



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Estudio de la transferencia de oxígeno y tamaños de burbuja en
fermentaciones con características reológicas complejas, a escala piloto, bajo
dos esquemas de suministro de potencia**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA
I.B.Q. Diana Nahyeli Pulido Durán

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Enrique Galindo Fentanes
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Octavio Manero Brito
Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Diciembre, 2020.



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, bajo la asesoría del Dr. Enrique Galindo Fentanes.

Para la realización de este trabajo se contó con la beca 703283 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), a través del proyecto BG200618.

DEDICATORIA

A mis padres y a Jaz, gracias por su amor y apoyo incondicional.

A mi familia, gracias por cuidarme de lejos y de cerca.

A los amigos que me han acompañado: Criz, Sara, Elí, Paulina y Ana Elena.

A los amigos que Cuernavaca me regaló: Bere, Esme, Tomás y Oscar.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Galindo Fentanes, por su acompañamiento, sugerencias, correcciones y todo apoyo en la realización de este proyecto. Gracias por su paciencia al enseñarnos a contemplar el bosque entero y no perdernos en las ramas.

A los miembros del Comité Tutor, la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera y al Dr. Octavio Manero Brito, por sus valiosos aportes y apoyo en este proceso de formación.

A los miembros del Jurado:

Dr. Adelfo Escalante Lozada

Dr. Gabriel Corkidi Blanco

Dr. Arturo Pimentel Cabrera

Dr. Gabriel Ascanio Gasca

Dr. Mauricio Trujillo Roldán

por todos los comentarios y aportaciones realizados durante la revisión final de este trabajo.

A la Dra. Celia Flores Ocampo, por sus útiles consejos y su invaluable apoyo técnico, así como el acompañamiento académico y personal brindado a lo largo de este ciclo.

Al Biól. Mario Alberto Caro Bermúdez, por su apoyo, consejos y acompañamiento en el desarrollo medular de este proyecto. Gracias por la paciencia, las enseñanzas y los chistes.

Al Dr. Luis Medina Torres, al M. en C. Luis Antonio Ramírez Torres y al Q. A. Miguel Ángel Valadez García, por todo el apoyo brindado para la realización de las pruebas reológicas e interpretación de los resultados obtenidos.

A los miembros del grupo Galindo, por los valiosos comentarios y aportaciones a este trabajo. A los miembros del grupo de dispersiones multifásicas: la Dra. Ma. Magdalena Brito, la M.C. Alehlí Holguín Salas, la Q.A. Rita García Rentería y la IBQ. Sandra García, por su disponibilidad para guiarme en todas las etapas de este trabajo.

A la B.A. Dip.Lib. A.L.A. Shirley Ainsworth por su ayuda para la obtención de fuentes bibliográficas. Al L.I. Jesús Omar Arriaga, por su apoyo técnico para el establecimiento de conexiones vía remota. Y al miembro de la Unidad de Cómputo David Santiago Castañeda Carreón, por el asesoramiento y apoyo proporcionado.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Transferencia de oxígeno	6
2.2. Efecto del comportamiento reológico del medio sobre la transferencia de oxígeno.....	8
2.3. Efecto de la disipación de energía en el medio sobre la transferencia de oxígeno.....	12
2.4 Correlaciones para la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y el diámetro Sauter en tanques agitados	15
2.5 Estudio de las dispersiones de tamaños de gotas y burbujas en modelos tetrafásicos de <i>Trichoderma harzianum</i>	21
2.6 Estudio de la dispersión de tamaños de gotas y burbujas bajo condiciones de potencia gaseada constante	24
2.7 Producción de ácido γ -poliglutámico por <i>Bacillus velezensis</i> como modelo de estudio de sistemas pseudoplásticos/viscoelásticos e	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVOS	27
5.1 Objetivo general.....	27
5.2 Objetivos específicos.....	27
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
7.1 Modelo biológico: <i>Bacillus velezensis</i> 83.....	30
7.1.1 Activación de la cepa.....	30
7.1.2 Composición de medios de cultivo	30
7.1.3 Preparación del inóculo.....	32
7.2 Cultivos alimentados en fermentador de 3 L.....	33
7.2.1 Condiciones de cultivo 3 L.....	33
7.3 Cultivos alimentados en fermentador multipuerto de 100 L.....	34
7.3.1 Condiciones de cultivo 100 L.....	36
7.3.2 Determinación de potencia gaseada y calibración del sistema de agitación	37

7.3.3 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.....	39
7.3.4 Determinación de la distribución de tamaños de burbuja	42
7.4 Métodos analíticos.....	46
7.4.1 Cuenta total.....	46
7.4.2 Glucosa residual	47
7.4.3 Concentración y peso molecular del PGA	47
7.4.4 Concentración de surfactina y bacilomicina	48
7.4.5 Tensión superficial	48
7.4.6 Conductividad eléctrica.....	48
7.4.7 Caracterización reológica	48
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
8.1 Cinética de crecimiento y producción de PGA por <i>B. velezensis</i> 83 en biorreactor de 3 L.	51
8.2 Caracterización reológica del medio de cultivo	53
8.2.1 Prueba de flujo	53
8.2.2 Prueba oscilatoria.....	55
8.3 Escalamiento a reactor de 100 L	57
8.4 Determinación de la caída en la potencia gaseada suministrada durante las fermentaciones conducidas a velocidad de agitación constante.....	60
8.5 Determinación de la velocidad de agitación para mantener el suministro de potencia gaseada constante.....	61
8.6 Análisis de las cinéticas de crecimiento observadas en las fermentaciones para producción de PGA en biorreactor de 100 L	63
8.6.1 Normalización de cinéticas obtenidas en las fermentaciones a escala piloto	64
8.7 Caracterización fisicoquímicas de las fermentaciones a N constante y Pg/V constante, a escala piloto	66
8.7.1 Evolución del comportamiento reológico	66
8.7.2 Tensión superficial	70
8.7.3 Conductividad eléctrica.....	73
8.8 Evolución del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	74
8.8.1 Evolución de la velocidad de transferencia de oxígeno	77
8.9 Evolución de las distribuciones de tamaños de burbuja.....	81
8.9.1 Análisis de las imágenes adquiridas	81
8.9.2 Distribución de tamaños de burbuja y diámetro Sauter.....	83
8.10 Interrelación entre las variables de proceso y las funciones objetivo k_{La} y D_{32}	91

8.11 Obtención de correlaciones	96
8.11.1 Correlaciones para la estimación del k_{La}	96
8.11.2 Correlaciones para la estimación del D_{32}	100
8.12 Modelamiento reológico de los caldos de cultivo	104
9. CONCLUSIONES	109
10. PERSPECTIVAS	111
11. BIBLIOGRAFÍA.....	112
ANEXO I. Cálculo de la velocidad de agitación para el escalamiento de la fermentación con <i>Bacillus velezensis</i> 83, de un volumen de trabajo de 2 a 100 L.....	119
ANEXO II. Cinéticas obtenidas para los diferentes parámetros evaluados durante las fermentaciones con <i>Bacillus velezensis</i> 83, bajo condiciones de velocidad de agitación constante (N cte) y potencia gaseada constante (Pg/V constante).....	121
ANEXO III. Distribuciones de tamaños de burbuja y diámetros característicos obtenidos durante la fermentación con <i>B. velezensis</i> para la producción de PGA, bajo condiciones de N constante	127
ANEXO IV. Distribuciones de tamaños de burbuja y diámetros característicos obtenidos durante la fermentación con <i>B. velezensis</i> para la producción de PGA, bajo condiciones de Pg/V constante.	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Relación entre la VTO y los diferentes factores presentes en un biorreactor (Adaptado de García-Ochoa & Gómez, 2009).....	8
Figura 2.2. Señales sinusoidales de tensión y deformación: a) señales en fase, b) señales desfasadas. Adaptado de UPV (2008)	10
Figura 2.3. Esquema del efecto Weissenberg. Adaptado de Scharmm (2000)	12
Figura 2.4. Relación entre el N_p y el Re , para: 1) turbina Rushton, 2) turbina Pitched-blade, 3) propela marina de 3 paletas. Adaptado de Doran (2013) a.	14
Figura 2.5. Cavidades de aire formadas tras las paletas de una turbina Rushton. Adaptado de Galindo (2008)	15
Figura 2.6 Estructura del ácido poliglutámico.	24
Figura 6.1. Estrategia experimental.....	29
Figura 7.1. Biorreactor Aplikkon de 3 L de volumen nominal.....	33
Figura 7.2. Biorreactor multipuerto de acero inoxidable	34
Figura 7.3. Configuración geométrica del biorreactor multipuerto y numeración de los puertos Ingold.....	35
Figura 7.4. Esquema de los impulsores empleados en el biorreactor multipuerto.....	35
Figura 7.5. Sistema montado para realización de la calibración estática (adaptado de García-Rentería, 2018).....	38
Figura 7.6. Curva de calibración del par impuesto	38
Figura 7.7. Esquema de la Envirocam TM BL3.	43
Figura 7.8. Estructuras observadas durante las fermentaciones con <i>B. velezensis</i> 83 en el biorreactor multipuerto. La flecha señala un objeto considerado como “deforme”	44
Figura 7.9. Estructuras observadas a las 44 horas de cultivo durante las fermentaciones con <i>B. velezensis</i> 83 en el biorreactor multipuerto: a) Imagen original; b) Imagen ampliada.	45
Figura 7.10. Esquema de la geometría de cilindros concéntricos de doble gap.	49
Figura 8.1. Evolución de a) biomasa y TOD; b) concentración de glucosa residual; c) concentración y peso molecular del PGA y viscosidad del medio; y d) tensión superficial del medio, para los cultivos exploratorios para la producción de PGA por <i>Bacillus velezensis</i> 83, a escala de 3 L bajo condiciones de velocidad de agitación constante de 900 rpm, 0.8 vvm y 30 °C	52
Figura 8.2. Evolución del comportamiento reológico observado en los cultivos exploratorios para la producción de PGA por <i>Bacillus velezensis</i> 83, a escala de 3 L bajo condiciones de velocidad de agitación constante de 900 rpm: a) Incremento de la viscosidad aparente a lo largo del cultivo; b) reogramas de los diferentes tiempos de muestreo.....	53
Figura 8.3. Evolución de los índices de flujo y de consistencia en los diferentes tiempos del cultivo alimentado con <i>B. velezensis</i> 83, a escala de 3 L bajo condiciones de velocidad de agitación constante de 900 rpm	55
Figura 8.4. Espectros obtenidos mediante reología oscilatoria para la muestra correspondiente a las 33 horas de cultivo con <i>Bacillus velezensis</i> 83 para la producción de PGA en biorreactor de 3 L: a) Módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G''); b) Viscosidad compleja (η^*) y módulo complejo (G^*).....	56

Figura 8.5. Evolución del comportamiento viscoelástico del cultivo con <i>Bacillus velezensis</i> 83 para la producción de PGA en biorreactor de 3 L: a) Módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G''); b) viscosidad compleja (η^*) y módulo complejo (G^*)	56
Figura 8.6. Comparación entre cinéticas de fermentaciones en biorreactor de 3 y 100 L, a velocidades de agitación constantes de 900 rpm y 400 rpm, respectivamente. a) Biomasa, glucosa residual y TOD; b) Viscosidad aparente (a 100 s^{-1}); c) Concentración y peso molecular de PGA	58
Figura 8.7. Capacidad viscosificante del PGA producido en a escala de 3 y 100 L, a velocidades de agitación constantes de 900 rpm y 400 rpm, respectivamente.....	59
Figura 8.8. Evolución del de los índices de flujo (n) y consistencia (K) para las escalas de 3 y 100 L.	59
Figura 8.9. Evolución del valor del suministro de potencia gaseada en el biorreactor de 100 L durante las fermentaciones para la producción de PGA con <i>B. velezensis</i> 83 conducidas a velocidad de agitación constante (400 rpm)	61
Figura 8.10. Perfiles obtenidos durante las fermentaciones para la producción de PGA con <i>B. velezensis</i> 83 conducidas a potencia gaseada constante (1.1 W/L): a) Incremento en las velocidades de agitación; y b) potencia gaseada resultante	62
Figura 8.11. Normalización de las cinéticas de crecimiento de los cultivos con <i>Bacillus velezensis</i> 83 en biorreactor multipuerto: a) cinéticas originales; b) cinéticas normalizadas.....	65
Figura 8.12. Cinéticas obtenidas de las fermentaciones con <i>Bacillus velezensis</i> 83 en biorreactor multipuerto de 100 L, para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte): a) Viscosidad aparente (a 100 s^{-1}); b) Concentración de PGA; c) Peso molecular del PGA	67
Figura 8.13. Evolución de los índices de: a) consistencia (K); y b) flujo (n), obtenidos en las fermentaciones para producción de PGA para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L.....	68
Figura 8.14. Evolución de los módulos de: a) almacenamiento (G') y, b.) pérdida (G'') obtenidos en las fermentaciones para producción de PGA para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L.....	69
Figura 8.15. Evolución de la tensión superficial observada en las fermentaciones para producción de PGA para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L. Se indica el volumen estimado de antiespumante adicionado según el tiempo de cultivo. .	70
Figura 8.16. Evolución de las concentraciones de: a) surfactina; y b) bacilomicina, observadas en las fermentaciones para producción de PGA por <i>B. velezensis</i> 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L.....	71
Figura 8.17. Evolución de la conductividad eléctrica observada en las fermentaciones con “inóculos tardíos” para producción de PGA por <i>B. velezensis</i> 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L.....	74
Figura 8.18. Evolución de los parámetros evaluados en las fermentaciones para producción de PGA por <i>B. velezensis</i> 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L: a) $k_L a$; b) Potencia gaseada; c) viscosidad aparente; y d) tensión superficial (se indica el volumen de antiespumante adicionado).....	76

Figura 8.19. Evolución de los perfiles observados en las fermentaciones para producción de PGA por <i>B. velezensis</i> 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L: a) OTR; y b) TOD. Las líneas punteadas indican la correspondencia entre los valores máximos de OTR y los porcentajes de TOD registrados.....	79
Figura 8.20. Evolución de la q_{O_2} observada en las fermentaciones para producción de PGA por <i>B. velezensis</i> 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L. Los datos presentados corresponden tanto a cultivos realizados con “inóculos tempranos” como con “inóculos tardíos”	80
Figura 8.21. Imágenes de videoendoscopía de la fermentación con <i>B. velezensis</i> para la producción de PGA, conducida en condiciones de agitación constante (400 rpm) y 0.8 vvm, empleando “inóculos tardíos”. De izquierda a derecha: 0, 8, 16, 28 y 36 h normalizadas.....	82
Figura 8.22. Imágenes de videoendoscopía de la fermentación con <i>B. velezensis</i> para producción de PGA, conducida en condiciones de potencia gaseada constante (1.1 W/L) y 0.8 vvm, empleando “inóculos tardíos”. De izquierda a derecha: 0, 8, 16, 28 y 36 h normalizadas.....	82
Figura 8.23. Distribuciones de volumen acumulado de burbujas observadas en las fermentaciones con <i>B. velezensis</i> 83 para producción de PGA empleando “inóculos tardíos” en biorreactor de 100 L	83
Figura 8.24. Distribuciones de Probabilidad de Número para diferentes tiempos de cultivo obtenidas de las fermentaciones para producción de PGA por <i>B. velezensis</i> 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada: a) N cte y, b) Pg/V cte, en biorreactor de 100 L empleando “inóculos tardíos”.....	85
Figura 8.25. Comparación entre la evolución del a) diámetro Sauter; b) suministro de potencia gaseada; c) viscosidad; y d) tensión superficial; observada en las fermentaciones para producción de PGA por <i>B. velezensis</i> 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L.....	89
Figura 8.26. Relaciones obtenidas para los datos del a) k_{LA} y b) D_{32} como función del suministro de potencia gaseada, para las fermentaciones conducidas para los escenarios independientes de N constante y Pg/V; y para el escenario global.	91
Figura 8.27. Relaciones obtenidas para los datos del a) k_{LA} y b) D_{32} como función de la viscosidad, para las fermentaciones conducidas para los escenarios independientes de N constante y Pg/V; y para el escenario global	92
Figura 8.28. Relaciones obtenidas para los datos del a) k_{LA} y b) D_{32} como función de la tensión superficial, para las fermentaciones conducidas para los escenarios independientes de N constante y Pg/V; y para el escenario global.	94
Figura 8.29. Relaciones obtenidas para los datos del k_{LA} como función del D_{32} ; para las fermentaciones conducidas para los escenarios independientes de N constante y Pg/V; y para el escenario global	95
Figura 8.30. Analogía mecánica del modelo de Maxwell (adaptado de Barnes, 2000).....	102
Figura 8.31. Analogía mecánica del modelo de Maxwell generalizado (adaptado de Barnes, 2000)	106
Figura 8.32. Módulo elástico (círculos llenos) y módulo viscoso (círculos vacíos) en función de la frecuencia angular bajo condiciones de a) N constate y b) Pg/V constante. Las líneas continua y	

punteada representan la predicción del modelo multimodal de Maxwell, para los módulos elástico y viscoso, respectivamente. 107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Valores de los exponentes para las diferentes variables consideradas en las correlaciones propuestas para la predicción del k_{La} encontrados por diversos autores.	18
Tabla 2.2 Valores de los exponentes encontrados por diversos autores para las diferentes variables consideradas en las correlaciones propuestas para la predicción del D_{32}	21
Tabla 7.1. Composición del medio sólido YPG.....	30
Tabla 7.2. Composición del medio líquido YPG	31
Tabla 7.3. Composición del medio mineral	31
Tabla 7.4. Composición de las adiciones de glucosa y amonio.....	32
Tabla 7.5. Medidas de la geometría empleada en el equipo DHR-3.	49
Tabla 8.1. Índices de consistencia (K) y flujo (n) obtenidos para el cultivo alimentado con <i>Bacillus velezensis</i> 83.....	54
Tabla 8.2. Parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos para las réplicas de las fermentaciones para la producción de PGA por <i>B. velezensis</i> en biorreactor de 100 L, bajo condiciones de N constante como P_g/V constante.	63
Tabla 8.3. Correlaciones para la estimación del k_{La}	98
Tabla 8.4. Correlaciones para la estimación del D_{32}	101
Tabla 8.5. Parámetros obtenidos del ajuste al modelo generalizado de Maxwell para los datos experimentales correspondientes a las 32 horas normalizadas bajo condiciones de N constante y P_g/V constante.	107

NOMENCLATURA

A: Altura de las paletas del impulsor	[m]
a: Área interfacial de transferencia	[m ⁻¹]
coeficiente empírico en las correlaciones para el k_{La} y el D_{32}	[-]
B: Brazo de palanca	[m]
b: coeficiente empírico en las correlaciones para el k_{La} y el D_{32}	[-]
C: Concentración de oxígeno en el medio	[mmol/L]
C1: Coeficiente empírico en las correlaciones para el k_{La} y el D_{32}	[-]
C*: Concentración de saturación de oxígeno en el medio	[mmol/L]
Cx: Concentración de biomasa	[cel/L]
D: Diámetro del impulsor	[m]
Di: Diámetro del disco del impulsor	[m]
D _L : Difusividad del oxígeno en el líquido	[m ² /s]
DPN: Densidad de Probabilidad de Número.	[-]
D ₃₂ , D _{3,2} : Diámetro promedio Sauter	[m]
dj: Diámetro de la clase "j" en estadística descriptiva	[-]
e _{exp} : Error experimental	[%]
F: Flujo de aire	[L/h]
Fr: Número de Froude	[-]
fr,j: Frecuencia relativa de la clase "j" en estadística descriptiva	[-]
G: Módulo de corte según la ley de Hooke	[Pa]
g: Aceleración de la gravedad	[m.s ⁻²]
G*: Módulo complejo	[Pa]
G': Módulo de almacenamiento	[Pa]
G'': Módulo de pérdida	[Pa]
HL: Altura del líquido en el tanque de agitación	[m]
HT: Altura del tanque de agitación	[m]
i: Intervalo de clase en estadística descriptiva	[-]
Número de modos en el modelo de Maxwell	[-]
j: Variable para contar clases en estadística descriptiva	[-]

K: Índice de consistencia de la ley de potencia	[Pa.s ⁿ]
k _L : Coeficiente másico de transferencia de oxígeno	[m.s ⁻¹]
k _{La} : Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	[h ⁻¹]
L: Largo de las paletas del impulsor	[m]
M: Ancho de la mampara en un tanque de agitación	[m]
Par motor (<i>Torque</i>)	[N.m]
M: Masa	[kg]
N: Velocidad de agitación	[rpm], [s ⁻¹]
Na: Número de aireación	[-]
Nb: Población total	[-]
Np: Número de potencia	[-]
n: Índice de flujo de la ley de potencia	[-]
Tamaño de muestra en estadística descriptiva	[-]
OUR: Velocidad de consumo de oxígeno (<i>Oxygen uptake rate</i>)	[mmol · L ⁻¹ · h ⁻¹]
OTR: Velocidad de transferencia de oxígeno (<i>Oxygen transfer rate</i>)	[mmol · L ⁻¹ · h ⁻¹]
P: Potencia no gaseada	[W]
Pg: Potencia gaseada	[W]
q _{O2} : Velocidad específica de consumo de oxígeno	[mmol O ₂ · cel ⁻¹ · h ⁻¹]
Re: Número de Reynolds	[-]
rpm: Revoluciones por minuto	[min ⁻¹]
T: Diámetro del tanque de agitación	[m]
t: Tiempo	[s]
TOD: Tensión de oxígeno disuelto	[%]
V: Volumen	[L], [m ³]
V _j : Volumen de la clase "j"	[-]
Vs: Velocidad superficial de aireación	[m · s ⁻¹]
% v/v: Concentración en porcentaje de volumen de fase dispersa por volumen de fase continua	[%]
vvm: Flujo volumétrico de gas por unidad de volumen de líquido por minuto	[m ³ gas · m ⁻³ liq · min ⁻¹]

z: Variable estándar para una distribución normal	[-]
Letras griegas	
γ : Deformación	[-]
$\dot{\gamma}$: Gradiente de deformación	[s ⁻¹]
δ : Ángulo de desfase	[-]
ε : Velocidad de disipación de energía	[m ² · s ⁻³]
η : Viscosidad aparente	[Pa · s]
η_{ef} : Viscosidad aparente efectiva	[Pa · s]
η_{∞} : Viscosidad aparente a gradiente de deformación infinito	[Pa · s]
η^* : Viscosidad compleja	[Pa · s]
λ : Microescala de Kolmogorov	[m]
Tiempo de relajación	[s]
μ : Velocidad específica de crecimiento	[h ⁻¹]
ν : Viscosidad cinemática	[m ² · s ⁻¹]
ρ : Densidad	[kg · m ⁻³]
σ : Tensión superficial o interfacial	[N · m ⁻¹]
Desviación estándar	
τ : Esfuerzo de corte	[Pa]
Φ : <i>Hold-up</i>	[-]
ω : Frecuencia angular	[rad · s ⁻¹]

Subíndices

E: Referente al componente elástico en el modelo de Maxwell

V: Referente al componente viscoso en el modelo de Maxwell

O: Referente al material viscoelástico

RESUMEN

Con el objetivo de estudiar el efecto del suministro de potencia gaseada sobre la transferencia de oxígeno, se llevaron a cabo fermentaciones bajo dos condiciones operacionales diferentes: a) velocidad de agitación (N) constante y b) potencia gaseada (Pg/V) constante. Como modelo de estudio se seleccionaron fermentaciones a una escala de 100 L empleando *Bacillus velezensis* 83, debido al incremento en la viscosidad observado durante este proceso. El consumo de potencia gaseada fue determinado a partir de la lectura del par, dada por una celda de carga acoplada a la flecha del reactor. Para las fermentaciones conducidas Pg/V constante, se modificó la velocidad de agitación de manera que la energía suministrada fuera la misma a lo largo del proceso. El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$), las distribuciones de tamaños de burbuja y las características fisicoquímicas del medio fueron determinadas a lo largo de las fermentaciones (duración total de 40 h).

Para las fermentaciones conducidas a N constante, el suministro de potencia gaseada inicial presentó una caída del 40 %, mientras que el valor del $k_L a$ cayó de 118 a 35 h⁻¹. Las fermentaciones conducidas a Pg/V constante tuvieron valores iniciales de $k_L a$ menores (105 h⁻¹), pero presentaron una caída similar a la observada en condiciones de N constante. Las distribuciones de tamaño de burbujas también tuvieron un comportamiento similar para ambas condiciones operacionales. Los valores iniciales el diámetro Sauter (D_{32}) promedio fueron de 1155 y 1300 μm, para las condiciones de N constante y Pg/V constante, respectivamente. Conforme al incremento en la viscosidad del sistema, se esperaba un aumento en los valores del D_{32} , que sería contrarrestado al mantener Pg/V constante. Sin embargo, para ambas condiciones operacionales el D_{32} disminuyó drásticamente a valores cercanos a 400 μm, observándose una mayor homogeneidad en las poblaciones de burbujas. Este particular comportamiento en el D_{32} se adjudica principalmente a la presencia de surfactina y bacilomicina, metabolitos producidos por *B. velezensis* 83 que presentan alta actividad surfactante. Las variables que mayor correlación presentaron con el comportamiento del $k_L a$ fueron Pg/V y viscosidad, de acuerdo con la expresión $k_L a = 8.1 \times 10^{-6} \left(\frac{Pg}{V}\right)^{1.0} (\eta)^{-0.14}$ ($R^2 = 0.67$), siendo predominante el efecto de la viscosidad. Por otro lado, las predicciones obtenidas para el D_{32} fueron contrarias a lo teóricamente esperado, indicando un comportamiento atípico de este sistema.

