

PRODUCCIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS COMO ADITIVO PARA ALIMENTOS CONCENTRADOS PARA GANADO VACUNO (PRIMERA PARTE)

Edgar Mauricio Vargas*, Clara Juliana Gómez**, Mónica Eliana Parra**,
Maria A. Romero**

ABSTRACT

Probiotic bacteria have been recognized as an important alternative to antibiotics and other growth factors used in animals, which have a negative influence on animal and consumer's health. Preliminary experiments were performed in shaker to obtain the media formulation and the growth kinetics for isolated strains of Lactobacillus spp. and Bifidobacterium spp. Experiments on a 2.7 L batch reactor allowed the study of operation parameters as agitation and aeration, obtaining the highest growth using two 6-paddle Rushton turbines and air flow of 1.4 VVM. These results were used to scale-up the batch process to a 50.0 L bioreactor, obtaining a geometrically similar design that produces a cell density of 6.5 g/L in 24 hours of operation, with optimum media and operating conditions, broadening the field of application of probiotics to industries not necessarily related to dairy products.

PALABRAS CLAVE

Probióticos, Lactobacillus, Bifidobacterium, cinética, melaza, bioreactor, escalamiento.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el mercado de los alimentos saludables ha crecido notablemente a nivel global. Tanto en Asia como en Europa, el crecimiento anual de ésta industria fue del 20% entre 1992 y 1997. Dentro de esta gama de alimentos se destacan, con cerca del 65% de participación en el mercado mundial, aquellos con un contenido probiótico, los cuales contienen microorganismos bacterianos de tipo acidolácticos.

Los componentes activos de los probióticos son una mezcla de bacterias ácido lácticas, entre las que se encuentran *Lactobacili*, *Bifidobacteria* y *Enterococci* entre otras, las cuales componen la flora intestinal de humanos y animales. Sin embargo, según estudios, las especies bifidobacterium y lactobacillus son las que ejercen todo el efecto positivo sobre el organismo [6].

* Profesor Instructor del Departamento de Ingeniería Química, Universidad de los Andes edgvarga@uniandes.edu.co

** Estudiantes de Ingeniería Química, Universidad de los Andes

Estudios han demostrado la influencia positiva que tienen los cultivos probióticos en la salud humana y del ganado vacuno, actuando benéficamente en la flora intestinal del individuo[4], y se ha descubierto que para los vacunos, evita enfermedades tales como: mastitis, descalcificación e infecciones en el tracto reproductivo[16]. Además, los probióticos disminuyen las alteraciones digestivas e inducen el aumento del peso del animal en un 20%, lo cual reduce los costos por unidad producida de carne [3].

Europa, Estados Unidos y Japón, han desarrollado alimentos de varias clases con cultivos probióticos, entre los cuales se encuentran los derivados de la leche y los cereales. En Latinoamérica el mercado de los probióticos se ha desarrollado básicamente en los productos lácteos.

Actualmente en Colombia la producción de alimentos con probióticos es incipiente, siendo la industria de lácteos la única que los usa, debido a la facilidad para obtener crecimiento de los microorganismos en un medio láctico. Los probióticos utilizados actualmente en Colombia son importados de países como Japón, lo cual implica costos de adquisición y transporte elevados.

La búsqueda de medios y condiciones de cultivo que permitan la obtención de altas densidades de microorganismos ($>10^7$ UFC/g), ha sido la meta de muchas empresas, que están interesadas en las bacterias acidolácticas, no sólo como microorganismos iniciadores, sino también como un ingrediente o aditivo probiótico para aumentar el valor nutritivo de sus productos. De esta forma, la biomasa de estos microorganismos ha adquirido un mayor valor y una mayor demanda. Infortunadamente, los métodos de cultivo industrial de probióticos se caracterizan por sufrir de la inhibición del crecimiento celular debido a la producción de ácido láctico, un producto primario de su metabolismo.

Existe un amplio interés científico e industrial hacia el desarrollo de bioprocesos novedosos que puedan mejorar el rendimiento y la productividad actuales, así como simplificar el ciclo de producción. Un gran aporte a la industria nacional, sería la producción de los probióticos a partir de un medio no láctico para ampliar sus aplicaciones a otros alimentos, ya sea para consumo humano o animal, con la correspondiente reducción de costos para los consumidores.

Al obtenerse la tecnología para la producción de probióticos, se genera la posibilidad de encontrar mecanismos que promuevan su implementación en el país. Esto produciría efectos positivos en el mercado doméstico de este producto, especialmente en aplicaciones pecuarias.

En Europa y Japón se han desarrollado mezclas simbióticas [11] como alimentos para animales, que presentan elevados costos de producción, debido esencialmente a la necesidad de crecer los probióticos en medios de cultivo que arrojen una buena producción celular. Actualmente en Estados Unidos existe diversidad de productos para animales domésticos que tienen un contenido probiótico y se adquieren a costos elevados. Japón por su parte desarrolló una mezcla probiótica que se importa en algunos países productores de carne para ser mezclada con el concentrado que se suministra al ganado, lo cual eleva casi en un 50% los costos de producción de carne de buena calidad.

EL PROBLEMA Y LA SOLUCIÓN

Actualmente en el mundo existen dos factores preponderantes que están marcando la pauta en la producción de carne. Estos son el rendimiento de la producción animal y la calidad de la carne, la cual no debe contener residuos de antibióticos que hayan sido suministrados al animal.

