

Desarrollo de un software para la caracterización de matraces y fermentadores agitados mecánicamente

César Reyes^{1*}, Ketzasmin Terrón², Rodolfo Reynoso¹, Humberto Rubí¹, Salvador Chávez¹,
Hebert Jair Barrales-Cureño¹ y L. Germán López-Valdez³

Ingeniería en Biotecnología¹, Facultad de Ciencias², Preparatoria Agrícola³
Universidad Politécnica del Valle de Toluca¹, Universidad Autónoma del Estado de México²,
Universidad Autónoma Chapingo³
Almoloya de Juárez¹, Toluca², Texcoco³; Méx.; México
cesarey2003@yahoo.com.mx^{1*}, ket.a.t.m@gmail.com², lgermanlv@gmail.com³

Abstract— A software based in *Phyton* was developed with a basic correlations used commonly for the development of a Bioprocesses Technology. The software was named “*Software Simulator Bio Process (SSBP)*” the program language used was *Phyton* which is one of the most used in the informatics world. This software is able to determine automatically basic engineering parameters in shake flasks and stirred tank fermenters, the most used bioreactors in Biotechnology industry, research bioprocess and academic world. In the case of shake flasks at each specific condition of agitation rates and filling volumes the software estimated automatically parameters for complete the characterization of the system, such as: (P/V) = aerated bulk power, (Re) = number of Reynolds, $(k_L a)$ = volumetric oxygen transfer coefficient, (tm) = mixing time, (λ) = size of the eddy on the scale of Kolmogorov, (γ) = average speed cut, (τ) = effort average cut and (OTR) = oxygen transfer rate.

Keyword— *Software Simulator Bio Process, shake flasks, stirred tank fermenter, Phyton, characterization, bioprocess technology, automatically.*

Resumen— Se desarrolló un software basado en lenguaje *Phyton*, utilizando correlaciones comunes en Tecnología de Bioprosesos. A este software, lo hemos llamado “*Software Simulator Bio Process (SSBP)*”. El lenguaje *Phyton*, es uno de los más usados en el campo de la informática. Este software es capaz de determinar parámetros básicos de ingeniería en matraces y fermentadores agitados mecánicamente, los cuales, son los más comunes en la industria Biotecnológica, investigación en bioprosesos y en la academia. En el caso de los matraces agitados a cada condición específica de velocidad de agitación y volúmenes de trabajo, el software estima automáticamente los parámetros para la completa caracterización del sistema tales como: (P/V) = Potencia volumétrica gaseada, (Re) = Número de Reynolds, $(k_L a)$ = Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, (tm) = Tiempo de mezclado, (λ) = Tamaño de la eddy en la escala de Kolmogorov, (γ) = Velocidad de corte promedio, (τ) = Esfuerzo de corte promedio y (OTR) = Velocidad de transferencia de oxígeno.

Palabras claves—*Software Simulator Bio Process, matraces agitados, fermentadores mecánicamente agitados, Phyton, caracterización, tecnología de Bioprosesos, automáticamente.*

I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día en la industria biofarmacéutica, la fermentación es extremadamente importante en el desarrollo de nuevos metabolitos, para lograr esto, los ingenieros y biotecnólogos utilizan matraces y fermentadores agitados mecánicamente, donde se asegura que el oxígeno y los nutrientes estén disponibles para las células o microorganismos. El diseño y escalamiento de un bioproseso comienza con cultivos llevados a cabo en matraces agitados. Los matraces agitados son los biorreactores más usados en la academia y en la industria, principalmente para el desarrollo de nuevos bioprosesos. Existe una gran variedad de tareas por las cuales los matraces agitados mecánicamente son usados, por ejemplo, probar nuevas cepas con características bioquímicas específicas, desarrollo de nuevas cepas que fueron modificadas por mutación y seleccionadas con alguna característica especial, desarrollo de bioprosesos usando microorganismos recombinantes, prueba de cepas que han sido metabólicamente modificadas por ingeniería de rutas metabólicas, desarrollo y optimización de medios de cultivo, establecer protocolos analíticos, optimizar concentración de inóculo, temperatura, pH, tiempo de cultivo, y evaluación de datos cinéticos [1], [2]. Los resultados de bioprosesos desarrollados en matraces

agitados también han sido usados como criterio de escalamiento a fermentadores agitados mecánicamente, usando como criterio el consumo específico de potencia [3].

Una vez optimizado un bioproceso en matraces agitados, este puede ser escalado a un biorreactor de laboratorio, planta piloto y/o industrial, pero antes de ello es necesario caracterizarlos [4], [5]. Estos parámetros incluyen el consumo específico de potencia, velocidad en la punta del impulsor, tiempo de mezclado, transferencia de masa o alguna combinación de estas [6]. Los criterios de escalamiento comúnmente usados en reactores agitados consisten en mantener constante –en las diversas escalas- uno de los siguientes parámetros [7]: potencia volumétrica (P/V), tiempo de mezclado (t_m), velocidad en la punta del impulsor (T_{tip}), coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) y el número de Reynolds (Re). Por ejemplo, para los cultivos sensibles a los esfuerzos de corte (microorganismos filamentosos, células animales) mantener la velocidad en la punta de impulsor resulta uno de los criterios más adecuados [8]. En cambio, para cultivos reológicamente complejos, éste criterio no es del todo adecuado, ya que requiere del suministro suficiente de potencia para asegurar un mezclado homogéneo. Sin embargo, muchos investigadores aún no han llegado a un acuerdo sobre cuál de estos parámetros debería mantenerse constante para el escalamiento de un bioproceso [9], [10], [11], [12].

Los biorreactores agitados mecánicamente son los reactores más utilizados en la industria de los bioprocesos, a pesar de ello, su geometría varía, por ejemplo; la relación entre la altura y el diámetro del tanque varía de 2:1 y 6:1 ello es debido a la cantidad de calor que se desea remover [13]. Sin embargo, la parte más difícil de su diseño es predecir a través de correlaciones empíricas la capacidad de la demanda de oxígeno en cualquier fermentación [14], [15]. Algunos protocolos y métodos experimentales nos indican cómo mejorar la transferencia de oxígeno en biorreactores y existen un gran número de correlaciones empíricas en la literatura que nos permiten hacer predicciones sobre la caracterización y eficiencia de un biorreactor. Sin embargo, todo lo anterior no nos indica a detalle de la geometría del fermentador (diámetro de impulsores o geometría de los baffles, entre otros).

