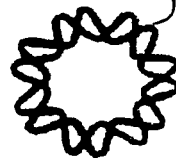




00562³

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

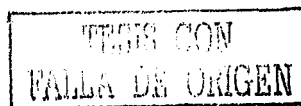
“Escalamiento -de matraz a fermentador de
laboratorio- de la producción de alginatos por
Azotobacter vinelandii”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A
BIÓLOGO CÉSAR REYES REYES

Cuernavaca, Morelos. Marzo del 2003

A





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

... la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e impres
contenido de mi trabajo recepción

NOMBRE: César
Reyes Reyes
FECHA: 4 - Junio - 2003
FIRMA: [Signature]

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique Galindo Fentanes y la asesoría del Dr. Carlos F. Peña. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): Beca C. Reyes y a DGAPA UNAM (Proyecto IN 218201).

B

TECNOLOGIA
FALLA DE CARGEN

Agradecimientos

A mi tutor Dr. Enrique Galindo Fentanes por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por todo su apoyo y confianza brindados durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Sanjay Bellara y Dr. Carlos Peña por su interés en la realización y culminación de este proyecto y valiosos comentarios.

A los miembros del jurado, por la revisión de la tesis, por sus críticas, comentarios y sugerencias.

Dr. Agustín López M.

Dra. Guadalupe Espin O.

Dr. Enrique Galindo F.

Dr. Mario Rodríguez

Dr. Norberto Chavarría H.

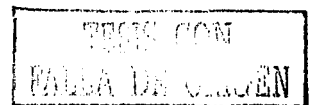
A los M. en C. J. Antonio Rocha y Mauricio Trujillo por sus valiosos comentarios durante la realización del presente proyecto.

Dra. Marisol Córdova y T.L. Mario Caro por su ayuda técnica

A Cristina del Carmen Dzul por su apoyo en el trabajo experimental

A mis amigos por su amistad, apoyo incondicional y por tener una familia lejos de casa: Heber, Karina, Celia, Jorge, Hugo, Edgar, Rolando, Angélica, J. Marfa, Rachel, Claire, Rocío, Sanjay, Leandro, Nancy, Rubén, Alejandro (s), Patricia, Soralia, Pedro, Boris, Lucio, Saúl, Gabriela.

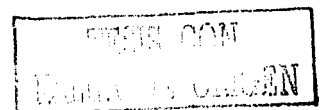
A todos los amigos y compañeros del laboratorio 10 y Planta piloto



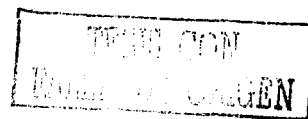
Índice general

	Página
Resumen	1
1.- Introducción	2
2.- Antecedentes	6
2.1 Ventajas y problemas de los matraces agitados	6
2.2 Suministro de potencia en matraces agitados	9
2.2.1 Transferencia de oxígeno en matraces agitados	12
2.3 Escalamiento	16
2.4 Escalamiento: de matraces a fermentador	18
2.5 Alginatos y <i>Azotobacter vinelandii</i>	21
2.5.1 <i>Azotobacter vinelandii</i>	22
2.5.2 Estructura y propiedades físicas del alginato	23
2.5.3 Aplicaciones de los alginatos	24
2.5.4 Factores y condiciones que influyen la producción de alginato por fermentación	24
2.6 Justificación	27
2.7 Hipótesis de trabajo	27
3.- Objetivos	28
4.- Materiales y Métodos	29
4.1 Materiales	29
4.1.1 Microorganismo	29
4.1.2 Medio de cultivo	29
4.1.3 Inóculo	29
4.2 Cultivos en matraces	30
4.2.1 Estimación de potencia volumétrica (caldos de cultivo a bajas viscosidades)	30
4.2.2 Determinación del número de fase en caldos de cultivo de altas viscosidades	31
4.3 Cultivos en fermentador	32
4.3.1 Determinación de consumo de potencia en fermentador	33

0



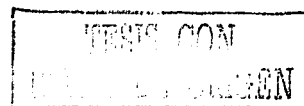
4.3.2	Determinación del consumo de potencia en fermentador a altas viscosidades	34
4.3.3	Determinación de las propiedades reológicas de soluciones de alginato	34
4.4	Métodos analíticos	36
4.4.1	Estimación de biomasa por turbidimetría	36
4.4.2	Determinación de la concentración de biomasa	36
4.4.3	Cuantificación del alginato	36
4.4.4	Determinación de sacarosa por el método de β - fructofuranosidasa DNS	37
4.4.5	Determinación de viscosidad del caldo de cultivo	38
4.4.6	Distribución de pesos moleculares	38
4.5	Cálculo de los parámetros cinéticos y estequiométricos	39
4.6	Estrategia experimental	41
5.	Resultados y Discusión	44
5.1	Cultivo de <i>Azotobacter vinelandii</i> en matraces bajo condiciones "estándar" (0.27 W/L)	44
5.2	Cultivos de <i>A. vinelandii</i> en fermentador a 0.27 W/L	46
5.3	Cultivos de <i>A. vinelandii</i> en fermentador operados a suministro de potencia inicial menores a 0.27 W/L	53
5.3.1.	Cultivos a 0.075 W/L	53
5.3.2	Cultivos a 0.056 W/L	55
5.3.3	Cultivos a 0.027 W/L	57
5.3.4	Comparación de resultados en biorreactor (a varias P/V's) y la condición "estándar" en matraz	57
5.3.4.1	$\mu_{\text{máx}}$ como función de P/V inicial	61
5.3.4.2	Rendimiento como función de P/V inicial	62
5.3.4.3	Capacidad viscosificante como función de P/V inicial	63
5.3.4.4	Evolución del PMP como función de P/V inicial	65
5.3.4.5	Polidispersión del alginato como función de P/V inicial	67



Índice de figuras

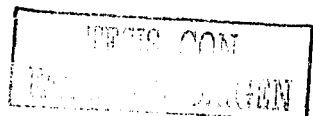
Página

2.1 Parámetros operacionales que afectan el suministro de potencia y k_{LA} en matraces	8
2.2. Matraces con líquidos de baja: a) 1 mPa's y de alta viscosidad (fenómeno "fuera de fase" b) 75 mPa's y c) 135 mP's (tomado de Büchs <i>et al</i> , 2000b).	11
2.3. Monómeros estructurales del alginato: a) Ácido gularónico y b) Ácido manurónico.	23
4.1. Determinación del suministro de potencia en matraces de 500 mL con 100 mL de agua a una velocidad de agitación de 200 r.p.m. y 2.5 cm de excentricidad.	30
4.2. Determinación del suministro de potencia en matraces de 500 mL con 100 mL de agua a una velocidad de agitación de 200 r.p.m. y 2.5 cm de excentricidad.	31
4.3 Relación entre la velocidad de agitación y el suministro de potencia gaseada (0.8 VVM) en biorreactor de 1 litro, utilizando agua.	34
4.4. Relación de la velocidad de corte (γ) con el esfuerzo de corte (τ) para obtener el índice de consistencia (K) y el índice de flujo (n).	35
4.5 Curva patrón para la determinación de sacarosa.	38
4.6. Estrategia experimental	42
5.1. Cinéticas de crecimiento de biomasa (a), producción de alginato (b), pH (c), viscosidad aparente (d), peso molecular promedio (e) y consumo de sacarosa (f) por <i>A. vinelandii</i> , en matraces Erlenmeyer de 500 mL (0.27 W/L de P/V).	45
5.2 . Evolución del oxígeno disuelto (a), biomasa (b), alginato (c), pH (d), viscosidad aparente (e) y sacarosa (f) por <i>A. vinelandii</i> en cultivos en fermentador y en matraces (tomada de la figura 1) a una potencia volumétrica inicial de 0.27 W/L.	47
5.3. Relación entre la concentración de alginato y la viscosidad de los caldos de <i>A. vinelandii</i> desarrollados en matraz y fermentador con suministro de potencia similares (0.27 W/L).	50
5.4. Evolución del peso molecular promedio del alginato durante el cultivo de <i>A. vinelandii</i> , en matraz y fermentador con suministro de potencia inicial de 0.27 W/L.	52



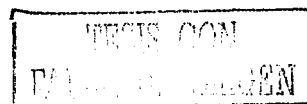
5.5. Evolución del oxígeno disuelto (a), biomasa (b), alginato (c), pH (d), viscosidad aparente (e) y sacarosa (f) por <i>A. vinelandii</i> , en cultivos en fermentador 200 r.p.m (0.075 W/L) y en matraces (de la figura 5.1).	54
5.6. Evolución del oxígeno disuelto (a), biomasa (b), alginato (c), pH (d), viscosidad aparente (e) y sacarosa (f) por <i>A. vinelandii</i> , en cultivos en fermentador 180 r.p.m (0.056 W/L) y en matraces (tomada de la figura 5.1).	56
5.7. Evolución del oxígeno disuelto (a), biomasa (b), alginato (c), pH (d), viscosidad aparente (e) y sacarosa (f) en cultivos de <i>A. vinelandii</i> en fermentador (0.027 W/L) y matraces (tomada de la figura 5.1).	58
5.8 Relación entre el suministro de potencia inicial y la máxima velocidad específica de crecimiento en cultivos de <i>A. vinelandii</i> en biorreactor y en matraz.	61
5.9. Rendimientos ($Y_{p/x}$) como función de la P/V inicial en cultivos de <i>Azotobacter vinelandii</i> desarrollados en fermentador y matraz.	63
5.10. Relación entre la concentración de alginato y la viscosidad de los caldos de <i>A. vinelandii</i> desarrollados en bioreactor a diferentes P/V's y en matraces a 0.27 W/L.	64
5.11. Evolución del peso molecular promedio del alginato durante el cultivo de <i>A. vinelandii</i> , a diferentes valores de P/V en fermentador y a 0.27 W/L en matraces.	65
5.12. Relación entre la máxima velocidad específica de crecimiento de <i>Azotobacter vinelandii</i> y el peso molecular promedio máximo del alginato producido en cultivos de fermentador y en matraz.	67
5.13 Índices de polidispersión de los alginatos sintetizados por <i>A. vinelandii</i> bajo diferentes condiciones de cultivo en fermentador y en matraz.	68
5.14 Distribución de pesos moleculares de alginatos sintetizados en fermentador a una potencia inicial de 0.27 W/L.	70
5.15 Distribución de pesos moleculares de alginatos sintetizados en fermentador a un consumo de potencia inicial de 0.075 W/L.	70
5.16 Distribución de pesos moleculares de alginatos sintetizados en fermentador a una potencia inicial de 0.056 W/L.	71
5.17. Distribución de pesos moleculares de alginatos sintetizados en fermentador a un consumo de potencia inicial de 0.027 W/L.	71
5.18. Suministro de potencia en biorreactor a diferentes velocidades de agitación y viscosidad en soluciones de alginato de <i>M. pyrifer</i> (aireación = 0.8 VVM).	72

G



5.19	Suministro de potencia y números de fase (<i>Ph</i>) para fluidos Newtonianos en matraces de 250 mL con 25 mL de volumen de llenado, agitados a 200 r.p.m (Büchs <i>et al</i> , 2000b).	74
5.20.	Índice de flujo (<i>n</i>) e índice de consistencia (<i>K</i>) de soluciones de alginato de <i>Macrocystis pyrifera</i> en función de su concentración, determinados a velocidades de corte de 3 a 700 s ⁻¹ .	75
5.21	Relación de la velocidad de corte con la viscosidad en reómetro (DIN125) para alginato de soluciones de algas marinas: <i>Macrocystis pyrifera</i> .	76
5.22.	Caída de potencia y del número de fase (<i>Ph</i>) de cultivos de <i>A. vinelandii</i> en matraces de 500 mL (100 mL de volumen de llenado, 2.5 cm de excentricidad y 200 r.p.m), a velocidades de corte de 80 y 12 s ⁻¹ .	77
5.23.	PMP _{máx} del alginato como función de la potencia volumétrica en biorreactor y en matraz.	78
5.24.	Perfil del suministro de potencia gaseada (en "fuera de fase"), de biorreactor.	81
5.25.	Evolución del oxígeno disuelto (a), biomasa (b), alginato (c), pH (d), viscosidad aparente (e) y sacarosa (f) por <i>A. vinelandii</i> en fermentador ("fuera de fase") y en matraz (tomado de la figura 5.1).	82
5.26	Relación entre la concentración de alginato y la viscosidad de los caldos de <i>A. vinelandii</i> desarrollados en matraz y fermentador a 0.27 W/L, comparados con cultivos en "fuera de fase" en biorreactor.	83
5.27.	Evolución del peso molecular promedio del alginato durante el cultivo de <i>A. vinelandii</i> , en matraz y fermentador (0.27 W/L) y de fermentador en "fuera de fase".	84
5.28.	Índices de polidispersión de los alginatos sintetizados por <i>A. vinelandii</i> en matraz y biorreactor a P/V inicial similar y en biorreactor en "fuera de fase".	85
A1.	Relación del número de Reynolds con el número de potencia modificado (<i>Ne'</i>) para matraces de 250 mL de volumen nominal, 25 mL de polivinilpirrolidona, agitados a 200 r.p.m. con viscosidades desde 0.8 mPa's hasta 200 mPa's (Büchs <i>et al</i> , 2000b).	96
A2.	Gráfica que representa la velocidad de reemplazo de oxígeno por nitrógeno en la fase líquida para determinar el <i>k_La</i> .	101
A3.	Relación entre la velocidad de agitación y el <i>k_La</i> en biorreactor de 1 litro.	101

H



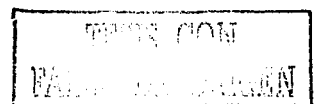
Nomeclatura

A	Constante para un cultivo de <i>E. coli</i> (-)
A	Area del tapón (cm ²)
a	Area de intercambio específico (m)
B	Brazo de palanca (m)
C*	Concentración de oxígeno en el equilibrio (ppm)
C _L	Concentración de oxígeno en el seno del líquido (ppm)
D _{eff}	Coefficiente de difusión efectiva de oxígeno en el líquido (m ² /s)
D _F	Coefficiente de difusión efectiva de oxígeno en el líquido (m ² /s)
di	Diámetro máximo interno del matraz (m)
db	Diámetro máximo externo del matraz (m)
ρO ₂	Densidad del oxígeno (kg/m ³)
e	Excentricidad (m)
F	Fuerza (N)
Fr	Número de Froude (-)
Ga	Número de Galilei (-)
g	Aceleración de la gravedad (m/s ²)
Hy	Constante de la Ley de Henry (Nm/kg)
H	Altura del tapón (cm)
K	Índice de consistencia (Pa.s ⁿ)
k _L a	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h ⁻¹)
M	Torque (N.m)
N	Velocidad de agitación (s ⁻¹)
Ne'	Número de potencia modificado (-)
Np	Número de potencia (-)
Nu	Número de Nussetl (-)
n	Velocidad de agitación (s ⁻¹)
n	Índice de flujo (-)
P	Presión (atm)
Ph	Número de fase (-)

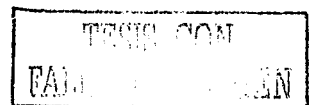
PMP	Peso molecular promedio (g/gmol)
P/V	Suministro de potencia volumétrica (W/L)
P/V _i	Suministro de potencia inicial volumétrica (W/L)
Pr	Número de Prandtl (-)
Re	Número de Reynolds (-)
Ref	Número de Reynolds de la película del líquido en un matraz (-)
PHB	Polihidroxibutirato
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno (mol/L/h)
Sc	Número de Schmidt (-)
Sh	Número de Stanton (-)
TOD	Tensión de oxígeno disuelto (%)
V	Volumen nominal (m ³)
V _L	Volumen de trabajo (m ³)
VVM	Volumen de aire por volumen de medio por minuto
Y _{p/x}	Rendimiento de producto en base a biomasa (g/g)
Y _{p/s}	Rendimiento de producto en base a fuente de carbono (g/g)
Y _{x/s}	Rendimiento de biomasa en base a fuente de carbono (g/g)
w	Constante empírica (-). Tabla 2; ec. 5
x	Constante empírica (-) Tabla 2; ec. 5
y	Constante empírica (-) Tabla 2; ec. 5
z	Constante empírica (-) Tabla 2; ec. 5

Símbolos griegos

α	Constante de la ec. de Luedeking-Piret, se refiere a la producción asociada al crecimiento
α	Constante para un cultivo de <i>E. coli</i> (-)
β	Constante de la ec. de Luedeking-Piret, se refiere a la producción no asociada al crecimiento
$\dot{\gamma}$	Velocidad de corte (s ⁻¹)



γ	Constante empírica (-) Tabla 2.
τ	Esfuerzo de corte (Pa)
ω	Velocidad angular (s^{-1})
σ	Densidad del líquido (Kg/m^3)
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidad máxima específica de crecimiento (h^{-1})
η	Viscosidad del líquido (mPas)
ν	Viscosidad cinemática (kg m/s) tabla 2, ec. 3

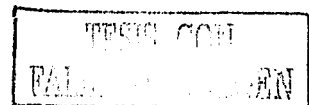


Resumen

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa productora de alginato. Cultivos de *A. vinelandii* en matraz producen alginatos con características reológicas de alta viscosidad en solución y altos pesos moleculares. Sin embargo, al cambiar la escala, por ejemplo, a biorreactor de laboratorio, bajo condiciones constantes de oxígeno disuelto y pH, las viscosidades y los pesos moleculares del polímero son menores en más de dos órdenes de magnitud. Con el objetivo de obtener alginatos con características semejantes a los obtenidos de cultivos de matraces agitados, se escaló el proceso, de matraces a biorreactor de laboratorio de 1 litro, manteniendo constante el suministro de potencia inicial.

Operando el biorreactor de 1 litro, sin control de pH y TOD, a una potencia volumétrica inicial de 0.27 W/L (potencia determinada en el matraz) se obtuvo una viscosidad similar del caldo (480 cps. con una concentración de 8 g/L de alginato). Sin embargo, la capacidad viscosificante del alginato, así como su peso molecular promedio (1.1×10^6 g/gmol) fueron menores a los obtenidos en matraces (1.9×10^6 g/gmol), por lo tanto, no se logró escalar la función objetivo. Sin embargo, en el biorreactor, disminuyendo el suministro de potencia inicial hasta 0.056 W/L, se obtuvo la misma tendencia de la capacidad viscosificante. El peso molecular promedio máximo similar al obtenido en matraces, se obtuvo a una P/V inicial de 0.027 W/L. En todos los cultivos en biorreactor, la polidispersión de los alginatos obtenidos fue mayor (PI = 70-245) a las obtenidas en cultivos de matraces (PI = 3-10).

En los cultivos desarrollados en matraces, las altas viscosidades obtenidas provocaron que los caldos de cultivo cayeran en "fuera de fase", esto es que, la altura del líquido del matraz es menor con respecto al inicio del cultivo y, por lo tanto, la potencia suministrada disminuye. Se estimó que en cultivos de *A. vinelandii* el suministro de potencia puede disminuir alrededor de 6-7 veces, con respecto del inicio de cultivo. En biorreactor se simuló el posible perfil de caída de potencia, basándose en el consumo de potencia total en biorreactor a 0.056 W/L de potencia inicial. La máxima velocidad específica de crecimiento, el perfil de la capacidad viscosificante y el PMP_{\max} fueron muy similares, en matraz y en biorreactor. Sin embargo, el índice de polidispersión del alginato siempre fue mayor en cultivos de fermentador respecto a aquellas en matraz.



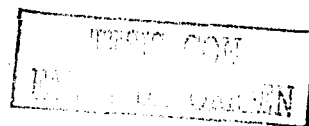
Capítulo I

Introducción

Los alginatos son copolímeros constituidos de residuos de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico. Debido a sus propiedades gelificantes y viscosificantes el alginato es utilizado en diversas industrias que incluyen la farmacéutica, la textil, la alimenticia y la biotecnológica (Clementi, 1997). Para los usos industriales, los alginatos son extraídos de algas marinas del grupo de las feofitas. Sin embargo, debido a los bajos rendimientos de extracción del polímero (10-40 % peso seco de alga), cambios en la calidad del alginato causado por fluctuaciones ambientales, alto contenido de impurezas y purificación costosa, han provocado que se busquen nuevas alternativas de producción (Mejía, 1997). Una de ellas, es el empleo de bacterias del género *Azotobacter*, ya que producen un polímero muy parecido al proveniente de las algas, sobre todo con relación a la presencia y longitud de los bloques de ácidos gulurónico (Sutherland, 1994).

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la producción de alginato por *A. vinelandii* y sobre la influencia de los parámetros ambientales; por ejemplo: efectos de los nutrientes, del tipo y cantidad de la fuente de carbono, el efecto del pH, adición de CO₂, de la temperatura del cultivo, de la agitación y el efecto de la tensión de oxígeno disuelto (Jarman *et al*, 1978; Clementi *et al*, 1995; Parente *et al*, 1998; Peña, 1998; Seañez *et al*, 2001; Peña *et al*, 2000). De toda la gama de factores estudiados en el cultivo de *A. vinelandii*, se ha visto que la tensión de oxígeno disuelto (TOD) es un parámetro clave en la producción de alginatos en cultivo sumergido, tanto en matraces como en fermentador (Horan *et al*, 1981; Horan *et al*, 1983; Chen *et al*, 1985; Brivonese y Sutherland, 1989; Peña *et al*, 1997; Parente *et al*, 1998; Peña *et al*, 2000; Parente *et al*, 2000).

En fermentadores, a una TOD de 3 y 5 % se ha obtenido un peso molecular promedio máximo (PMP_{máx}) de alginato de 0.68×10^6 g/g mol, viscosidades menores a 100 cps (medidas a una velocidad de corte de 12 s⁻¹, en un viscosímetro de cono y plato) y concentraciones de alginato de 3 a 5 g/L (Trujillo, 1999; Peña *et al*, 2000). Sin embargo, en cultivos de *A. vinelandii* en matraces

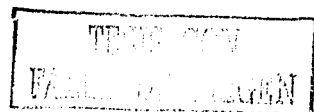


Erlenmeyer, se ha obtenido un $PMP_{m\acute{a}x}$ de hasta 1.98×10^6 g/gmol y una viscosidad de hasta 520 cps con concentraciones de alginato de 5 g/L (Peña *et al*, 1997).

Para cultivos de *A. vinelandii* desarrollados en matraces, existen varios factores que pueden estar involucrados en la producción de alginato de alto PMP y viscosidad, tales como la TOD, el pH, el CO_2 , las condiciones hidrodinámicas, entre otras. Peña *et al* (1997) demostraron que en matraces bafleados (condiciones de alta aireación/agitación), se obtienen alginatos con un $PMP_{m\acute{a}x}$ de 0.4×10^6 g/gmol. Esto demuestra que las condiciones de baja aireación conducen a la producción de alginatos de mayor calidad, desde el punto de vista del peso molecular sintetizado por la bacteria.

Si bien los cultivos de *A. vinelandii* en matraces Erlenmeyer producen un alginato con características reológicas de alta viscosidad y altos pesos moleculares, al trasladar el proceso (por ejemplo, a biorreactor de 1 L, 700 r.p.m., TOD de 3 % y 29 °C), las viscosidades y los pesos moleculares del polímero son menores hasta en dos órdenes de magnitud (Peña, 1998), no obstante que la productividad se mejora. Debido a lo anterior, en el presente trabajo se propone escalar el proceso de matraces agitados en biorreactores de laboratorio para obtener alginatos de alto peso molecular y, en consecuencia, caldos con alta viscosidad.

Una buena parte de los estudios en biotecnología se desarrollan en matraces agitados. Estos han mostrado ser una herramienta muy útil y común para el estudio de fermentaciones sumergidas a pequeña escala y proporcionan gran cantidad de información (Sumino *et al*, 1972; van Suijdam *et al*, 1978; Büchs, 2001). Sin embargo, algunas veces es imposible reproducir los resultados de matraces agitados en biorreactores de laboratorio (Seañez, 1999; Büchs, 2001). La mayor ventaja de los matraces agitados es su fácil manejo y el hecho de que un gran número de experimentos pueden llevarse a cabo simultáneamente con un mínimo de material y prácticamente sin supervisión. Las grandes compañías que trabajan en el campo de la biotecnología realizan desde 10,000 hasta 100.000 experimentos en matraces agitados anualmente (Büchs y Zoels, 2001). Estos sistemas de cultivo son utilizados para la determinación de condiciones básicas de proceso tales como pH, temperatura, relación de inoculación, evaluación de cepas, desarrollo de medios de cultivo, etc.

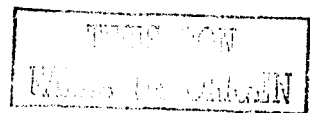


Sin embargo, aunque los cultivos en matraces agitados son de gran importancia práctica, se conoce muy poco acerca de sus características desde el punto de vista de ingeniería (Büchs, 2001). Este desconocimiento ha provocado que se lleven a cabo cultivos en condiciones no completamente conocidas, tales como suministro de potencia, el coeficiente de transferencia de oxígeno, el estrés hidrodinámico, la intensidad de mezclado, etc. Por lo tanto, es importante conocer los factores que influyen la fisiología y el rendimiento de los microorganismos en cultivos en matraces agitados.

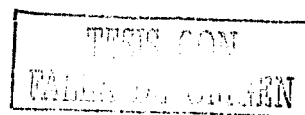
El PMP y la viscosidad de los caldos de cultivo conteniendo alginatos obtenidos en matraces agitados están influenciados por la capacidad de transferencia de oxígeno (Peña *et al*, 1997). Este parámetro a su vez, es afectado por las condiciones de operación: forma y tamaño del matraz, frecuencia de agitación, excentricidad (diámetro de rotación del matraz con respecto a un eje central en la incubadora), volumen de trabajo, propiedades superficiales del material (hidrofílico o hidrofóbico) y las propiedades físico-químicas del líquido (viscosidad, tensión superficial, solubilidad del oxígeno y difusividad) (Maier y Büchs, 2001). Recientemente, Büchs *et al* (2000a) han reportado un método para estimar el suministro de potencia en matraces agitados. Tomando en cuenta lo anterior, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) y el consumo volumétrico de potencia (P/V), en sistemas de cultivo en matraces pueden ser utilizados como criterios de escalamiento de matraces a fermentadores de laboratorio (Sumino *et al*, 1972; Büchs, 2001).

Debido a sus propiedades gelificantes y viscosificantes, el uso final del alginato es fuertemente dependiente de su peso molecular, viscosidad en solución y polidispersión de la masa molecular del polímero. Por lo tanto, es necesario encontrar, en biorreactores, condiciones de cultivo para la obtención de alginatos con características deseables, tales como los producidos en matraces agitados. Una estrategia es desarrollar cultivos en biorreactores, escalando el bioproceso de matraces, hasta donde ahora se han obtenido los mejores resultados en cuanto a viscosidad y a peso molecular.

Uno de los parámetros más importantes en fermentaciones de microorganismos aerobios, en matraces y tanques agitados, es el suministro de potencia por unidad de volumen (P/V). En la primera parte de este trabajo, se escalaron las condiciones iniciales encontradas en matraces agitados



(0.27 W/L de suministro volumétrico de potencia inicial en un biorreactor agitado de 1 L, sin control de pH ni de oxígeno disuelto). En la segunda parte del trabajo, el cultivo de *A. vinelandii* se sometió a P/V's iniciales menores y se evaluó su efecto sobre el crecimiento bacteriano, la producción de alginato, la capacidad viscosificante, la distribución de pesos moleculares del polímero y las viscosidades del caldo de cultivo.



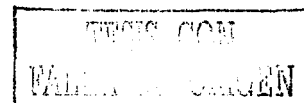
Capítulo II

Antecedentes

2.1 Ventajas y problemas de los matraces agitados

Los matraces agitados son ampliamente utilizados en la academia y en la industria, para la evaluación y desarrollo de bioprocesos. Existe una gran variedad de tareas para los cuales los matraces agitados son utilizados, por ejemplo: evaluación de cepas con actividades específicas, desarrollo de cepas utilizando mutación y selección, desarrollo de cepas recombinantes, elucidación de vías metabólicas, desarrollo y optimización de medios de cultivo, establecimiento de protocolos analíticos tales como concentración de inóculo, temperatura y pH óptimos, tiempo total de cultivo y evaluación de datos cinéticos (Solomons, 1969; Büchs, 2001). En los matraces agitados se pueden llevar a cabo un gran número de experimentos para observar el efecto de los diferentes componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento y rendimiento de los microorganismos (Kennedy *et al.*, 1994). Aunque las fermentaciones en matraces agitados han sido poco estudiadas desde el punto de vista de traslación de bioprocesos a fermentadores agitados mecánicamente, éstos han mostrado ser de una gran utilidad en el campo de la biotecnología (Finkelstein y Ball, 1992; Büchs, 2001). Otra gran ventaja de los matraces (no bafleados), en contraste con otros tipos de biorreactores, es su muy bien definida área de transferencia de masa gas-líquido (Büchs, 2001).

Sin embargo, existen varias limitaciones del uso de matraces agitados. Por ejemplo, Nakahara *et al.* (1992) mencionan que en los cultivos realizados en matraces agitados, el pH no se puede controlar y el control de la temperatura se lleva a cabo en el ambiente circundante (generalmente un cuarto o incubadora) y ello no siempre garantiza que la temperatura en el cultivo sea la misma. Además, bajo ciertas condiciones (*i.e.*: alto volumen de trabajo, baja velocidad de agitación y excentricidad y/o con líquidos viscosos), los matraces son sistemas poco eficientes en términos de transferencia de gases (oxígeno y CO₂), deficientes en el mezclado y monitoreo continuo (Aiba *et al.*, 1973; Archambault *et al.*, 1996; Henzler y Schedel, 1991). Aunado a lo anterior, existe evaporación considerable en los



cultivos de matraces agitados, la cual llega a ser hasta de un 20 % en dos o tres días de cultivo (Solomons, 1969; Kennedy *et al.*, 1994).

Además, se argumenta que la caracterización de los rendimientos de los microorganismos y optimizaciones realizadas en matraces agitados no tienen mucha relevancia, porque al trasladar el proceso a biorreactor, las velocidades de crecimiento de los microorganismos, productividad y los rendimientos muestran comportamientos diferentes (Kennedy *et al.*, 1994), debido a diferencias en hidrodinámica, velocidad de transferencia de oxígeno, estrés hidrodinámico, suministro de potencia y transferencia de calor (Humphrey, 1998).

El suministro insuficiente de oxígeno es uno de los problemas más frecuentes asociados con el uso de matraces agitados. Por ejemplo, la velocidad máxima de transferencia de oxígeno ($OTR_{m\acute{a}x}$) en matraces es más pobre que en biorreactores (tabla 1).

Tabla 1. Comparación de la velocidad máxima de transferencia de oxígeno en matraces y biorreactores.

Sistema	Condiciones de operación	$OTR_{m\acute{a}x}$ (mol/L/h)	Referencia
Fermentador	1.5 L (agua), 2 turbinas Rushton de 200-700 r.p.m. 1.0. VVM.	0.01-0.085	Hermann <i>et al.</i> 2001
Matraz	Volumen nominal 250 mL. volumen de llenado 26 mL (agua). excentricidad de 5 cm. agitación de 20-280 r.p.m.	0.005-0.017	Maier y Büchs, 2001
Matraz	Volumen nominal 250 mL. volumen de llenado 50 mL (agua), excentricidad de 2.5 cm. agitación de 130 r.p.m.	0.0035	Hermann <i>et al.</i> , 2001
Matraz	Volumen nominal 250 mL. volumen de llenado 30 mL (agua). excentricidad de 2.5 cm. agitación de 250 r.p.m.	0.015	Hermann <i>et al.</i> , 2001
Matraz	Volumen nominal 250 mL. volumen de llenado 75 mL (agua). excentricidad de 2.5 cm. agitación de 130 r.p.m.	0.0030	Hermann <i>et al.</i> , 2001

Los cultivos microbianos con limitación de oxígeno presentan varios problemas. Algunos de ellos son (Büchs, 2001):

- El metabolismo de los microorganismos se vuelve más lento.
- Pueden cambiar hacia un metabolismo parcialmente anaerobio..
- Se afecta la productividad del metabolito deseado.

- Pueden cambiar su metabolismo hacia la síntesis de otro metabolito.
- En general, los potenciales de óxido-reducción de las células cambian.

Debido a la pobre eficiencia de transferencia de oxígeno de cultivos en matraces agitados, se ha optado por la introducción de mamparas o *baffles*, lo cual resulta en altas transferencias de oxígeno, a bajas velocidades de agitación (McDaniel *et al*, 1965). Los valores del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) en matraces bafleados pueden ser hasta un orden de magnitud superior, con respecto a los matraces no bafleados (van Suijdam *et al*, 1978). Sin embargo, el uso de *baffles* no es siempre recomendado ya que usualmente son hechos por diferentes fabricantes y, por lo tanto, no son reproducibles en geometría y tamaño, conduciendo a diferencias significativas en la transferencia de oxígeno entre matraces individuales (McDaniel y Bailey, 1969), así como el suministro de potencia (Büchs *et al*, 2001). Además, los matraces bafleados tienen la desventaja de generar regímenes de flujo difíciles de determinar ya sea turbulento, laminar o en transición (Büchs, 2001), pudiendo conducir a resultados muy diferentes a los obtenidos en matraces no bafleados. Sin embargo, algunas veces el alto nivel de estrés hidrodinámico, causado por los *baffles*, puede ser una ventaja adicional. Ejemplos de ello incluyen la estimulación de mayor producción de lacasas sintetizadas por *Baryosphaeria sp.* (Dekker y Barbosa, 2000) así como una mayor síntesis de eritromicina producida por *Saccharopolyspora erythraea* (Bushell *et al*, 1997).

