

## Evaluación de la transferencia de oxígeno en cultivos con *Lactococcus lactis* empleando un sistema de fermentación con aireación externa

### Evaluating oxygen transfer in a *Lactococcus lactis* cultures using an external aeration fermentation system (EAFS)

Andrea Soler<sup>1</sup>, Gustavo Buitrago H<sup>2</sup>

---

#### Resumen

En fermentaciones aerobias el oxígeno, como aceptor terminal de electrones en el proceso de respiración, comúnmente se constituye en limitante debido entre otros factores al diseño del biorreactor (factores geométricos), a las condiciones de operación de los fermentadores (condiciones ambientales requeridas en el cultivo, potencia transferida al cultivo por el sistema de agitación, propiedades del medio líquido), demanda de oxígeno por parte del microorganismo, sistema de aireación (concentración de oxígeno en el gas, solubilidad del oxígeno). La limitación de oxígeno se refleja en la fermentación con *Lactococcus lactis* cepa IBUN 34.1, en que presenta una baja disponibilidad de oxígeno desde muy temprano en la fase exponencial del cultivo. Para superar estas limitaciones se diseñó y desarrolló un sistema de suministro de oxígeno de alta tasa de transferencia, consistente en un sistema de fermentación con aireación externa (SFAE), el cual es comparado en este trabajo con el sistema tradicional de fermentador agitado dotado con dos turbinas tipo Rushton y aireación por difusor interno.

En este trabajo se evalúa la operación del SFAE, se seleccionan y estudian algunas variables operacionales y su efecto sobre la transferencia de oxígeno gas-líquido. Los resultados indican que las variables que tienen efecto significativo sobre el coeficiente volumétrico global de transferencia de masa  $k_{L,a}$  son la agitación y el flujo de medio de cultivo que circula por el aireador externo denominado flujo de recirculación. Los valores de  $k_{L,a}$  obtenidos indican que con el fermentador convencional con aireación interna el mayor valor de  $k_{L,a}$  alcanzado fue de 40,68 (h<sup>-1</sup>), en tanto que con el SFAE se alcanzaron valores de 63,18 (h<sup>-1</sup>).

**Palabras clave:** biorreactores,  $k_{L,a}$ , transferencia de oxígeno, fermentaciones aeróbicas, transferencia de masa gas-líquido.

---

1 Ingeniera química Msc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. apsolerg@unal.edu.co

2 Ingeniero químico Msc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. gbuitragoh@unal.edu.co

## Abstract

Oxygen as final electron acceptor in respiration in aerobic fermentations is commonly a limiting factor due to its low solubility in aqueous solutions, bioreactors' geometric factors and operating characteristics, liquid media properties, oxygen concentration in gas supply, microorganisms' characteristics, environmental culture conditions, power supply by agitation system, etc. Oxygen limitation is present in cultures using the IBUN 34.1 *Lactococcus lactis* strain where oxygen availability is low some minutes after the exponential phase starts. A high transfer rate oxygen supply system was thus designed to overcome such limitations; it consisted of an external aeration fermentation system (EAFS) which was compared in this work with a conventional agitated tank fermenter equipped with two Rushton turbines and internal diffuser aeration flute mechanism.

This paper evaluates the EAFS; some operational variables were selected and studied as well as their effect on oxygen transfer. Our results showed that agitation and culture medium flow through the aerator (called external recirculation flow) were the variables having the main effect on overall volumetric mass transfer coefficient ( $k_{LA}$ ). The highest  $k_{LA}$  value in the conventional bioreactor having internal aeration was 40.68  $k_{LA}$  ( $\text{h}^{-1}$ ), while EAFS reached 90 ( $\text{h}^{-1}$ ).

**Key words:** Bioreactor,  $k_{LA}$ , oxygen transfer, aerobic fermentation, gas-liquid mass transfer.

**Recibido:** marzo 8 de 2010

**Aprobado:** noviembre 3 de 2010

## Introducción

En cultivos con *Lactococcus lactis* cepa IBUN 34.1 se presenta limitación de oxígeno (Vanegas, 2006; Galaction *et al.*, 2004) a las condiciones de operación que proveen fermentadores convencionales. En estos biorreactores el coeficiente volumétrico global de transferencia de masa ( $k_{LA}$ ) es el parámetro de mayor relevancia en el diseño y la operación, dependiendo de una gran cantidad de factores, por ejemplo, de la velocidad de agitación que modifica el régimen de turbulencia y disminuye el tamaño de burbuja. Sin embargo, el consumo de energía es proporcional a la velocidad a la tercera potencia y al diámetro del agitador a la quinta potencia (Calderbank y Moo-Young, 1961; Bandaipheth y Prasertsan, 2006; Rushton *et al.*, 1950), incidiendo en el costo de operación. Adicionalmente, debe tenerse en cuenta que altas velocidades de agitación tienen una influencia negativa en la productividad de complejos enzimáticos, debido al efecto de los esfuerzos de corte sobre el cultivo (Bandaipheth y Prasertsan, 2006; Kwon *et al.*, 1996). Otros factores que afectan la transferencia de oxígeno

no son las características geométricas y operacionales de los recipientes de fermentación, la composición del medio de cultivo, la viscosidad, la tensión superficial, la concentración de oxígeno en la corriente de gas, la morfología del microorganismo y el área superficial que proveen las burbujas. Es por esto que el  $k_{LA}$  es un parámetro que determina tanto el escalado de las fermentaciones aerobias como la estructura de costos en fermentadores convencionales (Gaddis, 1999). En estos biorreactores, el  $k_{LA}$  se puede calcular por un gran número de ecuaciones empíricas y por ecuaciones teóricas (Galaction *et al.*, 2004; Kawase *et al.*, 1992), unas y otras muestran que la viscosidad incide drásticamente sobre los valores de  $k_{LA}$ .

La eficiencia en la aireación de un sistema fermentativo depende de la solubilidad del oxígeno, la velocidad de difusión en los medios de cultivo, la demanda de oxígeno del cultivo y la capacidad del biorreactor de satisfacer dicha demanda en la población microbiana. La concentración de oxígeno disuelto en los medios de cultivo depende de la velocidad de consumo (oxygen uptake rate, OUR) de las células y de la

velocidad de transferencia del mismo (oxygen transfer rate, OTR). La OTR depende del coeficiente de transferencia de oxígeno  $k_{LA}$  y del gradiente entre la concentración de equilibrio y la concentración actual en el líquido, e incide sobre los índices de productividad y los rendimientos (Zhang y Thomas, 1996; Kawase *et al.*, 1992; García y Gómez, 2005).