Así, las correlaciones que se usaron para el desarrollo del *Software Simulator Bioprocess (SSBP)* son las más comúnmente usadas en ingeniería de bioprocesos. Para el suministro de potencia, el *SSBP* demostró la determinación de datos muy parecidos a los experimentales (matraces de 500 mL con 20, 50 y 80 mL de volumen de trabajo y agitados a diferentes rpm's). Para el caso de fermentadores agitados mecánicamente, se acudió a la medición experimental del suministro de potencia en dos biorreactores a través de un dinamómetro [16]; en fermentadores de 1 y 10 litros. A partir de ello se introdujeron en el *SSBP* las correlaciones empíricas más comunes para caracterizar a un fermentador (suministro de potencia, número de Reynolds, tiempo de circulación, coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, tiempo de mezclado y velocidad de transferencia de oxígeno).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El programa necesita de datos iniciales que dependen del volumen y geometría de los matraces agitados. De acuerdo al diseño del *Software Simulator Bio Process (SSBP)* se deben ingresar datos iniciales en la plataforma, tales como: densidad, velocidad de agitación, diámetro máximo del matraz, viscosidad del cultivo, diámetro de las células a cultivar, volumen nominal y volumen de trabajo. El software caracteriza automáticamente a los matraces; logrando determinar los siguientes parámetros de fermentación: Consumo de potencia volumétrica (P/V), número de Reynolds (Re), tamaño de la *eddy* (λ), gradiente de deformación (τ), velocidad de corte (γ), tiempo de mezclado (t_m), coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) y velocidad de transferencia de oxígeno (OTR). Ver Tabla I.

Tabla I. Plataforma de *Software Simulator Bio Process (SSBP)* para la caracterización de matraces agitados

Condiciones iniciales		Caracterización de los matraces agitados	
Densidad (kg/m ³)	_____	P/V (W/L)	_____
Velocidad de agitación (rpms)	_____	Re (-)	_____
Diámetro máximo (m)	_____	λ (m)	_____
Viscosidad (Pa*s)	_____	τ (mN/m ²)	_____
Tamaño celular (m)	_____	γ (s ⁻¹)	_____
Volumen nominal (m ³)	_____	Tm (s)	_____
Volumen de trabajo (m ³)	_____	k _L a (h ⁻¹)	_____
		OTR (mg O ₂ /l.h)	_____

Para el caso de la caracterización de fermentadores agitados mecánicamente, se introducen datos iniciales, tales como: densidad, número de potencia del impulsor, velocidad de agitación, relación potencia gaseada/no gaseada, volumen de aire/volumen de líquido por minuto (VVM's), viscosidad inicial, volumen del líquido, altura del líquido, diámetro del impulsor y altura del impulsor; para obtener: Consumo de potencia (Pg/P), flujo del gas (Fg), número de aireación (Na), número de Reynolds (Re), coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La), velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), tiempo de circulación (Tc) y tiempo de mezclado (Tm). Ver Tabla II.

Tabla II. Plataforma del *Software Simulator Bio Process (SSBP)* para la caracterización de fermentadores mecánicamente agitados

Condiciones iniciales		Caracterización del biorreactor	
Densidad (kg/m ³)	INPUT=	P/V no gaseada (W/L)	_____
Número de potencia (-)	_____	Potencia gaseada (W/L)	_____
Velocidad de agitación (rpms)	_____	Flujo del gas (m ³ /s)	_____
Pg/P (-)	_____	Velocidad superficial (m/h)	_____
VVMs (min ⁻¹)	_____	Número de aireación (-)	_____
Viscosidad (Pa*s)	_____	Número de Reynolds (-)	_____
Volumen del líquido (L)	_____	k _L a (h ⁻¹)	_____
Altura del líquido (m)	_____	OTR (mg O ₂ /l.h)	_____
Diámetro del impulsor (m)	_____	Tiempo de circulación (s)	_____
Altura de las paletas del impulsor (m)	_____	Tiempo de mezclado (s)	_____

Ecuaciones usadas para el desarrollo del *Software Simulator Bioprocess (SSBP)*

Caracterización de matraces agitados: Para el suministro de potencia se utilizó la Ec. propuesta por [3]:

$$\frac{P}{V_L} = \frac{C\rho n^3 d^4 \text{Re}^{-0.2}}{V_L^{2/3}} \quad (1)$$

Donde Reynolds (Re) se obtiene a partir de la Ec. 2

$$\text{Re} = \frac{\rho n d^2}{\mu} \quad (2)$$

Para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (Ec. 3), se usa la ecuación propuesta por [17].

$$k_L a = 0.141 n^{0.88} \left(\frac{V_L}{V_o} \right)^{-0.8} \quad (3)$$

La velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), mediante la siguiente correlación:

$$\text{OTR} = k_L a (C_g^* - C_L) \quad (4)$$

Para encontrar una correlación entre el consumo de potencia y el tiempo de mezclado, la correlación aplica para regímenes turbulentos ($\text{Re} > 4000$) [18]:

$$T_m = 1.74 \left(\frac{P_g}{V_L} \right)^{0.58} \quad (5)$$

La velocidad de la energía de disipación en matraces agitados se considera uniforme, este parámetro nos ayuda a determinar el estrés hidrodinámico que causa un fluido sobre una célula y depende del tamaño de la *eddy* (λ), usualmente medida por la microescala de Kolmogorov en un flujo turbulento y está relacionada con la energía de disipación (ε) como sigue [19], [20]:

$$\lambda = \left(\frac{\mu}{\rho} \right)^{3/4} \varepsilon^{-1/4} \quad (6)$$

Donde μ y ρ se refieren a la viscosidad y densidad del cultivo respectivamente. La velocidad promedio de disipación de energía ε se calcula a partir de la siguiente ecuación [21]:

$$\varepsilon = \frac{1.94 n^3 d^4}{V_L^{2/3} \text{Re}^{-0.2}} \quad (7)$$

Donde n es la velocidad de agitación, d es el diámetro máximo del matraz, V_L es el volumen del líquido y Re es el número de Reynolds. Finalmente, el esfuerzo de corte promedio (τ_t) y velocidad de corte (γ) dentro de las paredes internas del matraz se determina de acuerdo con las siguientes correlaciones [21]:

$$\tau_t = 0.0676 \left(\frac{d_p}{\lambda} \right)^2 (\rho u \varepsilon)^{0.5} \quad (8)$$

$$\gamma = \frac{\tau_t}{\mu} \quad (9)$$

Donde d_p es el diámetro de la célula.

Caracterización de fermentadores agitados mecánicamente:

Se determinó experimentalmente el suministro de potencia en los fermentadores de 1 y 10 litros, a estos se les adaptó una base para poder montarlos en un dinamómetro de cojinete neumático [16]. Este tipo de dinamómetro permite la determinación de torque de reacción debido a la rotación del impulsor inmerso en el fluido. Una celda detecta la fuerza de reacción. Con la ayuda de ésta y el brazo de palanca, se calcula el torque de reacción. El torque relaciona el brazo de palanca utilizado y la fuerza suministrada, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$M = F * B \quad (10)$$

La potencia se relaciona con el torque (M) transmitido por el impulsor de acuerdo a la siguiente relación:

$$P = \omega * M \quad (11)$$

Donde

$$\omega = 2\pi N \quad (12)$$

Las mediciones se llevaron a cabo en 2 fermentadores mecánicamente agitados de dos volúmenes diferentes. El primero es un fermentador de 1.5 L (Virtis) con dos turbinas Rushton de 6 paletas con un diámetro de 0.05 m (D/T = 0.5) con un litro de volumen de trabajo (agua). El segundo fermentador fue de 14 litros (New Brunswick Scientific, modelo Microferm) con tres turbinas Rushton de 6 paletas con un diámetro de 0.105 (D/T=0.5) con 10 litros de volumen de trabajo (agua).

