDonald, 2009, p. 175).

Otro tipo de biorreactor es la columna burbujeadora que constituye un tanque cilíndrico con una relación altura-diámetro de 4 a 6 donde el aire que ingresa por el fondo impulsado por aspersores, se comprime y simultáneamente proporciona agitación al medio (Chisti, 1999, p. 668). Dada la configuración de la columna burbujeadora, la homogenización del medio y la transferencia de oxígeno dependen principalmente de la velocidad del aire y las propiedades reológicas del medio.

A pesar de que estos biorreactores se consideran funcionales para el tratamiento biológico de aguas residuales porque los costos de operación son bajos y la generación de calor y esfuerzos cortantes es nula, son escasamente utilizados (especialmente para medios altamente viscosos) porque la eficiencia de

transferencia de oxígeno es baja y la formación de espuma es elevada si se trabaja con velocidades de aire superiores a 0,1 m/s (Huang y McDonald, 2009, p. 175; Ratledge y Kristiansen, 2006, p. 166).

Finalmente, es importante mencionar los biorreactores aereolevados o air-lift que presentan una configuración similar a las columnas burbujeadoras con la adición de un tubo central de succión en el que se encuentra el aspersor y que tiene el objetivo de controlar la circulación de aire en el medio de cultivo (Williams, 2002, p. 39). La disposición del tubo de succión divide al biorreactor en dos zonas, la de aspersión conocida como la zona ascendente y la descendente en la que no existe circulación de aire. En algunos casos, las zonas están aisladas mediante dos tuberías interconectadas externamente dando origen a una variación de este tipo de biorreactor que se denomina air-lift con lazo externo (Ratledge y Kristiansen, 2006, p. 167).

Energéticamente este tipo de biorreactores son más eficientes que el tipo tanque agitado, y además su capacidad de transferencia de oxígeno es superior a la de las columnas burbujeadoras, por esta razón son ampliamente usados para cultivos sensibles a los esfuerzos cortantes. Sin embargo, la formación de espuma bajo condiciones extremas de flujo de aire constituye el principal inconveniente de estos biorreactores (Huang y McDonald, 2009, p.175).

1.1.1.2 Modalidad de operación

Los biorreactores en los que se desarrolla la producción de biomasa pueden operar en distintas modalidades ya sea lotes o batch y continua, en cada caso las implicaciones de operación y los rendimientos varían debido a que los parámetros cinéticos del crecimiento microbiano se ven afectados.

En los procesos por lotes, la primera fase es la esterilización tanto del medio de cultivo como del biorreactor, para posteriormente realizar la inoculación del microorganismo. Durante el periodo de reacciones dinámicas subsiguientes, las

concentraciones de sustrato y células varían con el tiempo, mientras el volumen de operación permanece constante y la viscosidad del medio varía en función de la velocidad de propagación celular (Chisti, 1999, p. 664).

El control predictivo sobre la fase de crecimiento exponencial celular en la modalidad de operación por lotes –mediante la regulación de la concentración inicial en el inóculo, la formulación del sustrato y las condiciones de operación como agitación, aireación y temperatura– constituye el beneficio más importante, ya que asegura rendimientos elevados y reduce el riesgo de contaminación o mutación celular debido a periodos cortos de crecimiento microbiano (Williams, 2002, p. 37).

Por otra parte, en los procesos continuos el medio de cultivo previamente esterilizado ingresa al biorreactor, mientras que el producto se descarga de manera continua, por lo tanto, el volumen podría variar con el tiempo siempre que los flujos de carga y descarga sean diferentes. Generalmente, los procesos continuos inician como un proceso por lotes hasta alcanzar una concentración de masa microbiana determinada, y en otros casos una parte del producto se recircula con la finalidad de mejorar el rendimiento (Chisti, 1999, p. 664).

Cuando se trabaja en un biorreactor continuo perfectamente agitado conocido por sus siglas en inglés como un biorreactor CSTR, el factor de dilución –que es la relación entre el flujo de descarga y el volumen de operación– debe ser tal que permita que el microorganismo crezca a una velocidad específica menor que la máxima, para que no ocurra el fenómeno de lavado del biorreactor, donde el tiempo de residencia es insuficiente para que exista propagación celular (Chisti, 1999, p. 664).

La calidad y homogeneidad del producto obtenido en los procesos continuos es la principal ventaja. No obstante, al contrario de los procesos por lotes, los riesgos de contaminación y mutación celular son elevados debido a los cortos periodos de crecimiento microbiano (Williams, 2002, p. 38).

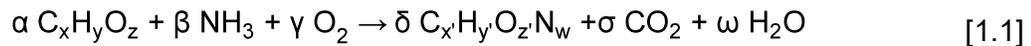
1.1.2 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA

Como se ha descrito anteriormente el tipo de biorreactor y la modalidad de operación influyen en la cinética de la producción de biomasa por lo tanto es importante el estudio de los modelos y parámetros cinéticos involucrados en el proceso.

1.1.2.1 Estequiometría de la producción de biomasa

En la producción de biomasa, la relación que existe entre la estequiometria de la reacción biológica y la cinética del proceso está basada en que la concentración de reactivo limitante, que en este caso constituye la fuente de carbono, influye en la cantidad de masa microbiana obtenida al final del proceso y en consecuencia en la tasa de crecimiento microbiano (Blanch y Clark, 1996, p. 164-165).

Para poder plantear la reacción estequiométrica, es necesario establecer – por convención– que la biomasa está compuesta por los elementos fundamentales carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, de manera que en la ecuación [1.1] se presenta la reacción general resultante para la obtención de masa celular a partir de los nutrientes que conforman el medio de cultivo (Quintero, 1981, p. 225).



Donde:

$C_xH_yO_z$: fuente de carbono generalmente carbohidrato

$C_xH_yO_zN_w$: composición de la masa celular formada

La estequiometria de la reacción contiene además información respecto a los coeficientes de rendimiento en el proceso, que relacionan la cantidad de masa microbiana formada por unidad de sustrato consumido por las células. Para el diseño de un proceso biotecnológico, es necesario conocer estos coeficientes

porque permiten formular de manera adecuada la composición del sustrato que suplirá de los nutrientes requeridos por el microorganismo en las cantidades óptimas (Blanch y Clark, 1996, p. 173). El coeficiente de rendimiento de la fuente de carbono es el parámetro más relevante para el análisis cinético del proceso y se simboliza en la mayor parte de la bibliografía como $Y_{x/s}$.

A partir de los conceptos preliminares, es posible deducir que el coeficiente de rendimiento de la fuente de carbono es igual a la relación entre los coeficientes estequiométricos correspondientes a la masa celular (δ) y a la fuente de carbono (α). Por lo tanto, si se considera la ley de velocidades en una reacción, es factible establecer la relación entre la velocidad de consumo de sustrato y la velocidad de propagación de masa celular mediante la ecuación 1.2 (Fogler, 2001, p. 79).

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} \quad [1.2]$$

Donde:

$\frac{dS}{dt}$: velocidad de consumo de sustrato

$\frac{dX}{dt}$: velocidad de propagación de masa celular

1.1.2.2 Velocidad específica de crecimiento

Al igual que en cualquier reacción química, en el caso de la producción de biomasa –que anteriormente se ha explicado constituye una reacción biológica autocatalítica– la velocidad específica de crecimiento microbiano (μ) es el parámetro cinético de mayor influencia en el proceso.

La velocidad específica de crecimiento es la máxima tasa a la cual el microorganismo se propaga durante la fase de crecimiento exponencial, luego del periodo de adaptación, cuando la cantidad de sustrato disponible se encuentra en exceso. Este parámetro cinético, se mantiene constante siempre que las condiciones del medio no se alteren, por lo tanto, cambia por efecto de la temperatura, pH y las condiciones de operación como la velocidad de agitación y flujo de aire (Stanbury et al., 1995, p. 27). En la Tabla 1.1 se presentan valores de velocidad específica de crecimiento para algunos microorganismos comunes en la industria.

Tabla 1.1. Valores referenciales de velocidad específica de crecimiento para diferentes microorganismos en cultivo sumergido por lotes

Microorganismo	Velocidad específica de crecimiento [h ⁻¹]	Sustrato
<i>Aspergillus nidulans</i> ¹	0,148	Glucosa
<i>Penicillium chrysogenum</i> ¹	0,123	Glucosa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ²	0,10 - 0,35	Sacarosa
<i>Vibrio natriegens</i> ³	4,24	Glucosa

¹ Trinci, 1969

² Arroyo, Orlic, Querol, Barrio, 2009

³ Eagon, 1961

1.1.2.3 Modelos cinéticos para la producción de biomasa

Los modelos cinéticos son expresiones matemáticas que describen el crecimiento microbiano en función de parámetros como la velocidad específica de crecimiento, concentración máxima de microorganismo, rendimiento de la fuente de carbono, entre otros.

Desde el punto de vista del comportamiento microbiano en un proceso biotecnológico, los modelos cinéticos se pueden clasificar en estructurados y no estructurados. Son estructurados cuando se consideran variaciones a nivel intracelular, es decir en la composición bioquímica, de manera que la biomasa se subdivide en componentes como ADN, ARN, proteínas, entre otros y se presentan un grupo de reacciones entre estos componentes y el medio externo. Por otra parte,

los modelos no estructurados son expresiones simplificadas que describen a la biomasa como una entidad no segregada en solución que interactúa con el medio externo (Blanch y Clark, 1996, p. 181). En la Tabla 1.2 se resumen algunos modelos cinéticos propuestos por diferentes autores.

Tabla 1.2. Modelos cinéticos no estructurados para la producción de biomasa

Nombre	Expresión del modelo	Ecuación
Modelo exponencial	$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$	[1.3]
Modelo de Monod	$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \cdot \frac{S}{K_S + S}$	[1.4]
Modelo logístico	$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)$	[1.5]
Modelo de Luedekin y Piret	$\frac{dX}{dt} = X \cdot (\mu - h \cdot P)$	[1.6]

(Jakymec, Morán, Páez, Ferrer, Mármol y Ramones, 2001, p. 55)

Los modelos cinéticos no estructurados con mayor aplicación en el ámbito de procesos biotecnológicos son el exponencial, el de Monod y el logístico cuyos perfiles cinéticos característicos para una modalidad de operación por lotes se presenta en la Figura 1.2.

El modelo de crecimiento exponencial es uno de los primeros postulados de la cinética microbiana que describe el crecimiento celular como una reacción de primer orden, bajo condiciones no restrictivas, es decir, concentraciones de los componentes esenciales estequiométricamente establecidas, ausencia de inhibidores, mezcla perfecta y condiciones de temperatura y pH inalterables (Panikov, 2002, p. 1 527).

Inicialmente, este modelo solo se aplicaba en casos de reproducción celular simétrica. Sin embargo, de acuerdo a ensayos experimentales realizados entre los años 1930 y 1960 se demostró que este modelo es aplicable para cualquier organismo procariota o eucariota exclusivamente en la fase de crecimiento exponencial y no en los periodos de adaptación o decrecimiento de la velocidad (Panikov, 2002, p. 1 528).

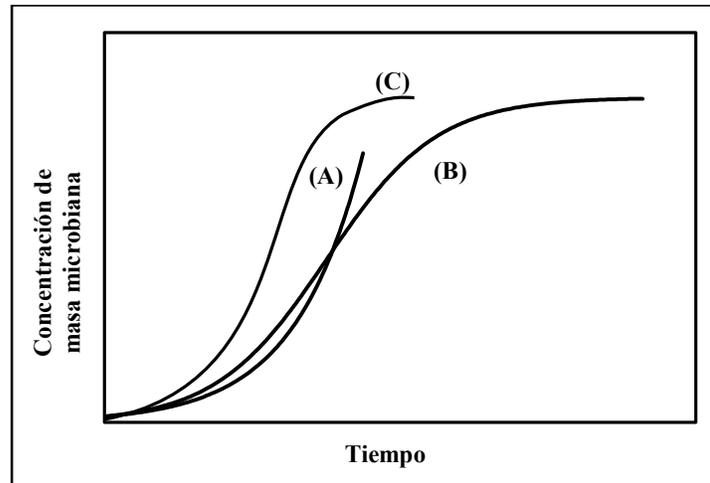


Figura 1.2. Perfiles cinéticos característicos de los modelos (A) exponencial (B) logístico y (C) Monod para la modalidad de operación por lotes (Trejos, Alzate y Gómez, 2008 p. 117; La Motta, 1976, p. 1030)

El modelo de Monod es un postulado importante en la cinética microbiana debido a que fue el primer modelo en el que el estudio teórico basado en cálculos matemáticos se impuso antes que los resultados obtenidos en los ensayos experimentales. Este modelo –a diferencia del exponencial– considera la dependencia de la velocidad específica de crecimiento con la concentración de sustrato limitante, donde además se presenta un nuevo parámetro denominado la constante de saturación (K_s) que es propio de cada microorganismo y de la naturaleza de la fuente de carbono (Panikov, 2002, p. 1 529).

Este modelo es usado como base para el desarrollo de la teoría del quimiostato, con el objetivo de predecir el comportamiento del crecimiento microbiano en modalidades de operación continua y semi-lotes (Panikov, 2002, p. 1 529).

Los principales inconvenientes de los modelos exponencial y de Monod, es su falta de aplicación para procesos por lotes durante todo el tiempo de operación, es decir, no solamente en la fase de crecimiento exponencial. Por lo tanto, se ha desarrollado un modelo que describe la cinética de crecimiento microbiano a lo largo de los periodos de adaptación, crecimiento y decline hasta llegar al estado estacionario, este es el modelo logístico (La Motta, 1976, p. 1 029).

El modelo logístico es aprovechado en procesos ecológicos para el manejo de residuos biológicos y para la producción de biomasa ya que considera la velocidad específica de crecimiento y la concentración máxima de microorganismo que está asociada con la concentración inicial de sustrato, y con el factor de rendimiento de la fuente de carbono (La Motta, 1976, p. 1 029).

Como ejemplo, en la fermentación láctica bacteriana, la producción de biomasa se ajusta muy bien al modelo logístico en tanto que la producción de ácido láctico se ve mejor representada por el modelo de Luedekin y Piret (Jakymec, 2001, p. 59).

1.1.3 CONDICIONES DE OPERACIÓN

En la producción de biomasa las condiciones de operación cumplen un papel importante porque afectan directamente parámetros cinéticos de crecimiento microbiano y por consiguiente se convierten en variables manipuladas para el control del proceso y su rendimiento (Ccopa, Yamakawa, Herrera, Geraldo, Carlos Rossell, Maciel, Bonomi, 2013, p. 1369).

1.1.3.1 Temperatura

La temperatura es la condición de operación de mayor influencia en la producción de biomasa porque afecta significativamente y de forma directa la velocidad específica de crecimiento, relación que -al igual que en las reacciones químicas- se manifiesta mediante la expresión de Arrhenius. Particularmente, en el caso de procesos biotecnológicos los cambios de temperatura producen variaciones en las configuraciones de las proteínas y constituyentes de la membrana celular. Por esta razón, aunque un aumento de temperatura de 10 °C podría generar un incremento de hasta 3 veces la velocidad específica de crecimiento, no es posible operar a temperaturas mayores a 50 °C porque se provocaría la denaturación (ruptura de la estructura) de las proteínas y lípidos, y por consiguiente se dañaría permanentemente la masa microbiana (Doran, 1995, p. 282).

En este contexto, estudios realizados por Arroyo et al. (2009), demuestran que para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la velocidad específica de crecimiento varía linealmente desde $0,1 \text{ h}^{-1}$ hasta $0,6 \text{ h}^{-1}$ en un sustrato de glucosa y fructosa (1:1), la temperatura se hizo variar desde $13,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $34,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, el pH se mantuvo fijo en 3,5 (p. 124).

1.1.3.2 pH

El pH tiene un efecto marcado sobre la velocidad específica de crecimiento, ya que mientras permanece invariable entre 1 a 2 unidades este parámetro cinético se mantiene en su valor óptimo, pero si el pH se desplaza la velocidad específica disminuye drásticamente. Este comportamiento en los procesos biotecnológicos está relacionado con la influencia de esta condición de operación en la estructura de las proteínas y componentes de la membrana celular (Doran, 1995, p. 283, 298).

Así, por ejemplo, estudios realizados por Arroyo et al. (2009), demuestran que para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la velocidad específica de crecimiento varía desde $0,1 \text{ h}^{-1}$ hasta $0,35 \text{ h}^{-1}$ con un aumento de pH desde 2,2 hasta 3,6. Cuando el pH aumenta hasta 4,6 la velocidad permanece prácticamente inalterable en $0,3 \text{ h}^{-1}$ (p. 124).

A pesar de que la temperatura y el pH son las condiciones de operación más relevantes en todos los procesos biotecnológicos, en procesos fermentativos aeróbicos -como es el caso de la producción de biomasa- la transferencia de oxígeno es un fenómeno trascendental cuya eficiencia depende de otras condiciones de operación que son la velocidad de agitación y el flujo de aire, que son tópicos que serán tratados con mayor detalle en las próximas secciones.

1.2 TRANSFERENCIA DE MASA EN BIOPROCESOS

En cualquier proceso la transferencia de masa se produce en mezclas donde la concentración de sus componentes es diferente, de manera que éste gradiente –al igual que en la transferencia de calor o de cantidad de movimiento– se convierte en la fuerza motriz del fenómeno. Particularmente en los bioprocesos, la importancia de la transferencia de materia se ve reflejada en sistemas líquido-sólido cuando contienen agregados y flóculos, donde los nutrientes deben ser transportados desde la fase líquida a la sólida; y también en sistemas gas-líquido cuando en procesos fermentativos aeróbicos el oxígeno debe pasar desde la burbuja de aire hacia el medio de cultivo (Doran, 1995, p. 199).

En general, en procesos biotecnológicos el transporte de materia entre fases se realiza básicamente mediante dos mecanismos: la difusión molecular y la transferencia de masa por convección.

1.2.1 DIFUSIÓN MOLECULAR

La difusión molecular es el mecanismo de transferencia de materia que se produce exclusivamente por el movimiento de las moléculas que conforman el sistema impulsadas por el gradiente de concentraciones, sin factores externos que puedan influir sobre la velocidad global de transferencia. Por lo tanto, en la difusión molecular la velocidad depende del área disponible para la transferencia de masa y del coeficiente de difusividad, que es propio de cada componente, y que para el caso de gases depende no solo de la temperatura sino también de la presión de operación (Doran, 1995, p. 200).

La difusividad en los líquidos varía con la concentración de la solución, y mayoritariamente tiene valores menores que en los gases, así por ejemplo la difusividad del oxígeno en agua es $2,5 \times 10^{-9} m^2 \cdot s^{-1}$ y en aire es $1,78 \times 10^{-5} m^2 \cdot s^{-1}$ evaluadas a la misma temperatura de 25 °C (Perry, 1997, pp. 2·329 - 2·332).

1.2.2 TRANSFERENCIA DE MASA POR CONVECCIÓN

En este mecanismo de transferencia, además del movimiento molecular debido al gradiente de concentraciones, se produce movimiento en el seno del fluido por acción mecánica, que incrementa directamente la velocidad global de transferencia de masa (Doran, 1995, p. 202). La velocidad de transferencia es directamente proporcional a la fuerza impulsora y al área disponible, de acuerdo a la ecuación de Fick que se presenta a continuación.

$$N_A = k \cdot A \cdot (C_{A0} - C_A) \quad [1.7]$$

Donde:

- N_A : velocidad global de transferencia de masa ($\text{kgmol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$)
 k, A : coeficiente de transferencia de masa ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) y área de transferencia (m^2) respectivamente
 C_{A0}, C_A : concentración inicial y final del componente transferido respectivamente ($\text{kgmol} \cdot \text{m}^{-3}$)

El coeficiente de transferencia de materia depende de la velocidad del fluido, la geometría del sistema y de las propiedades de los fluidos involucrados especialmente la viscosidad y la difusividad (Doran, 1995, p. 203).