## Metodología

### Microorganismo

El microorganismo empleado en este estudio es el *Lactococcus lactis*, bacteria gram positiva, mesófila, perteneciente a la familia Streptococaceae, aislado y catalogado como cepa IBUN 34.1, depositada en el banco de germoplasma del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN).

### Medio de fermentación e inóculo

El medio de cultivo utilizado en los ensayos (Vanegas, 2006) contiene sacarosa 30 g/L, extracto de levadura 20 g/L,  $K_2HPO_4$  20 g/L,  $CaCl_2 \cdot H_2O$  0,066 g/L,  $MgSO_4 \cdot H_2O$  0,023 g/L,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0,011 g/L y agua destilada c.s.p 1 litro. Para la caracterización hidrodinámica tanto de la configuración tradicional del reactor, como para el sistema con el aireador externo, se empleó agua como medio.

El inóculo se preparó en 50 mL de medio de cultivo contenidos en un Erlenmeyer de 250 mL al cual se adicionan 40  $\mu$ L de la cepa suministrada. El inóculo se mantuvo a 30 °C y 200 rpm por 12 h, al cabo de las cuales se verificó un crecimiento microbiano que corresponda a una densidad óptica mayor a 0,6, medida a 600 nm (Vanegas, 2006).

### Biorreactor

En este trabajo se comparan los valores de  $k_{LA}$  obtenidos en un fermentador convencional con aquellos obtenidos en el SFAE propuesto.

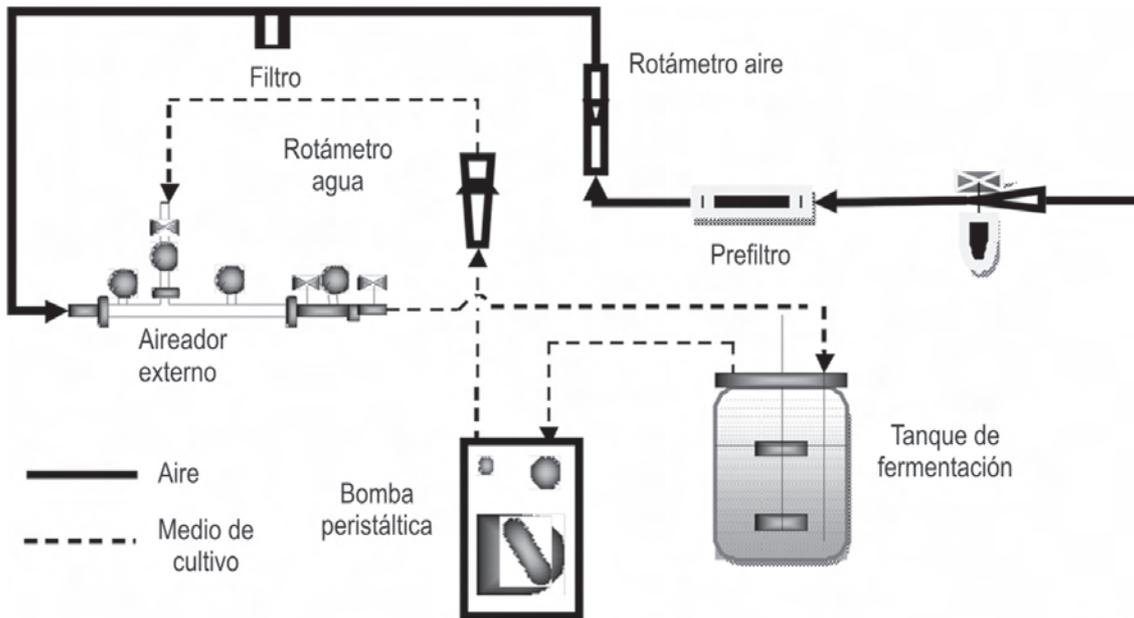
*Fermentador convencional.* Se empleó un fermentador Biolab con un recipiente de vidrio de 1,6 L de volumen de operación y diámetro 117 mm, equipado con dos turbinas Rushton de 56 mm de diámetro separadas 56 mm entre sí y del fondo del recipiente a la primera turbina; cuenta con un difusor de gas del tipo flauta en “L” con 5 orificios al que se suministra aire a presión y filtrado (tabla 1). El biorreactor está equipado con medidores de pH, oxígeno disuelto (electrodo polarográfico InPro®6800/12/220, Mettler, Toledo), controlador de temperatura y controlador de la velocidad de agitación. El fermentador se inocula con 50 mL de inóculo, el cultivo se mantiene a 30 °C y el pH inicial se ajusta en 7,0. El pH y el oxígeno disuelto (OD) no se controlan durante el cultivo. La agitación y aireación se fijan según el régimen por experimentar.

**Tabla 1.** Características del biorreactor y el impulsor

Dimensiones	Valor (mm)
Diámetro impeler $D_a$	56
Diámetro del tanque $D_t$	117
Altura del impeler $E$	56
Ancho hoja del impeler $L$	19
Alto hoja del impeler $W$	16,5
Sin baffles $J$	0
Altura líquido $H$	88 (1 litro); 110 (1,2 litros)

**Sistema de fermentación con aireador externo.** Se empleó el fermentador convencional Biolab, con las siguientes adaptaciones (figura 1):

- Se elimina el difusor interno.
- Se adaptan puertas de entrada y salida de medio, desde el fermentador hacia el aireador externo y el retorno al fermentador.



**Figura 1.** Configuración del sistema de fermentación con aireador externo.

- El medio es impulsado por una bomba peristáltica.
- El aireador externo (figura 2) consta de un difusor de micro burbujeo de 17 cm de largo y 1 cm de diámetro fabricado en acero sinterizado, en este dispositivo se pone en contacto la fase líquida con la corriente de aire, en circulación paralela, y retorna al fermentador agitado.

El uso de microburbujeadores en tanques agitados se recomienda para microorganismos sensibles al estrés mecánico, debido a que incrementa el área entre las fases gas-líquido, reflejándose en posibles reducciones en el flujo de aire y en las velocidades de agitación (Cockx *et al.*, 1995). Se seleccionó este tipo de difusor en el sistema de fermentación con aireador externo (SFAE) por proveer tamaños de burbuja reducidos y grandes áreas superficiales de contacto con la fase líquida, características que pueden ejercer un efecto favorable.