Una vez determinado el suministro de potencia de forma experimental, se ajustó a la siguiente ecuación para determinar el consumo de potencia en fermentadores de diferentes escalas: desde laboratorio a industriales.

$$\frac{P}{V} = \frac{P_o \rho N^3 D_i^5}{V} \quad (13)$$

Para estimar el suministro de potencia en fermentadores de mayor tamaño a este estudio, en la plataforma del *Software Simulator Bio Process (SSBP)* se anexan los siguientes datos: altura del líquido, velocidad de agitación, diámetro del impulsor, velocidad de aireación (VVM's), volumen del líquido,

densidad y el número de potencia, de acuerdo al tipo de impulsores con que este instrumentado el fermentador.

Para determinar si el fermentador se encuentra operando en flujo turbulento, laminar o en transición se utilizó el número de Reynolds (Re)

$$\text{Re} = \frac{\rho N D_i^2}{\mu} \quad (14)$$

Para estimar el flujo del gas (F_g) en el fermentador se aplica la siguiente correlación:

$$F_g = (VVM's)(V) \quad (15)$$

Una vez calculado el flujo del gas posible obtener la velocidad superficial:

$$V_s = \frac{F_g}{A} \quad (16)$$

con:

$$A = \left(\frac{\pi}{4}\right)(D_t)^2 \quad (17)$$

El número de aireación (N_a) se obtiene a través de la siguiente ecuación:

$$N_a = \frac{F_g}{N D_i^3} \quad (18)$$

Para determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, usamos [22]:

$$k_L a = 2 \times 10^{-3} \left(\frac{Pg}{V}\right)^{0.6} (Vs)^{0.667} \quad (19)$$

Se determinó experimentalmente el $k_L a$ en el fermentador de 1 litro mediante la técnica de eliminación de gas [23]. Se utilizó agua a una temperatura de 29 °C, 0.8 VVM's, dos turbinas Rushton y un difusor de 4 orificios. La técnica se basa en la eliminación de oxígeno mediante burbujeo de nitrógeno en lugar de aire. Una vez que la concentración de oxígeno sea igual a cero, se airea de nuevo y se toman mediciones de la concentración de oxígeno a diferentes tiempos. Los valores se grafican de acuerdo a la ecuación:

$$\ln\left(1 - \frac{C_t}{C_{g^*}}\right) = -k_L a t \quad (20)$$

Donde al graficar el logaritmo del cambio de concentración de oxígeno contra el tiempo es igual a $-k_L a$ (Figura 1).

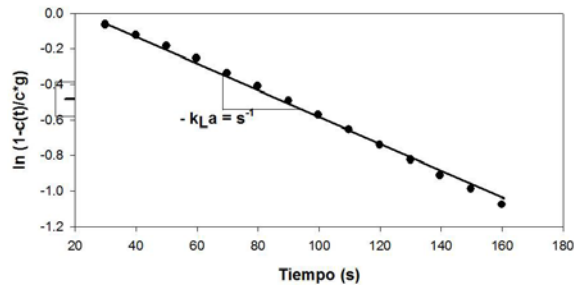


Figura 1. Gráfica que representa la velocidad de reemplazo de oxígeno por nitrógeno en la fase líquida del fermentador para determinar el $k_{L}a$.

Para el tiempo de circulación aplicamos la correlación:

$$T_c = \frac{V_c}{F_c} \tag{21}$$

Dónde:

$$V_c = (1/4)\pi D_i^2 H_L \tag{22}$$

$$F_c = V_{tip} \pi D_i H_i \tag{23}$$

Una vez obtenido el tiempo de circulación es fácil obtener el tiempo de mezclado (T_m):

$$T_m = 4t_c \tag{24}$$

Finalmente se obtiene la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), usando la ecuación (4)

III. RESULTADOS

Una de las funciones del simulador *Software Simulator Bio Process (SSBP)* es solamente introducir condiciones iniciales de cultivo y el *software* caracteriza automáticamente a los matraces agitados (de 25 mL a 1 L) y a biorreactores mecánicamente agitados de diferentes volúmenes. El suministro de potencia se determinó experimentalmente en fermentadores de 1.0 y 10.0 litros, mientras el $k_{L}a$ sólo se determinó por el método de eliminación de gases en el fermentador de 1.0 litro.

Caracterización de matraces agitados mecánicamente. El suministro de potencia en matraces agitados es a través del choque del líquido con las paredes del matraz, y a mayor velocidad de agitación a un volumen constante, esta se incrementa; lo mismo sucede con la velocidad de transferencia de oxígeno. Para determinar la viabilidad del *SSBP* se compararon los datos experimentales proporcionados por Büchs en el año 2001 (Comunicación personal) con los del *SSBP*. Para el caso de matraces de 500 mL con volúmenes de 20, 50 y 80 mL los datos no varían más del 5 % y son muy parecidos, por ejemplo a 300 rpm´s con 80 mL de volumen de trabajo, el suministro de potencia es de alrededor de 1.5 W/L medido experimentalmente, mientras el determinado por el *SBBP* fue de 1.7 W/L (Figura 2A), indicando que la diferencia no varía más de un 5 %. Las simulaciones en el *SSBP* sólo son válidas par viscosidades parecidas a las del agua (0.001 Pa·s) ya que a altas viscosidades se presenta un fenómeno

llamado “fuera de fase” [19], esto es que la altura del líquido en el matraz cae y por lo tanto el suministro de potencia es menor, teniendo efectos en la hidrodinámica, el mezclado, transferencia de oxígeno y en el estrés hidrodinámico.

Posteriormente comparamos el valor experimental del k_{La} medido por el método de sulfito en matraces de 250 mL de volumen nominal [17] a 200 y 250 rpm´s a varios volúmenes de trabajo y el resultado fue muy parecido (Figura 2B).