1.2.3 TRANSFERENCIA DE OXÍGENO EN CULTIVOS MICROBIANOS

En sistemas donde se producen reacciones biológicas como en la producción de biomasa, el transporte de oxígeno a través de la interfase gas-líquido es trascendental porque si es lento, la velocidad de propagación celular es alterada y la velocidad de transferencia de oxígeno se convierte en una limitante (Doran, 1995, p. 199).

1.2.3.1 Demanda de oxígeno

Como se ha explicado, la masa microbiana demanda cierta cantidad de oxígeno en los procesos aeróbicos para el metabolismo celular y consecuentemente para su propagación. Sin embargo, al igual que los nutrientes que forman parte del medio de cultivo se encuentran en solución, el microorganismo es capaz de captar únicamente el oxígeno que se encuentra disuelto en el medio (Stanbury et al., 1995, p. 243).

A pesar de que el oxígeno es 6 000 veces menos soluble en agua que en soluciones de carbohidratos como glucosa y sacarosa, esta solubilidad alcanza un valor de 10 ppm a temperatura y presión ambiente, que rápidamente es consumida por la masa microbiana y por consiguiente requiere constante renovación. El flujo de oxígeno que se debe suplir para cumplir con la demanda es función de la concentración de microorganismo, que como se explicó en la cinética varía con el tiempo. A medida que la concentración de oxígeno disuelto aumenta, la tasa específica de absorción de oxígeno por parte del microorganismo es mayor, hasta que la concentración de oxígeno disuelto alcanza su valor crítico luego de la cual la tasa de absorción permanece constante. Por esta razón, el flujo de aire que ingrese al biorreactor para la producción de biomasa deberá garantizar operar con una concentración de oxígeno disuelto igual o mucho mayor a la crítica, porque adicionalmente se ha comprobado que por debajo de ésta la vía metabólica del microorganismo se modifica y se genera la producción de metabolitos no deseados como el etanol (Stanbury et al., 1995, pp. 243 - 245).

1.2.3.2 Transporte de oxígeno desde la burbuja

Para trabajar a una concentración de oxígeno disuelto mayor a la crítica en la producción de biomasa, las moléculas de oxígeno deben superar resistencias a su transporte desde la burbuja de aire hacia el medio de cultivo y posteriormente al interior de la célula. Estas resistencias se esquematizan en la Figura 1.3 y se pueden resumir en tres etapas principales: (1) Transporte desde la burbuja al medio

de cultivo que incluye la transferencia desde el interior de la burbuja hasta la interfase gas-líquido, difusión a través de la película líquida relativamente inmóvil que rodea la burbuja y transporte a través del seno del líquido. (2) Transferencia del oxígeno disuelto en el medio hacia la célula microbiana que se refiere a la difusión a través de la película líquida que rodea a la célula, y finalmente (3) la absorción de oxígeno por parte de la célula que involucra el transporte desde el medio hasta la interfase líquido-sólido y el transporte a través del citoplasma celular hacia el sitio de reacción (García, Ochoa y Gómez, 2009, p. 155-156).

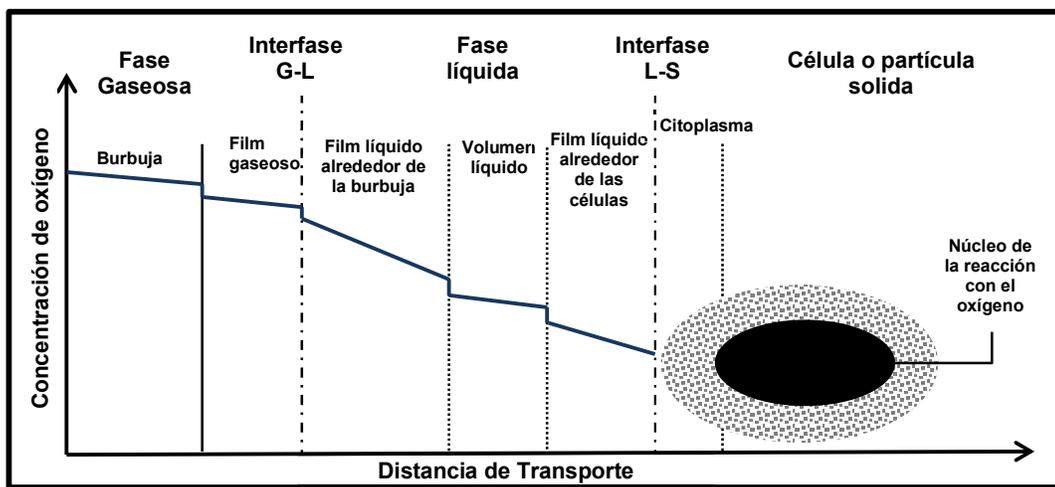


Figura 1.3 Resistencias para el transporte de oxígeno desde la burbuja hacia el medio de cultivo y al interior de la célula

La influencia de cada etapa en la transferencia de oxígeno depende mayoritariamente de la composición y propiedades reológicas del medio, del grado de mezcla y del tamaño de burbujas (Doran, 1995, p. 209).

En el caso de medios de cultivo con propiedades reológicas propias de un fluido newtoniano, la etapa limitante constituye la transferencia de oxígeno desde la burbuja de aire hacia el medio de cultivo, dentro de la cual las resistencias que se pueden considerar despreciables son los films alrededor de la interfase gas-líquido, y el transporte a través del fluido porque en mezcla perfecta los gradientes de concentración son mínimos. Sin embargo, el transporte a través de la película líquida que rodea la burbuja es la resistencia más relevante debido a la baja solubilidad del oxígeno en líquidos, de manera que esta etapa controla la velocidad

global de transferencia de oxígeno en el proceso que se puede describir mediante la ecuación 1.4, donde se considera un coeficiente volumétrico de transferencia (Stanbury et al., 1995, p. 247).

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a \cdot (C_L^* - C_L) \quad [1.8]$$

Donde:

$k_L a$: coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (s^{-1})

C_L^* : concentración de saturación de oxígeno disuelto (mg/L)

C_L : concentración de oxígeno disuelto (mg/L)

1.2.4 COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

Desde la perspectiva de la transferencia de masa, este coeficiente volumétrico representa la suma de las resistencias relevantes en el fenómeno de transporte de oxígeno desde la burbuja al medio de cultivo. Se puede tomar como una medida de la capacidad de aireación que tiene un biorreactor, mientras más alto sea el $k_L a$ mayor eficiencia presenta el sistema mecánico (Stanbury et al., 1995, p. 247).

Cuando se trata de un biorreactor tipo tanque agitado, como es el caso de estudio en este trabajo, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno depende de factores como la escala, la reología del sistema y sustancias antiespumantes, pero los factores de mayor influencia son la velocidad de agitación expresada como potencia de agitación por unidad de volumen, y el flujo de aire expresado como velocidad superficial de aireación, cuya relación se puede manifestar de acuerdo a la ecuación [1.9] que corresponde a la ecuación general de Cooper (Badino, Facciotti y Schmidell, 2001, p. 111)

$$k_L a = C \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^\alpha \cdot (V_s)^\beta \quad [1.9]$$

Donde:

$k_L a$: coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (s^{-1})

$\frac{P}{V}$: potencia de agitación con aireación por unidad de volumen (W/m^3)

V_S : velocidad superficial de aire (m/s)

C, α, β : coeficientes propios del sistema

La ecuación anterior ha sido ampliamente utilizada, desde 1944, para cultivos microbianos siempre que tengan un comportamiento newtoniano, donde los coeficientes C, α y β son parámetros que varían significativamente de un sistema a otro porque dependen de la geometría y configuración del sistema y del rango de variables de operación empleadas para los ensayos experimentales, (Badino et al., 2001, p. 111).

1.2.4.1 Potencia de agitación por unidad de volumen

La potencia disipada por el sistema de agitación en los biorreactores tanque agitado es la cantidad de energía requerida para obtener los efectos de mezcla deseados en el proceso, que son la homogenización del medio de cultivo y la eficiencia de la transferencia de oxígeno. La potencia de agitación depende principalmente del tipo de agitador, pero también de la configuración del sistema que involucra el número de agitadores y su disposición a lo largo del biorreactor (Piero y Chang, 1998, p. 284).

Es imperioso establecer una relación entre la potencia de agitación y la velocidad de agitación, que es la condición de operación y que se convierte en una variable manipulada para el proceso, esta relación está dada por los números adimensionales de potencia (N_P) y Reynolds (N_{RE}) como se observa en la Figura 1.4.

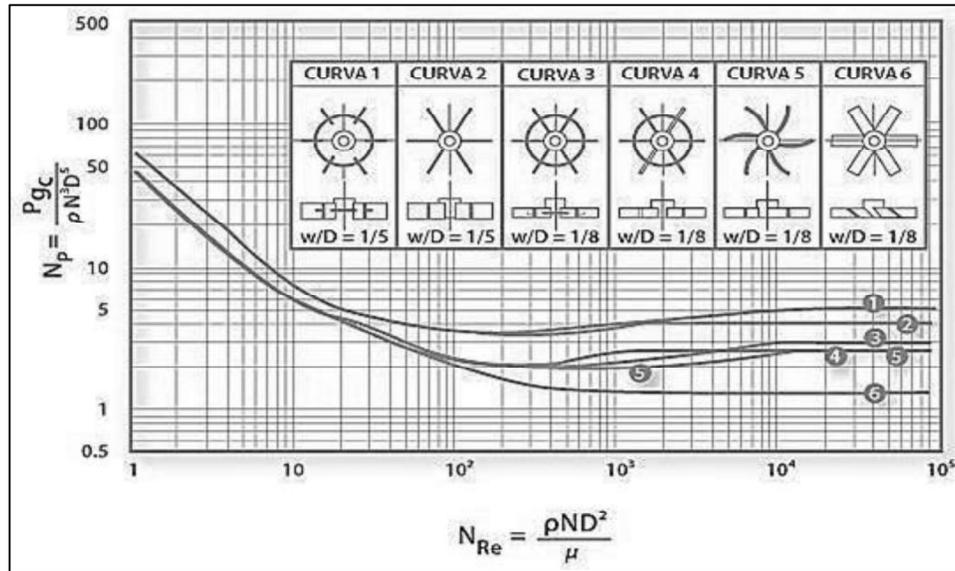


Figura 1.4. Número de potencia en función del número de Reynolds para sistemas agitados y con diferentes tipos de agitador (Towler y Sinnott, 2007, p. 618)

En función del tipo de agitador se puede constatar que para números de Reynolds mayores a 10^4 el número de potencia es constante, y para el caso de agitadores tipo disco turbina de Rushton es igual a 5. Bajo estas condiciones, la potencia de agitación pierde dependencia con la viscosidad y se asegura que el sistema opere dentro de régimen turbulento (Stanbury et al., 1995, pp. 258 - 259).

Para garantizar que el sistema tenga un comportamiento lo más próximo a una mezcla perfecta es necesario trabajar en régimen turbulento. Sin embargo, cuando se trata de sistemas no newtonianos alcanzar esta condición es complicado, y en otros casos el microorganismo presenta alta sensibilidad a los esfuerzos cortantes por lo que no es factible aplicar velocidades de agitación elevadas (Doran, 1995, p. 143 - 158).

1.2.4.2 Velocidad superficial de aire

La velocidad superficial de aire constituye un promedio de las velocidades de ascenso de las burbujas a través del aspersor de aire. Matemáticamente se calcula

como la relación entre el flujo de aire y el área transversal del biorreactor. Este parámetro está influenciado por el tipo de aspersion (tipo poroso, de tubería perforada, y de tobera) puesto que la caída de presión es diferente debido al diámetro del orificio, que además incide en la formación de la burbuja (Kantarci, Borak y Ulgen, 2005, p. 2270 - 2274).

La combinación adecuada de velocidad de agitación y flujo de aire es importante debido a que disminuye la probabilidad de coalescencia entre burbujas y los efectos de inundación del sistema en la etapa de dispersión del gas, que básicamente es la ruptura de las burbujas por acción del agitador (Doran, 1995, p. 213).

El fenómeno de inundación es la condición en la cual el patrón de mezcla en el biorreactor está dominado por el flujo de aire en lugar de la velocidad de agitación, esto ocurre cuando el flujo de aire es tan bajo que las burbujas pasan directamente a la superficie del líquido sin ser dispersadas (Stanbury et al., 1995, p. 179).

1.3 MODELACIÓN Y SIMULACIÓN DE BIOPROCESOS

En los procesos biotecnológicos tanto las condiciones de operación como los factores externos del medio y su interacción afectan significativamente al sistema microbiano. El desarrollo de modelos matemáticos y la simulación por ordenador son herramientas que permiten predecir el comportamiento de dichos procesos de acuerdo a cambios en estas condiciones. Como resultado, realizar el diseño e inclusive la optimización del proceso, será una tarea menos costosa en términos de dinero y tiempo (Ribas y García, 2011, p. 38).

1.3.1 MODELO DE UN SISTEMA

Un modelo es la representación simplificada de un sistema bajo análisis, que está conformado por un conjunto de supuestos concernientes a la operación del sistema. Estos supuestos se expresan en forma de relaciones matemáticas, lógicas o simbólicas entre las variables relevantes para el estudio y de manera general, se plantean en forma simple para que requieran de métodos matemáticos tan conocidos como el cálculo diferencial para su resolución (Banks, Marietta y Georgia, 1999, p. 3,11).

La confiabilidad del modelo matemático de un sistema depende de la correcta estimación de parámetros y del diseño dinámico de experimentos que permiten realizar una validación satisfactoria, es decir, que los resultados obtenidos del modelo se apegan con certeza al comportamiento real del sistema. Por esta razón, el desarrollo del modelo matemático es considerado como un ciclo que empieza con el planteamiento de la finalidad del modelo y mediante el conocimiento teórico o empírico del proceso termina con la implantación de una estructura a partir de datos preliminares e hipótesis iniciales (Rodríguez, 2006, p. 4-5).

1.3.2 TIPOS DE MODELOS

La implantación de la estructura del modelo para su posterior implementación y validación, se refiere a la selección del tipo de modelo que se ajusta al proceso biotecnológico, que incluye la determinación de las relaciones funcionales entre variables. La mayoría de modelos que describen el comportamiento de sistemas biológicos se distinguen por tener un carácter no lineal y dinámico, que involucran ecuaciones deterministas que se evalúan en función del tiempo (Rodríguez, 2006, p. 5, 8). Bajo esta concepción, cada tipo de modelo tiene sus características particulares, que se detallarán en las secciones siguientes.

1.3.2.1 Modelos estocásticos, empíricos y deterministas

Un modelo estocástico es aquel que representa un sistema que funciona principalmente bajo el azar y la probabilidad puesto que las leyes conocidas de causa-efecto no explican cómo actúa dicho sistema de forma determinista, son utilizados –por ejemplo– en la *teoría de filas* para modelar el tráfico vehicular o el tráfico de información en una red, donde no es posible conocer con certeza los flujos del sistema y solamente se conoce las posibles variaciones de dichos flujos. Se dice que un modelo es empírico cuando caracteriza un sistema en función de las variables que lo afectan, mas no obedece directamente las leyes de causa-efecto, por ejemplo, los modelos utilizados para estimar de coeficientes de transferencia de calor y materia a través de números adimensionales. Los modelos deterministas son aquellos que obedecen las leyes de causa-efecto, generalmente se observan estos modelos en sistemas macroscópicos, por ejemplo, la segunda ley de Newton (Urquia, 2000, p. 2).

1.3.2.2 Modelos dinámicos y estáticos

Se dice que un modelo es estático cuando existe dependencia directa e instantánea entre las variables y están descritos por ecuaciones algebraicas sencillas, como un balance de materiales de un sistema en estado estacionario. Los modelos dinámicos están descritos por ecuaciones diferenciales, y la relación entre las variables no está determinada por una influencia directa, si no que depende de la “historia” del sistema, es decir de las condiciones de borde, como lo sería la descripción matemática del proceso de llenado de un tanque (Urquia, 2000, p. 2).

1.3.2.3 Modelos de tiempo continuo y discreto

Se entiende como modelo de tiempo continuo a aquella expresión cuyas variables están definidas de manera continua en el tiempo, generalmente están expresados a través de ecuaciones diferenciales, por ejemplo, la ley de velocidad de un proceso de reacción. Un modelo de tiempo discreto expresa la dependencia de las variables en un instante de muestreo determinado, por ejemplo, la expresión de la presión de

un reactor como función de la temperatura y concentración de los reactantes (Urquia, 2000, p. 3).

1.3.2.4 Modelos de parámetros agrupados y de parámetros distribuidos

Estos modelos están definidos estrictamente al tipo de ecuación que los describe. Los modelos de parámetros agrupados están expresados mediante ecuaciones diferenciales ordinarias, y los modelos de parámetros distribuidos están descritos mediante ecuaciones diferenciales en derivadas parciales (Urquia, 2000, p. 2).

1.3.3 SIMULACIÓN DE PROCESOS

La simulación de un proceso es la imitación de la operación y comportamiento de un sistema real bajo condiciones hipotéticas, y es una herramienta ampliamente usada y aceptada para estudios a nivel mundial debido a que permite la resolución de los modelos matemáticos mediante su organización dentro de un algoritmo gracias a la disponibilidad de lenguajes de programación y la innovación tecnológica en el hardware de los ordenadores (Banks et al., 1999, p. 2).

Al tener presentes estos elementos, no se debe pensar en la modelación matemática como una meta, sino como una premisa obligatoria para alcanzar la simulación, que además es útil también si se desea alterar variables que en el sistema real no están accesibles o por otra parte no pueden ser modificadas en el rango deseado. Con un modelo matemático apropiado se hace posible practicar con condiciones de operación extremas que difícilmente se pueden llevar a cabo en el proceso real (Banks et al., 1999, p. 12-16).

2 METODOLOGÍA

La creación del programa de simulación para el diseño del proceso de producción por lotes de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se realizó en dos etapas. La primera, fue la formulación del modelo matemático a través de la aplicación de ecuaciones propuestas en bibliografía y de la experimentación del proceso de fermentación en tres escalas diferentes. En la segunda etapa, se diseñó el algoritmo de simulación y se implementó sobre la plataforma Microsoft Visual Studio 2010 bajo el lenguaje Basic.

Para determinar la confiabilidad del modelo matemático desarrollado e implementado en el programa de simulación, se realizó una comparación de resultados que consistió en el análisis de la desviación porcentual de los resultados obtenidos a partir de dicho modelo respecto a los valores experimentales.

2.1 FORMULACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

Para la formulación del modelo matemático se escogió un conjunto de ecuaciones que permitan determinar la variación de la concentración de levadura contra el tiempo, a partir de:

- Volumen de producción (V).
- Las condiciones de operación (velocidad de agitación (N) y flujo de aire (V_s))
- Las concentraciones iniciales de levadura (X_0) y sustrato (S_0).

Dichas ecuaciones se seleccionaron desde diversas fuentes bibliográficas que han realizado estudios similares al que se analiza en este trabajo. Una vez establecido el grupo de ecuaciones principales, se establecieron las ecuaciones secundarias que permiten determinar las variables intermedias y que completan el modelo.

A partir del volumen de producción se determinan las dimensiones del reactor en función de las relaciones estándar, luego se determina la dependencia del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno con la agitación, la aireación y la escala del proceso.

$$k_L a = f(V, N, V_s) \quad [2.1]$$

Después, debido a la variación de μ con $k_L a$, se determinó una relación de dependencia entre estas variables a partir de los datos experimentales generados en este trabajo.

$$\mu = f(k_L a) \quad [2.2]$$

Finalmente, se determinó la variación de la concentración de levadura con el tiempo como una función de la velocidad específica del crecimiento microbiano y las concentraciones de sustrato y levadura:

$$\frac{dX}{dt} = f(\mu, S, X) \quad [2.3]$$

Donde:

- X: concentración de levadura (g/L)
- S: concentración de la fuente de carbono o sustrato (g/L)
- μ : velocidad específica de crecimiento microbiano (s^{-1})

2.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL MODELO Y DEFINICIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

Para la determinación de los parámetros del modelo matemático se realizaron pruebas experimentales de crecimiento microbiano ejecutadas en tres fermentadores que operan por lotes y bajo diversas condiciones de operación.