El diseño del (SFAE) tiene como propósito aumentar la transferencia de oxígeno, descrita y analizada por medio del coeficiente volumétrico global de transferencia de masa ( $k_{L,a}$ ). El

SFAE diseñado (figura 1) incorpora un aireador externo que emplea un microburbujeador de acero sinterizado que provee una amplia área interfacial gas-líquido, el cual se instala en una unidad de contacto a la que llega una línea de flujo de recirculación y la línea de suministro de aire. En el aireador externo se puede incrementar la presión por encima de la presión atmosférica, de esta manera se incrementa la concentración de equilibrio del oxígeno en el medio líquido. El incremento de presión está limitado por la capacidad del microorganismo de soportar estas presiones.

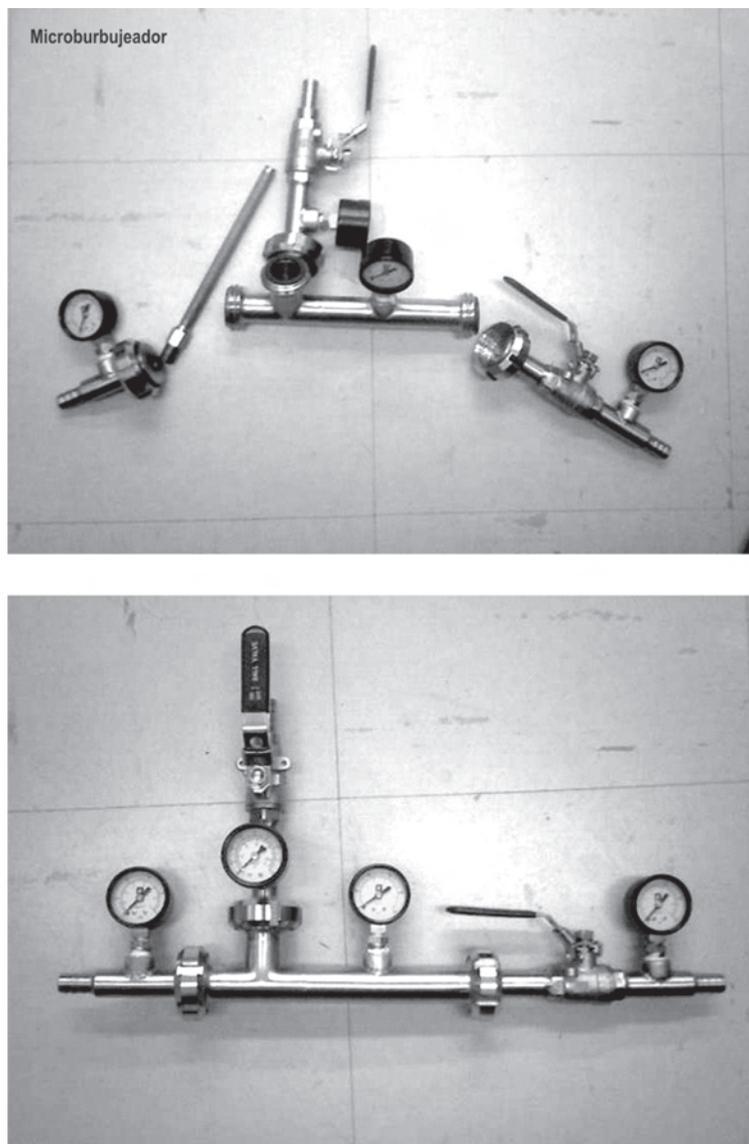
El SFAE evaluado es un sistema de fermentación con una alta velocidad de transferencia de oxígeno que no presenta limitación del mismo en la fermentación con el *Lactococcus lactis* IBUN 34.1, diferenciándose sustancialmente de los sistemas de fermentación convencionales, agitados y con difusor de aire del tipo burbujeador. Por las características del SFAE, presenta ventajas que lo hacen promisorio para ser utilizado en fermentaciones extractivas, en cultivos altamente sensibles a esfuerzos de corte, en cultivos con células inmovilizadas, entre otras aplicaciones potenciales.

Teniendo en cuenta las características del SFAE, en este trabajo se plantea estudiar tres condiciones de operación con el fin de alcanzar una mayor transferencia de oxígeno:

1. Empleo de SFAE bajo condiciones controladas de flujo y presión (Soler, 2009).
2. Incrementos de la presión en el aireador externo para modificar la solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo (Pinheiro y Mota, 2000), la so-

lubilidad y la difusividad son función directa de la presión en el sistema. La determinación de las condiciones de operación en el aireador externo propuesto están afectadas por la capacidad de las células de soportar estrés oxidativo o mecánico (Kwon *et al.*, 1996), factor que se evaluará experimentalmente.

3. Variación del tiempo de contacto entre el aire y el medio de cultivo (Soler, 2009).



**Figura 2.** Aireador externo, despiece y ensamble.

### Evaluación de los cultivos

El seguimiento de la fermentación se realiza determinando biomasa por densidad óptica a 600 nm, tomando lecturas de pH y de OD como porcentaje de saturación (Vanegas, 2006; Soler, 2009).

**Determinación del  $k_{La}$  cuando se emplea agua como medio.** En esta caracterización del SFAE se empleó el método estático en la estimación de los valores de  $k_{La}$  (Gaddis, 1999; Galaction *et al.*, 2004). Este método presenta como ventaja que puede aplicarse para diferentes medios de cultivo y los resultados corresponden a condiciones en que no hay consumo de oxígeno. El método estático consiste en medir la velocidad de incremento de la concentración de oxígeno disuelto en el medio; previamente se reduce esta concentración hasta valores cercanos a cero, haciendo pasar nitrógeno gaseoso por el sistema durante al menos 20 min. Se suspende el flujo de nitrógeno y se inicia la aireación a las condiciones de operación establecidas (velocidad de agitación y velocidad de aireación). El oxígeno disuelto se midió empleando un electrodo polarográfico con cartucho de membrana reemplazable InPro®6800/12/220 (Mettler, Toledo).