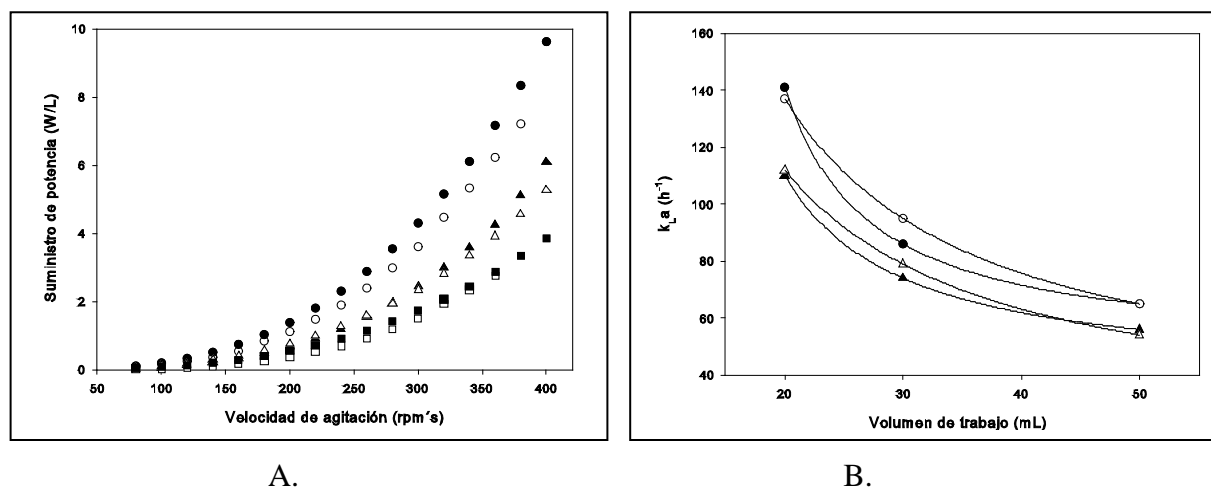


Figura 2. A. Determinación del suministro de potencia en matraces de 500 mL: con el *SSBP* (\circ 20 mL, Δ 50 mL y \square 80 mL) comparados con la determinación experimental por el método de [3] (\bullet 20 mL, \blacktriangle 50 mL y \blacksquare 80 mL)- datos proporcionados por Büchs en el 2001. B. Simulación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) en matraces de 250 mL con el *SSBP* (\circ , Δ) y determinación experimental (\bullet , \blacktriangle) por el método de sulfito de sodio, reportada por [17].

Al demostrar que no existen diferencias significativas en el valor del k_{La} y la potencia volumétrica en matraces de 250 mL, simulamos en el *SSBP* el comportamiento de matraces agitados de 500 mL a diferentes velocidades de agitación (Figura 3A y 3B). Por ejemplo a 200 rpm´s, con un volumen de 100 mL, se tiene un suministro de potencia de 0.38 W/L; mientras que el reportado experimentalmente fue de 0.3 W/L. Por otra parte, las simulaciones el cálculo del k_{La} a estas mismas condiciones (500 mL de volumen nominal, 100 mL de agua y 200 rpm´s) realizado con el *SSBP* con la ecuación reportada por [17] es de $31 h^{-1}$ (Figura 3B), el cual al hacer la estimación del k_{La} con otras correlaciones reportadas por otros autores resultan muy similares. Por ejemplo, [24] reporta valores de $27 h^{-1}$, [25] de $29 h^{-1}$, [26] de $25 h^{-1}$, [27] de $35 h^{-1}$, y finalmente [28] de $30 h^{-1}$. En todos los casos anteriores, a mayor volumen de trabajo y a una misma velocidad de agitación, el valor del k_{La} decreció.

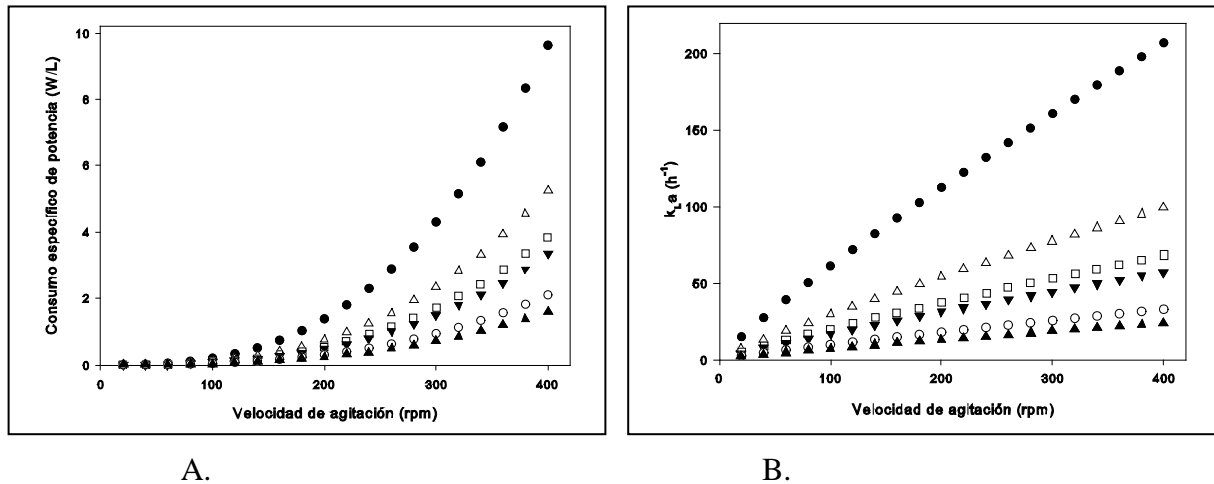


Figura 3. Simulación en el *SSBP* del comportamiento de un cultivo en matraces agitados: matraces de 500 mL a diferentes volúmenes de agua: (● 20 mL), (Δ 50 mL), (□ 80 mL), (▼ 100 mL), (○ 200 mL), (▲ 300 mL), y velocidades de agitación. **A.** Suministro de potencia (W/L), **B.** Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La).

Por otra parte, el *SSBP* puede determinar el valor los esfuerzos de corte (τ), velocidad de corte (γ), tamaño de la *eddy* (λ), todos estos parámetros están relacionados con el estrés hidrodinámico. Para ello se caracterizó por completo un cultivo con *Escherichia coli* ($2 \mu\text{m} = 2 \times 10^{-6} \text{ m}$) crecida en matraces agitados de 500 mL de volumen nominal, 100 mL de volumen de trabajo y 200 rpm's (Ver Tabla III). Los datos determinados corresponden al rango de los reportados por [21], para este caso los valores de γ , τ , ε y λ no son lo suficientemente altos para causar estrés hidrodinámico a *E. coli*, pero si para un cultivo de células animales. De acuerdo con [3], la ecuación que determina a ε solo tiene validez en regímenes de operación turbulentos ($\text{Re} > 10,000$), en cultivos de baja viscosidad, además se ha demostrado que la velocidad de energía de disipación está relacionada con el volumen de trabajo [21] en aproximadamente $V_L^{-2/3}$. Sin embargo, el estrés hidrodinámico generado en matraces agitados, comparados con fermentadores mecánicamente agitados, es de alrededor de 30-100 veces menor [29].

Tabla III. Caracterización de matraces con *SSBP*. 500 mL de volumen nominal, 100 mL de líquido a 200 RPM's.