Colombia ocupa el tercer puesto en volumen de producción de carne en América Latina, después de países como Argentina y Chile, sin em-

bargo se esta alejando de los índices productivos de carne de los países industrializados tanto en volumen como en calidad, debido al manejo primario que se le ha dado a la parte nutricional de la ganadería en Colombia, haciendo que la producción de leche y carne sea ineficiente. Estudios de Fedegan indican que la mala calidad de los pastos de forraje y la contaminación de las aguas, hacen que disminuyan las colonias de bacterias benéficas presentes en el intestino del animal, que permiten desdoblarse los alimentos y mantenerlo saludable.

Para obtener un buen rendimiento en la producción animal intensiva había sido necesario el uso de antibióticos para prevenir enfermedades y favorecer su crecimiento. El problema del uso de estos antibióticos radica en que trazas o residuos de los mismos quedan en la carne, que al ser consumida por el hombre crean resistencia de microorganismos patógenos a algunos antibióticos. Es así como en Asia y Europa se ha fomentado el consumo de alimentos que no involucren antibióticos en su producción, creando leyes que benefician la importación de alimentos proteínicos que cumplan con este requisito.

El mal funcionamiento del sistema digestivo en ganado vacuno produce deficiencias de minerales en los huesos y en los tejidos desarrollando mastitis, descalcificación, infertilidad posparto, retención de líquidos y tejidos de la placenta que producen endometritis, lo cual lleva a un alto índice de mortandad de cabezas de ganado al año, disminuyendo la producción de carne de buena calidad.

Es así como se hace necesario el desarrollo de un producto alimenticio para ganado vacuno que contenga microorganismos probióticos, el cual mejore el funcionamiento intestinal del animal, mejorando la producción de carne.

Los microorganismos probióticos necesitan básicamente de una fuente de carbono junto con otros micronutrientes para su crecimiento adecuado, por lo que es factible aprovechar ciertos productos agrícolas de gran producción en

el país como dicha fuente de carbono en el medio de cultivo por su alto contenido de sacáridos [7].

Un gran aporte a la industria nacional sería la producción de los probióticos a partir de un medio no láctico, con importantes beneficios como:

- Sustitución de importaciones de probióticos para aplicaciones en productos no lácteos.
- Mejor aprovechamiento de los recursos agrícolas y la tecnología disponibles en el país.
- Mejorar el contenido nutricional de alimentos de consumo masivo en el país.
- Ampliación de las aplicaciones de los probióticos a otros alimentos ya sea para consumo humano o animal.
- Reducción de costos para los consumidores.

MATERIALES Y MÉTODOS UTILIZADOS

Identificación y Aislamiento de Microorganismos

Utilizando el método de cultivo por aislamiento se realizaron siembras a partir de kumis y yogurt comerciales utilizando un medio sólido (agar) específico para cada cepa. Para *Lactobacillus* se utilizó el medio MRS (Merck) y el medio Rogosa (Merck), obteniendo mejores resultados en el primero, en un pH ajustado de 5,5, incubando a 44°C en un medio microaerófilico en cajas de petri por 48 horas. A pesar de que la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos es de 37°C, las siembras se incubaron a 44°C para evitar el crecimiento de levaduras presentes en los productos lácteos.

Para el aislamiento de la especie *Bifidobacterium* se preparó agar TPY (*Tryptone Peptone Casein*), al cual se le agregó *L-cysteina* (Merck).

La incubación se realizó en un medio anaerobio utilizando sobres de anaerobiosis (*Anaerogen*), en una jarra de anaerobiosis de 2,5 L durante 48 horas a 44°C.

La identificación de las cepas se realizó mediante una tinción de *Gram* para después ser observadas al microscopio. En la Tabla 1 se muestra la caracterización de cada cepa.

Para mantener las cepas en un medio enriquecido, se utilizó caldo de cultivo MRS (Difco), para la especie *Lactobacillus*, que fue incubado en tubos de ensayo a las mismas condiciones que para el aislamiento, y mantenido a 5°C durante periodos de 8 días para evitar la contaminación y el envejecimiento del cultivo. Para la especie *Bifidobacterium* se utilizó caldo de cultivo TPY preparado en el laboratorio.

Para la identificación de las especies también se utilizó el Kit API 50 ChL (Biomerieux), y API 50 ChB, que de acuerdo con el pH de las muestras, permitió identificar las siguientes especies: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. reuteri* y *Bifidobacterium bifidum*, esenciales para efectos benéficos en el gastro intestinal animal.