2.2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Los ensayos de producción de biomasa se llevaron a cabo en tres biorreactores de 2, 17 y 150 L, todos construidos en acero inoxidable 304, marca Acindec los dos primeros y Biolafitte el último. Todos los biorreactores tienen las mismas proporciones geométricas, son del tipo tanque agitado, enchaquetados. Cada uno de ellos está constituido por cuatro deflectores, un sistema de agitación múltiple de tres agitadores tipo disco turbina de Rushton con cuatro paletas, y un sistema de aspersión de aire del tipo tubería perforada con disposición en cruz ubicado en el fondo del biorreactor. Las equivalencias geométricas se presentan en las Figura 2.1 y Figura 2.2 (Quintero, 1981, p. 91-93).

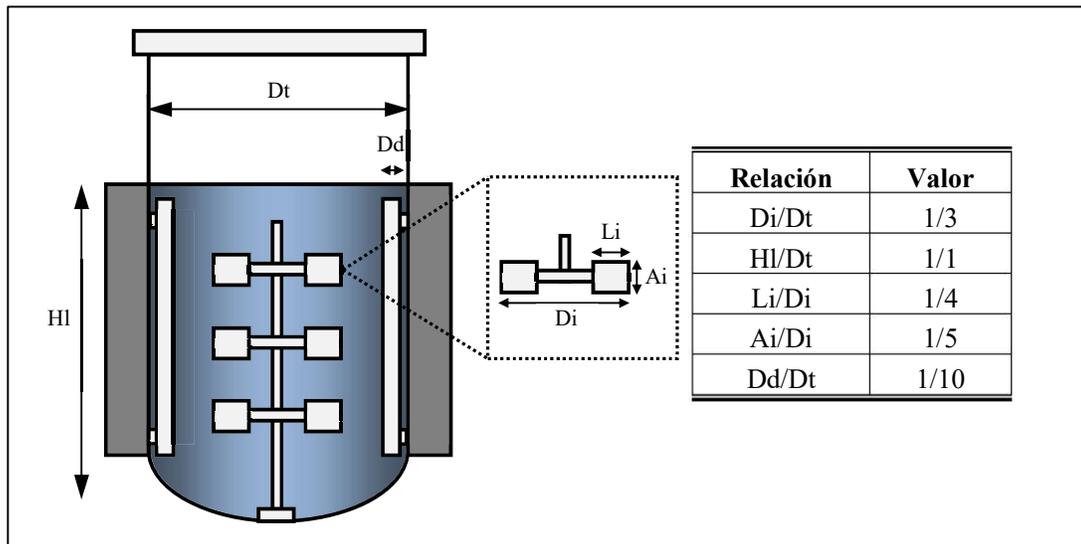


Figura 2.1. Equivalencias geométricas estándar para el dimensionamiento de biorreactores tipo tanque agitado

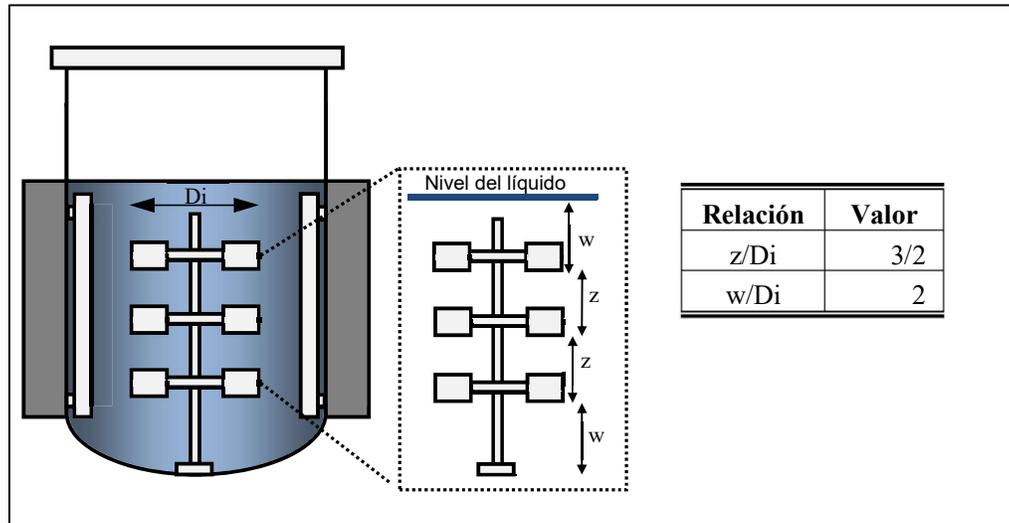


Figura 2.2. Equivalencias geométricas estándar para la disposición de los agitadores en biorreactores tipo tanque agitado

2.2.1.1 Parámetros de operación

En cada uno de los ensayos realizados en los biorreactores se establecieron diferentes condiciones de operación referidas a velocidad de agitación y flujo de aire, de acuerdo al diseño experimental factorial mixto 4 x 2. Este diseño experimental incluyó cuatro niveles para la velocidad de agitación, dos niveles para el flujo de aire y tres repeticiones de cada experimento. Las combinaciones para cada biorreactor se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 2.1. Combinaciones del diseño experimental factorial mixto

Condición de Operación	Biorreactor 150 L	Biorreactor 17 L	Biorreactor 2 L
Velocidad de agitación [rpm]	200	400	550
	300	500	650
	400	600	750
	500	700	820
Flujo de aire [L/min]	24,0	9,5	2,5
	47,0	15,2	3,5

Los rangos de velocidades de agitación se escogieron de manera que garanticen la operación en todos los casos dentro de régimen turbulento, y los rangos de flujo de aire se seleccionaron en función del límite operacional de los equipos disponibles tanto compresores como rotámetros.

El microorganismo utilizado en los experimentos fue la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* marca Levapan en presentación comercial de 250 gramos con una humedad promedio de 8% en base húmeda. Se preparó una solución madre de levadura con una concentración de 2,5%. Para las pruebas se inoculó la solución madre en una cantidad igual al 5% del volumen de operación. La composición del sustrato se estableció de acuerdo a la formulación propuesta por Wickerham (1986) que se presenta en la Tabla 2.2 (Prescott y Dunn, 1962, p. 50). Esta composición se mantuvo constante para todos los ensayos y fue la misma tanto para la fermentación como para la incubación de la solución madre.

Tabla 2.2. Composición del sustrato para los ensayos de producción de biomasa

Sustancia	Concentración
Sacarosa	2,0 % p/p
Sulfato de amonio	1,0 g/L
Cloruro de sodio	0,3 g/L
Sulfato de Cobre	3,0 ppm
Sulfato de Manganeso	3,0 ppm
Sulfato de Zinc	3,0 ppm
Extracto de carne	0,6 g/L

Los ensayos de producción de biomasa se iniciaron previa la esterilización del sustrato a 121°C durante 20 minutos. En el caso del biorreactor de 150 L la esterilización se realizó in situ mientras que en los biorreactores de 2 L y 17 L se llevó a cabo en autoclaves semiautomáticos New Brunswick modelo AE15-10. La inoculación de la solución madre se realizó previa la incubación del microorganismo durante 4 horas en baño termostático agitado a 150 rpm y 30°C. En todos los experimentos se mantuvo constante la temperatura en 30°C y el pH en 4,5 parámetros satisfactorios para el crecimiento de levadura de panificación

(Manovacía et al., 2008). Cada experimento duró 11 horas a partir de la inoculación en el biorreactor.

2.2.1.2 Variables medidas

Durante cada una de las fermentaciones se monitorizó cada hora, la concentración de oxígeno disuelto con un electrodo polarográfico marca Mettler Ingold, modelo InPro 6800 y la concentración de levadura mediante la medición de la absorbancia en un cromatógrafo marca Genesys 20 modelo 4001 a una longitud de onda de 540 nm. previa la construcción de la curva de calibración (Manovacía et al., 2008).

La curva de calibración se realizó en dos partes, en la primera se llevó a cabo un proceso de secado de la levadura en su presentación comercial a 70°C durante 10 horas en una estufa marca Heraeus modelo UT6060. En la segunda parte se prepararon soluciones con la levadura seca a diferentes concentraciones 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 y 1 g/L. Como solvente se utilizó el sustrato antes descrito, y se midió la absorbancia de cada solución a 540 nm.

Con el fin de estimar la potencia consumida por el sistema, se midió en todos los experimentos la corriente eléctrica con una pinza amperimétrica marca Fluke modelo Y8100, y el voltaje con un multímetro marca Fluke con una precisión de $\pm 0,1$ V.

2.2.2 CÁLCULO DE VARIABLES DEL MODELO

2.2.2.1 Cálculo de la potencia consumida

La potencia de agitación consumida por el sistema se determinó como la diferencia entre la potencia eléctrica medida cuando el biorreactor opera vacío y la potencia eléctrica medida cuando el biorreactor opera cargado con el sustrato bajo las

mismas condiciones de velocidad de agitación y flujo de aire establecidas en cada experimento.

La potencia eléctrica se calculó a través de la ecuación:

$$P_{\text{eléctrica}} = I \cdot v \quad [2.4]$$

2.2.2.2 Cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

La determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno se realizó mediante el método dinámico de dos etapas propuesto por Taguchi y Humphrey en 1966 que consiste en suspender el flujo de aire que se inyecta al biorreactor y registrar la variación de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo, (Stanbury et al., 1995). Durante esta experiencia se mide directamente la concentración de oxígeno disuelto (C_L) mediante un electrodo polarográfico, y el tiempo transcurrido mediante un cronómetro. La tasa de cambio de la concentración de oxígeno se obtiene a partir del balance de masa en la fase líquida del sistema, y es la siguiente:

$$\frac{dC_L}{dt} = - Q_{O_2} \cdot X \quad [2.5]$$

Donde:

$\frac{dC_L}{dt}$: tasa de cambio de la concentración de oxígeno disuelto respecto al tiempo (mg/L)

Q_{O_2} : tasa específica de respiración microbiana (mg O_2 /g $_{\text{Levadura}}$)

X : concentración de microorganismo (g/L). Se considera constante durante la medición.

Con éste primer grupo de datos del método se obtuvo el término $Q_{O_2} \cdot X$, que representa la pendiente de la recta resultante de la integración de la ecuación [2.5].

Posteriormente, se restaura el flujo de aire, esto se hace antes de que la concentración de oxígeno descienda a 0,13 ppm que es la concentración crítica a la que la levadura se deteriora fisiológicamente. De la misma forma se registra la variación de la concentración de oxígeno con el tiempo. La ecuación obtenida a partir del balance de masa es:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a \cdot (C_L^* - C_L) - Q_{O_2} \cdot X \quad [2.6]$$

Donde:

$k_L a$: coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (s^{-1})

C_L^* : concentración de saturación de oxígeno disuelto (mg/L)

C_L : concentración de oxígeno disuelto (mg/L)

Y la variación de la concentración de oxígeno disuelto se verá como en la Figura 2.3.

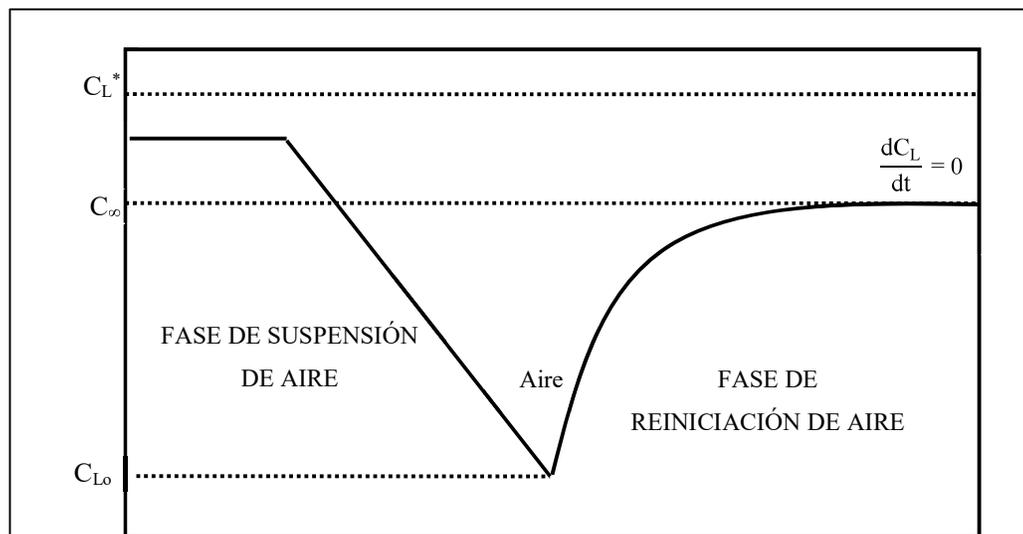


Figura 2.3. Esquema de la variación de la concentración de oxígeno disuelto durante la aplicación del método dinámico para la determinación del $k_L a$

Para determinar el $k_L a$ con el segundo grupo de datos se realizó un arreglo matemático de la ecuación [2.6] al considerar que cuando el tiempo tiende a infinito,

la variación de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo (dC_L/dt) es igual a cero. La ecuación [2.6] se puede reescribir como se muestra a continuación (Quintero, 1981, p. 287; García y Ochoa, 2009, p. 159).

$$C^\infty = C_L^* - \frac{Q_{O_2} \cdot X}{k_L a} \quad [2.7]$$

Donde:

C_L^∞ : concentración de oxígeno en el equilibrio

Si se reescribe la ecuación [2.6] y se integra, obtenemos:

$$k_L a \int_{C_{L1}}^{C_{L2}} \frac{dC_L}{\left(C_L^* - \frac{Q_{O_2} \cdot X}{k_L a}\right) - C_L} = \int_{t_1}^{t_2} dt \quad [2.8]$$

Al reemplazar [2.7] en [2.8], se obtiene la ecuación [2.9] cuya pendiente constituye el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno para cada uno de los experimentos.

$$\ln \left[\frac{C_\infty - C_L}{C_\infty - C_{L0}} \right] = k_L a \cdot t \quad [2.9]$$

Donde:

C_{L0} : concentración de oxígeno disuelto al inicio de la medición

C_∞ : concentración de oxígeno disuelto a tiempo infinito

t: tiempo de la medición a partir de que se reinició el flujo de aire

Por otra parte, la velocidad específica de crecimiento microbiano en la fase exponencial se determinó -para cada uno de los ensayos- mediante la linealización de los modelos de La Motta y Monod. La linealización del modelo de La Motta se

muestra en la ecuación [2.10] y se obtuvo a partir de la integración de la ecuación [1.4] en la cual μ_{\max} representa la pendiente de la recta y el punto de corte es cero. La linealización del modelo de Monod se consigue mediante la ecuación [2.11] donde $\frac{1}{t} \cdot \ln\left(\frac{S}{S_0}\right)$ se gráfica en función de $\left(\frac{1}{t} \cdot \ln\left[1 + \frac{Y_{X/S}}{X_0} \cdot (S_0 - S)\right]\right)$, la pendiente y el punto de corte están representados por los parámetros M y B que se expresan en las ecuaciones [2.12] y [2.13]. El valor de K_s es 1,35 g/L acorde a los resultados obtenidos en ensayos realizados con levadura de panificación en sustratos de naturaleza similar (Ramírez y Molina, 2005, p. 100; Duarte, 2000, p. 124).

$$\ln \left[\frac{X \cdot (X_m - X_0)}{X_0 \cdot (X_m - X)} \right] = \mu_{\max} \cdot t \quad [2.10]$$

$$M \cdot \frac{1}{t} \cdot \ln \left[1 + \frac{Y_{X/S}}{X_0} \cdot (S_0 - S) \right] - B = \frac{1}{t} \cdot \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) \quad [2.11]$$

$$M = \left[1 + \frac{X_0 + Y_{X/S} \cdot S_0}{Y_{X/S} \cdot k_s} \right] \quad [2.12]$$

$$B = \frac{\mu_{\max}}{k_s} \cdot (X_0 + Y_{X/S} \cdot S_0) \quad [2.13]$$

Donde:

X : concentración de microorganismo (g/L)

X_m : concentración máxima de microorganismo en el proceso (g/L)

X_0 : concentración inicial de microorganismo (g/L)

S: concentración de sustrato limitante (g/L)

S_0 : concentración inicial de sustrato limitante o fuente de carbono (g/L)

μ_{\max} : velocidad específica de crecimiento microbiano (s^{-1})

t : tiempo de operación (h)

$Y_{X/S}$: coeficiente de rendimiento de la fuente de carbono. Se considera constante e igual a 0,5 de acuerdo con

k_S : constante de saturación del modelo de Monod (g/L)

En la segunda fase del procesamiento de datos experimentales, a los valores de velocidad específica de crecimiento obtenidos tanto con el modelo logístico de La Motta como con el de Monod en función del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno se ajustaron tres regresiones: logarítmica del tipo $\mu_{\max} = a \cdot \ln(k_L a)$, potencial del tipo $\mu_{\max} = a \cdot k_L a^b$ y asintótica del tipo $\mu_{\max} = a + b/(k_L a + c)$; y se seleccionó como parte definitiva del modelo matemático la que presentó un mayor coeficiente de regresión R^2 .

Adicionalmente, a los valores de los coeficientes C , α y β pertenecientes al modelo de Cooper modificado se ajustaron regresiones logarítmica y potencial, y se seleccionaron las ecuaciones definitivas bajo el mismo criterio que en el caso anterior.

Todas las regresiones se desarrollaron con el programa PASW Statistic 18 y en cada caso se realizó conjuntamente el análisis de variación ANOVA.

2.3 IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

El modelo matemático que se aplicó para el desarrollo del algoritmo de simulación, se implementó en tres módulos bien definidos: el primero que permite el diseño del biorreactor a partir de relaciones de similitud geométrica y algunas condiciones de operación, el segundo que constituye la simulación del crecimiento microbiano y la influencia de las condiciones de operación en el proceso, y el tercero que corresponde a la optimización del proceso de producción de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3.1 MÓDULO I: DISEÑO DEL BIORREACTOR

En este módulo se incluyeron las equivalencias geométricas estándar para el diseño del reactor. El modulo opera a partir del volumen de operación que debe ingresar el usuario y devuelve las dimensiones del reactor, las dimensiones de los agitadores tipo turbina de Rushton y la distribución de estos a lo largo del eje.

2.3.2 MÓDULO II: SIMULACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA

En este módulo se implementó un algoritmo de simulación que mediante el conjunto de ecuaciones que conforman el modelo matemático y a partir de un paquete de datos que ingresa el usuario referidos a condiciones de operación y geometría del biorreactor, permite el cálculo de la velocidad específica de crecimiento microbiano y los perfiles cinéticos de crecimiento de levadura y consumo de sustrato bajo las condiciones del proceso establecidas por el usuario.

En este punto, en el programa de simulación se introdujeron dos alternativas para el usuario, la primera consiste en la modificación de las condiciones de operación para observar su influencia en la producción de biomasa, y la segunda involucra la activación del módulo para la optimización del proceso.

2.3.3 MÓDULO III: OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO

En este módulo se incluyó un algoritmo de simulación determina la velocidad de agitación y flujo de aire que permite conseguir la concentración máxima de levadura en el menor tiempo de fermentación posible.

2.4 COMPARACIÓN DE RESULTADOS

Para determinar la confiabilidad del modelo matemático formulado en este trabajo, se realizaron ensayos experimentales adicionales de producción de biomasa por lotes en los biorreactores de 17 y 150 L donde la composición del sustrato, la temperatura y el pH, se mantuvieron idénticos a los especificados en los ensayos para la determinación de parámetros del modelo.