<i>Condiciones iniciales</i>		<i>Caracterización de los matraces agitados</i>	
Densidad (kg/m ³)	1000	P/V (W/L)	0.47
Vel. de agitación (rpms)	200	Re (-)	36750
Diámetro máximo (m)	0.105	λ (m)	1.33x10⁻⁵
Viscosidad (Pa*s)	0.001	τ (mN/m ²)	56.4 x 10⁻³
Tamaño celular (m)	2 x 10⁻⁶	γ (s ⁻¹)	56.44
Volumen nominal (m ³)	5 x10⁻⁴	Tm (s)	1.133
Volumen de trabajo (m ³)	1 x10⁻⁴	k _L a (h ⁻¹)	31
		OTR (mg O ₂ /l.h)	217

Caracterización de biorreactores mecánicamente agitados de 1, 10 y 30 Litros. El *Software Simulator Bioprocess (SSBP)* fue usado para caracterizar a 3 reactores mecánicamente agitados de tres diferentes volúmenes. El primero es un fermentador de 1.5 L (Virtis) con dos turbinas Rushton de 6 paletas con un diámetro de 0.05 m ($D/T = 0.5$) con un litro de volumen de trabajo (agua). El segundo fermentador fue de 14 litros (New Brunswick Scientific, modelo Microferm) con tres turbinas Rushton de 6 paletas con un diámetro de 0.105 ($D/T=0.5$) con 10 litros de volumen de trabajo (agua). El tercer fermentador es de 43 L de volumen nominal (B. Braun, modelo Biostat UD) con tres turbinas Rushton de 6 paletas con un diámetro de 0.129 m ($D/T= 0.5$), con 30 litros de volumen de trabajo.

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) es muy importante en el rendimiento de una fermentación, así que el suministro adecuado de oxígeno siempre es importante a diferentes escalas [30]. Uno de los parámetros que más influyen en el k_{La} es el suministro de potencia, por ello la ecuación usada en el *SSBP* fue la correlación propuesta por [22] en donde también la velocidad superficial es tomada en cuenta, así como las constantes que dependen del k_{La} con la agitación y la constantes de dependencia del k_{La} con la dispersión del gas por el difusor. Una vez conocidos los valores de estas constantes, estas se introdujeron en el *SSBP*. Por otra parte, sabemos que existe una dependencia lineal entre la velocidad de agitación, el diámetro del impulsor y el número de potencia del impulsor. De esta manera, en la Figura 4A se muestran los valores experimentales del suministro de potencia gaseada (0.8 VVM's; de 100 a 700 rpm's) en el dinamómetro de los fermentadores de 1 y 10 litros, los valores son muy cercanos a los determinados con el *SSBP*. El resultado muestra que no existe una diferencia significativa entre ambas determinaciones, concluyendo que hasta ahora el *SSBP* puede ser usado, el menos para determinar consumo de potencia en fermentadores de laboratorio o de planta piloto.

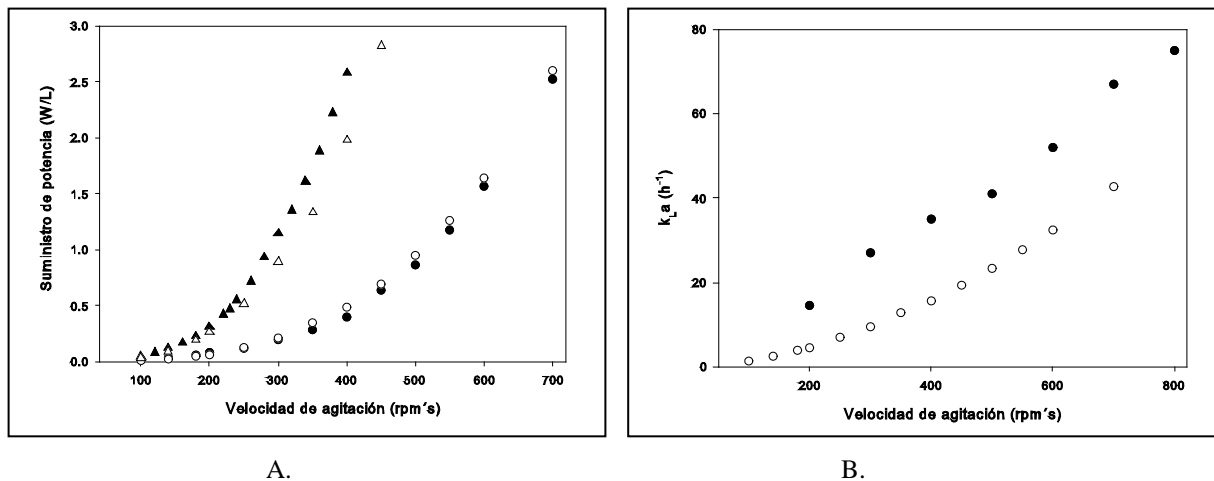


Figura 4. **A.** Determinación experimental del suministro de potencia en el fermentador de 1 (●) y 10 (▲) litros a diferentes velocidades de agitación medidos a través de un dinamómetro y el obtenido en el *SSBP*; 1 (○); y 10 (△) litros. **B.** Determinación experimental del k_{La} por el método de eliminación de gases (●) y por el *SSBP* (○) en el fermentador de 1 litro.

Por otra parte, la comparación de los valores del k_{La} , medidas experimentalmente por el método de eliminación de gases y el determinado con el *SSBP* usando la ecuación de [22], muestran una diferencia importante (Figura 4B). Sin embargo, existen varias publicaciones que reportan correlaciones para determinar la velocidad de transferencia de oxígeno [31], [32], [33], todas ellas muestran una diferencia en cuanto al valor del k_{La} en fermentadores agitados mecánicamente. Por ejemplo, [34] reportan valores de 60 h^{-1} de k_{La} en fermentadores de 2 litros agitado a 600 rpm's con 0.8 vvm's.

También, obtuvimos la simulación en el *SSBP* de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) y del tiempo de mezclado en los tres biorreactores analizados (Figura 5A y 5B) ya que el OTR es el parámetro más importante en el diseño, operación y escalamiento de bioprocesos. Así, el diseño

adecuado de un fermentador es importante para mantener la concentración de oxígeno homogénea, permitiendo mantener el crecimiento de las células y la formación de producto de manera óptima. La Figura 5B, muestra la simulación en el SSBP de los tiempos de mezclado; mostrando que los tiempos de mezclado son menores en el reactor de 10 y 30 litros (0.65 segundos para el fermentador de 1 litros y 0.54 segundos para el de 30 litros). Comparando estos tiempos de mezclado con matraces agitados, los tiempos máximos de mezclado para matraces, de una gran cantidad de experimentos, fueron de 2 segundos y 65 segundos usando una solución de PVP (Polivinilpirrolidona) con viscosidad de 38 mPa's [REF41]. Este tipo de mediciones de los tiempos de mezclado en matraces agitados con viscosidades parecidas a las del agua, confirman un buen mezclado en estos sistemas y se obtienen valores muy parecidos a los de los fermentadores agitados mecánicamente. Esto último fue demostrado con CFD (*Computational Fluid Dynamics*) reportado por [35].