Tabla 1. Caracterización de las cepas bacterianas

Característica	Lactobacillus	Bifidobacterium
Forma	Cilindros, varitas largas, cocoides	Cilindros pequeños
Estructura	Cadenas	Cadenas
Coloración	Gram positivas	Gram positivas
Esporulación	NO	NO
Condiciones Aeróbicas	Microaerófilos	Anaerobiosis
Colonias	Sin pigmentación, redondas	Sin pigmentación, ovaladas
Temperatura de aislamiento	44°C	42°C
pH óptimo de crecimiento	5.5	6.2
Medio de cultivo de aislamiento	Agar MRS	Agar TPY
Caldo de cultivo para conservación	Caldo MRS	Caldo TPY

Medio de Cultivo

Debido a la necesidad de encontrar un medio de cultivo que sea compatible con un alimen-

to concentrado para ganado vacuno, y puesto que las bacterias ácidolácticas basan su mecanismo de crecimiento en la fermentación de azúcares reductores, se ve la necesidad de encontrar un sustrato que sustituya a los convencionales (lácticos), y permita obtener iguales o mejores rendimientos en la reacción a bajo costo. Por lo anterior se buscó un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de las bacterias probióticas, cuya fuente de carbono provenga de un recurso agrícola del país. La opción seleccionada fue la melaza de caña, con una composición de 60% glucosa y 40% sacarosa y de bajo costo. Debido a esto, se comparó su rendimiento con un medio de cultivo que contenía agua residual del proceso de pasteurización UHT (*Ultra High Temperature*), con una población de coliformes totales menor a 10 NMP/g que esta por debajo del valor máximo estimado en la norma NTC 611 del ICONTEC para alimentos.

Se formularon tres medios de cultivo para experimentación en el shaker (baño agitado de temperatura controlada), con el fin de seleccionar en medio con mayor productividad celular. La formulación de cada medio de cultivo se realizó calculando la cantidad de sustrato que provee el carbono según la composición y adicionalmente con un medio mínimo de sales obtenido de la bibliografía [12], y adicionado la levadura que aporta la proteína.

A continuación se muestra la composición de los medios de cultivo formulados:

Tabla 2. Composición del Medio de Cultivo 1

Componente	Cantidad
Melaza de Caña	32 g/L
Extracto de Levadura	5,0 g/L
Medio Mínimo de Sales	
Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄)	0.5 g/L
Cloruro de Amonio (NH ₄ Cl)	1.0 g/L
Sulfato de Sodio (Na ₂ SO ₄)	2,0 g/L
Cloruro de Calcio Hexahidratado (CaCl ₂ *6H ₂ O)	0.001 g/L
Sulfato de Hierro (FeSO ₄)	0.0003 g/L
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	5 ppm

Tabla 3. Composición del Medio de Cultivo 2

Componente	Cantidad
Agua Residual UHT	45 g/L
Extracto de Levadura	5,0 g/L
Medio Mínimo de Sales	3.3 g/L

Según Luedeking [8], las fermentaciones ácido lácticos aumentan su eficiencia utilizando *peptona caseína*, como fuente de proteína además de la levadura, la cual no es utilizada frecuentemente por su costo. Sin embargo el costo que se evita utilizando glucosa como sustrato podría compensar la utilización de *peptona caseína*, por lo cual se procedió a formular un tercer medio de cultivo que presenta la siguiente composición:

Tabla 4. Composición del Medio de Cultivo 3

Componente	Cantidad
Melaza de Caña	32 g/L
Extracto de Levadura	5,0 g/L
Peptona Caseína	10,0 g/L
Medio Mínimo de Sales	3,3 g/L

Medición de Crecimiento Celular

El crecimiento celular fue determinado mediante mediciones de peso seco de las muestras (g células/ml), las cuales fueron inicialmente centrifugadas a 10000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se guarda para análisis, mientras que el precipitado es lavado con agua destilada para una segunda centrifugación de 10 min a la misma velocidad. Luego las muestras son secadas, primero a 110 °C durante 3 horas y posteriormente a temperatura ambiente en un desecador durante 12 horas.

Adicionalmente, se verificó la viabilidad celular mediante conteo de unidades formadoras de colonia (UFC), utilizando diversas diluciones del medio de cultivo, que fueron sembradas en agar MRS (Merck) o TPY según la bacteria, e incubadas durante 48-72 horas a 37°C.

Consumo de sustrato

El consumo de sustrato fue medido a partir de la concentración de azúcar en el medio de cultivo, por medio de un análisis DNS (Ácido dinitrosalicílico) [2].

Producción de Ácido Láctico

La concentración final de ácido láctico en cada una de las corridas se determinó por medio de la cuantificación del volumen de solución de Carbonato de Sodio 2.5 M adicionada para controlar el pH del medio de cultivo, conociendo que cada mililitro de solución equivale a 0.2252 g de ácido láctico [8].

DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA

Se realizaron 5 fermentaciones en el shaker para cada una de las especies en cada uno de los medios de cultivos formulados.

Para cada una de las fermentaciones se preparó un inóculo de 4 ml en un tubo de ensayo que contenía la misma composición del medio de cultivo de la respectiva fermentación. El inóculo se incubó por 8 horas antes de la fermentación a 37°C.

Cada medio de cultivo se preparó en un medio estéril, en erlenmeyers de 250 ml y un volumen 125 ml, para el caso de *Lactobacillus* la columna de aire garantizará una concentración de 5-10% de oxígeno, creando un ambiente microaerofílico; para las *Bifidobacterias*, la columna de aire se utilizó para que el Anaerogen absorba el volumen de aire encima del medio de cultivo y crea un ambiente anaerobio. Después de 8 horas de incubación del inóculo, se agregó al medio de cultivo en ambiente estéril, y se colocó el erlenmeyer en un shaker a (100 rpm) a 37°C por 48 h [2].

En la Tabla 5 se muestran un resumen de datos de cada una de las fermentaciones mencionadas anteriormente y los parámetros más relevantes de crecimiento celular.

