

Artículos de Originales

ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE GRANOS DE KÉFIR

Study of the stirring speed for the biomass production of kefir grains

Fermín H. Arévalo¹, Gladys C. Arias²

¹Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina.

²Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

Se realizó el estudio de la velocidad de agitación que requiere un cultivo de granos de kéfir, para optimizar su crecimiento en un medio de cultivo conformado por melaza de caña y suero de leche. Los resultados indican que esta mezcla de microorganismos requiere agitación para optimizar su crecimiento y que puede crecer en un amplio rango de velocidades de agitación, desde flujo laminar, con número de Reynolds menor a 2000, hasta flujo turbulento, con número de Reynolds mayor a 3500. Esto demuestra que los granos de kéfir, pueden adaptarse a diferentes condiciones de agitación, haciendo su cultivo bastante sencillo respecto a esta variable.

Palabras clave: Velocidad de agitación, número de Reynolds, biomasa.

SUMMARY

The stirring speed required for the culture of kefir grains was studied, to optimize its growth in a culture medium of molasses and whey. The results show that this mixture of microorganisms requires stirring to optimize its growth and can grow in a wide range of stirring speeds, from laminar flow, with Reynolds number lower than 2000, to turbulent flow with Reynolds number greater than 3500. This shows that the culture of kefir grains, can adapt to different stirring speeds, making its culture very easy with respect to this variable.

Keywords: Stirring speed, Reynolds number, biomass.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de alimentos, y producirlos sin dañar el ambiente, son retos importantes en la actualidad. Desde el siglo XIX la polución ha venido en aumento con el devenir de la tecnología, pero sólo en las últimas décadas, esta preocupación se ha hecho patente en las sociedades de nuestro planeta que ahora, al que ahora consideramos moderno y globalizado.

PML o P+L (Producción más Limpia), es un concepto ambiental donde los procesos unitarios son realizados de tal manera que no se desperdicie nada durante dicho proceso. Bajo este concepto los desechos industriales pueden convertirse en materia prima para otro proceso, generando valor agregado a los mismos, de tal manera que los residuos tiendan a cero, previniendo así la contaminación del planeta ⁽¹⁾.

El hecho de producir alimentos tratando al ambiente amigablemente es loable; pero lo es

mucho más si la producción de proteínas se realiza utilizando desechos industriales como la melaza de caña y el suero de leche, en una mezcla adecuada ⁽²⁾. Respecto al lactosuero, debe tenerse en cuenta que es un desecho industrial con alto poder de contaminación ambiental cuando es vertido a los drenajes, ya que exige una gran demanda bioquímica de oxígeno que varía entre 30000 a 50000 mg/L³; sin embargo, si se le utiliza adecuadamente puede ser una buena fuente nutricional para cultivos microbiológicos.

Para que la producción de biomasa sea óptima, los parámetros cinéticos de la fermentación deben de ser adecuadamente controlados, y un caso al respecto de gran importancia, es la velocidad de agitación durante el proceso de fermentación. Este parámetro, dependiendo del diseño del biorreactor, determina dos tipos de flujo hidrodinámico, que son los llamados flujo laminar y flujo turbulento ⁽⁴⁾, los cuales están determinados por un número adimensional que es de utilidad para

hacer escalamientos, el número de Reynolds ^(5, 6). Así pues en este trabajo se estudia como la velocidad de agitación y el tipo de flujo afectan la producción de biomasa de granos de kéfir, que es una mezcla simbiótica de bacterias y levaduras ⁽⁷⁾. En tal sentido, los objetivos del presente trabajo de investigación son estudiar de qué manera la velocidad de agitación afecta el crecimiento de los granos de kéfir en una mezcla de suero de