Varios parámetros operacionales afectan el suministro de potencia (y por lo tanto al k_{La}) a líquidos contenidos en matraces agitados (figura 2.1).

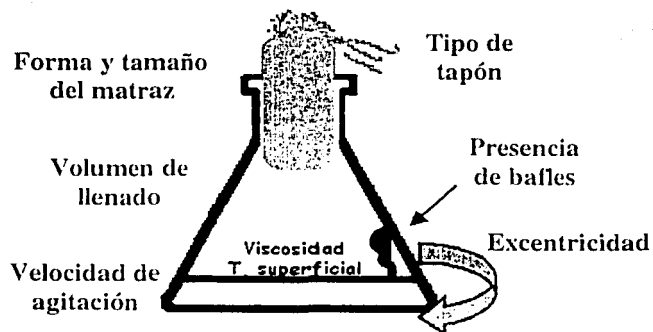


Figura 2.1. Parámetros operacionales que afectan el suministro de potencia y k_{La} en cultivos de matraces.

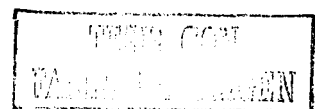
Entre ellos se incluyen la velocidad de agitación, el tamaño y tipo de matraz utilizado, el volumen de llenado, la excentricidad (diámetro de rotación del matraz con respecto a un eje central en la incubadora) y la presencia de *baffles*, así como las propiedades del líquido, principalmente la viscosidad y la tensión superficial. Además, el tipo de material con que el tapón está hecho afecta la transferencia de oxígeno.

2.2 Suministro de potencia en matraces agitados

El consumo volumétrico de potencia en caldos de fermentación es uno de los parámetros más importantes para el escalamiento de procesos microbianos (Büchs *et al*, 2001). El consumo de potencia influye directamente los parámetros de proceso de los cultivos, tales como: la transferencia de oxígeno, la remoción de dióxido de carbono, la intensidad del mezclado, el nivel de homogeneidad y el estrés hidrodinámico. La estimación del consumo de potencia en biorreactores agitados ha sido tema de numerosos estudios; sin embargo, en matraces agitados este tópico ha sido muy poco estudiado.

Se han reportado en la literatura varios métodos para tratar de estimar el suministro de potencia de caldos de cultivo en matraces agitados. El primer reporte donde se determina el consumo de potencia en matraces agitados está basado en el incremento de calor de las paredes de vidrio del matraz, en matraces aislados (en la agitadora) y fue publicado por Sumino *et al* (1972). Sin embargo, el incremento de la temperatura fue muy bajo, además de que la interpretación de los resultados es complicada por la conducción térmica no definida del vidrio seco, en la parte superior del matraz.

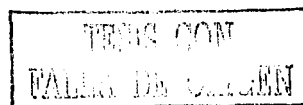
Otro método reportado para determinar el suministro de potencia en caldos de cultivo en matraces, es considerando el consumo de potencia eléctrica total de la agitadora. Este método fue utilizado para estimar el consumo de potencia de jarras cilíndricas con volúmenes de líquido relativamente altos (de 2.1 a 6.9 litros) (Kato *et al*, 1995). Sin embargo, cuando se quiere determinar el consumo de potencia eléctrica en agitadoras comerciales, bajo condiciones típicas de cultivo de microorganismos (matraces con volúmenes menores de 2 L), el consumo de energía eléctrica es difícil de precisar y varía con la carga de matraces en la agitadora, teniendo resultados no reproducibles.



Díaz *et al* (1996) propusieron una correlación para estimar el consumo de potencia en matraces agitados. El método está basado en la energía cinética adquirida por el matraz en cada oscilación del movimiento en la agitadora, la cual es inmediatamente transmitida al medio líquido. El suministro de potencia se calcula en función del tiempo empleado en cada choque del líquido con las paredes del matraz y de las características del movimiento asumido (uniforme o uniformemente acelerado). Sin embargo, los valores de potencia calculados no son del todo confiables ya que se basan solamente en suposiciones teóricas y no cuentan con validación experimental.

Büchs *et al* (2000a) propusieron recientemente un método confiable y reproducible para la determinación de la potencia suministrada a líquidos en matraces agitados. Este método emplea un indicador mecánico de torque en la parte externa de la agitadora. A partir de la frecuencia de agitación y de las mediciones de torque, la potencia consumida por la agitadora (la cual tiene una carga específica de matraces) puede ser calculada. La pérdida por fricción mecánica del sistema y la resistencia del aire en el matraz, son calibradas por medio de mediciones referenciales con agar solidificado del mismo peso. Con este método, el consumo de potencia de 63 matraces puede ser medido simultáneamente y, por lo tanto, la precisión de las mediciones se incrementa. Büchs *et al* (2000a) demostraron que el consumo de potencia en matraces agitados es relativamente alto y se encuentra al menos en el mismo orden de magnitud de los valores usuales de biorreactores agitados. En matraces agitados, el consumo de potencia se incrementa con la frecuencia de agitación. Sin embargo, con el incremento del volumen de llenado, el consumo de potencia decrece debido a que el área de fricción entre las paredes del matraz y el líquido es menor, a la misma velocidad de agitación.

El consumo de potencia se incrementa con el tamaño del matraz, a volumen de llenado constante, debido a que la velocidad relativa entre el líquido en movimiento y las paredes del matraz incrementan el área de fricción y ésta se incrementa con el diámetro del matraz (Büchs *et al*, 2000a). Las propiedades de superficie de las paredes del matraz (hidrofóbico ó hidrofílico) también muestran un efecto significativo en el consumo de potencia (Büchs *et al*, 2001). Bajo las mismas condiciones de operación, el consumo de potencia en matraces que poseen paredes con cualidades hidrofóbicas muestran consumos de potencia menores con respecto a aquellos con paredes hidrofílicas.



Büchs *et al* (2000b) llevaron a cabo determinaciones de consumo de potencia en matraces, utilizando líquidos Newtonianos con viscosidades desde 0.8 hasta 200 mPa s, a diferentes volúmenes de llenado, velocidad de agitación, tamaños de matraz y excentricidades. En líquidos viscosos, éstos autores observaron el fenómeno denominado “fuera de fase”. Este fenómeno está caracterizado (figura 2.2 b y c) porque el líquido no sigue el movimiento de la agitadora y la mayor parte de él permanece en la base del matraz. En consecuencia, la altura máxima del líquido en las paredes del matraz es reducida significativamente, respecto al sistema de baja viscosidad, reduciendo el área de fricción entre el líquido y las paredes del matraz. Por lo tanto, el suministro de potencia disminuye drásticamente.

Con el propósito de determinar cuando un líquido de alta viscosidad cae en “fuera de fase” en matraces. Büchs *et al* (2000b) introdujeron un número adimensional denominado “número de fase” (Ph). Basados en la correlación propuesta (ver materiales y métodos), para Ph mayores a 1.26, el líquido del matraz se considera “en fase” y el suministro de potencia no disminuye. Por su parte, para Ph inferiores a 1.26, el sistema se considera “fuera de fase” y las condiciones de cultivo son desfavorables debido a la caída de potencia y, por lo tanto, la disminución en el $k_L a$.

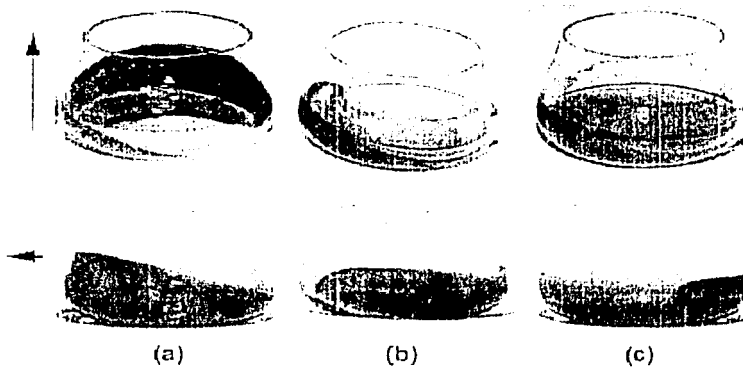


Figura 2.2. Matraces con líquidos de baja viscosidad: a) 1 mPa·s y de alta viscosidad (fenómeno “fuera de fase”): b) 75 mPa·s y c) 135 mPa·s (tomado de Büchs *et al*, 2000b).

Los matraces bafleados, con líquidos que tienen una viscosidad cercana a la del agua, también caen en “fuera de fase” a altas velocidades de agitación (Büchs *et al*, 2001). A diferencia de lo observado en matraces agitados sin *baffles*, en matraces bafleados, el consumo de potencia es influenciado por la

excentricidad. Por ejemplo, para matraces de 2 litros con un volumen de llenado de 400 mL a una excentricidad de 5 cm, el consumo de potencia fue mayor (3 W/L), si se compara con el experimento a una excentricidad de 2.5 cm (1 W/L). El volumen de llenado en matraces *bañados* también influencia el consumo de potencia, pero a diferencia de los matraces no *bañados*, el consumo de potencia se incrementa conforme el volumen de llenado es mayor (Büchs *et al*, 2001). Estos autores demostraron que a volúmenes de llenado de 20 mL (en matraces de 250 y 500 mL), el número y tamaño de los *bañes*, así como valores bajos de excentricidad (2.5 cm) generalmente incrementan la probabilidad de inducir condiciones de operación "fuera de fase".

2.2.1 Transferencia de oxígeno en matraces agitados

Debido a que el oxígeno es un gas poco soluble en agua (por ejemplo, a 25 °C y a 1 atmósfera de presión, el oxígeno disuelto es de sólo 8.7 ppm; Doran, 1998), el oxígeno en los cultivos microbianos puede volverse limitante si la demanda de oxígeno por los microorganismos excede su capacidad de transferencia a través de la interfase gas-líquido y/o tapón (Maier y Büchs, 2001). La velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), en cultivos de matraces y biorreactores, es el principal parámetro que determina la velocidad de crecimiento, el metabolismo y el rendimiento de los microorganismos en los bioprocesos. La OTR es generalmente definida como:

$$OTR = k_L a (C^* - C_L)$$

donde:

k_L = Coeficiente de transferencia de oxígeno

a = Area interfacial

C^* = Concentración de oxígeno en el equilibrio

C_L = Concentración de oxígeno en el seno del líquido

El coeficiente de transferencia de oxígeno ($k_L a$) es un parámetro fundamental que determina en gran medida la OTR a los microorganismos en los cultivos (Hermann *et al*, 2001). Los factores que

influyen el coeficiente de transferencia de oxígeno son (Maier y Büchs, 2001; Henzler y Schedel, 1991):

- El coeficiente de transferencia de oxígeno (k_L), el cual es dependiente de la difusividad y ésta a su vez depende de la temperatura, de la concentración de electrolitos y de la viscosidad del líquido.
- El área de transferencia interfacial (a) que es afectada por la tensión superficial y la viscosidad de la solución.

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{LA}) en matraces agitados, es función de la forma y el tamaño del matraz, el tipo de tapón y los valores de k_{LA} también dependen del tipo de método utilizado para su estimación (Maier y Büchs, 2001). Existen varios métodos reportados para estimar k_{LA} en matraces agitados. Uno de los más utilizados es el método de oxidación de sulfito, el cual tiene la desventaja de que no se puede llevar a cabo en fermentaciones reales y el k_{LA} determinado es sobreestimado. Otro método ha sido la técnica de desgasificación y ha sido empleado utilizando medios de cultivo (Chain y Gualandi, 1964).

Por ejemplo, Mc Daniel *et al* (1965) estimaron el k_{LA} en matraces Erlenmeyer tapados con algodón, midiendo en la fase gaseosa la concentración de oxígeno disuelto por medio de electrodos de oxígeno. van Suijdam *et al* (1978) y Veglio *et al* (1998) utilizaron agua destilada, midiendo el k_{LA} mediante la técnica de desgasificación. Por otra parte, Henzler y Schedel (1991) trabajaron con matraces Erlenmeyer, tomando muestras de gas del espacio de cabeza del matraz por medio de una jeringa y analizando la concentración de oxígeno por medio de un espectrómetro de masas. Sin embargo, para matraces operados a las mismas condiciones, volúmenes de llenado y volumen nominal, los valores de k_{LA} reportados en la literatura (tabla 2), no muestran una gran variación (Maier y Büchs, 2001).

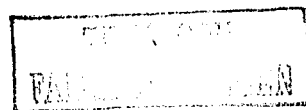
El tapón de algodón, que garantiza la asepsia de los procesos fermentativos, puede llegar a ser una barrera importante para la aireación (Schultz, 1964), pudiendo disminuir considerablemente la transferencia de oxígeno y el cual depende de la densidad y el tipo de material con que este hecho el tapón.



Tabla 2. Correlaciones para $k_L a$ en matraces Erlenmeyer agitados de 500 mL de volumen nominal y predicciones para condiciones de 100 mL de volumen de llenado, 200 r.p.m. y excentricidad de 2.5 cm.

Autores	Correlación propuesta	$k_L a$ (h ⁻¹)
van Suijdam <i>et al.</i> , 1978	(1) $k_L a = (n^{1.1} \sqrt{D_F})$	27
Henzler y Schedel, 1991	(2) $k_L a = A \left(\frac{d_i^3}{V_L} \right)^{8/9} \left(\frac{n^2 e d_i}{g} \right)^\alpha$ con constantes A y α	29
Haarde y Zehner, 1992	(3) $k_L a = \sqrt{\frac{n D_F}{d_2}} \left[1 + \left(\frac{0.380}{3600 Fr} \right)^{0.75} \left(1 + \frac{700}{Ga} \right) \right]^{-1}$ con $Fr = \frac{2(n\pi d)^2}{g}$ y $Ga = \frac{g}{v^2} \left(\frac{4V_L}{\pi d^2} \right)^3$	25
Veljkovic <i>et al.</i> , 1995	(4) $k_L a = n \left(\frac{V}{V_L} \right)^{0.845}$	35
Veglio <i>et al.</i> , 1998	(5) $k_L a = \frac{D_F}{d_i^2} \gamma Re^* Sc^x \left(\frac{d_i}{db} \right)^y \left(\frac{\rho D_{O_2, aire}}{\eta} \right)^z$ con $Re = \frac{\rho n d_i^2}{\eta}$ y $Sc = \frac{\eta}{\rho D_{eff}}$	30

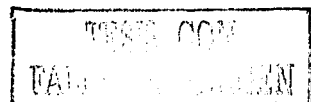
Henzler y Schedel (1991) y Mrotzek *et al* (2001) demostraron que la resistencia del tapón en matraces es mínima y que la principal resistencia se encuentra en la interfase gas/líquido, aunque debido a la resistencia del tapón, la presión parcial del oxígeno dentro del matraz es más baja que la presión parcial del exterior. Chain y Gualandi (1954) así como Maier y Büchs (2001) publicaron estudios en los que evaluaron taponos de algodón de diferentes tamaños y densidades, demostrando que los taponos con alta densidad (peso de algodón/unidad de volumen) sí llegan a ser una barrera importante para la aireación en matraces agitados. Por ejemplo, Solomons (1969) reportó valores de velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), para matraces abiertos, tapados con algodón y con tela (de muy alta densidad), concluyendo que los matraces abiertos tienen valores de OTR de hasta el doble de los obtenidos para los matraces con tapón.



Con respecto al efecto de la velocidad de agitación, Finn (1954) reporta que los valores del k_{LA} en matraces agitados se incrementan al aumentar la velocidad de agitación. Chen *et al* (1985) reportaron que en cultivos en matraces Erlenmeyer de 500 mL, usando una cepa de *A. vinelandii* a un volumen de trabajo de 100 mL y a diferentes velocidades de agitación (110, 140 y 170 r.p.m), encontraron que la mayor producción de alginato (5.5 g/L) ocurrió a 170 r.p.m. Sin embargo, a mayores velocidades de agitación (200 r.p.m) la concentración de alginato disminuye (5 g/L), debido a que la fuente de carbono es usada principalmente para la producción de biomasa.

Por su parte, bajos volúmenes de trabajo incrementan la transferencia de oxígeno. Por ejemplo, Olson y Johnson (1947) reportaron que el volumen de 25 mL - (probando desde 25 mL hasta 300 mL) en un matraz Erlenmeyer de volumen nominal de 500 mL, daba los valores más altos de producción de biomasa de levadura. Schultz (1964) reportó el crecimiento celular de *Bacillus megaterium* a diferentes volúmenes de trabajo en matraces Erlenmeyer de 500 mL y observó que el crecimiento celular disminuye conforme se aumenta el medio de volumen utilizado. McDaniel y Bailey (1969) midieron el crecimiento de *E. coli* usando diferentes volúmenes de trabajo (10, 20, 40, 80, 140 y 200 mL) en matraces Erlenmeyer de 300 mL y obtuvieron mayores valores de turbidez (4.5 veces) de diferencia entre los cultivos de 20 y 140 mL, concluyendo que al aumentar el volumen de medio utilizado disminuye significativamente el k_{LA} , a la misma velocidad de agitación. Chain y Gualandi (1954) realizaron un estudio más detallado. Los volúmenes caracterizados fueron de 50 y 100 mL para matraces de diferentes formas y Erlenmeyer de diferentes volúmenes nominales (250, 500, 1000, 1500) y volúmenes de trabajo del 5, 10, 20 y 30 % del volumen total. Sus resultados indicaron que los matraces Erlenmeyer operados a volúmenes de trabajo del 5 % dan los mayores valores de OTR. En relación al volumen empleado, las diferencias en los valores de OTR para matraces Erlenmeyer son de hasta 3 veces, usando volúmenes de trabajo de 10 y 30 %.

En matraces, el efecto de la viscosidad sobre la OTR se ha cuantificado para el caso de cultivos miceliares. Por ejemplo, Chain y Gualandi (1954) reportaron que la OTR se reduce considerablemente (hasta 8 veces) en presencia de diferentes cantidades de micelio muerto de *Penicillium chrysogenum*, a la misma velocidad de agitación. van Suidjam *et al* (1978) reportaron valores de k_{LA} más pequeños, empleando el hongo *Penicillium chrysogenum* que los obtenidos a las



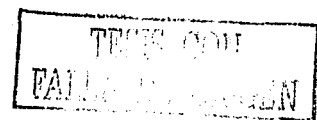
mismas condiciones con agua. Sin embargo, la diferencia en el $k_L a$ se hace más pequeña al aumentar la velocidad de agitación.

2.3 Escalamiento

El escalamiento de un proceso biotecnológico se efectúa cuando se traslada de una escala a otra, manteniendo un criterio físico constante ya sea de matraces a biorreactores o biorreactores a varias escalas de producción. Si se traslada de una escala menor a mayor se habla de escalamiento “hacia arriba” (*scale-up*) y, en forma inversa, de escalamiento “hacia abajo” (*scale-down*). El escalamiento surge de la necesidad de reproducir los resultados de procesos fermentativos a nivel laboratorio a escalas mayores. Durante el escalamiento, en cada una de las escalas se debe intentar mantener las condiciones ambientales en las que se desarrolla el proceso microbiano.

El primer cambio de escala de un proceso biotecnológico, es cuando se pasa de la etapa de selección del microorganismo y optimización del medio de cultivo (generalmente en matraces), a una que involucre fermentadores pequeños de laboratorio. A nivel laboratorio, es fácil alcanzar un mezclado eficiente; sin embargo, las condiciones imperantes en matraces agitados son en general difíciles de reproducir en fermentadores pequeños de laboratorio (Galindo, 1996). Lo anterior es debido a que no es posible mantener todas las características adimensionales (**tabla 3**) a un mismo valor numérico, por lo tanto, es necesario restringirlo a un valor adimensional (Hempel y Dziallas, 1999) o a un valor de operación similar (P/V) (Büchs *et al*, 2000a) ya que estos son, en la mayoría de los casos, los que determinan las velocidades de las reacciones biológicas en un sistema microbiano. Esto significa que muchos de los parámetros del proceso, en matraz y biorreactor, tales como: requerimiento de nutrientes, condiciones físico-químicas de crecimiento o procesos de transporte pueden ser totalmente diferentes debido a su diferente geometría.

Debido a la necesidad de reproducir los resultados encontrados de matraz a biorreactor, el escalamiento de procesos fermentativos se ha efectuado utilizando principalmente criterios de escalamiento, tales como: el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y potencia



suministrada por unidad de volumen (Sumino *et al*, 1972; Sumino *et al*, 1993; Panda, 1989; Palma *et al*, 1996; Muley *et al*, 1999; Büchs *et al*, 2000a; Büchs, 2001).

Tabla 3. Números adimensionales que pueden ser usados en el escalamiento de matraz a biorreactor (Hempel y Dziallas, 1999).

Nombre	Símbolo	Significado
Reynolds	Re	Relación de fuerzas inerciales y fuerzas viscosas. Relación entre <i>momentum</i> de transporte convectivo y difusividad
Prandtl	Pr	Relación entre la difusividad de <i>momentum</i> y difusividad de calor
Schmidt	Sc	Difusividad de <i>momentum</i> /difusividad de masa
Nusselt	Nu	Radio de un gradiente de temperatura en una superficie a otra con otro gradiente de temperatura. Relación entre resistencia al transporte de calor molecular/resistencia al transporte de calor convectivo.
Sherwood	Sh	Radio de un gradiente de concentración en una superficie a una con otro gradiente de concentración Relación entre la resistencia de masa molecular con la resistencia al transporte de masa convectivo
Número de potencia	Np	Relación entre las fuerzas de arrastre y gravitacionales
Stanton	St	Es una modificación del número de Nusselt
Froude	Fr	Relación entre las fuerzas inerciales y las fuerzas gravitacionales

Sin embargo, los resultados obtenidos en escalas mayores, no son siempre satisfactorios. Esto se debe a que conforme aumenta la escala de operación, el mezclado es cada vez más deficiente, dando origen a gradientes indeseables en las variables de proceso como pH, temperatura y concentración de sustratos, entre ellos el oxígeno (De León *et al*, 1995).

Debido al gradiente de oxígeno, los microorganismos están sometidos a ambientes fluctuantes a lo largo de su recorrido dentro del biorreactor, pasando de zonas bien mezcladas (regiones cercanas al impulsor con niveles altos de TOD) a zonas deficientes de TOD. Bajo tales condiciones, la

productividad de la mayoría de los procesos aerobios es afectada, ya que el comportamiento de los microorganismos puede ser alterado por los cambios continuos en la TOD (Buckland, 1984; Hempel, 1988). En el caso de las fermentaciones aerobias, el escalamiento de procesos obtenidos en el laboratorio requiere de un análisis cuidadoso de cada una de las escalas, tanto en sus variables fisicoquímicas como biológicas. Por lo general, en el laboratorio se opera con matraces agitados (aprox. de 500 mL) o pequeños fermentadores, donde se buscan nuevos productos y se mejoran las cepas de producción. En planta piloto (5-500 L) se estudian efectos de aireación, temperatura y control de pH. En los fermentadores de producción (5,000-40,000 L) se trata de aumentar la productividad con respecto a los resultados obtenidos en planta piloto (Quintero, 1987).

Los criterios de escalamiento comúnmente usados en reactores agitados consisten en mantener constante -en las diversas escalas- uno de los siguientes parámetros (Galindo, 1996): potencia volumétrica (P/V), tiempo de mezclado (t_m), velocidad en la punta del impulsor (ND), coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) y el número de Reynolds (Re). La selección del criterio de escalamiento depende en gran parte de las características particulares del proceso a escalar. Por ejemplo, para los cultivos sensibles a los esfuerzos de corte (microorganismos filamentosos, células animales) mantener la velocidad en la punta del impulsor resulta uno de los criterios más adecuados (De León *et al.*, 1995). En cambio, para cultivos reológicamente complejos, éste criterio no es del todo adecuado, ya que se requiere del suministro suficiente de potencia para asegurar un mezclado adecuado.

2.4 Escalamiento: de matraces a fermentador

La transferencia de procesos desarrollados en matraces agitados a biorreactores es problemática. Frecuentemente, el crecimiento microbiano y los rendimientos son significativamente diferentes durante el escalamiento de matraz a biorreactor. Existe muy poca literatura científica para guiar el escalamiento de procesos de nivel matraz a nivel fermentador. Esto contrasta con el caso cuando el escalamiento se hace a diferentes escalas entre biorreactores agitados, en donde, las velocidades de transferencia de oxígeno, el suministro de potencia o los tiempos de mezclado son criterios que han conducido a escalamientos exitosos (Gerson y Kole, 2001). Lo anterior es debido que los matraces

agitados son sistemas geoméricamente diferentes a los biorreactores y el concepto de escalamiento asume similitud geométrica y la noción de mantener al menos un criterio de escalamiento constante (P/V , k_{La} , t_m , ND, etc) (Hempel y Dziallas, 1999).

A mediados de la década de los 40's, después de la Segunda Guerra Mundial, un gran número de compañías farmacéuticas buscaron comercializar antibióticos, tales como la penicilina. Al principio, éstos fueron producidos en cultivos sólidos utilizando el hongo *Penicillium notatum*, en botellas de vidrio. De ahí, los microbiólogos desarrollaron los primeros procesos de cultivo sumergido utilizando el hongo *Penicillium chrysogenum* y, en sus comienzos, la principal preocupación fue la transferencia de oxígeno (Humphrey, 1998). Los primeros trabajos con matraces agitados revelaron que los tapones limitaban la transferencia de oxígeno, la cual depende del material con el que son hechos los tapones. Este problema se puede resolver incrementando la velocidad de agitación o usando matraces bañados o con paredes más inclinadas, logrando así incrementar la eficiencia de la transferencia de oxígeno (McDaniel *et al*, 1965; Humphrey, 1998).

En biorreactores, la transferencia de oxígeno se optimizó relacionando cuantitativamente la demanda de oxígeno con el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* durante la síntesis de antibióticos. Sin embargo, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno no es el único factor a considerar en la traslación de procesos (de matraces a fermentador). También se encuentran otros factores (Humphrey, 1998) tales como la transferencia de calor, el suministro de potencia, la calidad de mezclado, los esfuerzos de corte, la velocidad superficial del aire y la tendencia a la inundación en los impulsores. Descuidar alguno de esos factores puede conducir a fracasos en el escalamiento de matraz a biorreactor.

Existen muy pocos reportes de escalamiento de cultivos de matraz a fermentador. A pesar de que los matraces han sido una herramienta muy poderosa para la optimización de medios de cultivo, ya que han sido poco caracterizados en términos de la transferencia de oxígeno y de consumo de potencia (tabla 4).

Tabla 4. Antecedentes de ejercicios de escalamientos de procesos de matraz a fermentador

Condiciones de cultivo (matraz)	Criterio de escalamiento	Objetivo	Resultados	Referencia
Matraces Erlenmeyer de 500 mL de volumen nominal, con 100 mL de medio, operado a 160 r.p.m.	$k_{L,a}$ (36 h^{-1})	Biosíntesis de celulasa y xilanasa, con un cultivo de una mezcla de dos especies de hongos filamentosos: <i>Trichoderma resei</i> D1-6 y <i>Aspergillus wentii</i> Pt 2804. En biorreactores de 3 litros.	Al escalar las condiciones de matraces agitados en el biorreactor, la síntesis de enzimas decreció, lo cual pudiera ser debido a un mezclado ineficiente.	Panda (1989)
Matraces agitados (125 mL de volumen nominal, con 25 mL de medio de cultivo a 60 r.p.m)	$k_{L,a}$ (1.24 h^{-1})	Obtención de xilanasa en biorreactores de 4 litros.	La mayor actividad de xilanasa (8.9 U/mL) fue obtenida en cultivos de matraces agitados, alrededor de 10 veces mayor en cultivos de biorreactores. En cultivos de fermentadores, la actividad xilanasa decrece conforme se incrementa la tensión de oxígeno disuelto.	Palma <i>et al</i> (1996)
Matraces de 500 mL de volumen nominal a diferentes volúmenes de llenado (20, 40 y 60 mL), utilizando dos velocidades de agitación (190 y 240 r.p.m),	$k_{L,a}$ P/V 1 W/L hasta 2.5 W/L.	Escalar la producción de nucleósidos de purinas producidos por una cepa mutante de <i>Bacillus subtilis</i> , desde matraces agitados a biorreactores.	En cada una de las condiciones probadas, el escalamiento fue exitoso en cuanto a la concentración de nucleósidos de purina. Sin embargo, observó que la urea no fue completamente metabolizada en cultivos en biorreactor; por lo tanto, el pH y la concentración de NH_4 fueron menores en biorreactores que en matraces agitados.	Sumino <i>et al</i> (1993)
Cultivos en matraz de 500 mL de volumen nominal, 125 mL de volumen de llenado y 5 cm de excentricidad.	$k_{L,a}$ (18 h^{-1})	Escalamiento de la producción de δ endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>kenyae</i> a biorreactor de varias escalas (10, 50, 500 y 1,200 litros)	Escalamiento exitoso de la producción de δ endotoxina. También observaron una mejora en la rapidez de esporulación y liberación de la toxina.	Muley <i>et al</i> (1999)
Matraces de 500 mL de volumen nominal y 150 mL de volumen de trabajo, agitados a 150 r.p.m.	No reportado	Producción de ácido γ -linoleico producido por el hongo filamentoso <i>Mucor hiemalis</i> IRL 51, en fermentadores de 10 L.	El rendimiento de ácido con base a la fuente de carbono y la producción de ácido γ -linoleico fue prácticamente el mismo en cultivos en matraz y en biorreactor	Kennedy <i>et al</i> (1994)

2.5 Alginatos y *Azotobacter vinelandii*

Existe una amplia variedad de polisacáridos que son producidos por microorganismos, por ejemplo: alginato, curdlano, dextrana, xantana, gelana, pululanos y glucanos. La tabla 5 muestra varias características de estos polisacáridos usados en la industria.

Tabla 5. Características de algunos polisacáridos sintetizados por microorganismos (Sutherland, 1990).

Polisacárido	Fuente	Estructura	Incremento de demanda anual (%) Flores y Deckwer (1999)	Comportamiento del polímero en solución
Curdlano	Hongos: <i>Sclerotium rolfsii</i> <i>Schizophyllum commune</i>	Homopolisacárido 1,3-β-D-glucano	1.7	Fluido No- newtoniano
Dextrana	Bacterias: <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Homopolisacárido 1,6-α-D-glucosyl	-----	Fluido No- newtoniano
Pululano	Hongos: <i>Aureobasidium pullulans</i>	Homopolisacárido Maltotetraosyl	-----	Fluido No- newtoniano
Gelana	Bacterias: <i>Pseudomonas elodea</i>	Heteropolisacárido L-rhamnosa, L-Lmanosa	2.1	Fluido No- newtoniano
Xantana	Bacteriano <i>Xanthomonas campestris</i>	Heteropolisacárido D-glucosa- D-manosa- D-glucoronato	5.0	Fluido No- newtoniano
Alginato	Algas: <i>Laminaria</i> , <i>Macrocystis</i> etc. Bacterias: <i>Azotobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	Heteropolisacárido Acido gulurónico y manurónico	3.3	Fluido No- newtoniano

Los alginatos son obtenidos de las algas marinas de la familia *Phaeophaceae*. Entre los géneros más importantes se encuentran *Laminaria*, *Ascophyllum* y *Macrocystis* (Jarman, 1979). La gran variabilidad de composición de alginato entre cada especie, así como la dependencia de las condiciones climáticas bajo las cuales se produce el polímero, han motivado la búsqueda de nuevas fuentes de producción.

La producción de alginatos microbianos podría tener la ventaja de tener una composición y rendimiento constante y podría volverse factible si el proceso de producción es optimizado y éstas

ventajas podrían resultar en un producto de mayor calidad (Sabra *et al*, 2001). Entre las bacterias potenciales para producir alginato están los géneros de *Pseudomonas* y *Azotobacter*. Los riesgos potenciales de patogenicidad asociados con *Pseudomonas* hacen de *Azotobacter vinelandii* una alternativa más apropiada para la producción de alginatos. Además, los alginatos producidos por *Pseudomonas spp.* contienen largas regiones contiguas de residuos L-manurónico, mostrando pobres propiedades gelificantes (Clementi *et al*, 1995). La producción de alginatos por cepas de *Azotobacter vinelandii* tienen potencial para ser implementadas a nivel industrial; sin embargo, debido a los bajos rendimientos hasta ahora obtenidos, este proceso no ha logrado constituirse como una alternativa económicamente viable con respecto al alginato extraído de las algas marinas (Clementi *et al*, 1995; Peña, 1998).

2.5.1 *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram-negativa, la cual crece en ambientes aeróbicos y es capaz de fijar nitrógeno (Clementi, 1997). Esta bacteria utiliza la fuente de carbono mediante la vía Entner-Doudoroff, ciclo de las pentosas fosfato y ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ATC). En respuesta a incrementos de la tensión de oxígeno disuelto (TOD), *A. vinelandii* aumenta la velocidad específica de respiración, convirtiendo una gran proporción de la fuente de carbono a bióxido de carbono, un proceso energéticamente inútil para la producción de alginato. Este rasgo del metabolismo ayuda a mantener un ambiente de baja concentración de oxígeno, protegiendo al sistema nitrogenasas que son sensibles al oxígeno (Jarman, 1979).