Tabla 5. Parámetros cinéticos experimentales.

Especie	Lactobacillus			Bifidobacterium	
	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 2	Medio 3
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,06	0,05	0,1	0,07	0,35
$X_{\text{máx}}$ (g/L)	4,5	3,8	5,5	2,8	3,4
UFC/g	1,21 x10 ⁷	8,10 x10 ⁵	1,34 x10 ⁷	8,10 x10 ⁵	2,00 x10 ⁷
$P_{\text{máx}}$ (g/L)	4,5	-	9,5	-	7,5

En las figuras 1, 2, 3 y 4, y de la tabla 5, se observa que el mayor crecimiento celular, para las dos especies se da en el medio de cultivo 3 y al comparar este medio, con el medio 1 se encuentra un aumento de hasta un 25%.

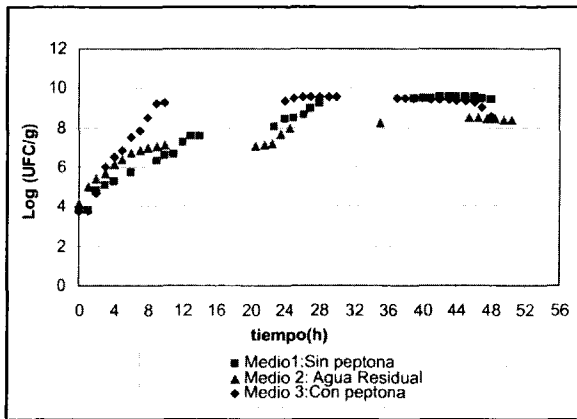


Figura 1. Curva de crecimiento para fermentación de lactobacillus en medios 1, 2 y 3

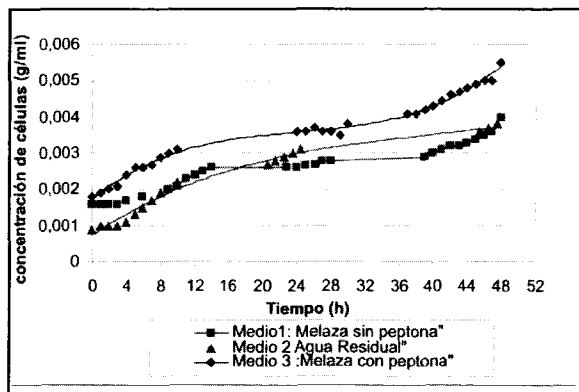


Figura 2. Concentración celular para fermentación de Lactobacillus en medio 1, 2 y 3.

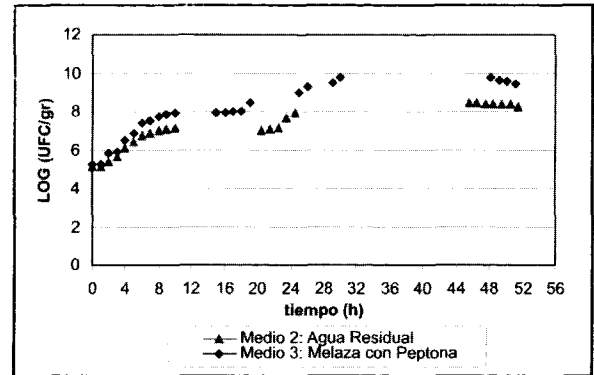


Figura 3. Curva de crecimiento para fermentación de Bifidobacterium en medios 2 y 3

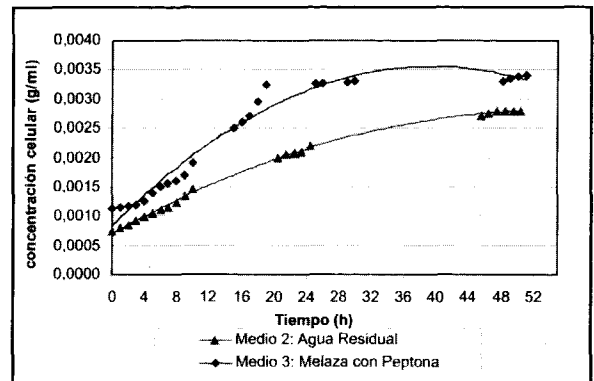


Figura 4. Gráfico de concentración celular para Bifidobacterium en medios 2 y 3

Los crecimientos que se obtuvieron de las fermentaciones en agua residual UHT para las dos especies son muy bajos comparados con los otros medios, y la viabilidad de células es del orden de 10⁵ UFC/g. Por lo anterior este medio no es el adecuado para el propósito de este proyecto.

Para las fermentaciones que se realizaron en lactobacillus con los medios 1 y 3 (Tablas 2 y 3), la viabilidad de células es del orden de 10⁷ UFC/g. En algunas fermentaciones se alcanzó a obtener un crecimiento de 10⁸ UFC/g en el medio 3, lo que asegura un mejor desempeño de este último. La velocidad de crecimiento global y máxima para el cultivo 3 es mayor a la obtenida en el cultivo 1 lo que resulta en un menor tiempo de fermentación.