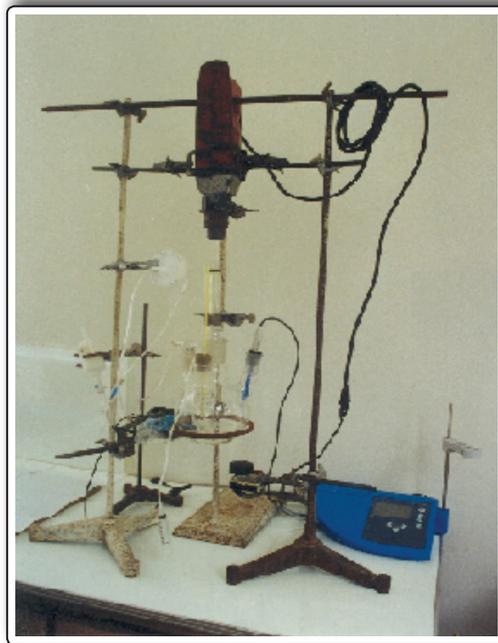


Figura 1. Biorreactor.

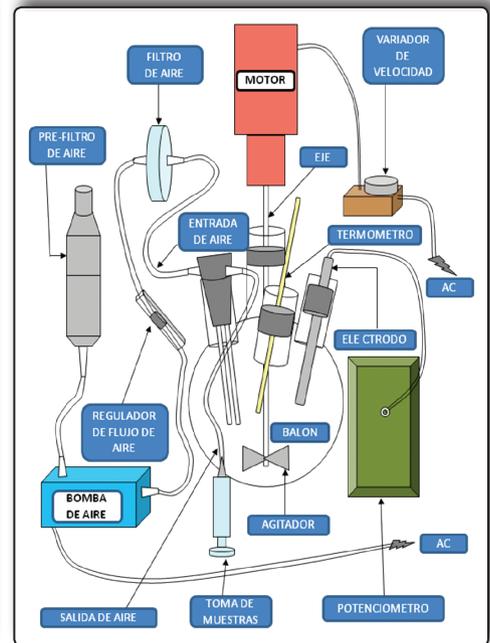


Figura 2. Esquema del biorreactor .

leche y melaza de caña, y determinar si el crecimiento óptimo de los mencionados granos se da a velocidad de agitación de flujo laminar, de transición o turbulento, tomando en consideración el número de Reynolds.

En una fermentación, para que el crecimiento, metabolismo y transferencia de masa se realicen a velocidades apropiadas, es necesario proveer de movimiento al sistema, lo cual normalmente se hace mediante la agitación mecánica. Sin embargo, como se dijo previamente, qué velocidad o qué fuerza deberán aplicarse en dicha agitación, dependerá de muchos factores, entre los cuales se destacan el diseño del biorreactor, además de las características fisicoquímicas del medio de cultivo y/o los microorganismos implicados en la fermentación, pues uno de los factores que generalmente limita la velocidad de agitación es el corte que pueden sufrir los microorganismos en el proceso, lo cual degenera la mencionada reacción ^(8, 9).

En un biorreactor circular con agitación generada por paletas –el más común del mercado–, la velocidad máxima está en el extremo de las paletas lo que causa importantes daños por corte cuando no es debidamente controlada ⁽⁹⁾.

El número de Reynolds, que rige el flujo hidrodinámico, se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$Re = \frac{D_i \cdot N \cdot d}{u}$$

Donde:

- Di = Diámetro del agitador en cm (cm)
- N = Velocidad del agitador en Hz (seg⁻¹)
- d = Densidad del medio de fermentación (g/cm³)
- u = Viscosidad dinámica en centipoises (g/cm.seg)

La interpretación se realiza de acuerdo al número de Reynolds obtenido, según los siguientes criterios ^(8, 9, 10):

Flujo laminar: *número de Reynolds menor a 2000.*

Flujo intermedio o de transición: *número de Reynolds de 2000 a 3500.*

Flujo turbulento: *número de Reynolds mayor a 3500.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Agente biológico: Granos de kéfir.

Medio de cultivo: Mezcla de suero de leche con melaza de caña correspondiente a una concentración de 7,0% de azúcares totales ⁽²⁾.