Se concluye que el suministro de Pg/V constante no logró contrarrestar el efecto negativo de la viscosidad sobre los valores de $k_L a$; mientras que valores del D_{32} mostraron estar mayormente determinados por la presencia de biosurfactantes, que por el suministro de potencia gaseada o la viscosidad del sistema. No obstante, aunque la presencia de biosurfactantes ocasionó un incremento en el área interfacial de transferencia (a) al disminuir el D_{32} , tanto la presencia de estos compuestos como el aumento en la viscosidad del sistema repercutieron sobre los valores del $k_L a$, muy probablemente a través de la disminución del coeficiente másico de transferencia, k_L . El particular comportamiento observado en este sistema, especialmente para el D_{32} , no hubiera podido estimarse a partir del uso de correlaciones encontradas en la literatura, obtenidas a partir de fluidos modelo. Los resultados aquí obtenidos reflejan la compleja interrelación de los múltiples factores presentes en un bioproceso real, hecho que constituye el principal aporte de este trabajo.

ABSTRACT

In order to study the effect of power consumption on oxygen transfer, we conducted a fermentation process under two different operational conditions: a) constant stirred speed (N) and b) constant gassed power input (Pg/V). Poly-glutamic acid production by *Bacillus velezensis* was chosen as fermentation model, due to the increase in viscosity observed in this process. The process was conducted in a 100 L bioreactor. Power consumption was measured by torque readings given by a torquemeter, coupled to the bioreactor shaft. For the constant power input fermentation, power supply was kept constant by adjusting the stirring speed. Oxygen mass transfer coefficient (k_{La}), bubble size distribution and the physicochemical characteristics of the media were determined every four hours during the entire process (total duration of 40 hrs).

For the constant stirring speed fermentations, power input exhibited a decrease of 40 % from its initial value (1.5 W/L), as well as in the k_{La} values, going from 118 to 35 h⁻¹. The constant power input fermentations had lower k_{La} initial values (105 h⁻¹), nevertheless this parameter showed a similar drop than that observed for the constant stirred speed fermentations. Bubble size distributions were also similar for both operational conditions. During the first culture hours, the Sauter mean diameter (D_{32}) was 1155 and 1300 μm , for constant N and constant Pg/V, respectively. An increase in bubble size was expected, due to the higher apparent viscosity of the medium, and this was expected to be counteracted by keeping constant power input. Nevertheless, the D_{32} values decreased to ~ 400 μm , with more homogeneous bubble populations, for both process conditions. This singular behavior of the D_{32} was likely caused by the presence of surfactin and bacillomycin, two metabolic products of *B. velezensis* 83 with strong surfactant activity. Pg/V and viscosity were found to be the main parameters to define the k_{La} values, according to the expression $k_{La} = 8.1 \times 10^{-6} \left(\frac{Pg}{V}\right)^{1.0} (\eta)^{-0.14}$ ($R^2 = 0.67$), where viscosity had a bigger effect than that of Pg/V. On the other hand, the predictions generated for D_{32} were opposed to theoretical expectations, indicating the atypical behavior of this system.

It was concluded that constant power input could not counteract the negative effect of viscosity on the k_{La} values; while the D_{32} values were found to be more influenced by the presence of biosurfactants, than by the power input or the viscosity. Nonetheless, although the presence of biosurfactants lead to an increase on interfacial transfer area (a), by decreasing D_{32} , the presence of these molecules and the increase in the medium viscosity affected the k_{La} values, likely by means of the mass transfer coefficient (k_L). The atypical behavior of this system, especially for the D_{32} , could not have been estimated by using typical correlation found in the literature. The results obtained show the complex interaction of the multiple factors involved in a real bioprocess, which constitutes the principal contribution of this work.

1. 1. INTRODUCCIÓN

En fermentaciones aerobias, el rendimiento y productividad depende en gran medida de una adecuada transferencia de oxígeno. Es común que bioprocesos que involucran altas concentraciones de biomasa, morfologías de tipo micelial, o bien, la producción de biopolímeros, muestren cambios en su comportamiento reológico, adquiriendo un comportamiento de tipo pseudoplástico, lo que puede dificultar el mezclado y la transferencia de materia. Otro aspecto para considerar son los cambios en las propiedades fisicoquímicas del medio de cultivo, como la tensión superficial y la conductividad eléctrica, que se ven generalmente modificadas a causa del incremento en la biomasa, la morfología del mismo y/o la secreción al medio de productos extracelulares, que también pueden traer consigo afectaciones en el transporte de oxígeno en el sistema. Dado que muchos de estos procesos son llevados a cabo por microorganismos aerobios, resulta importante analizar cómo se da la transferencia de oxígeno en cultivos con tales características.

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, o k_{La} , se emplea para caracterizar el transporte de oxígeno desde el medio gaseoso al líquido. Debido a la importancia de garantizar una adecuada transferencia de oxígeno al medio, el valor del k_{La} es comúnmente utilizado como parámetro de escalamiento.

Existen correlaciones que permiten predecir el valor del k_{La} bajo diversas condiciones operacionales en medios con diferentes características fisicoquímicas y/o reológicas. No obstante, la mayoría de estas correlaciones fueron obtenidas a través del estudio de transferencia de oxígeno en fluidos modelo, donde no se consideran los factores que afectan un proceso fermentativo real (Nienow, 1990). Además, la aplicación de estas correlaciones está limitada a sistemas similares al medio en el que fueron determinadas (Galindo, 1996).

A su vez, el $k_L a$ de un sistema está determinado por el coeficiente másico de transferencia (k_L) y el área interfacial (a). Así, el área interfacial es inversamente proporcional al tamaño de las burbujas de aire inmersas en el líquido. El tamaño de estas estructuras está determinado tanto por sistema de suministro de aire al medio (tipo de difusor), las propiedades fisicoquímicas del sistema, así como por la energía suministrada al mismo.

En muchos procesos industriales, es común que se usen tanques agitados mecánicamente. Justamente, esta agitación mecánica es la responsable del grado de homogeneización del sistema, así como de la dispersión de las diferentes fases que puedan estar presentes. Las turbinas que generan flujo radial son ideales para llevar a cabo la dispersión de fases. Este tipo de turbinas presenta mayores números de potencia que las turbinas de flujo axial; este mayor consumo de energía se destina al rompimiento y dispersión de estructuras (como burbujas de aire o gotas de un compuesto inmisible en agua) en la fase continua (Grenville et al., 2017).

Por otro lado, para una determinada velocidad de agitación y de aireación, el consumo de potencia en el sistema estará relacionado principalmente a las propiedades del medio. Por ejemplo, es común encontrar caídas importantes en la potencia suministrada al sistema conforme se incrementa la viscosidad del sistema, debido a la formación de cavidades de aire tras las paletas del impulsor (Paul et al, 2004).

Como se mencionó anteriormente, para dispersiones gas-líquido, el tamaño de las burbujas está determinado tanto por las propiedades fisicoquímicas del medio como por la potencia suministrada, y ésta última es, a su vez, afectada por las mismas propiedades del medio. En vista de lo anterior, Brito-Bazan et al., (2017) realizaron un estudio de la dispersión de gotas de aceite y burbujas de aire en un sistema tetrafásico bajo condiciones de potencia gaseada constante retroajustada. Esto es, modificando la velocidad de agitación del sistema de

manera que la potencia entregada al mismo permaneciera constante para todas las condiciones estudiadas. De este modo, estos autores pudieron eliminar el efecto de los cambios en la potencia sobre la dispersión de estructuras, que hubieran ocurrido bajo condiciones de velocidad de agitación constante. Así, los cambios en las dispersiones fueron respuesta únicamente del cambio en las propiedades del fluido.

En este proyecto, se estudió la transferencia de oxígeno en un modelo biológico para la producción de ácido poliglutámico por la cepa *Bacillus velezensis* 83, bajo dos condiciones diferentes de proceso: velocidad de agitación (N) constante y potencia gaseada (Pg/V) constante. Los resultados permitieron evaluar el efecto de la potencia gaseada sobre la distribución de tamaños de burbujas y sobre el k_{La} , en un sistema biológico donde las características fisicoquímicas y reológicas evolucionaron a lo largo del proceso.

2. ANTECEDENTES

2.1. Transferencia de oxígeno

Debido al gran impacto que tienen sobre el proceso fermentativo aerobio, la transferencia de oxígeno en biorreactores ha sido ampliamente estudiada.

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, o $k_L a$ (h^{-1}), se emplea para caracterizar el transporte de oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida, para posteriormente ingresar a la célula (fase sólida). A lo largo de este recorrido, existen diversas barreras entre las fases presentes en el medio, de manera que la fuerza impulsora para lograr la difusión del oxígeno es el gradiente de concentración existente entre cada fase:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \cdot (C^* - C) \quad (\text{Ec. 2.1})$$

donde C^* es la concentración en el equilibrio de saturación de oxígeno en agua; y C , la concentración de oxígeno en el líquido en un tiempo t .

La determinación experimental del valor del $k_L a$ puede realizarse mediante diversas técnicas, como oxidación del sulfito de sodio, eliminación de oxígeno con gases inertes, la técnica dinámica, balance de masas en los flujos de gas a la entrada y salida, entre otras (García-Ochoa et al., 2010).

El $k_L a$ considera dos parámetros independientes: el coeficiente de transferencia másica (k_L) y el área interfacial (a). Para estimar los valores para el k_L ($m \cdot s^{-1}$) muchos métodos se basan en la teoría de difusión de Higbie, donde se considera el tiempo de contacto (t_c), entre las fases gaseosa y líquida del medio, así como el coeficiente de difusión de oxígeno en el medio líquido (D_L , medido en $m^2 \cdot s^{-1}$), de acuerdo con la siguiente expresión (García-Ochoa et al., 2010):

$$k_L = 2 \sqrt{\frac{D_L}{\pi \cdot t_c}} \quad (\text{Ec. 2.2})$$

Por su parte, el área interfacial específica (a), puede estimarse a partir de la dispersión de tamaños de burbuja (en términos del diámetro Sauter, D_{32}) y el *hold-up* (Φ , que representa la fracción volumétrica de gas dentro de la dispersión), según la ecuación (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009):

$$a = \frac{6\phi}{D_{32}} \quad (\text{Ec. 2.3})$$

donde D_{32} es un estadístico de momento que representa la relación entre el volumen de las estructuras (tercer momento del diámetro, D^3) sobre el área proyectada por las mismas (segundo momento del diámetro D^2).

De este modo, la dispersión de un gas en burbujas de menor tamaño conducirá a un incremento en el área interfacial, comparado con su dispersión en burbujas más grandes.

El valor del k_{La} es afectado por un gran número de factores, entre los que se encuentran la geometría del biorreactor y las condiciones operacionales del proceso, las propiedades fisicoquímicas y reológicas del medio y la presencia de biomasa (Galaction et al., 2004; Garcia-Ochoa & Gomez, 2009). La interacción de estos factores se esquematiza en la Figura 2.1.

A continuación, se describirán con mayor detalle el impacto de las características reológicas y la disipación de energía al medio sobre el valor del k_{La} .

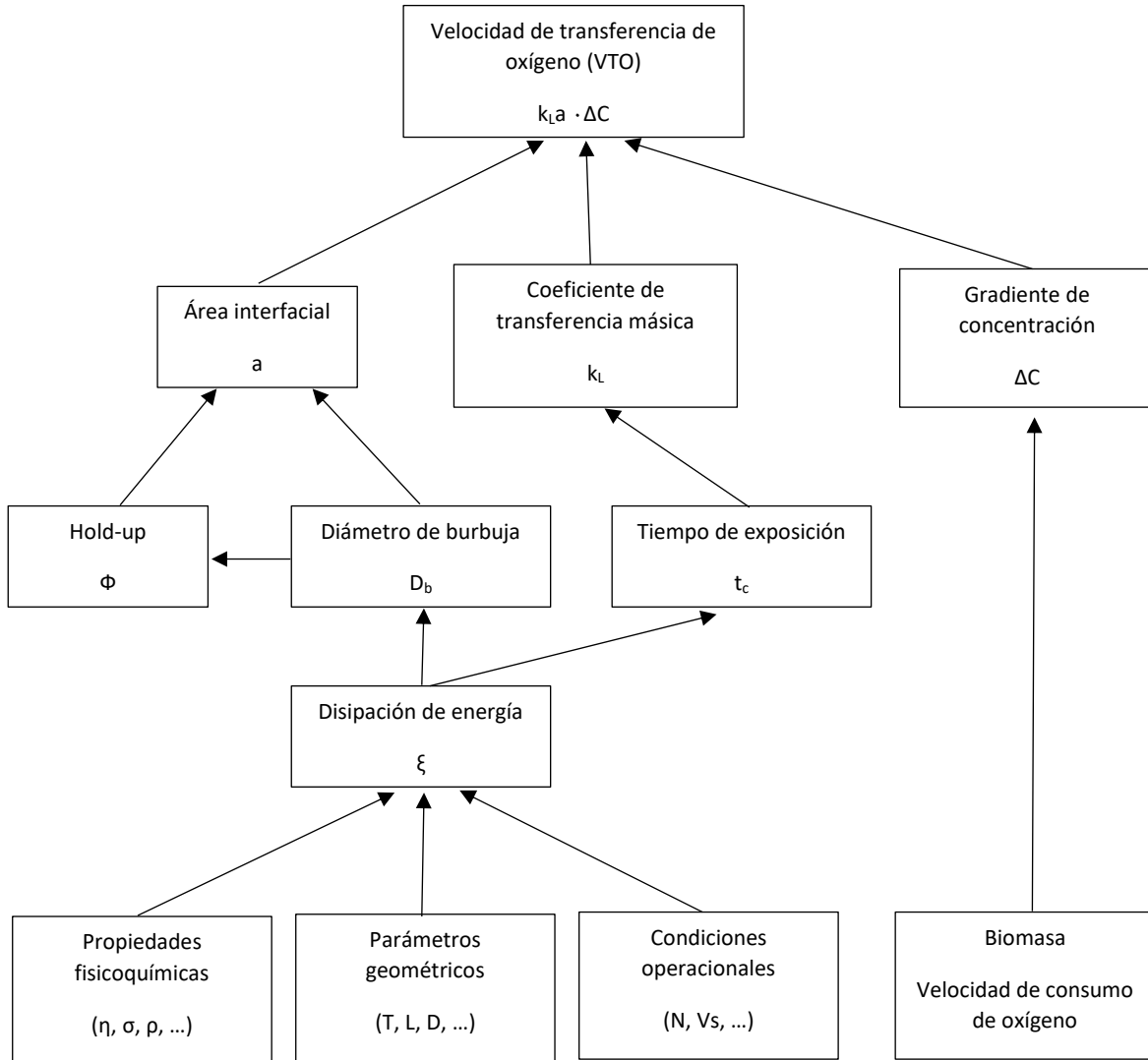


Figura 2.1. Relación entre la VTO y los diferentes factores presentes en un biorreactor (Adaptado de García-Ochoa & Gómez, 2009).

2.2. Efecto del comportamiento reológico del medio sobre la transferencia de oxígeno

El comportamiento reológico de un fluido puede clasificarse como newtoniano o no-newtoniano, dependiendo de la relación existente entre la viscosidad (η) del medio con el gradiente de deformación aplicado ($\dot{\gamma}$). En un fluido newtoniano, la viscosidad es independiente del gradiente de deformación; contrario a lo que sucede con un fluido no-newtoniano, donde la viscosidad está en función de este último, de ahí que se emplee el término de 'viscosidad aparente' (η). Se habla entonces de un fluido de comportamiento

no-newtoniano de tipo pseudoplástico si éste presenta una disminución de su viscosidad conforme aumenta el gradiente de deformación, ajustándose, por ejemplo, al modelo de la “ley de potencia”:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (\text{Ec. 2.4})$$

donde τ es el esfuerzo cortante aplicado sobre el medio, en Pa; n es el índice de flujo (adimensional, cuyo valor es 1 para fluidos newtonianos y disminuye conforme aumenta el grado de pseudoplasticidad), y K es el índice de consistencia, en Pa.sⁿ.

En el caso de algunos procesos fermentativos, factores como el aumento de la concentración de biomasa o la producción de metabolitos extracelulares pueden traer consigo modificaciones en la reología del medio de cultivo, cambiando su comportamiento de newtoniano a no-newtoniano pseudoplástico (Galaction et al., 2004; Richard & Margaritis, 2002). A su vez, el aumento en la viscosidad del sistema repercute de manera importante en el transporte de materia, limitando así el acceso a nutrientes y la transferencia de oxígeno (Gabelle et al., 2011). De acuerdo con Gogate et al., (2000), un incremento en la viscosidad del medio trae consigo la formación de burbujas de mayor tamaño debido a fenómenos de coalescencia, minimizando el área interfacial y afectando así la transferencia de oxígeno.

La transferencia de oxígeno en fluidos de características reológicas no-newtonianas ha sido estudiada en varios trabajos (García-Cerna, 2017; García-Ochoa et al., 2000; García-Rentería, 2018; Kawase & Hashimoto, 1996; Yagi & Yoshida, 1975). Para esto, generalmente se emplean fluidos modelo o suspensiones de biomasa que simulen el comportamiento reológico del medio fermentativo, ya que éstos son menos costosos y más sencillos de manejar (Gabelle et al., 2011). No obstante, al emplear fluidos modelo no se contemplan los elementos involucrados en un bioproceso real, como lo son los cambios en el medio ocasionados por el crecimiento y la secreción de productos, daño celular, cambios morfológicos, etc. Por tanto, resulta complicado vincular los resultados obtenidos a partir de un fluido modelo con un proceso biológico real (Nienow, 1990).

Además del comportamiento pseudoplástico, se ha observado que ciertos caldos de cultivo exhiben también un comportamiento reológico de tipo viscoelástico. Fluidos con estas características presentan componentes tanto de líquido viscoso como de sólido elástico. Este comportamiento puede ser caracterizado mediante ensayos de reología oscilatoria, en los que la muestra es sometida a una tensión sinusoidal (τ_0), obteniéndose como respuesta una señal sinusoidal de deformación (γ_0) por parte del material analizado. Si las señales de tensión y deformación se encuentran *en fase*, el material se comporta totalmente como un sólido elástico (Figura 2.2 a). Por el contrario, si existe un ángulo de desfase (δ) entre ambas señales, el material presentará, además, un comportamiento viscoso, (Figura 2.2 b) teniendo un valor máximo cuando el desfase entre las señales sea de $\pi/2$ rad (90°).

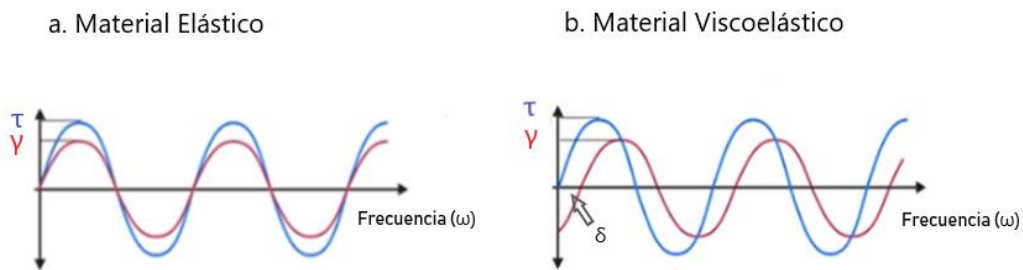


Figura 2.2. Señales sinusoidales de tensión y deformación: a) señales en fase; b) señales desfasadas. Adaptado de UPV (2008).

El componente de sólido elástico es representado por el módulo de almacenamiento (G'), mientras que el componente de líquido viscoso se denota a través del módulo de pérdida (G''), de acuerdo con las Ecuaciones 2.5 y 2.6. Las unidades para ambos módulos son pascales (Pa), y sus magnitudes varían de acuerdo con la frecuencia oscilatoria aplicada (ω), medida en $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$. La tangente del ángulo de desfase puede obtenerse a partir de la relación entre ambos módulos, como se muestra en la Ecuación 2.7 (Barnes, 2000).

$$G' = \frac{\tau_0 \cdot \cos(\delta)}{\gamma_0} \quad (\text{Ec. 2.5})$$

$$G'' = \frac{\tau_0 \cdot \sin(\delta)}{\gamma_0} \quad (\text{Ec. 2.6})$$

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad (\text{Ec. 2.7})$$

Mediante el módulo complejo (G^*) puede expresarse la relación existente entre G' y G'' , mientras que la viscosidad compleja (η^*) representa la magnitud de la viscosidad mostrada por un material sometido a tensiones oscilatorias, y es función de la viscosidad dinámica (η'). Las unidades para G^* y η^* son Pa y Pa·s, respectivamente.

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (\text{Ec. 2.8})$$

$$\eta' = \frac{G''}{\omega} \quad (\text{Ec. 2.9})$$

$$|\eta^*| = \left[(\eta') + \left(\frac{G'}{\omega^2} \right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Ec. 2.10})$$

Se ha reportado que algunas fermentaciones miceliales con microorganismos como *Trichoderma reesei* (Marten et al., 1996), *Streptomyces tendae* y *Chaetomium cellulolyticum* (Chmiel et al., 1990), así como fermentaciones para la obtención de biopolímeros como goma welana y goma xantana (Galindo & Nienow, 1992; Li et al., 2011) exhiben este tipo de comportamiento.

Otra manifestación de la viscoelasticidad de un fluido es la presencia de esfuerzos normales. Cuando un material viscoelástico es sometido a la deformación ejercida por un rotor, además del esfuerzo cortante generado en las diferentes capas concéntricas (dirección radial), se genera también un estrés que actúa en dirección perpendicular al esfuerzo cortante (Figura 2.3), también conocido como efecto Weissenberg.

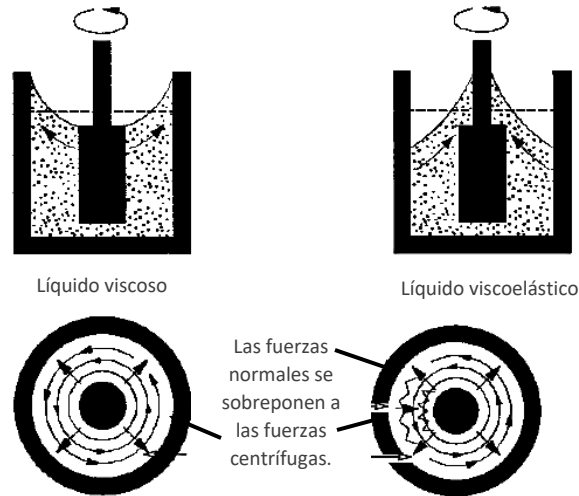


Figura 2.3. Esquema del efecto Weissenberg. Adaptado de Scharmm, 2000.

Al ejecutar una prueba de flujo sobre un material de este tipo, este estrés normal ocasiona que el fluido ascienda por la flecha del rotor, creando una fuerza normal que intentará separar, por ejemplo, al cono de su base en un reómetro rotacional (Scharmm, 2000). Utilizando reómetros acoplados a un sensor de esfuerzos normales, es posible medir el carácter viscoelástico de un material basándose en este efecto.

Diversos estudios han reportado el efecto de la viscoelasticidad sobre el mezclado, el consumo de potencia, transferencia de materia, etc., en fluidos modelo (Galindo & Nienow, 1992; Ramsay et al., 2016; Schumpe & Deckwer, 1987; Torre et al., 1993; Zhou et al., 2000) tanto en términos del esfuerzo normal como de otros parámetros derivados de él, como el número de Weissenberg. De acuerdo con Ranade & Ulbrecht (1977), el aumento de la viscoelasticidad de un fluido afecta negativamente la transferencia de oxígeno, disminuyendo el valor del $k_L a$ hasta en un 75 % para soluciones de poliacrilamida al 0.1 % comparadas con los valores de $k_L a$ para el agua, bajo las mismas condiciones operacionales.

2.3. Efecto de la disipación de energía en el medio sobre la transferencia de oxígeno

En principio, la generación de burbujas pequeñas se da a partir del rompimiento de burbujas de mayor tamaño, cuyo diámetro inicial es determinado por el tamaño del orificio del dispersor. Este rompimiento tiene lugar cuando las tensiones externas que causan disrupción en la burbuja (como la hidrodinámica de la fase continua) superan a las tensiones

superficiales y viscosas que se oponen a la deformación de la misma (Jakobsen et al., 2005; Kerdouss et al., 2006; Laakkonen et al., 2007).

Para un tanque agitado, la turbulencia ocasionada por el movimiento del impulsor es el principal mecanismo responsable del rompimiento de las burbujas (Kerdouss et al., 2006). Según la teoría del micro-mezclado, la energía es disipada al medio en forma de remolinos, denominados *eddies*, cuyo tamaño es definido por el nivel de energía que posean. Así, mientras mayor sea la cantidad de energía disipada, menor será el tamaño del *eddy* generado. La microescala de Kolmogorov (λ) es un estimado del tamaño mínimo del *eddy* que se forma debido al mezclado, y cuya energía es capaz de romper estructuras de una fase dispersa (Zhou & Kresta, 1998). Esta medida está determinada por la viscosidad cinemática del fluido (ν) y la velocidad de disipación de energía (ϵ):

$$\lambda = \left(\frac{\nu^3}{\epsilon}\right)^{1/4} \quad (\text{Ec. 2.11})$$

Únicamente *eddies* de menor o igual tamaño al del diámetro de las estructuras en cuestión (ya sean burbujas o gotas) podrán causar su rompimiento, mientras que los *eddies* de mayor tamaño sólo generan el transporte de estas.

Así, para una dispersión bifásica gas-líquido, la distribución de tamaños de las burbujas (y, por ende, los valores del $k_L a$) en un sistema agitado dependerá tanto de las propiedades del fluido, las condiciones hidrodinámicas del sistema y de la energía suministrada al medio. Esta energía entregada al sistema muchas veces es expresada en términos del consumo de potencia gaseada (P_g/V) (Vrábel et al., 2000).