Modelo Matemático de la Cinética de Crecimiento

Según Luedeking [8], en fermentaciones ácido lácticas la concentración de ácido láctico mínima que inhibe la reacción es de 35 g/L. En las fermentaciones de *Lactobacillus* con el sustrato 3 la concentración máxima obtenida fue de 9,5 g/L, por lo que se sospecha que no hay una inhibición. Los datos experimentales se compararon con los datos obtenidos por los modelos de la ecuación de crecimiento [14], Monod y Monod con inhibición no competitiva por producto (Figura 5), que dependen de la concentración de células (g/ml); también se comparó con el modelo de Gompertz (Figura 6) para bacterias, basado en el número de células viables por gramo.

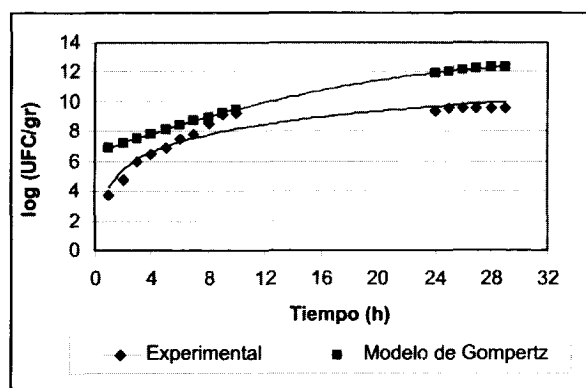


Figura 5. Velocidad específica calculada por los diferentes modelos para *lactobacillus*.

Para el modelo de de monod simple, los datos presentan una desviación promedio de $\pm 0.004 \text{ h}^{-1}$, respecto a los datos experimentales, mientras que la desviación promedio del modelo de Monod con inhibición es de $\pm 0.09 \text{ h}^{-1}$.

La desviación promedio de los datos del modelo de Gompertz, respecto a los datos experimentales es de $\pm 0.1 \text{ log (UFC/g)}$.

Del análisis de las desviaciones estándar y de las curvas de los modelos, se predice que la fermentación de *lactobacillus* en el medio de cultivo 3, sigue el **Modelo de Monod Simple**.

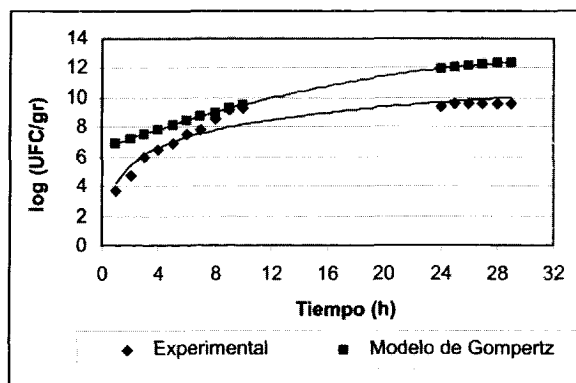


Figura 6. Viabilidad de células contra tiempo obtenidas por el modelo de Gompertz para *lactobacillus*.

Tabla 6. Parámetros cinéticos calculados del modelo de crecimiento.

Parámetro	Fermentación de <i>Lactobacilos</i> en medio de cultivo 3	Fermentación de <i>Bifidobacteria</i> en medio de cultivo 3
$X_{\text{máx}}$ (crecimiento celular)	5,5 g/L	3,4 g/L
$P_{\text{máx}}$ (concentración de ácido láctico)	9,5 g/L	7,5 g/L
Viabilidad de células	$1,34\text{E}+07$ UFC/g	$2,00\text{E}+07$ UFC/g
$\mu_{\text{máx}}$ (velocidad de crecimiento)	$0,1 \text{ h}^{-1}$	$0,35 \text{ h}^{-1}$
τ_d (tiempo de generación)	7,073 h	1,98 h
$Y_{X/S}$ (coeficiente de rendimiento)	0,2596 g células/g sustrato	0,2195 g células/g sustrato
$Y_{P/S}$ (coeficiente de rendimiento)	0,7391 g producto/g sustrato	0,6976 g producto/g sustrato
m (coeficiente de mantenimiento)	0,09 g sustrato/g células*h	0,03 g sustrato/g células*h
k_d (velocidad de muerte)	$0,01 \text{ h}^{-1}$	$0,01 \text{ h}^{-1}$

A partir del modelo cinético y de las ecuaciones cinéticas para cada fase se hallaron los rendimientos de biomasa, sustrato, y el coeficiente de manteniendo de células, así como también la constante de velocidad de la fase de muerte los cuales se muestran en la tabla 6. La ecuación cinética encontrada, el balance de sustrato y los tiempos de crecimiento se indican en la Tabla 7.

PRUEBAS DE LABORATORIO EN MAYOR ESCALA (5L) PARA LACTOBACILLUS

Por medio de los datos cinéticos, se pudo establecer un tiempo óptimo para preparación del inóculo de 8 horas, con las cuales se asegura que los microorganismos se encuentran en su fase exponencial de crecimiento. El volumen del inóculo se fijó en 10% del volumen de líquido en el reactor, valor recomendado por múltiples autores [9,14] con el fin de reducir la fase de latencia en el reactor.