Equipo: Biorreactor de 1000 ml de capacidad. Se muestran en las figuras 1 y 2.

Procedimiento experimental:

Se utilizó el biorreactor indicado en la figura 1 y 2 empleando medio de cultivo formado por una mezcla de suero de leche y melaza de caña ⁽²⁾ y con velocidades de agitación de 00, 60, 120, 180, 240 y 300 r.p.m. Cada

ensayo fue realizado por triplicado. El inóculo para cada ensayo fue de 4% de granos de kéfir respecto al volumen del medio de cultivo, según lo recomendado por Sasaki ⁽¹¹⁾. Se registraron el pH por potenciometría ⁽¹²⁾, densidad inicial y densidad final por picnometría ⁽¹³⁾, en cada ensayo de fermentación, tomando alícuotas del medio de cultivo. Al término de las primeras 48 horas de fermentación se cambió el medio de cultivo por uno nuevo y se reinició el proceso por 48 horas más. Al final de cada ensayo se registraron los datos de peso húmedo y peso seco de biomasa.

RESULTADOS

Los granos de kéfir del experimento sin agitación presentaron un color marrón y fueron de consistencia gelatinosa; en tanto que los obtenidos, a velocidades de agitación de 60, 120, 180 y 240 rpm se presentaron de color blanquecino, consistencia firme y forma bien definida, tal como se muestra en la figura 3; sin embargo, a 300 rpm se observó que los granos fueron muy parecidos a los obtenidos con las revoluciones indicadas anteriormente, pero más pequeños. Las variaciones de pH y densidad se muestran en las figuras 4 y 5, mientras los incrementos porcentuales de biomasa, respecto al inóculo, se presentan en la figura 6.

DISCUSIÓN

La falta de agitación tiene un impacto significativo en la producción de biomasa de granos de kéfir, tal como se observa en la figura 6.

En lo referente al pH y la densidad, figuras 4 y 5, se observan dos partes bien definidas: una correspondiente a los ensayos sin agitación y la otra a los ensayos con agitación. Específicamente en la figura 5, se observa que sin agitación se alcanza un valor más bajo que en con ella, probablemente debido a que la anaerobiosis es más estricta y por ello se ve favorecida la producción de metabolitos que inducen acidez, como por ejemplo, ácido láctico, alcohol y dióxido de carbono, entre otros ⁽⁸⁾. Además la falta de agitación impide la eliminación adecuada del dióxido de carbono disuelto en el medio de cultivo que tiene un efecto directo sobre el pH.

Para el caso de la densidad, en la figura 4, se observa que con agitación la densidad



Figura 3. Granos de kéfir.

disminuye significativamente respecto al ensayo sin agitación; esto se debería a que los nutrientes han sido mejor distribuidos y aprovechados por los microorganismos en crecimiento, lo cual se corrobora en la figura 4.

En cuanto al color de los granos de kéfir, la coloración marrón en el ensayo sin agitación parece deberse a que, por mecanismos de sedimentación, los granos engloban partículas de carbón provenientes de la melaza de caña, la misma que es parte del medio de cultivo. Este mismo hecho puede explicar la consistencia gelatinosa de los granos obtenidos sin agitación, ya que es el único caso, a diferencia de los demás ensayos, en el cual el incremento porcentual de biomasa húmeda es mayor al de la biomasa seca. Así pues, cuando se proporciona agitación al sistema, los granos de kéfir obtenidos no son de consistencia gelatinosa, sino firmes, blanquecinos y de forma bien definida, tal como se observa en la figura 6, a pesar del color marrón oscuro del medio.

De los resultados obtenidos se colige que la velocidad de agitación, con el biorreactor empleado, a 60 rpm, ya es adecuada para la producción de biomasa. Probablemente el valor mínimo requerido de rpm sea aún menor (el biorreactor no permitió hacer tales pruebas).