El alginato es un componente esencial del quiste de *A. vinelandii*. Este polisacárido cubre al quiste y protege a la bacteria contra la desecación y condiciones desfavorables. Las capas de intina (cubierta interior) y exina (cubierta exterior) contienen diferentes tipos de alginato (Sabra *et al*, 2000). El alginato también funciona como una barrera protectora contra la toxicidad de metales pesados y como un sistema intercambiador de iones, con una alta selectividad hacia los iones calcio. Además, el alginato le confiere a *A. vinelandii* una cubierta hidrofílica (cargada negativamente), la cual le brinda protección contra condiciones ambientales adversas (Fyfe y Govan, 1983).

2.5.2 Estructura y propiedades físicas de los alginatos

Los alginatos son una familia de copolímeros binarios no ramificados; los cuales consisten de ácido α -D-manurónico (M) y su epímero, el ácido β -L-gulurónico (G). El alginato de *A. vinelandii* consiste de bloques de copolímeros, compuestos de regiones homopoliméricas de bloques M y G (figura 2.3), interespaciados por regiones de estructura alternada (bloques MG). La variación de la secuencia de la cadena de alginato en el bloque MG, la longitud y frecuencia de los bloques G son característicos del alginato de *A. vinelandii*. Adicionalmente, los alginatos microbianos están O-acetilados en residuos 2 ó 3 del ácido α -D-manurónico (Sabra *et al*, 2001).

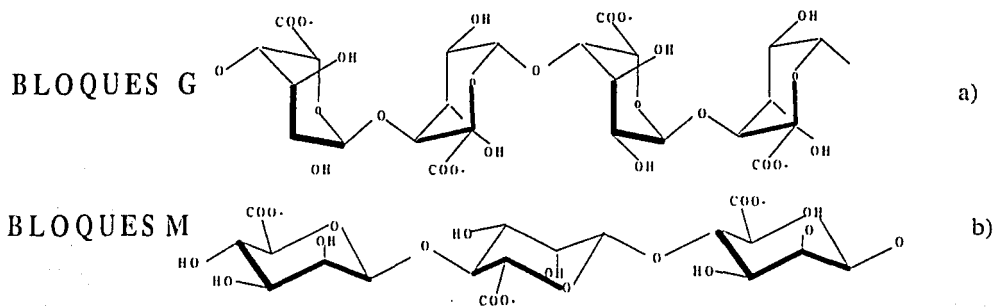


Figura 2.3. Monómeros estructurales del alginato: a) Ácido gulurónico y b) Ácido manurónico

La estructura de bloque y grado de O-acetilación determinan las propiedades fisicoquímicas del alginato bacteriano. Desde el punto de vista comercial, la viscosidad y su capacidad para formar geles son las características más importantes de éste polímero.

La viscosidad es función del peso molecular del alginato (Moe *et al*, 1995), así como de la polidispersión de su masa molecular y la concentración de polímero. Las propiedades gelificantes de los alginatos son debidas a su capacidad para unirse a cationes divalentes o multivalentes. El más importante es el ión calcio, el cual produce cambios conformacionales, induciendo la gelificación por el modelo conocido como la "caja de huevos" (Clementi, 1997).

2.5.3 Aplicaciones de los alginatos

Los alginatos son principalmente usados en la industria alimentaria, la cual consume alrededor de 50 % del alginato total extraído de las algas marinas y es utilizado en la producción de helados, flanes, mezclas de crema y pasteles (Gacesa, 1998). En la industria textil y papelera, ayuda a mejorar las propiedades superficiales de ropa y papel, mejorando la adhesión de colorantes (Sutherland y Ellwood, 1979). Los alginatos también se usan en el proceso de tratamiento de aguas, ayudando a incrementar la agregación de bacterias en procesos de floculación (Rehm y Valla, 1997). En la industria farmacéutica se usan para formar emulsiones estables e impresiones dentales (Skjak-Braek, 1992; Clementi, 1997).

Una de las aplicaciones biotecnológicas de los alginatos, es su uso en la inmovilización de células vivas de diferentes tipos. Por ejemplo, el alginato es usado como biocatalizador en varios procesos industriales, tales como la producción de etanol por células de levadura, o la producción de anticuerpos monoclonales en células de hibridomas (Skjak-Braek, 1992; Crescenzi, 1995; Clementi, 1997).

En medicina, los alginatos de alta calidad se usan para el tratamiento de la diabetes tipo I, por inmovilización de células β del páncreas (que producen insulina) en cápsulas de alginato, las cuales funcionan como un páncreas artificial (Sabra *et al*, 2001). Se ha reportado también que los alginatos estimulan el sistema inmunológico a través de los monocitos, ayudándoles a secretar *citokinas*, por ejemplo, para la expresión de interleucinas y factores α en necrosis tumorales (Otterlei *et al*, 1991).

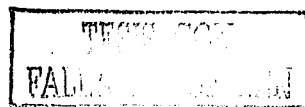
2.5.4 Factores y condiciones que influyen la producción de alginatos por fermentación

Se han realizado varios estudios a fin de determinar cuales son los factores que influyen la producción de alginato por *A. vinelandii*. La aireación es un factor crítico que determina el rendimiento de alginato (Peña *et al*, 1997; Clementi *et al*, 1995).

La producción de alginato por *A. vinelandii* ha sido estudiada en cultivos en lote (Chen *et al*, 1985; Clementi *et al*, 1995; Clementi *et al*, 1999; Parente *et al*, 1998; Scañez, 1999; Trujillo, 1999; Peña *et al*, 2000) y en cultivos continuos (Horan *et al*, 1983; Annison y Couperwhite, 1986a). Esos estudios revelaron la importancia del oxígeno disuelto en la producción de alginato. A bajas TOD, la bacteria acumula poli- β -hidroxibutirato (PHB), el cual es un polímero de reserva, mientras que a altas tensiones de oxígeno disuelto, *A. vinelandii* utiliza la fuente de carbono principalmente para la producción de biomasa (Horan *et al*, 1981; Peña *et al*, 2000). La conversión eficiente de sacarosa a alginato es lograda si el oxígeno es controlado a una tensión de oxígeno disuelto entre 1 y 5 % de la saturación (Chen *et al*, 1985; Annison y Couperwhite, 1986b). Horan *et al* (1983) demostraron que la tensión de oxígeno disuelto (TOD) fue uno de los factores más importantes entre los estudiados (fosfatos, molibdeno, hierro, nitrógeno, calcio, fuente de carbono y fosfatos) sobre la síntesis de alginato. PHB y crecimiento bacteriano. En dicho trabajo también se demostró el efecto causado por la tensión de oxígeno disuelto sobre la concentración final de alginato.

Horan *et al* (1981) midieron las actividades específicas de las enzimas claves de la síntesis de alginato (glucoquinasa, fructoquinasa, fosfomanosa isomerasa, GDP manosa pirofosforilasa, y GDP manosa deshidrogenasa), encontrando que las actividades de dichas enzimas, así como la productividad, fueron máximas entre 2 y 5 % de TOD.

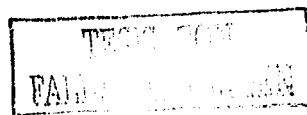
Peña (1998) y Peña *et al* (2000) estudiaron algunos factores determinantes en la biosíntesis y composición del alginato producido por *A. vinelandii* en biorreactor. Encontraron que la TOD y la velocidad de agitación influyen en la calidad del alginato (medida como viscosidad y peso molecular promedio). Al aumentar la TOD desde 1 a 5 % (a velocidad de agitación constante de 300 r.p.m), se incrementó tanto la productividad de alginato, como la cantidad de biomasa. Al incrementar la velocidad de agitación de 300 a 700 r.p.m, a una TOD constante del 3 %, la mayor producción de alginato (5.0 g/L) se obtuvo con la velocidad más alta de agitación. La velocidad específica de producción de alginato fue tres veces mayor en el caso de alta velocidad de agitación (700 r.p.m.), comparado con la condición de menor agitación (300 r.p.m.).



Chen *et al* (1985) estudiaron el efecto de la aireación/agitación sobre la producción de alginato por *A. vinelandii* en cultivos de matraces. Al variar la velocidad de agitación de 100 hasta 200 r.p.m., encontraron un óptimo de producción a 170 r.p.m. Brivonese y Sutherland (1989) experimentaron con dos velocidades de agitación en matraces agitados, observando que la productividad fue mayor a la velocidad más alta de agitación (180 r.p.m.). Resultados similares fueron encontrados por Salvagi y Salvagi (1992), quienes, al cultivar una cepa silvestre y una cepa mutante de *A. vinelandii* en matraces obtuvieron los mayores rendimientos de producto a la mayor velocidad de agitación (240 r.p.m.), obteniendo hasta 5.8 g/L de alginato. Clementi *et al* (1995) reportaron que el efecto de la agitación y de la aireación en cultivos de *A. vinelandii* DSM 576, en matraces, fueron similares a los obtenidos anteriormente por Chen *et al* (1985) y por Brivonese y Sutherland (1989). Encontraron que a valores intermedios de la velocidad de agitación (250-300 r.p.m.), las productividades fueron máximas; sin embargo, a valores mayores de 300 r.p.m., la cantidad de alginato sintetizado disminuía hasta en un 60 % con respecto a velocidades de agitación de 250-300 r.p.m, como consecuencia de la alta aireación. A altas eficiencias de aireación, *A. vinelandii* incrementa su velocidad específica de respiración para mantener la concentración de oxígeno baja y prevenir daño al sistema nitrogenasa (Sabra *et al*, 1999).

Peña *et al* (1997) cultivaron a *A. vinelandii* ATCC9046 en dos tipos de matraces: bafleados (con 3 mamparas o *baffles* en el matraz) y matraces no bafleados a 200 r.p.m. y 29 °C, con un volumen de trabajo de 100 mL. La cantidad de polímero fue tres veces mayor en matraces convencionales (baja agitación/aireación) con respecto a matraces bafleados. Los pesos moleculares y la viscosidad de los caldos de fermentación fueron mayores en matraces no bafleados y el tamaño de las células fue el doble con respecto a las células obtenidas de cultivos de matraces bafleados, debido a la acumulación de PHB. Los resultados de Peña *et al* (1997) concuerdan con lo reportado por Brivonese y Sutherland (1989), quienes argumentan que la acumulación de PHB en el espacio intracelular puede alcanzar hasta el 70 % del peso seco de las células.

En cultivos en fermentadores a 3 y 5 % de TOD constante o a TOD oscilante (Peña, 1998; Trujillo-Roldán *et al*, 2001), las características reológicas (viscosidad) y pesos moleculares de los alginatos (peso molecular promedio) han sido inferiores con respecto a lo obtenido en cultivos de *A. vinelandii*



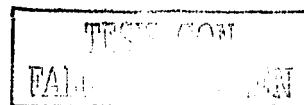
en matraces convencionales. Sin embargo, al cambiar la escala (por ejemplo, a biorreactor de 1 L. 700 r.p.m., TOD de 3 % y 29 °C) las viscosidades y los pesos moleculares del polímero sufren una caída de más de dos órdenes de magnitud (Peña, 1998), no obstante que los rendimientos mejoran. En cultivos de biorreactores se ha obtenido un peso molecular promedio (PMP) máximo de alginato de 0.68×10^6 g/g mol y viscosidades inferiores a los 100 cps (Peña, 1998; Trujillo, 1999; Trujillo-Róldan *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2000). Sin embargo, en cultivos de *A. vinelandii* en matraces Erlenmeyer, se han obtenido alginatos con un PMP máximo de hasta 1.98×10^6 g/gmol y viscosidades superiores a los 500 cps (Peña *et al.*, 1997).

2.6 Justificación

Debido a que en matraces Erlenmeyer operados bajo nuestras condiciones “estándar” (200 r.p.m., 500 mL de volumen nominal y 100 mL de volumen de trabajo) se producen alginatos con altos pesos moleculares y alta viscosidad aparente, en el presente trabajo se escaló el proceso de los cultivos de *A. vinelandii* en matraces agitados a biorreactores de laboratorio (de 1 L). Una estrategia fue desarrollar cultivos en biorreactores escalando el proceso de matraces, hasta donde ahora se han obtenido los mejores resultados en cuanto a viscosidad de los caldos y a peso molecular del alginato. Entre las características más importantes que pudieran determinar las características de PMP del alginato, en cultivos de matraces agitados, se encuentran el consumo de potencia por unidad de volumen (P/V) y el coeficiente de transferencia de oxígeno. Por lo tanto, se utilizó al suministro de potencia como criterio de escalamiento de matraces a biorreactor, pretendiendo obtener alginatos con características semejantes a los obtenidos en matraces agitados.

2.7 Hipótesis de trabajo

Al trasladar el proceso, de matraz a fermentador de laboratorio, utilizando como criterio de escalamiento el suministro específico de potencia, *Azotobacter vinelandii* será capaz de producir alginatos de alta peso molecular promedio y alta viscosidad en solución.



Capítulo III

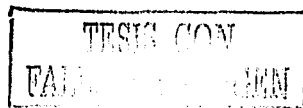
Objetivos

General

Escalar la producción de alginatos, de matraz a fermentador de laboratorio para la obtención de alginatos con alto peso molecular y viscosidad en solución, similares a los que se obtienen en matraces agitados, con cultivos de *Azotobacter vinelandii*.

Particulares

- Caracterizar el PMP del alginato y viscosidad del caldo de cultivo con *Azotobacter vinelandii*, en matraces agitados.
- Escalar la producción de alginatos de matraz a biorreactor de laboratorio, usando el consumo de potencia volumétrica como criterio de escalamiento.
- Obtener alginatos, en biorreactor, con pesos moleculares promedio, capacidad viscosificante y viscosidades en solución, similares a los obtenidos en cultivos en matraces agitados.
- Establecer las cinéticas de crecimiento y de producción de alginato, así como de la evolución del PMP, en cultivos de *A. vinelandii* llevadas a cabo a varios suministros de P/V.



Capítulo IV

Materiales y métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa de colección de *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046.

4.1.2 Medio de cultivo

El microorganismo se creció en medio Burk modificado, con la siguiente composición (en g/L): sacarosa (20); extracto de levadura (3); K_2HPO_4 (0.66); KH_2PO_4 (0.16); MOPS (1.42); $CaSO_4$ (0.05); NaCl (0.2); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2); $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.0029); $FeSO_4$ (0.027). Las sales de potasio, la sacarosa, el extracto de levadura y el MOPS se disolvieron en 900 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 7.2 con NaOH (2N). A su vez, el sulfato de calcio se disolvió en 50 mL y las sales restantes en el mismo volumen de agua destilada. Con el objeto de evitar precipitaciones, las tres fracciones se esterilizaron por separado a 121 °C durante 15 minutos y ya estériles se mezclaron en la campana de flujo laminar.

4.1.3 Inóculo

Los procedimientos de mantenimiento de la cepa han sido descritos en detalle previamente por Miranda (1998). La cepa se transfirió de un cultivo de medio inclinado (*slants*) a cajas Petri, conteniendo medio Burk modificado. Se cultivó durante 72 horas a 29 °C. Las células así obtenidas se usaron para la preparación del inóculo en fermentador, el cual es producido en matraz, de la siguiente manera: se inocularon 100 mL de medio de cultivo Burk modificado contenido en matraz Erlenmeyer de 500 mL y se incubó a 200 r.p.m. y 29 °C, durante 24 horas o hasta alcanzar una densidad óptica de 0.1, medida a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU 650.

4.2 Cultivos en matraces

Los cultivos en matraces se realizaron por duplicado, llevándose a cabo en matraces Erlenmeyer convencionales de 500 mL de volumen nominal, conteniendo 100 mL de medio Burk, a una velocidad de agitación de 200 r.p.m., excentricidad de 2.5 cm y 29°C, durante 72 horas, en una incubadora New Brunswick, modelo G-25.

4.2.1 Estimación de suministro de potencia volumétrica (caldos de cultivo a bajas viscosidades)

En la figura 4.1 se muestran datos experimentales del suministro de potencia en matraces Erlenmeyer de 500 mL, 2.5 cm de excentricidad, a diferentes volúmenes de llenado con agua (20, 50 y 80 mL), a varias velocidades de agitación. Los datos fueron proporcionados por el Prof. Jochen Büchs (Aachen, Alemania; comunicación personal), los cuales fueron medidos de acuerdo al método reportado por Büchs *et al* (2000a).

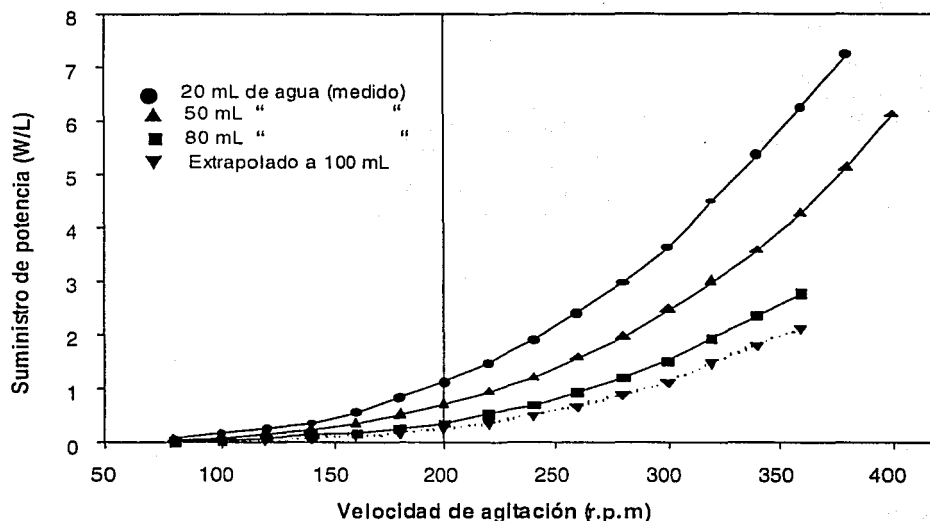


Figura 4.1. Determinación del suministro de potencia en matraces de 500 mL con 100 mL de agua a una velocidad de agitación de 200 r.p.m. y 2.5 cm de excentricidad.

Para predecir el consumo de potencia a un volumen de trabajo de 100 mL agitados a 200 r.p.m, se extrapoló (figura 4.2) mediante una correlación lineal, a partir de los datos experimentales del suministro de potencia con volúmenes de agua de 20, 50 y 80 mL. A mayor volumen de llenado, el suministro de potencia es menor. El resultado fue un suministro de potencia de 0.27 W/L.

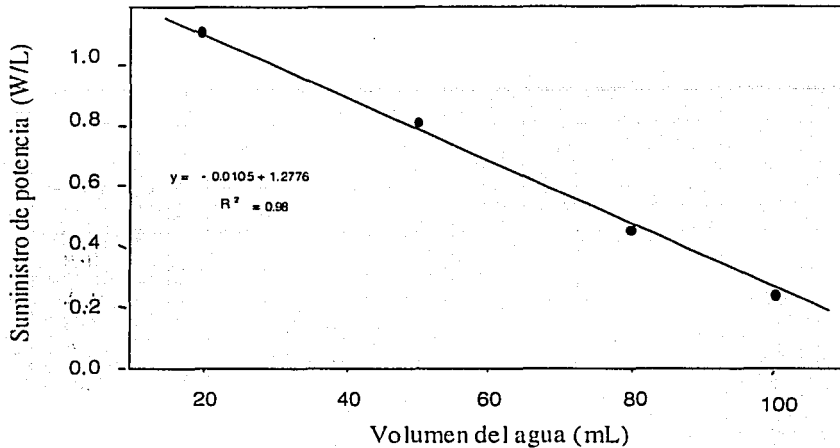


Figura 4.2. Determinación del suministro de potencia en matraces de 500 mL con 100 mL de agua a una velocidad de agitación de 200 r.p.m. y 2.5 cm de excentricidad.

4.2.2 Determinación del número de fase en caldos de cultivo de altas viscosidades

Debido a las altas viscosidades encontradas en los caldos de cultivo de *A. vinelandii* producidos en matraces y como se ha discutido en la sección 2.2 de Antecedentes, el consumo de potencia del líquido del matraz disminuye. Por lo tanto, es necesario determinar las condiciones cuando el líquido del matraz cae en “fuera de fase”, es decir, cuando el líquido no sigue el movimiento de la agitadora, la altura del líquido decrece y por ende, el consumo de potencia disminuye. Büch *et al* (2000b) propusieron el “número de fase” (Ph), el cual sirve para determinar a que valor de viscosidad la altura del líquido del matraz disminuye:

$$Ph = e/di*(1+3*\log_{10}(Ref)), \text{ si } Ph > 1.26, \text{ entonces el líquido permanece "en fase"}$$

donde:

Ph = número de fase (-)

Re_f = número de Reynolds de la película del líquido en el matraz (-)

d_i = diámetro máximo interno del matraz (m)

e = excentricidad de la agitadora (m)

$$Re_f = Re \frac{\pi}{2} \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \left(\frac{V_L^{1/3}}{d_i} \right)^2} \right)^2$$

donde:

Re = número de Reynolds (-)

V_L = volumen de trabajo (m^3)

d_i = diámetro máximo interno del matraz (m)

Büchs *et al* (2000a) reportaron que el número de Reynolds en matraces agitados se obtiene a partir de:

$$Re = \rho \cdot n \cdot d_i^2 / \eta$$

donde:

ρ = densidad del líquido (kg/m^3)

n = velocidad de agitación (s^{-1})

d_i = diámetro máximo interno del matraz (m)

η = viscosidad del caldo de cultivo (Pa s)

Para números de fase (Ph) mayores a 1.26, el suministro de potencia no disminuye (ver anexo, A2).

Para Ph 's inferiores a 1.26, la altura del líquido del matraz cae y, por lo tanto, el consumo de potencia del líquido (a alta viscosidad) del matraz es menor.

4.3 Cultivos en fermentador

Los cultivos se realizaron en un fermentador de 1.5 L (Virtis) equipado con dos turbinas Rushton (diámetro impulsor/diámetro tanque=0.5) con un volumen inicial de 1.0 L. El pH no se controló. La

tensión de oxígeno disuelto (TOD) se midió mediante un electrodo polarográfico de oxígeno (Ingold) cuya señal fue amplificada y adquirida por una computadora (Compaq). La TOD no se controló y se permitió variar libremente. Las fermentaciones se corrieron a un flujo de gas constante de 800 ccpm, 29 °C y a diferentes velocidades de agitación (140, 180, 200 y 340 r.p.m.), llevándose a cabo dos réplicas. Cada 12 horas se tomaron muestras de 16 mL para las determinaciones analíticas.

4.3.1 Determinación de consumo de potencia en fermentador

Para la determinación del suministro de potencia en el fermentador de 1.5 litros, a éste se le adaptó una base para poder montarlo sobre un dinamómetro de cojinete neumático (Reséndiz *et al.*, 1991). Este tipo de dinamómetro permite la determinación del torque de reacción debido a la rotación del impulsor inmerso en el fluido. Una celda de carga 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:

$$M = F * B$$

donde:

B= Brazo de palanca utilizado (0.20 m)

M= Torque (N.m)

F= Fuerza (N)

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

$$P = \omega * M$$

donde:

ω = Velocidad angular = $2\pi N$ (s^{-1})

N= Velocidad de agitación (s^{-1})

Las mediciones de consumo de potencia se llevaron a cabo con dos impulsores tipo Rushton con un diámetro del impulsor de 0.05 metros y diámetro del tanque de 0.102 m y con un volumen de trabajo de 1 litro (agua), configuración del biorreactor con la cual los cultivos de *A. vinelandii* son llevados a

cabo para la producción de alginato. En la **figura 4.3** se muestra el suministro de potencia gaseada (0.8 VVM), en agua, en función de la velocidad de agitación. A una velocidad de agitación de 340 r.p.m. se tiene un suministro de potencia de 0.27 W/L, semejante el obtenido en matraces.

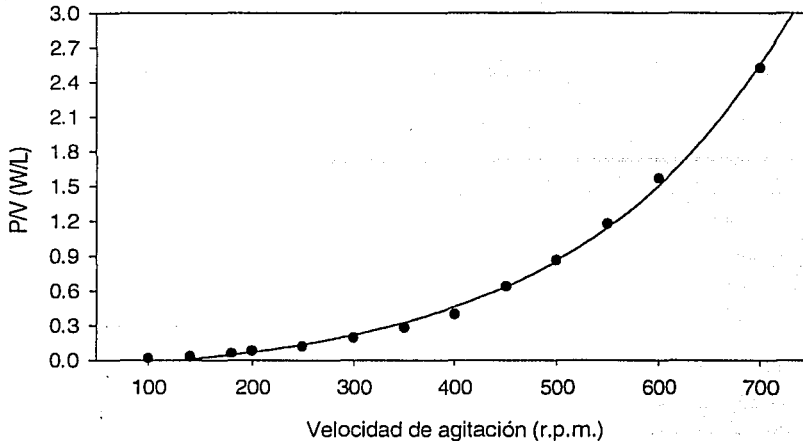


Figura 4.3. Relación entre la velocidad de agitación y el suministro de potencia gaseada (0.8 VVM) en biorreactor de 1 litro, utilizando agua.

4.3.2 Determinación de consumo de potencia en fermentador a altas viscosidades

Para determinar el consumo de potencia en fermentador con caldos de cultivo durante la producción de alginato, se prepararon soluciones de diferentes concentraciones de alginato de *Macrocystis pyrifera* (Kelco, Sigma Co.) de viscosidad media. Las concentraciones utilizadas de alginato (1, 3, 5, 6 y 10 g/L), se disolvieron en agua y posteriormente se adicionaron en el fermentador de 1.5 litros. El suministro de potencia se determinó directamente a través del dinamómetro, tal como se detalló en la sección 4.3.1 de antecedentes.

4.3.3 Determinación de las propiedades reológicas de soluciones de alginato

Las propiedades reológicas de las soluciones de alginato se determinaron en un reómetro (Contraves, Reomat 120), usando el dispositivo DIN125. Para ello se prepararon soluciones de diferentes

concentraciones de alginato de *Macrocystis pyrifera* (Kelco, Sigma Co.) de viscosidad media, obteniendo el índice de flujo (n) y el índice de consistencia (K), de la ley de la potencia:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

donde:

τ = esfuerzo de corte (Pa)

K = índice de consistencia ($\text{Pa} \cdot \text{s}^n$)

$\dot{\gamma}$ = velocidad de corte (s^{-1})

n = índice de flujo (-)

Graficando $\log \tau$ en función de $\log \dot{\gamma}$ se obtiene una línea recta

$$\text{Log } \tau = \text{Log } K + n \text{Log } \dot{\gamma}$$

Cuya pendiente es n y el antilogaritmo de la ordenada al origen es K (figura 4.4).

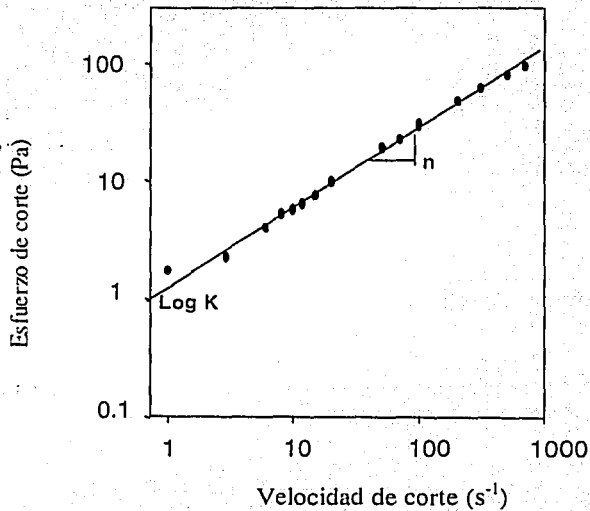


Figura 4.4. Relación de la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$) y el esfuerzo de corte (τ) para obtener el índice de consistencia (K) y el índice de flujo (n).

4.4. Métodos analíticos

4.4.1 Estimación de biomasa por turbidimetría

Se tomó una alícuota de 1.0 mL del caldo de fermentación y se diluyó 1/50 con agua destilada. Posteriormente, se leyó la absorbancia de la muestra a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 650. Los valores se usaron como una manera rápida de determinar el crecimiento bacteriano (Miranda, 1998).

4.4.2 Determinación de la concentración de biomasa

La determinación de la concentración de biomasa se llevó a cabo por un método gravimétrico de peso seco (en g/L), tal como lo describe Peña (1998):

- Se mezclaron 10 mL de caldo de cultivo con 1.0 mL de EDTA (0.1 M) y 1.0 mL de NaCl (1.0 M). Se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 15 minutos en una centrifuga Beckman J2HS (Rotor JA20).
- Se separa el sobrenadante y posteriormente el centrifugado (paquete celular), se lava dos veces con una mezcla de 0.1 M EDTA: 1 M NaCl (1:1 v/v). El paquete celular es filtrado al vacío a través de membranas *Nucleopore* de 0.45 μm de tamaño de poro, previamente taradas.
- La membrana fue secada por 24 horas a 70 °C en estufa (Felisa), para finalmente pesarse y obtener por diferencia de peso la cantidad de biomasa (peso seco).

4.4.3 Cuantificación del alginato

La técnica se basa en la precipitación de alginato con isopropanol y cuantificación gravimétrica del mismo (Jarman *et al*, 1978). El procedimiento es como sigue:

- Se mezclaron 10 mL de caldo de cultivo con 1 mL de NaEDTA (0.1 M) y 1 mL de NaCl (1.0 M) y posteriormente se centrifugó a 12,000 r.p.m. (centrífuga Beckman J2-HS) durante 20 minutos.
- Se separó el sobrenadante y se mezcló con 30 mL de isopropanol, dejando reposar 10 minutos, para la precipitación del producto.
- El producto se filtró en membranas *Nucleopore* de 0.2 μm , las cuales se secaron a 70 °C por 24 horas (hasta peso constante). Finalmente, se pesó el filtro y se calculó por diferencia de peso la concentración de polisacárido en el medio.

4.4.4 Determinación de sacarosa por el método de β -fructofuranosidasa-DNS

Este método se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando una invertasa y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reducción del ácido dinitrosalicílico (DNS), formando un compuesto nitroaminado colorido (amarillo), cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959).

Preparación de reactivos: la solución de DNS se preparó pesando 16 g de hidróxido de sodio, 300 g de tartrato de sodio y 10 g de DNS y mezclar en este orden en 1.0 L de agua destilada, calentando para una disolución total, con adición lenta del DNS para evitar precipitación. La solución enzimática se preparó como sigue: mezclar 2.5 mg de la enzima β -fructofuranosidasa (Gist-Brocades con una actividad de 243 U/mg a 40 °C) con 1 mL de amortiguador de citratos (0.32 M, pH 4.6). El procedimiento es como sigue:

- Se tomó una alícuota de 1.0 mL del caldo de fermentación y se diluyó 1/25 con agua destilada y se sirvieron 0.9 mL en tubos de ensayo y se mezclaron con 0.1 mL de la solución enzimática.
- La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se adicionaron 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, Sigma Chemical Co.) a cada muestra.
- Los tubos se calentaron a ebullición durante 5 minutos e inmediatamente después se enfriaron en baño de hielo.

- A cada tubo se le adicionaron 10 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm (espectrofotómetro Beckman DU 650) contra un blanco de reactivos.
- Los valores se extrapolaron en la curva patrón, la cual se elaboró utilizando soluciones de sacarosa en concentraciones de 0.2 a 1.0 g/L (figura 4.5).

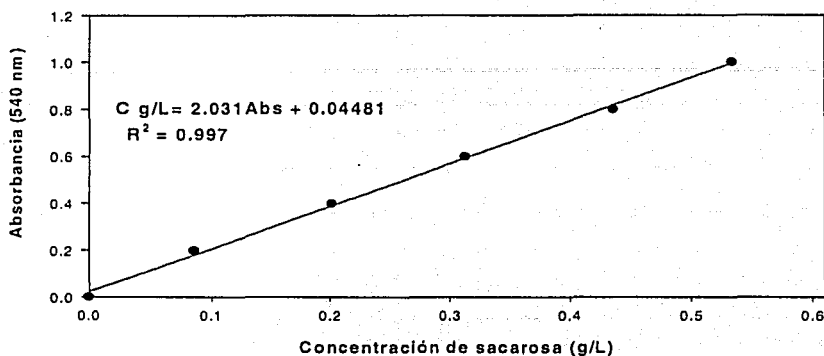


Figura 4.5 Curva patrón para la determinación de sacarosa.

4.4.5 Determinación de viscosidad del caldo de cultivo

La viscosidad del caldo de cultivo se midió en un viscosímetro de cono y plato (Wells-Brookfield LVT, Series 82198). Todas las determinaciones se hicieron a temperatura ambiente (25 °C) a 6 r.p.m y usando el cono CP-52, lo cual corresponde (de acuerdo a los datos del fabricante) a una velocidad de deformación de 12 s^{-1} .

4.4.6 Distribución de pesos moleculares

La distribución de pesos moleculares se determinó por cromatografía de filtración en gel (CFG) usando una serie de columnas Ultrahidrogel (UG 500 y 2000, Waters) de 7.8 mm (diámetro interno) por 300 mm, acopladas a un equipo de HPLC (Waters 625) con un detector de índice de refracción (Waters, 410). Como fase móvil se usó NaNO_3 0.1 M a 35 °C a un flujo de 0.9 mL/min. La señal del detector fue procesada con un programa PC compatible (Máxima GPC, Waters). La calibración de

las columnas se llevó a cabo utilizando pululanos de *Aerobasidium pullulans* como estándares de peso molecular con un rango de 5,800 a 1,600,000 daltones (Peña, 1998).