Se realizaron cuatro corridas, de 2.7 L cada una, en el reactor biológico Bioflo 3000 (New Brunswick Scientific), manteniendo la temperatura a 37 °C, pH

Tabla 7. Ecuaciones cinéticas, balance de sustrato y tiempos de la curva de crecimiento en el shaker

Factor Cinético	Fermentación de Lactobacilos en medio de cultivo 3	Fermentación de Bifidobacteria en medio de cultivo 3
Ecuación cinética	$\mu = 0,1 * S / 2,5 + S$	$\mu = 0,35 * S / 9,2 + S$
Balance de Sustrato	$dS/dt = 3,8 dX/dt + 1,3 dP/dt + 0,09 * X$	$dS/dt = 4,5 dX/dt + 1,4 dP/dt + 0,03 * X$
Fase de Latencia	2 h	2 h
Fase de Aceleración	1 h	1 h
Fase Exponencial	22 h	28 h
Fase Estacionaria	5 h	14 h
Fase de Muerte	3 h	3 h

a 5.5 y agitación a 150 rpm, y utilizando el diseño experimental de la tabla 8.

Tabla 8. Variables experimentales evaluadas

	B ₁	B ₂
A ₁	Turbinas Rushton 0.74 VVM	Turbinas Rushton 1.48 VVM
A ₂	Lightnin A-315 0.74 VVM	Lightnin A-315 1.48 VVM

A: Tipo de agitador

B: Flujo de alimentación de aire

El primer tipo de agitación evaluada (A₁) consiste en 2 turbinas Rushton de 6 paletas, distanciadas 1.5 veces su diámetro entre si. El segundo tipo de agitación evaluada (A₂) corresponde a un agitador tipo A-315, similar al de la figura 10. Los flujos de aire utilizados corresponden a 2 L/min (B₁) y 4 L/min (B₂).

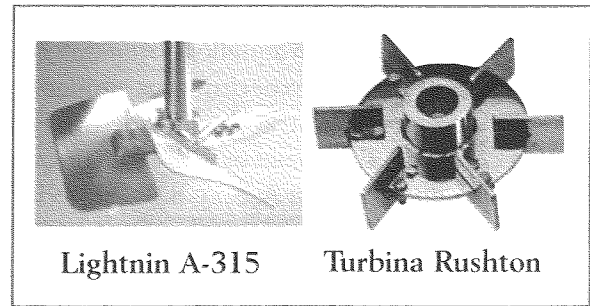


Figura 7. Agitadores utilizados

Los resultados obtenidos para crecimiento celular en cada una de las corridas se muestran en la Figura 8, donde se puede observar que al final de las 48 horas de muestreo se obtiene un crecimiento entre 6-10% mayor en las corridas que utilizaron un mayor flujo de aire, mostrando poca relación con el tipo de agitación utilizado.

Sin embargo, analizando la duración de la fase exponencial en cada una de las corridas, se puede observar que esta tiene una menor duración utilizando la combinación A₁B₂, en la cual se obtiene un valor de masa celular por unidad de volumen cercano al 83% de su valor final a las 21.5 horas de iniciado el proceso.

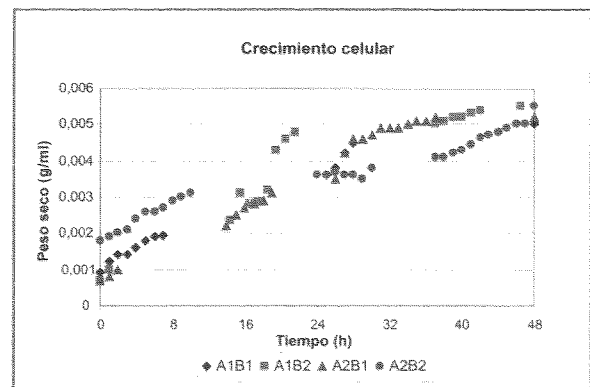


Figura 8. Crecimiento celular según peso seco.

Además de los resultados anteriores, se comprobó una viabilidad celular muy elevada en todas las corridas, superior a 1×10^7 UFC/ml en todas ellas, siendo la más elevada la obtenida en la corrida A₁B₂, la cual alcanza el orden de las 6×10^{10} UFC/ml.

Los resultados de producción final de ácido láctico son consistentes con aquellos obtenidos por Schiraldi et al [12] en experimentos similares, obteniendo una concentración final de 8.79 g/L en la corrida A₁B₂, la cual es 7.2% mayor que la obtenida en la corrida A₂B₂, y 8.9% superior al valor obtenido con las otras dos corridas.

Dados los resultados anteriores, se determina que las condiciones más adecuadas para la obtención de una biomasa elevada con un tiempo de producción reducido, con alta viabilidad celular, son las utilizadas en la corrida A1B2, es decir, utilizando 2 turbinas Rushton con un flujo de aire de 1.48 VVM (4 L/min en el Bioflo).

DIMENSIONAMIENTO PRELIMINAR DEL REACTOR PILOTO

Se decidió realizar el diseño de un reactor piloto que permitiera garantizar la mayor similitud con las pruebas experimentales realizadas en el Bioflo. El volumen total seleccionado fue de 50.0 L, el cual presenta un aumento de un orden de magnitud con respecto al reactor de laboratorio y permite que este último sea usado para la preparación del inóculo.