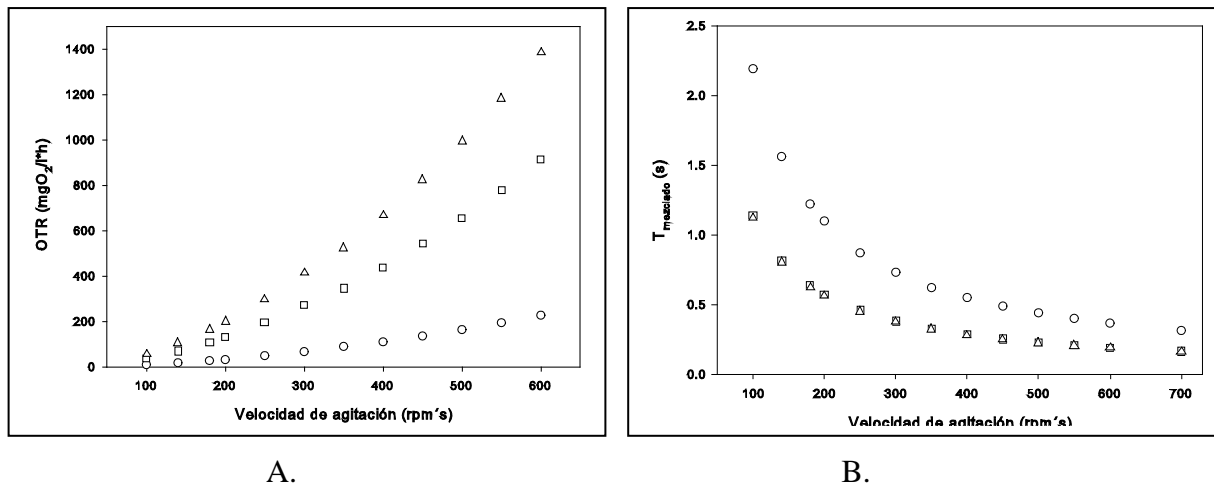


Figura 5. **A.** Determinación experimental experimental de velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) en los fermentadores agitados a diferentes rpms y 0.8 VVM's (○ 1 L, □ 10 L y Δ30 L). **B.** Simulación con SSBP de la velocidad de transferencia de oxígeno en los fermentadores agitados a diferentes rpms y 0.8 VVM's (○ 1 L, □ 10 L y Δ30 L).

Finalmente se muestra la caracterización completa del fermentador de 1 L agitado a 300 rpm's, 0.8 VVM's, con dos turbinas Rushton a través del SSBP (Tabla IV). Del lado izquierdo la plataforma se introducen las condiciones iniciales y el SSBP y este caracteriza automáticamente (P/V, Fg, Na, Re, $k_L a$, OTR, Tc, Tm).

Tabla IV. Plataforma del *Software Simulator Bio Process (SSBP)* para la caracterización de un fermentador, mecánicamente agitado: 1 L, 0.8 VVM's 2 turbinas Rushton a 300 RPM's.

<i>Condiciones iniciales</i>		<i>Caracterización del bioreactor</i>	
Densidad (kg/m ³)	1000	P/V no gaseada (W/L)	0.42
Número de potencia (-)	5.8	Potencia gaseada (W/L)	0.3
Velocidad de agitación (rpms)	300	Flujo del gas (m ³ /s)	1.33x10⁻⁵
Pg/P (-)	0.8	Velocidad superficial (m/h)	0.0040
VVM's (min ⁻¹)	0.8	Número de aireación (-)	0.78
Viscosidad (Pa*s)	0.001	Número de Reynolds (-)	20498
Volumen del líquido (L)	1	k _{La} (h ⁻¹)	26.2
Altura del líquido (m)	0.22	OTR (mg O ₂ /l.h)	183.4
Diámetro del impulsor (m)	0.05	Tiempo de circulación (s)	0.18
Altura de las paletas del impulsor (m)	1x10⁻⁴	Tiempo de mezclado (s)	0.735

IV. DISCUSIÓN

La simulación es una herramienta que puede ser usada para cualquier etapa del desarrollo de un bioproceso, desde el laboratorio hasta la operación de una planta. En este trabajo se presenta el desarrollo del *Software Simulator Bioprocess (SSBP)* como una herramienta que podría utilizarse en las primeras etapas en la innovación de un bioproceso. Se tomó en cuenta a los matraces agitados, que a pesar de su gran utilidad e importancia de diseño en bioingeniería para sistemas de producción de células, estos son subestimados [2],[36]. La selección apropiada de las condiciones de cultivo son especialmente importantes en sistemas a pequeña escala y generalmente esto es el primer paso para el desarrollo de un bioproceso [37]. Si se realizan malas decisiones al inicio del cultivo, por ejemplo en la optimización de medios, en etapas tempranas del desarrollo de un bioproceso, podría generar resultados poco prometedores y optimizar a una escala mayor sería mucho más complicado [2].

Por lo anterior, el desarrollo y escalamiento de un bioproceso de matraces a fermentadores agitados mecánicamente es crucial, haciéndose muy necesario antes de ello, caracterizar desde el punto de vista de ingeniería a estos biorreactores. En la literatura se reportan varios casos de éxito de escalamiento de matraces a fermentadores agitados. Entre ellos se encuentra la producción de alginato por *Azotobacter vinelandii* [38], la producción de α pentil pirona por *Trichoderma harzianum* [39], producción de termonucleasa alcalina con *Bacillus cereus* [40], producción de ácido láctico por *Corynebacterium*

glutamicum [41], producción de inoculantes de *Azospirillum brasilense* [42], producción de la proteína recombinante APA por *Streptomyces lividans* [43], producción de rifamicina B con *Amycoletoposis mediterranei* [44], producción de proteínas halotolerantes por *Bacillus sp* [45], ácido linoleico por *Mucus hiemalis* [46], de microorganismos filamentosos [47], entre otros. Estos escalamientos exitosos, de matraces agitados a fermentadores o entre fermentadores de varias escalas, se basaron en mantener en ambos reactores un criterio de escalamiento constante (suministro específico de potencia o el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno constante o algún otro), de ahí la importancia de saber caracterizar a los matraces y fermentadores adecuadamente para poder trasladar el bioproceso desde el laboratorio hasta la industria con éxito.

Considerar la energía de disipación causada por la agitación y mezclado es de primordial importancia ya que ésta, es más uniforme en matraces que en fermentadores y por lo tanto la conducta del fluido puede ser totalmente diferente. Por ejemplo, la energía de disipación en fermentadores agitados (agitado con tres turbinas y $D/T = 0.3$) la energía de disipación fue 36 veces mayor que en el matraz, a un suministro similar de potencia [29]. Lo anterior indica que los cultivos en matraces agitados están sujetos a menor estrés hidrodinámico que en un fermentador, es decir presentan altos gradientes de deformación, siendo el escalamiento un problema para organismos sensibles al esfuerzo de corte. Lo anterior debe ser tomado en cuenta, ya que el estrés hidrodinámico es un parámetro a considerar cuando se cultivan células de plantas o animales. El *SSBP* es capaz de estimar el nivel de estrés hidrodinámico a través del cálculo del esfuerzo de corte (τ), velocidad de corte (γ) y la energía de disipación (ϵ) tanto en matraces agitados y fermentadores, ya que algunos autores recomiendan considerarlos en el escalamiento efectivo, sobre todo en el cultivo de células de mamíferos e insectos [37].