Las condiciones de operación concernientes a velocidad de agitación y flujo de aire que se utilizaron corresponden a los valores medios dentro del rango propuesto en el diseño experimental factorial mixto descrito anteriormente. Estas combinaciones se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 2.3. Combinaciones de condiciones de operación empleados en los ensayos de comparación de resultados

Condición de operación	Biorreactor 150 L	Biorreactor 17 L
Velocidad de agitación [rpm]	450,0	550,0
Flujo de aire [L/min]	35,5	12,4

Los ensayos se ejecutaron durante 11 horas a partir de la inoculación, y en intervalos de una hora se monitorizaron la concentración de oxígeno disuelto y la concentración de levadura, y además se estimó la potencia de agitación consumida con los mismos equipos y métodos indicados en los apartados anteriores.

Usando los parámetros del modelo según se indica en la sección 2.2.2 se realizó una simulación en la que se comparó los resultados con los obtenidos en ésta parte. Finalmente, se determinó la desviación porcentual entre los datos experimentales y de simulación correspondientes a coeficiente de transferencia de oxígeno, velocidad específica de crecimiento microbiano y los perfiles cinéticos de crecimiento de levadura y consumo de sustrato.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 FORMULACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

El modelo matemático formulado para el diseño del proceso de producción por lotes de levadura *Saccharomyces cerevisiae* consta de 26 ecuaciones distribuidas en cuatro tópicos globales que forman parte de la ruta principal del programa de simulación. Dicho modelo permite determinar la variación de la concentración de levadura contra el tiempo, a partir de los datos que ingresa el usuario en el programa de simulación:

- Volumen de producción (V).
- Las condiciones de operación (velocidad de agitación (N) y flujo de aire (V_s))
- Las concentraciones iniciales de levadura (X_0) y sustrato (S_0).

Se describen a continuación las ecuaciones con las que se realizó la simulación

3.1.1 RELACIONES DE SIMILITUD GEOMÉTRICA ESTANDAR

Las relaciones de similitud geométrica estándar que se presentan en la Figura 3.1, son las ecuaciones que en función del volumen de operación, permiten al programa dimensionar un biorreactor tipo tanque agitado con cuatro deflectores y un sistema de agitación múltiple conformado por tres agitadores tipo disco turbina de cuatro paletas (Quintero, 1981, p. 91-93).

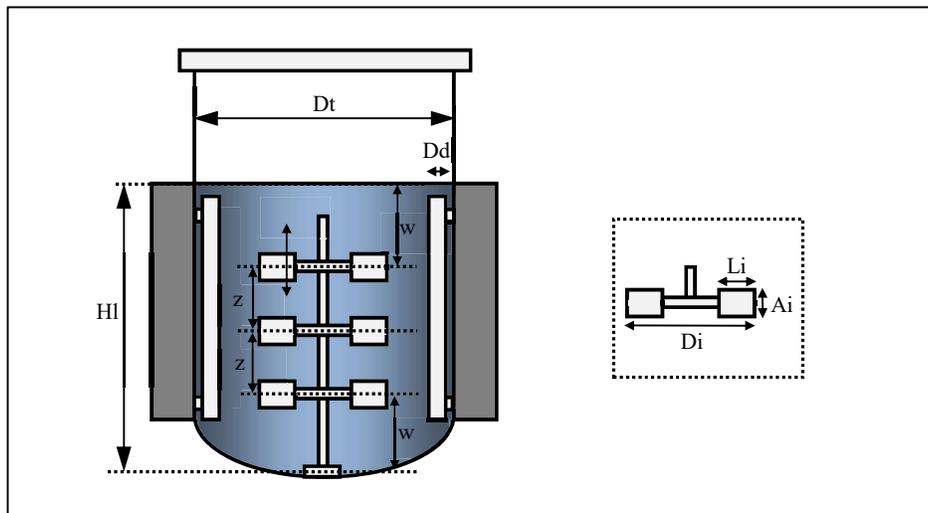


Figura 3.1. Relaciones de similitud geométrica estándar para el dimensionamiento de biorreactores tipo tanque agitado

Donde:

$$D_t = \sqrt[3]{\frac{V}{4\pi}} \quad [3.1]$$

$$H_l = D_t \quad [3.2]$$

$$D_i = \frac{1}{3} D_t \quad [3.3]$$

$$L_i = \frac{1}{4} D_i \quad [3.4]$$

$$A_i = \frac{1}{5} D_i \quad [3.5]$$

$$D_a = \frac{1}{10} D_t \quad [3.6]$$

$$z = \frac{3}{2} D_i \quad [3.7]$$

$$w = 2D_i \quad [3.8]$$

El dimensionamiento incluye la estimación del diámetro y altura del tanque, el diámetro, alto y ancho de las paletas del agitador y la disposición de los agitadores a lo largo del biorreactor.

3.1.2 CÁLCULO DEL COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

Se determinó la dependencia del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno con las condiciones de operación del proceso (velocidad de agitación y flujo de aire) y la escala del proceso, a través de una modificación a la ecuación propuesta por Cooper (ver ecuación original [1.9]).

Ecuación modificada:

$$k_L a = C \cdot \left(\frac{P}{V} + \frac{P}{V_{\min}} \right)^\alpha \cdot (V_S)^\beta \quad [3.9]$$

Donde:

$k_L a$: coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (s^{-1})

$\frac{P}{V}$: potencia de agitación consumida por un sistema con aireación por unidad de volumen (W/m^3)

V_S : velocidad superficial de aireación (m/s)

$\frac{P}{V_{\min}}$: potencia de agitación mínima consumida por un sistema con aireación por unidad de volumen (W/m^3)

C, α, β : parámetros que varían con la geometría y escala del proceso

La ecuación [3.9] es una variación de la ecuación original de Cooper, ya que en ésta se considera el término $\frac{P}{V_{\min}}$, y representa la potencia de agitación mínima que debe poseer el sistema para que ocurra la ruptura de las burbujas al impactar con

el agitador. Con esta modificación, es necesario hacer notar que el modelo es inválido para cualquier potencia de agitación por unidad de volumen menor a $\frac{P}{V_{\min}}$.

La velocidad superficial de aireación se estima como función del flujo de aire de la manera que se describe en la ecuación [3.10].

$$V_S = \frac{Q_A}{A_T} \quad [3.10]$$

Donde:

Q_A : flujo de aire (m^3/s)

A_T : área transversal del biorreactor (m^2)

Los coeficientes C , α y β son parámetros que varían con la geometría y escala del proceso. Sin embargo, debido a que cualquier escala del proceso trabaja con la misma distribución geométrica porque se aplican las relaciones estándar de similitud geométrica para el dimensionamiento del biorreactor, estos coeficientes se vuelven dependientes exclusivamente del volumen del biorreactor. Estos coeficientes se determinaron mediante el ajuste de ecuaciones fenomenológicas.

$$C = a_1 V^{b_1} \quad [3.11]$$

$$\alpha = a_2 V^{b_2} \quad [3.12]$$

$$\beta = a_3 V^{b_3} \quad [3.13]$$

3.1.2.1 Cálculo de la potencia de agitación

Para estimar la potencia de agitación de un sistema que posee aireación se utilizan la siguiente ecuación. (Gill, Appleton, Baganz y Lye, 2008, p. 1 149)

$$P = \frac{P_o}{\sqrt{1 + z \cdot \frac{V_s}{\sqrt{g \cdot D_t}}}} \quad [3.14]$$

Donde:

- P: potencia de agitación consumida por un sistema con aireación
- P_o: potencia de agitación consumida por un sistema sin aireación, se determina mediante la ecuación [3.15]
- z: factor de corrección en función del número de turbinas, 375 para un sistema de tres turbinas. (Piero y Chang, 1998, p. 285)
- g: aceleración gravitacional (9,8 m/s²)
- D_t: diámetro del tanque. Se determina a partir del volumen de operación que ingresa el usuario en conjunto con las relaciones geométricas del reactor.

Luego, la potencia de agitación consumida por un sistema desprovisto de aireación, se calcula mediante la siguiente ecuación.

$$P_o = N_p \cdot \rho_L \cdot N^3 \cdot D_i \quad [3.15]$$

Donde:

- P_o: potencia de agitación consumida por un sistema sin aireación
- N_p: número de potencia, se tomó un valor de 5 para un proceso que opera en régimen turbulento con agitadores tipo disco turbina, Figura 1.4.
- ρ_L: densidad del sustrato, para este trabajo se utiliza la densidad del agua, 1 000 kg/m³
- N: velocidad de agitación. Constituye un dato que ingresara el usuario a través de la interfaz
- D_i: diámetro del agitador. Se determina a partir del volumen de operación que ingresa el usuario en conjunto con las relaciones geométricas del reactor.

3.1.3 CORRELACIÓN ENTRE EL COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO Y LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Luego, se determinó la ecuación fenomenológica $\mu = f(k_L a)$, que relaciona la velocidad específica de crecimiento y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno. Se ajustaron ecuaciones exponenciales, logarítmicas e hiperbólicas.

$$\mu = a_4 (k_L a)^{b_4} \quad [3.16]$$

$$\mu = a_4 \ln(k_L a) + b_4 \quad [3.17]$$

$$\mu = a_5 + \frac{b_5}{k_L a + c_5} \quad [3.18]$$

3.1.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

La descripción de la variación de la concentración de levadura en función del tiempo se realiza mediante la ecuación [3.19] que corresponde al modelo logístico propuesto por La Motta en 1976 y la ecuación [3.20] que constituye el modelo de Monod propuesto en 1942 (que se presentaron en la Tabla 1.2). Se seleccionan estas dos ecuaciones porque son los modelos que mejor se ajustan a la cinética de crecimiento de levadura *Saccharomyces Cerevisiae* (Shafagha, Najafpour, Rezaei, y Sharifzadeh, 2010, p. 162; Ramírez y Molina, 2005, p. 92).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot X \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \quad [3.19]$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot X \cdot \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \quad [3.20]$$

Donde:

- $\frac{dX}{dt}$: variación de la concentración de levadura respecto al tiempo (g/L·s)
 μ_{\max} : velocidad específica máxima de crecimiento microbiano (s⁻¹)
X: concentración de levadura (g/L)
S: concentración de sustrato limitante (fuente de carbono) (g/L)
Ks: constante de saturación (1,35 g/L)

Se fijó la constante de saturación Ks en 1,35 g/L de acuerdo con los experimentos realizados por Ramírez y Molina (2005), donde se realizaron ensayos de fermentación.

3.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL MODELO

El modelo matemático formulado queda definido íntegramente con la introducción de parámetros y ecuaciones que no se pueden derivar de fuentes bibliográficas, sino que son el producto del procesamiento de datos experimentales y por consiguiente conforman la base para definir el alcance del programa de simulación para el proceso de producción por lotes de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2.1 PARÁMETROS DE LA EXPRESIÓN DE COOPER

- Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

La estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno es el punto de partida para el análisis de los parámetros de la expresión de Cooper que forma parte del modelo matemático. Por esta razón, se presentan ejemplos de los resultados obtenidos al aplicar el método dinámico de dos etapas de Taguchi y Humphrey para algunas combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire, en los diferentes reactores.

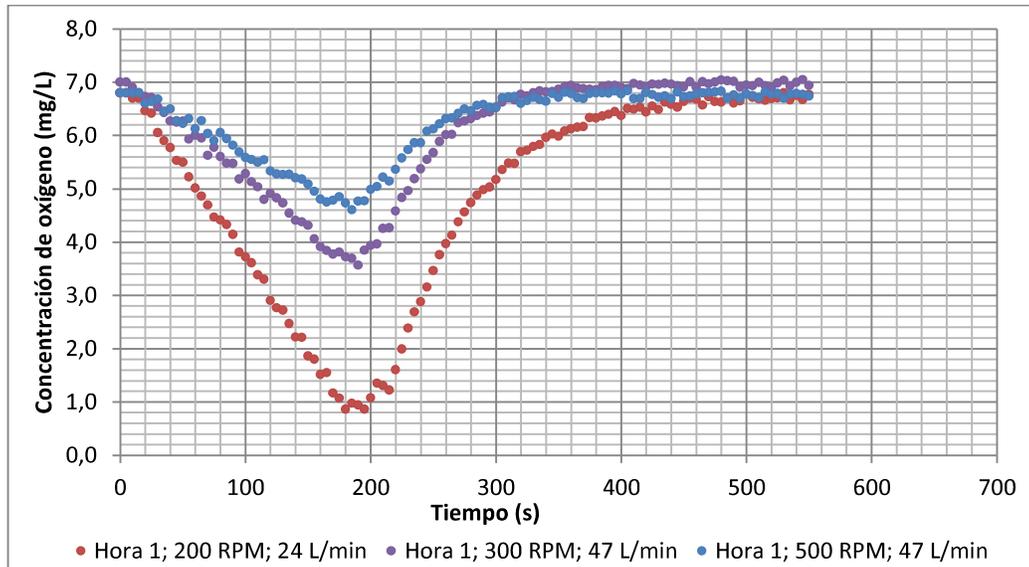


Figura 3.2. Variación de la concentración de oxígeno disuelto durante el método dinámico de Taguchi y Humphrey para el biorreactor de 150 L a diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire

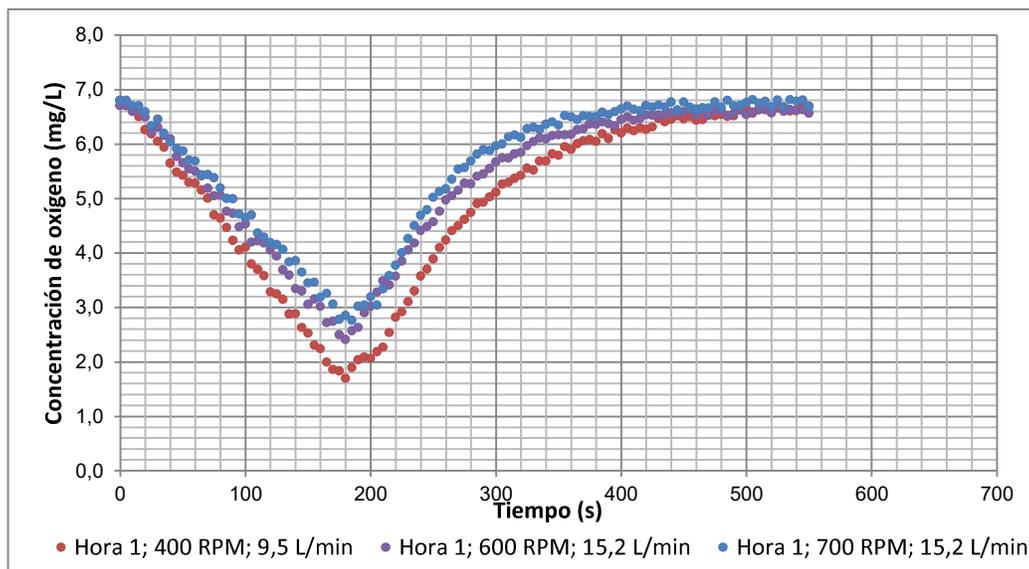


Figura 3.3. Variación de la concentración de oxígeno disuelto durante el método dinámico de Taguchi y Humphrey para el biorreactor de 17 L a diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire

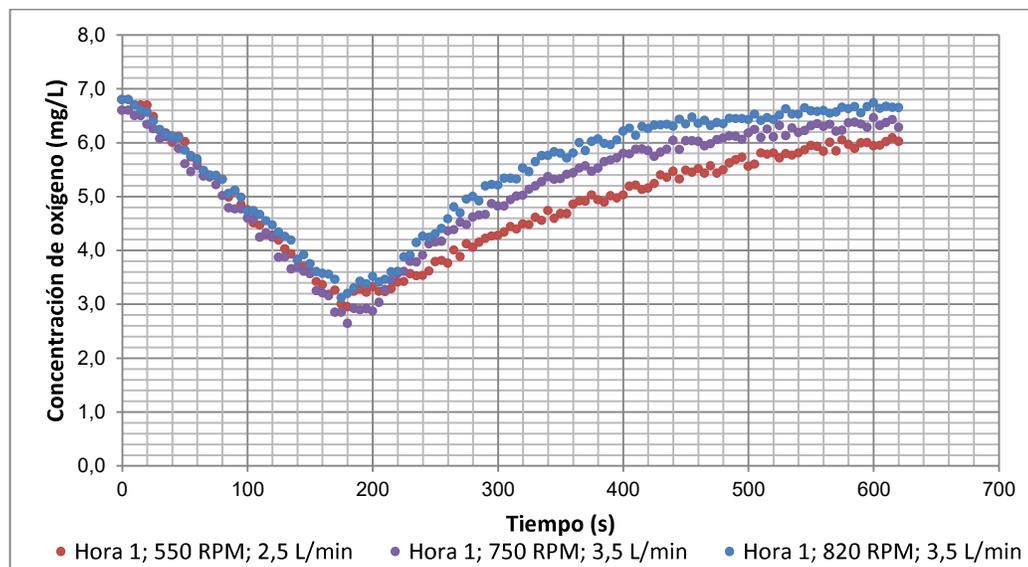


Figura 3.4. Variación de la concentración de oxígeno disuelto durante el método dinámico de Taguchi y Humphrey para el biorreactor de 2 L a diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire

Si se comparan los resultados obtenidos entre las tres escalas, se puede notar que el tiempo en que el sistema recupera la concentración de oxígeno de equilibrio, es menor para el reactor de 150L y menor para el reactor de 2L, esto se debe a la velocidad de transferencia de oxígeno, más adelante se observara esta velocidad es mayor para los reactores de mayor volumen.

Si se comparan los resultados de estos ensayos con los obtenidos por Taguchi y Humphrey, se puede observar que se ajustan correctamente a la teoría basada en balances de masa, excepto una pequeña desviación al inicio de la fase de restauración de la aireación que se debe probablemente a la inercia del sistema como consecuencia de la adaptación del microorganismo a un ambiente desprovisto de oxígeno producto de la fase previa donde se ha suspendido el suministro de aire.

Al aplicar la ecuación [2.9] al conjunto de datos correspondientes a la zona de restauración de aire se consiguió determinar el k_{LA} para cada combinación. En la Figura 3.5 se muestra como ejemplo la linealización de los datos correspondientes.

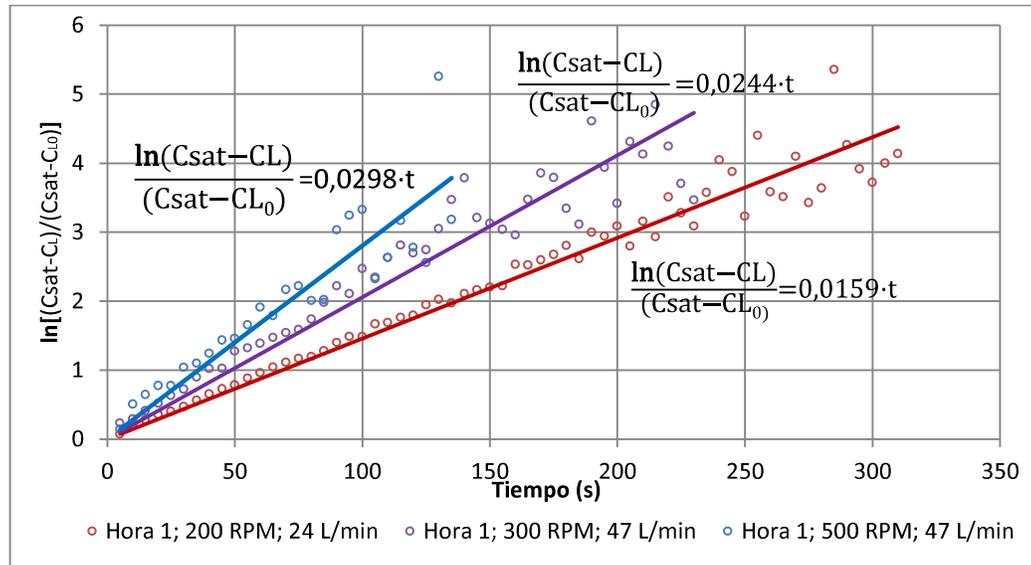


Figura 3.5. Linealización del método dinámico de Taguchi y Humphrey para el biorreactor de 150 L a diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire

El cálculo del $k_L a$ se realizó sobre todas las combinaciones, cada hora, y se obtuvieron un conjunto de datos de $k_L a$ desde los cuales se determinó el valor medio para cada combinación.