Las curvas obtenidas por este método se ajustan a la ecuación (1), de velocidad de trans-

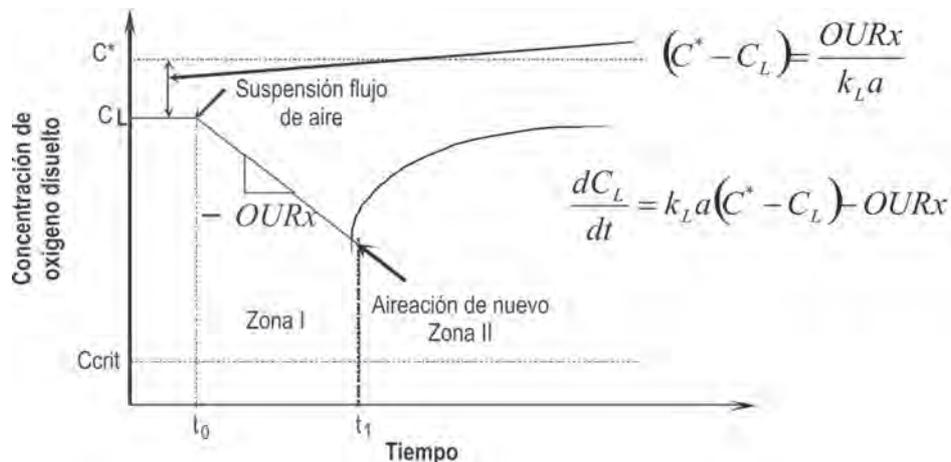
ferencia, y se determina el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $k_{La}$  para cada condición experimental.

$$\frac{C^* - C}{C^* - C_{t=0}} = \exp(-k_{La} * t) \quad (1)$$

**Determinación del  $k_{La}$  en cultivos empleando la técnica dinámica** (Kawase *et al.*, 1992; Zhang y Thomas, 1996; Montes *et al.*, 1998). Cuando el cultivo se encuentra en fase exponencial de crecimiento, se suspende el suministro de aire permitiendo que se reduzca la concentración de oxígeno disuelto hasta un valor cercano a la concentración crítica, en este momento se permite la reaireación bajo las condiciones de operación evaluadas, obteniendo curvas como la descrita en la figura 3. Las curvas obtenidas fueron modeladas en la zona I para la determinación de la demanda de oxígeno  $OUR_x$ , y en la zona II, integrando la expresión para la zona de reaireación para calcular el  $k_{La}$  en una ecuación de la forma:

$$C_L = A + B \exp(\alpha t) = \%OD \quad (2)$$

En esta ecuación A y B son constantes,  $\alpha$  es una constante que corresponde a  $-k_{La}$ . El ajuste de los datos experimentales a la ecuación se realizó con ayuda del programa Data Fit 9 (Oakdale Engineering, versión libre, 2002).



**Figura 3.** Curva característica para la determinación del valor de  $k_{La}$  por el método dinámico para cada condición de fermentación evaluada.

Esta técnica presenta algunas restricciones tales como la dependencia del tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno disuelto, el cual debe ser menor a  $1/k_{LA}$ , en el presente trabajo se verifica que el electrodo cumpla esta condición.

### Diseño experimental

Para el desarrollo de la evaluación hidrodinámica del sistema de aireación externo se planteó el modelo factorial no balanceado de efectos fijos (Montgomery, 1997) correlacionando las variables que afectan las condiciones de transferencia de oxígeno con el  $k_{LA}$ . Se

seleccionaron dos factores, el flujo de recirculación del líquido (FR) y flujo de aire (FA), y tres covariables, la presión manométrica en el difusor (PA), la agitación (A) y la temperatura (T). Para emplear este modelo se establecen las combinaciones totales posibles de los niveles en los factores FA y FR. Para la evaluación de las covariables (PA, A y T) se tiene en cuenta que desarrollar el modelo completo implicaría un total de 128 ensayos, por lo que se opta por sesgar, partiendo de algunas combinaciones iniciales de FR y FA y haciendo la variación de los parámetros de las covariables una a la vez. La tabla 2 corresponde las condiciones evaluadas en los experimentos realizados de acuerdo con la metodología de diseño experimental.

**Tabla 2.** Diseño experimental para evaluar el SFAE: factores (FR y FA) y covariables (agitación, presión manométrica en el difusor y la temperatura)

Corrida	FR (CPM)	FA (vvm)	Agitación (CPM)	Presión (psi)	Temperatura (°C)
1	1,73	0,65	154	3	18
2	1,30	0,65	154	2	18
3	0,87	0,65	154	0	18
4	0,45	0,65	154	0	18
5	1,73	1,00	154	4	18
6	1,30	1,00	154	3	18
7	0,87	1,00	154	0	18
8	0,45	1,00	154	0	18
9	0,45	1,00	283	0	18
10	0,87	1,00	283	0	18
11	0,45	0,65	154	10	18
12	0,45	0,65	154	15	18
13	0,45	0,65	154	20	18
14	0,45	0,65	154	0	30
15	0,45	0,65	154	10	30

## Resultados y análisis

### Determinación del $k_{LA}$ en el fermentador convencional empleando agua

En la tabla 3 se presentan valores obtenidos para el  $k_{LA}$ , empleando el fermentador convencional y agua como medio. Los resultados indican que el valor de  $k_{LA}$  presenta una alta dependencia con las condiciones de aireación y agitación. El valor máximo alcanzando corresponde a las condiciones extremas de 1 volumen de aire/volumen de medio·minuto (vvm) y 300 rpm, con un coeficiente de transferencia de 40,68 ( $\text{h}^{-1}$ ). Se determinó el tiempo muerto (0,419 s) y el tiempo de respuesta del electrodo de medición de oxígeno disuelto con el fin de evaluar el criterio de aceptabilidad. Se escogieron las condiciones extremas entre un tiempo de respuesta de 75 (s) y un  $k_{LA}$  de  $1,13 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $40,68 \text{ h}^{-1}$ ). La respuesta se considera adecuada si: ( $\tau < 1/ k_{LA}$ ), condición que se cumple por ser  $\tau = 75$  (s) y  $1/ k_{LA} = 82$  (s).

**Tabla 3.** Valores de  $k_{LA}$  obtenidos para el fermentador convencional al emplear agua y la técnica de desgasificación con nitrógeno

Ensayo	$k_{LA}$ ( $\text{h}^{-1}$ )
0,5 vvm - 200 rpm	20.16
1 vvm - 200 rpm	32.4
0,5 vvm - 300 rpm	28.44
1 vvm - 300 rpm	40.68

### Determinación del $k_{LA}$ en cultivos con *Lactococcus lactis* IBUN 34.1 realizados en el fermentador convencional

Para determinar el efecto de la aireación y la agitación en el fermentador convencional de tanque agitado y difusor interno, se evaluó la cinética de producción de biomasa en estas fer-

mentaciones y el comportamiento del pH. En la figura 4 se presentan los resultados para estas condiciones, estos indican que las condiciones de estandarización del inóculo resultaron adecuadas al obtener una concentración inicial de biomasa similar en los cultivos. Los resultados muestran que la biomasa final es dependiente de los parámetros evaluados (velocidades de agitación y aireación), en los ensayos realizados el mayor valor que se alcanzó corresponde a una velocidad de aireación de 1,75 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto) y una velocidad de agitación de 250 rpm (figura 4). El comportamiento del pH en el transcurso de las fermentaciones no se ve afectado para los niveles de aireación y agitación evaluados, manteniendo un comportamiento similar en todos los ensayos (figura 4).