Para el análisis se usaron 50 μL de muestra (0.010 g de alginato disuelto en 10 mL de solución de nitrato de sodio 0.1M y filtrada en membrana *Nucleopore* de 0.22 μm), utilizando una jeringa de 100 μL . La manera como se almacenaron las muestras del alginato obtenido en cultivos para el posterior análisis fue la siguiente:

- Se separó el alginato del contenido celular, de la misma manera como se realiza para la cuantificación del alginato.
- Se decanta el isopropanol y se lleva el alginato centrifugado a recipientes Eppendorf de 1.0 mL de capacidad. Se retira la humedad por medio de un Savant de las muestras y se guardan a 4 °C hasta el momento del análisis.
- Se toman entre 20 y 30 mg de alginato seco y se resuspenden en 1.0 M de nitrato de sodio, dejando en reposo un mínimo de 8 horas. Se filtra la muestra resuspendida en membrana *Nucleopore* de 0.2 μm y se procede a inyectar en el HPLC.

4.5 Cálculo de los parámetros cinéticos y estequiométricos

Asumiendo que la velocidad de crecimiento de las células se incrementa en forma constante, durante la fase exponencial. La velocidad máxima específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) fue calculada mediante la siguiente expresión:

$$dX/dt = \mu X$$

Donde:

dX/dt = Velocidad de crecimiento

μ = Velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial

De la integral de la ecuación (1) se obtiene:

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

Simplificando:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t$$

Posteriormente se graficó el tiempo contra $\ln X$ y la pendiente obtenida representa la velocidad específica de crecimiento.

La cinética de formación de producto puede ser descrita por la ecuación de Luedeking-Piret, la cual ha sido utilizada con éxito en la descripción de la cinética de producción de exopolisacáridos sintetizados por *Xanthomonas campestris*, *Aureobasidium pullulans*, *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas sp.* (Luong *et al.*, 1988; Weiss y Ollis, 1980; Serrano-Carreón *et al.*, 1998). Para el caso de *A. vinelandii*, la generación de alginato puede estar asociado al crecimiento bacteriano (dX/dt) y/o estar asociada a la fase estacionaria (X). Esta relación es representada por la siguiente ecuación:

$$dP/dt = \alpha dX/dt + \beta X \quad (1)$$

El parámetro α se obtiene a partir de la ecuación logística:

$$dX/dt = \mu X (1 - X/X_m) \quad (2)$$

Donde:

X_m = máxima concentración de biomasa

La integración y rearrreglo de la ecuación (2) genera la siguiente ecuación:

$$X(t) = X_0 \{e^{\mu t} / [1 - (X_0/X_m)(1 - e^{\mu t})]\} \quad (3)$$

la integración de la ecuación (1) y la posterior sustitución en la ecuación (2) genera la evolución de P en el tiempo (4):

$$P(t) = P_0 + \alpha(X_m/\mu) \ln[1 - (X_0/X_m)(1 - e^{\mu t})] + \beta X_0 \{e^{\mu t} / [1 - (X_0/X_m)(1 - e^{\mu t})]\} \quad (4)$$

El parámetro β (constante no asociada al crecimiento) se evaluó a partir de los datos experimentales de dP/dt tomados de la cinética de cultivo en la fase estacionaria.

$$\beta = (dP/dt)X_m$$

El valor (dP/dt) se obtuvo a partir de los incrementos de P (alginato) en el tiempo (t) a partir de los datos experimentales.

El parámetro α se obtiene a partir de la ecuación (4) rearrreglada:

$$P(t) = P_o + \alpha X_o \left\{ \frac{e^{\mu t}}{1 - (X_o/X_m)(1 - e^{\mu t})} \right\} + \beta (X_m/\mu) \ln[1 - (X_o/X_m)(1 - e^{\mu t})] \quad (5)$$

De tal forma que:

$$P(t) - P_o = \alpha X_o \left\{ \frac{e^{\mu t}}{1 - (X_o/X_m)(1 - e^{\mu t})} \right\} + \beta (X_m/\mu) \ln[1 - (X_o/X_m)(1 - e^{\mu t})]$$

Como:

$$X(t) = \left\{ \frac{e^{\mu t}}{1 - (X_o/X_m)(1 - e^{\mu t})} \right\}$$

El parámetro α (constante asociada al crecimiento), se obtuvo de la pendiente que resulta de graficar

$$P - P_o - \beta (X_m/\mu) \ln[1 - (X_o/X_m)(1 - e^{\mu t})] \text{ contra } X(o) - X(t).$$

4.6 Estrategia experimental

El objetivo principal del presente trabajo fue escalar cultivos de *A. vinelandii* de matraz a biorreactor de 1 litro para la obtención de alginatos de alto peso molecular y alta viscosidad en solución. Para ello se planteó la estrategia experimental esquematizada en la **figura 4.6**.

El primer paso fue estimar el suministro de potencia en los matraces Erlenmeyer de 500 mL, operados a nuestras condiciones “estándar” (100 mL de volumen de trabajo, 200 r.p.m. y 2.5 cm de excentricidad), la estimación del suministro de potencia bajo esas condiciones se realizaron a partir de datos experimentales proporcionados por el Prof. Büchs (2001, Comunicación personal). Los datos experimentales proporcionados, se obtuvieron con el método reportado por Büchs *et al* (2000a). A partir de los datos experimentales del suministro de potencia a diferentes volúmenes de llenado (20, 50 y 80 mL) y 200 r.p.m, de matraces Erlenmeyer de 500 mL, se estimó un consumo de potencia (0.27 W/L) para los matraces operados a nuestras condiciones “estándar”.

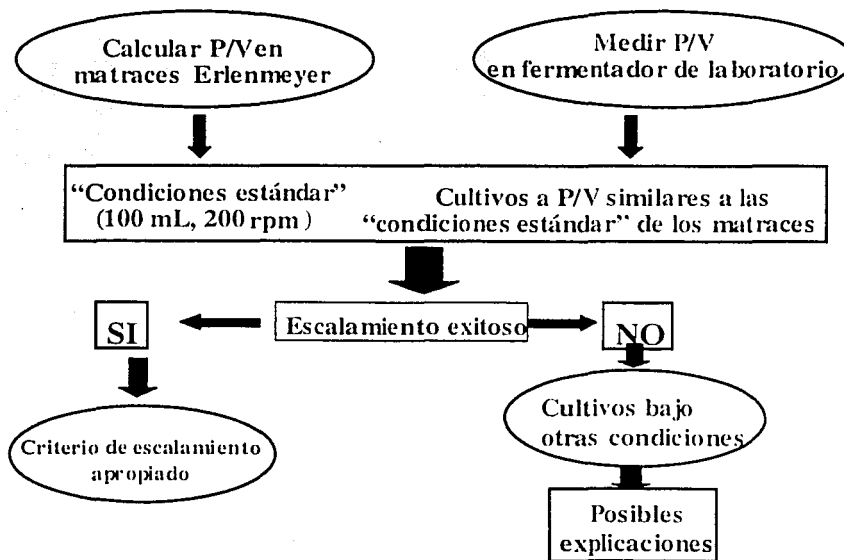


Figura 4.6. Estrategia experimental.

En biorreactor (volumen nominal de 1.5 litros, con 1.0 lt. de volumen de trabajo, 2 turbinas Rushton y 0.8 VVM), el consumo de potencia fue medido con un dinamómetro, en el cual se adaptó el biorreactor. Como se detalló en la sección 4.4.2, a 340 r.p.m el suministro de potencia fue similar al estimado para los cultivos de matraces, al inicio de la fermentación. Posteriormente, se escalaron los

cultivos de *A. vinelandii* a biorreactor, utilizando como criterio de escalamiento el suministro de potencia. Si la función objetivo no se lograba, entonces se realizarían cultivos en biorreactor a otras P/V's iniciales. Por último, se ofrecerían posibles explicaciones sobre el éxito o fracaso del escalamiento de las funciones objetivo, basadas en el comportamiento del suministro de potencia, en matraz y biorreactor, durante el cultivo de *A. vinelandii*.

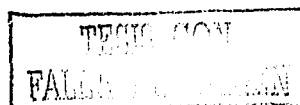
Capítulo V

Resultados y Discusión

5.1 Cultivos de *Azotobacter vinelandii* en matraces bajo condiciones "estándar" (0.27 W/L)

En la **figura 5.1** se muestran las cinéticas de crecimiento de biomasa, producción de alginato, pH, viscosidad aparente y consumo de sacarosa para el cultivo en matraces a 0.27 W/L de potencia inicial (calculada para las condiciones "estándar"). Cada uno de los puntos representados en la gráfica indica el promedio de dos cultivos independientes. La concentración máxima de biomasa fue de 5.1 g/L (**figura 5.1a**), a las 72 horas de cultivo, con una máxima velocidad específica de crecimiento de 0.09 h⁻¹. La producción de alginato estuvo asociada tanto a la fase de crecimiento como a la fase estacionaria, alcanzándose una concentración de polímero de 5.3 g/L al final del cultivo. El consumo de sacarosa al término de la fermentación (72 horas) fue de un 80 %. El pH cayó de 7.2 (al inicio del cultivo) a 5.5, seguramente debido a la excreción del ácido algínico (Clementi *et al*, 1995) y probablemente a otro tipo de metabolitos producidos (ácidos orgánicos). Esto sucedió a pesar de que el medio de cultivo contiene MOPS como amortiguador de pH.

La viscosidad aparente del caldo de cultivo se incrementa drásticamente a partir de las 36 horas de cultivo (60 cps) hasta 520 cps, a las 72 horas, con una concentración de alginato de 5.3 g/L (**figura 5.1b-d**). Estos resultados concuerdan con los anteriormente reportados por Peña *et al* (1997) y Miranda (1998), usando la misma cepa y condiciones de operación, en matraces, similares a las utilizadas en el presente trabajo. El peso molecular promedio del alginato sintetizado por *A. vinelandii*, se incrementa de 0.4 x 10⁶ g/gmol, al inicio del cultivo (**figura 5.1e**), hasta 1.9 x 10⁶ g/gmol (72 horas). Hasta ahora, en cultivos llevados a cabo en biorreactores (pH, TOD constante) no ha sido posible obtener alginatos de alto peso molecular. La producción de alginato por *A. vinelandii* (**figura 5.1b**) estuvo asociada parcialmente al crecimiento y la mayor síntesis tomó parte en la fase estacionaria, concordando con lo reportado anteriormente por Horan *et al* (1981); Chen *et al* (1985); Brivonese y Sutherland (1989); Peña *et al* (1997); Clementi *et al* (1995).



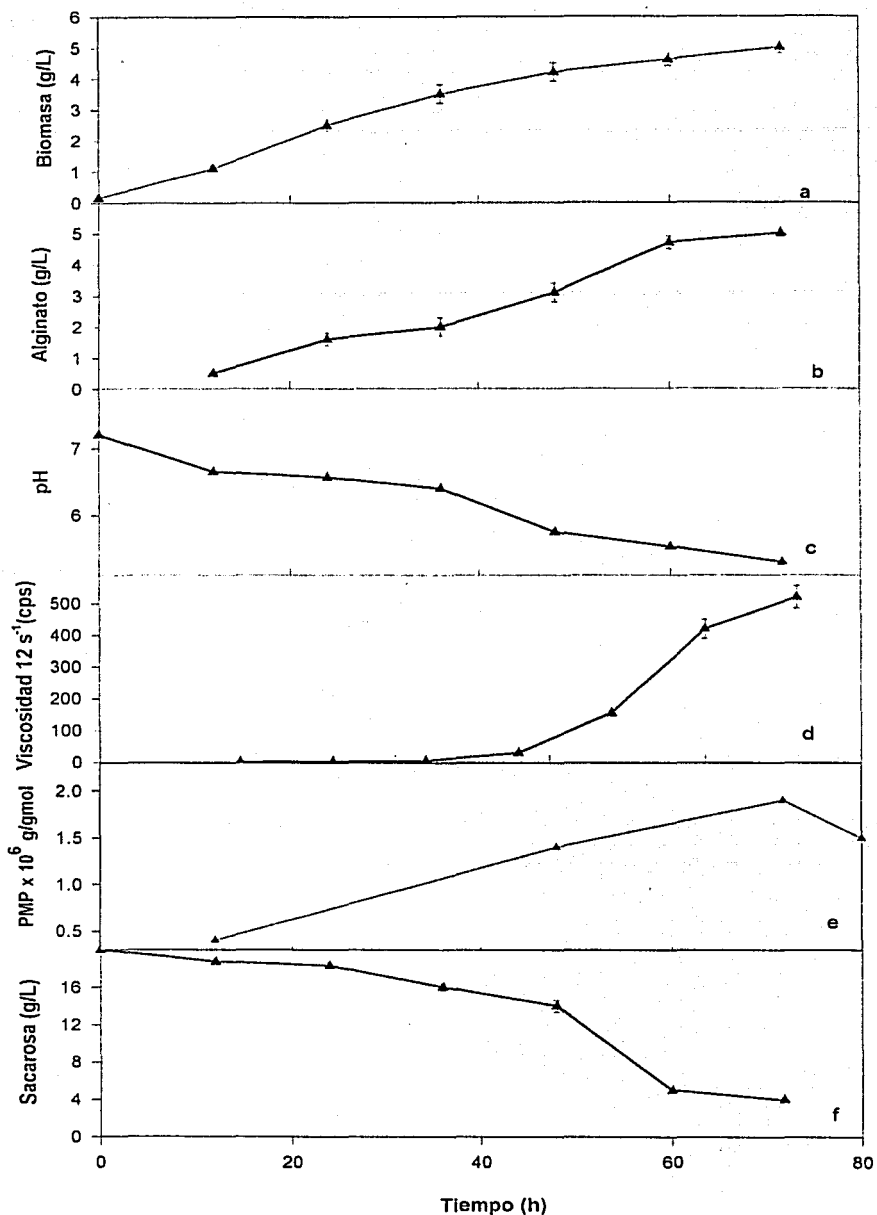


Figura 5.1. Cinéticas de crecimiento de biomasa (a), producción de alginato (b), pH (c), viscosidad aparente (d), peso molecular promedio (e) y consumo de sacarosa (f) por *A. vinelandii*, en matraces Erlenmeyer de 500 mL (0.27 W/L de P/V).

5.2 Cultivos de *A. vinelandii* en fermentador a 0.27 W/L.

La **figura 5.2a** muestra la evolución de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en el cultivo llevado a cabo en el fermentador a una potencia volumétrica inicial de 0.27 W/L (que corresponde a 340 r.p.m.). En las primeras 12 horas de cultivo, la TOD disminuyó drásticamente. Posteriormente, la TOD es menor al 0.5 %, hasta que la bacteria deja de crecer (46 horas), momento en el que la tensión de oxígeno disuelto se incrementa por encima del 40 % de saturación. Este mismo comportamiento de la TOD, durante la producción de alginato por *A. vinelandii*, fue observado por Rubio *et al* (1996), en cultivos de fermentadores de 3 L agitados a 250, 375 y 500 r.p.m., sin control de la tensión de oxígeno disuelto ni de pH. Estos autores reportaron que existen tres etapas claramente diferenciadas con respecto al comportamiento de la TOD: 1) la primera corresponde a la fase *lag* de crecimiento, en donde la TOD disminuye rápidamente. 2) La segunda etapa corresponde al crecimiento exponencial, donde la TOD es prácticamente cero y 3) cuando la bacteria deja de crecer, la TOD se incrementa. Por su parte, Parente *et al* (2000) observaron el mismo comportamiento de la TOD, en cultivos de *A. vinelandii* durante la producción de alginato en biorreactor, pero con control del pH, reportando que la tensión de oxígeno disuelto se incrementa cuando aún existe fuente de carbono (glucosa) en el cultivo.

El perfil de la tensión de oxígeno disuelto de la **figura 5.2a** también concuerda con lo observado por Seañez (1999) en el sentido que la mayor velocidad de respiración de *A. vinelandii* ocurre en la fase exponencial de crecimiento (observado como la generación de CO₂). Es decir, la velocidad de respiración disminuye en la fase estacionaria. En cultivos a tensión de oxígeno disuelto constante (controlado a través de la mezcla de oxígeno y nitrógeno), Trujillo (1999) y Peña *et al* (2000) observaron que en la fase exponencial de crecimiento, el porcentaje de oxígeno en el influente, con respecto al nitrógeno, es mayor. Por su parte, el porcentaje de oxígeno en el influente es mucho menor en la fase estacionaria, indicando una caída en la velocidad de respiración de la bacteria.

La máxima producción de alginato, en biorreactor, fue de 8.0 g/L (**figura 5.2c**). Bajo esta condición de suministro de potencia (0.27 W/L) y sin control de la TOD, la producción de polímero fue mayor en comparación a lo reportado con cultivos realizados a TOD constante (Parente *et al*, 1998; Sabra *et al*, 1999; Peña *et al*, 2000), quienes reportan concentraciones máximas de alginato de 5.2 g/L, con

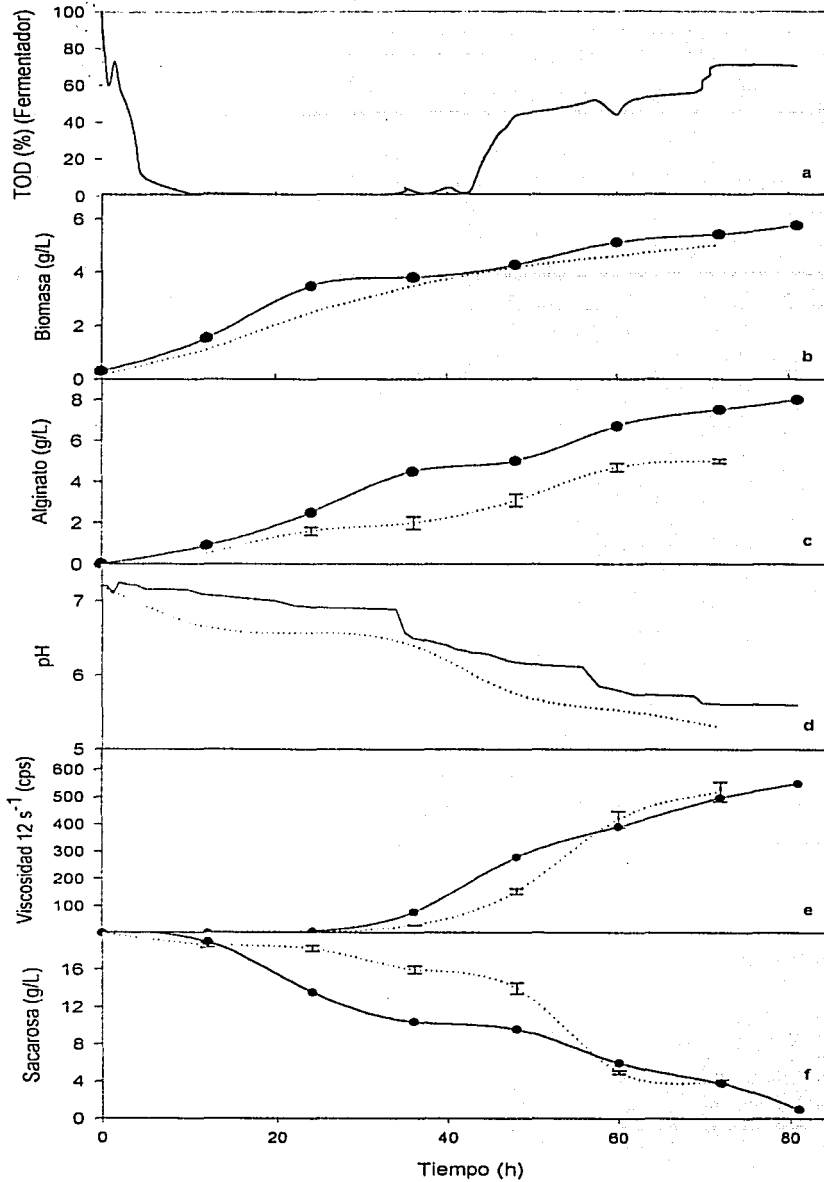


Figura 5.2. Evolución del oxígeno disuelto (a), biomasa (b), alginato (c), pH (d), viscosidad aparente (e) y sacarosa (f) por *A. vinelandii* en cultivos en (●) fermentador y en matraces (--- tomada de la figura 5.1), a una potencia volumétrica inicial de 0.27 W/L.

productividades de 0.07-0.2 g/L.h. En condiciones de cultivo sin control de TOD se han obtenido concentraciones máximas de alginato de hasta 5.8 g/L, con productividades desde 0.06-0.2 g/L.h (Horan *et al*, 1981; Chen *et al*, 1985; Salvagi y Salvagi, 1992; Clementi *et al*, 1995; Rubio *et al*, 1996; Peña *et al*, 1997; Clementi *et al*, 1999; Parente *et al*, 2000). La **figura 5.2c** muestra que en cultivos de biorreactor se produce mayor cantidad de alginato (8 g/L), en comparación al cultivo realizado en matraz (operado a nuestras condiciones "estándar"), (5.1 g/L), a pesar de que la viscosidad aparente del caldo de cultivo es similar (520-550 cps). Esto probablemente es debido, como se verá más adelante, a la diferente calidad de alginato sintetizado en cada uno de los sistemas.

Peña *et al* (2000) reportaron que las máximas concentraciones de alginato fueron de 5.0 g/L en biorreactor de 1 litro, a altas velocidades de agitación (700 r.p.m. a 3% de TOD constante y pH controlado a 7.2). Sin embargo, a bajas velocidades de agitación (300 r.p.m. a 3% de TOD constante y pH de 7.2) las concentraciones de alginato fueron de 3.5 g/L. Estos resultados fueron atribuidos a las pobres condiciones de mezclado, ya que el número de Reynolds (29580) a 700 r.p.m es mucho mayor a el número de Reynolds (12750) de los cultivos realizados a 300 r.p.m., lo cual puede conducir al incremento de los tiempos de mezclado. Además, a bajas velocidades de agitación se observó la formación de agregados celulares, lo que permitió explicar las diferencias en productividad (Peña, 1998). Sin embargo, en el presente trabajo, el hecho de no controlar la TOD ni el pH pudieran ser la causa de las altas concentraciones de alginato obtenidas, pudiendo estos parámetros afectar la actividad de las enzimas clave en la biosíntesis de alginato, tales como la fosfomanosa isomerasa y la GDP-manosa fosforilasa.

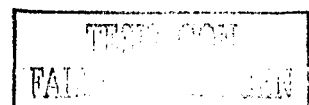
El perfil de pH del cultivo llevado a cabo en fermentador fue similar al de matraces Erlenmeyer (**figura 5.2d**), llegando a un valor mínimo de 5.5. Por lo tanto, el pH no sería en gran medida el factor que promueva la mayor síntesis de alginato en biorreactor. Clementi *et al* (1995) observaron que al final del cultivo, cuando el pH cae a un valor inferior a 5.5, las velocidades de síntesis de alginato son cercanas a cero, aunque no se ha reportado cual es el mecanismo fisiológico por el cual valores bajos de pH inhiben la síntesis de alginato. Por otra parte, Vermani *et al* (1995) encontraron que las mayores concentraciones de alginato, en matraces, se obtienen en un rango de pH de 5 a 6. Clementi *et al* (1999) han demostrado que el pH es un parámetro importante que media el consumo de oxígeno y nutrientes en *A. vinelandii*: por ejemplo, a valores de pH inferiores a 6, la bacteria tiene bajas

velocidades de crecimiento, reflejado en un menor consumo de nutrientes, por lo tanto, se requiere de su control para una mayor producción de alginato. Por otra parte, Clementi *et al* (1995) reportan que el pH es un parámetro importante en fermentaciones de *A. vinelandii* y mencionan que en cultivos en matraces, valores de pH controlados entre 7.5-6.5 por medio de MOPS, permiten que la velocidad de síntesis de alginato pueda ser incrementada de 2 a 2.5, respecto a cultivos con pH no controlado.

Sin embargo, la ausencia de control de la tensión de oxígeno disuelto pudiera ser en gran medida el principal factor que promueva la mayor síntesis de alginato por *A. vinelandii*. En este sentido, Parente *et al* (2000) reportan que la producción de alginato en biorreactor es incrementada cuando no se controla la TOD (4.3 g/L) con respecto a TOD constante de 1, 2, 5 y 10 % (3.7 g/L) y con control del pH (Parente *et al*, 1998). Este hecho demuestra que posiblemente el perfil de oxígeno disuelto (figura 5.2a) fue en gran medida el responsable de la alta concentración de alginato sintetizado. Horan *et al* (1983) demostraron que las actividades de la fosfomanosa isomerasa y de la GDP-manosa fosforilasa se incrementaban a concentraciones de oxígeno entre 1 y 5 %, pero las actividades de éstas enzimas decrecen a tensiones de oxígeno disuelto mayores a 5 %. Sin embargo, Sabra *et al* (1999) han reportado que alrededor de las células de *A. vinelandii* se forma una capa densa de alginato, la cual limita la transferencia de oxígeno hacia su interior, por lo tanto, la TOD que pudieran sentir las enzimas clave podría ser mucho menor, permitiendo explicar la síntesis de alginato en la fase estacionaria, cuando la TOD se incrementa.

Por lo tanto, en el presente trabajo, en el cultivo de biorreactor llevado a cabo a 0.27 W/L de potencia inicial, el no haber controlado el pH ni el oxígeno disuelto pudo haber permitido una mayor actividad por parte de las enzimas clave (GDP-manosa fosforilasa y la fosfomanosa isomerasa), respecto a lo reportado por Peña (1998) y por Sabra *et al* (2000) en cultivos de biorreactor a pH y TOD constantes (3.5 g/L).

La figura 5.2f muestra que el consumo de sacarosa es mucho más rápido para el cultivo en fermentador que en matraz, en las primeras 36 horas de cultivo (consumiendo más del 80 % de la fuente de carbono), con respecto a la parte final de la fermentación. En el biorreactor, al final de la fermentación, la viscosidad aparente del caldo de cultivo fue de 550 cps (figura 5.2e), la cual se encuentra en el mismo orden de magnitud de la viscosidad aparente de los caldos de cultivo obtenidos



de matraces Erlenmeyer bajo las condiciones "estándar" de este trabajo (200 r.p.m. con 100 mL de volumen de trabajo y 2.5 cm de excentricidad). La máxima velocidad específica de crecimiento de *A. vinelandii* en biorreactor fue de 0.158 h^{-1} , la cual, comparada con la del cultivo realizado en matraz (0.09 h^{-1}) fue mucho mayor.

Una de las formas para inferir la calidad del alginato producido por *A. vinelandii* es a través de la determinación de su capacidad viscosificante, la cual es definida como la viscosidad aparente generada por unidad de peso de alginato. Torrestiana *et al* (1990) utilizaron el concepto de capacidad viscosificante para evaluar la calidad de la xantana producida por diferentes cepas aisladas de *Xanthomonas campestris*, el cual mostró ser un parámetro práctico para la selección de cepas productoras de xantana de alta calidad. En la figura 5.3 se muestran los perfiles de capacidad viscosificante para los caldos de cultivo de *A. vinelandii* obtenidos de matraz y en fermentador al mismo suministro de potencia inicial de 0.27 W/L . En los cultivos realizados en biorreactor, la concentración de alginato fue mayor, ya que se produjeron hasta 8 g/L de alginato y con una viscosidad aparente en solución de hasta 550 cps. Sin embargo, en los cultivos realizados en matraz, la viscosidad fue de 520 cps, pero se logró con una concentración máxima de alginato de solo 5.3 g/L .

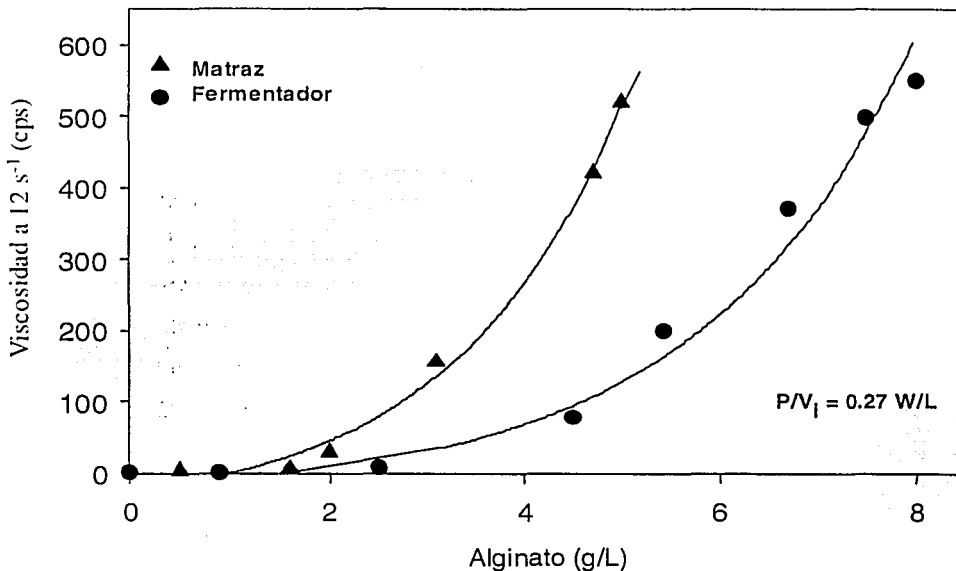
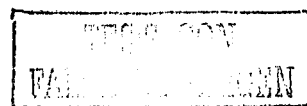


Figura 5.3. Relación entre la concentración de alginato y la viscosidad de los caldos de *A. vinelandii* desarrollados en matraz y fermentador con suministro de potencia similares (0.27 W/L).

Por lo tanto, se concluye que en cultivos en matraces agitados se obtiene alginato de mayor calidad (capacidad viscosificante) que en cultivos de biorreactor a similar suministro de potencia inicial. Si solo se considerara a la viscosidad aparente final del caldo de cultivo como función objetivo de escalamiento del proceso, de matraz a fermentador, se podría considerar como exitoso. Sin embargo, no lo fue en cuanto al perfil de la capacidad viscosificante del alginato.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue la obtención de alginatos de altos pesos moleculares promedio, similares a los producidos en los cultivos de matraces por *A. vinelandii*, ya que el peso molecular promedio del alginato producido por la bacteria es uno de los parámetros críticos de las características reológicas del polímero y determinante en su uso final. En la **figura 5.4** se muestra el peso molecular promedio del alginato sintetizado por *A. vinelandii* en el curso de la fermentación, en cultivos tanto en matraces como en biorreactor. El peso molecular promedio del alginato obtenido en matraces se incrementó durante el cultivo. Al inicio de la fase exponencial de crecimiento, el peso molecular promedio fue de 0.4×10^6 g/gmol y éste se incrementó a valores de hasta 1.9×10^6 g/gmol durante la fase estacionaria.

Por otra parte, en el cultivo realizado en biorreactor, el peso molecular promedio del alginato producido al comienzo del cultivo fue similar a los obtenidos en matraces agitados (0.4×10^6 g/gmol). Sin embargo, cuando la bacteria cesa su crecimiento, el peso molecular promedio del alginato fue de 1.1×10^6 g/gmol. En la fase estacionaria de los cultivos realizados en matraz y en biorreactor (**figura 5.4**) se observó una disminución en el peso molecular promedio. Este fenómeno pudiera estar relacionado con la síntesis de la enzima alginato liasa, la cual degrada al polímero. Horan *et al* (1983), así como Peña (1998) reportaron que la expresión de la alginato liasa por *A. vinelandii* parece estar controlada por los niveles de oxígeno del caldo de cultivo. Algunos trabajos han reportado los efectos de las condiciones de cultivo sobre el PMP (Peña *et al*, 1997; Peña, 1998; Parente *et al*, 1998; Peña *et al*, 2000; Trujillo-Roldán *et al*, 2001; Trujillo-Roldán, 2002). Estos trabajos en general han reportado que existe una relación dependiente de el PMP con la TOD del cultivo, pero al final del cultivo existe una degradación del polímero, disminuyendo la calidad del alginato.



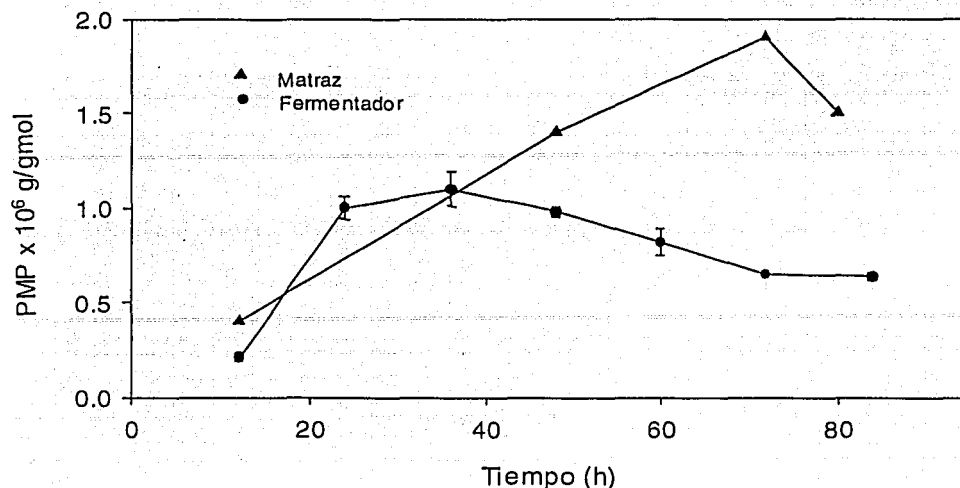


Figura 5.4. Evolución del peso molecular promedio del alginato durante el cultivo de *A. vinelandii*, en matraz y fermentador con suministro de potencia inicial de 0.27 W/L.