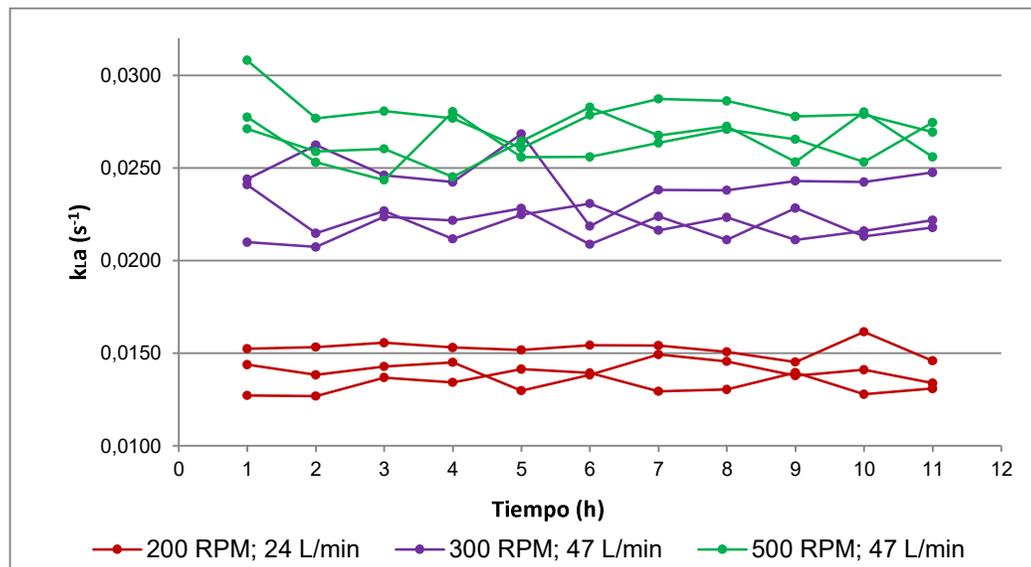


Figura 3.6. Ejemplo de la dispersión de datos de $k_L a$ obtenidos de la linealización para el biorreactor de 150L a diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire

Tabla 3.1. Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire en las escalas de 2, 17 y 150 L

Escala [L]	Flujo de aire [L/min]	Velocidad de agitación [rpm]	k_{La} PROMEDIO [s ⁻¹]
2	2,5	550	$5,24 \times 10^{-3} \pm 4,91 \times 10^{-4}$
		650	$6,32 \times 10^{-3} \pm 3,01 \times 10^{-4}$
		750	$7,43 \times 10^{-3} \pm 3,87 \times 10^{-4}$
		820	$7,98 \times 10^{-3} \pm 1,30 \times 10^{-4}$
	3,5	550	$4,94 \times 10^{-3} \pm 4,61 \times 10^{-4}$
		650	$6,57 \times 10^{-3} \pm 5,44 \times 10^{-4}$
		750	$8,06 \times 10^{-3} \pm 5,34 \times 10^{-4}$
		820	$8,20 \times 10^{-3} \pm 3,77 \times 10^{-4}$
17	9,5	400	$1,14 \times 10^{-2} \pm 1,01 \times 10^{-3}$
		500	$1,31 \times 10^{-2} \pm 1,85 \times 10^{-3}$
		600	$1,45 \times 10^{-2} \pm 9,04 \times 10^{-4}$
		700	$1,55 \times 10^{-2} \pm 1,12 \times 10^{-3}$
	15,2	400	$1,22 \times 10^{-2} \pm 1,66 \times 10^{-3}$
		500	$1,38 \times 10^{-2} \pm 1,19 \times 10^{-3}$
		600	$1,60 \times 10^{-2} \pm 1,25 \times 10^{-3}$
		700	$1,68 \times 10^{-2} \pm 8,37 \times 10^{-4}$
150	24,0	200	$1,43 \times 10^{-2} \pm 9,81 \times 10^{-4}$
		300	$2,14 \times 10^{-2} \pm 1,12 \times 10^{-3}$
		400	$2,30 \times 10^{-2} \pm 1,60 \times 10^{-3}$
		500	$2,76 \times 10^{-2} \pm 8,43 \times 10^{-4}$
	47,0	200	$1,71 \times 10^{-2} \pm 1,09 \times 10^{-3}$
		300	$2,63 \times 10^{-2} \pm 1,46 \times 10^{-3}$
		400	$2,79 \times 10^{-2} \pm 7,48 \times 10^{-4}$
		500	$2,82 \times 10^{-2} \pm 9,41 \times 10^{-4}$

- Determinación de la potencia de agitación

Un análisis más apropiado de los resultados tabulados se realiza mediante la visualización de la variación del k_{La} promedio con la potencia de agitación consumida por unidad de volumen en un sistema con aireación (k_{La} vs P/V) que se

muestra en la Figura 3.7. Para este efecto, se requiere presentar con anterioridad los valores medidos de potencia de agitación consumida y la desviación de éstos respecto a los calculados a partir de la ecuación [3.14].

Tabla 3.2. Potencias de agitación calculadas y medidas en el biorreactor de 2 L para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y velocidad superficial de aire

Velocidad de agitación [rpm]	Velocidad superficial de aire [m/s]	Potencia de agitación calculada [W]	Potencia de agitación medida [W]	Desviación porcentual
550	4,27E-03	0,15	0,18	15,94
650	4,27E-03	0,26	0,28	9,35
750	4,27E-03	0,39	0,44	11,73
820	4,27E-03	0,51	0,59	13,13
550	5,97E-03	0,14	0,16	10,78
650	5,97E-03	0,23	0,27	13,58
750	5,97E-03	0,35	0,40	11,00
820	5,97E-03	0,46	0,52	11,28

Tabla 3.3. Potencias de agitación calculadas y medidas en el biorreactor de 17 L para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y velocidad superficial de aire

Velocidad de agitación [rpm]	Velocidad superficial de aire [m/s]	Potencia de agitación calculada [W]	Potencia de agitación medida [W]	Desviación porcentual
400	4,17E-03	2,35	2,65	11,43
500	4,17E-03	4,58	5,23	12,30
600	4,17E-03	7,92	8,87	10,71
700	4,17E-03	12,58	13,98	10,02
400	7,04E-03	2,02	2,32	13,07
500	7,04E-03	3,94	4,67	15,72
600	7,04E-03	6,81	7,99	14,78
700	7,04E-03	10,81	12,03	10,14

Tabla 3.4. Potencias de agitación calculadas y medidas en el biorreactor de 150 L para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y velocidad superficial de aire

Velocidad de agitación [rpm]	Velocidad superficial de aire [m/s]	Potencia de agitación calculada [W]	Potencia de agitación medida [W]	Desviación porcentual
200	2,54E-03	13,18	15,07	12,54
300	2,54E-03	44,49	50,29	11,52
400	2,54E-03	105,47	121,36	13,10
500	2,54E-03	205,99	237,38	13,22
200	5,11E-03	11,50	13,20	12,90
300	5,11E-03	38,81	43,73	11,25
400	5,11E-03	92,00	101,80	9,63
500	5,11E-03	179,68	210,53	14,65

Debido a que para ninguno de los casos la desviación supera el 16%, la confiabilidad de utilizar ecuaciones para la estimación de la potencia de agitación como parte del modelo matemático es elevada.

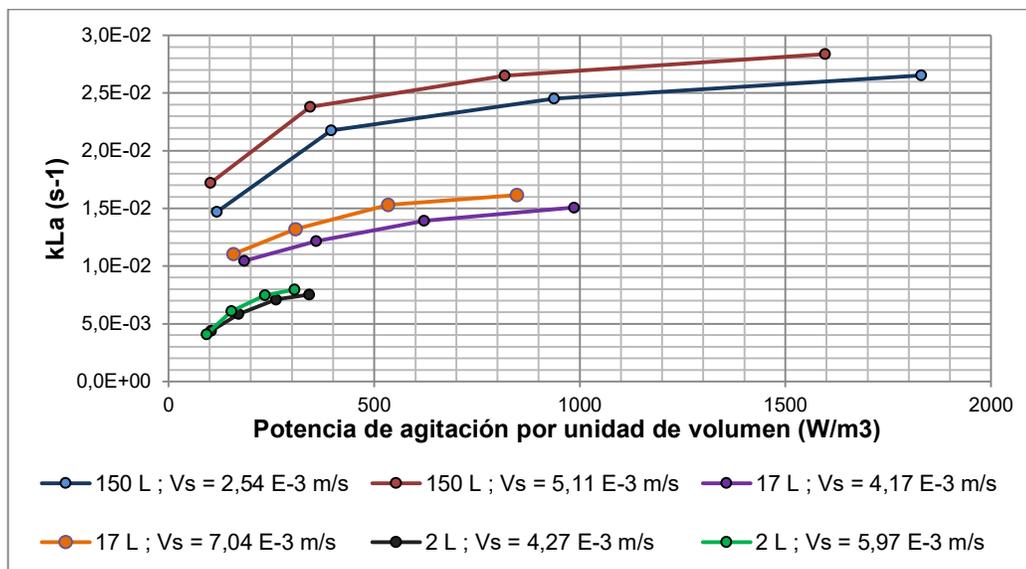


Figura 3.7. Variación del k_{La} con la potencia de agitación consumida por unidad de volumen para diferentes flujos de aire en los biorreactores de 2, 17 y 150 L

Para todas las escalas del proceso, la tendencia creciente del k_La a medida que la potencia de agitación por unidad de volumen y el flujo de aire aumentan se debe a que el área de transferencia de oxígeno se incrementa y las resistencias disminuyen por lo tanto la velocidad de transporte del oxígeno desde la burbuja de aire hacia el medio es mayor.

- Cálculo de los coeficientes C , α , β y P/V_{\min}

En este contexto, al realizar regresiones para el conjunto de datos en cada biorreactor ajustadas al modelo original de Cooper se obtienen los resultados que se presentan en la Figura 3.8, Figura 3.9 y Figura 3.10.

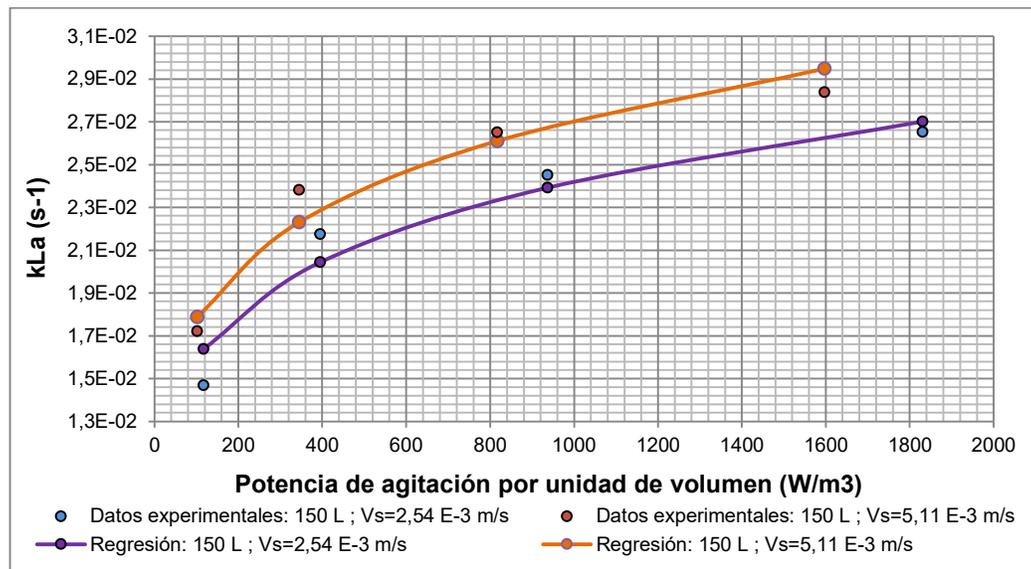


Figura 3.8. Modelo de Cooper original versus resultados experimentales en el biorreactor de 150 L

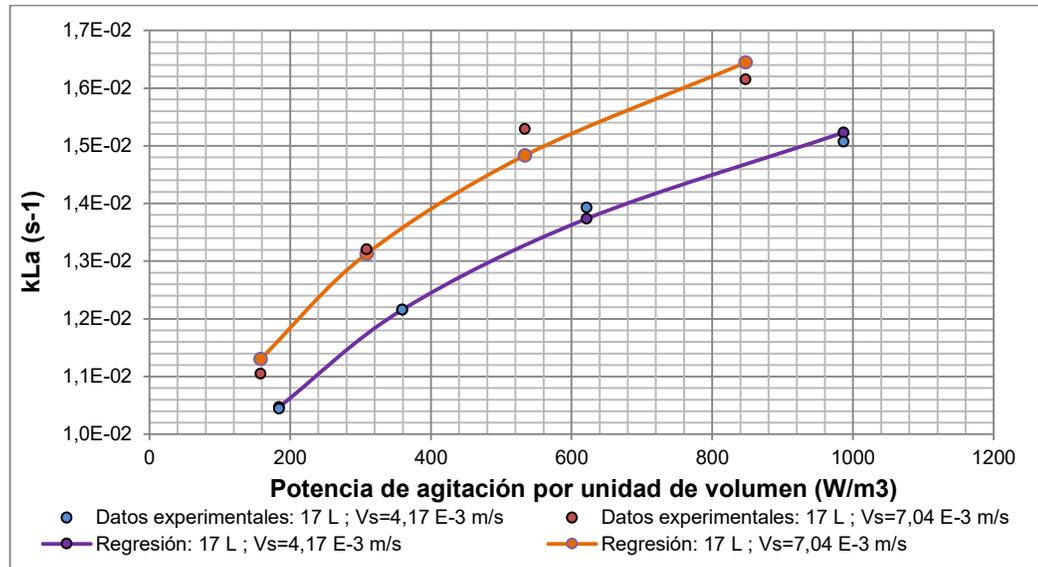


Figura 3.9. Modelo de Cooper original versus resultados experimentales en el biorreactor de 17 L

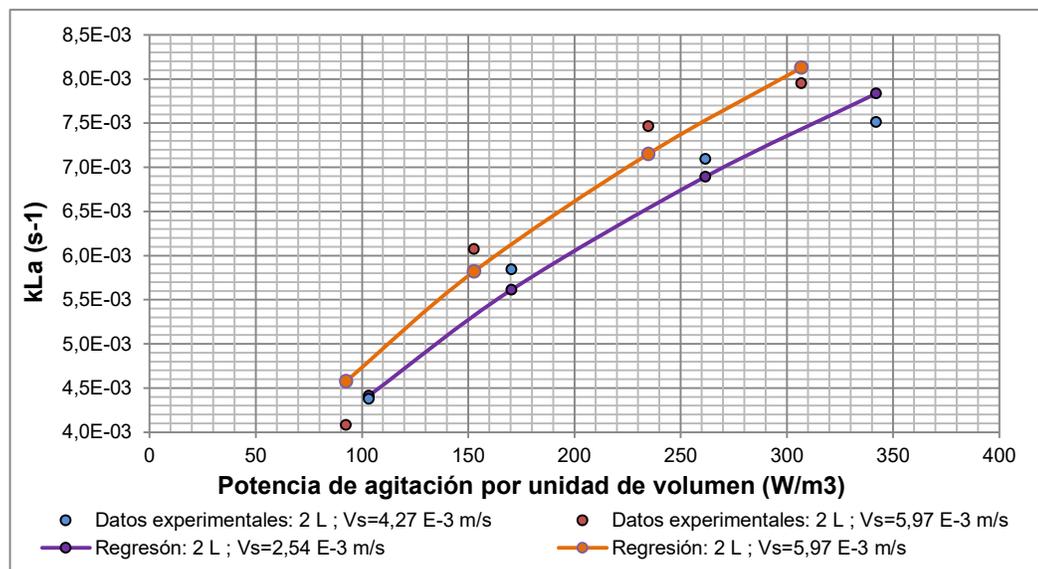


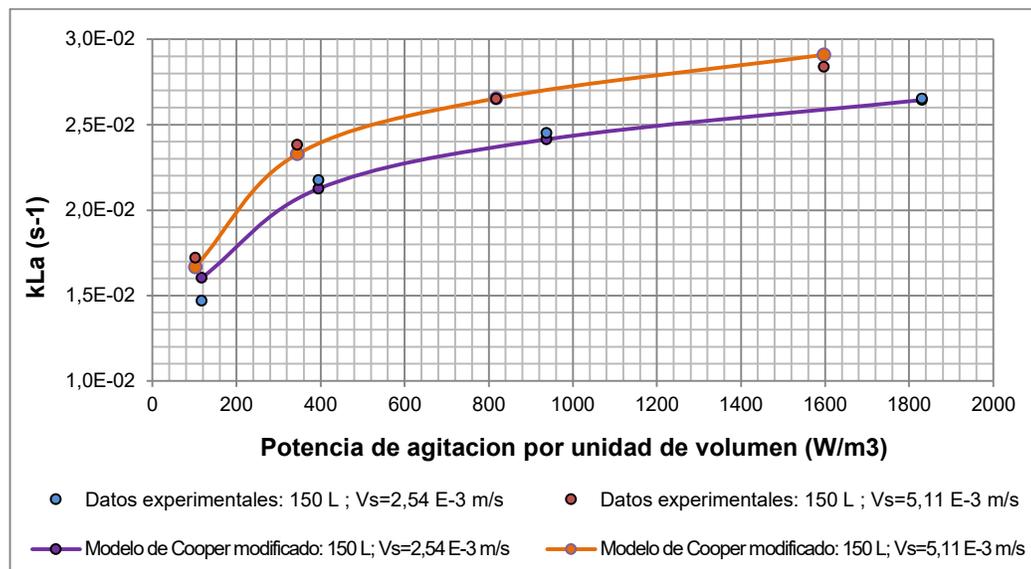
Figura 3.10. Modelo de Cooper original versus resultados experimentales en el biorreactor de 2 L

Los coeficientes C , α y β correspondientes al modelo de Cooper original expresado en la ecuación [1.9] para cada biorreactor se presentan en la Tabla 3.5 a continuación.

Tabla 3.5. Coeficientes del modelo de Cooper original para las escalas de 2, 17 y 150 L

Escala [L]	C	α	β	Coefficiente de regresión R ²
2	0,003	0,385	0,227	0,958
17	0,013	0,190	0,202	0,986
150	0,020	0,175	0,167	0,942

En las tres regresiones expuestas, aunque los coeficientes de regresión en todos los casos son superiores a 0,9 se presentan desviaciones puntuales considerables de los datos experimentales respecto al modelo de Cooper especialmente en valores bajos de k_La como se observa en los gráficos anteriores. Por esta razón, se efectúa un nuevo ajuste al modelo original donde se incluye la definición de potencia de agitación mínima consumida por unidad de volumen (P/V_{\min}) obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 3.11, Figura 3.12 y Figura 3.13.