En todos los cultivos con *Lactococcus lactis* IBUN 34.1 realizados en la fermentación convencional, la limitación de oxígeno persiste aún bajo las condiciones extremas, como se observa en la figura 5, donde el porcentaje de oxígeno disuelto llega a cero en la tercera hora de fermentación, que corresponde a la etapa inicial de la fase exponencial del cultivo. Bajo las condiciones de experimentación evaluadas para el fermentador convencional, no se logra satisfacer la demanda de oxígeno en el cultivo.

Los resultados indican que hay mayor incidencia en la transferencia de oxígeno por cambios en la agitación al compararlos con cambios en la aireación. El aumento de la concentración de biomasa debido al incremento en los niveles de aireación, indica que efectivamente al mejorar las condiciones de oxigenación se incrementa la productividad del cultivo.

### Evaluación del sistema de fermentación con aireador externo (SFAE)

**Diseño del aireador externo.** En la figura 2 se presenta el aireador externo en despiece y ensamblado y en la figura 1 el diagrama

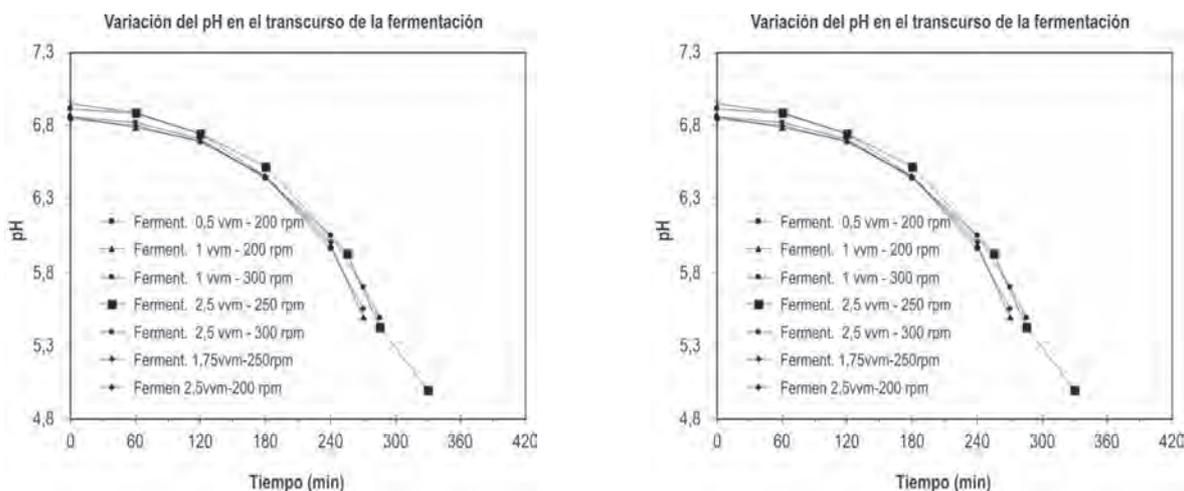


Figura 4. Cinéticas de crecimiento y variación de pH en cultivos con *Lactococcus lactis* IBUN 34.1 para diferentes niveles de oxigenación en el fermentador convencional.

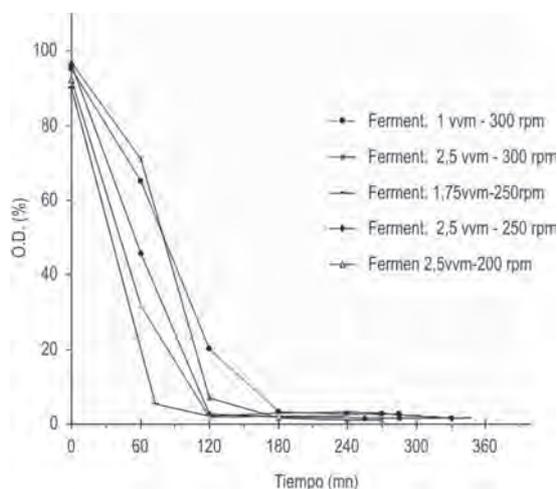


Figura 5. Variación del porcentaje de saturación de oxígeno disuelto en cultivos con *Lactococcus lactis* IBUN 34.1 realizados en fermentador convencional.

del SFAE. Los factores que se tomaron para caracterizar este sistema fueron:

- Flujo de gas (FA) medido en vvm.
- Flujo de líquido recirculado (FR) medido como número de veces que circula el medio contenido en el fermentador por el aireador externo por minuto (CPM).

Las covariables seleccionadas fueron:

- Agitación (rpm).
- Presión en el aireador externo (psi).
- Temperatura (°C).

Las variables respuesta fueron:

- pH
- Oxígeno disuelto.
- Biomasa.
- Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $k_{LA}$ .

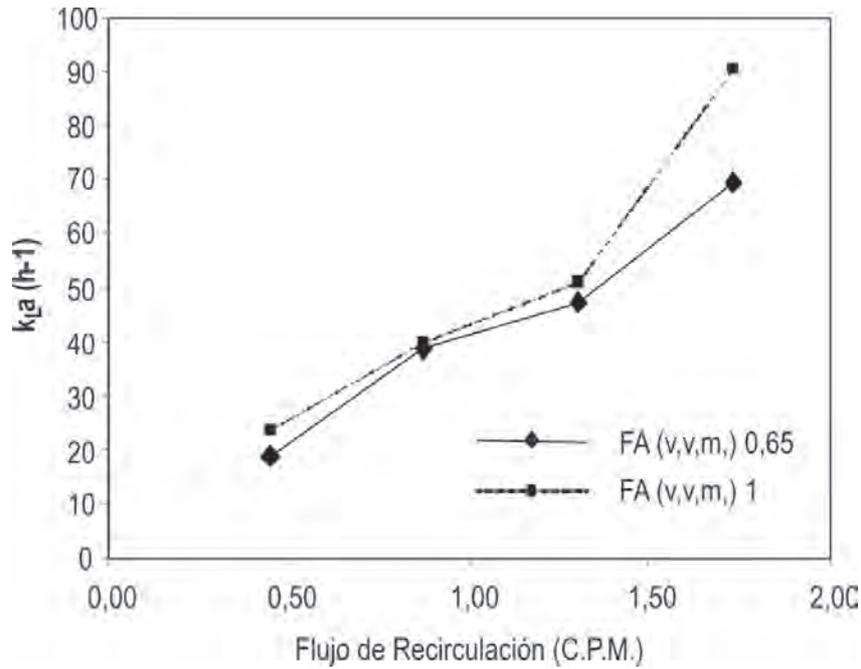
El volumen de medio se mantuvo constante durante los ensayos y la variable independiente fue el tiempo.