Es claro que a medida que se aumenta la velocidad de agitación por encima de 60 rpm, tal como se aprecia en la figura 6, no se observa cambio significativo en el incremento porcentual de biomasa; mientras que cuando alcanza 300 rpm se observa un descenso.

Por otro lado, respecto al tamaño de los granos de kéfir, se observó que a 300 rpm fueron sustancialmente más pequeños que aquellos obtenidos con menores rpm de agitación y aún más pequeños que el inóculo mismo, lo que significa que sufren fraccionamiento debido, principalmente, a los extremos de las paletas, donde la velocidad y el efecto de corte son máximas ^(8, 9).

Tomando en consideración el número de Reynolds, es preciso mencionar que el diámetro de las paletas utilizadas fue de 8 cm. Las velocidades de agitación que se pueden considerar son de 60 a 300 rpm, es decir de 1 a 5 Hz. La densidad del medio, al iniciar la fermentación, estuvo entre 1,03 y 1,04 g/cm³ (ver anexo), la cual va disminuyendo a medida que la fermentación transcurría, pero con valores superiores a 1,00 g/cm³. Es importante señalar que la fermentación es heterogénea, ya que se diferencian dos fases: el medio de cultivo y los granos de kéfir; sin embargo, por otro lado se tiene que la proporción de granos respecto al volumen total del medio de cultivo es sólo de 4%, la cual aumenta a medida que la fermentación transcurre.

Finalmente, la viscosidad dinámica del medio de fermentación, la cual no se puede medir debido a la heterogeneidad del mismo y por las variaciones de temperatura ⁽¹⁴⁾, sólo puede ser estimada de acuerdo a tablas. Según Raymond Chang, el plasma sanguíneo y la sangre tienen una viscosidad de 1,015 y 1,040 centipoises respectivamente ⁽¹⁰⁾, y la mayoría de los fluidos biológicos oscilan alrededor de estos valores. Entonces es de esperar que el suero de leche se aproxime a dichas cifras y que la melaza de caña, en el medio de cultivo, influya para que la viscosidad sea aún mayor que 1,040 centipoises, al incrementar los azúcares en solución dentro del medio, motivo por lo cual, en

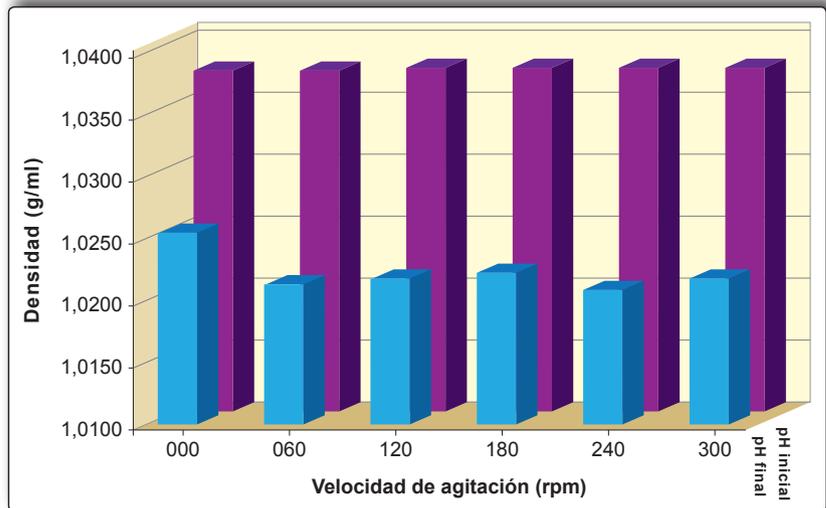


Figura 4. Variación de la densidad respecto a la velocidad de agitación.