Se encontraron las relaciones adimensionales utilizadas para la descripción geométrica del reactor de laboratorio, las cuales se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Relaciones adimensionales para el diseño del reactor

Relación adimensional	Valor
Altura líquido/Altura total	0.65
Altura reactor/Diámetro reactor	1.45
Diámetro agitador/Diámetro reactor	0.33
Altura paleta/Diámetro agitador	0.2
Longitud paleta/Diámetro agitador	0.25

La relación entre altura de líquido y altura total es un poco menor a la que usualmente se utiliza, debido a la aparición de abundante espuma a partir de las 16 horas de operación bajo las condiciones seleccionadas. Por esta razón,

para el diseño se tuvo en cuenta la implementación de un rompedor mecánico de espuma, ya que la adición de sustancias antiespumantes afectan el coeficiente de transferencia de oxígeno, elemento clave en el posterior escalamiento del reactor.

Las dimensiones generales del equipo diseñado se presentan junto con los parámetros de escalamiento del equipo en la tabla 10.

Nivel de Contención para Seguridad

El nivel de contención se define de acuerdo con las características del microorganismo utilizado, teniendo en cuenta aspectos como su grado de modificación genética, patogenicidad y virulencia entre otros.

Dado que las bacterias utilizadas no presentan riesgo para la salud humana en ninguno de los aspectos anteriores, es posible clasificarlas como microorganismos Grupo I, y debe cumplir con los requerimientos de seguridad GILSP (*Good Industrial Large Scale Practice*) [9]. Los procedimientos de seguridad para la operación a este nivel son aquellos de seguridad básica en un laboratorio, con autoclavado in situ, y sin requerimientos de purificación de gases ni sistemas sellados para toma de muestras o adición de materiales. Puede utilizarse la agitación mecánica sin condiciones especiales de seguridad.

Material de Construcción

El material seleccionado es acero inoxidable AISI 316L, apropiado para las condiciones especiales de pH generadas por la producción de ácido láctico. Los espesores de placa requeridos son de 2 mm para las paredes y 2.86 mm para el fondo y la tapa, calculados de acuerdo con el estándar ASME capítulo VIII.

Escalamiento del Reactor

Conocidas las condiciones óptimas para el crecimiento celular, y dado que las variables analizadas experimentalmente se relacionan estre-

chamente con la transferencia de oxígeno al medio y el sostenimiento de las condiciones microaerofílicas dentro del reactor, se optó por utilizar el criterio del coeficiente volumétrico de transferencia de masa $K_L a$ como constante para el escalamiento, utilizando como parámetros la potencia por unidad de volumen (P_G/V) y el flujo volumétrico de aire (Q).

El procedimiento seguido es el sugerido por Hubbard [4], que determina dos pasos para la obtención de las condiciones de operación en el reactor de mayor escala:

- Determinación del flujo de aire que mantiene el parámetro Q/V constante.
- Cálculo de la velocidad de agitación que mantiene constante el valor de $K_L a$.

El valor de $K_L a$ para el Bioflo fue determinado de manera experimental utilizando el método estático de *gassing out* [15], obteniendo de esta manera un valor de 5.16 h^{-1} (0.001 s^{-1}).

Los parámetros de escalamiento se pueden obtener utilizando las siguientes correlaciones [15].

$$K_L a = 0.0026 \left(\frac{P_G}{V} \right)^{0.4} v_s^{0.5}$$

$$\frac{P_G}{P_o} = 0.1 \left(\frac{Q}{NV} \right)^{-0.25} \left(\frac{N^2 D^4}{g w V^{2/3}} \right)^{-0.2}$$

$$P_o = N_p N_i N^3 D^5 \left(\frac{\rho}{550 g_c} \right)$$

Aplicando las correlaciones, se obtienen los resultados que se muestran en la tabla 10.

Con estos resultados se puede realizar el diseño del reactor piloto, el cual se presenta en la Figura 9.

Tabla 10. Resultados Escalamiento

Parámetros de Escalamiento	
Q/V	1,48 vvm
Q (Flujo volumétrico de gas)	74,0 L/min
Dimensiones generales	
D (diámetro del reactor)	43,45 cm
H (Altura del líquido)	40,96 cm
H _T (Altura total del reactor)	63,01 cm
h _p (Altura de pared)	41,28 cm
V (Volumen líquido del reactor)	50,00 L
V _T (Volumen total del reactor)	82,7 L
Agitación	
d (diámetro del agitador)	19,98 cm
w (altura de paleta)	4,00 cm
l (longitud de paleta)	4,99 cm
N (velocidad del agitador)	100 rpm
N _p (Power number)	5,28
N _i (Número de agitadores)	2
Baffles	
N _b (número de baffles)	4
J (ancho de baffles)	4,35 cm
Cálculos	
Re	58501
P _g (potencia requerida)	10,6351 W
K _L a calculado (correlación)	5,88 h ⁻¹

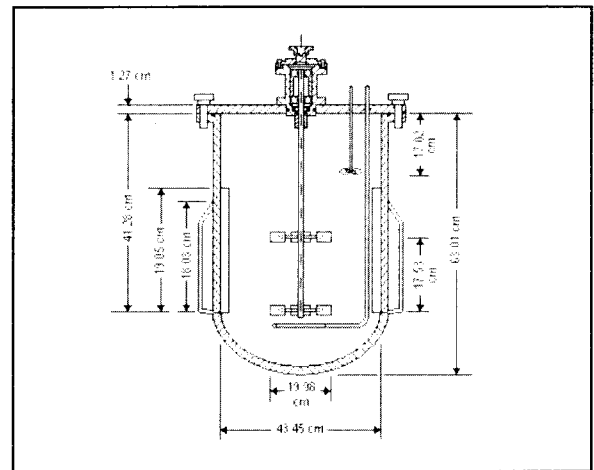


Figura 9. Diseño del reactor piloto (50 L)

CONCLUSIONES GENERALES

Se logró producir probióticos a partir de medios no lácticos, utilizando como medio de cultivo un subproducto de la industria del azúcar de muy bajo costo en el mercado.