De esta serie de experimentos, se puede concluir que, bajo la misma potencia volumétrica inicial, en matraces agitados se sintetiza alginato de mayor poder viscosificante (figura 5.3) y peso molecular promedio (figura 5.4) con respecto al cultivo en fermentador. Este comportamiento puede deberse a las grandes diferencias en la hidrodinámica de los cultivos llevados a cabo en matraz y biorreactor (Gerson y Kole, 2001), así como a las posibles diferencias en la velocidad de transferencia de oxígeno debido a la generación de altas viscosidades aparentes del cultivo (Hermann *et al.*, 2001).

Estudios previos en biorreactor (realizados por Peña, 1998) a una velocidad de agitación de 300 r.p.m., es decir, con un suministro de potencia de 0.21 W/L, pero a TOD constante de 3 % y pH controlado, indicaron que la bacteria sintetiza alginatos con PMP_{\max} de 0.68×10^6 g/gmol, los cuales son mucho menores a los observados en el presente trabajo. Ello sugiere que la ausencia de control del pH y de la TOD pueden ser los responsables de la síntesis de alginatos de alto peso molecular promedio.

Con el objetivo de investigar si era posible obtener PMP_{\max} y perfiles de capacidad viscosificante similares a los obtenidos en los caldos de cultivo de matraces, se decidió llevar a cabo cultivos en biorreactor a P/V's menores, debido a que la velocidad máxima específica de crecimiento de *A. vinelandii* fue mayor en cultivos en biorreactor (0.158 h^{-1}) que en cultivos de matraces (0.09 h^{-1}), bajo el mismo suministro de potencia inicial (0.27 W/L).

5.3 Cultivos de *A. vinelandii* en fermentador a suministros de potencia iniciales menores a 0.27 W/L

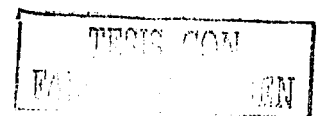
Con el propósito de obtener similar calidad de alginato, en cultivos de matraz y fermentador, se realizaron cultivos en fermentador a suministros de potencia iniciales de 0.075, 0.056 y 0.027 W/L, los cuales fueron elegidos para disminuir la velocidad máxima específica de crecimiento.

5.3.1 Cultivos a 0.075 W/L

A una velocidad de agitación de 200 r.p.m. (potencia inicial de 0.075 W/L), la biomasa alcanzada fue de 4 g/L (figura 5.5), al momento en que la TOD se incrementó (40 horas de cultivo). A ese tiempo de cultivo, la viscosidad aparente del caldo de cultivo fue de 75 cps y se habían producido 4 g/L de alginato. En ese momento el pH tenía un valor de 6.7. Se observó el mismo comportamiento general de la TOD que en el cultivo realizado a 0.27 W/L en biorreactor, es decir, la TOD se incrementó cuando *A. vinelandii* dejó de crecer.

La figura 5.5a muestra el perfil de la tensión de oxígeno disuelto, de dos fermentaciones independientes. En este caso, la TOD llega a un valor menor al 0.5 % a las 8 horas de cultivo, manteniéndose en 0 % de TOD hasta las 40 horas de cultivo. Posteriormente, la TOD se mantuvo por encima del 10 %, justo después de que *A. vinelandii* dejó de crecer, debido seguramente a que en la fase estacionaria la bacteria disminuye su velocidad de respiración. La máxima concentración de biomasa alcanzada fue de 5.3 g/L, con una velocidad máxima específica de crecimiento de 0.125 h^{-1} . El consumo de sacarosa estuvo ligado al crecimiento de la bacteria (consumiendo más del 75 % de la fuente de carbono, a las 40 horas de cultivo) y el pH cayó hasta un valor de 5.55.

La figura 5.5e muestra que la máxima viscosidad aparente del caldo de cultivo fue de 420 cps, con una concentración de alginato de 6.7 g/L. Esta producción de alginato es menor a la condición anteriormente evaluada en biorreactor (P/V de 0.27 W/L), pero mayor a los cultivos en matraces. Las altas concentraciones de alginato encontradas en la fermentación a una P/V de 0.27 W/L, pueden estar relacionados con las mejores condiciones de mezclado, en comparación a la fermentación realizada a P/V de 0.075 W/L



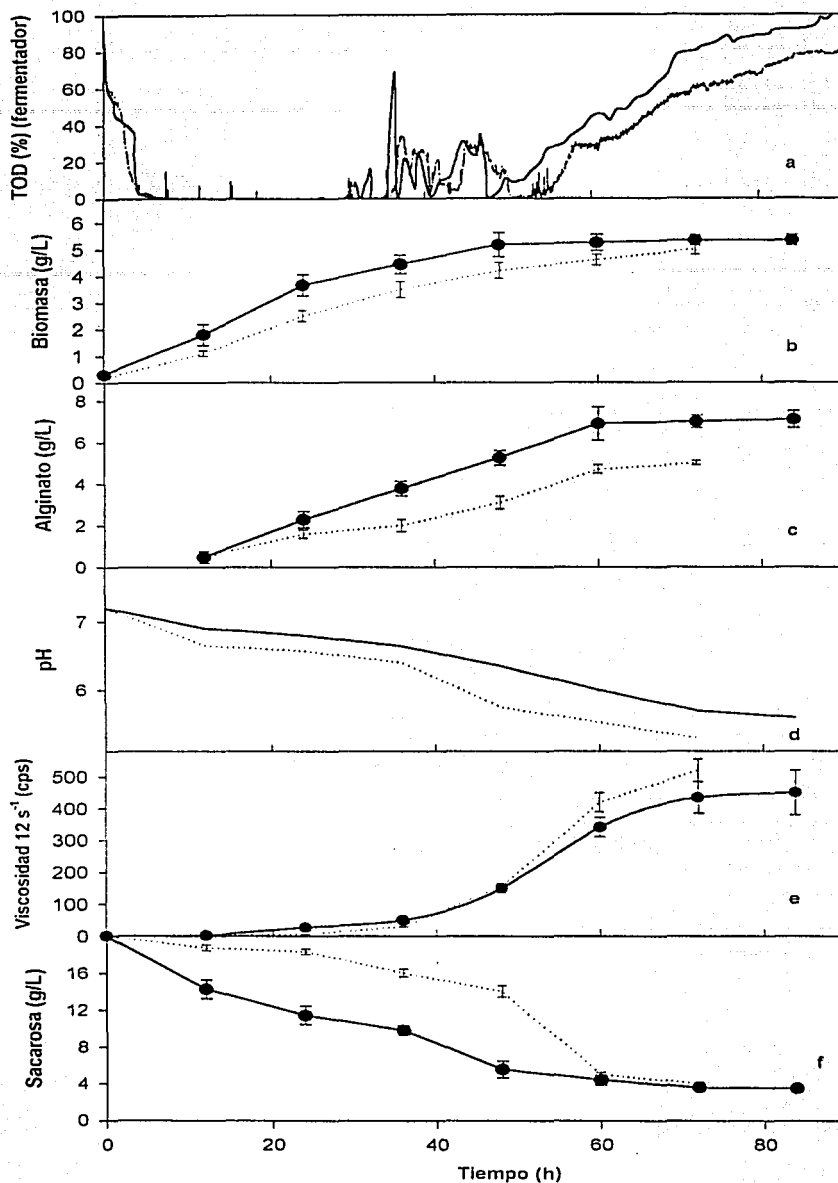
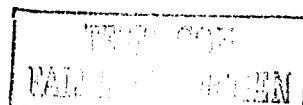


Figura 5.5. Evolución del oxígeno disuelto (a), biomasa (b), alginato (c), pH (d), viscosidad aparente (e) y sacarosa (f) por *A. vinelandii*, en cultivos en fermentador (●) 200 r.p.m (0.075 W/L) y en matraces (---, de la figura 5.1).

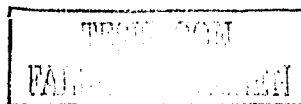


5.3.2 Cultivo a 0.056 W/L

En la **figura 5.6** se muestran las cinéticas del cultivo, desarrolladas a una P/V de 0.056 W/L, es decir, a 180 r.p.m. Cuando la TOD comienza a incrementarse (45 horas de cultivo), la biomasa alcanzada a ese tiempo fue de 4.6 g/L, la viscosidad aparente del caldo de cultivo fue de 80 cps con una concentración de alginato de 2.7 g/L, el pH de 6.7 y el consumo de sacarosa fue de 12 g/L a ese tiempo de la fermentación (45 horas).

En la **figura 5.6a** se observa que la TOD disminuyó durante las primeras 7 horas de fermentación y después de las 45 horas de cultivo (aproximadamente cuando la bacteria dejó de crecer) la TOD se incrementó. Al final del cultivo se obtuvo una concentración máxima de biomasa de 5.5 g/L. La máxima velocidad específica de crecimiento fue de 0.11 h^{-1} . La máxima viscosidad aparente del caldo de cultivo fue de 240 cps, con una concentración máxima de alginato de 4.2 g/L. El consumo de sacarosa fue del 85 % y el valor final del pH fue de 5.6. Se observó una disminución en la producción de alginato, respecto a las condiciones evaluadas anteriormente (0.27 y 0.076 W/L de suministro de potencia inicial). De igual forma, la máxima velocidad específica de crecimiento disminuyó de 0.158 h^{-1} ($P/V_i = 0.27 \text{ W/L}$) a 0.11 h^{-1} ($P/V_i = 0.056 \text{ W/L}$).

La disminución del suministro de potencia condujo a una menor producción de alginato, lo cual se reflejó en la disminución de la viscosidad aparente del caldo de cultivo. Esto posiblemente fue causado por diferencias en la hidrodinámica, por ejemplo, a 340 r.p.m., al inicio del cultivo, el número de Reynolds es mayor (14660) que el cultivo realizado a 180 r.p.m (número de Reynolds de 7650). Por lo tanto, los tiempos de mezclado de los cultivos realizados a menores velocidades de agitación son mayores, tal y como lo reporta Hoogendoorn y den Hartog (1977) quienes reportaron una relación del tiempo de mezclado contra el número de Reynolds en biorreactores de 1 y 10 litros con 2 turbinas Rushton. Para los números de Reynolds aquí reportados, al inicio de cultivo, los tiempos de mezclado se pueden incrementar de 4 a 5 s en los cultivos a bajas velocidades de agitación, por lo tanto, conducen a menor transferencia de oxígeno a las células, que daría como resultado una menor velocidad de crecimiento, en comparación al cultivo realizado a P/V inicial de 0.27 W/L.



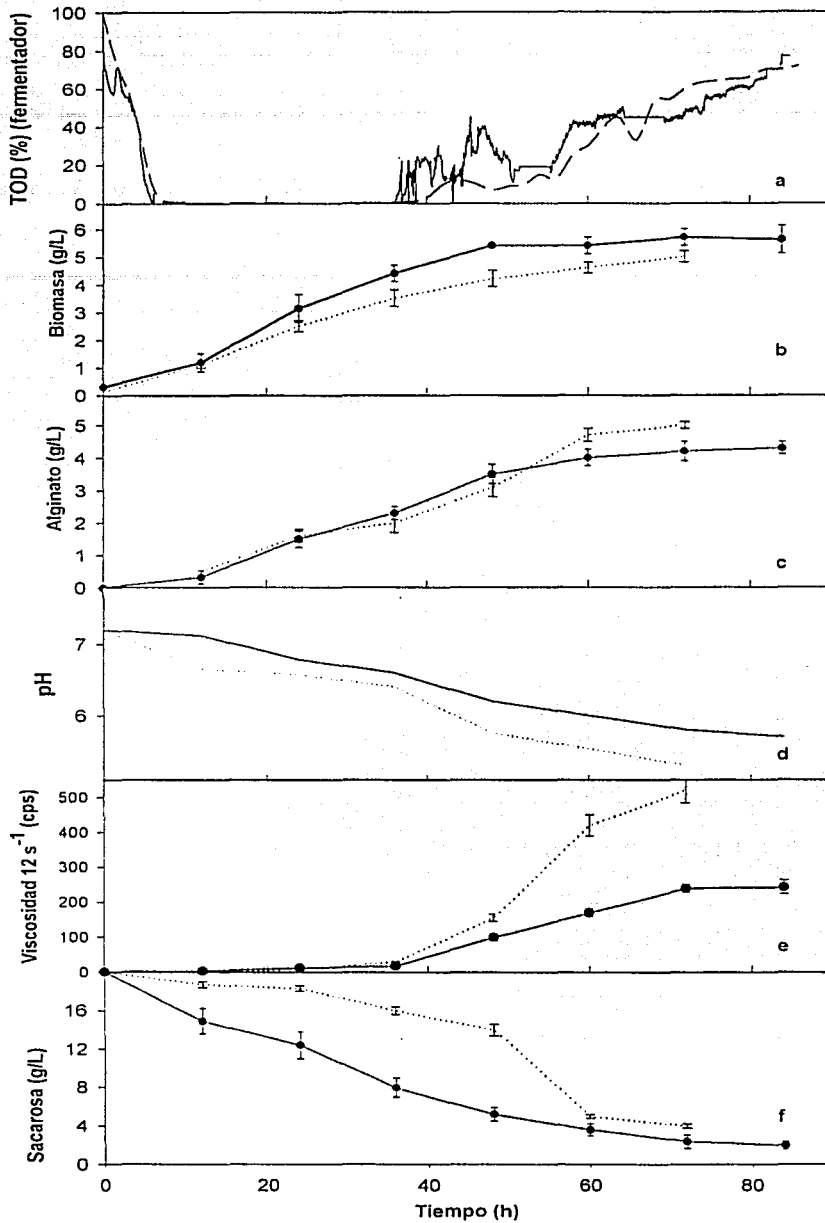


Figura 5.6. Evolución del oxígeno disuelto (a), biomasa (b), alginato (c), pH (d), viscosidad aparente (e) y sacarosa (f) por *A. vinelandii*, en cultivos en fermentador (●) 180 r.p.m (0.056 W/L) y en matraces (---, tomado de la figura .5.1).

5.3.3 Cultivo a 0.027 W/L

La figura 5.7 presenta los resultados de la fermentación de *Azotobacter vinelandii*, realizada a una P/V inicial de 0.027 W/L (esto es, a 140 r.p.m). Se observa que al inicio del cultivo, la TOD disminuyó constantemente a menos de 1 % en cerca de 6 horas. Posteriormente, hasta las 70 horas de cultivo, la TOD se incrementó. La biomasa máxima alcanzada fue de 5.3 g/L. La máxima velocidad específica de crecimiento fue de 0.092 h⁻¹. Esta máxima velocidad específica de crecimiento fue similar a la obtenida en matraces Erlenmeyer bajo las condiciones "estándar" del presente trabajo (200 r.p.m., 100 mL de volumen de trabajo, 2.5 cm de excentricidad).

La figura 5.7 también muestra que la máxima concentración de alginato encontrada bajo éstas condiciones fue de 3.2 g/L, la cual fue menor a la encontrada en matraces (5.3 g/L). La sacarosa no se consumió por completo, mismo fenómeno observado en matraces (con 4.5 g/L sin consumir). La disminución de pH fue más lenta, en comparación con los cultivos en matraces, con valores finales de 5.7. Los valores de viscosidad aparente y de concentración del alginato fueron menores (180 cps y 3.2 g/L, respectivamente), en comparación a las de las demás fermentaciones evaluadas (a consumos de potencia mayores).

En el cultivo llevado a cabo a P/V de 0.027 W/L (140 r.p.m.), se tuvieron las condiciones más pobres de mezclado evaluadas en cultivos de biorreactor. Como el caso de la xantana producida por *Xanthomonas campestris*, en biorreactor de 1.5 L. los tiempos de mezclado se incrementan de 4 a 7 segundos a viscosidades de 0.6 Pa's y se comporta como un fluido con flujo laminar (Hoogendoorn y den Hartog, 1977), sugiriendo que -posiblemente- en matraces agitados bajo nuestras condiciones "estándar", la transferencia de oxígeno sea similar a los cultivos evaluados en biorreactor a potencia inicial de 0.027 W/L, ya que la máxima velocidad específica de crecimiento fue idéntica a la obtenida en matraces (0.092 h⁻¹).

5.3.4 Comparación de resultados en biorreactor (a varias P/V's) y la condición "estándar" en matraz.

En el presente trabajo, el incremento de la velocidad de agitación, condujo a una mayor síntesis de

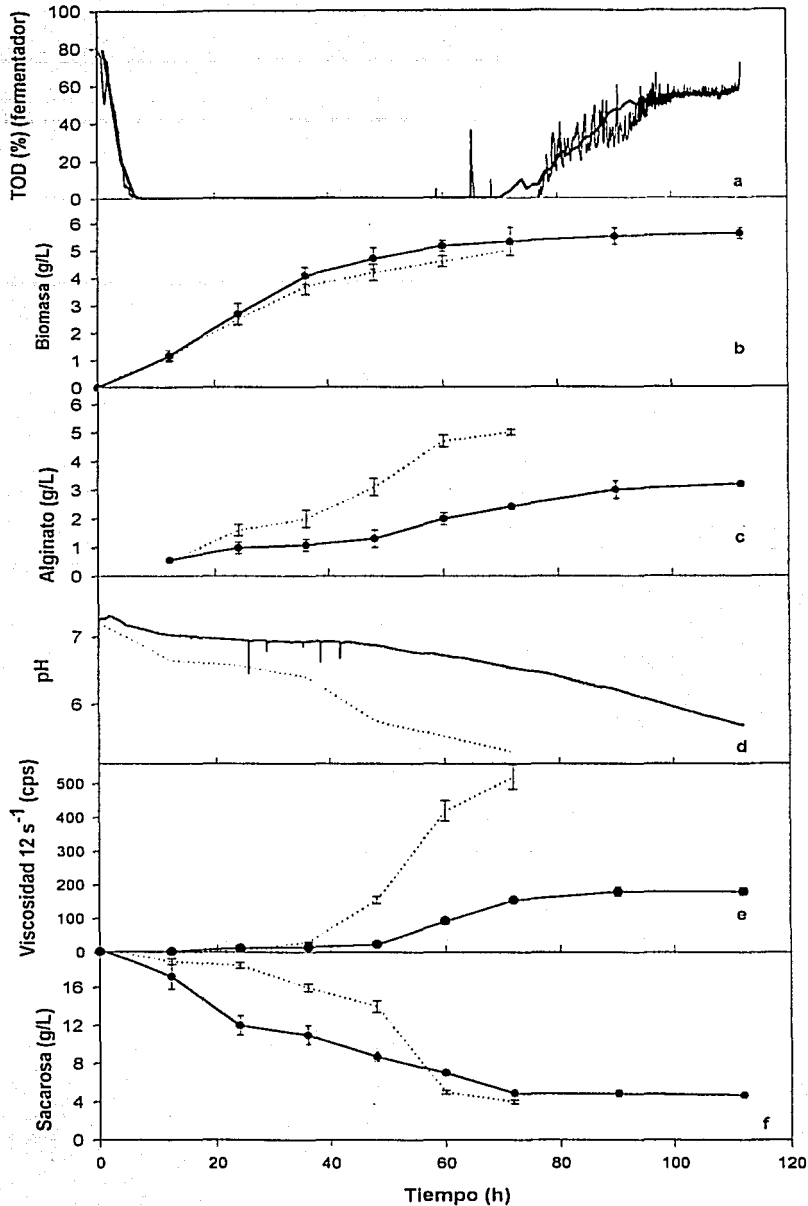


Figura 5.7. Evolución del oxígeno disuelto (a), biomasa (b), alginato (c), pH (d), viscosidad aparente (e) y sacarosa (f) en cultivos de *A. vinelandii* en fermentador (●) (0.027 W/L) y matraces (---, tomada de la figura 5.1).

alginato. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Rubio *et al* (1996), en cultivos de *A. vinelandii* donde no se controló la TOD ni el pH. Estos autores evaluaron el efecto de la velocidad de agitación (250, 375 y 500 r.p.m.) sobre la producción de alginato, reportando que conforme se incrementó la velocidad de agitación se sintetiza más alginato, asociándolo con la protección del sistema nitrogenasa, la cual es una enzima sensible a altas TOD. Sin embargo, Parente *et al* (2000) reportan que la producción de alginato, en condiciones de control de pH, pero sin control de la TOD, al incrementar la velocidad de agitación de 300 a 700 r.p.m. condujeron a una disminución de la síntesis de alginato, de 2.3 a 1.8 g/L. Se ha reportado (Peña *et al*, 2000) que la velocidad de agitación influye en la producción de alginato y en el crecimiento de *A. vinelandii*. Por ejemplo, a TOD constante de 3 %, se ha observado que al aumentar la velocidad de agitación de 300 a 700 r.p.m. la producción de alginato se incrementa de 3.5 a 5.1 g/L (Peña *et al*, 2000).

Este mismo fenómeno se ha observado en cultivos en biorreactor, con otros sistemas microbianos para la producción de polisacáridos. Por ejemplo, McNeil y Kristiansen (1987), así como Gibbs y Seviour (1996) reportaron que la producción de pululano producido por *Aurebasidium pullulans* aumenta con el incremento de la velocidad de agitación. En *Xanthomonas campestris*, se ha demostrado un fenómeno semejante, ya que la transferencia de oxígeno es el principal factor que afecta las velocidades específicas de producción de xantana (Peters *et al*, 1989). Con *Alcaligenes faecalis* se observó un incremento significativo en la síntesis de curdlano, así como en la velocidad de crecimiento, al aumentar la velocidad de agitación de 300 a 600 r.p.m. (Lee *et al*, 1999).

En la **tabla 5.2** se muestran, junto con las velocidades de crecimiento, las constantes α y β de la ecuación de Luedeking-Piret y los rendimientos de biomasa y de producto en base a sacarosa ($Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$) como función del suministro de potencia. Las máximas velocidades específicas de crecimiento aquí reportadas son similares a las reportadas por Peña (1998) para cultivos de *A. vinelandii*, a bajas velocidades de agitación en biorreactor (300 r.p.m y TOD constante de 3 %) y en matraces (200 r.p.m., 100 mL de volumen de trabajo, 2.5 cm de excentricidad). En los cultivos realizados en el presente trabajo (en biorreactor), las bajas velocidades de agitación condujeron a una baja producción de alginato, baja viscosidad del caldo de cultivo y menor velocidad específica de crecimiento.



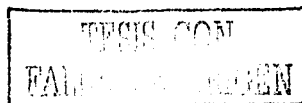
La producción del polímero (en todas las condiciones evaluadas en biorreactor) fue asociada tanto a la fase de crecimiento exponencial como a la estacionaria, tal y como sucede en matraces. Como se muestra en la **tabla 5.2**, durante la fase estacionaria se sintetizó alginato. La producción de polímero en la fase estacionaria va desde el 30 al 40 % del alginato total producido, mismo fenómeno observado en matraces agitados. Estudios previos realizados por Peña (1998), Trujillo (1999), Seañez (1999), Parente *et al* (1998), Peña *et al* (2000) reportaron que en la fase estacionaria no existe producción de alginato, en cultivos realizados en biorreactores a TOD constante. Esto indica que el metabolismo de la bacteria es muy diferente a TOD y pH controlados. Los cultivos desarrollados en matraces y en fermentador sin control de pH y TOD, tuvieron constantes α y $\beta > 0$, concordando con lo reportado por otros autores (Deavin *et al*, 1977; Horan *et al*, 1981; Chen *et al*, 1985; Brivonese y Sutherland, 1989; Clementi *et al*, 1995; Parente *et al*, 1998; Peña, 1998).

Tabla 5.2. Velocidad máxima específica de crecimiento, constantes de la ecuación de Luedeking-Piret y rendimientos, en función del P/V inicial en matraz y en fermentador.

Fermentación P/V (W/L)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	α (g_{alg}/g_{biom})	β ($g_{alg}/g_{biom}h$)	$Y_{x/s}$ g_{biom}/g_{sac}	$Y_{p/s}$ g_{alg}/g_{sac}	% de alg fase _{estac.}
Matraz 0.27	0.090 (± 0.002)	0.62 (± 0.2)	0.020 (± 0.003)	0.305 (± 0.03)	0.320 (± 0.03)	50 (± 2.5)
Biorreactor 0.27	0.158 (± 0.009)	1.65 (± 0.3)	0.011 (± 0.004)	0.340 (± 0.02)	0.486 (± 0.04)	40 (± 3.0)
0.076	0.123 (± 0.003)	1.84 (± 0.2)	0.009 (± 0.003)	0.294 (± 0.01)	0.388 (± 0.02)	30 (± 3.4)
0.056	0.113 (± 0.004)	1.91 (± 0.5)	0.006 (± 0.004)	0.310 (± 0.05)	0.252 (± 0.03)	30 (± 5.0)
0.027	0.093 (± 0.003)	2.07 (± 0.1)	0.007 (± 0.001)	0.312 (± 0.03)	0.193 (± 0.02)	40 (± 4.5)

En los cultivos en biorreactor reportados previamente (Parente *et al*, 1998; Peña, 1998), la producción de alginato estuvo principalmente asociada al crecimiento, es decir, con valores de β cercanos a cero. Este fenómeno había sido relacionado con las condiciones de cultivo, con la especie bacteriana (Clementi, 1997) y particularmente a las condiciones de oxígeno disuelto (Peña, 1998). En este caso, los perfiles de pH y oxígeno disuelto pudieran ser los responsables de la síntesis de alginato en la fase estacionaria.

Los máximos rendimientos ($Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$) con base al consumo de sacarosa se obtuvieron en la fermentación a P/Vi de 0.27 W/L, seguido por las obtenidas en el cultivo de 200 r.p.m (P/Vi de 0.076



W/L). El comportamiento del rendimiento $Y_{p/s}$, en biorreactor, puede ser debido a que a altas velocidades de agitación se obtiene mayor concentración de polímero (8 g/L a $P/V_i = 0.27$ W/L), mientras que a bajas velocidades de agitación ($P/V_i = 0.027$ W/L) la fuente de carbono puede ser canalizada hacia la formación de PHB, debido a las pobres condiciones de mezclado y transferencia de oxígeno.

Los altos valores de la concentración de biomasa (mayores a 5.3 g/L) encontrados en todas las velocidades de agitación evaluadas en biorreactor (340, 200, 180 y 140 r.p.m.) y los altos valores del rendimiento biomasa/sustrato (0.340, 0.294, 0.310 y 0.312 g/g, respectivamente), pueden ser debidos a la acumulación del polímero intracelular de reserva (PHB). Se ha reportado que *A. vinelandii* incrementa su volumen celular por el incremento continuo del número y tamaño de los gránulos de PHB (Horan *et al.*, 1981). La bacteria puede acumular hasta 45 % de PHB en cultivos de matraces bajo nuestras condiciones "estándar" (Miranda, 1998). Brivonese y Sutherland (1989) han reportado valores de acumulación de PHB de hasta 70 % del peso seco, en cultivos de *A. vinelandii*.

5.3.4.1 $\mu_{m\acute{a}x}$ como función de P/V inicial

En la figura 5.8 se muestran las máximas velocidades específicas de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$), en biorreactor, como función de la P/V inicial del cultivo. La condición en la cual el microorganismo creció más rápidamente fue en el cultivo a P/V_i de 0.27 W/L. Fue clara la disminución de la máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) conforme la P/V inicial es menor.

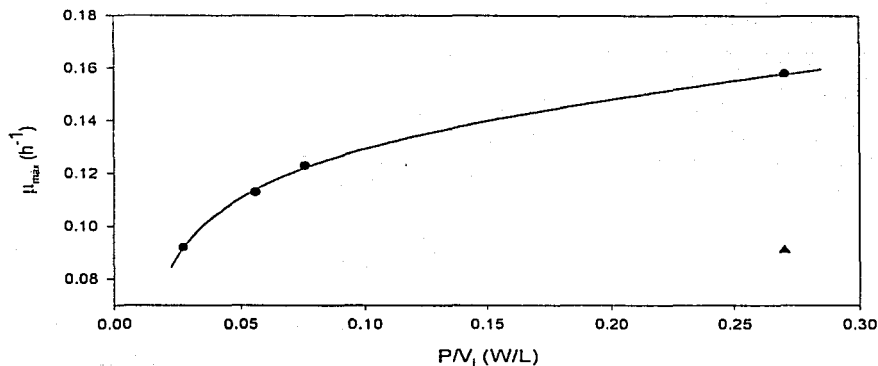


Figura 5.8 Relación entre el suministro de potencia inicial y la máxima velocidad específica de crecimiento en cultivos de *A. vinelandii* en (●) biorreactor y en (▲) matraz.

Como se observa, la máxima velocidad específica de crecimiento del cultivo realizado en matraz, no cae en la tendencia de lo observado en los cultivos en biorreactor. La menor velocidad específica de crecimiento (0.09 h^{-1}) observada en cultivos de matraces agitados, a similar suministro de potencia inicial que en cultivos en biorreactor (0.27 W/L), pudo haber sido ocasionada por el insuficiente suministro de oxígeno, ya que la transferencia de oxígeno es uno de los problemas más frecuentes asociados con el uso de matraces agitados (Solomons, 1969; Henzler y Schedel, 1991; Büchs, 2001).

Sin embargo, a pesar de que los cultivos en matraz fueron llevados a cabo a la misma P/V inicial que en biorreactor, la máxima velocidad específica de crecimiento fue inferior. Peña (1998) observó que al aumentar la TOD en el caldo de cultivo (en el rango de 0.5 a 5 %) se provocó un incremento en la máxima velocidad específica de crecimiento de la bacteria, alcanzándose una velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) de 0.20 h^{-1} , en los cultivos desarrollados al 5 % de TOD y 300 r.p.m. Por lo tanto, el incremento en el suministro de oxígeno, determina altas velocidades de crecimiento de *A. vinelandii*, mostrando que en cultivos de matraces, en el presente trabajo, el suministro de oxígeno al cultivo es limitante, en donde, se sabe que existe una relación directa entre el suministro de potencia con el k_{La} y ambos parámetros son altamente dependientes de la viscosidad aparente del caldo de cultivo.

5.3.4.2 Rendimiento como función de P/V inicial

La figura 5.9 presenta el efecto de la P/V inicial, en matraz y biorreactor, sobre el rendimiento de alginato en base a biomasa ($Y_{\text{p/x}}$). En biorreactor, a mayor P/Vi, el rendimiento $Y_{\text{p/x}}$ se incrementa. El mayor $Y_{\text{p/x}}$ (1.3) fue a la P/Vi de 0.27 W/L ; mientras que el $Y_{\text{p/x}}$ obtenido a 0.056 W/L fue parecido al obtenido en matraces agitados (pero con diferente suministro de potencia inicial). La figura 5.9 sugiere que el valor $Y_{\text{p/x}}$ permanece constante a mayor P/V inicial. Este comportamiento puede ser consecuencia, como se detallará más adelante, de la diferente evolución del suministro de potencia y mezclado durante el cultivo de *A. vinelandii*, en matraz y en biorreactor.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Priego *et al* (2001), quienes reportaron que el rendimiento $Y_{\text{p/x}}$ se incrementa conforme la máxima velocidad específica de crecimiento disminuye (en este caso, P/Vi está relacionado con $\mu_{\text{máx}}$, figura 5.8), independientemente de las condiciones de

cultivo (TOD, pH, velocidad de agitación, CO_2 etc). Los valores de $Y_{p/x}$ reportados por estos autores van desde 0.2 hasta 3.8, por lo que los valores $Y_{p/x}$ (0.6-1.3) reportados en el presente trabajo caen en la tendencia reportada por esos autores.

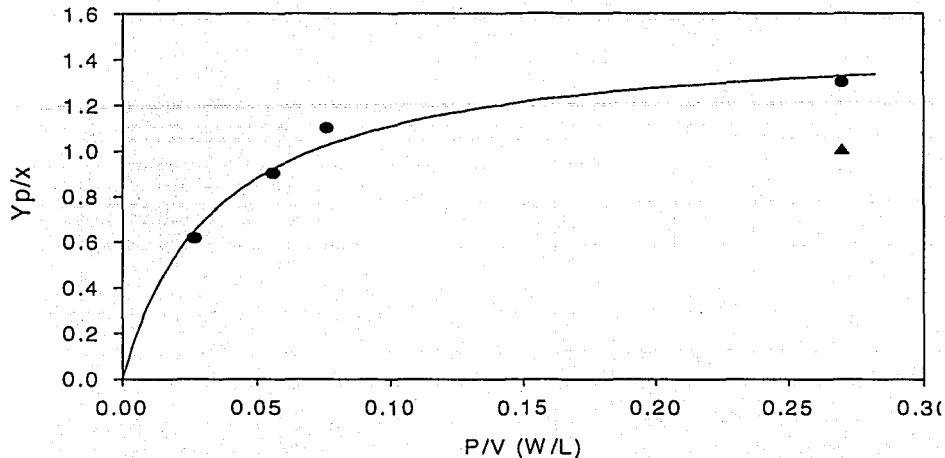


Figura 5.9 Rendimientos ($Y_{p/x}$) como función de la P/V inicial en cultivos de *Azotobacter vinelandii* desarrollados en (●) fermentador y (▲) matraz.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Priego *et al* (2001), quienes reportaron que el rendimiento $Y_{p/x}$ se incrementa conforme la máxima velocidad específica de crecimiento disminuye (en este caso, P/V_i está relacionado con $\mu_{m\acute{a}x}$, figura 5.8), independientemente de las condiciones de cultivo (TOD, pH, velocidad de agitación, CO_2 etc). Los valores de $Y_{p/x}$ reportados por estos autores van desde 0.2 hasta 3.8, por lo que los valores $Y_{p/x}$ (0.6-1.3) reportados en el presente trabajo caen en la tendencia reportada por esos autores.