**Caracterización hidrodinámica.** Esta etapa del trabajo se realizó empleando agua como medio en el fermentador. El error ex-

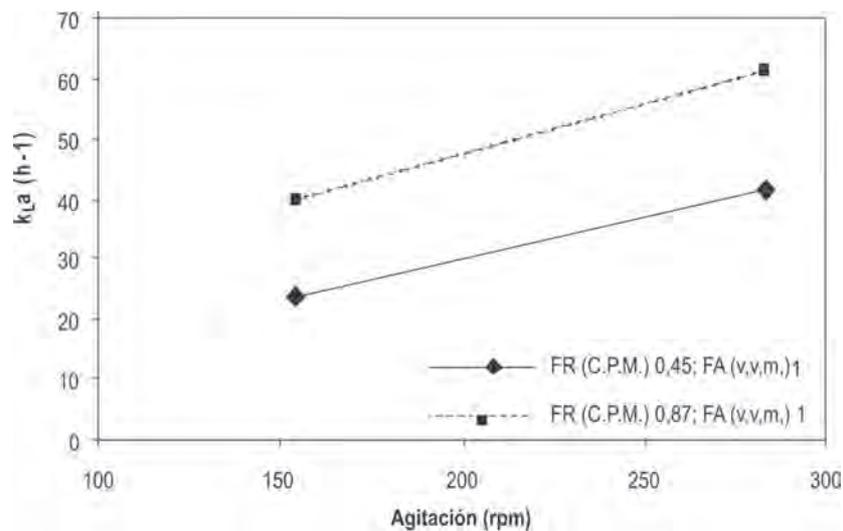
perimental se determina al realizar la técnica de medición del  $k_{LA}$  por triplicado en el punto central, correspondiendo a FR (Re/m) 0,87; FA (vvm) 0,65; agitación (rpm) 176 y temperatura (°C) 18, con lo cual se obtuvo un porcentaje de error relativo de 0,6%, suficientemente bajo para asegurar la estabilidad del sistema, en par-

ticular durante la etapa de desgasificación (zona 1 en la figura 3).

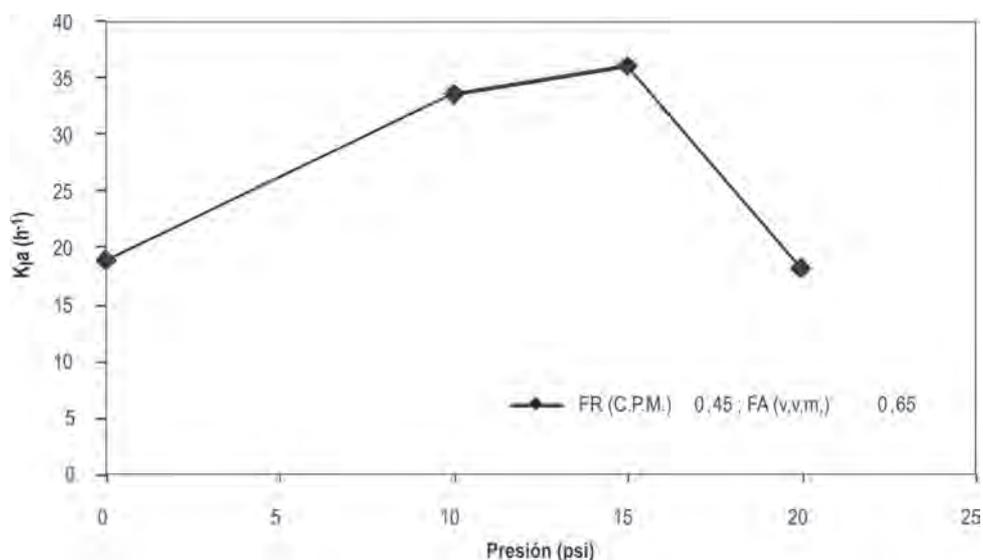
La figura 6 muestra la variación del  $k_{LA}$  con el flujo de recirculación (FR) y con el flujo de aire (FA), y la figura 7 muestra el efecto de la velocidad de agitación sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno.



**Figura 6.** Variación del  $k_{LA}$  con el flujo de recirculación y la velocidad de aireación.



**Figura 7.** Variación del  $k_{LA}$  con la agitación cuando el flujo de aire es de 1 vvm.



**Figura 8.** Variación del  $k_{La}$  con cambios de presión en el aireador externo para un flujo de recirculación de 0,45 CPM y un flujo de aire de 0,65 vvm.

En la figura 8 se muestra el efecto del cambio en la presión manométrica sobre el  $k_{La}$ , se observa una tendencia a incrementar el coeficiente hasta obtener un máximo a una presión manométrica de 15 psi. Cuando el sistema opera a una presión manométrica de 20 psi se presenta una disminución en el  $k_{La}$  que puede explicarse por inestabilidad del sistema, originada en la relación entre el flujo de recirculación y el flujo de aire, ya que este último se incrementa con la presión afectando la interfase gas-líquido, indicando que el flujo del líquido es insuficiente para el flujo de aire disponible.

La figura 7 muestra el efecto significativo que tiene la agitación sobre el  $k_{La}$ , indicando la importancia de este factor en el SFAE. Lo observado indica que la disponibilidad de oxígeno en el cultivo depende de la capacidad del fermentador de homogeneizar en la masa contenida el flujo de recirculado que retorna del aireador externo. La tendencia de los resultados en las figuras 6 y 7 indican que el efecto de la agitación es independiente del flujo de recirculación.

Teniendo en cuenta que en los ensayos con el SFAE se empleó un nuevo medidor de oxígeno disuelto, se evalúa nuevamente el cri-

terio de aceptabilidad por tiempo de respuesta en las condiciones extremas, entre un tiempo de respuesta  $\tau = 25,9$  (s) y el mayor  $k_{La}$  obtenido bajo las condiciones de FR (CPM) 1,73; FA (vvm) 1; agitación (rpm) 154 y temperatura ( $^{\circ}C$ ) 18, fue de  $0,0251 s^{-1}$  que corresponde a un valor de  $1/k_{La} = 39,84$  s; el tiempo muerto medido experimentalmente para el electrodo fue de 1,8 s. La respuesta se considera adecuada si: ( $\tau < 1/k_{La}$ ), condición que se cumple.