En condiciones no gaseadas, la potencia requerida para llevar a cabo el mezclado dependerá de la velocidad de agitación, el tipo y tamaño del impulsor, la geometría del tanque, así como de densidad y viscosidad del medio. La relación entre estas variables se expresa comúnmente a través de números adimensionales, como lo son el número de Reynolds:

$$Re = \frac{ND^2\rho}{\eta} \quad (\text{Ec. 2.12})$$

y el número de potencia, Np :

$$Np = \frac{P}{N^3 D^5 \rho} \quad (\text{Ec. 2.13})$$

donde N es la velocidad de agitación y D es el diámetro del impulsor, ρ es la densidad del líquido, η es la viscosidad y P es la potencia no gaseada.

Para cada tipo de impulsor, existe una relación general entre el Np y el Re , que depende del régimen de flujo alcanzado en el tanque, como se muestra en el a Figura 2.4.

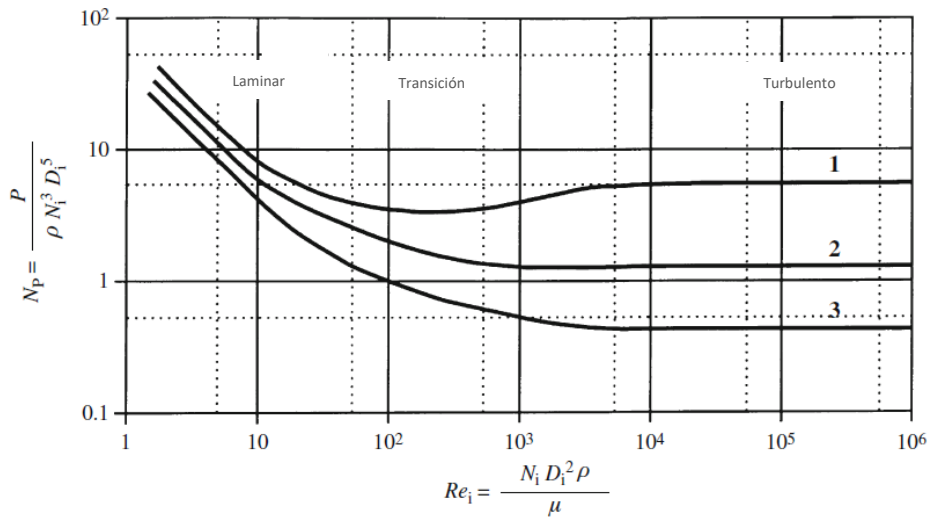


Figura 2.4. Relación entre el Np y el Re , para: 1) turbina Rushton, 2) turbina Pitched-blade, 3) propela marina de 3 paletas. Adaptado de Doran (2013) a.

Una vez alcanzado el régimen turbulento ($Re > 10^4$), el Np se vuelve independiente del Re , alcanzando valores que son característicos para cada tipo de impulsor. En dichas condiciones, es posible determinar el consumo de potencia de la siguiente forma:

$$P = N_p \rho N^3 D^5 \quad (\text{Ec 2.13})$$

Es bien sabido que, al introducir aireación al sistema, el valor del consumo de potencia se ve drásticamente reducido debido a la formación de cavidades tras la paleta del impulsor (Paul et al., 2004), como se muestra en la Figura 2.5.



Figura 2.5. Cavidades de aire formadas tras las paletas de una turbina Rushton. Adaptado de Galindo (2008).

De esta forma, el cociente obtenido de dividir el valor de la potencia gaseada entre la potencia no gaseada (P_g/P) es menor a 1, y disminuye al aumentar el flujo de aireación en el sistema.

Esta caída en la potencia suministrada es también determinada por las características fisicoquímicas del medio. Se ha observado que el aumento en la viscosidad conduce a mayores caídas para el suministro de potencia gaseada, al obtenerse menores valores para el cociente de P_g/P (Galindo & Nienow, 1992; Nienow & Ulbrecht, 1985).

2.4 Correlaciones para la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y el diámetro Sauter en tanques agitados

Debido a la importancia de garantizar una adecuada transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa hacia la fase líquida, el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno es muchas veces empleado como parámetro de diseño de reactores y/o de escalamiento para un amplio número de procesos. Por lo tanto, su valor debe poder estimarse adecuadamente.

De acuerdo con Garcia-Ochoa & Gomez (2004), las características que afectan en mayor medida la transferencia de oxígeno entre las fases gaseosa y líquida son la disipación de energía, el *hold-up* y el tamaño de las burbujas. Por su parte, estas variables son función de las condiciones operacionales y la geometría del sistema, así como de las propiedades físicas del medio y del gas dispersado. Al mismo tiempo, existe una interrelación entre la influencia de casi todos estos parámetros, lo que hace que la predicción adecuada de la transferencia de oxígeno sea un problema que involucra múltiples factores.

Debido a lo anterior, muchos estudios se han enfocado en generar correlaciones que permitan estimar la transferencia de oxígeno en términos del $k_L a$, o bien, haciendo una distinción entre sus componentes (k_L y a), en función de las diferentes variables fisicoquímicas y operacionales.

Una de las descripciones más comúnmente empleadas para predecir el $k_L a$ se expresa a través de la correlación en su forma más básica, propuesta por Cooper, et al. (1944):

$$k_L a = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a V_s^b$$

donde Pg/V es la potencia gaseada suministrada y V_s es la velocidad superficial de aireación (m/s). Muchas veces, el término Pg/V no es considerado, y en su lugar se incluyen los términos N y D , que corresponden a la velocidad de agitación (s^{-1}) y al diámetro del impulsor empleado (m). La constante de proporcionalidad $C1$ depende de los parámetros geométricos y del tipo de impulsor empleado. Los valores de los exponentes a y b varían según las diferentes condiciones geométricas y operacionales usadas, así como de las características del fluido.

Karimi et al. (2013) determinaron los diferentes valores del $k_L a$ en función del tipo y número de impulsores, la velocidad de agitación, la velocidad superficial de aireación y el tipo de difusor, en tanque de 1.77 L de volumen de trabajo, usando agua desionizada. A partir de los resultados obtenidos, generaron una serie de correlaciones de la forma anterior. Determinaron que la turbina tipo Rushton presentó un mejor desempeño en la dispersión de aire a través de la generación de burbujas de menor tamaño, comparada con los impulsores de 2 y 4 paletas inclinadas (*Pitched 2 blades* y *pitched 4 blades*). Sin embargo, en un estudio similar realizado por Xie et al. (2014.a), empleando turbinas tipo Rushton, *Hollow blade* e *hydrofoil*, concluyeron que, a altas velocidades de aireación, todas las configuraciones empleadas alcanzaron valores de $k_L a$ similares, bajo condiciones de suministro de potencia gaseada idénticas.

Por otro lado, Linek et al. (2012) señalan que el impacto del suministro de potencia gaseada (Pg/V) sobre el $k_L a$ es mayor en medios no coalescentes que en medios coalescentes,

presentando mayores valores para la constante a . Estos autores desarrollaron estudios en un medio no coalescente, empleado diferentes escalas y variando las velocidades de agitación y de aireación superficial.

Muchos trabajos consideran además el efecto de las características fisicoquímicas del medio sobre el k_La , a través de la inclusión de un mayor número de términos a la Ecuación 2.12. Uno de los parámetros mayormente considerados es la viscosidad del medio. De manera general, se ha descrito que la velocidad de transferencia de oxígeno disminuye al aumentarse la viscosidad del medio, debido a que (Garcia-Ochoa & Gomez, 1998):

- El aumento en la viscosidad disminuye el nivel de turbulencia dentro del reactor, lo que, a su vez, ocasiona una disminución en la intensidad de la transferencia de materia.
- La disminución en el nivel de turbulencia genera un aumento del tamaño de burbuja.

Yagi & Yoshida (1975), estudiaron el efecto del aumento en la viscosidad sobre el k_La , en fluidos newtonianos y no-newtonianos, empleando soluciones de glicerol, poliacrilamida y carboximetilcelulosa, bajo diferentes configuraciones geométricas y operacionales, en un tanque de 12 L. Un estudio similar fue realizado por Garcia-Ochoa & Gomez (1998), empleando soluciones de goma xantana, en un volumen de 20 L, y por Xie et al. (2014.b), quienes compararon 6 combinaciones de impulsores en un tanque de 50 L, también empleando soluciones de goma xantana. Estos últimos autores, reportan que el k_La depende fuertemente tanto de la potencia gaseada suministrada como de la viscosidad del sistema, pero es mucho menos influenciado por el flujo de aireación. Por otro lado, Garcia-Ochoa & Gomez (2004), desarrollaron un modelo teórico para la predicción del k_La , basado en la teoría de penetración de Higbie, la teoría de la turbulencia isotrópica de Kolmogorov, así como en ecuaciones teóricas para la predicción del *hold-up* y el tamaño de burbuja. Las formas de las correlaciones obtenidas y los exponentes para cada término considerado en estos trabajos se muestran en la Tabla 2.1.

Además de la viscosidad, la tensión superficial del medio resulta relevante sobre la transferencia de materia entre las fases gaseosa y líquida. De acuerdo con Albal et al. (1983),

la presencia de surfactantes en el medio afecta la generación de burbujas y el nivel de coalescencia, lo que impacta positivamente el área interfacial. En un trabajo realizado por estos autores, se estudió el efecto de la adición de Triton CF-32 (surfactante capaz de disminuir la tensión superficial del agua de 72 a 35 mN/m) empleando agua como fluido modelo, bajo diferentes configuraciones geométricas, y variando velocidades de agitación y aireación. Observaron que la disminución de la tensión superficial causaba un incremento en el *hold-up* del sistema, así como un incremento en el valor del k_{La} . Las formas de las correlaciones y los valores obtenidos para los exponentes de los términos considerados en las correlaciones obtenidas a partir de este trabajo, así como el trabajo de Yagi & Yoshida (1975), donde se incluye el término para la tensión superficial, se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Valores de los exponentes para las diferentes variables consideradas en las correlaciones propuestas para la predicción del k_{La} encontrados por diversos autores.

Autor	Forma de la correlación obtenida	Valores de los exponentes							
		a	b	c	d	e	f	g	h
Cooper, et al. (1944)	$k_{La} = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a V_S^d$	0.95	---	---	0.67	---	---	---	---
Yagi & Yoshida (1975)	$k_{La} = C1 \cdot N^b D^c V_S^d \eta^e \sigma^f \rho^g D_L^h$	---	2.2	0.87	0.28	-0.4	-0.6	1.0	0.5
Albal et al. (1983)	$k_{La} = C1 \cdot N^b D^c \eta^e \sigma^f \rho^g D_L^h$	---	3.25	3.21	---	-0.17	-1.3	1.46	0.5
Ogut & Hach (1988)	$k_{La} = C1 \cdot N^b D^c V_S^d \eta^e$	---	0.54	0.14	0.50	-0.41	---	---	---
Garcia-Ochoa & Gomez (1998)	$k_{La} = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a V_S^d \eta^e$	0.6	---	---	0.67	-0.67	---	---	---
Garcia-Ochoa & Gomez (2004)	$k_{La} = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a V_S^d \eta^e$	0.8	---	---	0.64	-0.5	---	---	---
Linek, et al. (2012)	$k_{La} = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a V_S^d$	1.17	---	---	0.34	---	---	---	---
Karimi, et al. (2013)	$k_{La} = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a V_S^d$	0.68	---	---	0.58	---	---	---	---
Xie, et al. (2014.a)	$k_{La} = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a V_S^d$	0.56	---	---	0.45	---	---	---	---
Xie, et al. (2014.b)	$k_{La} = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a V_S^d \eta^e$	0.65	---	---	0.33	-0.69	---	---	---

Por otra parte, el tamaño de las burbujas presentes en un sistema gas-líquido es un parámetro importante en la transferencia, ya que guarda relación con el *hold-up* y el área interfacial del sistema, por lo que es un buen criterio para evaluar la eficiencia de la transferencia de oxígeno.

Al igual que para el $k_L a$, se han generado diversas correlaciones para determinar el tamaño de burbuja generado en un sistema. En tanques agitados, la formación de estructuras está determinada por el balance entre los procesos de ruptura (ocasionados por la turbulencia del sistema) y los procesos de coalescencia (donde la resistencia a la deformación depende de la tensión superficial) (Martín et al, 2008). En este sentido, el diámetro Sauter puede expresarse de la siguiente forma (Calderbank, 1958):

$$D_{32} = \frac{\sigma^{0.6}}{\rho^{0.6} \left(\frac{Pg}{V}\right)^{0.4}}$$

Una correlación similar a la anterior fue propuesta por Parthasarathy et al. (1991) quienes determinaron el diámetro Sauter de las burbujas de aire para un sistema no coalescente (agua con 50 ppm de metil-isobutil carbinol), utilizando dos tipos de impulsores diferentes y variando la velocidad de agitación y de aireación superficial. Las observaciones realizadas en diferentes puntos del tanque demostraron que las variaciones en los tamaños de burbuja fueron del $\pm 10\%$, lo que sugiere que el tamaño de burbuja se determina en la zona de descarga del impulsor y es preservado en las diferentes regiones del tanque, hecho que confirma la naturaleza no coalescente del sistema. Los exponentes para los términos considerados en la correlación generada a partir de los resultados obtenidos se muestra en la Tabla 2.2.

Alves et al. (2002) estudiaron el tamaño de burbuja de manera local en diferentes puntos de un tanque agitado bajo diferentes condiciones operacionales, incluyendo diferente tipo y número de impulsores, en medios coalescentes y no coalescentes. Observaron que, para las turbinas tipo Rushton, el tamaño de burbuja incrementa desde la punta de la paleta del impulsor a lo largo de la corriente de descarga, hasta la pared del tanque. Además, describieron cómo el tamaño de burbuja en medios no coalescentes (por adición de

electrolitos o surfactantes) era menor y más sensible al suministro de potencia gaseada que en medios coalescentes (agua). Con los datos obtenidos, generaron dos correlaciones para estimar el tamaño de burbuja en función de P_g/V , cuyos valores encontrados para los exponentes se muestran en la Tabla 2.2. En un trabajo similar realizado por Bouaifi et al. (2001) en un sistema de donde se variaba el flujo de aireación y la velocidad de agitación, empleando diferentes combinaciones de impulsores y empleando agua como fluido modelo, se concluyó que el tamaño de burbuja es afectado por el consumo de potencia gaseada, pero es independiente de la velocidad de aireación superficial. Para todas las configuraciones y las velocidades de aireación empleadas, obtuvieron una correlación para predecir el diámetro Sauter en función del suministro de potencia gaseada, cuyo valor del exponente para esta variable se muestra en la Tabla 2.2.

El efecto de la viscosidad sobre el tamaño de burbuja fue teóricamente estudiado por Martín et al. (2010). Mediante herramientas de dinámica de fluidos computacional y considerando un modelo de balance de poblaciones, determinaron la distribución de tamaños de burbuja y el diámetro Sauter obtenido para múltiples escenarios, considerando diferentes velocidades de aireación y de agitación, así como diferentes soluciones de viscosidad moderada (glucosa, glicerol y *mizuame* (edulcorante líquido)) a partir de los datos previamente reportados en la literatura. Concluyeron que la viscosidad del medio determina las velocidades de ruptura y coalescencia de las burbujas, donde la estabilidad de éstas es mayor en fluidos viscosos. Por otro lado, la velocidad de coalescencia disminuye debido a la desaceleración del movimiento entre las capas superficiales de las burbujas. Los resultados para el diámetro Sauter determinados en este trabajo mostraron buena concordancia con las predicciones hechas a través de la correlación propuesta por Bhavaraju et al. (1978), cuyos valores para los exponentes de las variables consideradas se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Valores de los exponentes encontrados por diversos autores para las diferentes variables consideradas en las correlaciones propuestas para la predicción del D_{32} .

Autor	Forma de la correlación obtenida	Valores de los exponentes			
		a	b	c	d
Calderbank (1958)	$D_{32} = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a \sigma^b \rho^c$	- 0.4	0.6	- 0.6	---
Bhavaraju et al. (1978)	$D_{32} = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a \sigma^b \rho^c \left(\frac{\eta_{liq}}{\eta_{aire}}\right)^d$	- 0.4	0.6	- 0.2	0.1
Parthasarathy et al. (1991)	$D_{32} = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a \sigma^b \rho^c$	- 0.4	0.6	- 0.2	---
Bouaifi et al. (2001)	$D_{32} = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a$	- 0.2	---	---	---
Alves et al. (2002)	$D_{32} = C1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^a$	- 0.14 ^a	---	---	---
		- 0.37 ^b	---	---	---

- a. Sistema coalescente
b. Sistema no coalescente

No obstante, muchas veces tanto las correlaciones para el k_{La} como para el D_{32} no logran predecir los verdaderos valores de estos parámetros, debido a que su aplicación se limita a sistemas similares a aquellos mediante los cuales fueron originalmente determinadas (Galindo, 1996; Garcia-Ochoa & Gomez, 2009).

2.5 Estudio de las dispersiones de tamaños de gotas y burbujas en modelos tetrafásicos de *Trichoderma harzianum*

La dispersión de estructuras ha sido ampliamente estudiada en el grupo del Dr. Enrique Galindo, empleando sistemas modelo con el hongo micelial *T. harzianum*. En dichos sistemas, se ha estudiado la interacción de cuatro fases distintas, agua-aire-aceite-biomasa, donde se determinaron las dispersiones de los tamaños de gotas de aceite y de burbujas en función de diferentes factores.

Lucatero et al., (2003) estudiaron la influencia del tipo de morfología micelial (micelio disperso o en forma de pellets) en la distribución de tamaños de gotas y burbujas. La presencia de micelio disperso produjo un mayor aumento en la viscosidad aparente del medio que con el micelio en forma de pellets, lo que ocasionó el aumento en el tamaño de las gotas de aceite. No obstante, esto no fue así para las burbujas de aire, sino que su tamaño se vio reducido por este tipo de micelio. Esto pudo explicarse como efecto de una

segregación de la población de burbujas de aire en las diferentes regiones del tanque ocurrida a altas concentraciones de biomasa, ya que en la región de captura de imágenes para el análisis (cerca de la pared del tanque) solamente se observaron estructuras pequeñas. No obstante, las observaciones visuales confirmaron que la presencia de burbujas de mayor tamaño se limitaba a la región cercana a la flecha del reactor, fuera de la región de análisis. De manera similar, Córdova-Aguilar (2003) reportó que un aumento en la viscosidad aparente del medio (logrado mediante la adición de carboximetilcelulosa) condujo a una disminución significativa del diámetro tanto de gotas de aceite como de burbujas de aire. Lo anterior pudo deberse a que, debido a la alta viscosidad, las burbujas no se movían lo suficiente para poder coalescer.

Pulido-Mayoral & Galindo (2004) estudiaron el efecto del tipo y concentración de proteína sobre los tamaños de gotas y burbujas, así como sobre los valores del k_La . La presencia de pequeñas cantidades de proteína, independientemente del tipo, ocasionaron una disminución en el tamaño de las estructuras, lo cual vino acompañado de una disminución de la tensión superficial. De manera paralela, los valores del k_La presentaron un incremento de hasta el 100 %, en presencia de proteína.

Estos trabajos fueron llevados a cabo empleando fluidos modelo que simulan momentos clave de las fermentaciones con *T. harzianum* para la producción de γ -decalactona. Sin embargo, se han limitado al estudio de parámetros experimentales discretos (por ejemplo, tres niveles de concentración de biomasa, o dos concentraciones de proteína) dado que no es posible considerar los cambios continuos que ocurren a lo largo del proceso fermentativo real. Por otra parte, la biomasa empleada es generalmente inactivada y lavada antes de usarse. Por tal motivo, en estos sistemas no se considera ningún factor asociado a la biología del sistema más allá de la morfología del micelio, como lo puede ser la respiración celular o la producción de metabolitos. Los resultados generados a partir de estos trabajos son de gran utilidad para implementar mejoras en los procesos fermentativos reales; sin embargo, no son del todo comparables con lo que sucede en los procesos reales, por las razones expuestas.

2.6 Estudio de la dispersión de tamaños de gotas y burbujas bajo condiciones de potencia gaseada constante

Bajo condiciones de velocidad de agitación constante, el consumo de potencia puede verse disminuido como consecuencia de un cambio en las características fisicoquímicas del medio, lo que repercutiría tanto en las distribuciones de tamaño de burbuja como en los valores del $k_L a$. En su trabajo de maestría, Cuervo-Amaya (2016) estudió el efecto de la concentración de surfactantes (proteína) y sólidos (biomasa micelial) sobre la distribución de tamaños de gotas y burbujas en un sistema tetrafásico (agua-aceite-aire-biomasa). Al modificar la concentración de surfactantes y biomasa, encontró una variación hasta de $\pm 28\%$ en los valores del consumo de potencia gaseada, al mantener constante la velocidad de agitación. Esto significaría que, de tratarse de una fermentación real, el valor de P_g/V inicial no sería el mismo a lo largo del proceso.

Dado que el suministro de potencia gaseada es fuente de variación de los tamaños de estructuras, el trabajo de Cuervo-Amaya fue realizado bajo condiciones de potencia gaseada constante retroajustada (0.19 W/L), esto es, mediante la modificación de la velocidad de agitación según las propiedades fisicoquímicas del medio con el fin de mantener fijo el suministro de potencia gaseada. Esto permitió separar el efecto de las variaciones en el suministro de potencia gaseada de aquellos ocasionados por las diferentes concentraciones de surfactante y biomasa. Los resultados más representativos de este trabajo se describen en el artículo publicado por Brito-Bazan et al., (2017) donde pudieron identificarse dos escenarios distintos:

- 1) A bajas concentraciones de biomasa y en presencia de proteína en el sistema, la potencia gaseada es quien controla el diámetro Sauter tanto de gotas de aceite como de burbujas libres (no inmersas en gotas de aceite).
- 2) A altas concentraciones de biomasa, la potencia gaseada no determina el diámetro Sauter de gotas de aceite ni de burbujas libres. La biomasa impacta de manera diferente en la formación de estructuras, hecho que pudo ser identificado al mantener la potencia gaseada constante.

Teniendo esto como antecedente, los estudios posteriormente realizados por el grupo del Dr. Galindo sobre la transferencia de oxígeno en medios con diferentes características también fueron llevados a cabo bajo condiciones de P_g/V constante retroajustada (García-Cerna, 2017; García-Rentería, 2018).

Para medios de comportamiento viscoelástico, se han reportado caídas de potencia significativas relacionadas con el incremento de esta característica (Renade & Ulbrecht, 1977). Así, mantener P_g/V constante para fluidos con este comportamiento podría permitir descartar los efectos que las variaciones que dicho parámetro tienen sobre los tamaños de burbuja y el k_La .

2.7 Producción de ácido γ -poliglutámico por *Bacillus velezensis* como modelo de estudio de sistemas pseudoplásticos/viscoelásticos

El ácido γ -poliglutámico (PGA) es un biopolímero aniónico, hidrosoluble, biodegradable y no tóxico, cuyo peso molecular varía entre los 10 – 8 000 kDa. Está compuesto por monómeros de ácido D- o L-glutámico, unidos mediante enlaces peptídicos entre los grupos α -amino y γ -carboxilo (Figura 2.6), y es producido principalmente por *Bacillus* spp (Luo et al., 2016). Tiene aplicaciones en las industrias farmacéutica, biomédica, alimenticia, de tratamiento de efluentes, entre otras (Buescher & Margaritis, 2007; Regestein née Meissner et al., 2017). Varios autores reportan un comportamiento de tipo pseudoplástico para fermentaciones de PGA, donde la viscosidad aparente del medio alcanza un valor máximo de 275-341 mPa.s (a 56 y 245 s^{-1} , respectivamente) (Bajaj & Singhal, 2010; Regestein née Meissner et al., 2017; Richard & Margaritis, 2003).

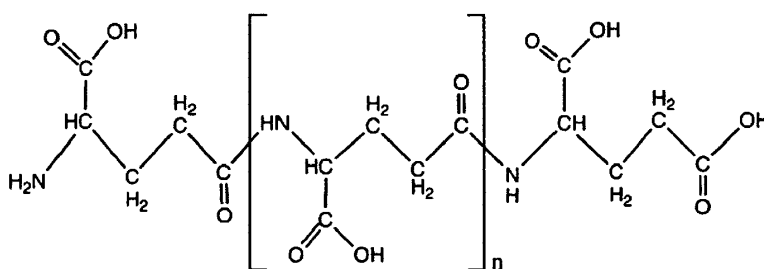


Figura 2.6. Estructura del ácido poliglutámico.

Dentro del grupo del Dr. Galindo, se ha observado que fermentaciones para la obtención de esporas de *Bacillus velezensis* 83 presentan un comportamiento reológico complejo, debido a la producción de PGA. En pruebas preliminares, Medina (2019) caracterizó el comportamiento pseudoplástico de estos medios, obteniendo viscosidades aparentes en el rango de 5 a 11 mPa·s (a 100 s⁻¹). Asimismo, el comportamiento viscoelástico también ha sido caracterizado: en muestras tomadas a las 24 hrs de cultivo, se obtuvieron valores de $G' = 0.49$ Pa $G'' = 0.80$ Pa y $G^* = 0.94$ Pa, a una frecuencia ondulatoria de 94.85 rad·s⁻¹ (datos no publicados).