**Figura 3.11.** Modelo de Cooper modificado versus resultados experimentales en el biorreactor de 150 L

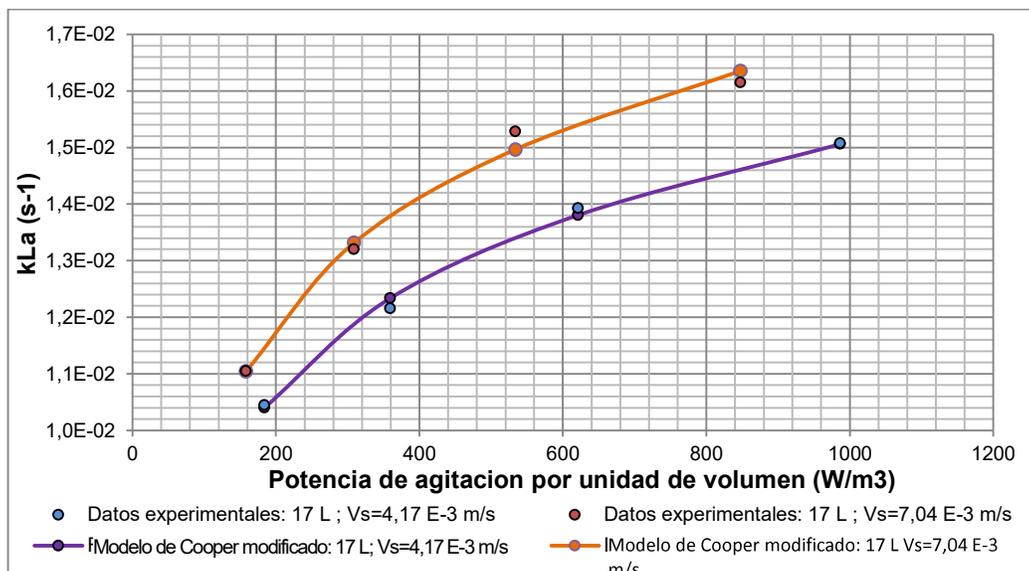


Figura 3.12. Modelo de Cooper modificado versus resultados experimentales en el biorreactor de 17 L

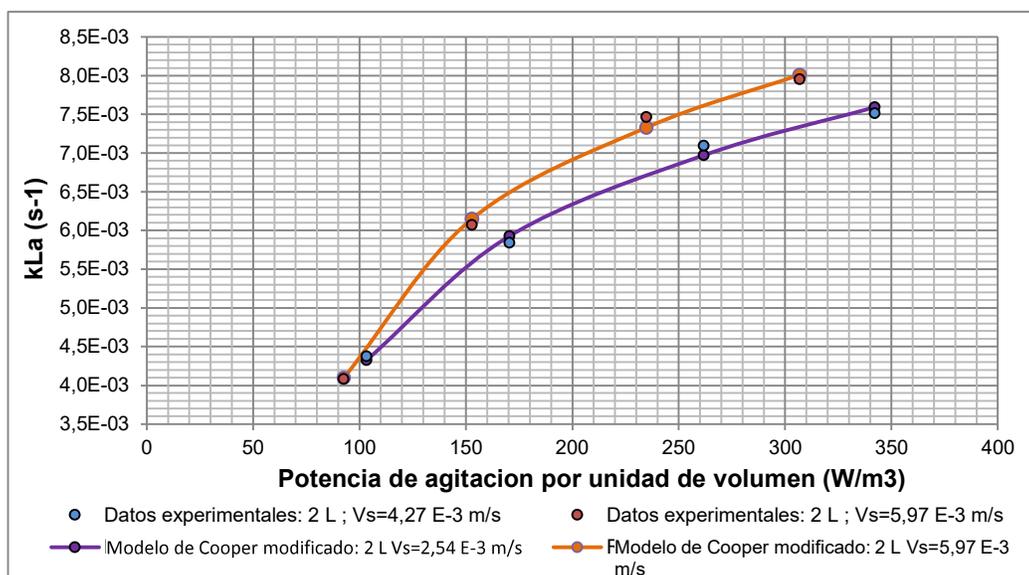


Figura 3.13. Modelo de Cooper modificado versus resultados experimentales en el biorreactor de 150 L

Los coeficientes C , α y β al igual que el término P/V_{\min} correspondientes al modelo de Cooper modificado expresado en la ecuación [3.9] para cada biorreactor se presentan en la Tabla 3.6 a continuación.

Tabla 3.6. Coeficientes y parámetros del modelo de Cooper modificado para las escalas de 2, 17 y 150 L

Escala [L]	C	α	β	P/V_{\min} [W/m ³]	Coefficiente de regresión R ²
2	0,009	0,198	0,225	75,41	0,98
17	0,017	0,148	0,202		0,99
150	0,028	0,130	0,167		0,99

Con la modificación en el modelo de Cooper es notable a través de los gráficos presentados que las desviaciones de los datos experimentales son menores, además de poseer coeficientes de regresión más altos que al utilizar la ecuación original, con esta reforma se espera tener menor incertidumbre en las predicciones del coeficiente de transferencia de masa para cualquier combinación de velocidad de agitación y flujo de aire en las diferentes escalas del proceso.

Por otra parte, el término P/V_{\min} incluido en el modelo modificado representa la potencia de agitación mínima a la cual la velocidad de agitación tiene influencia sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de masa, producto del inicio de la convección forzada y la ruptura de las burbujas de aire al hacer impacto con las paletas del sistema de agitación, este efecto provoca el incremento del área de transferencia de oxígeno. Trabajar con velocidades de agitación inferiores a la mínima, no genera la fuerza de impacto suficiente para vencer la tensión superficial y romper la burbuja, por lo tanto, la ecuación propuesta en este trabajo no se aplica a sistemas que operan bajo este límite. Además, debido a que la potencia consumida es una función de la geometría del sistema y de la escala del proceso, al guardar similitud geométrica todos los biorreactores esta dependencia se elimina, y la relación entre la potencia y el volumen se convierte en una constante para todas las escalas.

- Evaluación de la variación de los coeficientes C, α , β

Finalmente, la determinación de los parámetros de la expresión de Cooper como parte del modelo matemático está completa cuando se define la dependencia de

los coeficientes C , α y β como función de la escala del proceso mediante las regresiones que se presentan en la Figura 3.14, Figura 3.15 y Figura 3.16.

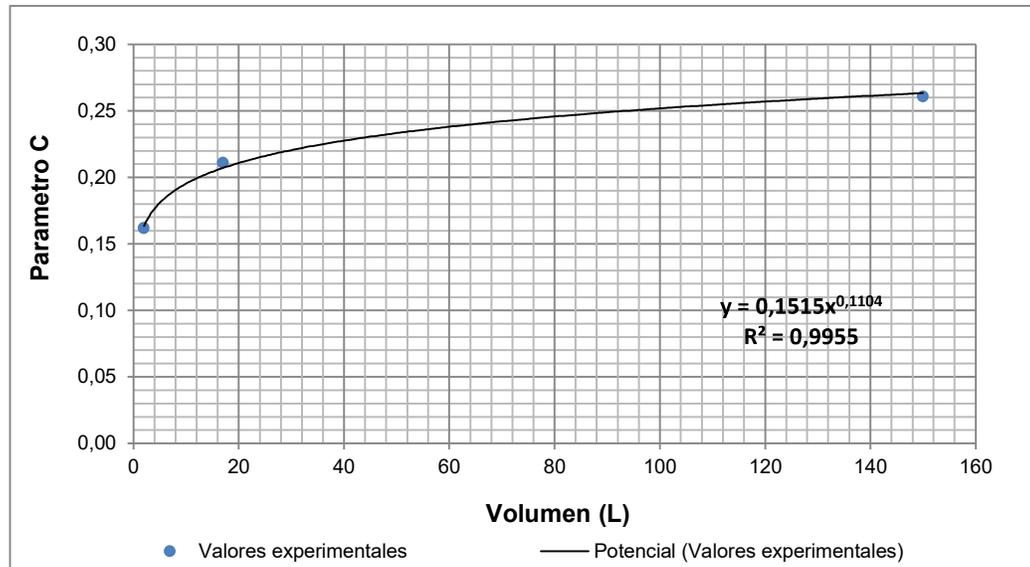


Figura 3.14. Regresión sobre los datos del coeficiente C con la escala del proceso

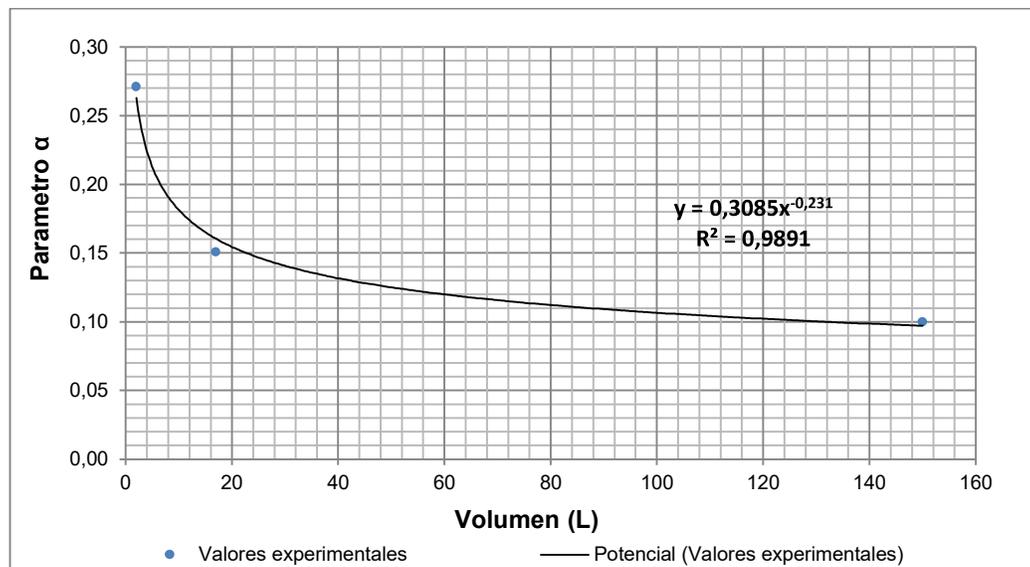


Figura 3.15. Regresión sobre los datos del coeficiente α con la escala del proceso

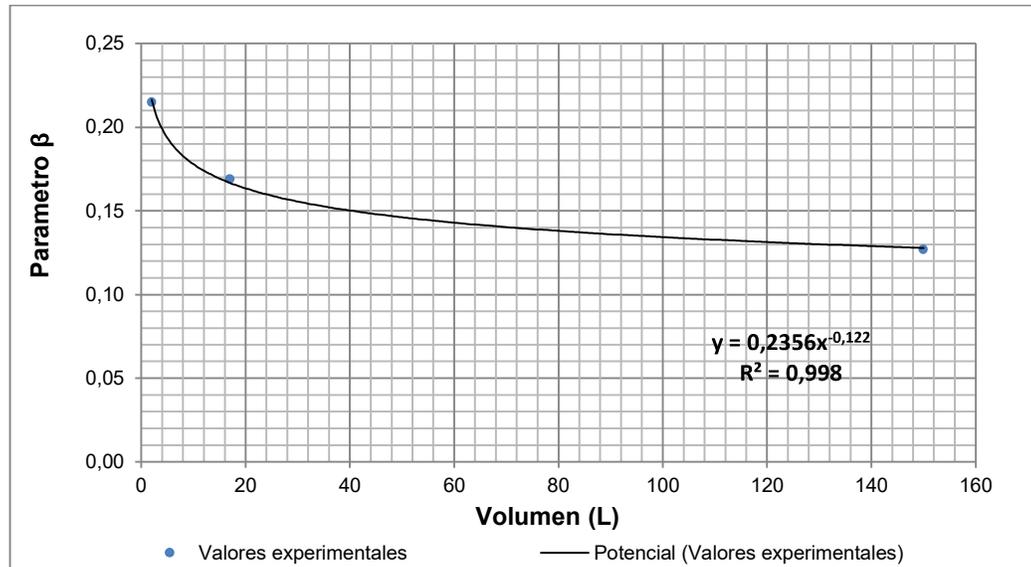


Figura 3.16. Regresión sobre los datos del coeficiente β con la escala del proceso

En los gráficos se observa que las tendencias que mejor se ajustan para todos los parámetros son exponenciales. Para el caso del parámetro C es siempre creciente con la escala del proceso lo que guarda concordancia con la estructura matemática del modelo y con la dependencia geométrica que tiene este parámetro, puesto que conforme aumenta el volumen del reactor también lo hace el área de transferencia. En el caso de los parámetros α y β también son exponenciales, pero en ambos casos son siempre decrecientes, lo que implica que cuanto más grande es el volumen de operación es más difícil que el sistema alcance valores de $k_L a$ elevados.

3.2.2 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE PROPAGACIÓN DE LEVADURA

La construcción de la curva de calibración que se muestra en la Figura 3.17 es el primer paso para encontrar la concentración de levadura a partir de la absorbancia medida en los ensayos experimentales, y con esto establecer la variación de la concentración de levadura con el tiempo y por consiguiente determinar la velocidad específica de crecimiento microbiano.

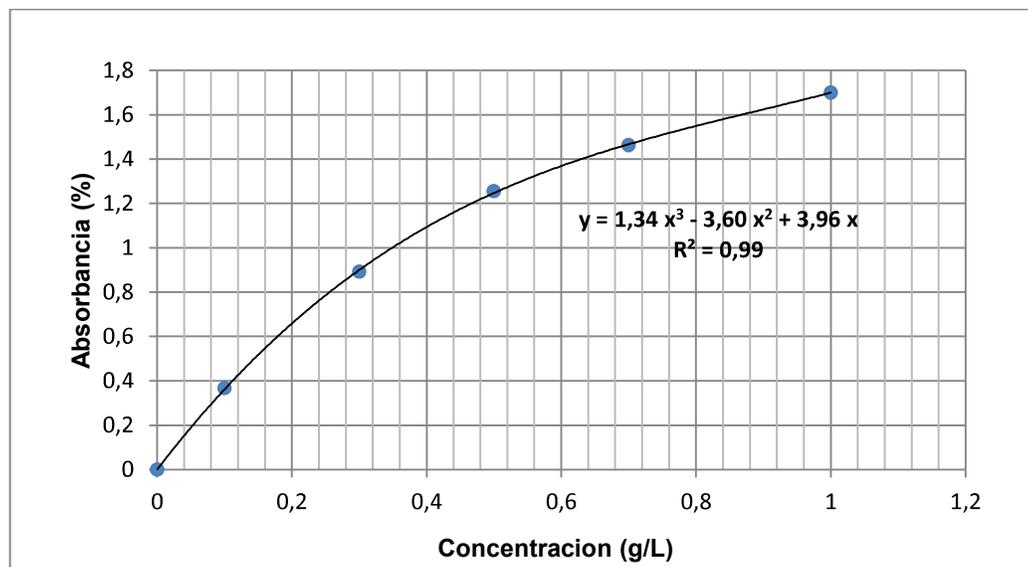


Figura 3.17. Curva de calibración para la determinación de la concentración de levadura a partir de la absorbancia ($\lambda = 540 \text{ nm}$)

La regresión que mejor se ajusta a la tendencia que se observa en el gráfico corresponde a un polinomio de tercer orden. No obstante, por la naturaleza oscilante de esta función no puede extrapolarse para predecir concentraciones más altas que 1g/L que constituye el límite superior al cual se realizó la curva de calibración.

En este sentido, las concentraciones de levadura para las diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire en los biorreactores de 2, 17 y 150 L se determinan directamente a partir de la función polinómica, mientras que la concentración de sustrato limitante -en este trabajo la fuente de carbono- se estiman a partir de la ecuación [1.1] con lo que se consiguen los perfiles de crecimiento microbiano como se presentan en la Figura 3.18.

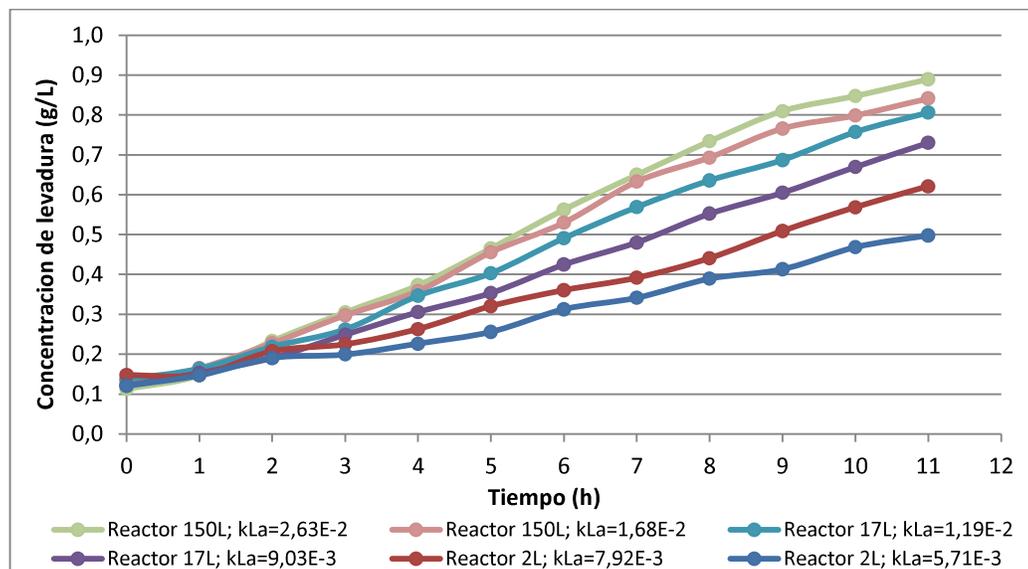


Figura 3.18. Curvas de crecimiento de levadura para los reactores de 150, 17 y 2 L con sus respectivos coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno

Los perfiles de crecimiento microbiano cumplen las expectativas de acuerdo a la teoría. Se puede observar que a partir de la segunda hora de fermentación la levadura abandona la fase de adaptación e ingresa a la fase de crecimiento exponencial. Se puede notar que, para el reactor de 150 L que opera a condiciones que producen un k_{La} de $2,63E-2$, el primer indicio de la disminución en la velocidad de crecimiento se da a partir de la novena hora, tiempo para el cual la concentración de levadura se encuentra al 80% de su valor máximo teórico, que sería 1 g/L de acuerdo al rendimiento de sustrato igual a 0,5 valor característico cuando se emplean carbohidratos como fuente de carbono (Quintero, 1981, p. 91), sin embargo para el reactor de 2L, con k_{La} inferiores ($7,92E-3$ o $5,71E-3$) hasta el tiempo de finalizar el experimento en la onceava hora, no se observa una disminución en la velocidad de crecimiento, y las concentraciones máximas alcanzadas se encuentran entre el 50% y el 60% de la concentración máxima teórica. Estos primeros resultados sobre los perfiles de crecimiento microbiano apoyan la hipótesis de una dependencia entre la velocidad de crecimiento microbiano y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

El tratamiento de los resultados del perfil de crecimiento microbiano para todas las combinaciones y en todas las escalas del proceso permite obtener la velocidad

específica de propagación de la levadura a través de regresiones sobre el modelo logístico de La Motta y el modelo de Monod, las velocidades específicas de crecimiento microbiano para cada combinación en los tres reactores se muestran en la Tabla 3.7,

Tabla 3.8 y Tabla 3.9.