### Evaluación del sistema de fermentación con aireador externo en el cultivo con el *Lactococcus lactis* IBUN 34.1

#### Análisis estadístico

La tabla 4 presenta el análisis de varianza que permite determinar los efectos que son estadísticamente significativos. Esta tabla muestra la fuente de variabilidad, los grados de libertad asociados (DF), las sumas de cuadrados del error (Seq SS) ajustadas (Adj SS), y el error cuadrado medio ajustado (Adj MS). Una variable tiene efecto estadísticamente significativo, al 10% de significancia, si su valor  $p$  es menor

a 0,1. Bajo las condiciones de experimentación se encontró que los dos factores, agitación (FA) y flujo de recirculación (FR), afectan significativamente el valor de  $k_{LA}$ .

### Comportamiento de los cultivos en el SFAE

Las fermentaciones en el SFAE, realizadas de acuerdo con el diseño experimental, presentan curvas de crecimiento características para el cultivo y niveles de biomasa final similares a los alcanzados en cultivos realizados en el fermentador convencional.

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos para los cultivos, así como los valores obtenidos para la demanda de oxígeno y el  $k_{LA}$ . La demanda de oxígeno aumenta a medida que se incrementa la concentración de biomasa. Los experimentos se realizaron en dos cultivos, los ensayos 1 al 6 en el primero, y en el segundo la réplica del ensayo 6 y los ensayos 7 y 8. La disminución en la deman-

da de oxígeno que se presenta en los ensayos 4 y 5, puede obedecer a la muerte de parte de la biomasa debida a las sucesivas disminuciones en la concentración de oxígeno y/o a los cambios en las condiciones de operación a que se sometió el cultivo. El ensayo 6 corresponde a la mayor concentración de biomasa alcanzada en este primer cultivo, en un valor ubicado en el extremo superior de la fase exponencial. Esta carga acumulativa no afecta la determinación de cada coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, puesto que en el modelamiento puntual de la zona de reaireación la demanda de oxígeno y el  $k_{LA}$  son respuestas dependientes de la eficiencia en la transferencia de oxígeno del SFAE. Con el fin de verificar la reproducibilidad entre los ensayos de un lote y el siguiente, se realiza una réplica del ensayo 6 para una concentración de biomasa que corresponde a la etapa inicial de la fase exponencial, obteniéndose un error del 1,6% en la determinación del  $k_{LA}$ , lo que indica que el modelo experimental presenta aceptable reproducibilidad.

**Tabla 4.** Análisis de varianza para  $k_{LA}$  ( $h^{-1}$ ), usando el ajuste de las sumas de cuadrados del error SS para los ensayos

	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	p
Fuente de variabilidad						
Agitación (rpm)	1	220,73	325,96	325,96	4,77	0,065
Presión (psi)	1	152,04	129,26	129,26	1,89	0,211
Temperatura (°C)	1	416,81	29,62	29,62	0,43	0,531
FR (CPM)	3	4369,60	4110,31	1370,10	20,04	0,001
FA (vvm)	1	90,28	90,28	90,28	1,32	0,288
Error	7	478,51	478,51	68,36		
Total	14	5727,97				

**Tabla 5.** Demanda de oxígeno y  $k_{La}$  determinados por la técnica dinámica en el SFAE

Ensayo	Condiciones de operación			Biomasa (mg/ml)	Zona I	Zona II			
	FR (CPM)	FA (vvm)	Presión (psi)		OURx (%OD/s)	R <sup>2</sup>	A	B	$k_{La}$ (h <sup>-1</sup> )
1	0,45	0,65	1	0,8	0,2428	0,9958	59,9	-52,15	28,54
2	0,87	0,65	1	1,25	0,4892	0,9958	87,88	-77,08	46,88
3	1,30	0,65	3	1,9	0,5527	0,9986	70,47	-60,18	48,84
4	0,87	1,00	3	2,3	0,3294	0,999	61,77	-53,55	36,53
5	1,30	1,00	3	2,8	0,3968	0,9993	74,43	-65,54	45,97
6	0,87	0,65	10	3,25	0,5424	0,995	68,33	-64,89	48,10
6	0,87	0,65	10	0,75	0,4458	0,996	68,42	-48,99	49,75
7	1,30	0,65	10	2,2	0,4373	0,998	81,75	-63,53	63,18
8	0,87	0,65	14	3,46	0,5315	0,997	75,15	-56,79	52,92

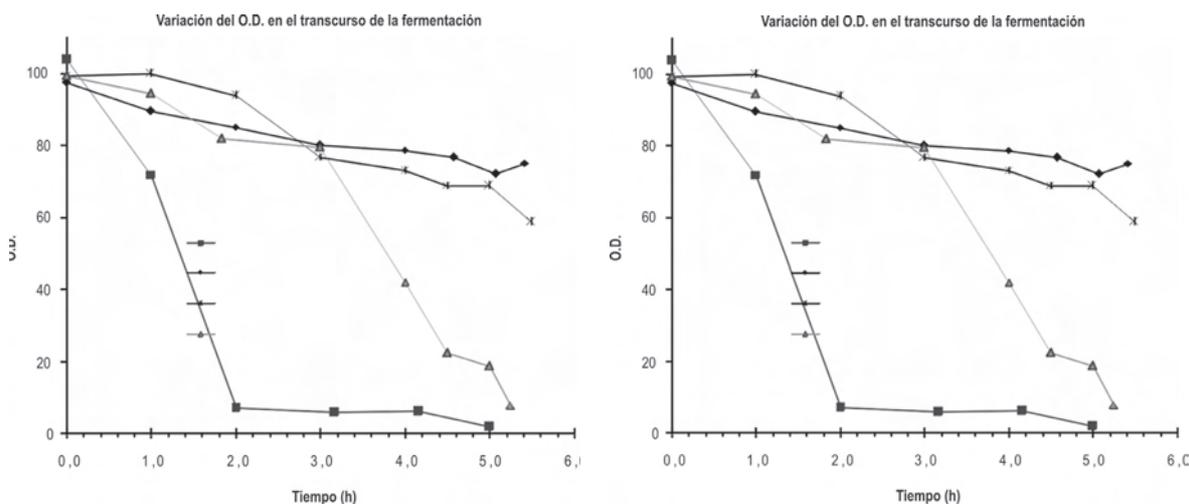
Los valores de  $k_{La}$  obtenidos por el método dinámico concuerdan con los resultados de la etapa anterior, las variables que tienen mayor incidencia sobre este coeficiente son el flujo de recirculación FR y la presión. Con el propósito de validar este resultado se realiza una fermentación con el SFAE, seleccionando como condiciones de operación un nivel medio que aporte un valor de  $k_{La}$  mayor a los obtenidos en el fermentador convencional. De esta manera, se seleccionaron las condiciones que corresponden al ensayo 6 y se desarrolló la fermentación. Adicionalmente, se desarrolló una fermentación con los niveles más bajos en las variables estudiadas (FR y FA).