Recientemente, Cristiano-Fajardo (2020) reportó que el aumento en la viscosidad aparente del medio de cultivo, por la producción de PGA, afectaba negativamente la transferencia de oxígeno en cultivos continuos a escala laboratorio. Dichos experimentos se realizaron en biorreactores de 1.2 L de volumen de trabajo, con una aireación de 0.4 vvm, una agitación de 900 rpm y bajo condiciones de tensión de oxígeno disuelto (TOD) controlada a 17 %, mediante mezcla de gases en el flujo de entrada. Bajo estas condiciones, el valor del k_{La} al inicio del proceso se estimó en 407 h⁻¹. Este parámetro mostró un descenso paulatino hasta caer un 87 % de su valor inicial (a 53 h⁻¹), una vez que el medio de cultivo alcanzó su máxima viscosidad (10 mPa·s). De hecho, el aumento en la viscosidad ocasionó dificultades sobre el control de la TOD, ya que, incluso suministrando oxígeno puro en el flujo de aire a la entrada, este parámetro no pudo mantenerse en el valor establecido.

Con base en lo anterior, este modelo fermentativo resulta de interés para estudiar el efecto que el cambio en el comportamiento reológico del sistema tiene sobre la transferencia de oxígeno.

3. JUSTIFICACIÓN

Con base en lo anteriormente descrito, se resaltan los siguientes aspectos:

- La gran mayoría de los estudios sobre la transferencia de oxígeno son realizados usando fluidos modelo, los cuales no siempre reproducen los fenómenos que realmente ocurren durante un proceso fermentativo.
- La energía disipada al medio, P_g/V , es un factor determinante del tamaño de burbuja, y por ende sobre el valor del k_{La} . Sin embargo, cambios en el valor de P_g/V están a su vez determinados por las características fisicoquímicas del sistema y es necesario separar tales efectos.

Por tanto, el presente estudio pretende contribuir a un mejor entendimiento sobre cómo se da la transferencia de oxígeno, en función del k_{La} y la distribución de tamaños de burbuja, en un medio de comportamiento reológico complejo. El estudio se conducirá en un sistema biológico para la producción de ácido poliglutámico empleando la cepa *Bacillus velezensis* 83, bajo dos diferentes escenarios: 1) a condiciones de velocidad de agitación (N) constante, y 2) a condiciones de potencia gaseada (P_g/V) constante retroajustada, a escala piloto.

4. HIPÓTESIS

La potencia gaseada constante retroajustada determinará los diámetros de burbuja y los valores de k_{La} , al contrarrestar los efectos de los cambios en características reológicas y fisicoquímicas del sistema, comparado con condiciones de velocidad de agitación constante, para un sistema modelo para la producción de PGA empleando la cepa *Bacillus velezensis* 83.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Establecer la influencia de dos esquemas de suministro de potencia (potencia gaseada constante retroajustada y velocidad de agitación constante) sobre los valores del k_{La} y los tamaños de burbuja, en una fermentación para la producción de ácido poliglutámico empleando la cepa *Bacillus velezensis* 83, que presenta características reológicas complejas.

5.2 Objetivos específicos

1. Establecer una estrategia de cultivo a escala laboratorio para generar fermentaciones modelo con *Bacillus velezensis* 83, caracterizando las cinéticas de crecimiento y los parámetros fisicoquímicos del medio.
2. Realizar el escalamiento del proceso a un volumen final de 100 L (escala piloto), empleando el valor de Pg/V inicial como parámetro de escalamiento.
3. Realizar fermentaciones bajo condiciones de N constante y Pg/V constante, determinando la evolución del valor del k_{La} , de las distribuciones de tamaños de burbuja, y las características fisicoquímicas del sistema a lo largo de las fermentaciones.
4. Establecer el efecto de las variables fisicoquímicas y del suministro de potencia gaseada sobre los valores del k_{La} y las distribuciones de tamaño de burbuja.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se esquematiza en la Figura 6.1. Se realizaron cultivos exploratorios a escala laboratorio para generar fermentaciones modelo empleando la cepa *Bacillus velezensis* 83, caracterizando las cinéticas de crecimiento y los parámetros fisicoquímicos del medio.

Una vez definida la estrategia de cultivo, se realizó el escalamiento del proceso a un volumen de 100 L. El proceso fue conducido bajo dos escenarios de suministro de potencia gaseada:

1. **Velocidad de agitación constante:** conservando la velocidad de agitación inicial, registrando la caída en la potencia gaseada suministrada al sistema causada por los cambios en las características del medio de cultivo.
2. **Potencia gaseada constante:** ajustando la velocidad de agitación como respuesta a los cambios en las características del medio de cultivo, de manera que se conserve la potencia gaseada inicial.

Para ambos escenarios de suministro de energía, se realizó la caracterización de las cinéticas de crecimiento y las características fisicoquímicas del medio, así como la evolución de los valores del k_{La} y de las distribuciones de tamaños de burbuja a lo largo de la fermentación.

Con los resultados obtenidos, se estableció la influencia que las variables fisicoquímicas (viscosidad y tensión superficial) y operacionales (Pg/V) tuvieron sobre los valores de k_{La} y las distribuciones de tamaños de burbuja. Se generó una serie de correlaciones empíricas para estimar los valores del k_{La} y el D_{32} en función de las variables fisicoquímicas y operacionales consideradas.

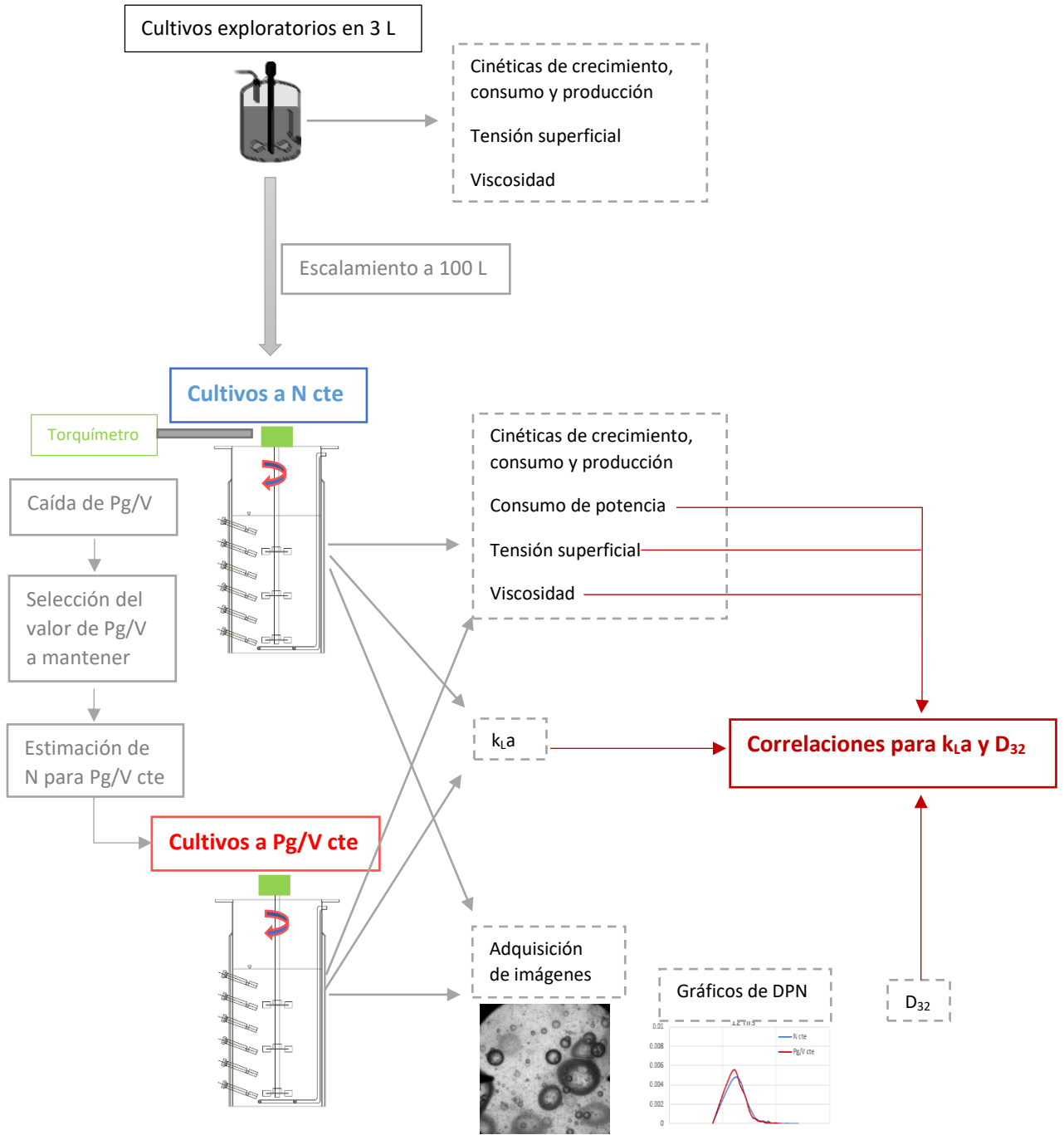


Figura 6.1. Estrategia experimental.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Modelo biológico: *Bacillus velezensis* 83

7.1.1 Activación de la cepa

La cepa empleada *Bacillus velezensis* 83 fue aislada de la filósfera de cultivos de mango y proporcionada por la empresa Agro&Biotecnia. La cepa se conservó en glicerol al 80 %, a una temperatura de -18 °C. Su activación se realizó en medio sólido YPG en cajas Petri, incubando a 29°C, por 12 horas.

7.1.2 Composición de medios de cultivo

7.1.2.1 Medio sólido YPG

El medio sólido YPG fue utilizado para la reactivación de la cepa conservada en glicerol. La composición del medio se muestra en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Composición del medio sólido YPG.

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10.0
Peptona	10.0
Dextrosa	10.0
Agar	15.0

7.1.2.2 Medios líquidos

Se empleó medio YPG para la preparación de inóculos, mientras que la fermentación se realizó en medio mineral modificado. Este último fue definido a partir del medio mineral original, reportado por Soriano-Peña (2016). La composición de los medios utilizados en este trabajo se muestra en las Tablas 7.2 y 7.3:

Tabla 7.2. Composición del medio líquido YPG.

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10.0
Peptona	10.0
Dextrosa	10.0

Tabla 7.3. Composición del medio mineral.

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	15.0
(NH₄)₂SO₄	6.0
K₂HPO₄	16.0
KH₂PO₄	12.8
MgSO₄.7H₂O	1.2
MnCl₂	0.06
CaCl₂	0.3
FeSO₄.7H₂O	0.2

7.1.2.3 Preparación del medio mineral

Se preparó una solución de sulfato de amonio y los fosfatos mono y dibásico de potasio. Se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 2N. La solución se esterilizó y se le añadieron por separado las soluciones de glucosa y las sales restantes, bajo condiciones estériles. Todas las soluciones fueron previamente esterilizadas en autoclave a 121°C por 20 min.

7.1.2.4 Preparación de las adiciones de glucosa y amonio

El cultivo fue alimentado con tres adiciones de glucosa y amonio, de manera que la concentración final de estos componentes en el reactor posterior a cada adición fuera la siguiente:

Tabla 7.4. Concentración de glucosa y amonio en el medio de cultivo posterior a cada adición de glucosa y amonio.

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	15.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.0

Para las fermentaciones a escala piloto, se prepararon soluciones saturadas de glucosa y amonio, de modo que el volumen adicionado fuera mínimo, y el volumen final de 100 L se mantuviera constante. Los volúmenes de las adiciones fueron de 3 y 1.5 L, para las soluciones de glucosa y amonio, respectivamente.

7.1.3 Preparación del inóculo

El desarrollo del inóculo se realizó en tres etapas. Para la primera etapa (activación de la cepa), se tomaron tres asadas de la cepa conservada en glicerol y se estiraron en una caja Petri. Se incubó por 12 h a 29°C. En la segunda etapa se tomó una asada de la cepa crecida en caja, se resuspendió en tubos de ensayo con 5 mL de medio líquido YPG y se incubó a 29°C por 12 horas, agitando a 200 rpm en una incubadora orbital New Brunswick Scientific Co, Inc. (N.J. USA). Para la tercera etapa, se tomaron 2 mL del tubo de la etapa anterior y se agregaron a 18 mL de medio líquido YPG, contenidos en un matraz de 250 mL, completando un volumen de 20 mL de medio de cultivo. Se incubó a 29°C por 12 horas, agitando a 200 rpm. Se tomaron 10 mL del medio crecido en la etapa anterior y se centrifugó a 11 000 rpm (15 450 x g) por 10 min a 25°C en una centrifuga Eppendorf 5810 R, empleando un rotor F 34-6-38. El pellet obtenido se resuspendió en 10 mL de solución salina, la cual sirvió para inocular el reactor de 3 L.

Para el caso de la fermentación en 100 L, posterior a las 12 horas de cultivo en tubos (segunda etapa), se tomó la totalidad del medio líquido YPG contenido en dos tubos y se agregó a dos matraces de 250 mL con 45 mL de medio YPG fresco, completando un volumen de 50 mL. Se incubaron a 29°C por 12 horas, agitando a 200 rpm. Una vez completado el tiempo de cultivo, los 50 mL de medio crecido en cada matraz se vertieron en dos matraces Fernbach de 2800 mL llenados con 450 mL de medio YPG fresco, completando un volumen

de 500 mL en cada matraz, los cuales se incubaron a 29°C por 12 horas, agitando a 200 rpm. Finalmente, el contenido de los dos matraces se repartió en tres frascos de teflón de 500 mL estériles, para ser centrifugados a 6 000 rpm (6 370 x *g*) por 25 minutos a 4° C en una centrífuga Beckman modelo J2-21 empleando un rotor JA-10. Los pellets obtenidos se resuspendieron en un volumen total de 1 L de solución salina al 0.9 % estéril, la cual sirvió para inocular el reactor de 100 L.

7.2 Cultivos alimentados en fermentador de 3 L

En el fermentador de 3 L se realizaron cultivos exploratorios para la producción de PGA por *Bacillus velezensis* 83, en el medio mineral alimentado con tres adiciones de glucosa y amonio.

7.2.1 Condiciones de cultivo 3 L

El cultivo alimentado se llevó a cabo en un biorreactor de 3 L de volumen nominal (Applikon Biotechnology), mostrado en la Figura 7.1.



Figura 7.1. Biorreactor Applikon de 3 L de volumen nominal.

El cultivo se realizó en un volumen de trabajo de 2 L, empleando 2 turbinas Rushton de 6 paletas de 0.045 m de diámetro ($D/T=1/3$) operando a una velocidad de agitación de 900 rpm y un flujo de aireación de 0.8 vvm

El pH fue controlado a un valor de 6.8, por un electrodo de la marca AppliSens 10870095 sumergido en el medio y conectado al sistema de control, que activa la dosificación de H_2SO_4 2N y NaOH 2N a través de dos bombas peristálticas. La temperatura se controló a 30 °C a través de una mantilla eléctrica.

El control de espuma se realizó mediante un sensor de nivel por conductividad conectado al sistema de control y acoplado a una bomba peristáltica, para la dosificación de solución antiespumante (Clerol y AF, Dow Corning, al 30 % v/v).

Se monitoreó la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en el medio de cultivo, empleando un electrodo polarográfico marca AppliSens 01035435.

El cultivo tuvo una duración total de 48 horas, realizando toma de muestra cada 4 h. Para cada muestra se determinó: cuenta total, glucosa residual, concentración y peso molecular del PGA, tensión superficial, así como la caracterización reológica (prueba de flujo y oscilatoria).

7.3 Cultivos alimentados en biorreactor multipuerto de 100 L

El estudio de la transferencia de oxígeno y dispersión de tamaños de burbuja en fermentaciones con *B. velezensis* 83 se realizó en un biorreactor de 190 L de volumen nominal y un volumen de trabajo fue de 100 L (Figura 7.2), cuyas dimensiones se muestran en la Figura 7.3.



Figura 7.2. Biorreactor multipuerto de acero inoxidable.

Para la inserción de la cámara de video y el electrodo de oxígeno, el reactor cuenta con seis puertos Ingold estándar (2.5 cm de diámetro interno), con una inclinación de 20°. Cada puerto permite ubicar la cámara y el electrodo de oxígeno en diferentes alturas del tanque, como se muestra en la Figura 7.3. El sistema de agitación está compuesto por una flecha de 0.0254 m de diámetro, equipada con tres turbinas Rushton estándar de diámetro (D) igual a $1/3 T$, con un disco (D_i) equivalente a $0.75 D$, la altura de las paletas (A) es de $1/5 D$ y su largo (L) de $1/4 D$ (Figura 7.4). Los impulsores tienen una separación entre sí igual a $1D$ y el primer impulsor se encuentra a una distancia de 0.007 m del fondo del tanque.

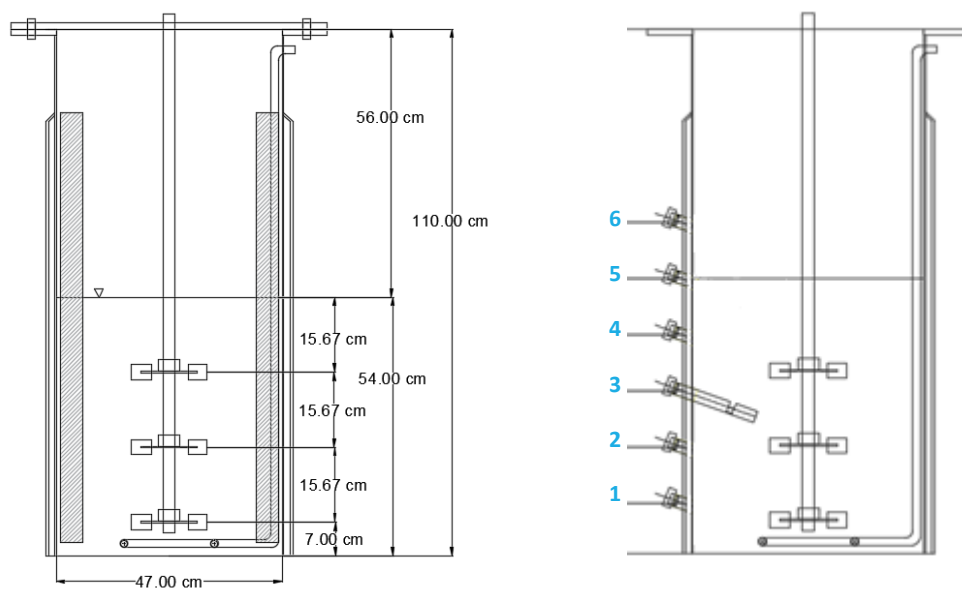


Figura 7.3. Configuración geométrica del biorreactor multipuerto y numeración de los puertos Ingold.

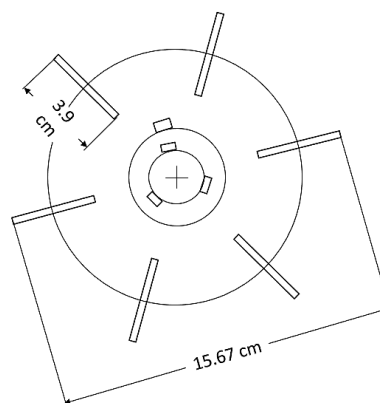


Figura 7.4. Esquema de los impulsores empleados en el biorreactor multipuerto.

7.3.1 Condiciones de cultivo 100 L

La fermentación para producción de PGA por *B. velezensis* en reactor de 3 L fue escalada a volumen de 100 L, empleando como parámetro de escalamiento el valor de potencia gaseada volumétrica (P_g/V), la cual fue estimada mediante la siguiente correlación para P_g/P (Amanullah et al., 2004), y dividiendo entre el volumen del reactor (V).

$$\frac{P_g}{P} = 0.0312 * Re^{0.064} * Fr^{-0.156} * Na^{-0.38} * \left(\frac{T}{D}\right)^{0.8} \quad (\text{Ec. 7.1})$$

donde P es la potencia no gaseada, T es el diámetro del tanque y D el diámetro del impulsor; mientras que Re , Fr y Na son los números adimensionales de Reynolds ($Re = \rho * N * D^2 / \mu$), Froude ($Fr = D * N^2 / g$) y de aireación ($Na = Q / N * D^3$), respectivamente.

De este modo, para la fermentación en reactor de 3 L se determinó un valor de P_g/V de 1.9 W/L. Para conservar este valor de P_g/V a escala de 100 L (bajo la configuración geométrica anteriormente descrita y manteniendo una aireación de 0.8 vvm) la velocidad de agitación correspondiente fue de 389 rpm. Se decidió fijar la velocidad de agitación a 400 rpm. Los detalles del cálculo de la velocidad de agitación para el tanque de 100 L se muestran en el Anexo I.

Las fermentaciones en el biorreactor de acero se llevaron a cabo en un volumen de trabajo de 100 L, un flujo de aireación de 0.8 vvm (equivalente a una velocidad superficial de aireación de 0.0077 m/s) y a una temperatura de 30 °C.

El pH fue controlado a un valor de 6.8 mediante la adición automática de H_2SO_4 10 N y NaOH 10 N a través de dos bombas peristálticas conectadas al sistema de control.

El control de espuma se realizó mediante la dosificación automática de solución antiespumante a base de silicón (GA, Droguería Cosmopolita al 30 % v/v), a través de la señal enviada por un sensor de espuma conectado al sistema de control.

Se conectó la corriente de salida de aire del reactor a un analizador de gases INNOVA AirTech Instruments, para el seguimiento en línea del porcentaje de oxígeno y dióxido de carbono presentes en este efluente, valores que serán empleados para la determinación del $k_L a$.

La duración total del proceso fue de 40h, realizando el muestreo cada 4 h. Para cada muestra se determinó: cuenta total, glucosa residual, concentración y peso molecular del PGA, concentración de lipopéptidos, tensión superficial, conductividad eléctrica, así como la caracterización reológica (prueba de flujo y oscilatoria).

7.3.2 Determinación de potencia gaseada y calibración del sistema de agitación

La determinación de la potencia gaseada volumétrica suministrada al sistema se llevó a cabo mediante el registro del par (*torque*), M , medido a través de un torquímetro (Forsentek, China) montado por debajo del motor de la fecha. El cálculo de potencia gaseada se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$P = 2\pi NM \quad (\text{Ec. 7.2})$$

donde P es la potencia (W), N la velocidad de agitación (rps) y M el par (N.m). El valor de par dado por el equipo es corregido por el factor proveniente de la calibración de par impuesto (calibración estática), así como por la sustracción del valor de par residual. A continuación, se describe la obtención de estos factores.

7.3.2.1 Calibración de par (torque) impuesto

Esta calibración permite conocer la correlación entre el par impuesto (de magnitud conocida) sobre el eje de rotación y la lectura emitida por el equipo. Para esto, se siguió la metodología descrita por García-Rentería (2018): se colocó una única turbina Rushton al extremo de la flecha del tanque y a una de sus paletas se le acopló una cuña que sostiene una cuerda, de la que a su vez pende una serie de pesas de masa conocida a través de un sistema de polea, como se ilustra en la Figura 7.5.

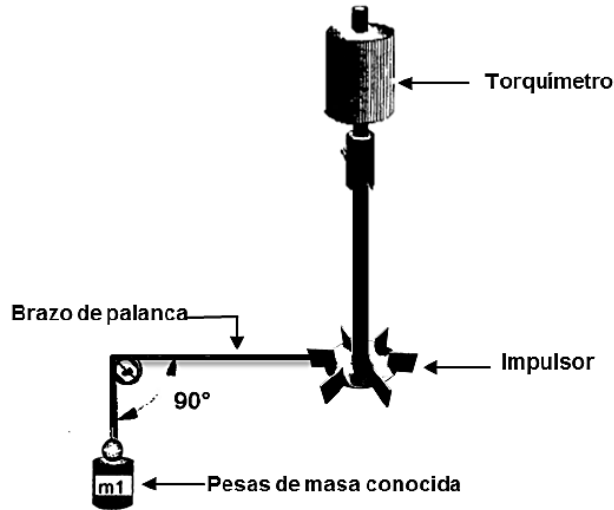


Figura 7.5. Sistema montado para realización de la calibración estática (adaptado de García-Rentería, 2018).

El par impuesto es calculado a partir de la Ecuación 7.3, donde M_{imp} es el par impuesto ($N \cdot m$), m es la masa de la pesa empleada (kg), g es la aceleración gravitacional (9.81 ms^{-2}) y B es la longitud del brazo de palanca (0.084 m).

$$M_{imp} = m \cdot g \cdot B \quad (\text{Ec. 7.3})$$

La Figura 7.6 muestra la recta de correlación entre los valores impuestos y las lecturas arrojadas por el equipo. Los datos muestran un coeficiente de correlación de 0.99 con una pendiente 0.77.

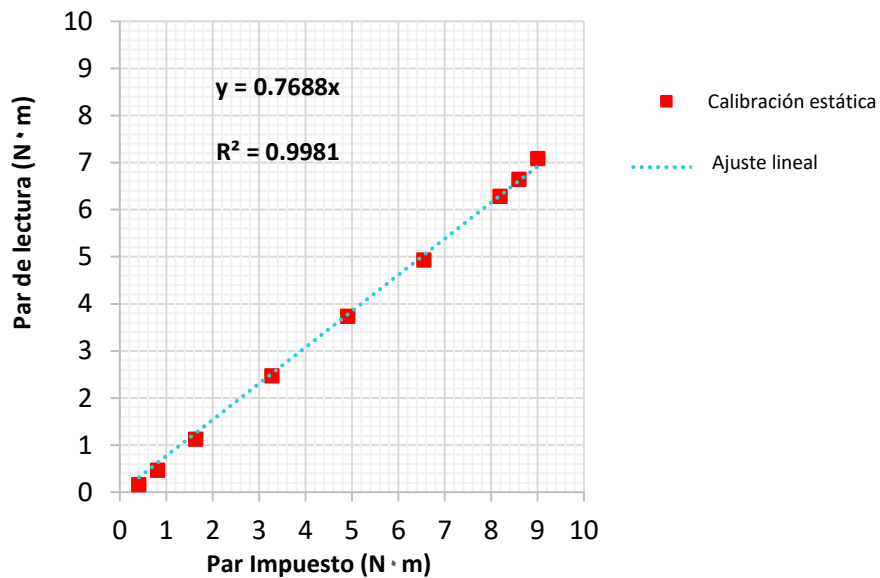


Figura 7.6. Curva de calibración del par impuesto.