Se diseñó y escaló un reactor a escala piloto para producción de probióticos en medios no lácticos.

El medio de cultivo 3 arrojó resultados sorprendentes de crecimiento celular (5.8 g/L) y viabilidad de células (10^{14} UFC/kg), dando una posibilidad para Colombia de entrar en el mer-

cado de producción de los probióticos, utilizando materias nacionales y aprovechando los residuos de uno de los procesos productivos más importantes en el país como lo es la producción de azúcar.

Uno de los logros más relevantes de este proyecto fue la obtención de las condiciones de operación óptimas para el crecimiento de los microorganismos probióticos en un reactor *batch* de laboratorio, usando dos turbinas Rushton de 6 paletas, aireación de 1.48 vvm, tiempo de proceso de 24 horas y un medio de cultivo de bajo costo.

El crecimiento celular que se obtuvo en el medio de cultivo 3 en los experimentos en el shaker, es tan solo un 10% menor que los mayores crecimientos encontrados en institutos de investigación de Japón [13] y es 40% mayor que estudios realizados en otros sustratos en Europa [10].

Para bifidobacterium la fermentación en el shaker tarda 40 horas en alcanzar el mayor crecimiento celular, y es un tiempo aproximado a los encontrados en referencias bibliográficas [5].

En las fermentaciones realizadas en el shaker con el medio de cultivo 2, no se obtuvo una viabilidad de células favorable para el propósito de éste experimento (10^5 UFC/gr), y el crecimiento celular máximo obtenido en el medio de cultivo 3 fue bajo (3,5 g/L) comparado con los obtenidos en los otros medios.

El escalamiento del reactor fue completado de manera exitosa, con un alto grado de confianza en los resultados dado que el valor de $K_L a$ experimental es muy similar al calculado por correlaciones. El cambio de escala permite además el uso del reactor de laboratorio para preparar el inóculo del reactor piloto.

Sobre la producción de ácido láctico, importante subproducto del proceso, se encontró una concentración final en niveles similares a los

referenciados por otros investigadores, alrededor de 9g/L.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Centro de Investigaciones de la Facultad de Ingeniería (CIFI) de la Universidad de los Andes.

REFERENCIAS

- [1] "Lighthnin Impeller Technology", catálogo en línea de Lighthnin Inc. En www.lighthnin-mixers.com
- [2] Gómez, C. "Obtención de Microorganismos Probióticos en un Medio no Láctico", Anexo C, Tesis Universidad de los Andes, Bogotá 2004.
- [3] Hobsobson, P. "Crianza de un ternero para carne", Editorial CECSA, 1985
- [4] Holzapfel, Wilhelm et al " *Introduction to pre- and probiotics*", Food Research International, Mayo 15 de 2001.
- [5] Kim, Young. Growth of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in Natural Media using Vegetables, Seaweed, Grains and Potatoes, Food Science Biotechnology, Korea, 2000, p.322- 324.
- [6] Krasaekoopt, W. Bhandari, B. Deeth, H. *Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt*. International Dairy Journal, Junio de 2001. pp. 87-92
- [7] Kwon, S., Yoo, I., et al "High-Rate Continuous Production of Lactic Acid by Lactobacillus rhamonosus in a Two-Stage Membrane Cell-Recycle Bioreactor", Korea Advanced Institute of Science and Technology, Enero 29 de 2000.
- [8] Luedeking R, Piret E, "A Kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH", Biotechnology and Bioengineering, Vol 67, No. 6, Mar. 2000, pp. 393-401.
- [9] Lydersen B, D'elia N, Nelson K, "Bioprocess engineering: systems, equipment and facilities", John Wiley & Sons, 1994.
- [10] Ostlie, H, Helland, M, *Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk*, International Journal of Food Microbiology, Noruega, 2002, p.3.
- [11] Pardio, Violeta , *Los probióticos y su futuro*, Archivos Latinoamericanos de nutrición, Volumen 46, 1998.
- [12] Schiraldi C, Adduci V, Valli V, Maresca C, Giuliano M et al., "High cell density cultivation of probiotics and lactic acid production", Wiley Periodicals, Feb. 2003, pp. 213-222.
- [13] Shimakawa, Y. " Evaluation of Bifidobacterium Yakult fermented soymilk as a probiotic food", International Journal of Food Microbiology, Mayo 7 de 2002.
- [14] Shuler, M. Kargi, F. "Bioprocess Engineering: Basic Concepts". 2a. Ed. Prentice Hall, 2001.
- [15] Stanbury P, Whitaker A, Hall S, "Principles of fermentation technology", Butterworth Heinemann, Massachussets, EUA, 1995.
- [16] Williams, P. " La acción de los cultivos de levadura en el rumen", en *Biotecnología en la industria de alimentación animal*, Editorial Setosa, Volumen 1, México 1999.