5.3.4.3 Capacidad viscosificante como función de P/V inicial

La figura 5.10 muestra los perfiles de capacidad viscosificante de los caldos de los cultivos de *A. vinelandii* a varias potencias volumétricas iniciales en fermentador y aquel para matraces agitados bajo nuestras condiciones "estándar". La fermentación en biorreactor más parecida al perfil de capacidad

viscosificante del cultivo de matraz agitado, fue a una P/V inicial de 0.056 W/L, es decir, 180 r.p.m. Por su parte, las fermentaciones realizadas en biorreactor a P/Vi de 0.27 y 0.076 W/L, la capacidad viscosificante del alginato fue menor a la obtenida de los matraces agitados. En el cultivo llevado a una P/Vi de 0.027 W/L (140 r.p.m), el perfil de capacidad viscosificante de los cultivos en biorreactor fue superior al obtenido de los cultivos en matraces. Como se verá más adelante, la mayor capacidad viscosificante del alginato obtenido en biorreactor a una P/Vi de 0.027 W/L está asociado al PMP_{más} obtenido en cultivos de biorreactor.

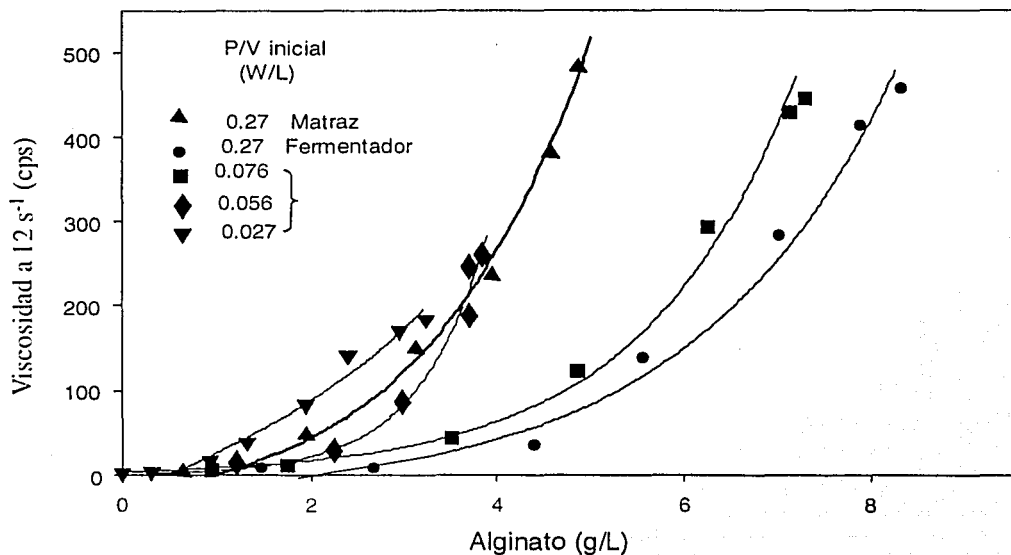


Figura 5.10 Relación entre la concentración de alginato y la viscosidad aparente de los caldos de *A. vinelandii* desarrollados en biorreactor a diferentes P/V's y en matraces a 0.27 W/L.

La capacidad viscosificante, en el presente trabajo resultó ser un parámetro clave para conocer la calidad del alginato sintetizado por *A. vinelandii* y como se verá más adelante, está relacionado con el PMP, es decir, a mayor PMP se tiene mayor capacidad viscosificante. Sin embargo, estudios previos, en biorreactores, no observaron generación de caldos viscosos por parte de los cultivos de *A. vinelandii* (Trujillo *et al*, 1999; Peña *et al*, 2000). No obstante que en cultivos de matraces convencionales, varios autores han reportado la generación de alta viscosidad aparente del caldo de cultivo (Chen *et al*, 1985; Peña *et al* 1997; Clementi *et al*, 1999).

5.3.4.4 Evolución del PMP como función de la P/V inicial

Por otra parte, se analizó el peso molecular promedio del alginato sintetizado por *A. vinelandii* en cultivos en matraz y biorreactor a las diferentes P/V's iniciales. La figura 5.11 muestra la evolución del PMP durante el transcurso de la fermentación, para las diferentes condiciones evaluadas. Para los cultivos en matraz, al inicio del cultivo (12 horas) se obtienen polímeros de 0.4×10^6 g/gmol y al final del cultivo (72 horas) se obtiene el máximo peso molecular promedio (1.9×10^6 g/gmol). En cultivos en biorreactor para el caso de $P/V_i = 0.076$ W/L, se observó que el máximo PMP alcanzado fue a las 36 horas de cultivo (1.55×10^6 g/gmol) logrando un PMP de 0.95×10^6 g/gmol al final del cultivo.

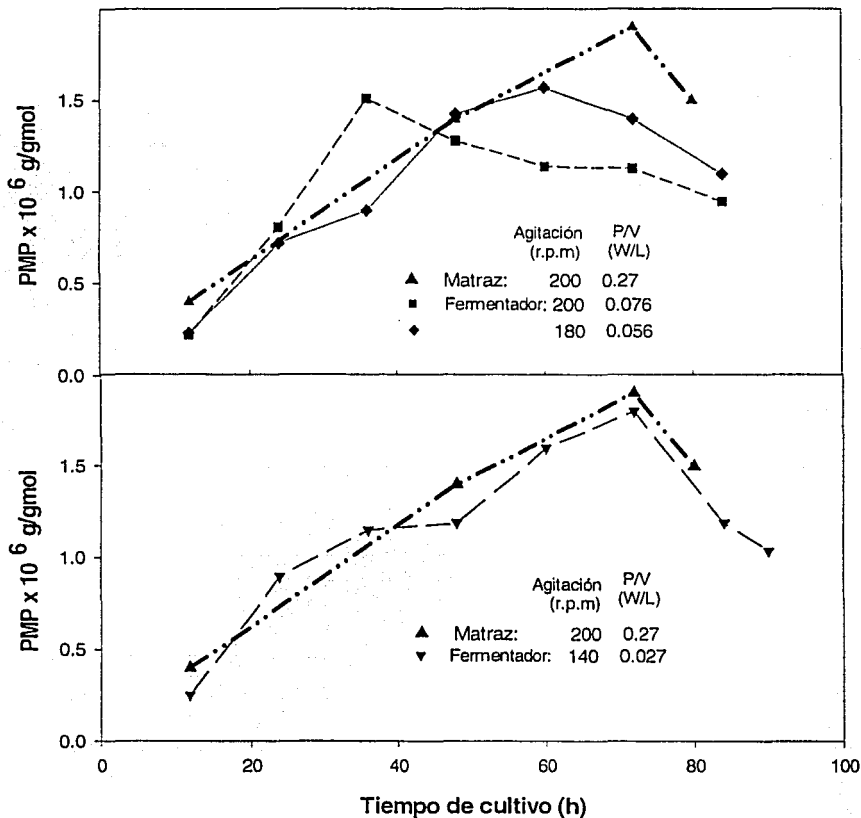


Figura 5.11 Evolución del peso molecular promedio del alginato durante el cultivo de *A. vinelandii*, a diferentes valores de P/V en fermentador y a 0.27 W/L en matraces.

Por otra parte, en los cultivos realizados a una P/V de 0.056 W/L, se obtienen alginatos de mayor $PMP_{m\acute{a}x}$ (1.6×10^6 g/gmol).

La **figura 5.11** muestra que altos valores del $PMP_{m\acute{a}x}$ de alginato en cultivos en biorreactor (similares a los obtenidos en matraces) se obtuvieron a una potencia inicial de 0.027 W/L (1.8×10^6 g/gmol). Estos resultados nos indican que fue posible obtener en condiciones de cultivo de biorreactor y a una P/V inicial de 0.027 W/L, alginatos de $PMP_{m\acute{a}x}$ similares a los obtenidos en cultivos de matraces, pero con un suministro de potencia inicial diez veces menor.

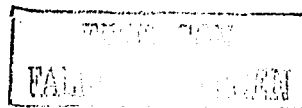
En cada una de las P/V iniciales probadas en biorreactor, de acuerdo a un análisis estadístico, el $PMP_{m\acute{a}x}$ del polímero sintetizado por *A. vinelandii* muestra que existen diferencias significativas (**tabla 5.3**) en cada una de la condiciones probadas, mostrando que la bacteria sintetiza alginatos de tamaño muy diferente dependiendo del suministro de potencia inicial. Ello indica que las condiciones hidrodinámicas, así como la calidad de mezclado y la transferencia de oxígeno conducen a la síntesis de alginatos de diferente $PMP_{m\acute{a}x}$.

Tabla 5.3. Comparación del $PMP_{m\acute{a}x}$ del alginato en biorreactor a diferentes P/V iniciales: Prueba de ANOVA: Tukey. $\alpha = 0.05$

Potencia, biorreactor (W/L)	N	1 0.27	2 0.076, 0.056	3 0.027
0.27	2	*	<i>Dif</i>	<i>Dif</i>
0.076	2	<i>Dif</i>	*	<i>Dif</i>
0.056	2	<i>Dif</i>	*	<i>Dif</i>
0.027	2	<i>Dif</i>	<i>Dif</i>	*

* No existe diferencia significativa, *Dif* = existe diferencia significativa

En la **figura 5.12** se observa que existe una relación directa de la velocidad máxima específica de crecimiento con el $PMP_{m\acute{a}x}$ del alginato sintetizado, ya sea en caldos de cultivo obtenidos en fermentador o en matraz. Esta relación había sido observada anteriormente por Priego *et al* (2001), quienes propusieron que existe una relación directa del $PMP_{m\acute{a}x}$ sintetizado con la máxima velocidad específica de crecimiento, no importando la condición que determina la $\mu_{m\acute{a}x}$. La relación directa entre



la velocidad de crecimiento y el $PMP_{\text{máx}}$ de alginato sintetizado no es afectada por las limitaciones de oxígeno que se tienen en el cultivo de matraz (figura 5.8), y todos los cultivos caen en una sola tendencia, indicando que las enzimas encargadas de la polimerización del alginato se pueden encontrar acopladas a la velocidad de crecimiento de *A. vinelandii*. Sin embargo, no se conoce el mecanismo fisiológico y molecular por el cual *A. vinelandii* sintetiza alginatos de alto peso molecular a bajas velocidades específicas de crecimiento.

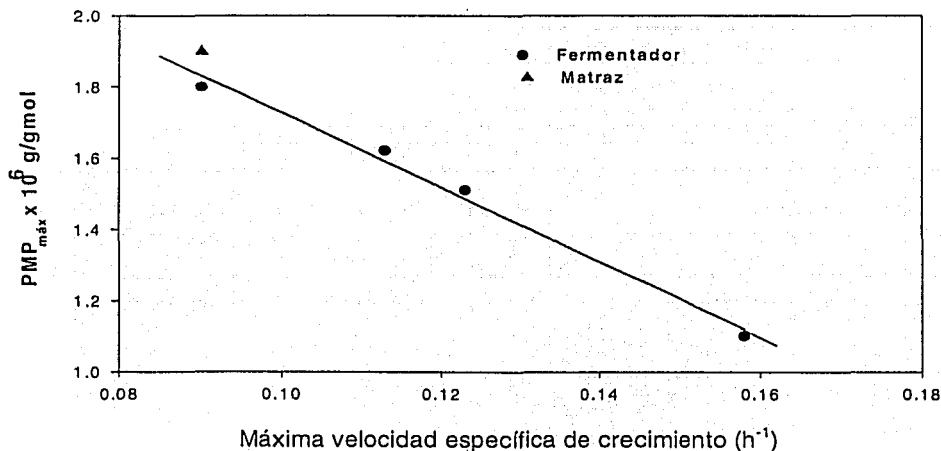


Figura 5.12 Relación entre la máxima velocidad específica de crecimiento de *Azotobacter vinelandii* y el peso molecular promedio máximo del alginato producido en cultivos de fermentador (●) y en matraz (▲).

5.3.4.5 Polidispersión del alginato como función de P/V inicial

La polidispersión de un polímero es un reflejo de la distribución de los pesos moleculares que se encuentran en una determinada muestra. Mientras menor sea el número de polidispersión, más moléculas del mismo peso molecular existirán en una población. La figura 5.13 muestra la polidispersión de los pesos moleculares del alginato sintetizado por *A. vinelandii*, bajo diferentes P/V's. En el cultivo "estándar" en matraces, la polidispersión del alginato tiene valores menores de 10, mientras que la fermentación realizada a la misma P/V (0.27 W/L), en fermentador, muestra valores de hasta 250 (a las 50 horas de cultivo). Esto indica que en cultivos en matraces, se producen familias más homogéneas de alginatos de pesos moleculares con respecto a lo que se obtiene en el fermentador.

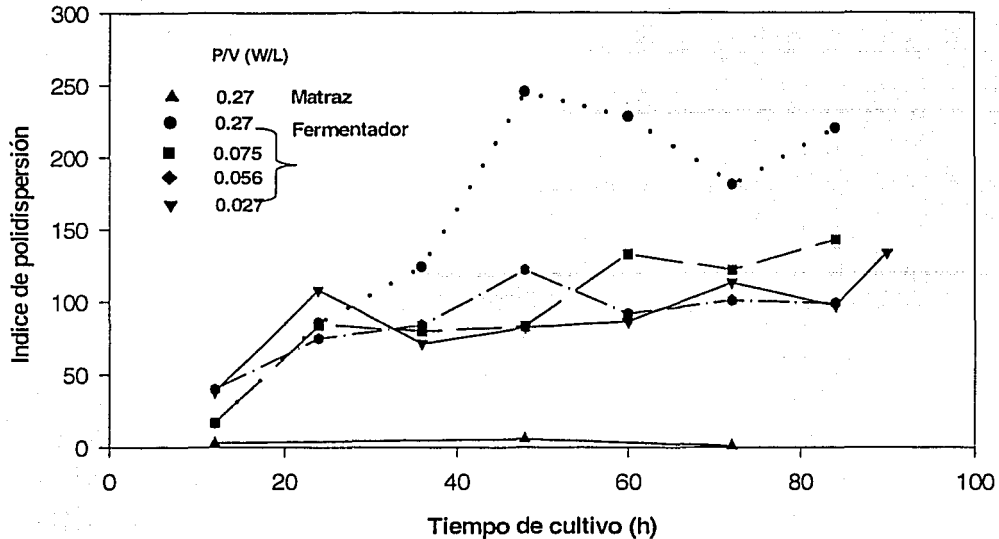


Figura 5.13 Índices de polidispersión de los alginatos sintetizados por *A. vinelandii* bajo diferentes condiciones de cultivo en fermentador y en matraz.

Por otra parte, en las fermentaciones realizadas en fermentador (0.27, 0.075, 0.056 y 0.027 W/L de P/V) los índices de polidispersión son bastante altos (desde 76 hasta 250) indicando que la distribución de familias de pesos moleculares es muy extensa y durante todo el cultivo se obtienen familias heterogéneas de pesos moleculares. Por lo tanto, si la polidispersión fuera una función objetivo del escalamiento de las condiciones del matraz, no se logra bajo ninguna de las condiciones probadas en biorreactor. En trabajos previos (Peña, 1998; Trujillo, 1999; Seañez, 1999; Peña *et al.*, 2000) se ha observado que bajo condiciones de TOD constante (3 % a 300 y 700 r.p.m) se obtienen índices de polidispersión similares (aprox. 10) a los obtenidos en matraces agitados bajo las condiciones "estándar" de este trabajo (200 r.p.m., 100 mL de volumen de trabajo, 2.5 cm de excentricidad). Esto sugiere que en cultivos de matraces, se tendría un perfil de TOD diferente al observado en cultivos de biorreactor durante la fermentación.

La polidispersión de los PMP de los alginatos obtenidos en biorreactor a pH y TOD libre es muy alta comparada con otros cultivos realizados anteriormente, en donde la TOD y el pH se mantuvieron

constantes durante todo el cultivo. Seañez (1999) encontró familias de alginatos con polidispersión de hasta 40, mientras que Peña (1998) reportó valores de polidispersión de 2 y 3. Los altos niveles de polidispersión de los alginatos obtenidos en biorreactor, podrían estar asociados a las diferentes concentraciones de oxígeno disuelto (figuras 5.2, 5.5, 5.6 y 5.7) que se presentan en los diferentes cultivos de *A. vinelandii* y posiblemente a condiciones no homogéneas de mezclado.

En cultivos en biorreactor en donde no se controla la TOD, en cada región del biorreactor, las células podrían estar expuestas a diferentes tensiones de oxígeno disuelto. Por ejemplo, en la zona cercana al impulsor (donde se esperaría que la TOD fuera máxima) o bien en zonas "muertas" (por ejemplo, entre los impulsores o atrás de los *baffles*), donde se esperaría que la TOD fuera muy baja (Galindo y Nienow, 1992). Esto podría provocar la síntesis de una amplia gama de familias de alginato. Recientemente, Trujillo-Roldán (2002) demostró que la tensión de oxígeno disuelto está estrechamente relacionada con la dispersión de los pesos moleculares de los alginatos. Cuando la TOD no se controla adecuadamente (alejado del *setpoint*) se hacen presentes varias familias de alginatos, es decir, aumentando su polidispersión.

5.3.4.6 Distribución de pesos moleculares del alginato como función de P/V inicial

Las figuras 5.14, 5.15, 5.16 y 5.17 muestran la distribución de los pesos moleculares a diferentes tiempos de cultivo, para todas las condiciones evaluadas de P/V en biorreactor. En todas las distribuciones se aprecia la existencia de dos familias de pesos moleculares bien definidas. A una P/V de 0.27 W/L. se presenta un incremento de la fracción de alto peso molecular hasta las 36 horas de cultivo, posteriormente, ésta disminuye. En los cultivos realizados a más bajas velocidades de agitación (200, 180 y 140 r.p.m.) existen comportamientos muy semejantes entre sí, con respecto a la distribución de pesos moleculares. En todas las condiciones evaluadas se observó, en las primeras horas de cultivo, un incremento en la fracción de alto peso molecular. Sin embargo, conforme el tiempo de cultivo fue mayor, la fracción de alto peso molecular disminuye y se incrementa la fracción de bajo peso molecular. Este comportamiento puede estar mediado por enzimas liasas que degradan el alginato en las etapas finales de la fermentación.

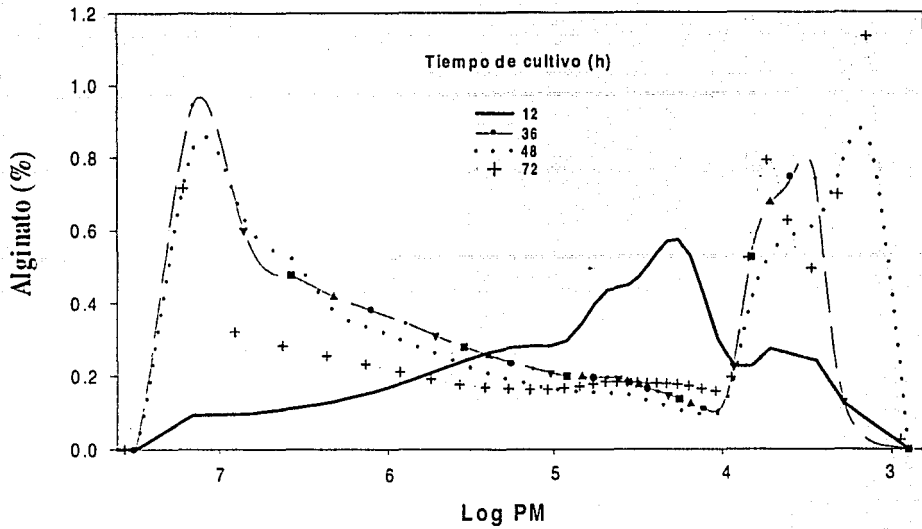


Figura 5.14 Distribución de pesos moleculares de alginatos sintetizados en fermentador a una potencia inicial de 0.27 W/L.

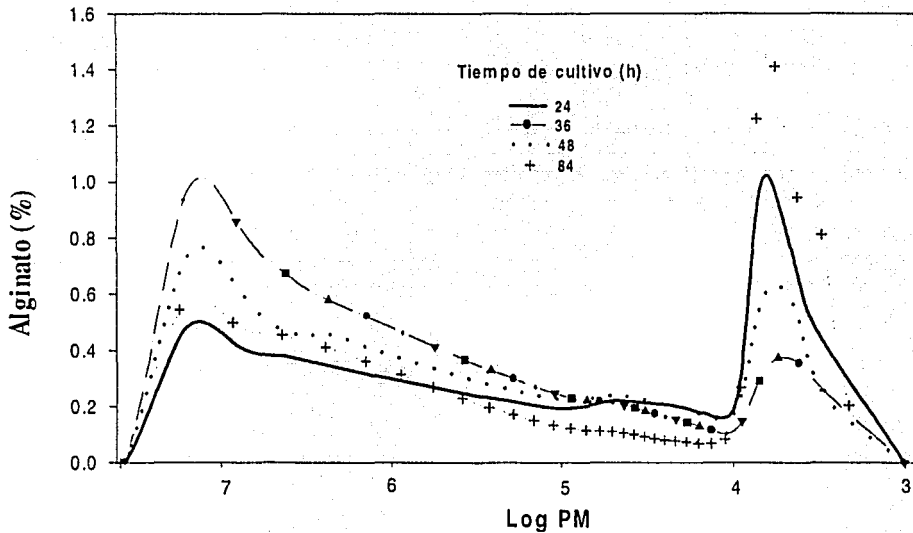


Figura 5.15 Distribución de pesos moleculares de alginatos sintetizados en fermentador a un consumo de potencia inicial de 0.076 W/L.

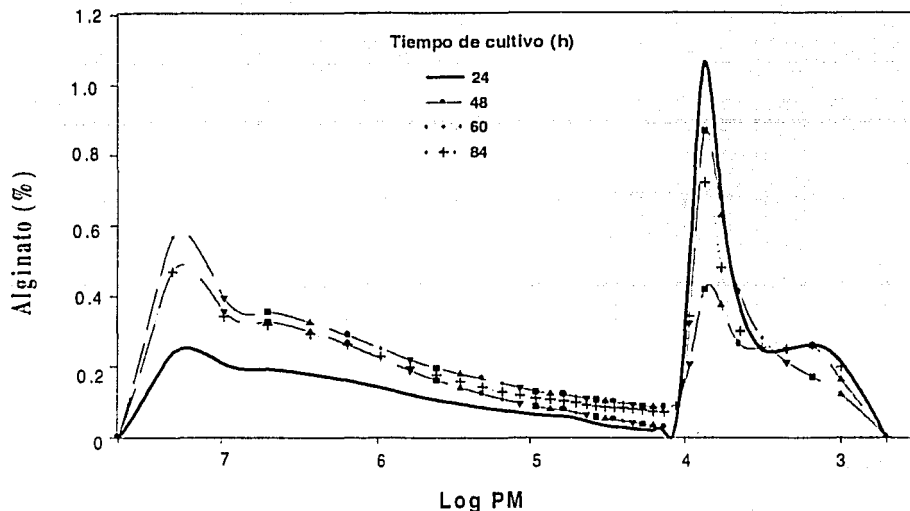


Figura 5.16. Distribución de pesos moleculares de alginatos sintetizados en fermentador a una potencia inicial de 0.056 W/L.

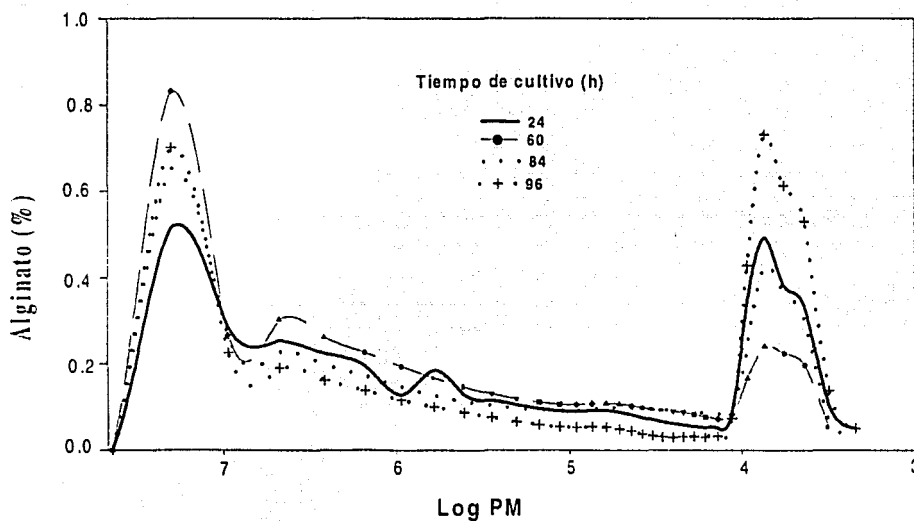
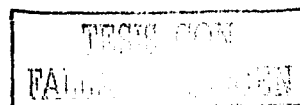


Figura 5.17 Distribución de pesos moleculares de alginatos sintetizados en fermentador a un consumo de potencia inicial de 0.027 W/L.



5.4 Suministro de potencia en matraces y fermentador a altas viscosidades

Debido al desarrollo de altas viscosidades aparentes del caldo de cultivo, tanto en matraz (condiciones "estándar") como en biorreactor, a P/V inicial de 0.27 W/L, se estudió el comportamiento del suministro de potencia durante la producción de alginato. Con el propósito de explicar el porqué no se lograron las funciones objetivo durante el escalamiento, es decir, obtención de altos pesos moleculares promedio y capacidad viscosificante del alginato, utilizando como criterio de escalamiento el suministro específico de potencia.

Para ello, en biorreactor, se utilizaron soluciones de alginato de *Macrocystis pyrifera*, donde el suministro de potencia se determinó directamente a través de un dinamómetro (ver sección 4.3.2 de Antecedentes). La figura 5.18 muestra el suministro de potencia gaseada bajo cada una de las velocidades de agitación. La potencia decrece hasta 0.15 W/L conforme se incrementa la viscosidad (hasta 260 cps). Anteriormente, Büchs *et al* (2000a) demostraron que en matraces el consumo volumétrico de potencia se encuentra en valores del orden del de biorreactores agitados. Para las otras condiciones evaluadas en biorreactor (200, 180 y 140 r.p.m.), el suministro de potencia se mantiene prácticamente constante (figura 5.18), ya sea en líquidos de baja o alta viscosidad.

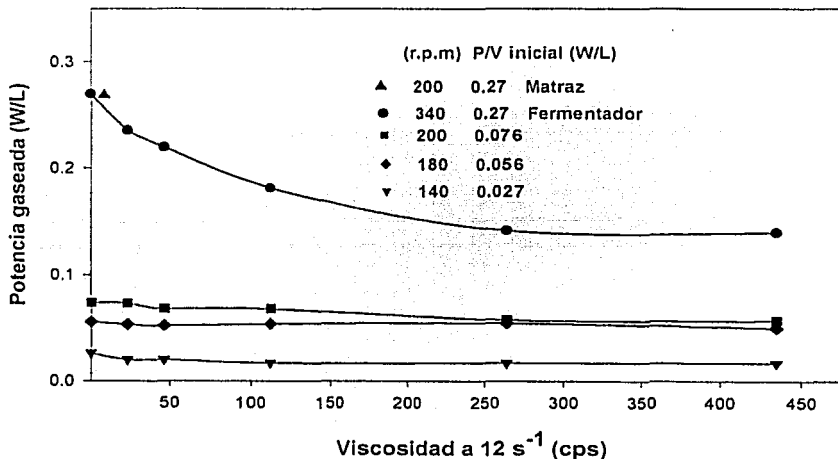


Figura 5.18. Suministro de potencia en biorreactor a diferentes velocidades de agitación y viscosidad aparente en soluciones de alginato de *M. pyrifera* (aireación = 0.8 VVM).

Por ejemplo, en el caso de 140 r.p.m., el suministro de potencia fue de 0.027 W/L al inicio del cultivo y posteriormente la potencia se mantuvo en 0.026 W/L al incrementar la viscosidad (hasta 450 cps).

En biorreactores, las caídas de potencia en sistemas aireados son debidas a las cavidades de aire que se forman detrás de los impulsores, tales como las turbinas Rushton. Hudcova *et al* (1989) reportan que conforme aumenta la velocidad del impulsor se generan cavidades más grandes y estables, provocando una compartimentalización del reactor debido a la formación de "cavernas". Como consecuencia, con los fluidos viscosos se presentan mayores caídas de potencia que con los fluidos de baja viscosidad, a la misma velocidad de agitación. Galindo *et al* (1998) reportaron que para caldos simulados de la fermentación para la producción de goma xantana, a mayor concentración del polímero, más significativa es la caída de potencia por el efecto de la aireación.

En matraces Erlenmeyer, bajo nuestras condiciones "estándar" (200 r.p.m., 100 mL de volumen de trabajo, 2.5 cm de excentricidad) el consumo de potencia inicial fue de 0.27 W/L, a viscosidades similares a las del agua. En este caso, las condiciones se encuentran "en fase", es decir, las condiciones en las que el líquido sigue el movimiento de la agitadora y la altura del líquido en el matraz no cae (Büchs *et al*, 2000b). Sin embargo, al incrementar la viscosidad del caldo de cultivo, la altura del líquido disminuye y, como consecuencia, el suministro de potencia es menor, ya que el líquido del matraz cae en "fuera de fase". Büchs *et al* (2001) observaron que en matraces agitados con volumen nominal menor a 1 L y a altas viscosidades de fluidos Newtonianos, se dan condiciones que ponen al sistema en "fuera de fase". En cultivos donde se desarrollan altas viscosidades, como el caso de *A. vinelandii*, el suministro de potencia disminuye significativamente. Tales condiciones de "fuera de fase" podrían ser la razón por la que no fue posible escalar nuestras funciones objetivo de la fermentación de alginatos, de matraz a biorreactor, ya que este fenómeno tiene implicaciones en la transferencia de oxígeno y en la intensidad de mezclado, los cuales también pueden disminuir significativamente.

En este contexto, Büchs *et al* (2000b) demostraron que en matraces de 250 mL con un volumen de 25 mL, agitados a 200 r.p.m. se tienen valores de *número de fase* (*Ph*) de 2.61 (P/V de 0.38 W/L), a viscosidades similares a la del agua. Sin embargo, el *Ph* disminuye conforme se incrementa la viscosidad (a partir de 17 cps, para fluidos Newtonianos) y el sistema cae en "fuera de fase". Para

valores superiores a 1.26 de Ph , la potencia consumida por el líquido del matraz no disminuye. Sin embargo, para viscosidades de 75 y 135 cps, el Ph tiene valores de 0.83 y 0.59, respectivamente. Estos autores encontraron que la caída de potencia para fluidos Newtonianos, respecto al suministro de potencia con agua, cae alrededor de 6-7 veces, para viscosidades del orden de los 500 cps (figura 5.19).

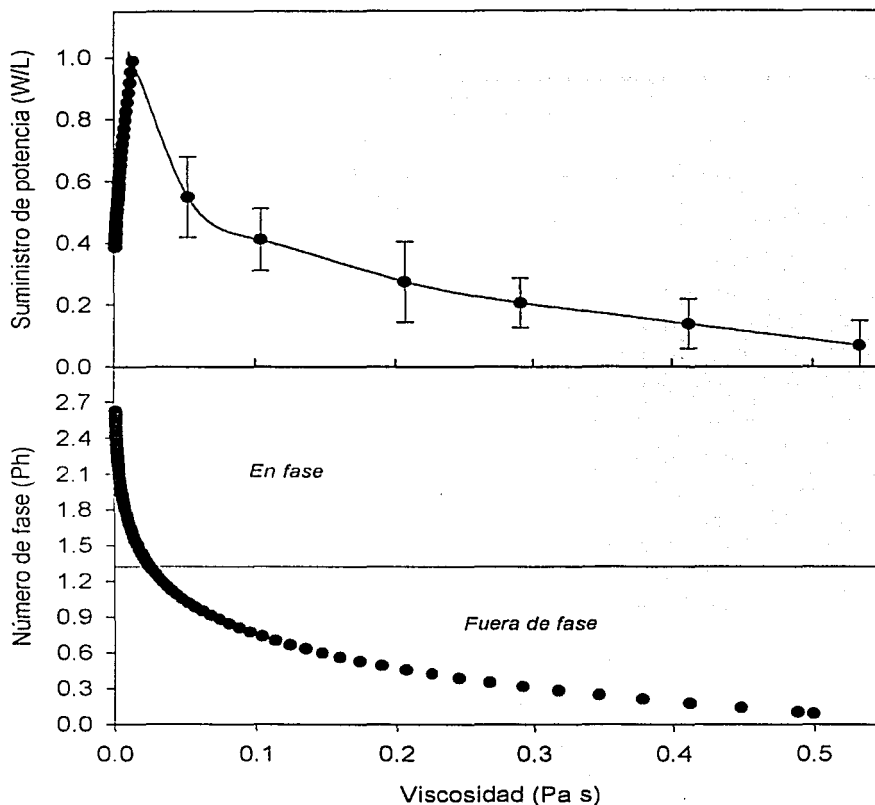


Figura 5.19. Suministro de potencia y números de fase (Ph) para fluidos Newtonianos en matraces de 250 mL con 25 mL de volumen de llenado, agitados a 200 r.p.m (Büchs *et al*, 2000b).