Por otro lado, se determinó el valor del **par residual**, correspondiente a la lectura arrojada por el equipo al operar el sistema con la configuración previamente descrita al inicio de la Sección 7.3, pero en ausencia de líquido, es decir, con el tanque vacío. Este valor de par es dividido entre el factor de corrección de la calibración estática (0.77). De este modo, el par residual para una velocidad de agitación de en un rango de 350 a 450 rpm es de 0.16 N·m.

7.3.3 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

La tensión de oxígeno disuelto (TOD) se determinó a lo largo de las fermentaciones empleando un electrodo polarográfico InPro® 6800 (Mettler Toledo), colocado en el puerto número 2 del reactor. El tiempo característico de respuesta es de 14 segundos.

Debido al cambio en las condiciones de TOD, concentración de biomasa y actividad respiratoria del microorganismo durante la fermentación, fue necesario el uso combinado de tres técnicas para la determinación del k_{La} :

1) Técnica estática de degasificación con nitrógeno

Este método es empleado para determinar el k_{La} inicial del sistema, una vez preparado el reactor y previo a la inoculación. Consiste en una degasificación del oxígeno presente en el medio mediante la alimentación de nitrógeno al mismo. Una vez que la concentración de oxígeno disuelto sea de 0 %, se reinicia la alimentación de aire al sistema y se registra el incremento en la TOD con respecto al tiempo. El valor del k_{La} viene dado por el negativo la pendiente de la recta obtenida al graficar $\ln(1 - \frac{C_L}{C^*})$ con respecto al tiempo, donde C_L es la concentración de oxígeno disuelto en el medio, mientras que C^* es la concentración de oxígeno en la saturación (García-Ochoa & Gómez, 2009), correspondiente a 0.22 mmol/L para las condiciones de presión y temperatura de la ciudad de Cuernavaca, Mor.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, obteniéndose buena repetibilidad de los resultados, con variaciones menores al 3 %. Los valores reportados corresponden al promedio de las dos réplicas.

2) Técnica dinámica de degasificación

Esta técnica es empleada para determinar el k_La cuando las variaciones en la TOD son importantes, es decir, fuera del estado estacionario.

Al igual que el método dinámico convencional, esta técnica también implica un corte en el suministro de aire al medio; sin embargo, no se realiza inyección de nitrógeno ya que la degasificación del medio es debida a la respiración celular. Además, la concentración de oxígeno debe mantenerse por encima del 10 % del valor de saturación para evitar la limitación de oxígeno. Esta primera etapa se puede expresar de la siguiente forma:

$$\frac{dC}{dt} = -q_{O_2} \cdot C_x \quad (\text{Ec. 7.4})$$

donde q_{O_2} es la velocidad específica de consumo de oxígeno y C_x la concentración de biomasa en el medio. El valor de q_{O_2} se obtuvo a partir la pendiente de la recta generada al graficar la concentración de oxígeno en el medio vs. el tiempo, dividida entre la concentración de biomasa presente en ese momento del cultivo.

Cuando el suministro de gas es restaurado nuevamente, la concentración de oxígeno aumenta en función del tiempo, hasta alcanzar un valor estable (\hat{C}) que refleja el balance entre el suministro y el consumo de oxígeno en el sistema. A partir del momento en que se reinicia la inyección de aire (t_1) hasta un tiempo diferente (t_2), cambiando así la concentración de oxígeno en el medio de C_1 a C_2 , el valor del k_La puede calcularse a partir de la pendiente positiva obtenida de graficar $\ln\left(\frac{\hat{C}-C_1}{\hat{C}-C_2}\right)$ vs tiempo. Más detalles de esta metodología pueden consultarse en el texto publicado por Doran (2013) b.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, obteniéndose buena repetibilidad de los resultados, con variaciones menores al 9 %. Los valores reportados corresponden al promedio de las dos réplicas.

3) Técnica de balance de gases

Este método es empleado como alternativa a la técnica dinámica, y es aplicable cuando la velocidad de cambio de la concentración de oxígeno con respecto al tiempo, dC_L/dt en la Ecuación 7.5, tiende a cero, alcanzando el estado estacionario (*steady-state*).

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR \quad (\text{Ec. 7.5})$$

$$OTR = k_L a (C^* - C) \quad (\text{Ec. 7.6})$$

$$OUR = q_{O_2} \cdot C_x \quad (\text{Ec. 7.8})$$

Este estado se alcanzó cuando concentración de oxígeno disuelto en el medio cayó hasta valores cercanos a cero ($TOD < 1\%$), manteniéndose constante durante el resto del proceso. Bajo estas condiciones, puede asumirse que todo el oxígeno transferido al sistema es consumido ($OTR = OUR$).

El oxígeno consumido (OUR) se determinó de acuerdo a lo reportado por Cristiano-Fajardo (2020). Para esta técnica se requiere un analizador de gases para medir el porcentaje de oxígeno a la salida del reactor, así como un electrodo de oxígeno para determinar la concentración de este gas disuelto en el medio. Se determinó el porcentaje de N_2 tanto en el flujo de entrada como de salida de aire, por diferencia de los porcentajes de O_2 y CO_2 dados por el analizador de gases.

Para calcular la velocidad de consumo de oxígeno, se estableció un balance de materia tanto para el N_2 como para el O_2 . Se asume que el N_2 no es consumido ni producido por el sistema, por lo que el flujo de entrada es igual al flujo de salida del reactor. Mientras que el oxígeno que entra al sistema es mayor que el que sale de él, ya que es consumido por las células.

Balance de N_2 :

$$F_{aire\ entrada} \cdot \%N_2\ entrada = F_{aire\ salida} \cdot \%N_2\ salida \quad (\text{Ec. 7.9})$$

Balance de O_2 :

$$F_{O_2\ consumido} = F_{aire\ entrada} \cdot \%O_2\ entrada - F_{aire\ salida} \cdot \%O_2\ salida \quad (\text{Ec. 7.10})$$

Donde F_{aire} , es el flujo de aire total de entrada o salida; $\% N_2$, es el porcentaje de nitrógeno en la entrada o salida; $\% O_2$, es el porcentaje de oxígeno en la entrada o salida; y F_{O_2} es el flujo de oxígeno en el reactor.

Al resolver el sistema, se obtiene la siguiente ecuación:

$$F_{O_2 \text{ consumido}} = F_{\text{aire entrada}} \cdot \left[\%O_2 \text{ entrada} - \%O_2 \text{ salida} \left(\frac{\%N_2 \text{ entrada}}{\%N_2 \text{ salida}} \right) \right] \quad (\text{Ec. 7.11})$$

El flujo de oxígeno consumido obtenido en L/h es convertido a moles/h·L, considerando el volumen molar de un gas ideal a las condiciones de presión y temperatura del proceso; y posteriormente dividido por el volumen total de trabajo.

Dado que, en el estado estacionario, la velocidad de transferencia de oxígeno desde las burbujas hacia el medio es igual a la velocidad de consumo de oxígeno por las células presentes en el medio, el $k_L a$ se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$k_L a = \frac{OUR}{C^* - C_L} \quad (\text{Ec. 7.12})$$

7.3.4 Determinación de la distribución de tamaños de burbuja

7.3.4.1 Sistema de videoendoscopía

Se empleó una cámara EnviroCam BL3 (EnviroOptics, EUA), la cual permite visualizar medios de alta turbidez gracias a su sistema de iluminación por luz LED roja. La fuente de luz se encuentra localizada a 1.3 cm de la mirilla, y es a través de este espacio por donde atraviesa la muestra a observar. El área de análisis es de 0.689 cm².

El cuerpo de la cámara y la sonda son de acero inoxidable, y ésta cuenta con una rosca para acoplarse a puertos Ingold estándar (Figura 7.7). La sonda fue desmontada del cuerpo de la cámara y colocada en el puerto Ingold número 3 del fermentador de 100 L (ver Figura 7.3) para ser esterilizada como parte del proceso previo a cada fermentación. Esta posición fue conservada en todas las fermentaciones realizadas. El manejo de la cámara se realiza a través del *software* (EnviroCam Software, EnviroOptics, EUA). La cámara permite tomar videos monocromáticos a 100 fotogramas por segundo (fps), de 1024 x 1024 píxeles.

La captura de imágenes se realizó cada cuatro horas a lo largo del proceso, coincidiendo con los tiempos de muestreo. Dado que la turbidez del medio fue incrementándose paulatinamente a lo largo de las fermentaciones, los parámetros “apertura de obturador”

(Shutter) y “ganancia” (Gain) fueron ajustados a cada tiempo de muestreo. Esto permitió obtener imágenes de nitidez aceptable para su posterior análisis.



Figura 7.7. Esquema de la Envirocam™ BL3.

7.3.4.2 Análisis de imágenes

Las imágenes adquiridas con el sistema *EnviroCam™* fueron analizadas con el programa *Image Pro Plus 5.1.2.59* (Media Cybernetics, EUA). Con este *software* se midió el radio en píxeles de las burbujas, seleccionando a cada objeto con la herramienta para crear contornos circulares para el caso de objetos de circunferencia definida. Por otro lado, en el caso de objetos deformes (Figura 7.8) se hizo el trazo manual del perímetro del objeto, cuyo diámetro equivalente fue calculado (en píxeles) por el *software*. Los valores obtenidos en ambos casos fueron empleados para calcular el diámetro en píxeles y posteriormente en μm , multiplicando por el factor $6.94 \mu\text{m}/\text{pixel}$, previamente determinado por Holguín-Salas (2019).

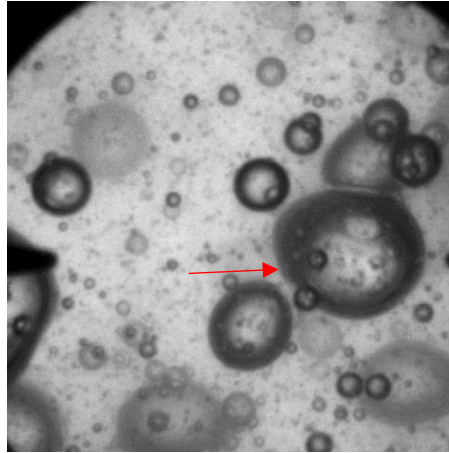


Figura 7.8. Estructuras observadas durante las fermentaciones con *B. velezensis* 83 en el biorreactor multipuerto. La flecha señala un objeto considerado como “deforme”.

Para determinar el número mínimo de objetos que deben ser medidos, de modo que el error experimental de los datos medidos sea menor al 5 %, se utilizó la siguiente ecuación (Valdivieso et al., 2011)

$$n = \frac{N_b \cdot \sigma^2 \cdot z^2}{[(N_b - 1) \cdot e_{exp}^2] + \sigma^2 \cdot z^2} \quad (\text{Ec. 7.13})$$

En donde e_{exp} es el error experimental (5 %), z es el valor del estadístico correspondiente a la curva de distribución normal (1.96, para un nivel de confianza del 95 %), σ es la desviación estándar de la población N_b , y n es el número de objetos que se deben medir como muestra representativa. Para ello, primero se evaluó una población 3053 burbujas, lo que permitió conocer los valores de desviación estándar de una población grande de objetos.

A través de esta ecuación se obtuvo que 632 objetos son la cantidad estadísticamente representativa para el análisis, por lo que decidió redondear este número a 700. De esta cantidad de objetos a evaluar, menos del 1% de la población de burbujas observadas corresponde a los objetos denominados “deformes”, los cuales se observan durante las primeras 12 horas de cultivo.

Además, se establecieron los criterios a considerar para la selección de objetos a medir en cada cuadro, en función de la nitidez de los bordes de las burbujas. Dado que la turbidez del medio aumenta conforme avanza la fermentación, las imágenes obtenidas a tiempos

finales resultan menos nítidas que aquellas correspondientes a las primeras horas del proceso. Por tal motivo, fue necesario determinar el tamaño mínimo identificable para este tipo de condiciones, como se muestra en la Figura 7.9.

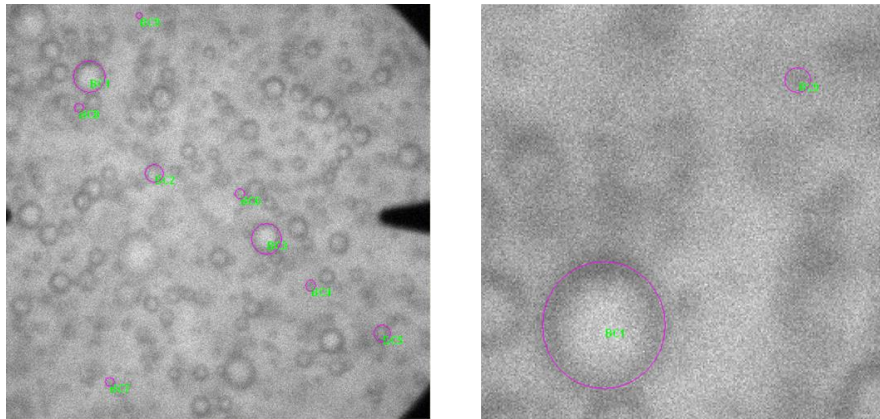


Figura 7.9. Estructuras observadas a las 44 horas de cultivo durante las fermentaciones con *B. velezensis* 83 en el biorreactor multipuerto: a izquierda, imagen original; a la derecha, imagen ampliada.

Así, el radio mínimo cuantificable bajo estas condiciones corresponde a 7 píxeles (97.16 μm), por lo que este se definió como el radio mínimo para todo tiempo de muestreo.

7.3.4.3 Tratamiento estadístico de los datos de tamaño de burbuja

Para cada tiempo de muestreo se determinó el diámetro de 700 objetos, se ordenaron de manera ascendente y se generaron los histogramas correspondientes. El límite inferior para la primera clase se fijó en 90 μm , en todos los casos; mientras que el intervalo de clase utilizado fue de 50 μm , valor determinado según lo descrito por Cuervo-Amaya (2016).

Posteriormente, se realizaron los histogramas de Densidad de Probabilidad de Número (DPN), empleando la siguiente ecuación:

$$DPN_j = \frac{f_{r,j}}{i} \quad (\text{Ec. 7.14})$$

Donde DPN_j es la densidad de probabilidad de número de la j -ésima clase, $f_{r,j}$ es la frecuencia relativa de j -ésima clase, e i es el intervalo de clase.

Adicionalmente, se realizaron histogramas de fracción de volumen acumulado. Para ello, fue necesario calcular la fracción del volumen ocupado por las burbujas medidas pertenecientes a una clase específica sobre el volumen total de la dispersión, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$X_{vol,j} = X_{vol,j-1} + x_j \quad (\text{Ec. 7.15})$$

$$x_j = \frac{V_j}{\sum_{j=1}^m V_j} \quad (\text{Ec. 7.16})$$

$$V_j = f_j * \left(\pi \frac{d_j^3}{6} \right) \quad (\text{Ec. 7.17})$$

siendo $X_{vol,j}$ la fracción de volumen acumulado de la j -ésima clase; $X_{vol,j-1}$ la fracción de volumen acumulado de la $(j-1)$ -ésima clase; x_j la fracción del volumen total contenido en la clase j ; V_j el volumen de la j -ésima clase; m el número total de clases; f_j la frecuencia en la j -ésima clase y d_j el diámetro de la j -ésima clase.

Otro parámetro empleado para caracterizar las distribuciones fue el diámetro Sauter (D_{32}), el cual es considerado un estadístico de momento que relaciona el centro de gravedad de dos características de la muestra: el tercer momento del diámetro (D_3) y el segundo momento del diámetro (D_2), representando así el volumen de las estructuras en la dispersión con el área proyectada por las mismas, calculado a partir de la siguiente fórmula:

$$D_{32} = \frac{\sum_{j=1}^m d_j^3 * f_j}{\sum_{j=1}^m d_j^2 * f_j} \quad (\text{Ec. 7.18})$$

siendo D_{32} el diámetro Sauter; m , el número de clases; d_j , el diámetro de la j -ésima clase y f_j , la frecuencia de la j -ésima clase.

7.4 Métodos analíticos

7.4.1 Cuenta total

Se realizó conteo directo al microscopio de células totales de *Bacillus velezensis* 83, utilizando una cámara de Neubauer. La cámara se encuentra dividida en 25 cuadrantes, cada uno de los cuales tiene una capacidad de 4×10^{-6} mL. Se realizó el conteo de las células

contenidas en cuatro de estos cuadrantes. El valor promedio se utilizó para calcular la concentración celular, de acuerdo con la siguiente relación:

$$\frac{cel}{mL} = \frac{\text{promedio de células por cuadrante}}{4 \times 10^{-6} ml} * \text{factor de dilución} \quad (\text{Ec. 7.19})$$

7.4.2 Glucosa residual

La concentración de glucosa residual en el medio de cultivo se realizó mediante el método YSI (Yellow Spring Instruments). Este método se basa en la cuantificación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) liberado a partir de la reacción enzimática entre la glucosa-oxidasa (inmovilizada en una membrana en el sensor del equipo) y la glucosa presente en la muestra a analizar. Para esta determinación, se vertió 1 mL de muestra en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 12 000 rpm ($10\,000 \times g$) durante 10 minutos para separar la biomasa, utilizando una centrífuga WiseSpin modelo CF-10. Se realizó la determinación de glucosa en el sobrenadante obtenido.

La determinación de glucosa residual en el medio fue llevada a cabo inmediatamente al tomar la muestra. Este seguimiento en continuo permitió definir el momento para las adiciones de los pulsos de glucosa y amonio, los cuales fueron alimentados al reactor cuando la concentración de glucosa residual del medio fuera menor o igual a 3 g/L.

7.4.3 Concentración y peso molecular del PGA

La concentración y el peso molecular del polímero se determinó mediante análisis de HPLC. Se utilizó una columna ultrahidrogel 500 y una columna lineal como precolumna, así como un detector de índice de refracción (Waters 2414). Como fase móvil se empleó una solución de $NaNO_3$ 0.1 M, a un flujo de 0.8 mL/min y a una temperatura de 38°C. Las muestras analizadas fueron previamente centrifugadas para retirar la biomasa.

Para la determinación del peso molecular se realizó una curva de calibración con estándares de óxido de polietileno (Waters), de acuerdo con los siguientes pesos moleculares: 24.2, 41.3, 70.9, 163, 311, 502 y 933 kDa, según lo reportado por Medina (2019).

7.4.4 Concentración de surfactina y bacilomicina

La concentración de estos compuestos se determinó mediante análisis de HPLC. Se utilizó una columna ZorbaxSB-C18 (4.6 mm x 150 mm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), empleando el sistema Waters 2695. La fase móvil se componía de una solución de 0.1 % ácido trifluoroacético (TFA) en agua (fase A), y 0.1 % de TFA en acetonitrilo (fase B). Las muestras fueron eluidas por 14 minutos usando 40 % de fase B a 32°C a un flujo de 0.3 mL/min, seguido de un gradiente lineal de 40-85 % por 1 minuto y mantenido a 85% por otros 36 minutos; finalmente, por otro gradiente lineal de 40-85 % por 1 minuto, continuando a 40 % por 8 minutos. El patrón de elución se monitoreó mediante la determinación de la absorbancia a 205 nm. Se empleó surfactina e iturina puras como estándares de calibración (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Las muestras analizadas fueron previamente centrifugadas para retirar la biomasa.

7.4.5 Tensión superficial

La determinación de la tensión superficial de las muestras recolectadas se llevó a cabo mediante un tensiómetro de placa de Wilhelmy (ST-PLUS, Tantech Inc., EUA), de acuerdo a la metodología descrita por Cuervo-Amaya (2016). Las determinaciones se realizaron a una temperatura de 30 °C, correspondiente a la temperatura de la fermentación. Para este análisis se requirió un volumen mínimo de 15 ml de muestra, las cuales fueron previamente centrifugadas a 11 500 rpm durante 15 min para retirar la biomasa. Se empleó agua desionizada como fluido de referencia.

7.4.6 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica de las muestras se determinó empleando un conductímetro marca OAKTON (pH/CON 510 series). Para el análisis, las muestras previamente centrifugadas, se llevaron a una temperatura de 30° C en baño María. Se empleó una solución estándar de calibración de 1440 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a 26° C, de la marca Thermo Scientific.

7.4.7 Caracterización reológica

7.4.7.1 Prueba de flujo

La determinación de la viscosidad aparente y el carácter pseudoplástico de las muestras fue realizada mediante pruebas de flujo en un reómetro DHR-3 (TA Instruments). Para fines

comparativos con otros trabajos realizados, la viscosidad aparente se reporta a una velocidad de deformación de 100 s^{-1} .

Este equipo se encuentra ubicado en el Laboratorio de Análisis de Materiales Complejos, a cargo del Dr. Octavio Manero, en el Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM), en Ciudad Universitaria, CDMX. Se trata de un equipo de esfuerzos controlados. La geometría empleada fue cilindros concéntricos de doble *gap* (Figura 7.10) cuyas medidas se muestran en la Tabla 7.5. El rango de velocidades de deformación fue de 0.1 a 300 s^{-1} (suficiente para alcanzar el *plateau* newtoniano para η_{ω}), medidos a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

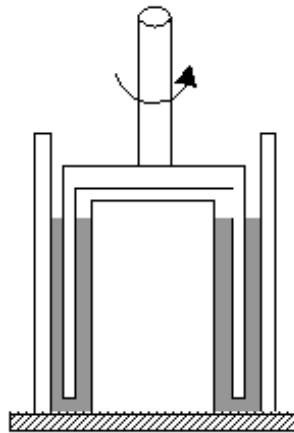


Figura 7.10. Esquema de la geometría de cilindros concéntricos de doble gap.

Tabla 7.5. Medidas de la geometría empleada en el equipo DHR-3.

Diámetro interno de la copa	30.2 mm
Diámetro interno del bob	32 mm
Diámetro externo de la copa	37 mm
Diámetro externo del bob	35 mm
Altura sumergida	54.5 mm
Gap de operación	500 μm

7.4.7.2 Prueba oscilatoria

Para caracterizar el comportamiento viscoelástico del caldo de cultivo se realizaron pruebas oscilatorias en el reómetro DHR-3. Este análisis se realizó previo a la prueba de flujo, empleándose la misma geometría antes descrita.

Para la determinación de la zona lineal se realizaron dos barridos de amplitud, fijando la frecuencia a 10 y a 1 Hz, respectivamente. Los porcentajes de deformación así establecidos se fijaron entre 30 y 40 %. Una vez delimitada la zona lineal, se realizó la prueba oscilatoria, en un rango de frecuencias de oscilación de 0.1 a 300 rad/s. El análisis se realizó fijando la temperatura a 30° C.

7.4.7.3 Modelado de pruebas reológicas

Se seleccionaron los datos experimentales con mayor respuesta viscoelástica (dada por la mayor concentración de PGA obtenida) y se ajustaron a un modelo reológico de Maxwell Multimodal, empleando el *software Wolfram Mathematica* versión 12.0.0 para el cálculo y ajuste de los parámetros reológicos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Cinética de crecimiento y producción de PGA por *B. velezensis* 83 en biorreactor de 3 L

La primera etapa de este trabajo consistió en establecer una estrategia de cultivo para la obtención de una fermentación modelo que presentara cambios importantes en sus características reológicas a lo largo del proceso, a escala laboratorio.

Para esto, se realizó el cultivo en lote alimentado de *Bacillus velezensis* 83, en biorreactor de 2 L de volumen de trabajo, utilizando medio mineral a las concentraciones establecidas en la Sección 7. Estos cultivos exploratorios se llevaron a cabo a una velocidad de agitación constante de 900 rpm. El seguimiento se realizó durante 48 horas, tomándose muestra cada 4 horas. La fermentación se llevó a cabo por duplicado. En la Figura 8.1 se muestran el promedio de los resultados para las cinéticas de crecimiento, el consumo de glucosa, la producción de PGA y el perfil de TOD. Las cinéticas de viscosidad aparente y tensión superficial corresponden a los datos obtenidos de la segunda réplica realizada.

El reactor se inoculó con una concentración aproximada de 5.6×10^7 cel/mL. La fase de crecimiento exponencial se observó entre las 8 y las 16 horas de cultivo (Figura 8.1 a) y el crecimiento máximo alcanzado fue de 5.1×10^9 cel/mL. La velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.42 h^{-1} , similar a la reportada por Cristiano (2012) para esta cepa en un medio de diferente composición (0.45 h^{-1}).

La primera alimentación de glucosa y amonio se dio entre las 16 y 18 horas, momento en el cual la concentración de glucosa residual en el medio se encontraba por debajo de los 5 g/L (Figura 8.1 b). Las adiciones del segundo y tercer pulso de glucosa y amonio se realizaron a las 6 y 8 horas posteriores a la primera adición, respectivamente. De acuerdo con Wilming et al. (2013), el exceso de fuente de carbono combinado con condiciones de limitación de oxígeno, produce represión catabólica de las enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, causando la acumulación de α -cetoglutarato. Es a partir de este intermediario que el flujo metabólico se redirecciona hacia la síntesis de ácido glutámico y posteriormente, hacia ácido γ -poliglutamato.