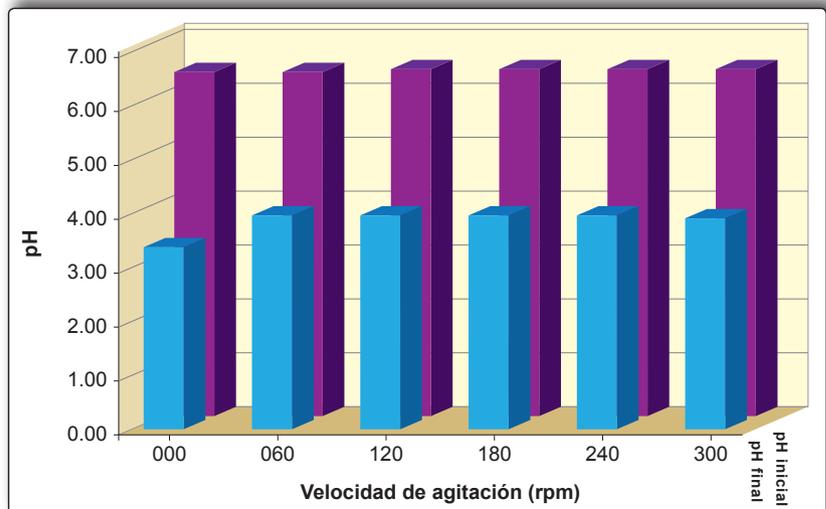


Figura 5. Variación del pH respecto a la velocidad de agitación.

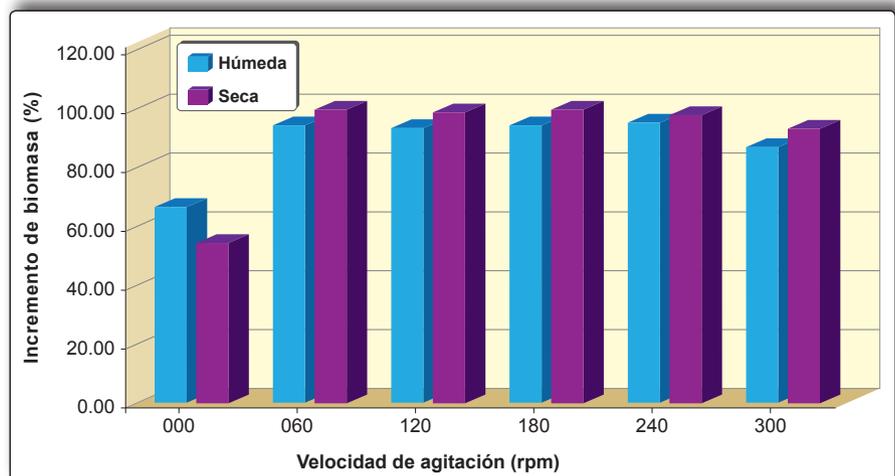


Figura 6. Incremento de biomasa respecto a la velocidad de agitación.

ningún caso, el valor en cuestión sería menor a 1,015 centipoises. En el caso extremo de que la viscosidad sea mayor a 1,040 centipoises, se deduce que disminuirá el número de Reynolds, ya que este valor, es decir la viscosidad dinámica μ , se encuentra en el denominador de la ecuación.

Así pues, a la luz de los resultados y haciendo algunas estimaciones matemáticas con los siguientes valores: $D_i = 8$ cm; $N = 1$ a 5 seg^{-1} ; $d = 1,00$ a $1,04$ g/cm^3 ; $\mu = 1,015$ a $1,040$ $\text{g/cm}\cdot\text{seg}$; se determinó que este tipo de cultivo puede crecer tanto en flujo laminar ($Re < 2000$), como en flujo intermedio o de transición (Re de 2000 a 2500) y flujo turbulento ($Re > 3500$)^(8,9,10). Sin embargo, para economizar energía, y no causar cortes en los granos de kéfir, se optaría por el flujo laminar o el de transición, no siendo necesario el flujo turbulento; consideración de importancia para fines industriales o de escalamiento.