Las propiedades reológicas del alginato (n y K) (figura 5.20) fueron medidas usando soluciones de alginato de algas marinas (*Macrocystis pyrifera*). El comportamiento reológico se determinó a diferentes concentraciones de alginato y velocidades de corte (de 3 a 700 s^{-1}) y mostró que todas las dispersiones acuosas exhibieron una típica conducta pseudoplástica que puede ser descrita por el

modelo de Ostwald de Waele (Clementi *et al*, 1998). Este mismo comportamiento ha sido reportado para otros polisacáridos microbianos, como la goma xantana (Galindo y Torrestiana, 1989).

Esto significa que las características de flujo del alginato cambian en función de la posición que guarden respecto a la zona de los impulsores (zonas de alta velocidad de deformación). El fluido tendrá una baja viscosidad en las zonas aledañas a los impulsores. Por el contrario, en las zonas alejadas de éstos (cerca de las paredes del biorreactor), la velocidad de deformación aplicada al fluido será menor, originando un aumento notable en la viscosidad (Doran, 1998). El índice de consistencia (K) aumenta conforme se incrementó la concentración de alginato, mientras que el índice de flujo (n) decrece, mostrando un comportamiento típico de fluidos pseudoplásticos (figura 5.20).

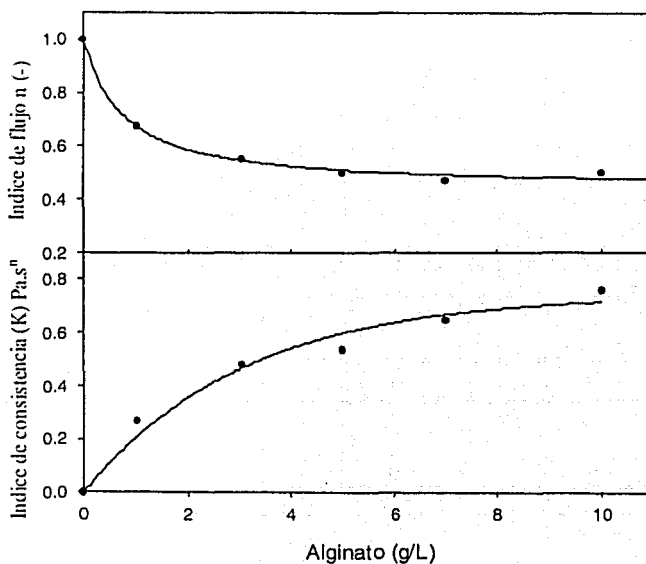


Figura 5.20. Índice de flujo (n) e índice de consistencia (K) de soluciones de alginato de *Macrocystis pyrifera* en función de su concentración, determinados a velocidades de corte de 3 a 700 s^{-1} .

Para el caso del alginato, el cual es un polímero que en solución se comporta como un fluido no-Newtoniano, la caída de potencia y por ende el número de fase no es posible conocerlo, ya que no se conoce la viscosidad que sensan las paredes del matraz, es decir, no se conoce cual es la velocidad de corte causado por la agitación del matraz. Sin embargo, Fujita *et al* (1994) han reportado

velocidades de deformación de 50 s^{-1} en la formación de *pellets* de *Aspergillus niger* en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con 100 mL de volumen de cultivo, agitados a 200 r.p.m.

Para nuestro caso, como una primera aproximación, se supuso una velocidad de corte entre 12 y 80 s^{-1} , para estimar cuando el cultivo cae en "fuera de fase", y por ende, la caída de potencia es pronunciada durante el cultivo de *A. vinelandii* en matraces agitados bajo nuestras condiciones "estándar". La figura 5.21 muestra la viscosidad de alginato comercial de algas de *Macrocystis pyrifera* a varias velocidades de deformación determinadas en un reómetro. A una velocidad de corte de 12 s^{-1} se tienen viscosidades de 500 cps, con 6 g/L, mientras a una velocidad de corte de 80 s^{-1} , la viscosidad es de 220 cps.

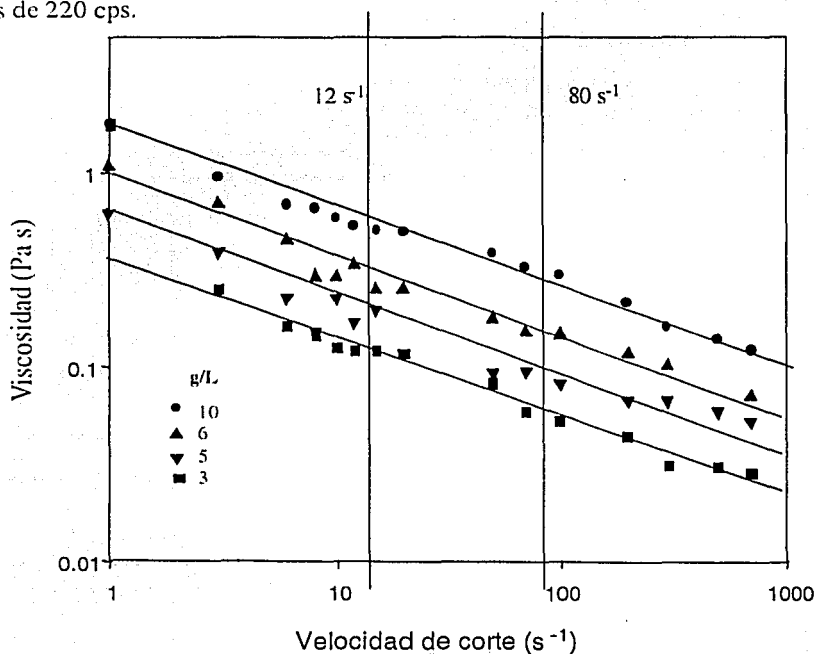


Figura 5.21 Relación de la velocidad de corte con la viscosidad en reómetro (DIN125) para alginato de soluciones de algas marinas: *Macrocystis pyrifera*.

Como se muestra en la figura 5.22, el proceso cae en "fuera de fase" a partir de los 20 cps, lo cual corresponde a las primeras 20-24 horas de cultivo, indicando el inicio de la caída en el suministro de potencia. Al final del cultivo, a una velocidad de corte de 80 s^{-1} , la potencia cae de 2.5-3.5 veces, con

respecto a la potencia inicial suministrada (0.27 W/L). Sin embargo, en el caso de una velocidad de corte de 12 s^{-1} , el suministro de potencia cae hasta 6-7 veces al término de la fermentación.

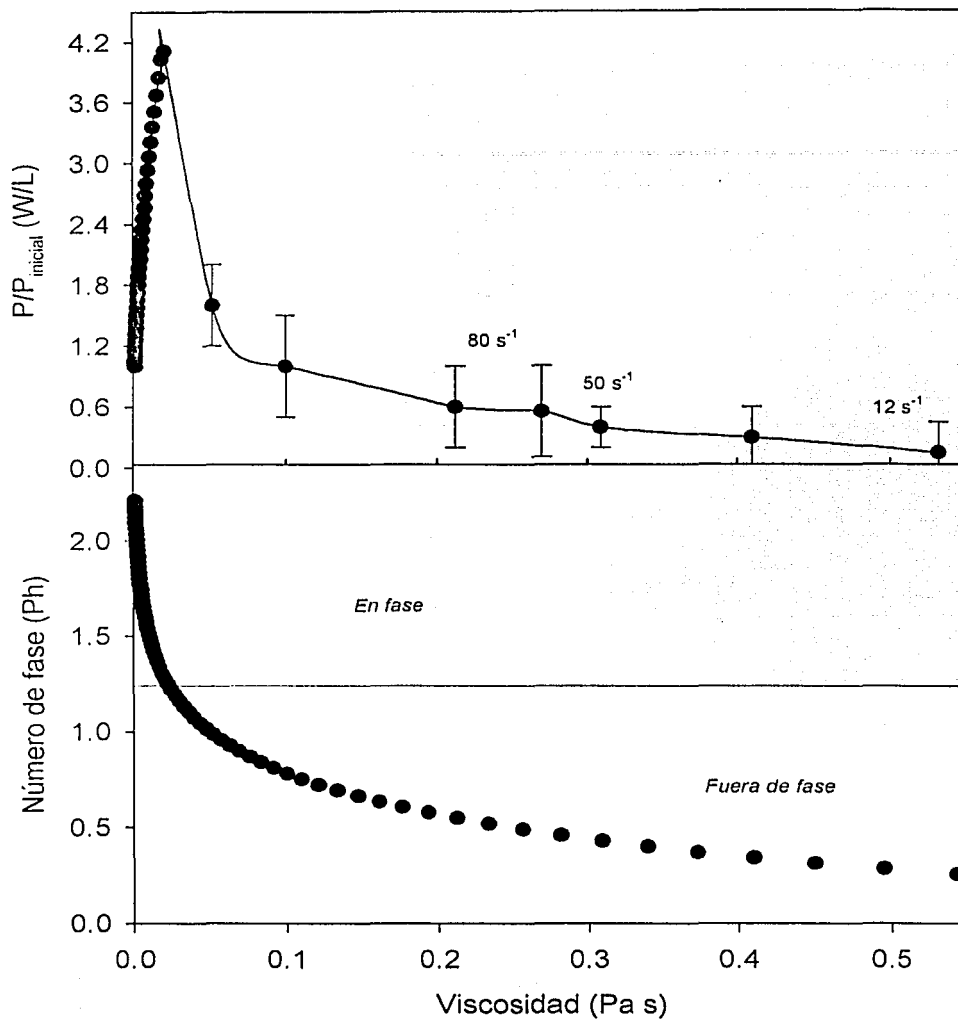


Figura 5.22. Caída de potencia y del número de fase (Ph) de cultivos de *A. vinelandii* en matraces de 500 mL (100 mL de volumen de llenado, 2.5 cm de excentricidad y 200 r.p.m), a velocidades de corte de 80 y 12 s^{-1} .

El fenómeno de "fuera de fase", en cultivos de *A. vinelandii*, tuvo implicaciones en el $PMP_{m\acute{a}x}$ del alginato sintetizado. En la **figura 5.23** se observa que los cultivos realizados a P/V inicial de 0.27 W/L, tanto en matraz como en fermentador, difieren, ya que el $PMP_{m\acute{a}x}$ obtenido en matraz no cae en la tendencia de aquellos obtenidos en fermentador a diferentes P/V iniciales. En biorreactor se obtienen alginatos con $PMP_{m\acute{a}x}$ similares a los obtenidos en cultivos de matraz, pero a potencias iniciales de un orden de magnitud menores (0.027 W/L). Ello sugiere una caída de la potencia en el cultivo de matraz, posiblemente en el rango de las potencias consumidas por el caldo de cultivo en biorreactor a 140 o 180 r.p.m (0.027-0.056 W/L), ya que a esas P/V's iniciales se sintetizan alginatos, en cultivos de biorreactor, con $PMP_{m\acute{a}x}$ de 1.6×10^6 g/gmol hasta 1.8×10^6 g/gmol, los cuales son muy parecidos a los alginatos sintetizados en cultivos de matraces.

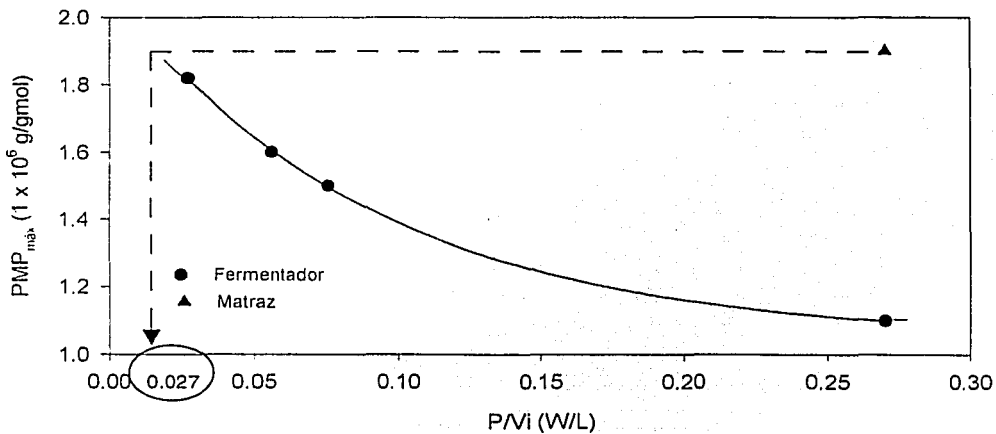


Figura 5.23. $PMP_{m\acute{a}x}$ del alginato como función de la potencia volumétrica en biorreactor (●) y en matraz (▲).

Si la velocidad de corte causado por la agitación del matraz (200 r.p.m) fuera de 12 s^{-1} , la caída en el suministro de potencia explica satisfactoriamente el comportamiento del $PMP_{m\acute{a}x}$ del alginato, en relación a la P/V inicial del caldo de cultivo (**figura 5.22**), ya que el suministro de potencia puede caer hasta 6-7 veces, en relación a la P/V inicial de 0.27 W/L. Pero si la velocidad de corte en el matraz fuera de 50 s^{-1} , tal y como lo reporta Fujita *et al* (1994), la caída de potencia no explicaría por completo los altos pesos moleculares del alginato sintetizado en matraz, operado a nuestras condiciones "estándar", ya que la potencia caería solamente entre 3-3.5 veces, en relación a la potencia inicial.

La posible explicación puede ser la diferente hidrodinámica en los cultivos de matraces y biorreactor durante el cultivo. En este sentido, Gerson y Kole (2001) reportaron un nuevo método para medir la intensidad de mezclado, es decir, la intensidad y frecuencia de los remolinos en un área determinada en líquidos de matraces y biorreactor. Este método está basado principalmente en un dispositivo que sensa los movimientos del fluido durante el mezclado. Estos autores demostraron que la intensidad del mezclado, utilizando agua, se incrementa conforme se aumenta la velocidad de agitación en matraces (1 L de volumen nominal con 540 mL de volumen de llenado) y biorreactor, pero al adicionarle 1 % de dextrana en ambos sistemas (viscosidad de 10 cps, medida a 12 s^{-1}), la intensidad de mezclado en el líquido del matraz decaía. Estos autores postulan que el incremento de la concentración de la dextrana y por ende en la viscosidad del líquido del matraz, la mayoría del líquido tiende a reunirse en los bordes del matraz y este experimenta la mayor fuerza centrípeta, pero tiene un comportamiento de flujo laminar, más que como un líquido que fluya libremente, resultando en menor turbulencia y por lo tanto, en menor intensidad de mezclado.

Por su parte, Delgado *et al* (1989) caracterizó la transferencia de oxígeno en matraces Erlenmeyer agitados (en matraces de 500 mL con 25 mL de volumen de trabajo) utilizando un método biológico, el cual se basa en el cultivo de *Bacillus subtilis*. Este microorganismo es muy sensible en cuanto a la producción de sus metabolitos, acetoina (Ac) y butanodiol (Bu) dependiendo de las características de mezclado y oxigenación del sistema. Cuando el sistema está bien oxigenado, la concentración de acetoina es mayor que la de butanodiol. La adición de goma xantana al 0.2 % (viscosidad menor de 10 cps, medida a una velocidad de corte de 12 s^{-1}) produjo condiciones de mezclado y limitación de oxígeno, abatiendo la relación Ac/Bu, hasta 4 veces, en la presencia del viscosificante. Esto indicaría que en los cultivos de *A. vinelandii* se podrían tener pobres condiciones de transferencia de oxígeno desde el inicio del cultivo, en matraces operados a nuestras condiciones "estándar".

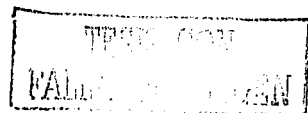
Maier y Büchs (2001) caracterizaron la transferencia de oxígeno en la interfase gas-líquido, en matraces. Estos autores propusieron un modelo para determinar el área de intercambio específico (a) en la interfase gas-líquido de matraces y demostraron que la mayor transferencia de oxígeno se lleva a cabo en la película de las paredes del matraz y no en la superficie del líquido. Por ejemplo, para matraces de 250 mL de volumen nominal, 26 mL de volumen de llenado, excentricidad de 5 cm, agitados a 200 r.p.m., más del 70 % de la transferencia de oxígeno se lleva a cabo en la película de

líquido que se encuentra en las paredes del matraz, concordando con lo argumentado anteriormente por Gaden (1962) y apoyando la teoría de penetración de oxígeno dada por Higbie (1935), en donde la velocidad de absorción de oxígeno es dependiente en la frecuencia de reemplazamiento de la película del líquido en la pared del matraz. Este hecho tiene relevancia importante para los cultivos de *A. vinelandii*, ya que cuando el fluido del matraz entra en "fuera de fase", la altura del líquido disminuye y por ende abate la velocidad de transferencia de oxígeno, y por lo tanto, el k_{La} decrecería significativamente ya que el área (a) de intercambio específico de oxígeno sería menor.

Podemos concluir que los valores iniciales del suministro de potencia y, por lo tanto el k_{La} (como se sabe existe una relación directa entre la P/V y el k_{La}), así como su evolución durante el cultivo debido a las altas viscosidades aparentes, tienen un fuerte impacto en la calidad del alginato producido por *A. vinelandii*. El suministro de potencia tiene un fuerte impacto en la máxima velocidad de crecimiento y a la vez el $PMP_{m\acute{a}x}$ depende de la $\mu_{m\acute{a}x}$ (figura 5.12).

5.5 Cultivos en biorreactor en "fuera de fase"

Con el propósito de obtener similar capacidad viscosificante y $PMP_{m\acute{a}x}$ de alginato en cultivos de biorreactor, como aquellos sintetizados en matraz operados a nuestras condiciones "estándar" y a la vez simular el fenómeno "fuera de fase", que ocurre en matraces, se llevó a cabo otro experimento, en el biorreactor. En este caso, se disminuyó la velocidad de agitación (desde 340 r.p.m. hasta 90 r.p.m.), es decir, P/V de 0.27 W/L hasta 0.02 W/L, basado en el comportamiento del $PMP_{m\acute{a}x}$ de la figura 5.23, la cual sugiere que el suministro de potencia en cultivos de matraces, puede caer hasta en un orden de magnitud (de 0.27 a 0.027 W/L). El perfil del suministro total de potencia (5.23 W/L.h) en biorreactor se basó en los resultados obtenidos de los cultivos a suministro de potencia inicial de 0.056 W/L (potencia total de 5.23 W/L.h), ya que ésta condición simuló mejor el perfil de capacidad viscosificante y el $PMP_{m\acute{a}x}$ del alginato obtenido en cultivo de matraz. La figura 5.24 muestra el perfil del suministro de potencia en el biorreactor en "fuera de fase".



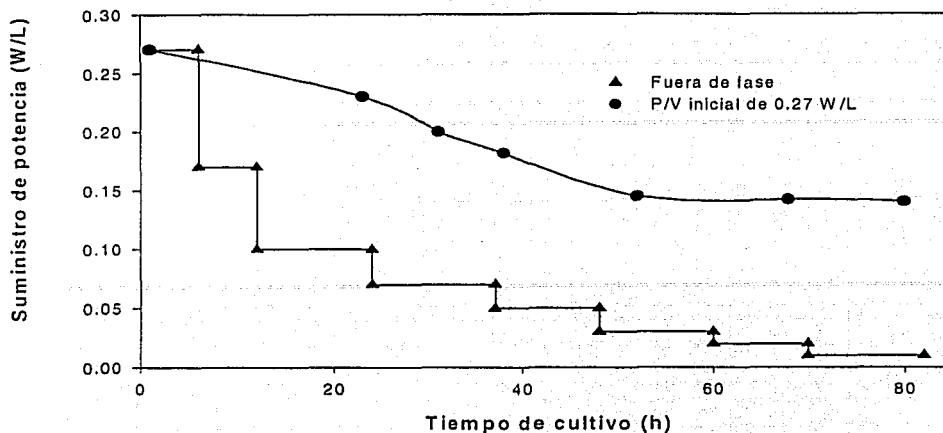


Figura 5.24 Perfil del suministro de potencia gaseada (en "fuera de fase") del biorreactor.

La figura 5.25 muestra las cinéticas de los cultivos. La TOD siguió un comportamiento similar a lo obtenido en los cultivos anteriores a diferentes P/V's iniciales. La TOD cayó a valores menores a 1 % después de las 10 horas de cultivo y ésta se incrementó hasta 40 % en la fase estacionaria del cultivo. La máxima concentración de alginato fue de 4.1 g/L y menor a la obtenida en matraces (5.3 g/L). El pH cayó a valores de 5.9 al final del cultivo. La viscosidad máxima alcanzada del cultivo fue de solamente 182 cps, la cual es mucho menor si se le compara con los cultivos de matraces (520 cps).

La función objetivo del presente trabajo, es decir, el perfil de capacidad viscosificante de los alginatos obtenidos en el cultivo "fuera de fase" del fermentador, fue similar a la obtenida en los cultivos de matraces agitados (figura 5.26). En biorreactor, a similar suministro de potencia inicial que en matraces agitados (0.27 W/L), el alginato mostró un perfil diferente de capacidad viscosificante, indicando una menor calidad del alginato sintetizado bajo tales condiciones. Los cultivos en biorreactor en "fuera de fase" mostraron una velocidad máxima específica de crecimiento (0.09 h^{-1}) y perfil de capacidad viscosificante del alginato fue parecida a la obtenida en matraces agitados. Estas diferencias son debidas, como se verá más adelante, al $\text{PMP}_{\text{máx}}$, índice de polidispersión y concentración del alginato sintetizado por la bacteria bajo cada una de éstas condiciones.

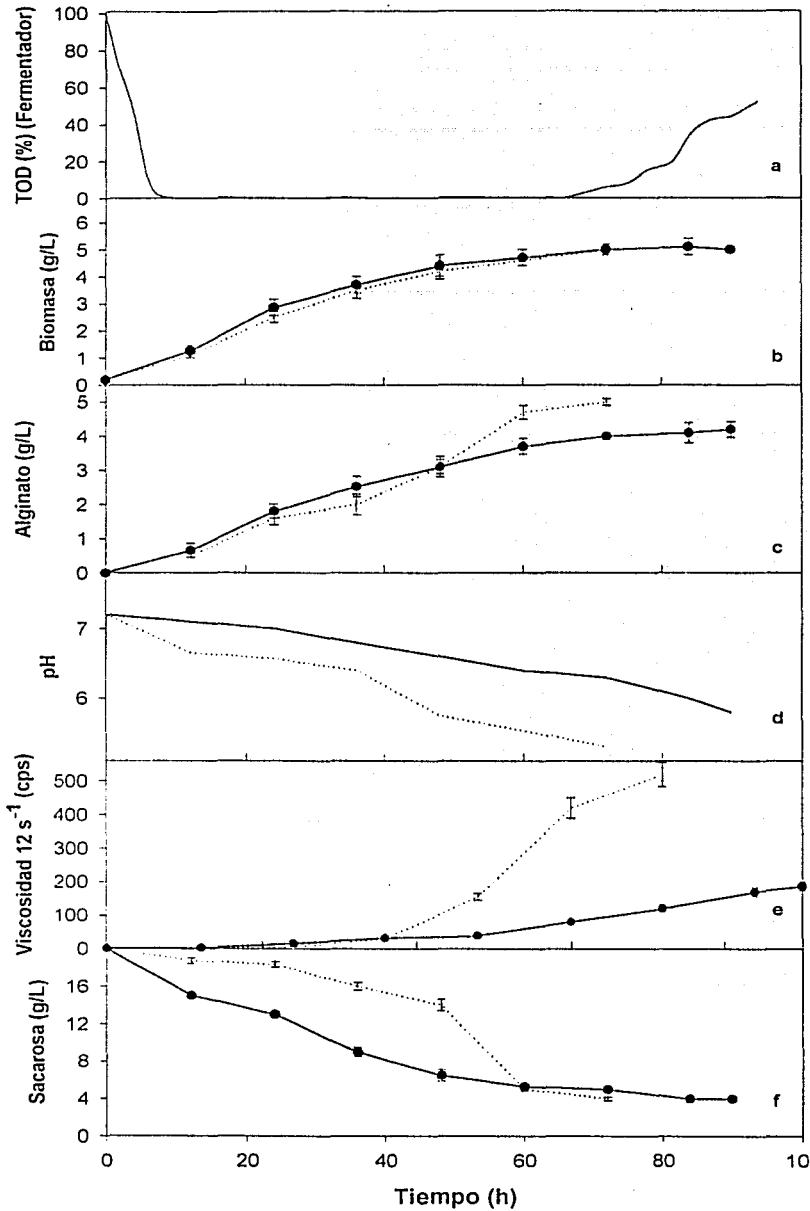


Figura 5.25. Evolución del oxígeno disuelto (a), biomasa (b), alginato (c), pH (d), viscosidad aparente (e) y sacarosa (f) por *A. vinelandii* en (●) fermentador ("fuera de fase") y en matraz (---, tomado de la figura 5.1).

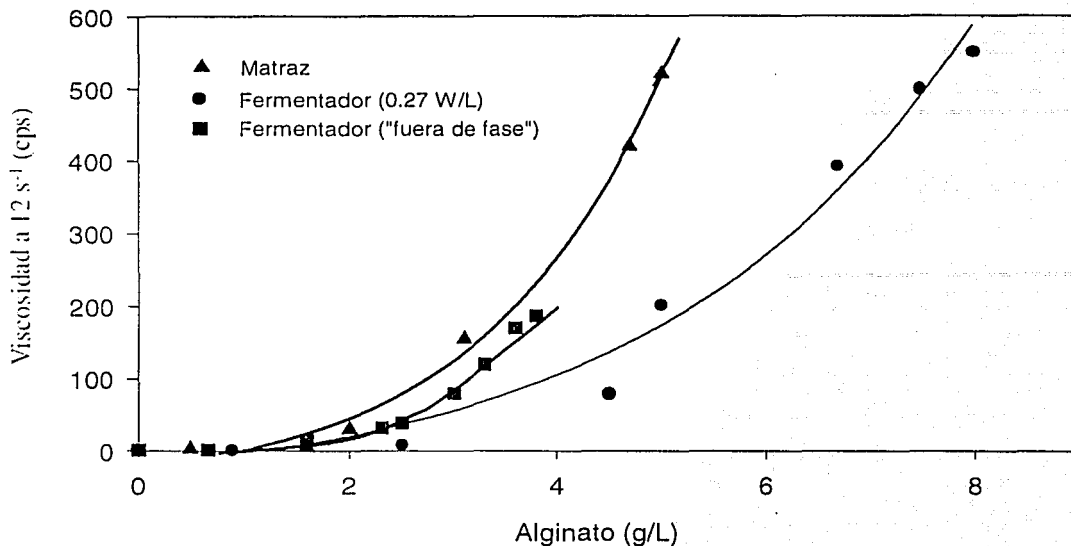


Figura 5.26. Relación entre la concentración de alginato y la viscosidad de los caldos de *A. vinelandii* desarrollados en matraz (▲) y fermentador (●) a 0.27 W/L, comparados con cultivos en “fuera de fase” en biorreactor (■).

La figura 5.27 muestra la evolución del PMP del alginato sintetizado por *A. vinelandii* en el cultivo “fuera de fase” en el biorreactor. El PMP del polímero en los cultivos de matraces y el cultivo en “fuera de fase” del biorreactor fue similar durante las primeras 50 horas de cultivo (1.4×10^6 g/gmol), indicando que fue posible sintetizar alginatos de igual PMP. Sin embargo, se observa una caída drástica del $PMP_{m\acute{a}x}$ al final del cultivo. La síntesis de la enzima alginato-liasa, la cual degrada al alginato, puede ser la responsable de la caída del PMP. Aunque no se sabe cual es la señal ambiental que induce la síntesis de la liasa, varios estudios indican que puede estar controlado por la TOD en el caldo de cultivo (Peña *et al*, 2000; Trujillo, 1999; Trujillo-Roldán, 2001). A pesar de que no se sintetizaron alginatos de similar $PMP_{m\acute{a}x}$ a los obtenidos en matraces agitados, se logró obtener alginatos de PMP similares en gran parte del cultivo, excepto al final de la fermentación.

Con en cultivo en biorreactor en “fuera de fase” fue posible obtener alginatos en biorreactor con características similares de $PMP_{m\acute{a}x}$ y capacidad viscosificante, a las obtenidas en matraces, basado

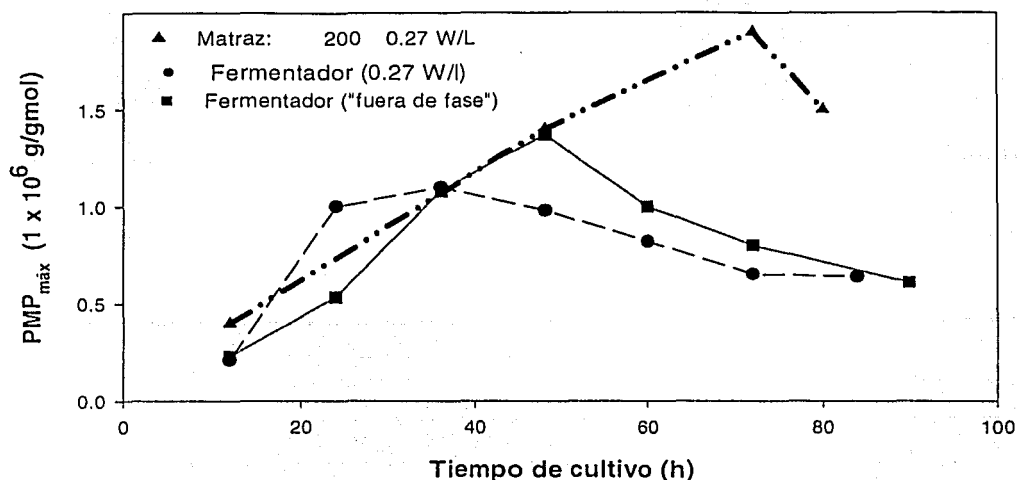


Figura 5.27. Evolución del peso molecular promedio del alginato durante el cultivo de *A. vinelandii*, en matraz y fermentador (0.27 W/L) y de fermentador en "fuera de fase".

en la disminución del suministro de potencia en biorreactor. Confirmando que el suministro de potencia inicial en matraces con cultivos de *A. vinelandii*, operados a nuestras condiciones "estándar", puede caer hasta en un orden de magnitud, teniendo serias implicaciones en el escalamiento, de matraz a biorreactor, de la producción de alginatos. Sin embargo, el índice de polidispersión de los alginatos sintetizados por la bacteria en el cultivo en "fuera de fase" en biorreactor, fue bastante alto (60-130) al compararlo con el alginato sintetizado en matraces (3-10). En la figura 5.28 se muestra que, en los cultivos en biorreactor, todos los alginatos mostraron altos índices de polidispersión, ya sea con alto o bajo valor de suministro de potencia inicial o en "fuera de fase". Tomando como criterio esta función objetivo no se logró un escalamiento exitoso.

El escalamiento de la producción de alginato, de matraz a biorreactor, usando como criterio de escalamiento el suministro específico de potencia no condujo a la obtención de altos pesos moleculares promedio, aunque la viscosidad del caldo de cultivo fue similar. El problema fundamental, en matraces agitados, es el cambio drástico del suministro de potencia durante el cultivo de *A. vinelandii* causado por la generación de altas viscosidades, lo que provoca un abatimiento del suministro de potencia. Este fenómeno de "fuera de fase", con cultivos de microorganismos, no se ha reportado en la literatura, a pesar de tener serias implicaciones en

ejercicios de escalamiento, de matraz a biorreactor, como en el caso de *A. vinelandii* en la producción de alginato.

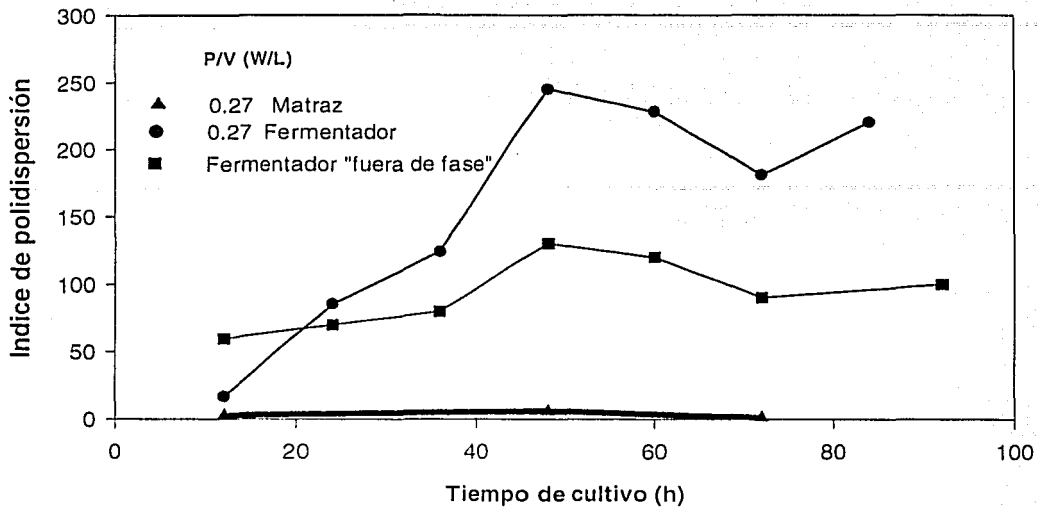


Figura 5.28. Índices de polidispersión de los alginatos sintetizados por *A. vinelandii* en matraz y biorreactor a P/V inicial similar y en biorreactor en "fuera de fase".