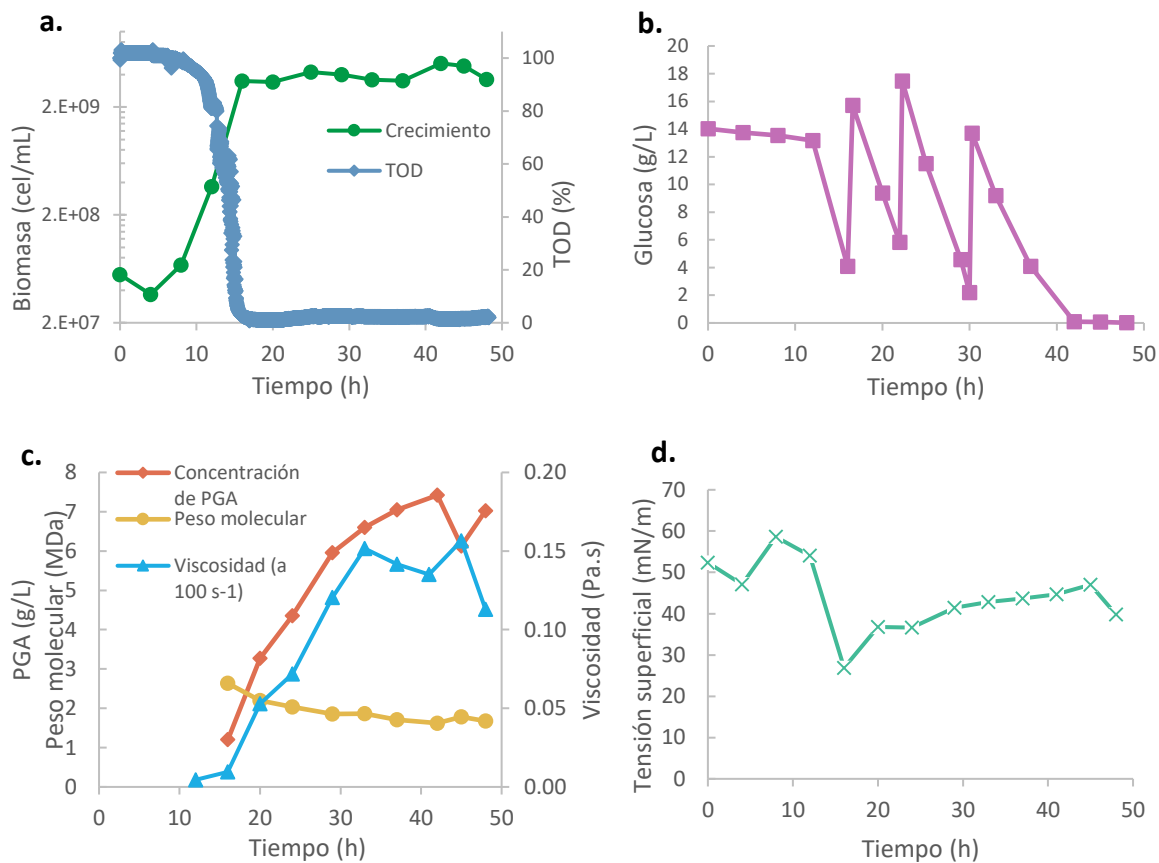


Figura 8.1. Evolución de **a)** biomasa y TOD; **b)** concentración de glucosa residual; **c)** concentración y peso molecular del PGA y viscosidad del medio; y **d)** tensión superficial del medio, para los cultivos exploratorios para la producción de PGA por *Bacillus velezensis* 83, a escala de 3 L bajo condiciones de velocidad de agitación constante de 900 rpm, 0.8 vvm y 30 °C.

La fuente principal de nitrógeno en el medio viene dada por la sal de sulfato de amonio. La alimentación de esta sal en cada adición garantiza la no limitación de nitrógeno en el medio. De acuerdo con Kunioka (1995) y Zeng et al. (2017), el incremento en la concentración de amonio en el medio trae consigo un aumento en la producción de PGA, ya que está involucrado en la síntesis de los monómeros de ácido glutámico. No obstante, no se realizó seguimiento de la concentración de amonio residual en el medio.

La síntesis de PGA inició a las 16 horas, alcanzando una concentración máxima de 7.4 g/L a las 42 horas de cultivo (Figura 8.1 c). El peso molecular del polímero a lo largo del cultivo se

encontró entre 2.4 MDa (a las 16 h de cultivo) y 1.7 MDa (al finalizar el mismo). La producción de PGA fue evidente una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento, que coincide con la disminución de la TOD a valores por debajo del 5 % (condiciones de limitación de oxígeno). Mediante las alimentaciones realizadas se garantizó el exceso de fuentes de carbono y nitrógeno en el medio, de manera que se favoreciera la producción de PGA, lo que conllevó al aumento en la viscosidad aparente del medio.

El comportamiento de la tensión superficial durante el cultivo (Figura 8.1 d) estuvo influenciado en gran medida por la adición de antiespumante (que fue mayor entre las 12 y las 30 horas de cultivo), y, muy probablemente, por la presencia de metabolitos con actividad surfactante (no cuantificados a esta escala de producción). Esto se discute en la Sección 8.4.1.2.

8.2 Caracterización reológica del medio de cultivo

8.2.1 Prueba de flujo

Conforme al avance de la fermentación, se fue incrementando la viscosidad del medio de cultivo, debido a la producción de PGA (Figura 8.2 a). El carácter pseudoplástico del caldo de cultivo pudo confirmarse mediante la prueba de flujo, al disminuir la viscosidad aparente conforme se incrementaba la velocidad de deformación (Figura 8.2 b).

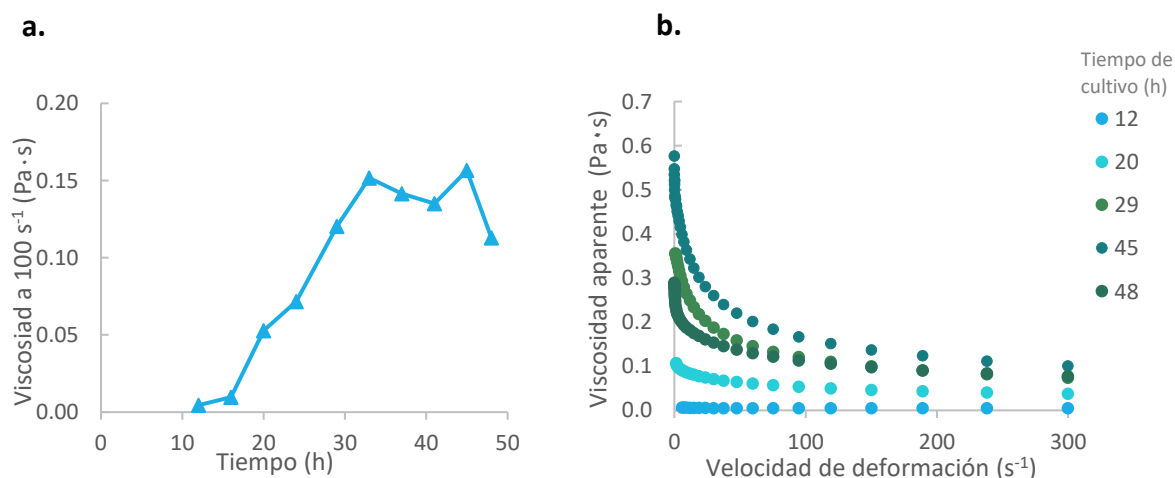


Figura 8.2. Evolución del comportamiento reológico observado en los cultivos exploratorios para la producción de PGA por *Bacillus velezensis* 83, a escala de 3 L bajo condiciones de velocidad de agitación

constante de 900 rpm: **a)** Incremento de la viscosidad aparente a lo largo del cultivo; **b)** reogramas de los diferentes tiempos de muestreo.

Con fines comparativos con otros trabajos realizados en el grupo de investigación del Dr. Galindo, la viscosidad aparente se reporta a una velocidad de deformación de 100 s^{-1} . La máxima viscosidad aparente obtenida fue de 0.150 Pa.s a las 33 horas de cultivo, siendo la concentración de PGA de 6.6 g/l. Para un cultivo realizado en matraces, Wilming et al. (2013) reportan una viscosidad aparente máxima de 0.060 Pa.s, a 300 s^{-1} ; a esa misma velocidad de deformación, la viscosidad aparente obtenida en este estudio fue de 0.084 Pa.s. En dicho trabajo no se reporta la concentración de PGA correspondiente.

Mediante el ajuste a la ley de Potencia (Ecuación. 2.4) se determinaron los valores de los índices de flujo (n) y consistencia (K) para cada tiempo de muestreo, obteniéndose altos coeficientes de regresión (> 0.97). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 8.1. Estos índices también han sido reportados por Richard & Margaritis (2003), para una fermentación con *B. licheniformis*: el índice de consistencia máximo fue de aproximadamente 0.4 Pa.s^n , mientras que el índice de flujo mínimo fue de 0.9.

Posteriormente, se observó la disminución de los valores de K y un aumento en los valores de n , indicando una disminución en el comportamiento pseudoplástico. Esto fue debido a la degradación del PGA por enzimas depolimerasas, para emplearlo como fuente alterna de carbono una vez agotada la glucosa en el medio (Regestein née Meissner et al., 2017).

Tabla 8.1. Índices de consistencia (K) y flujo (n) obtenidos para el cultivo alimentado con *B. velezensis* 83.

Tiempo (h)	K	n
12	0.007	0.91
16	0.015	0.90
20	0.150	0.77
24	0.236	0.74
29	0.447	0.72
33	0.598	0.71
37	0.526	0.72
41	0.460	0.74

45	0.466	0.79
48	0.240	0.85

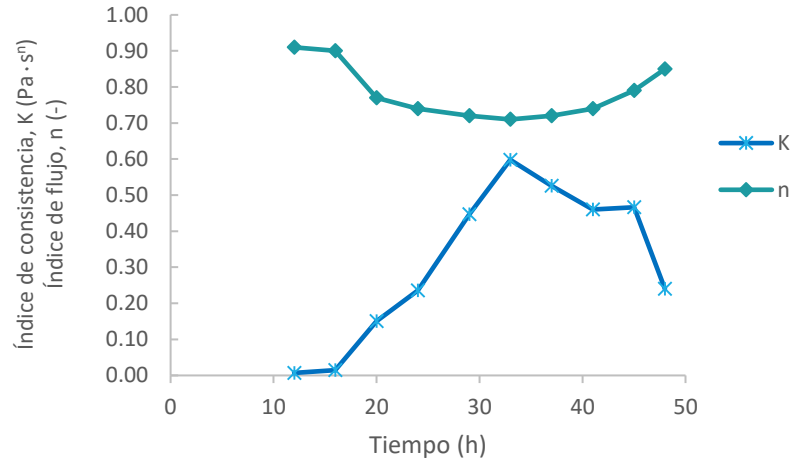


Figura 8.3. Evolución de los índices de flujo y de consistencia en los diferentes tiempos del cultivo alimentado con *B. velezensis* 83, a escala de 3 L bajo condiciones de velocidad de agitación constante de 900 rpm.

8.2.1.1 Viscoelasticidad (esfuerzos normales)

En el reómetro DHR-3 se llevaron a cabo pruebas en busca de la presencia de esfuerzos normales. No obstante, en ningún tiempo de muestreo hubo registro de esfuerzos normales cuantificables.

8.2.2 Prueba oscilatoria

El comportamiento viscoelástico de un material puede ser caracterizado mediante ensayos oscilatorios, los cuales proporcionan información sobre la microestructura del polímero a través de la aplicación de un estrés (o deformación) sinusoidal pequeño.

Mediante este análisis se obtuvieron los módulos de pérdida, almacenamiento y complejo, así como la viscosidad compleja para cada muestra analizada. En la Figura 8.4 se muestra el espectro obtenido a partir del análisis de la muestra correspondiente a las 33 horas, momento en el cual, tanto el carácter viscoso como el elástico, alcanzaron sus máximos valores. Se observa que el módulo de pérdida G'' está por encima del módulo de

almacenamiento, G' , lo que indica la predominancia del carácter viscoso sobre el elástico. Dicha predominancia de la componente viscosa permaneció constante a lo largo de toda la fermentación.

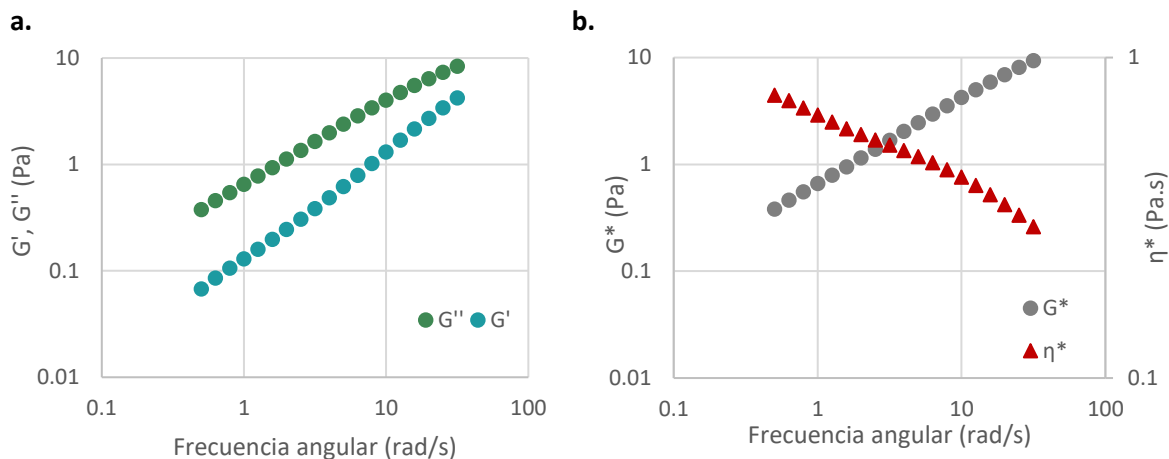


Figura 8.4. Espectros obtenidos mediante reología oscilatoria para la muestra correspondiente a las 33 horas de cultivo con *Bacillus velezensis* 83 para la producción de PGA en biorreactor de 3 L: **a)** Módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G''); **b)** Viscosidad compleja (η^*) y módulo complejo (G^*).

Con fines comparativos, se tomaron los valores de G' , G'' , G^* y η^* correspondientes a una frecuencia de 10 rad/s (definida arbitrariamente). En la Figura 8.5 se muestra el incremento en estos parámetros a lo largo de la fermentación.

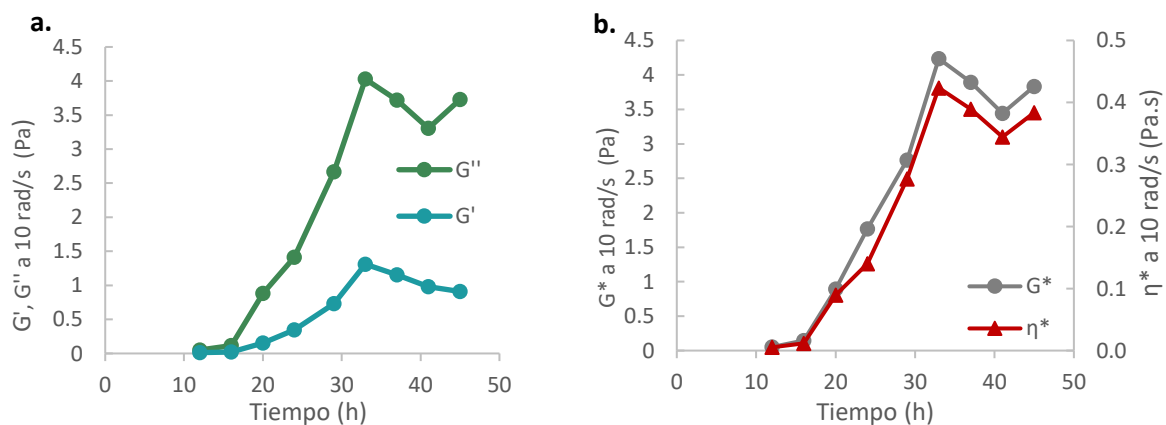


Figura 8.5. Evolución del comportamiento viscoelástico del cultivo con *Bacillus velezensis* 83 para la producción de PGA en biorreactor de 3 L: **a)** Módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G''); **b)** Viscosidad compleja (η^*) y módulo complejo (G^*).

A las 16 horas de cultivo, el módulo de almacenamiento presentaba un valor de 0.1 Pa, que posteriormente fue incrementándose hasta alcanzar un máximo de 1.31 Pa a las 33 horas de cultivo. El incremento gradual en el carácter viscoso (G'') mostró la misma tendencia que el carácter elástico (G'), partiendo de 0.07 Pa a las 16 horas de cultivo (a 10 rad/s), hasta alcanzar 4.03 Pa a las 33 horas (Figura 8.5 a).

De este modo, se concluyó que la estrategia de cultivo en lote alimentado con tres pulsos de glucosa y amonio presenta una evolución importante en las características reológicas del sistema. Por este motivo, se procedió a realizar el escalamiento del proceso, para emplearlo como modelo de estudio de la transferencia de oxígeno a escala piloto.

8.3 Escalamiento a reactor de 100 L

Para efectuar el estudio de la transferencia de oxígeno a la escala piloto, se llevó a cabo el escalamiento de la fermentación en lote alimentado realizada en 3 L (conducida a una velocidad de agitación constante de 900 rpm), a reactor de 100 L de volumen de trabajo.

El criterio de escalamiento empleado fue la potencia gaseada volumétrica inicial (P_g/V), dado que ésta tiene influencia sobre la transferencia tanto de materia como de calor, así como en los tiempos de circulación y de mezclado, además de que ser quién determina principalmente el valor del k_{La} del sistema (Ascanio et al., 2004). De este modo, se calculó el valor de P_g/V para el inicio de la fermentación en reactor 3 L, el cual fue de 1.9 W/L (ver Anexo I). Partiendo de este valor se realizó la determinación de la velocidad de agitación a la que debía conducirse el proceso a escala de 100 L, la cual se fijó en 400 rpm (para una aireación de 0.8 vvm). Así, esta etapa de escalamiento a su vez constituyó la primera réplica conducida bajo condiciones de velocidad de agitación constante.

La Figura 8.6 muestra las cinéticas de la fermentación en el biorreactor de 100 L, a velocidad de agitación constante de 400 rpm. En el escalamiento se alcanzó una concentración celular máxima de 7×10^9 cel/mL, con una velocidad específica de crecimiento de 0.37 h^{-1} . La concentración máxima de PGA fue de 7.3 g/L, obtenidos a las 36 horas de cultivo con un peso molecular promedio de 1.7 MDa, y una viscosidad aparente de 0.160 Pa.s (a 100 s^{-1}).

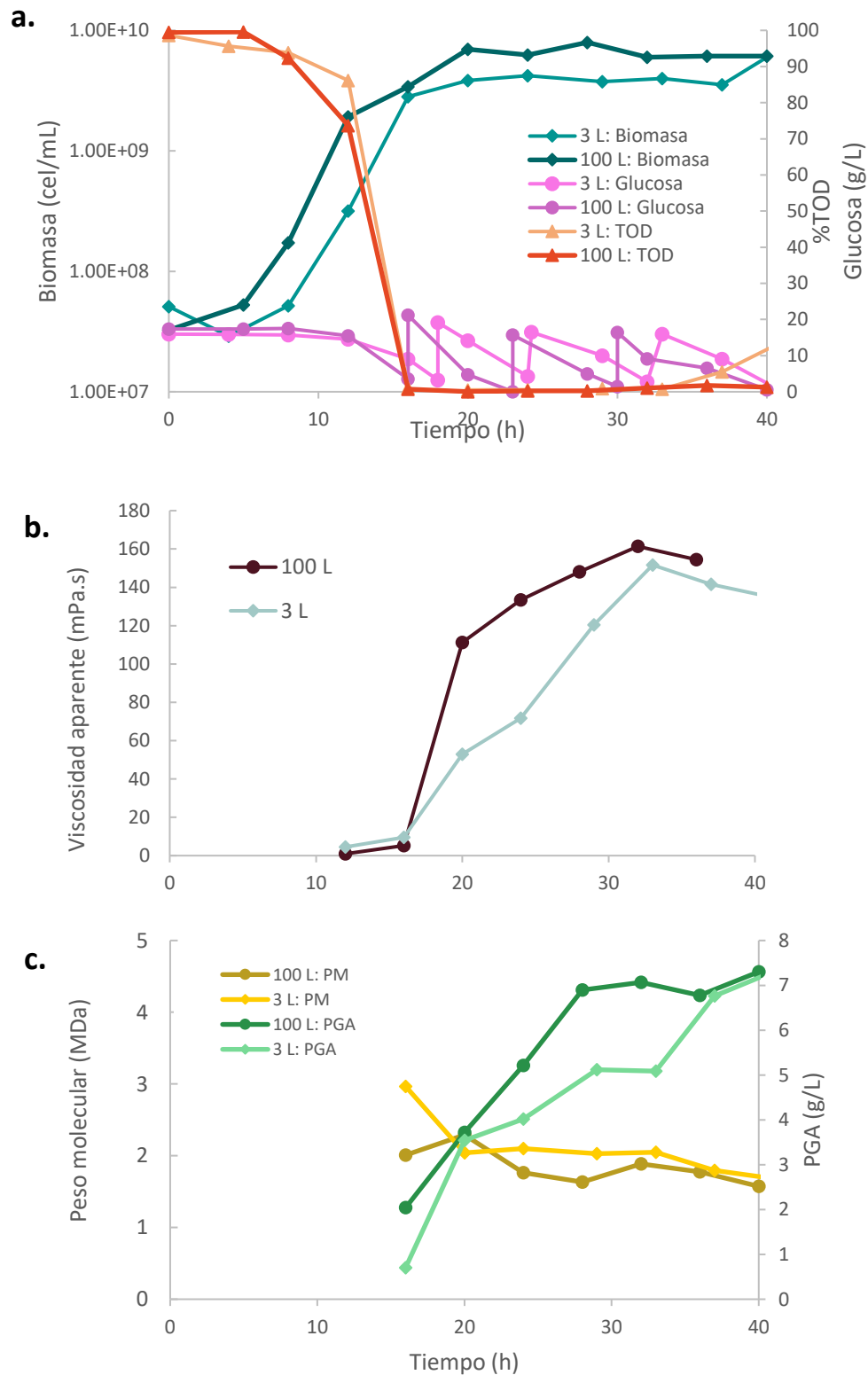


Figura 8.6. Comparación entre cinéticas de fermentaciones en biorreactor de 3 y 100 L, a velocidades de agitación constantes de 900 rpm y 400 rpm, respectivamente. **a)** Biomasa, glucosa residual y TOD; **b)** Viscosidad aparente ($a\ 100\ s^{-1}$); **c)** Concentración y peso molecular de PGA.

La capacidad viscosificante del polímero producido fue similar en ambas escalas. Este parámetro se obtuvo a partir de los exponentes generados del ajuste a un modelo exponencial de las curvas de viscosidad aparente contra concentración de PGA (Figura 8.7) (Gómez-Pazarín, 2014). Los valores obtenidos resultaron bastante cercanos, siendo de 0.43 y 0.47 L/g, para 3 y 100 L, respectivamente.

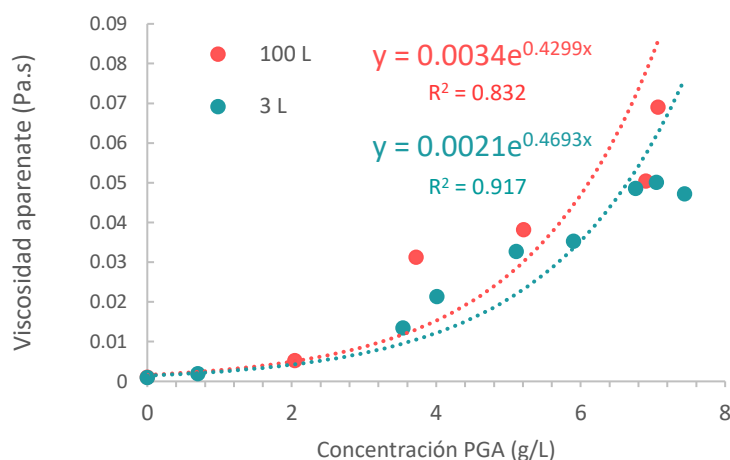


Figura 8.7. Capacidad viscosificante del PGA producido en a escala de 3 y 100 L, a velocidades de agitación constantes de 900 rpm y 400 rpm, respectivamente.

En la Figura 8.8 se muestra la evolución de los índices de consistencia (K) y de flujo (n) para ambas escalas. Los valores obtenidos para los índices de flujo fueron comparables para ambas escalas de proceso, lo que confirma una evolución del carácter pseudoplástico similar a la previamente observada en el volumen de 3 L.

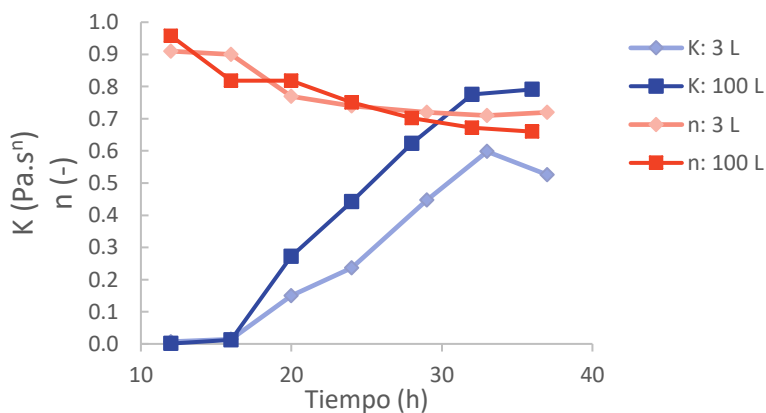


Figura 8.8. Evolución del de los índices de flujo (n) y consistencia (K) para las escalas de 3 y 100 L.

Debido a que la concentración de PGA producido a escala de 100 L fue comparable con aquella observada en volumen de 3 L, generando una evolución similar del comportamiento reológico en ambas escalas, se consideró que el escalamiento del proceso para la producción de PGA por *B. velezensis* fue exitoso.