El propósito del desarrollo del *Software Simulator Bio Process (SSBP)* es alentar su interpretación para un desarrollo, optimización y escalamiento efectivo de cualquier bioproceso, ya que la ciencia de la Ingeniería depende de la teoría aplicada, de correlaciones cuantitativas y de matemáticas. Afortunadamente, para muchos científicos con enfoque biológico o microbiológico, las ecuaciones serán resueltas de forma automática por el software. Al desarrollar y escalar un bioproceso desde matraces agitados a biorreactores de laboratorio (0.1 a 10 litros) y hasta biorreactores industriales (10,000 a 1,000,000 o más litros) se deben considerar riesgos de factibilidad de costos, demostrar de que el bioproceso es escalable, soluciones de esterilización y transferencia de calor, reducción de riesgos comerciales, servicios, procesos de purificación, entre otros. Muchas veces el escalamiento es el cuello de botella ya que implica diseño, construcción y operación, todo ello conlleva riesgos operativos y de costo, así como de optimización de transferencia de masa, mezclado y remoción de calor.

V. Conclusión

Se diseñó un software *Software Simulator Bioprocess (SSBP)* el cual, hasta ahora, ha resultado útil para aplicar en la academia, investigación e industria. Este está basado en el uso de correlaciones empíricas de ingeniería bioquímica sobre Tecnología de Bioprocesos para la caracterización de matraces y biorreactores mecánicamente agitados. Las ventajas de este software son: su fácil uso, no se requiere de conocimientos de matemáticas o ingeniería, ayuda a tomar de decisiones rápidas de en la elección de cultivos, y para el escalamiento de bioprocesos de matraces a fermentadores agitados mecánicamente o en fermentadores de varias escalas. También, puede ser muy útil para microbiólogos e investigadores de la industria que estén diseñando bioprocesos. Asimismo, pretende ser una herramienta interactiva para estudiantes, investigadores, profesionales dedicados al desarrollo de bioprocesos, empresas farmacéuticas, de alimentos, plantas tratadoras de agua, desarrollo de biocombustibles, entre otros.

RECONOCIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Programa al Apoyo de la Educación Superior (PADES), México. A través del proyecto “Innovación en el Proceso de Transferencia Tecnológica de Bioprocesos” Convenio UPVT/SEP PADES 2013 No de Proyecto 2013-05-15-014-134. A la Planta Piloto del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México por el acceso a datos experimentales. Al Prof. Jochen Büchs (Aachen, Alemania; comunicación personal) por los datos experimentales proporcionados en el 2001.

REFERENCIAS

- [1] G. Solomons. *Materials and Methods in Fermentation*. 1st Ed. Academic Press New York. London 1969. p 1-8.
- [2] J. Büchs. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, 7:91-98.
- [3] J. Büchs., U. Maier, and B. Zoels. Power consumption in shaking flasks on rotary machines. I power consumption measurements in unbaffled flasks at low viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000a. 68(6): 589-593.
- [4] M. Thiry., and D. Cingolani. Optimizing scale-up fermentation processes. *Trends in Biotechnology*. 2002 20 (3): 103-105.
- [5] E. Wernersson and C. Trägårdh. Scaling of turbulence characteristics in a turbine-agitated tank in relation to agitation rate. *Journal of Chemical Engineering*. 1998. Vol. 70. pp. 37-45.
- [6] R. Davis. Design and scale-up of production scale stirred tank fermentors. 2010. All Graduate Theses and Dissertations, Utah State University.
- [7] E. Galindo. Traslación de escala, notas del XXI Curso Latinoamericano de Ingeniería Química. 1996. Valparaiso, Chile, pp 231-252.
- [8] A. De León., G. Cortés; O. Ramírez y E. Galindo. Diseño y aplicación de un simulador de gradientes de oxígeno disuelto presentes en fermentadores de gran escala. 1995. *Avances en Ingeniería Bioquímica*, 5(1): 1-6
- [9] N. Oosterhuis; M. Siebel, and G. Mijnbeek. *Bioreactor Deseign and Product Yield*. 1992. Butterworth-Heinemann, pp. 8-47.
- [10] W. Whitman. Preliminary experimental confirmation of the two film theory of gas absorption. 1923. *Chemical and Metallurgical Engineering*, Vol. 29, pp. 146-149.
- [11] E. Gómez., and F. García-Ochoa. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. 2009. *Biotechnology Advances*, pp. 153-176.
- [12] P. Prasertsan, and C. Bandaiphet. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficiente, k_La in exopolysaccharides production from *Enterobacter cloacae* WD7. 2006. *Carbohydrate Polymers*, 66(2): 216-228.
- [13] G. Najafpour. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Elsevier's Science & Technology. 2007 Oxford UK.
- [14] J. Wilson., and M. Charles. Fermenter Design. 1999. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, John Wiley & Sons. pp. 1157-1189.
- [15] R. Weetman. Development of transitional flow mixing empeller. 1991. *Proceeding of the 7th European Conference on Mixing*, Belgium.
- [16] R. Reséndiz, A. Martínez, G. Ascanio and E. Galindo. A new pneumatic bearing dynamometer for power-input measurements in stirred tanks. 1991. *Chemical Engineering Technology*, 14: 105-108.

- [17] Y. Yuan-Shuai., Y. Jiang-Yong. and H. Kwok-ping. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia ehodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. 2006. *Biochemical Engineering Journal*, 27: 331-335.
- [18] R. Tan., W. Eberhard, and J. Büchs. Measurement and characterization of mixing time in shake flasks. 2011. *Chemical Engineering Science*, 66: 440-447.
- [19] J. Büchs., U. Maier., C. Milbradt., and B. Zoels. Power consumption in shaking flasks rotary machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. 2000. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(6): 594-601.
- [20] H. Zhang., W. William-Dalson., E. Keshavars-Moore, and P.A. Shamlow. Computational-fluid-dynamics (CFD) analysis of mixing and gas-liquid mass transfer in shake flasks. 2005. *Biotechnology Applied Biochemical*. 41:1-8.
- [21] F. García., J. Gallardo., A. Sánchez., M. Cerón., E. Belarbi., and E. Molina. Determination of shear stress thresholds in toxic dinoflagellates cultured in shake flasks Implications in bioprocess engineering. 2007. *Process Biochemistry*, 42: 1506-1515.
- [22] C. M. Cooper, G. A. Ferstrom, and S.A. Miller. Performance of Agitated Gas-Liquid Contactors. 1944. *Industrial Eng, Chem*. 36: 504-509.
- [23] R. Quintero. Escalamiento de fermentaciones, En: *Ingeniería Bioquímica*. Ed. Alambra Mexicana, México, Cap. 7, pp. 97-113.
- [24] J. van Suijdam., H. Kossen and C. Joha. Model for oxygen transfer in a shake flasks. 1978. *Biotechnology and Bioengineering*, 20: 1695-1709.
- [25] H. Henzler and M. Schedel. Suitability of the shaking flasks for oxygen supply to microbiological cultures. 1991. *Bioprocess Engineering*, 7: 123-131.
- [26] W. Haarde., and P. Zehner. Leistungseintrag und Stoffubergang in Schüttelkolben, citado por U. Maier, and J. Büchs (2001). Characterisation of gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 7: 99-106.
- [27] V. Veljkovic., S. Nikolic., M. Lazic., and C. Engeler. Oxygen transfer in shaken on orbital shakers. 1995. *Biochemical Engineering Journal*, 49 (6): 265-272.
- [28] F. Veglio., F. Beolchini., and S. Ubaldini. Empirical models for oxygen mass transfer: a comparison between shake flasks and lab-scale fermentor and application to manganiferus ore bioleaching. 1998. *Process Biochemical* 33 (4): 367-376.
- [29] J. Büchs and B. Zoels. Evaluation of the maximum specific power consumption in shaking bioreactors. 1999. *Proceeding of the 3th International Symposium of Mixing in Industrial Processes (ISMIP-3)*, Japan: 19-22.
- [30] S. Arjunwadkar., A. Sarvanan., P. Kulkarni and A. Pandit. Gas liquid mass transfer in dual impeller bioreactor. 1998. *Biochemical Engineering Journal*. 1:99-106.
- [31] L. Arrua., B. McCoy and J. Smith. Gas-liquid mass transfer in stirred tanks. 1990. *Aiche Journal*. 36 (11):1768-1672.
- [32] A. Badino., M. Facciotti and W. Schmidell. Volumetric oxygen transfer coefficiente (k_La) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. 2001. *Biochemical Eng Journal* 8:111-119.
- [33] A. Galaction., D. Cascaval., C. Onisco and M. Turnea. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeast and fungus broths. 2004. *Biochemical Engineering Journal*, 20: 85-94.
- [34] X. Ni and S. Gao. A comparative study of mass transfer in yeast for a batch pulsed baffled bioreactor and stirred tank fermenter. 1995. *Chemical Engineering Science*, 50 (13): 2127-2134.
- [35] H. Zhang., W. William-Dalson., E. Keshavarz-Moore and P.A. Shamlou. Computational-fluid-dynamics (CFD) analysis of mixing and gas-liquid mass transfer in shake flasks. 2005. *Biotechnology Applied Biochemical*, 41, 1-8.