Finalmente, Crueguer menciona que la mayoría de las fermentaciones requieren una velocidad tangencial del impulsor de 5 a 7 m/seg ⁽⁸⁾; sin embargo en este caso, realizando los cálculos correspondientes, sólo se alcanzarían las velocidades de $0,25$ m/seg a 60 rpm y de $1,25$ m/seg a 300 rpm, lo cual es mucho menor que lo mencionado anteriormente. Por tanto, en resumen, se puede concluir que los requerimientos de agitación para la producción de biomasa a partir de los granos de kéfir, son absolutamente necesarios, pero no son rigurosos ni exigentes.

CONCLUSIONES

Del estudio realizado se puede concluir que la velocidad de agitación en la producción de biomasa de granos de kéfir es absolutamente necesaria, pero no es de exigencias rigurosas, ya que puede crecer normalmente en un amplio rango de velocidades de agitación, desde flujo laminar hasta flujo turbulento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. United Nations Environment Programme PNUMA. Documentos Técnicos de apoyo. Parte III. [En línea] Acceso 14 de febrero 2014. Disponible en <http://www.pnuma.org/eficienciarecursos/documentos/pmlcp03b.pdf>
2. Arévalo-Ortiz FH. Obtención de biomasa de la microbiota de los granos de kéfir utilizando suero de leche y melaza de caña. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2005.
3. Sánchez-Toro OJ, Ortiz-Buriticá MC, Betancourt -Garcés AL. Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus* spp. Rev Colomb Biotecnol 2004; 4(1): 43-54. [En línea] Acceso 19 de agosto 2014. Disponible en <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/542/1044>
4. Pardo-Aluma LE. Flujo en Tuberías. Programa de Ingeniería Civil. Grupo Hidráulica Aplicada. Universidad Tecnológica de Chocó. Colombia, Quibdó, 2002. p. 2-4.
5. Wang M, Catalano P, Iaccarino G. Prediction of high Reynolds number flow over a circular cylinder using LES with wall modeling. Center for Turbulence Research. Annual Research Briefs 2001. p. 45-9.
6. Breuer, M. A challenging test case for large eddy simulation: high Reynolds number circular cylinder flow. International Journal of Heat and Fluid Flow 2000. 21(5): 648-54.
7. Guzel-Zeydim Z, Wyffels JT, Seydim AT, Greene AK. Turkish kéfir and kéfir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. Int J Dairy Technol 2005; 58(1): 25-9.
8. Crueguer W, Crueguer A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Editorial Acribia. Zaragoza, 1993. pp. 92-106, 141-6, 353-64.
9. Scragg, A. Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos. 1ª ed. Limusa. México DF, 1996. pp. 101-23, 190-204, 290-303.
10. Chang R. Físicoquímica con Aplicaciones a Sistemas Biológicos. Compañía Editorial Continental. México. 1ª ed. México, 1986. pp. 101-7, 387-8, 475-505.
11. Sasazki-Tamaki D. Elaboración de Kéfir. [Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias] Facultad de Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, 1995. pp. 32-4, 38-40.
12. Bloomfield M. Química de los organismos vivos. Limusa. México, 2001. pp. 346-7.
13. Atarés-Huerta L. Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro. Universidad Politécnica de Valencia. España. [En línea] Acceso 19 de agosto 2014. Disponible en <http://riiunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12655/11.%20Art%C3%ADculo%20docente.%20Determinaci%C3%B3n%20de%20la%20densidad%20de%20un%20l%C3%ADquido%20con%20el%20m%C3%ADtodo%20del%20picn%C3%B3metro.pdf?sequence=1>
14. Pons Muzzo G. Físicoquímica. Curso Básico Para las Profesiones Científicas. 4ª ed. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 1978. pp. 239-43, 385-92.

Manuscrito recibido el: 30/06/14

Aceptado para su publicación el: 18/08/2014

Correspondencia:

Nombre: Fermín Humberto Arévalo Ortiz
Gladys Arias Arroyo
Dirección: Av. La Molinas/n La Molina. Lima-Perú.
Jr. Puno 1002. Lima - Perú.
E-mail: fharevalo@lamolina.edu.pe
ariasarroyo@gmail.com