Tabla 3.7. Velocidad específica de crecimiento microbiano en el biorreactor de 2 L para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y velocidad superficial de aire

Velocidad de agitación [rpm]	Velocidad superficial de aire [m/s]	Velocidad específica de crecimiento μ_{\max} [h ⁻¹]	
		Modelo Logístico	Modelo de Monod
550	4,27E-03	0,126	0,3186
650	4,27E-03	0,185	0,3458
750	4,27E-03	0,221	0,3465
820	4,27E-03	0,233	0,3585
550	5,97E-03	0,100	0,3200
650	5,97E-03	0,193	0,3451
750	5,97E-03	0,228	0,3557
820	5,97E-03	0,248	0,3712

Tabla 3.8. Velocidad específica de crecimiento microbiano en el biorreactor de 17 L para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y velocidad superficial de aire

Velocidad de agitación [rpm]	Velocidad superficial de aire [m/s]	Velocidad específica de crecimiento μ_{\max} [h ⁻¹]	
		Modelo Logístico	Modelo de Monod
400	4,17E-03	0,280	0,2703
500	4,17E-03	0,293	0,2883
600	4,17E-03	0,312	0,3089
700	4,17E-03	0,316	0,3126
400	7,04E-03	0,283	0,2744
500	7,04E-03	0,300	0,2951
600	7,04E-03	0,320	0,3177
700	7,04E-03	0,321	0,3192

Tabla 3.9. Velocidad específica de crecimiento microbiano en el biorreactor de 150 L para diferentes combinaciones de velocidad de agitación y velocidad superficial de aire

Velocidad de agitación [rpm]	Velocidad superficial de aire [m/s]	Velocidad específica de crecimiento μ_{\max} [h^{-1}]	
		Modelo Logístico	Modelo de Monod
200	2,54E-03	0,319	0,3121
300	2,54E-03	0,346	0,3578
400	2,54E-03	0,346	0,3671
500	2,54E-03	0,358	0,3808
200	5,11E-03	0,320	0,3350
300	5,11E-03	0,345	0,3715
400	5,11E-03	0,356	0,3816
500	5,11E-03	0,371	0,3655

En todos los casos, mientras aumenta la velocidad de agitación y el flujo de aire la velocidad específica de crecimiento también se incrementa producto de la mejor eficiencia de transferencia de oxígeno que permite que la levadura esté en capacidad de captar mayor cantidad de oxígeno disuelto del medio de cultivo y por lo tanto se aceleran las reacciones biológicas de respiración y propagación celular. Por otra parte, a medida que aumenta la escala del proceso la diferencia entre las velocidades específicas de crecimiento microbiano para los modelos logístico y de Monod es menor específicamente para combinaciones bajas de velocidad de agitación y flujo de aire. Esto se debe a que la sensibilidad de los modelos de crecimiento microbiano es marcada cuando la fase de crecimiento exponencial es prolongada y por consiguiente las velocidades de crecimiento son bajas como en el caso del biorreactor de 2 L donde existe la mayor diferencia.

3.2.3 DEPENDENCIA DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO MICROBIANO CON EL COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

Al considerar que a cada combinación de velocidad de agitación y flujo de aire en cada uno de los biorreactores le corresponde un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno propio y característico, es factible relacionar este

coeficiente con la velocidad específica de crecimiento microbiano que caracteriza el proceso de producción de levadura por lotes y con ello definir la dependencia entre estas dos variables del proceso como se presenta en la Figura 3.19.

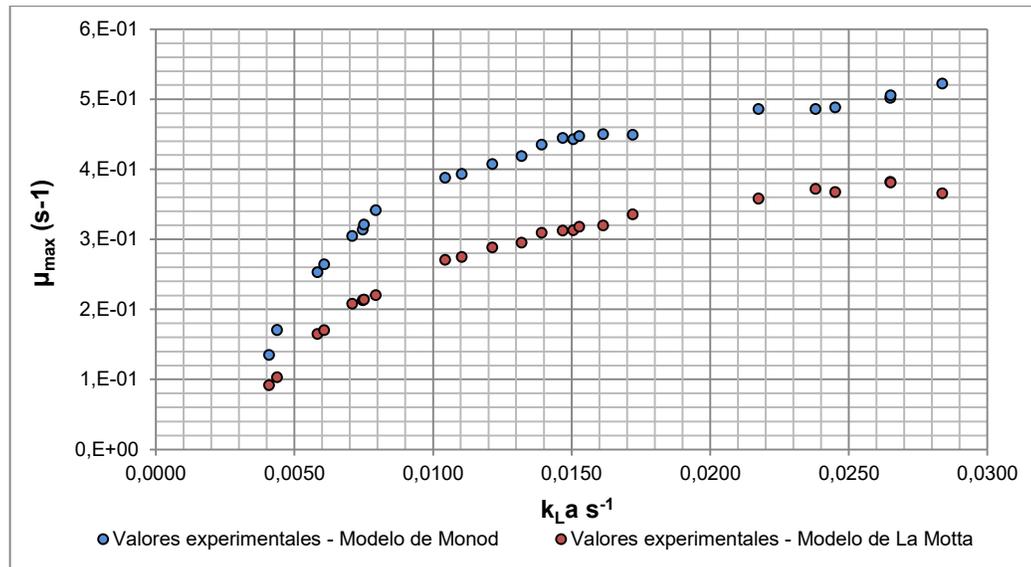


Figura 3.19. Variación de la velocidad específica de crecimiento en función del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en la producción de levadura por lotes

Para ambos modelos se aprecia que la velocidad específica de crecimiento es mayor mientras el k_La aumenta, esto se debe –como se ha expresado antes– a que ambos parámetros dependen de la transferencia de oxígeno, de manera que, si la velocidad de transporte de oxígeno de la burbuja al medio aumenta, también lo hace la tasa de crecimiento microbiano. No obstante, para un análisis más profundo se requiere establecer una tendencia para la dispersión de puntos y el significado de la misma en el proceso, por lo tanto, se muestra en las figuras siguientes los resultados de la aplicación de regresiones potencial, logarítmica e hiperbólica (asintótica).

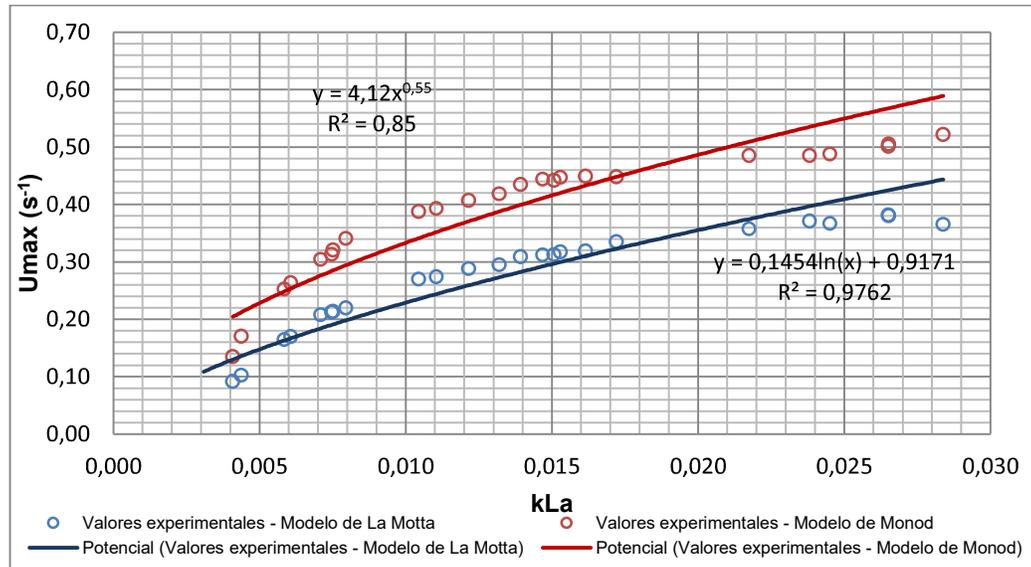


Figura 3.20. Regresión potencial para los datos de variación de la velocidad específica de crecimiento en función del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

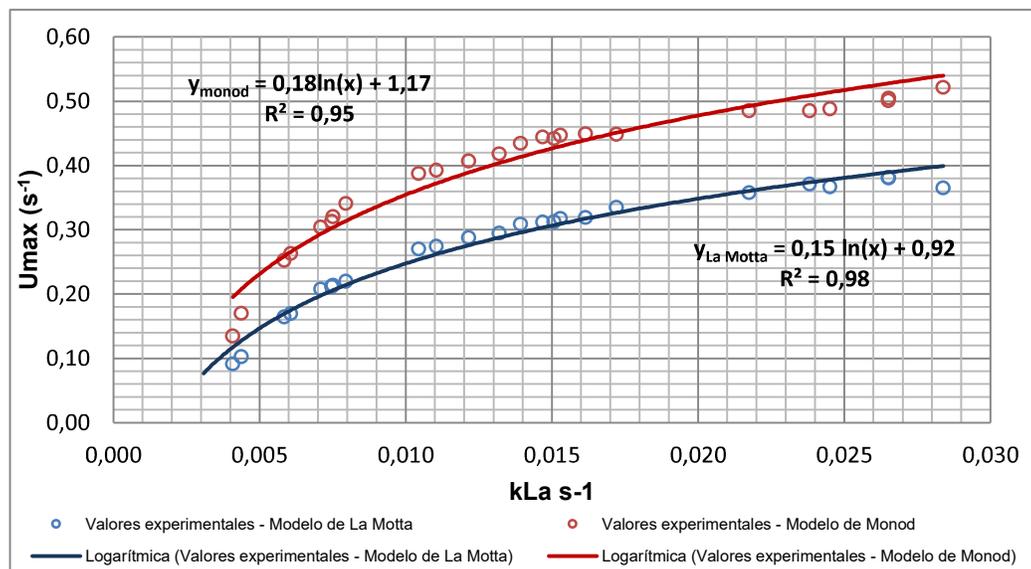


Figura 3.21. Regresión logarítmica para los datos de variación de la velocidad específica de crecimiento en función del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

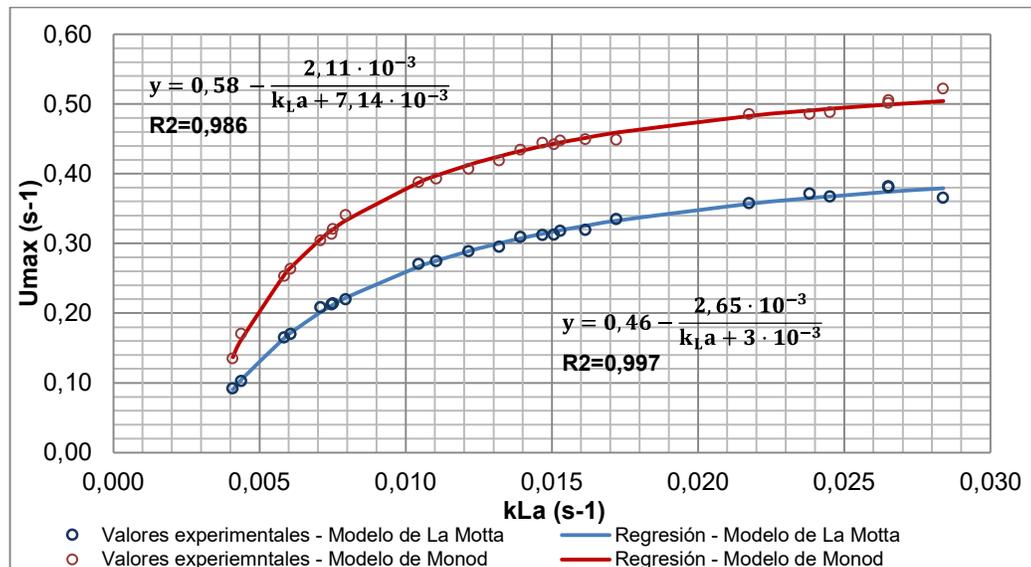


Figura 3.22. Regresión hiperbólica para los datos de variación de la velocidad específica de crecimiento en función del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

En el caso de la regresión potencial tanto en el modelo logístico como en el de Monod se observa que la tendencia se encuentra muy distante de los datos experimentales, hecho que se refleja además al obtener coeficientes de regresión inferiores a 0,9.

Por otra parte, los coeficientes de regresión superiores a 0,9 convierten a la tendencia logarítmica en una buena alternativa como función representante de la dependencia entre el coeficiente de transferencia de masa y la velocidad específica de crecimiento. Sin embargo, esta función posee un carácter siempre creciente y sin límite superior, hecho que compromete el significado real para el proceso ya que se espera que la velocidad de crecimiento microbiano pierda dependencia paulatinamente con el incremento del coeficiente de transferencia de masa, recuérdese que la idea de encontrar la variación de μ_{\max} en función del $k_{L,a}$ se basa en la influencia que tiene concentración de oxígeno disuelto en el medio como un elemento indispensable en la reacción de proliferación, y esta concentración tiene un límite –conocido como la concentración de saturación– por lo que la velocidad de crecimiento microbiano también lo tendría. Este hecho descarta esta función como una alternativa viable.

En definitiva, la tendencia hiperbólica (o asintótica) presenta los mejores resultados desde el punto de vista matemático y físico, tal que ofrece ajustes con coeficientes de regresión cercanos a la unidad e incluso superiores a 0,99. Además, este tipo de tendencia presenta asíntotas en los valores $0,46 \text{ h}^{-1}$ y $0,58 \text{ h}^{-1}$ para los modelos logístico y Monod respectivamente, lo que implica que el valor de la velocidad específica de crecimiento microbiano aun cuando es siempre creciente posee un límite por encima del cual pierde dependencia con el incremento de k_{La} y por lo tanto no podrá alcanzar valores mayores a los citados, un importante concepto como ya se analizó en la tendencia logarítmica.

3.3 IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

La implementación del modelo matemático completamente desarrollado se realiza bajo lenguaje Basic en la plataforma Microsoft Visual Studio 2010 donde el código de simulación se divide en tres módulos concernientes al diseño del biorreactor, al crecimiento microbiano y a la optimización del proceso. Cada módulo constituye la columna vertebral del programa de simulación y opera como una subrutina que requiere datos específicos que pueden ser ingresados por el usuario o calculados por los otros módulos.

En forma global, el algoritmo requiere el ingreso por parte del usuario de los datos correspondientes a: volumen de operación del biorreactor tipo tanque agitado, concentración inicial de la levadura y del sustrato limitante (fuente de carbono), velocidad de agitación y flujo de aire. Además, el usuario deberá seleccionar bajo su propio criterio el modelo de crecimiento microbiano que se utilizará para la simulación.

La interacción entre los módulos principales del programa, así como las trayectorias que podría seguir el mismo en función de la selección del usuario se presenta en la figura a continuación.

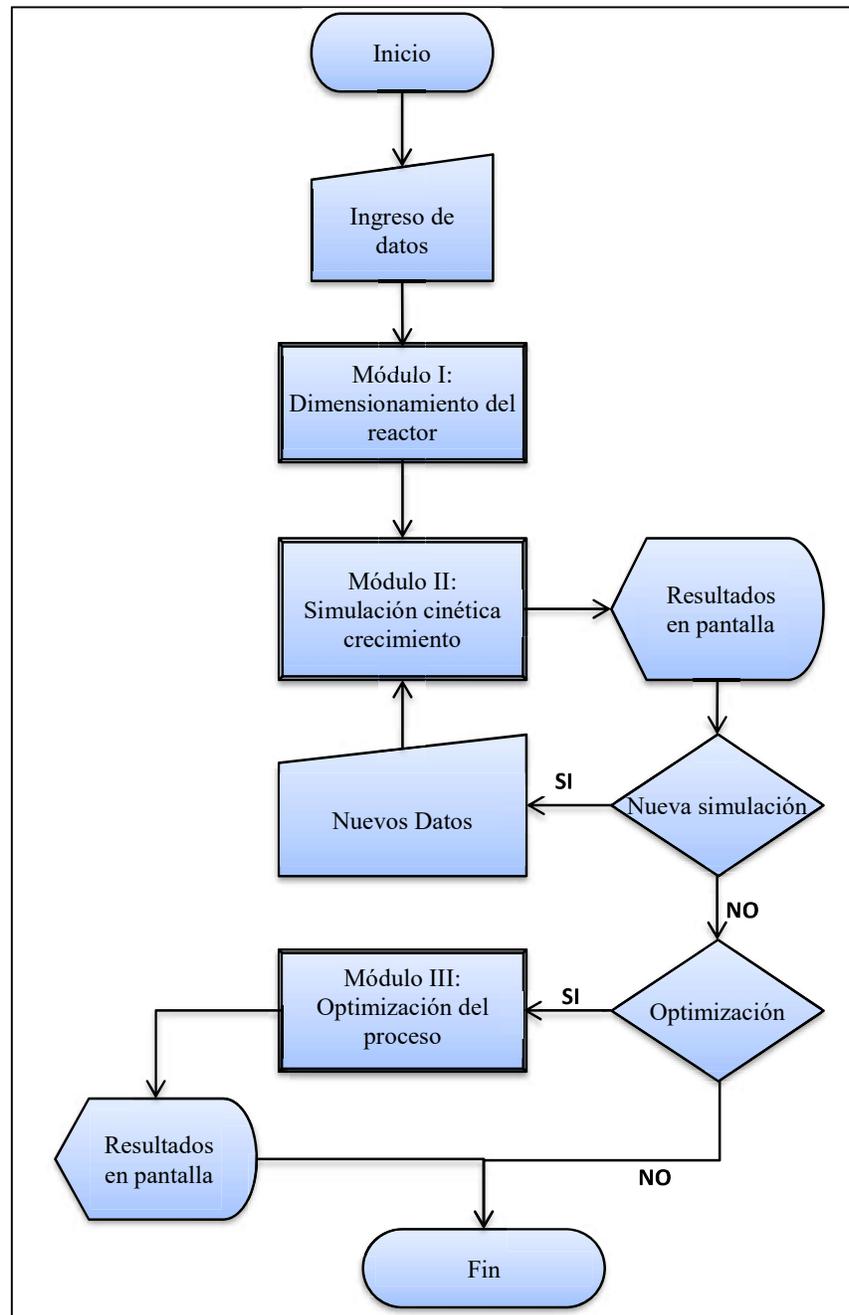


Figura 3.23. Diagrama de flujo global del algoritmo de simulación

El módulo correspondiente al dimensionamiento del biorreactor, cuyo diagrama de flujo se presenta en la Figura 3.24, contiene las ecuaciones del modelo matemático correspondientes a las relaciones de similitud geométrica que consisten en una serie de sencillas ecuaciones algebraicas que permiten determinar las dimensiones del reactor a partir del volumen de operación que ingresó el usuario.

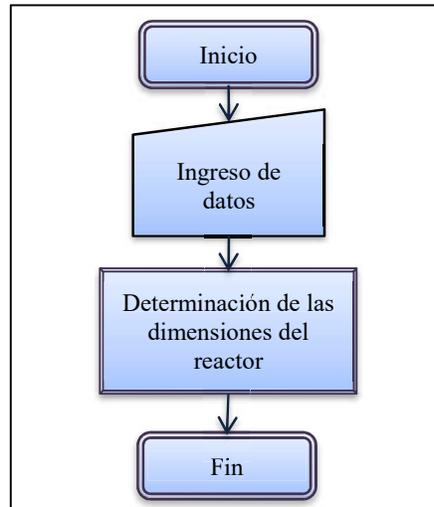


Figura 3.24. Diagrama de flujo del algoritmo de simulación en el módulo I

Con el diseño del biorreactor establecido, el programa continúa con el segundo módulo cuyo diagrama de flujo que se muestra en la Figura 3.25, que se encarga de determinar el perfil de concentraciones de levadura y sustrato a lo largo del tiempo, esto se consigue –previo cálculo del k_{La} – al hacer uso de la función hiperbólica propuesta en este trabajo para el análisis de la dependencia de la velocidad específica de crecimiento microbiano con el coeficiente de transferencia de oxígeno. Con el parámetro cinético determinado se encuentra el perfil de concentraciones mediante la aplicación del modelo logístico de La Motta o de Monod de acuerdo a la elección que haga el usuario.

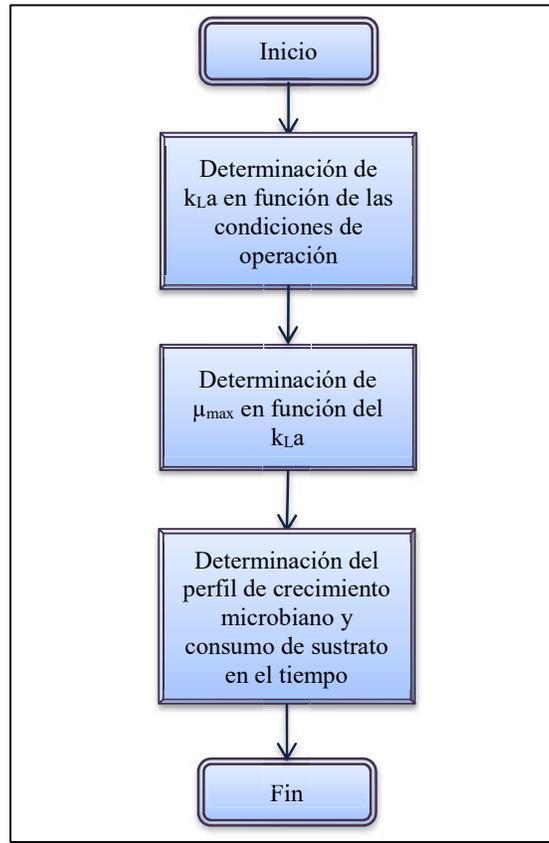


Figura 3.25. Diagrama de flujo del algoritmo de simulación en el módulo II

Finalmente, el último módulo correspondiente a la optimización del proceso cuyo diagrama de flujo se presenta en la Figura 3.26, inicia con la determinación del valor de $k_{L,a}$ que permite una máxima velocidad específica de crecimiento microbiano, este criterio se utiliza bajo la concepción de que al maximizar esta velocidad se minimiza el tiempo de fermentación requerido para alcanzar la concentración máxima de levadura y por lo tanto se optimiza el uso de recursos para la producción de levadura por lotes.