Como se observa en la figura 9, los resultados obtenidos para estos ensayos presentan curvas de crecimiento similares a las obtenidas con el sistema convencional, y no presentan diferencias significativas para las condiciones

evaluadas. Con los niveles de las variables en el menor valor, en el cultivo se presenta limitación de oxígeno a partir de la hora dos, mientras que con la condición propuesta se logra mantener el oxígeno disuelto en concentraciones cercanas al 60% de saturación durante toda la fermentación, eliminando la limitación de oxígeno durante el cultivo.

### Conclusiones

Para las condiciones evaluadas en los ensayos realizados con el fermentador convencional, de tanque agitado y difusor interno, se presentó en todos los ensayos limitación de oxígeno en los cultivos. Sin embargo, se comprobó que cuando se incrementa la transferencia de oxígeno se presentan incrementos en los parámetros de evaluación del cultivo. Asimismo, se corroboró que se presentan mayores



**Figura 9.** Cinéticas de crecimiento microbiano y variación del porcentaje de saturación de oxígeno en el SFAE con FA de 0,65 vvm; FR de 0,45 CPM y 0,87 CPM; presión de 10 psi; agitación de 154 rpm y temperatura de 30 °C.

incrementos en el  $k_{LA}$  por aumento en la agitación en comparación con los obtenidos con incrementos en la velocidad de aireación.

En la caracterización hidrodinámica del sistema de fermentador con aireación externa (SFAE) las variables determinantes en la transferencia de oxígeno son el flujo de recirculación (FR) y la velocidad de agitación en el reactor, aumentando el  $k_{LA}$  de un máximo obtenido en el fermentador convencional de 40,68 ( $\text{h}^{-1}$ ) hasta valores de 63,18 ( $\text{h}^{-1}$ ) con el SFAE.

El SFAE es un modelo de fermentador de alta tasa de transferencia de oxígeno si se compara con el sistema convencional, logrando mayores valores de  $k_{LA}$ .

En la fermentación con el SFAE operando con un flujo de recirculación de 0,87 (CPM), una aireación de 0,65 vvm y una presión de 10 psi, se logra una condición de operación que elimina la limitación de oxígeno en los cultivos con el *Lactococcus lactis* IBUN 34.1.

## Referencias bibliográficas

Bandaiphet, C., Prasertsan, P. 2006. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient,

$k_{LA}$  in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. Carbohydrate Polymers 66 (2, 27): 216-228.

Calderbank, P. H., Moo-Young, M. B. 1961. The power characteristic of agitators for the mixing of Newtonian and non-Newtonian fluids. Trans Inst Chem Eng 39: 337-347.

Cockx, A., Line, R. M., Hebrard, A. 1995. Modeling of mass transfer coefficient  $k_L$  in bubble columns. Trans Inst Chem Eng 73: Part A, 627-631.

Deckwer, W. D., Schumpe, A. 1993. Improved Tools for bubble column reactor design and scale-up. Biochemical Engineering div. GBF – Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, W-3300 Braunschweig. Chem Eng Process 48 (5): 889-911.

Eickenbusch, H., Brunn, P. O., Schumpe, A. 1995. Mass transfer into viscous pseudoplastic liquid in large-diameter bubble columns. Chem Eng Process 34: 479-485.

Gaddis, E. S. 1999. Mass transfer in gas-liquid contactors. Chem Eng Process 38: 503-510.

Galaction, A. I., Cascaval, D., Oniscu, C., Turnea, M. 2004. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. Biochem Eng J 20: 85-94.

García Ochoa, F., Gomez, E. 2005. Prediction of gasliquid mass transfer in sparged stirred tank bioreactors. Biotech Bioeng 92: 76172.

- Kawase, Y., Halard, B., Moo-Young, M. 1992. Liquid-phase mass transfer coefficients in bioreactors, *Biotechnol Bioeng* 39: 1133-1140.
- Kwon, G. S., Moon, S. H., Hong, S. D., Lee, H. M., Mheen, T. I., Oh, H. M. 1996. Rheological properties of extracellular polysaccharide, Pestan, produced by *Pestalotiopsis* sp. *Biotechnol Lett.* 18: 1465-1470.
- Merchuk, J. C., Siegel, O. G., Shacham, M. 1992. A Method for Evaluation of Mass Transfer Coefficients in the Different Regions of Air Lift Reactors. *Chem Eng Sc* 47: 2221-2226.
- Montes, F. J., Catalan, J., Galan, M. A. 1998. Prediction of  $k_{La}$  in yeast broths. *Process Biochem* 34: 549-555.
- Montgomery, D. C. 1997. *Design and Analysis of Experiments*. 5th ed. New York: John Wiley & Sons. pp. 303-349.
- Perez, J.F., Sandall, O. C. 1974. Gas absorption by non-Newtonian fluids in agitated vessels. *AIChE J* 20: 770-775.
- Pinheiro, R., Mota, B. I. 2000. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 756-762.
- Rushton, J. H., Costich, E. W., Everett, H. J. 1950. Power characteristics of mixing impeller. *Chem Eng Prog* 46: 395-404.
- Soler, A. P. 2009. Evaluación de un sistema de aireación externo en la fermentación con *Lactococcus lactis* IBUN 34.1. Trabajo para optar el título de Magíster en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Vanegas, O.L. 2006. Evaluación de los componentes del medio de cultivo y su influencia sobre la producción de la enzima glucansacarasa obtenida por fermentación de la cepa *Lactococcus lactis* IBUN 34.1. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Weber, J., Agblevor, F. A. 2005. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Process Biochemistry* 40: 669-676.
- Zhang, Z., Thomas, C. R. 1996. Eddy number distribution in isotropic turbulence and its application for estimating mass transfer coefficients. *Chem Eng Commun* 140: 207-217.