Capítulo VI

6.1 Conclusiones

- El suministro de potencia inicial, como criterio de escalamiento de matraz a fermentador, no reproduce la conducta de cultivo (particularmente el peso molecular promedio).
- Lo anterior puede ser explicado por las diferencias drásticas en la evolución del consumo de potencia durante el cultivo de *A. vinelandii* en matraz y en fermentador.
- Reduciendo el suministro de potencia en el fermentador fue posible obtener $PM_{P_{máx}}$ del alginato similares al obtenido en matraces agitados.
- El escalamiento, de matraz a fermentador, para cultivos que generan altas viscosidades (*i.e.* hongos filamentosos y microorganismos productores de polisacáridos) tiene que considerar el fenómeno de "fuera de fase", lo que causa cambios hidrodinámicos (OTR, $k_L a$, número de Reynolds) y tiene importantes consecuencias en la síntesis de alginato por *A. vinelandii*.

Capítulo VII

Bibliografía

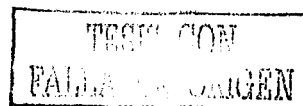
- Aiba, S., Humphrey, E. and Millis, N. 1973. **Biochemical Engineering**. 1a Ed. Academic Press. New York. London. 157 pp.
- Annison, G., and Couperwhite, I. 1986a. Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **25**: 55-61.
- Annison, G., and Couperwhite, I. 1986b. Effect of limiting substrate concentration, growth rate and aeration on alginate composition and production by *Azotobacter vinelandii* in continuous culture. **Food Hydrocolloids**, **1**: 101-111.
- Archambault, J., Williams, R., Bédard, C., and Chavarie, C. 1996. Production of sanguinarine by elicited plant cell culture. I. Shake flasks suspension cultures. **Journal of Biotechnology**, **46**: 95-105.
- Brivonese, A., and Sutherland, Y.W. 1989. Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **30**: 90-102.
- Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C., and Zoels, B. 2000a. Power consumption in shaking flasks on rotary machines. I Power consumption measurements in unbaffled flasks at low viscosity. **Biotechnology and Bioengineering**, **68** (6): 589-593.
- Büchs, J., Maier, U., Maier, U., and Zoels, B. 2000b. Power consumption in shaking flasks on rotary machines. II Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. **Biotechnology and Bioengineering**, **68** (6): 594-601.
- Büchs, J., and Zoels, B. 2001. Evaluation of maximum to specific power consumption ratio in shaking bioreactors. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, **34** (5): 647-653.
- Büchs, J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. **Biochemical Engineering Journal**, **7**: 91-98.
- Büchs, J., Lotter, S., and Milbradt, C. 2001. Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, **7**: 135-141.
- Buckland, B.C. 1984. The translation of scale in fermentation process: Impact of computer process control. **Biotechnology**: 875-883.

- Bushell, M.E., Dunstan, G.L. and Wilson, G.C. 1997. Effect of small scale culture vessel type on hyphal fragment size and erythromycin production by *Saccharopolyspora erythaea*. **Biotechnology Letters**, **19**: 849-852.
- Chain, E. and Gualandi, G. 1954. Aeration studies II. **Journal of Applied Microbiology**, **17**: 5-60.
- Chen, W.P., Chen, J.Y., Chang, S.C., and Su, C.L. 1985. Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. **Applied and Environmental Microbiology**, **49** (3): 543-546.
- Clementi, F., Paolo, F., Mancini F., and Moresi, M. 1995. Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme and Microbiology Technology**, **17**: 983-988.
- Clementi, F., Mancini, F., Mancini, M., and Moresi, M. 1997. Rheological behaviour of aqueous dispersions of bacterial sodium alginate. In: **Engineering and Food at ICE F7**, Part I. Ed. R. Jowitt. Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. E25-28.
- Clementi, F. 1997. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. **Critical Reviews in Biotechnology**, **17** (4): 327-361.
- Clementi, F., Crudele, M.A., Parente, E., Mancini, M., and Moresi, M. 1999. Production and characterization of alginate from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **79**: 602-610.
- Crescenzi, V. 1995. Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. **Biotechnology Progress**, **11**: 251-259.
- Deavin, L., Jarman, T.R., Lawson, C.J., Richelato, R.C., and Scolombe, S. 1977. The production of alginic acid by *Azotobacter vinelandii* in batch and continuous culture. In: Sanford, P.A. and Laskin, A. (Eds.). **Extracellular Microbial Polysaccharides**. American Chemical Society, Washington. pp 14-26.
- Dekker, F., and Barbosa, M. 2000. Effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Batryosphaeria sp.* **Enzyme and Microbial Technology** **28**: 81-88.
- Delgado, G., Topete, M., and Galindo, G. 1989. Interaction of cultural conditions and product distribution in *Bacillus subtilis* grown in shake flasks. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **31**: 288-292.
- De León, A., Cortés, G., Ramírez, O., and Galindo, E. 1995. Diseño y aplicación de un simulador de gradientes de oxígeno disuelto presentes en fermentadores de gran escala. **Avances en Ingeniería Bioquímica**, **5**(1): 1-6.
- Díaz, M., García, A. and García, L. 1996. Mixing power, external convection, and effectiveness in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, **51**: 131-140.

- Doran, P. 1998. Principios de Ingeniería de los Procesos. En: **Fluidos no-Newtonianos**. Ed. Acibia, Zaragoza, España. pp. 148-162
- Finkelstein, D., and Ball, C. 1992. **Biotechnology of Filamentous Fungi Technology and Products**. Butterworth-Heinemann. Boston.
- Finn, R. 1954. Agitation-aeration in the laboratory and in industry. **Bacteriology Review**, **18**: 254-274.
- Flores C. and Deckwer W. 1999. Xanthan gum, In: **Encyclopedia of Bioprocess Technology, Fermentation, Biocatalysis and Separation**, Ed. Flickinger and S. Drew. pp. 2323- 2332.
- Fujita, M., Iwahort, K., Tatsuta, S. and Yamakawa, K. 1994. Analysis of pellet formation of *Aspergillus niger* based on shear stress. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **75** (5): 368-373.
- Fyfe, J.A.M., and Govan, J.R.W. 1983. Synthesis, regulation and biological function of bacterial alginate. **Progress and Industrial Microbiology**, **18**: 45-83.
- Gacesa, P. 1998. Bacterial alginate biosíntesis-recent progress and future prospects. **Microbiology**, **144**: 1133-1143.
- Gaden, E.L. 1962. Improved shaken flasks performance. **Biotechnology and Bioengineering**, **4**: 99-103.
- Galindo, E. and Torrestiana, B. 1989. Rheological characterization of xanthan fermentation broths and their reconstituted solutions. **Bioprocess Engineering**, **4**: 113-118.
- Galindo, E. and Nienow.A.W. 1992. Mixing of highly viscous simulated xanthan fermentation broths with the lightnin A-315 impeller. **Biotechnology Progress**, **8**:233-239.
- Galindo, E. 1996. Traslación de escala. **Notas del XXI Curso Latinoamericano de Ingeniería Bioquímica**, Valparaíso, Chile, pp 231-252.
- Galindo, E., Nienow, A. and Badhan, R. 1998. Mixing of simulated xanthan gum broths. In: **Proc. 2nd International Conference on Bioreactor Fluid Dynamics**. (Ed. King, R.), Cranfield BHRA. pp. 65-78.
- Gerson, G.F. and Kole, J. 2001. Quantitative measurements of mixing intensity in shake flasks and stirred tank reactors: use of the mixmeter, a mixing process analyzer. **Biochemical Engineering Journal**, **7**: 153-156.
- Gibbs, A. and Seviour, R. 1996. Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture?. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **46**:503-510.

- Haarde, W. and Zehner, P. 1992. Leistungseintrag und Stoffüberbang in Schüttelkolben, citado por Maier, U. and Büchs, J. 2001: Characterisation of gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, 7: 99-106.
- Hempel, D.C. 1988. Fundamentals of scale-up for biotechnological process in stirred fermentors, In: **Biotechnology Focus 1**. Finn R.K., Prave P., Schinlingamann, M., Crueger, K., Esser K., Thauer R., and Wagner F. (Eds.), Hanser Publishers, pp. 51-85.
- Hempel, D.C. and Dziallas, H. 1999. Scale-up, stirred reactors, In: **Encyclopedia of Bioprocess Technology, Fermentation, Biocatalysis and Separation**, Ed. Flickinger and S. Drew. pp. 2314-2323.
- Henzler, H.J., and Schedel, M. 1991. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. **Bioprocess Engineering**, 7: 123-131.
- Hermann, R., Walther, N., Maier, U. and Büchs, J. 2001. Optical methos for the determination of the oxygen-transfer capacity of small bioreactors based on sulfite oxidation. **Biotechnology and Bioengineering**, 74 (5): 355-363.
- Higbie, R. 1935. The rate of absorption of a pure gas into a still liquid during shorts periods of exposure. **Trans. Am. Inst. Eng.** 31: 365-385.
- Hoogendoorn, C.J., den Hartog, A.P. 1977. Model studies on mixers in the viscous flow region. **Chemical Engineering Science**. 22: 1689-1699.
- Horan, N.J., Jarman, T.R., and Dawes, E.A., 1981. Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and the enzymes involved in its biosynthesis. **Journal of General Microbiology**, 127: 185-191.
- Horan, N.J., Jarman, T.R., and Dawes, E.A. 1983. Studies of some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. **Journal of General Microbiology**, 129: 2985-2990.
- Hudecova, V., Machon, V. and Nienow, A.W. 1989. Gas liquid dispersion with dual Rushton turbines impellers. **Biotechnology and Bioengineering**, 34:617-628.
- Humphrey, A. 1998. Shake flask to fermentor: What have we learn?. **Biotechnology Progress** 14 (1): 3-7
- Jarman, T.R., Deavin, L., Scolombe, S., Righelato, R.C. 1978. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of General Microbiology**, 107: 59-64.
- Jarman, T.R. 1979. Bacterial alginate synthesis. In: **Microbial Polysaccharides and Polysaccharases**. Berkeley, R.C.W., Gooday, G.W. and Ellwood, D.C. (Eds.). Academic Press, London, pp. 35-49.

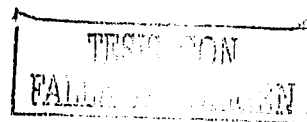
- Kato, Y., Hiraoka, S., Tada, Y., Shira, S., Ue, T., Koh, S-T, and Yamaguchi, T. 1995. Power consumption of horizontally shaking vessel with circulating motion. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, **30**: 365-371.
- Kennedy, M., Reader, S., Davies, J., Rhoades A., and Silby, H. 1994. The scale-up of mycelial shake flasks fermentations: a case study of gamma linoleic acid production by *Mucor hiemalis* IRL 51. **Journal of Industrial Microbiology**, **13**: 212-216.
- Lee, I., Kim, M., Lee, J., Sea, W., Jung, J., Lee, H. and Park, Y. 1999. Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium* species. **Bioprocess Engineering**, **20**: 283-287.
- Luong, J.T., Mulchandani, A. and Leduy, A. 1988. Kinetics of biopolymer synthesis: a revisit. **Enzyme and Microbiology Technology**, **10**: 326-322.
- McDaniel, L. E., Bailey, E. G., and Zimmerti, A. 1965. Effect of the oxygen supply rates on growth of *Escherichia coli*. I. Studies in unbaffled and baffled flasks. **Journal of Applied Microbiology**, **13**: 109-114.
- McDaniel, L. and Bailey G. 1969. Effect of shaking speed and type of closure on shaken flasks culture. **Journal of Applied Microbiology**, **17 (29)**: 286-290.
- Maier, U. and Büchs, J. 2001. Characterisation of gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, **7**: 99-106.
- McNeil, B. and Kristiansen, B. 1987. Influence of impeller speed upon the pullulan fermentation. **Biotechnology Letters**, **9**: 101-104.
- Mejía, R. 1997. Caracterización del gen algK de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Doctorado. Programa de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, **107**: 59-64.
- Miranda L. 1998. Evaluación de cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii* en la producción de alginato. Tesis de Ingeniería Química. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Moe, S., Draget, K., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O. 1995. Alginates. In: **Food Polysaccharides and their Applications**. Stephen A.M., Marcel Dekker (Eds.), New York, pp. 245-286.
- Muley, R., Sarkar, S., Arunkumar, B., Narayanan, M. and Naik, S. 1999. Scale-up approach for fermentation process of production of *Bacillus thuringiensis* var *kenyae* based biopesticide. **Journal of Scientific and Industrial Research**, **58 (10)**: 781-784.
- Mrotzek, C., Büchs, J., and Henzler, H.J. 2001. Diffusion resistance of sterile plugs of shaken bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, **7**: 91-98.



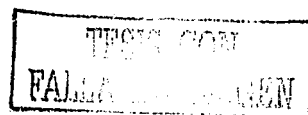
- Nakahara, T., Yokocki, T., Kamisaka, Y., and Osamu, S. 1992. Gamma-linoleic acid from genus *Mortierella*. In: **Industrial Applications of Single Cell Oils**. Eds. Kyle, D. and Ratledge, C., American Oil Chemist Society, Champaign, Illinois, pp. 61-97.
- Olson, B. and Jhonson, M. 1947. Factors producing high yeast yields in synthetic media. **Journal of Bacteriology**, **57**: 235-246.
- Otterlei, M., Ostgaard, K., Skajak-Braek, G., Smidsrod, O., Soon-Shiong, P., and Espevik, T. 1991. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. **Journal of Immunotherapy**, **10**: 286-291.
- Palma, M., Milagres, A., Prata, A. and Mancilha, I. 1996. Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. **Process Biochemistry**, **31** (2): 141-145.
- Panda, T. 1989. Simulation of shake flasks conditions in a bioreactor for the biosynthesis of cellulase and xylanase by a mixed culture of *Trichoderma reesei* D1-6 and *Aspergillus wentii* Pt 2804. **Process Biochemistry**, **24**: 104-108.
- Parente, E., Crudele, M. A., Aquino, M., and Clementi, F. 1998. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, **20**: 171-176.
- Parente, E., Crudele, M. A., Ricciardi, A., Manzini, M. and Clementi, F. 2000. Effect of ammonium sulphate concentration and agitation speed on the kinetics of alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, **25**: 242-248.
- Peña, C., Campos, N. and Galindo, E. 1997. Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shaken flasks. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **253**: 31-36.
- Peña, C. 1998. Producción de alginatos bacterianos por fermentación líquida: estudio de los factores determinantes en la biosíntesis y composición del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. **Tesis de Doctorado**. Instituto de Biotecnología. UNAM. 108 p.
- Peña, C., Trujillo-Roldán M.A., Galindo E. 2000. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme and Microbial Technology**, **27** (6): 380-387.
- Peters, A., Herbst, H., Heselink, P., Lunsdorf, H., Schumpe, A. and Deckwer, W. 1989. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, **34**: 1393-1397.

- Priego, R., Lozada, J., Peña, C. y Galindo, E. 2001. Rendimiento y calidad del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* y su relación con la velocidad específica de crecimiento. **Memorias del IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería**, 10- 14 Sept. Veracruz, México, p. 58.
- Quintero, R. 1987. Escalamiento de fermentaciones, En: **Ingeniería Bioquímica**. Ed. Alambra Mexicana, Cap. 7, pp. 97-113.
- Rehm, B.H.A., and Valla, S. 1997. Bacterial alginate; biosynthesis and applications. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, 48: 281-288.
- Reséndiz, R., Martínez, A., Ascanio, G. and Galindo, E. 1991. A new pneumatic bearing dynamometer for power-input measurements in stirred tanks. **Chemical Engineering Technology**, 14: 105-108.
- Rubio, F.C., Nieto, L.M., Serrano, M.F., and Moleon, M.C. 1996. Batch culture of *Azotobacter vinelandii* under oxygen limitation conditions. **Anales de Química**, 92 (5): 288-293.
- Sabra, W.A., Zeng, A.P., Sabry, S., Omar, S., and Deckwer, W.D. 1999. Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 52: 773-780.
- Sabra, W., Zeng, A.P., Lünsdorf, H., and Decker W.D. 2000. Function and variation of alginate production in *Azotobacter vinelandii* under nitrogen fixation conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 52: 773-780.
- Sabra, W., Zeng, A.P., and Deckwer W.D. 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 56: 315-325.
- Salvagi, V. and Salvagi, V. 1992. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in batch culture. **Journal of General and Applied Microbiology**, 38: 641-645.
- Seañez, G. 1999. Efecto del CO₂ sobre la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. **Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas**. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. 93 p.
- Seañez, G., Peña, C. and Galindo, E. 2001. High CO₂ affects alginate production and prevents polymer degradation in cultures of *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme and Microbial Technology**, 24: 535-540.
- Schultz, J. 1964. Cotton closure as an aeration barrier in shaken flasks fermentations. **Journal of Applied Microbiology**, 12(4): 305-310.
- Serrano-Carreón, L., Corona, R.M., Sánchez, A. and Galindo, E. 1998. Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. **Process Biochemistry**, 33 (2): 133-146.

- Skjak-Braek, G. 1992. Alginate: biosynthesis and some structure function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications. **Transactions-Biochemical Society**, 20: 27-33.
- Solomons, G. 1969. **Materials and Methods in Fermentations**. 1a Ed. Academic Press. New York. London. p. 1-8.
- Sumino, Y., Akibama, H., and Fukada, H. 1972. Performance of the shaking flaks. I. Power consumption. **Journal of Fermentation Technology**, 50: 203-208.
- Sumino, Y., Sonoi, K. and Doi, M. 1993. Scale-up of purine nucleoside fermentation from a shaking flasks to a stirred-tank fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 38: 581-585.
- Sutherland, I., and Ellwood, D.C. 1979. Microbial exopolysaccharides-industrial polymers of current and future potential. **Symposium of the Society of General Microbiology**, 29: 107-150.
- Sutherland, I., 1990. **Journal of Applied Microbiology**. Ed. Cambridge University Press. Gran Bretaña. pp. 12-38.
- Sutherland, I. 1994. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, 12: 393-448.
- Torrestiana, B., Fucikovsky, L. and Galindo, E. 1990. Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. **Letters in Applied Microbiology**, 10: 81-83.
- Trujillo, M.A. 1999. Efecto de las oscilaciones de oxígeno disuelto sobre la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. **Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas**. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Trujillo-Roldán, M.A. Peña, C., Ramírez, T. and Galindo, E. 2001. Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. **Biotechnology Progress**, 17: 1042-1048.
- Trujillo-Roldán, M. 2002. Determinación de las condiciones de cultivo que regulan el peso molecular del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. **Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas**. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (en proceso).
- van Suijdam, J.C., Kossen, H.N.F., and Joha, C. 1978. Model for oxygen transfer in a shake flasks. **Biotechnology and Bioengineering**, 20: 1695-1709.
- Veglio, F., Beolchini, F., and Ubaldini S. 1998. Empirical models for oxygen mass transfer: a comparison between shake flask and lab-scale fermentor and application to manganiferous ore bioleaching. **Process Biochemical** 33 (4): 367-376.



- Veljkovic, V.B., Nikolic, S., Lazic, M.L., and Engeler, C.R. 1995. Oxygen transfer in flasks shaken on orbital shakers. **Biochemical Engineering Journal**, 49 (6): 265-272.
- Vermani, M., Kelkar, S. and Kamuit, M. 1995. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 80 (6): 569-602.
- Weiss, M. and Ollis, D.F. 1980. Extracellular microbial polysaccharides I. Substrate, biomass and product kinetic equations for batch gum fermentation. **Biotechnology and Bioengineering** 12: 854-873.



ANEXOS

A1. Estimación del suministro de potencia en matraces con líquidos de alta viscosidad

Büchs *et al* (2000b) reportaron la relación de el número de potencia modificado Ne' vs el número de Reynolds (figura A1) para matraces de volumen nominal de 250 mL, con 25 mL de polivinilpirrolidona (fluido Newtoniano), agitados a 200 r.p.m. Cuando el líquido se encuentra "en fase", el número de potencia modificado (Ne') se incrementa y $Ne' = 70Re^{-1} + 25Re^{-0.6} + 1.5Re^{-0.2}$. Büchs *et al* (2000a) reportaron que el número de Reynolds en matraces agitados se obtiene a partir de:

$$Re = \rho \cdot n \cdot d_i^2 / \eta$$

donde:

ρ = densidad del líquido (kg/m^3)

n = velocidad de agitación (s^{-1})

d_i = diámetro máximo interno del matraz (m)

η = viscosidad del caldo de cultivo (Pa s)

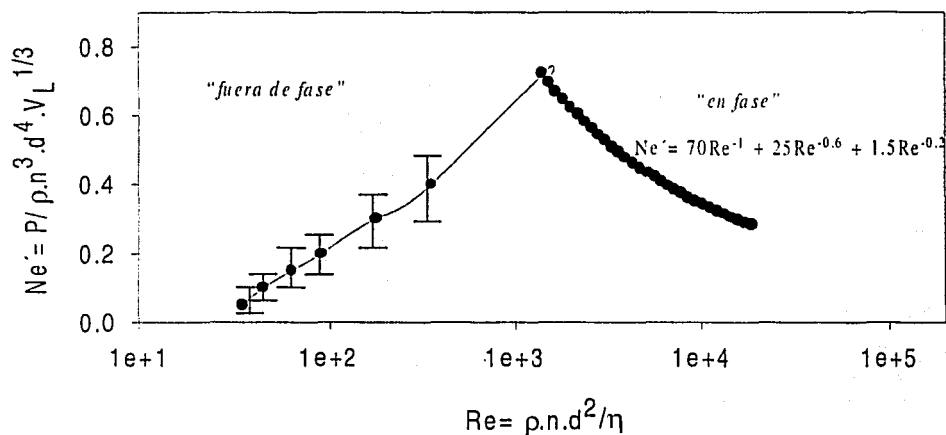


Figura A1. Relación del número de Reynolds con el número de potencia modificado (Ne') para matraces de 250 mL de volumen nominal, 25 mL de polivinilpirrolidona, agitados a 200 r.p.m. con viscosidades desde 0.8 mPa's hasta 200 mPa's (Büchs *et al*, 2000b).

Al incrementar la viscosidad, Ne' disminuye, debido a que el líquido del matraz cae en "fuera de fase", aproximadamente en un número de Reynolds de 1000 (figura A1). De acuerdo a Büchs *et al* (2000b), conociendo Ne' , se puede saber cual es el suministro de potencia, obteniéndola a partir de:

$$P = Ne'(\rho \cdot n^3 \cdot di^4 \cdot V_L^{1/3})$$

La figura 5.19, en la sección de resultados y discusión, muestra el suministro de potencia en función de la viscosidad, en matraces de 250 mL de volumen nominal, con 25 mL de polivinilpirrolidona, agitados a 200 r.p.m. A continuación se muestran ejemplos de cálculo del consumo de potencia en esas condiciones:

donde:

ρ = densidad (1000 kg/m³)

n^3 = velocidad de agitación (3.33 s⁻¹)

di^4 = Diámetro máximo interno del matraz (0.075 m)

$V_L^{1/3}$ = Volumen de llenado (0.000025 m³)

η = Viscosidad (Pa s)

η	Re	Ne'	ρ	di^4	$V_L^{1/3}$	N^3	P	P/V (Kw/m ³)
0.001	18750	0.28	1000	0.000031	0.0290	37.03	0.0095	0.383
0.052	358.86	0.40	1000	0.000031	0.0290	37.03	0.0087	0.548
0.1039	180.35	0.30	1000	0.000031	0.0290	37.03	0.0039	0.411
0.2068	90.64	0.20	1000	0.000031	0.0290	37.03	0.0025	0.274
0.291	64.26	0.15	1000	0.000031	0.0290	37.03	0.0021	0.205
0.411	45.55	0.1	1000	0.000031	0.0290	37.03	0.0011	0.137
0.53	35.2	0.1	1000	0.000031	0.0290	37.03	0.0009	0.067

Tabla A1. Suministro de potencia en matraces con líquidos Newtonianos de alta viscosidad. Matraces de 250 mL, con volumen de llenado de 25 mL, agitados a 200 rpm.

Para el caso de matraces de 500 mL, con 100 mL de volumen de llenado, 200 r.p.m. y 2.5 cm de excentricidad, el suministro de potencia, a diferentes viscosidades del caldo de cultivo, se puede estimar a partir de la tendencia de los valores experimentales de Ne' (figura A1) como el caso de matraces de 250 mL, reportados por Büchs *et al* (2000b). Fue posible estimar el suministro de potencia en los matraces operados a nuestras condiciones "estándar". En la tabla A2 se muestra el ejemplo de cálculo de la estimación del suministro de potencia en matraces operados a nuestras condiciones "estándar", con viscosidades de caldo de cultivo determinadas a un gradiente de deformación de 12 s⁻¹.

donde:

ρ = densidad (1000 kg/m³)

n^3 = velocidad de agitación (3.33 s⁻¹)

d_i^4 = Diámetro máximo interno del matraz (0.105 m)

$V_L^{1/3}$ = Volumen de llenado (0.0001 m³)

η	Re	Ne'	ρ	d_i^4	$V_L^{1/3}$	n^3	P/Pi (W/L)	P/V (W/L)
0.001	36750	0.23	1000	0.00012	0.0464	37.03	1.0	0.27
0.0518	709.02	0.32	1000	0.00012	0.0464	37.03	1.6	0.47
0.10	367.19	0.23	1000	0.00012	0.0464	37.03	1.0	0.31
0.212	173.2	0.2	1000	0.00012	0.0464	37.03	0.6	0.21
0.28	143.43	0.15	1000	0.00012	0.0464	37.03	0.56	0.17
0.309	118.85	0.12	1000	0.00012	0.0464	37.03	0.40	0.11
0.409	89.7	0.1	1000	0.00012	0.0464	37.03	0.32	0.08
0.532	35.2	0.1	1000	0.00012	0.0464	37.03	0.15	0.05

Tabla A2. Suministro de potencia en matraces con alginatos de alta viscosidad: Matraces de 500 mL, con volumen de llenado de 100 mL, agitados a 200 rpm's (fluidos no-Newtonianos).

A2. Ejemplo de la determinación del número de fase (Ph) en matraces de 500 mL con 100 mL de volumen llenado, 200 r.p.m. y 2.5 cm de excentricidad, durante la producción de alginato por *A. vinelandii*.

Debido a las altas viscosidades encontradas en los caldos de cultivo de *A. vinelandii* producidos en matraces, el consumo de potencia del líquido en el matraz, disminuye. Por lo tanto, es necesario determinar a que viscosidad el caldo de cultivo cae en "fuera de fase". es decir, la altura del líquido decrece y por ende, el consumo de potencia disminuye. Büch *et al* (2000b) propusieron el "número de fase" (Ph), el cual puede ser calculado a partir del número de Reynolds de la película del matraz (Ref):

$$Ref = Re \frac{\pi}{2} \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \left(\frac{V_L^{1/3}}{d_i} \right)^2} \right)^2$$

Para Ph 's inferiores a 1.26, la altura del líquido del matraz cae y, por lo tanto, el consumo de potencia del líquido (a alta viscosidad) del matraz disminuye.

$Ph = e/d_i * (1 + 3 * \log_{10}(Ref))$ si $Ph > 1.26$, entonces el líquido permanece "en fase" (tabla A3)

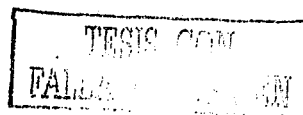


Tabla A3. Determinación de Ph en matraces de 500 mL, 100 mL de volumen de llenado, 200 r.p.m. y 2.5 cm de excentricidad, durante el cultivo de *A. vinelandii*.

<i>"en fase"</i>					
η (mPa s)	Re	d	$v_L^{1/3}$	Ref	Ph
0.001	36750	0.105	0.0464	577	2.21
0.003	11895	0.105	0.0464	186	1.86
0.006	5607	0.105	0.0464	88	1.62
0.009	3850	0.105	0.0464	60	1.51
0.010	3504	0.105	0.0464	55	1.48
0.013	2904	0.105	0.0464	45	1.42
0.016	2190	0.105	0.0464	34	1.33
0.020	1815	0.105	0.0464	28	1.26
<i>"fuera de fase"</i>					
0.023	1652	0.105	0.0464	25	1.24
0.026	1369	0.105	0.0464	21	1.18
0.029	1246	0.105	0.0464	19	1.16

Los caldos de cultivo caen en "fuera de fase" a una viscosidad de 0.020 Pa·s (20 cps) (determinada a un gradiente de deformación de 12 s^{-1}), es decir, a las 20 horas de cultivo o a las 24 horas, si la viscosidad del caldo de cultivo es determinada a un gradiente de deformación de 80 s^{-1} .

A3. Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) en matraces

La correlación utilizada para estimar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en la interfase gas-líquido (k_{La}), en matraces agitados, fue la propuesta por Henzler y Schedel (1991):

$$k_{La} = A (d_i^3/V_L)^{8/9} (n^2 e d_i/g)^\alpha$$

donde:

A= Constante para un cultivo de *E. coli* = 25 h^{-1}

α = Constante para un cultivo de *E. coli* = 0.66

n= Velocidad de agitación = 3.33 s^{-1}

e= Excentricidad = 0.025 m

V_L = Volumen de trabajo = $1 \times 10^{-4} \text{ m}^3$

d_i = Diámetro máximo del matraz = 0.10 m

g= Aceleración de la gravedad = 9.81 m/s^2

Sustituyendo los respectivos valores, se obtiene un k_{La} de $0.0081 \text{ s}^{-1} = 29 \text{ h}^{-1}$.

Debido a la resistencia del tapón, la presión parcial de oxígeno dentro del matraz es más baja que la presión parcial de oxígeno del exterior (Mrotzek *et al*, 2001). Dado a lo anterior, se calculó la resistencia del tapón (C) a la transferencia de oxígeno dentro del matraz. Para ello se utilizó la correlación propuesta por Henzler y Schedel (1991):

$$C = A / \rho_{O_2} D_F H_y / H_V L P$$

donde:

A = Área del tapón = 12.6 cm^2

H = Altura del tapón = 1 cm

ρ_{O_2} = Densidad del oxígeno = 1.165 kg/m^3

D_F = Coef. de difusión del oxígeno = $1.25 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}$ en agua (Doran, 1998)

H_y = Constante de Henry = $2.62 \times 10^6 \text{ Nm/kg}$

V_L = Volumen de trabajo = $1 \times 10^{-4} \text{ m}^3$

P = Presión = 0.89 atm

Sustituyendo los respectivos valores, se obtiene un valor de $0.0908 \text{ s}^{-1} = 327 \text{ h}^{-1}$. Sumando las resistencias, se obtiene un k_{La} global:

$$1/(1/29.1 \text{ h}^{-1} + 1/327 \text{ h}^{-1}) = 27 \text{ h}^{-1} = k_{La} \text{ total}$$

A4. Determinación de k_{La} en fermentador por la técnica de desgasificación

La determinación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) se llevó a cabo utilizando la técnica de eliminación de gas (Quintero, 1987). Se utilizó medio Burk modificado, pH 7.2, temperatura de $29 \text{ }^\circ\text{C}$, 0.8 VVM , 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:

$$\ln(1-C(t)/C_g^*) = -k_L a$$

Donde la pendiente de una gráfica de $\ln(1-C(t)/C_g^*)$ contra el tiempo es igual a $-k_L a$ (figura A2).

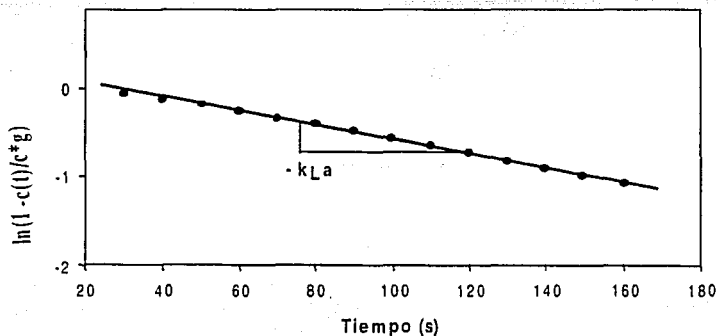


Figura A2. Gráfica que representa la velocidad de reemplazo de oxígeno por nitrógeno en la fase líquida para determinar el $k_L a$.

La figura 4.3 muestra el efecto de la velocidad de agitación sobre el $k_L a$. El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en matraces agitados (200 r.p.m, 100 mL de volumen de llenado a 2.5 cm de excentricidad), se obtiene a una velocidad de agitación de 300 r.p.m. en el fermentador de un litro.

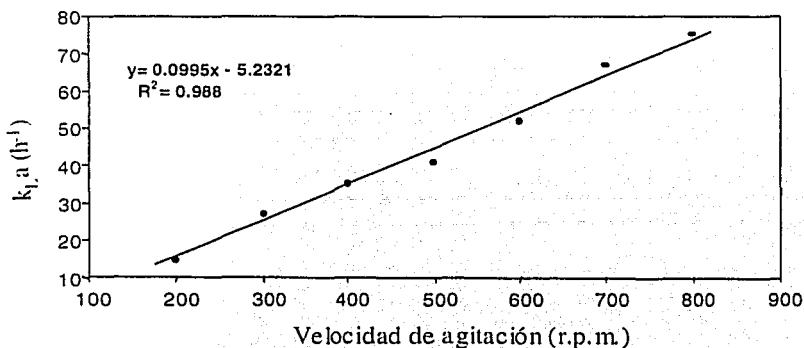


Figura A3. Relación entre la velocidad de agitación y el $k_L a$ en biorreactor de 1 litro.