Se realizaron dos repeticiones más de este proceso a condiciones de velocidad de agitación constante (denominadas “N constante”), en las cuales se incluyó la captura de imágenes para el análisis de tamaños de burbuja, así como la cuantificación de metabolitos extracelulares (surfactina y bacilomicina). La evolución de P_g/V , k_{La} , viscosidad aparente y tensión superficial se muestran más adelante.

8.4 Determinación de la caída en la potencia gaseada suministrada durante las fermentaciones conducidas a velocidad de agitación constante

Dado que la energía suministrada al sistema tiene influencia sobre el tamaño de burbuja, y este a su vez sobre el k_{La} (Alves et al, 2002; Ascanio et al, 2004), el consumo de potencia gaseada fue determinado a lo largo del proceso, a partir de la lectura del torquímetro acoplado a la flecha del biorreactor.

Para las fermentaciones conducidas a velocidad de agitación constante, el valor inicial promedio de P_g/V registrado fue de 1.5 W/L, difiriendo del valor teórico considerado para el escalamiento (1.9 W/L). A lo largo del proceso, este valor fue disminuyendo hasta un mínimo promedio de 0.88 W/L, debido a los efectos combinados de las propiedades fisicoquímicas y reológicas del medio. Estos resultados se muestran en la Figura 8.9.

La caída en la potencia gaseada en los cultivos con *Bacillus velezensis* responde al efecto acumulado tanto de la disminución de la tensión superficial como del aumento en la viscosidad. La evolución de estas dos variables se describe en las secciones siguientes. Así, el haber mantenido la velocidad de agitación constante llevó a una caída de la potencia gaseada suministrada al sistema de aproximadamente 40 %.

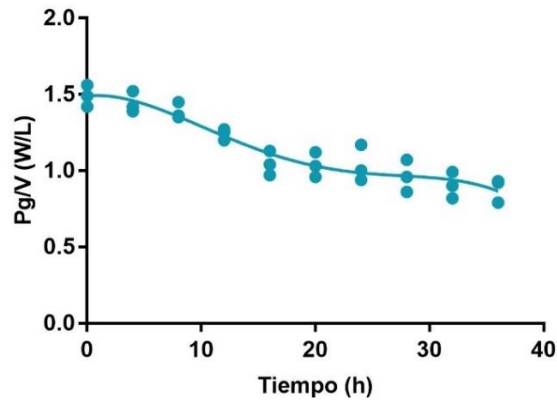


Figura 8.9. Evolución del valor del suministro de potencia gaseada en el biorreactor de 100 L durante las fermentaciones para la producción de PGA con *B. velezensis* 83 conducidas a velocidad de agitación constante (400 rpm).

8.5 Determinación de la velocidad de agitación para mantener el suministro de potencia gaseada constante

Para descartar los efectos que la caída en el suministro de potencia gaseada pudiera tener sobre la transferencia de oxígeno en las fermentaciones con *B. velezensis* 83, se realizaron dos réplicas conducidas bajo un esquema de suministro de potencia gaseada constante retroajustada. Esto es, ajustando la velocidad de agitación de manera que el valor de Pg/V se mantuviera fijo.

Para ello, primeramente, se determinó el valor de Pg/V a mantener constante durante la fermentación. Esto se realizó mediante la integración del área bajo la curva generada en el proceso conducido a N constante, y dividiendo este valor entre la duración total del proceso. De este modo, se buscó que el valor global de la Pg/V entregada al sistema fuera la misma en ambas condiciones. El valor resultante fue de 1.1 W/L.

El valor de Pg/V fue calculado *in situ* periódicamente a lo largo del proceso, para garantizar que este permaneciera lo más controlado posible. Esto se realizó a partir del valor del par (*torque*) y la velocidad de agitación registradas a lo largo del cultivo, como se describió en la Sección 7.3.2.

Cuando el valor de Pg/V obtenido resultaba menor al valor objetivo (1.1 W/L), se incrementó manualmente la velocidad de agitación y se realizó nuevamente el cálculo con

los nuevos valores registrados para el par y la velocidad de agitación. De este modo, el proceso inició con una velocidad de agitación de 360 rpm, la cual fue incrementándose hasta un máximo de 430 rpm. Se realizaron dos réplicas de fermentaciones bajo condiciones de Pg/V constante, cuyos perfiles de velocidad de agitación y potencia gaseada obtenida se muestran en la Figura 8.10. De este modo el suministro de potencia gaseada logró controlarse en el valor de 1.1 ± 0.04 W/L.

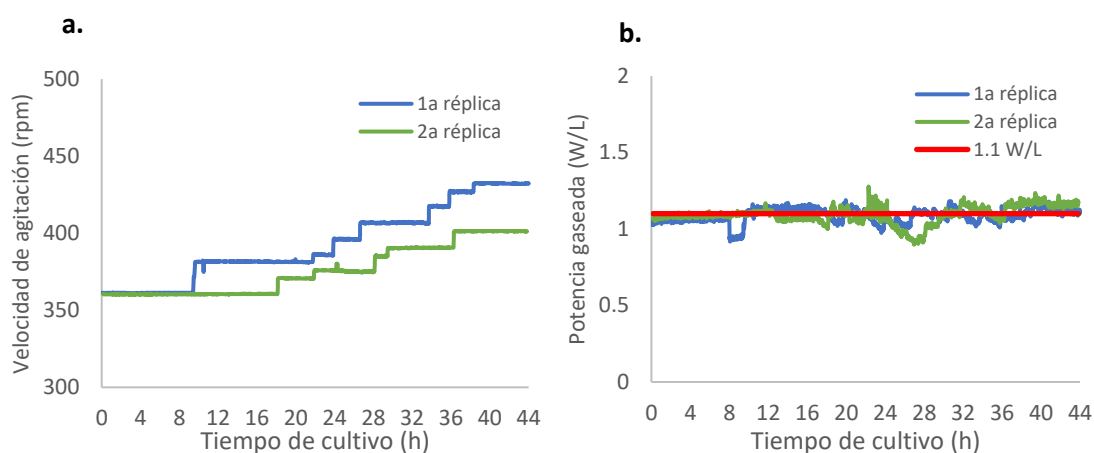


Figura 8.10. Perfiles obtenidos durante las fermentaciones para la producción de PGA con *B. velezensis* 83 conducidas a potencia gaseada constante (1.1 W/L): **a)** Incremento en las velocidades de agitación; y **b)** potencia gaseada resultante.

Como se observa en la Figura 8.10 a, el incremento en la velocidad de agitación fue diferente entre las dos réplicas realizadas. Esto fue debido a diferencias en las cinéticas de crecimiento y de producción de PGA observadas entre los inóculos empleados, hecho que se describe a detalle en la siguiente sección.

Para cada réplica se realizaron las mismas determinaciones que en los experimentos conducidos a N constante, incluida la captura de imágenes para la determinación de dispersión de tamaños de burbuja. Las cinéticas generadas para ambas condiciones de proceso se muestran en la siguiente sección.

8.6 Análisis de las cinéticas de crecimiento observadas en las réplicas de las fermentaciones para producción de PGA en biorreactor de 100 L

En este trabajo se llevaron a cabo 5 cultivos en el fermentador de 100 L, bajo dos condiciones de suministro de potencia gaseada (3 réplicas bajo condiciones de N constante y 2 réplicas bajo Pg/V constante). Los cultivos se llevaron a cabo a lo largo de 6 meses calendario y en cada caso se llevó a cabo un tren de inoculación similar. Los primeros dos cultivos (1ª y 2ª N constante), resultaron en cinéticas muy similares en términos de crecimiento bacteriano (Figura 8.11 a). Sin embargo, los tres cultivos restantes mostraron una cinética de crecimiento bacteriano diferente a los dos primeros, con fases *lag* más prolongadas. En el caso particular de las últimas dos fermentaciones realizadas (3ª N cte y 2ª Pg/V cte), este efecto fue más pronunciado (durante las primeras 8 horas el incremento en la concentración celular fue apenas perceptible). Esto pudo ser debido a que, si bien el esquema de desarrollo de inóculos fue el mismo para los cinco cultivos, pudieron existir pequeñas variaciones en las materias primas usadas en los medios de cultivo (sobre todo las complejas) y ello resultó en que los inóculos para los primeros tres cultivos (en función del tiempo calendario) en el fermentador de 100 L se encontraran en un estado fisiológico diferente al de los siguientes dos cultivos.

Los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos para cada fermentación realizada en el biorreactor de 100 L se muestran en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2. Parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos para las réplicas de las fermentaciones para la producción de PGA por *B. velezensis* en biorreactor de 100 L, bajo condiciones de N constante como Pg/V constante.

		μ (h ⁻¹)	C _{X max.} (cel/mL)	Y _{Cx/glu} (cel/g glucosa)	Y _{PGA/glu} (g PGA/g glucosa)	Productividad PGA (g PGA/ L · h)
N constante	1ª réplica	0.35	6.6x10 ⁹	2.4x10 ¹¹	0.12	0.18
	2ª réplica	0.34	5.7x10 ⁹	2.2x10 ¹¹	0.11	0.18
	3ª réplica	0.31	6.6x10 ⁹	3.1x10 ¹¹	0.09	0.14
Pg/V constante	1ª réplica	0.31	7.4x10 ⁹	2.4x10 ¹¹	0.12	0.17
	2ª réplica	0.27	7.3x10 ⁹	3.6x10 ¹¹	0.09	0.13

A pesar de las fases *lag* fueron más prolongadas para los últimos tres cultivos realizados en el tiempo calendario, no hubo variaciones importantes en las velocidades específicas de crecimiento (μ) entre el conjunto de réplicas realizadas (a excepción de la 2ª réplica a Pg/V constante), alcanzando concentraciones celulares máximas del orden de 10^9 cel/mL para todos los casos. No obstante, estas diferencias en las cinéticas de crecimiento entre ambos conjuntos de cultivos repercutieron en la producción de metabolitos, siendo la producción máxima de PGA el parámetro más afectado. Debido a lo anterior, para las últimas dos réplicas realizadas (3ª N cte y 2ª Pg/V cte) se observó una disminución tanto en el rendimiento de este producto con respecto al sustrato consumido ($Y_{PGA/glu}$), cayendo de 0.12 a 0.09 g PGA/ g glucosa, como en la productividad del cultivo, la cual disminuyó de 0.18 a 0.14 g PGA/L · h.

Debido a que estas diferencias en las cinéticas de crecimiento bacteriano entre ambos conjuntos de cultivos repercutieron en las cinéticas de producción de metabolitos (sobre todo en términos de la concentración de PGA), se decidió analizar los datos para cada condición de inoculación: los primeros tres cultivos se denominaron "inóculos tempranos" y los últimos dos (desarrollados en el tiempo calendario) como "inóculos tardíos".

Además, estas diferencias en la duración de las fases *lag* ocasionaron un desfase de las curvas de crecimiento, así como de las cinéticas de aquellos parámetros dependientes del estado fisiológico de las células (TOD, consumo de glucosa, concentración de metabolitos), y de algunas características fisicoquímicas del medio generadas por la presencia de metabolitos (comportamiento reológico). Por tal motivo, fue necesario realizar un ajuste de las cinéticas generadas, el cual se describe a continuación.

8.6.1 Normalización de cinéticas obtenidas en las fermentaciones a escala piloto

El alargamiento de las fases *lag* entre los cultivos realizados pudo deberse a un decaimiento en la viabilidad celular de la cepa preservada en glicerol, ya que este hecho fue más notorio en los inóculos tardíos. Por otra parte, también es posible que la activación de la cepa y los posteriores pasos preparativos en medio YPG tuvieran un impacto en el metabolismo de las células, ya que se trata de un medio complejo de composición no definida, pudiendo variar

de lote a lote. Las observaciones al microscopio de las muestras tomadas en las primeras horas del cultivo permitieron descartar cualquier posible contaminación de estos.

Para eliminar los errores comparativos ocasionados por el desfase generado, se realizó la normalización de las cinéticas obtenidas. Esta normalización consistió en tomar como punto inicial de comparación el comienzo de la fase de crecimiento logarítmico, para todos los parámetros analizados. De este modo, la comparación de los resultados obtenidos para las diferentes réplicas fue hecha en base al estado fisiológico del cultivo (Figura 8.11 b).

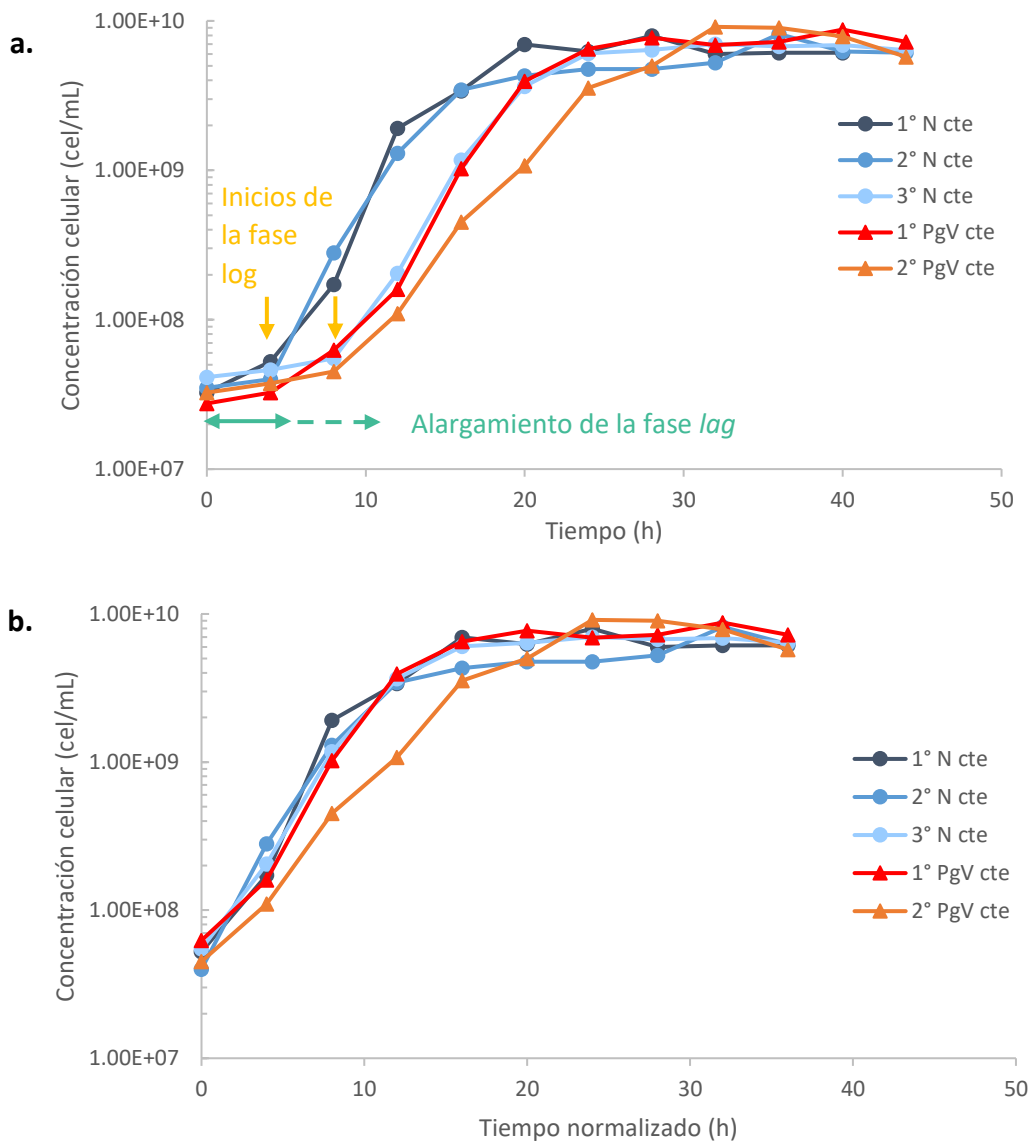


Figura 8.11. Normalización de las cinéticas de crecimiento de los cultivos con *Bacillus velezensis* 83 en biorreactor multipuerto: **a)** cinéticas originales; **b)** cinéticas normalizadas.

En el Anexo II se muestra la modificación realizada sobre las cinéticas de los diferentes parámetros evaluados en este trabajo, así como las cinéticas originales (sin normalizar).

En las siguientes secciones, se describe la evolución de los parámetros fisicoquímicos evaluados, donde todas las cinéticas mostradas fueron previamente normalizadas.

8.7 Caracterización fisicoquímica de las fermentaciones a N constante y P_g/V constante, a escala piloto

La evolución general de los parámetros fisicoquímicos fue similar para ambas condiciones de proceso. Esto permitió realizar la comparación entre los efectos de ambos esquemas de suministro de potencia gaseada sobre la evolución de los valores del k_La y las distribuciones de tamaños de burbujas.

8.7.1 Evolución del comportamiento reológico

Viscosidad aparente y pseudoplasticidad

Se realizaron pruebas de flujo a las muestras tomadas durante las fermentaciones en 100 L, como se describió con anterioridad, empleando el reómetro DHR-3.

Para las fermentaciones denominadas “inóculos tempranos” la concentración máxima promedio de polímero producida fue de 7.2 g/L, mientras que para los “inóculos tardíos” la concentración máxima promedio fue de 5.4 g/L (Figura 8.12 a). Esta disminución en la producción de PGA pudo estar relacionada con las condiciones fisiológicas de la cepa usada en el tren de inoculación (viabilidad de la cepa preservada en glicerol), o bien, por la composición de los medios preparativos, como se describió en el apartado anterior. Si bien la diferencia entre las concentraciones máximas de PGA obtenidas fue pequeña, esta tuvo un impacto importante sobre la viscosidad de los medios de cultivo, ocasionando que la viscosidad máxima alcanzada para los “inóculos tardíos” fuera menor que la obtenida para los “inóculos tempranos”, como se muestra en la Figura 8.12 c.

Al igual que en los cultivos realizados en biorreactor de 3 L, se observó un incremento en la viscosidad aparente a partir de las 12 horas posteriores al inicio de la fase logarítmica. Este aumento en la viscosidad es producto del incremento en la concentración de PGA, cuyo

peso molecular estuvo alrededor de los 2 MDa (Figura 8.12 b). Este incremento en la viscosidad aparente del sistema contribuyó a la caída en la potencia gaseada suministrada al sistema para las fermentaciones conducidas a N constante, ya que, en un sistema aireado, al incrementarse la viscosidad del medio se favorece la formación de cavidades de aire detrás del impulsor (Renade & Ulbrecht, 1977).

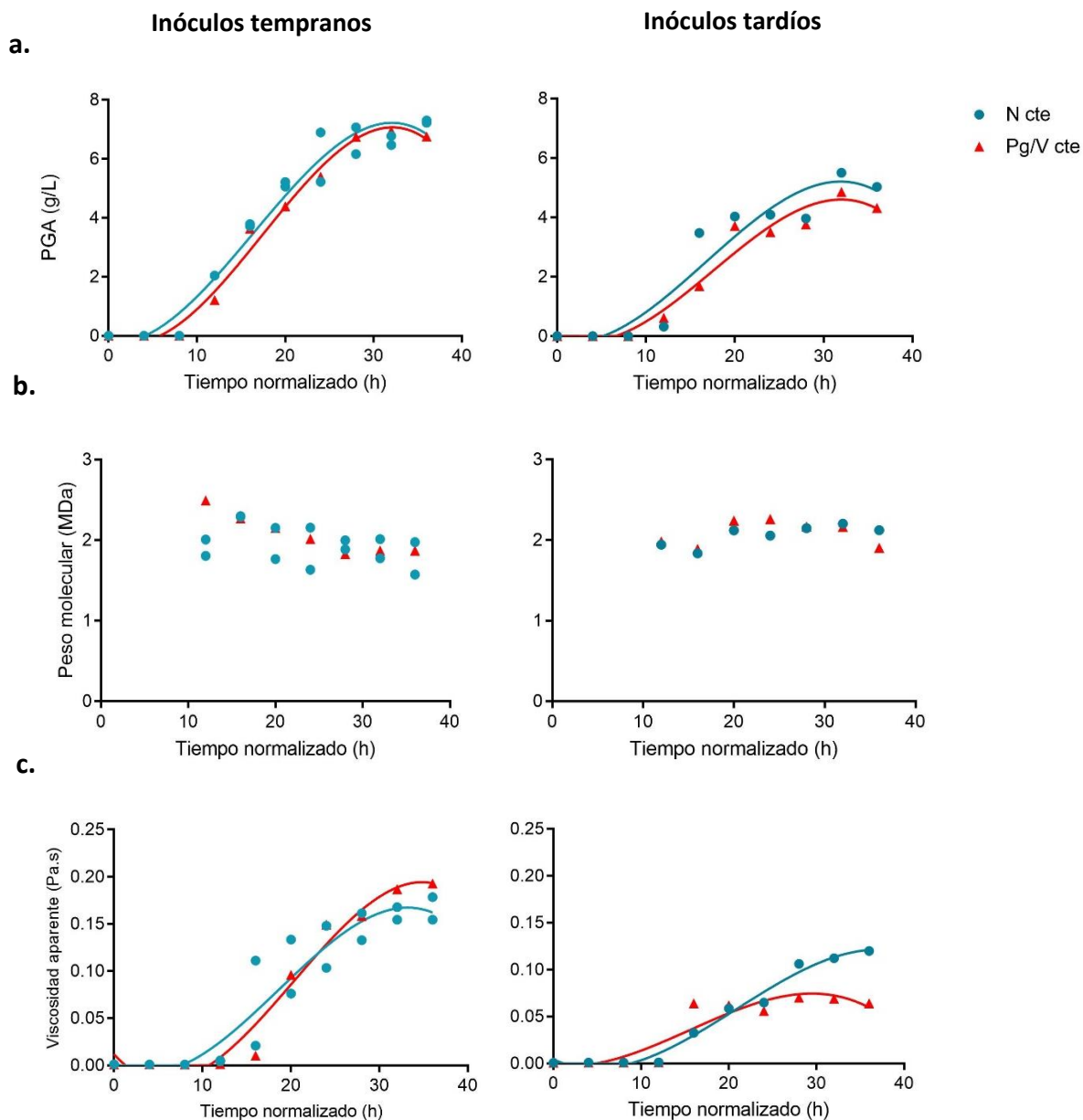


Figura 8.12. Cinéticas obtenidas de las fermentaciones con *Bacillus velezensis* 83 en biorreactor multipuerto de 100 L, para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte): **a)** Viscosidad aparente ($a\ 100\ s^{-1}$); **b)** Concentración de PGA; **c)** Peso molecular del PGA.

Mediante un ajuste a la Ley de la potencia, se obtuvieron los valores de n y K para cada tiempo de muestreo. Para los “inóculos tardíos”, los índices de consistencia (K) obtenidos también resultaron ser notoriamente menores que los correspondientes a los “inóculos tempranos” (Figura 8.13 a). Sin embargo, la evolución de los índices de flujo (n) no muestra diferencias tan evidentes entre las cinéticas (Figura 8.13 b). Lo anterior es indicativo de que la concentración de polímero tiene mayor impacto sobre el índice de consistencia, mientras el índice de flujo podría estar mayormente influenciado por el peso molecular del polímero (el cual se mantuvo relativamente constante para todos los cultivos) que por la concentración del mismo.

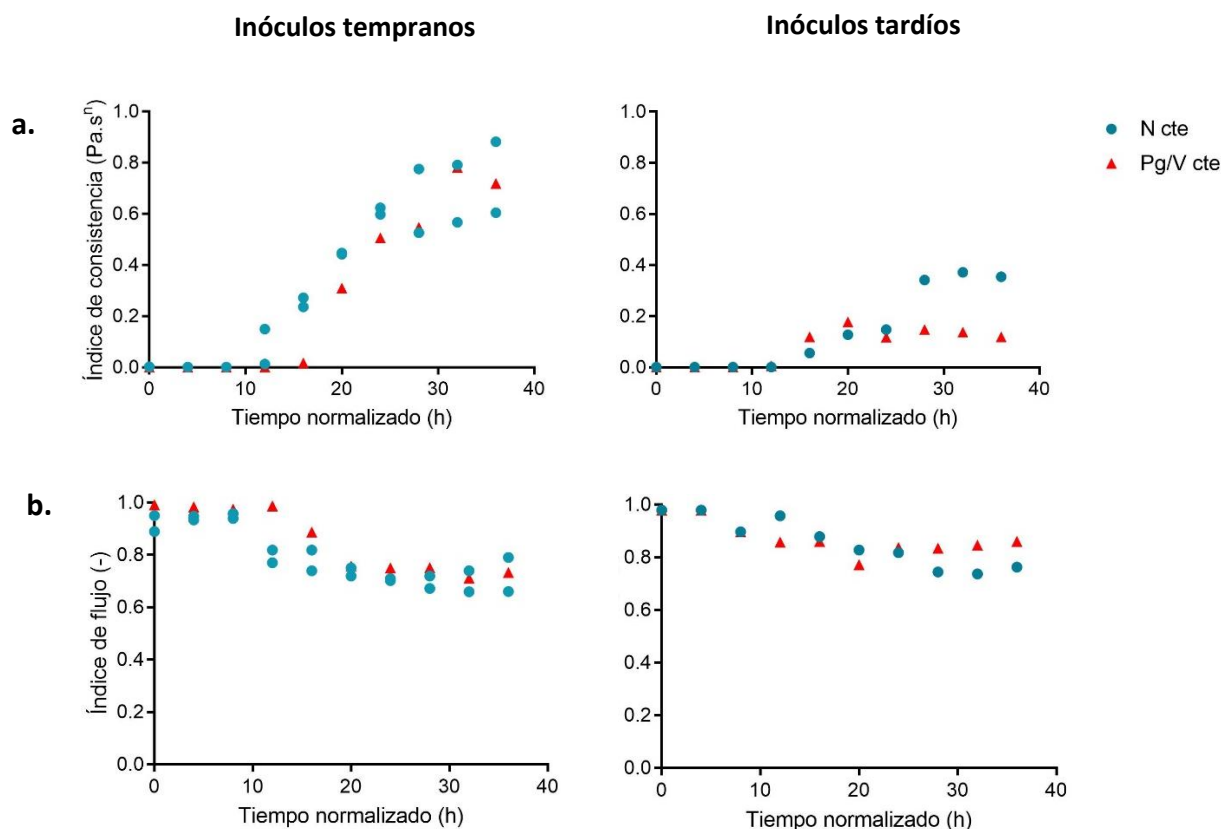


Figura 8.13. Evolución de los índices de: **a)** consistencia (K); y **b)** flujo (n), obtenidos en las fermentaciones para producción de PGA para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L.