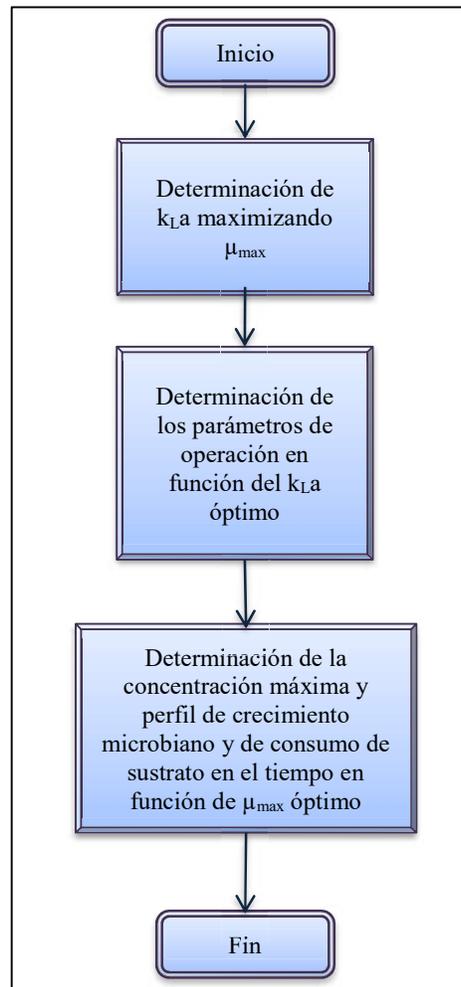


Figura 3.26. Diagrama de flujo del algoritmo de simulación en el módulo III

En este contexto, con el k_{La} que se ha determinado, se procede a estimar los parámetros de operación a través de la ecuación de Cooper modificada. Debido a que se poseen dos incógnitas (potencia de agitación consumida y velocidad superficial de aire) y una sola ecuación, el usuario debe fijar uno de los parámetros, velocidad de agitación o flujo de aire, y el programa determina el faltante, con el cual se obtendría el k_{La} deseado.

La concentración máxima de levadura se determina a través del rendimiento del sustrato (Y_{xs}) y con ésta se encuentra el tiempo de fermentación en la última subrutina del módulo mediante la aplicación del modelo de crecimiento que haya seleccionado el usuario y una aproximación a la concentración máxima del 95%.

Al finalizar el programa devuelve en pantalla el tiempo de fermentación, la concentración máxima alcanzada, las condiciones de operación del proceso (flujo de aire y velocidad de agitación) y las dimensiones del biorreactor.

3.4 COMPARACIÓN DE RESULTADOS

Las desviaciones porcentuales entre los valores experimentales obtenidos por ensayos de fermentación en los biorreactores de 17 y 150 L y los valores calculados por simulación a partir de las ecuaciones que conforman el modelo matemático íntegramente desarrollado permiten la comparación de resultados que se analiza en las secciones a continuación.

3.4.1 DESVIACIÓN EN EL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

La comparación de resultados comienza con la presentación de las desviaciones porcentuales entre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno experimental y el obtenido mediante simulación como se muestra en la Tabla 3.10. Debido a que para el cálculo del k_{La} por simulación se requiere determinar previamente la potencia de agitación consumida y que en los ensayos de fermentación se estimó esta potencia, como una herramienta de soporte para el análisis se presenta también la desviación porcentual respecto a este parámetro en la Tabla 3.11.

Tabla 3.10. Comparación de los resultados experimentales y por simulación obtenidos respecto al k_{La} en los biorreactores de 17 a 550 rpm y 12,4 L/min y 150 L a 450 rpm y 35,5 L/min

Parámetro	Biorreactor 17 L	Biorreactor 150 L
k_{La} calculado [s^{-1}]	1,28E-02	2,56E-02
k_{La} experimental [s^{-1}]	1,41E-02	2,38E-02
Desviación de k_{La} calculado respecto al experimental	-9,09%	7,53%
Potencia de agitación calculada [W]	5,69	141,23
Potencia de agitación experimental [W]	5,98	153,94
Desviación de potencia de agitación calculada respecto a experimental	-4,82%	-8,26%

Se puede observar que la potencia calculada –al igual que en todos los ensayos realizados anteriormente– se encuentra con una desviación en defecto respecto a la potencia medida experimental, aunque el error porcentual no es mayor al 10% (como valor absoluto). Para el caso del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno se nota que las desviaciones son en exceso respecto al valor experimental para el ensayo llevado a cabo en la escala de 150 L mientras que para la escala de 17 L son en defecto. Sin embargo, nuevamente los errores no superan el 10% lo cual asegura la elevada confiabilidad de utilizar la expresión de Cooper modificada y las ecuaciones empleadas para calcular la potencia de agitación consumida que forman parte del modelo matemático planteado en este trabajo.

3.4.2 DESVIACIÓN EN LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Las desviaciones porcentuales entre la velocidad específica de crecimiento microbiano experimental y las conseguidas mediante simulación con el modelo cinético logístico de La Motta y el de Monod se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 3.11. Comparación de los resultados experimentales y por simulación obtenidos respecto a la velocidad específica de crecimiento en los biorreactores de 17 y 150 L

Escala [L]	Modelo Logístico			Modelo de Monod		
	μ_{\max} calculado [h ⁻¹]	μ_{\max} experimental [h ⁻¹]	Desviación porcentual	μ_{\max} calculado [h ⁻¹]	μ_{\max} experimental [h ⁻¹]	Desviación porcentual
17	0,309	0,290	6,68	0,434	0,433	0,18
150	0,365	0,387	-5,74	0,491	0,532	-7,69

Al determinar la velocidad de crecimiento microbiano, se encuentra que las desviaciones entre los resultados experimentales y los ofrecidos por los modelos matemáticos son siempre menores al 10% (como valor absoluto) e incluso para el modelo de Monod en el ensayo sobre el biorreactor de 17L la desviación es inferior a la unidad.

3.4.3 DESVIACIÓN EN LOS PERFILES DE CRECIMIENTO MICROBIANO

La variación de la concentración de levadura respecto al tiempo en contraste con los perfiles que se obtienen si se aplica los modelos cinéticos de La Motta y Monod se presentan en la Figura 3.27 y la Figura 3.28 respectivamente.

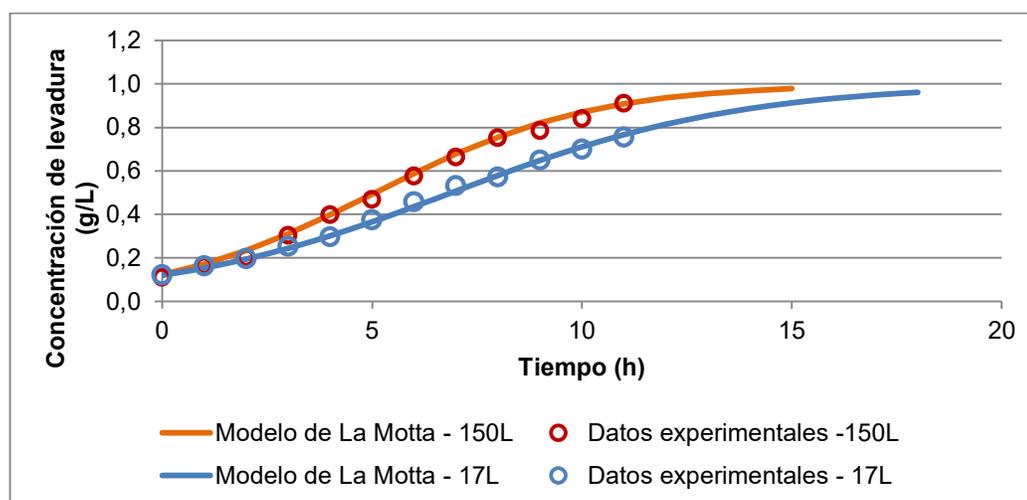


Figura 3.27. Perfiles de crecimiento de levadura experimental y por simulación aplicando el modelo logístico de La Motta para las escalas de 17 y 150 L

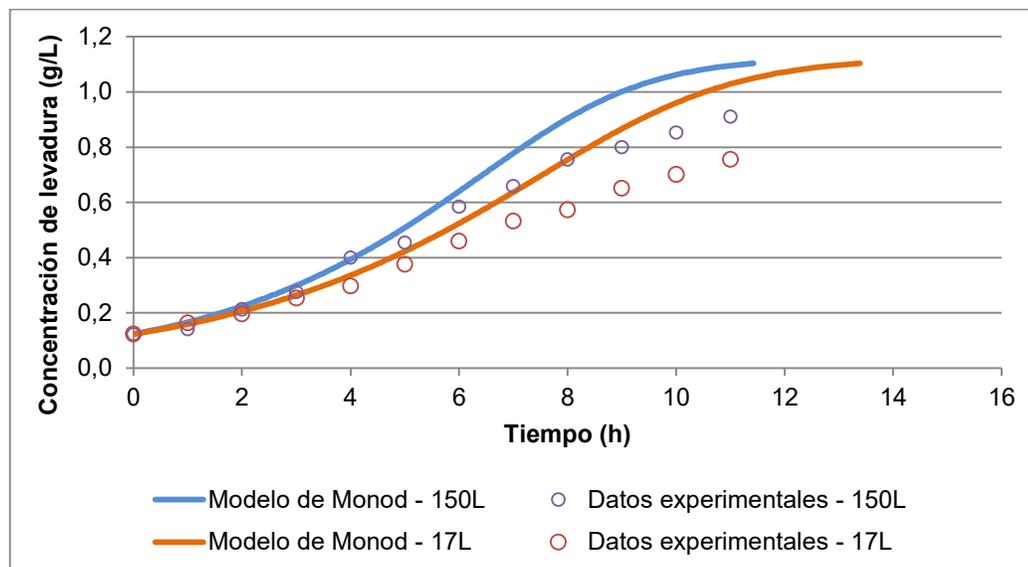


Figura 3.28. Perfiles de crecimiento de levadura experimental y por simulación aplicando el modelo de Monod para las escalas de 17 y 150 L

Para los dos casos tanto de 17 y 150 L, el modelo logístico de La Motta ofrece una excelente aproximación para el perfil de concentración de levadura, se observa que las fases de adaptación, crecimiento exponencial, y de disminución de la velocidad de crecimiento se ajustan durante todo el rango al modelo.

No obstante, en el análisis del modelo de Monod se aprecia una fuerte desviación a partir de la mitad de la fase de crecimiento exponencial en adelante y sugiere que el tiempo de llegada a la fase estacionaria es menor respecto a los valores experimentales en alrededor de 2 horas. Adicionalmente, este modelo devuelve concentraciones de levadura mayores en un 15% al rendimiento máximo teórico de acuerdo con la concentración inicial de sustrato y al rendimiento de la fuente de carbono ($Y_{X/S}$). Por estas razones, se concluye que, para obtener la máxima confiabilidad del programa de simulación, el usuario deberá seleccionar el modelo de Monod únicamente cuando haya comprobado que perfil de concentraciones de la levadura que está usando sea similar al que ofrece este modelo.

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

La ecuación de Cooper modificada con el término P/V_{\min} , propuesta en este trabajo, permite un mejor acercamiento a los valores experimentales de k_La con una menor desviación.

La velocidad específica de crecimiento μ_{\max} para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene diferentes valores en función de la concentración de oxígeno en el sustrato y posee una dependencia con el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno disuelto (k_La).

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno guarda dependencia con la escala del proceso, cuanto mayor es el volumen de producción, también lo es el coeficiente de transferencia. Al mismo tiempo, mientras mayor es la tasa de transferencia de oxígeno, mayor es la velocidad de crecimiento microbiano. Por esto, mayores escalas de producción, favorecen el crecimiento microbiano.

El modelo logístico propuesto por La Motta se ajusta al perfil de concentraciones en todas las etapas del crecimiento microbiano, desde la fase de adaptación hasta la de disminución de la velocidad de crecimiento, mientras que el modelo propuesto por Monod se ajusta únicamente en la etapa de adaptación y en las primeras horas de la etapa de crecimiento exponencial del crecimiento microbiano, y se al final de la fase exponencial y estacionaria.

Mediante la simulación del proceso de fermentación, se pudo predecir el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno con menos del 10% de desviación respecto al valor experimental. Mediante los modelos cinéticos de Monod y La Motta se pudo predecir la velocidad de crecimiento microbiano con menos del 8% de desviación respecto al valor experimental y el perfil de concentración. Sin embargo, los perfiles de concentración del modelo de Monod presentaron mayores desviaciones que el

modelo logístico de La Motta, y la concentración máxima que se determina a través del modelo de Monod es un 15% superior a la concentración máxima teórica obtenida a partir del rendimiento de la fuente de carbono en el sustrato ($Y_{X/S}$).

4.2 RECOMENDACIONES

Aplicar el modelo de crecimiento microbiano propuesto por Monod con microorganismos diferentes o formulaciones de sustrato diferentes con el fin de hallar mejores ajustes y aplicaciones para el modelo en cuestión.

Hallar la dependencia del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno con los números de Reynolds y Schmidt.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arroyo, F., Orlic, S., Querol, A. y Barrio, E. (2009). *Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of Saccharomyces cerevisiae, S. kudriavzevii and their interspecific hybrid*. International journal of food microbiology, 131(1), 120-127.
2. Badino, A., Facciotti, M., y Schmidell, W. (2001). *Volumetric oxygen transfer coefficients (kLa) in batch cultivations involving non-newtonian broths*. Biochemical engineering journal. 8(1). 111-119
3. Banks, J. y Marietta, G. (1999). *Discrete event simulation*. Winter simulation conference. Ed. P.A. 7-13
4. Blanch, H. y Clark, D. (1996). *Biochemical engineering*. (2da Edición). 164-165
5. Chisti, Y. (1999). *Fermentation (industrial): Basic considerations*. Department of chemical engineering, university of Almería, Spain. 663-674
6. Doran, P. (1995). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. (1ra. Edición). España, Zaragoza: Acribia.
7. Duarte, A. (2000). *Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod*. Ingeniería e investigación. 123-134
8. Eagon, R. (1961). *Pseudomonas natriegens, a marine bacterium with a generation time of less than 10 minutes*. Department of Bacteriology, University of Georgia. 736 – 737.
9. Fogler, S. (2008). *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*. (4ta Edición). México, Guadalajara: Pearson educación.

10. Gaden, E. (2000). *Fermentation Process Kinetics*. Department of Chemical Engineering, Columbia University. 413-419
11. García-Ochoa, F. y Gómez, E. (2009). *Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview*. Journal of Biotechnology Advances. 27 (2). 153.
12. Gill, N., Appleton, M., Baganz, F. y Lye, G. (2008). *Quantification of Power Consumption and Oxygen Transfer Characteristics of a Stirred Miniature Bioreactor for Predictive Fermentation Scale-up*. Biotechnology and Bioengineering Journal. 100 (6). 1 144.
13. Huang, T. y McDonald, K. (2009). *Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures*. Biochemical engineering journal, 45(1), 168-184.
14. Jakymec, M., Morán, H., Páez, G., Ferrer, J., Mármol, Z. y Ramones, E. (2001). *Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato*. Revista científica, FCV-LUZ. 11(1). 53-59
15. Kantarci, N., Borak, F., y Ulgen, K. (2005). *Bubble column reactors*. Process Biochemistry. 40(1). 2263-2283
16. La Motta, E. (1976). *Kinetics of continuous growth cultures using the logistic growth curve*. Biotechnology and Bioengineering, 18(1), 1 029-1 032
17. Manovacía, N., Moreno, A., Mayorga, O. y Barahona, R. (2008). *Evaluación del contenido de nutrientes de biomasa en cepas de levadura colombianas y comerciales*. Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín. 61 (2). 85.
18. Matei, I. y Bock, C. (2012). *Modeling technologies and simulation for dynamical systems*. National Institute of standards and technology. 1-23

19. Panikov, N. (2002). *Kinetics, microbial growth*. Institute of microbiology, Russian Academy of Sciences. 1 513-1 543.
20. Perry, R., Green, Don., Maloney, J. (2001). *Manual del ingeniero químico*. (4ta Edición). España. Madrid: Mc Graw Hill.
21. Piero, M. y Chang, G. (1998). *Power consumption in agitated vessels provided with multiple-disk turbines*. Department of chemical engineering, chemistry, and environmental science. 37(1). 284-291
22. Prescott, S., Dunn, C. (1962), *Microbiología industrial*. (2da edición). España. Madrid: Aguilar.
23. Quintero, R. (1981). *Ingeniería Bioquímica teoría y aplicaciones*. (1ra. Edición). México D.F. México: Alhambra.
24. Ramírez, O. y Molina, M. (2005). *Evaluación de parámetros cinéticos para la Saccharomyces Cerevisiae utilizando agua de coco como sustrato*. Ingeniería. 15(1,2). 91-102.
25. Ratledge, C. y Kristiansen, B. (2006). *Basic biotechnology*. (2da Edición). Reino Unido, Cambridge: Cambridge University press
26. Ribas, M., Hurtado, R., Garrido, N., Domenech, F., Sabadí, R. (2011). *Metodología para la modelación matemática de procesos. Caso de estudio, fermentación alcohólica*. Icidca, 45(1), 37-47.
27. Ccopa, E., Yamakawa, C., Herrera, M., Geraldo, V., Rossell, C., Maciel, R., Bonomi, A. (2013). *A procedure for estimation of fermentation kinetic parameters in fed-batch bioethanol production process with cell recycle*, Chemical engineering transactions, 32(1), 1369-1374.

28. Rodríguez, M. (2006). *Modelado e identificación de bioprocesos*. Departamento de Ingeniería química, Universidad de Vigo. Vigo. 4-8
29. Shafagha, H., Najafpour, G., Rezaei, P., Sharifzadeh, M. (2010). *Ethanol production with natural carbon sources in batch and continuous fermentation using free and immobilized Saccharomyces cerevisiae*. Journal of scientific & Industrial research, 70(1), 162-169
30. Stanbury, P. Whitaker, A. y Hall, S. (1995). *Principles of fermentation technology*. (2da. Edición). Reino Unido, Londres: Butterwoth-Heinemann.
31. Towler, G., Sinnott, R. (2007). *Chemical Engineering Design: Principles, Practice and Economics of Plant and Process Design*. (4ta Edición). Estados Unidos. San Diego: Butterworth-Heinemann.
32. Trejos, M., Alzate, J., Gómez, M. (2008). Descripción matemática y análisis de estabilidad de procesos fermentativos. Dyna, 158(1), 111-121.
33. Trinci, A. (1969). *A kinetic study of the growth of aspergillus nidulans and other fungi*. Department of microbiology, university of London. 11-24.
34. Urquia, A. (2000). *Modelado orientado a objetos y simulación de sistemas híbridos en el ámbito del control de procesos químicos*. (Tesis doctoral no publicada). Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, España.
35. Waites, M., Morgan, N., Rockey, J., Higton, G., (2011). *Industrial Microbiology: An introduction*. (1era Edición). Londres, Reino Unido: Blackwell Science
36. Williams, J. (2002). *Keys to bioreactor selections*. Enviromental & production solutions. 34-41