- [36] S. Suresh., V.C. Srivastava and I.M. Mishra. Techniques for oxygen transfer measurements in bioreactors: a review. 2009. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 1091-1103.
- [37] W. Klockner and J. Büchs. Advances in shaking technologies. 2012. *Cell Press*, 30 (6): 307-314.
- [38] C. Reyes., C. Peña and E. Galindo. Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*. 2003. *Journal of Biotechnology*, 105 (1-2): 189-198.
- [39] J. Rocha-Valadez., M. Estrada., E. Galindo and L. Serrano-Carreón. From shake flasks to stirred fermentors: Scale up of an extractive fermentation process for 6-pentyl-a-pyrone production by *Trichoderma harzianum* using volumetric power input. 2006. *Process Biochemistry*, 41: 1347-1452.
- [40] S. Kumar and S. Kumar. Shake-flasks and bench-scale stirred tank bioreactor production optimization of a thermoalkaline protease from *Bacillus cereus* SIU1 using one-factor-at-a-time and response surface (statistical) methodologies. 2014. *Biocatalysis and Biotransformation* 32 (3): 173-187.
- [41] J. Seletzky., U. Noak., J. Fricke., E. Welk., W. Eberhard., C. Knocke and J. Büchs. Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. 2007. *Biochemical Engineering*, 98 (4): 800-811.
- [42] M. Trujillo-Roldán., N. Valdez-Cruz., C. Gonzalez-Monterubio., E. Acevedo-Sánchez., C. Martínez-Salinas., R. García-Cabrera., R. Gamboa-Suasnavart., L. Marín-Palacio., J. Villegas and A. Blancas-Cabrera. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. 2013. *Biotechnological Products and Process Engineering*, 97: 9665-9674.
- [43] R. Gamboa-Suasnavart., M. Palacios-Luz., J. Martínez-Sotelo., C. Espitia., L. Servin-González., N. Valdez-Cruz and M. Trujillo-Roldán. Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant APA (45/47 kDa protein) form *Mycobacterium tuberculosis*. 2013. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29 (8): 1421- 1429.
- [44] J. Zhi-hua., L. Jian-ping and C. Pei-lin. Scale up of rifamicyn B fermentation with *Amycolatopsis mediterranei*. 2004. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*. 2004, 5(12): 1590-1596.
- [45] P. Roopa., K. Theruvath and J. Ananthkrishnam. Scale up of production in a bioreactor of a halotolerant protease from moderately halophilic *Bacillus sp* isolated from soil. 2014. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57 (3): 448-455.
- [46] M. Kennedy., S. Reader., J. Davies and H. Silby. The scale-up of mycelial shake flasks fermentations: a case study of gamma linoleic acid production by *Mucor hiemalis* IRL 51. 1994. *Journal of Industrial Microbiology*, 13: 212-216.
- [47] W. Katzer., M. Blackburn., K Cherman., S. Martin., J. Penn and S. Wringley. Scale-up of filamentous organisms from tubes and shake-flasks into stirred vessels. 2001. *Biochemical Engineering Journal*, 7 (2): 127-134.

NOMENCLATURA

P/V_L = Potencia volumétrica gaseada (W/L)
 $C = 1.94$ (Coef. de la ecuación de Büchs *et al*, 2000a)
 ρ = Densidad (kg/m^3)
 n = Velocidad de agitación (s^{-1})
 d = Diámetro máximo de matraz (m)
 μ = Viscosidad ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
 V_L = Volumen del líquido (m^3)
 V_o = Volumen nominal del matraz (m^3)
 ε = Energía de disipación (W kg^{-1})
 γ = Velocidad de corte promedio (s^{-1})
 λ = Tamaño de la eddy en la escala de Kolmogorov (m)
 T_m = Tiempo de mezclado (s)
 d_p = Tamaño de la célula (m)

τ_i = Esfuerzo de corte promedio (mN/m^2)
 Re = Número de Reynolds (-)
 C_g^* = Saturación de oxígeno en agua a 37 °C (mg/L)
 C_L = Concentración de oxígeno en el seno del líquido (mg/L)
 OTR = Velocidad de transferencia de oxígeno ($\text{mgO}_2/\text{l}\cdot\text{h}$)
 M = Torque (N.m)
 F = Fuerza (N)
 B = Brazo de palanca utilizado (m)
 P = Potencia (W)
 ω = Velocidad angular ($2\pi N$) (s^{-1})
 Po = Número de potencia del impulsor (-)

N = Velocidad de agitación de los impulsores del fermentador (s^{-1})

D_i = Diámetro del impulsor (m)

D_t = Diámetro del tanque del fermentador (m)

V = Volumen del líquido en el fermentador (L)

F_g = Flujo del gas (m^3/s)

VVM's = (Vol. de aire/vol. de líquido/minuto = min^{-1})

N_a = Número de aireación (-)

V_s = Velocidad superficial (m/h)

A = Área del tanque (m^2)

$k_{L,a}$ = Coef. volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1})

T_c = Tiempo de circulación (s)

V_c = Volumen de caudal (m^3)

F_c = Capacidad de bombeo del impulsor (m^3/s)

H_L = Altura del líquido en el tanque (m)

H_i = Altura del impulsor (m)