Viscoelasticidad

Mediante las pruebas de flujo, no se detectó la existencia de esfuerzos normales cuantificables. No obstante, el carácter viscoelástico de los caldos de cultivo fue determinado mediante pruebas oscilatorias, como se describió anteriormente.

El aumento en la concentración de PGA en el medio trajo consigo un aumento en el carácter tanto elástico (G') como viscoso (G'') de los caldos de cultivo, teniendo siempre mayor predominancia el comportamiento viscoso sobre el elástico. En la Figura 8.14, se muestra la evolución de los valores de G' y G'' , reportados a una frecuencia de 10 rad/s. Como era de esperarse, las fermentaciones con menores concentraciones de PGA (“inóculos tardíos”) alcanzaron menores valores para ambos módulos.

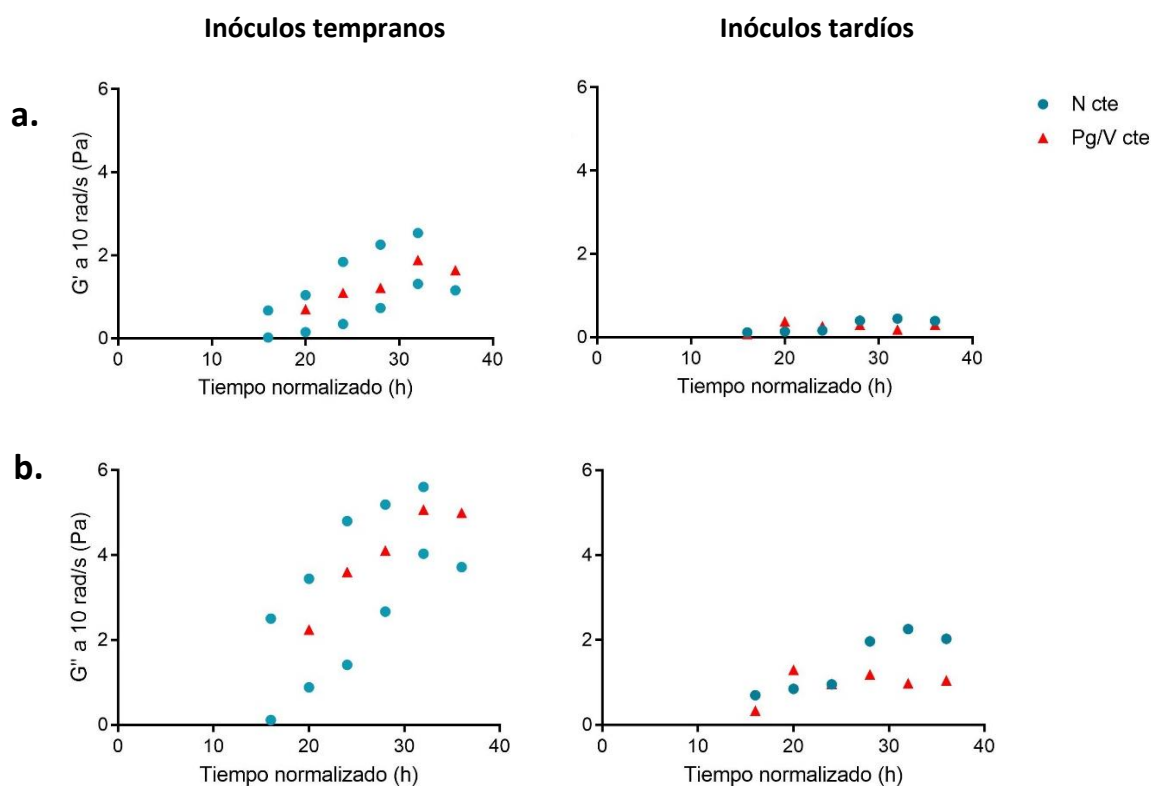


Figura 8.14. Evolución de los módulos de: **a)** almacenamiento (G') y, **b.)** pérdida (G'') obtenidos en las fermentaciones para producción de PGA para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L.

Con el objetivo de hacer una caracterización más detallada del comportamiento viscoelástico generado por el polímero producido por *B. velezensis*, los resultados de las muestras con mayor respuesta viscoelástica fueron ajustados a un modelo reológico. Estos resultados se muestran en la Sección 8.12.

8.7.2 Tensión superficial

Dado que la tensión superficial tiene un impacto importante sobre los tamaños de burbujas, y a su vez sobre la transferencia de oxígeno (Painmanakul et al., 2005), se evaluó la evolución de esta variable a lo largo de las fermentaciones realizadas. La evolución de la tensión superficial fue similar tanto para las dos condiciones de proceso, como para la condición de los inóculos empleados (“inóculos tempranos” e “inóculos tardíos”). Los valores obtenidos para todas las réplicas se muestran en la Figura 8.15.

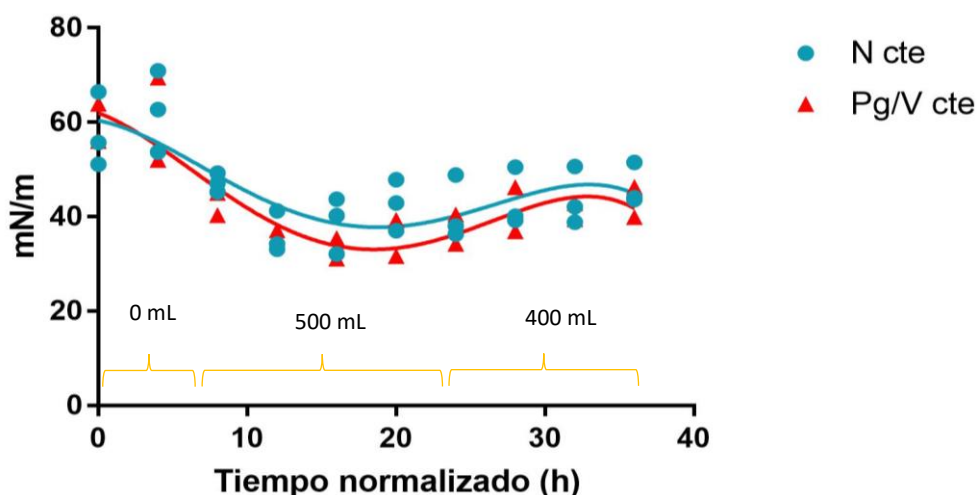


Figura 8.15. Evolución de la tensión superficial observada en las fermentaciones para producción de PGA para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L. Se indica el volumen estimado de antiespumante adicionado según el tiempo de cultivo.

La disminución en la tensión superficial del medio es debida, en primera instancia, a la adición de antiespumante. Este efecto ha sido reportado por Morao et al. (1999) y Routledge (2012), y corresponde a lo aquí observado entre las 8 y 20 horas de cultivo, periodo durante el cual la adición de antiespumante fue mayor para controlar el nivel de

espuma en el fermentador (Figura 8.15). En segundo lugar, a partir de las 20 horas de cultivo, la tensión superficial se mantiene relativamente constante por debajo de los 50 mN/m. Este comportamiento se podría atribuir a la presencia de compuestos biosurfactantes: surfactina y bacilomicina (Thimon et al., 1992). Éstos son productos de metabolismo de *B. velezensis*, cuya síntesis se ve favorecida por el exceso de fuente de carbono en presencia de Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} y F^{2+} como elementos traza (Shaligram & Singhal, 2010), los cuales también se encontraban en el medio. En la Figura 8.16 se muestra la evolución de las concentraciones de ambos metabolitos en el medio.

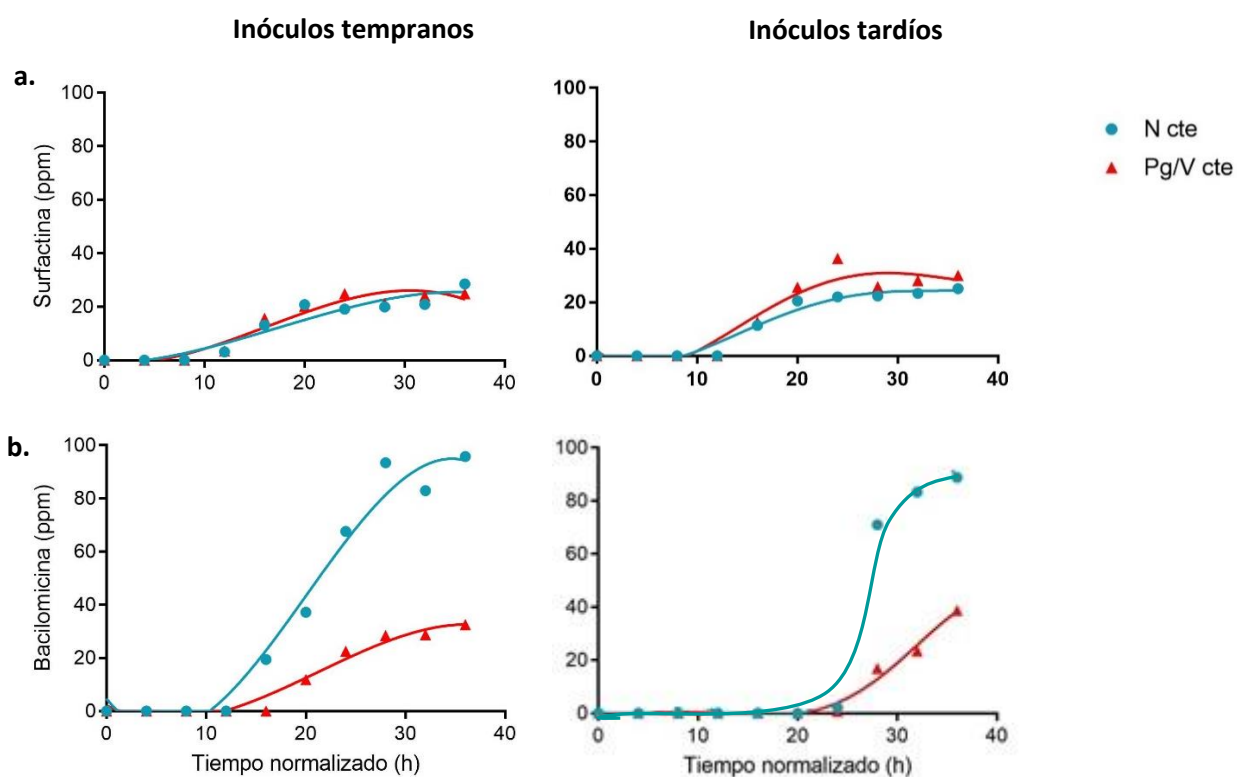


Figura 8.16. Evolución de las concentraciones de: **a)** surfactina; y **b)** bacilomicina, observadas en las fermentaciones para producción de PGA por *B. velezensis* 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (*N cte* y *Pg/V cte*) en biorreactor de 100 L.

Como se muestra en la Figura 8.16 b, la síntesis de bacilomicina mostró diferencias importantes en función del esquema de suministro de potencia gaseada, mostrando un incremento en su concentración de hasta el 100 % bajo condiciones de velocidad de agitación constante. De acuerdo con Fahim et al. (2012), en cultivos con *Bacillus subtilis*

BBG21 en medio Landy, se ha observado que la síntesis de los lipopéptidos surfactina y fengicina, así como la producción selectiva de cada uno de estos, dependen fuertemente de las condiciones hidrodinámicas y de la transferencia de oxígeno al medio líquido. En dicho trabajo, la producción de surfactina se vio favorecida en condiciones de alta transferencia de oxígeno ($k_{La} > 216 \text{ h}^{-1}$), una moderada transferencia de oxígeno ($k_{La} = 36 \text{ h}^{-1}$) resultó óptima para la producción de fengicina, mientras que una producción mixta (mas no óptima) se obtenía en un rango de valores de k_{La} entre 20 y 144 h^{-1} . En el caso de la familia de las iturinas (al que pertenece la bacilomicina), Shih et al. (2009) encontraron que, para un medio de cultivo diferente y empleando la cepa *B. subtilis* S3, una mayor concentración de iturina A era producida a altas condiciones de transferencia de oxígeno; pero que, a su vez, su producción se veía limitada por las altas velocidades de corte generadas en el reactor. De acuerdo con lo anterior, la mayor concentración de bacilomicina obtenida en el presente trabajo para la condición de N constante podría deberse a la mayor transferencia de oxígeno (mayores valores iniciales de k_{La}) observada para esta condición de cultivo -como se describirá con mayor detalle en la Sección 8.8-. Por otro lado, dado que para la condición de Pg/V constante se incrementó la velocidad de agitación, esto conllevó un aumento en las velocidades de corte generadas por la agitación mecánica, lo cual pudo haber afectado negativamente la producción de bacilomicina para esta condición de cultivo. En vista de que la producción de surfactina no se vio alterada por ninguno de los dos factores anteriores, es posible que las afectaciones en su síntesis se produzcan fuera de los rangos de transferencia de oxígeno aquí estudiados.

Independientemente de las concentraciones de biosurfactantes aquí obtenidas, no es posible saber si los valores en la tensión superficial son precisamente ocasionados por la presencia de dichos compuestos, ya que su efecto queda enmascarado por la adición previa de antiespumante.

Un tercer factor que podría tener influencia en los valores de tensión superficial es la presencia de proteína soluble, producida y secretada al medio durante el transcurso de la fermentación, aunque su presencia y concentración no fue determinada en este trabajo.

El comportamiento de la tensión superficial a lo largo del proceso pudo contribuir a la caída en el suministro de potencia gaseada en las fermentaciones conducidas a N constante, como se mencionó en la Sección 8.4. Este efecto fue descrito por Cuervo-Amaya, (2016), quien observó que a mayor concentración de agente surfactante (proteína), mayor era la incorporación de aire en el sistema, lo cual se reflejó en la caída en la potencia gaseada suministrada.

8.7.3 Conductividad eléctrica

El grado de coalescencia de un sistema está influenciado por la fuerza iónica del mismo, de manera que al aumentarse esta (por adición de electrolitos), se disminuye el tamaño de las estructuras de aire formadas (Lessard & Zieminski, 1971).

Dado que para determinar la fuerza iónica es necesario conocer el tipo y la concentración de los iones presentes en la solución, sólo fue posible determinar este valor al inicio del cultivo (donde se conoce exactamente la composición del medio). El valor resultante fue de 0.644 M.

No obstante, una manera de estimar la cantidad de iones presentes y su evolución fue a través de la determinación de la conductividad eléctrica, aunque este parámetro no proporciona información del tipo ni de la concentración de estos. Este parámetro fue determinado únicamente para las fermentaciones realizadas con “inóculos tardíos”.

La evolución de la conductividad eléctrica de los medios de cultivo se muestra en la Figura 8.17. Como se observa, la conductividad eléctrica presenta un incremento a partir de las 12 horas. Este resultado podría deberse a la adición de NaOH, empleado para el control de pH del medio. El NaOH, al ser un electrolito fuerte, tendría gran aporte a la conductividad eléctrica del medio. No obstante, no se llevó registro de los momentos ni de las cantidades de las adiciones realizadas, ya que estas se hicieron de manera automática a través de una bomba peristáltica.

De no haberse adicionado NaOH, un descenso en la conductividad eléctrica podría haber sugerido un comportamiento similar en la fuerza iónica, como consecuencia del consumo de las sales presentes en el medio. No obstante, aunque las sales presentes en el medio

hayan sido consumidas, la presencia de iones de Na^+ y OH^- no permitió generar ninguna conclusión con respecto a la fuerza iónica del sistema. Por tal motivo, no se consideró el efecto de este parámetro sobre la transferencia de oxígeno.

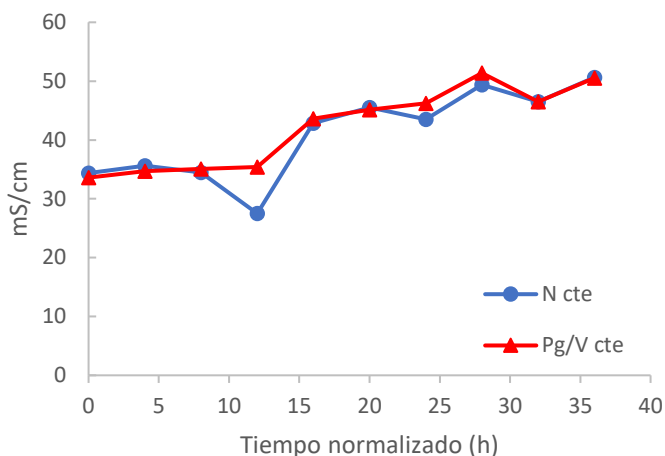


Figura 8.17. Evolución de la conductividad eléctrica observada en las fermentaciones con “inóculos tardíos” para producción de PGA por *B. velezensis* 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L.

Conociendo la evolución de las características fisicoquímicas y reológicas del sistema, se procedió a determinar el efecto del suministro de potencia gaseada entregada sobre la capacidad de transferencia de oxígeno. Estos resultados se discuten en las siguientes secciones.

8.8 Evolución del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, k_{La} , fue determinado a cada tiempo de muestreo a lo largo de las fermentaciones, empleando los métodos descritos en la Sección 7.3.3. Entre las 4 y las 12 horas normalizadas, la determinación del k_{La} se realizó por el método dinámico de degasificación. Esta metodología se implementó en las últimas réplicas realizadas (“inóculos tardíos”). Debido a problemas de operación, para las primeras cinéticas realizadas no se cuenta con los valores experimentales correspondientes a estos momentos del proceso.

En la Figura 8.18 se muestra la evolución de los valores del k_{La} para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada, junto con la evolución de las demás variables previamente descritas. Debido a las diferencias en las viscosidades máximas alcanzadas entre las diferentes réplicas, los resultados obtenidos se analizaron haciendo distinción entre las fermentaciones con “inóculos tempranos” e “inóculos tardíos”, como se describió en la Sección 8.6.

Para las fermentaciones conducidas a N constante, se obtuvieron valores iniciales de k_{La} cercanos a 120 h^{-1} , correspondientes a un suministro de potencia gaseada de 1.5 W/L . En el caso de las fermentaciones conducidas a P_g/V constante, el valor de k_{La} inicial rondó las 105 h^{-1} , correspondiente a un menor suministro de potencia gaseada (1.1 W/L). Posterior a las 12 horas, el k_{La} mostró un descenso importante para ambos escenarios de suministro de potencia gaseada. En el caso de la condición de N constante, este descenso podría atribuirse a la caída de la potencia suministrada (Figura 8.18 b). Sin embargo, es posible que la adición importante de antiespumante en ese lapso para ambas condiciones de proceso (Figura 8.18 d) tuviera un efecto negativo sobre el k_{La} , ya que el antiespumante abate drásticamente el área interfacial y puede modificar la rigidez de la superficie de las burbujas, aumentándose así la resistencia a la transferencia de oxígeno (Doran, 2013; Morao et al., 1999).

Luego de las 20 horas, en el caso de las fermentaciones con “inóculos tempranos”, los valores de k_{La} se mantuvieron entre 20 y 50 h^{-1} , independientemente de la condición de proceso. Por otro lado, las fermentaciones con “inóculos tardíos” mostraron una caída ligeramente menor del k_{La} , con valores que oscilaron entre las 30 y 60 h^{-1} tanto para N constante como para P_g/V constante, posiblemente debido a las menores viscosidades alcanzadas. Lo anterior indica que, pese a haber mantenido un suministro de potencia gaseada constante, los valores del k_{La} disminuyeron a lo largo del cultivo. El hecho de que esto ocurriera tanto en las fermentaciones con “inóculos tempranos” como en las fermentaciones con “inóculos tardíos”, indica que, independientemente de la viscosidad máxima alcanzada, el descenso de los valores del k_{La} no pudo ser contrarrestado por el suministro constante de energía al sistema.

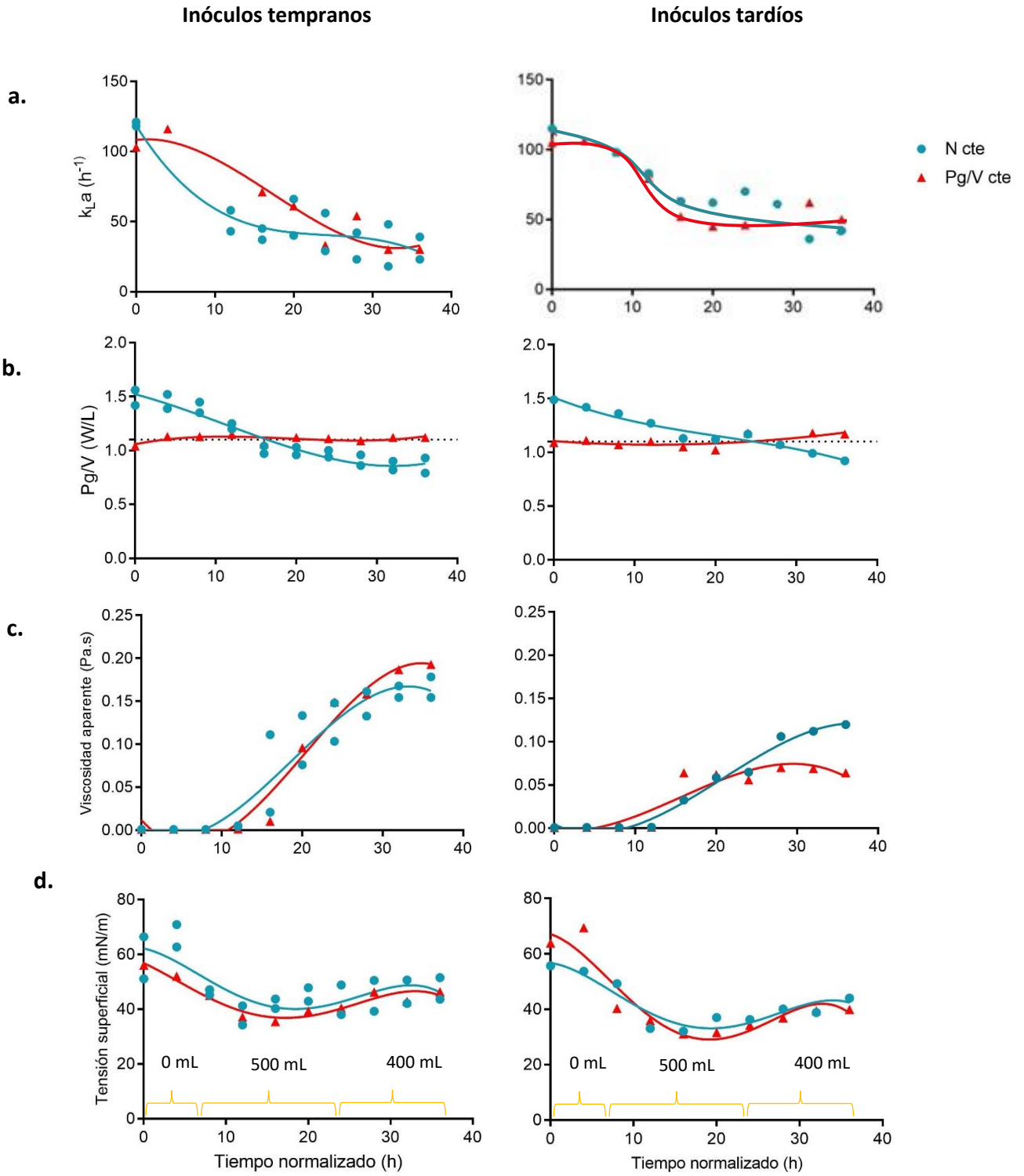


Figura 8.18. Evolución de los parámetros evaluados en las fermentaciones para producción de PGA por *B. velezensis* 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L: **a)** $k_{L,a}$; **b)** Potencia gaseada; **c)** viscosidad aparente; y **d)** tensión superficial (se indica el volumen de antiespumante adicionado).

El objetivo principal de mantener un suministro de potencia gaseada constante es contrarrestar los efectos negativos que el aumento en la viscosidad tendría sobre el área interfacial de transferencia (a través del tamaño de las burbujas de aire), y, por ende, sobre el $k_L a$. Sin embargo, el incremento en la viscosidad del sistema también conlleva a un aumento en el grosor de las capas de líquido que rodean a las burbujas de aire, lo que incrementa la resistencia a la transferencia de oxígeno (Doran, 2013 b). Por otro lado, el aumento en la viscosidad pudo ocasionar un atrapamiento de las burbujas de aire al limitar su movilidad dentro del sistema, lo que pudo llevar a un agotamiento de su capacidad de transferencia de oxígeno al estar sumergidas por largos periodos. Lo anterior implicaría que el aumento en la viscosidad muy probablemente trajo consigo afectaciones sobre el coeficiente másico de transferencia (k_L), las cuales no pudieron ser contrarrestadas por el ajuste en el suministro de potencia gaseada, inclusive en los escenarios de menor viscosidad.

El haber trabajado bajo condiciones de suministro de potencia gaseada constante no llevó a un mayor control del valor del $k_L a$, como se hubiera esperado, ya que se obtuvieron perfiles y valores finales de $k_L a$ muy similares (a lo largo de los cultivos) tanto para las fermentaciones a N constante como a P_g/V constante.

8.8.1 Evolución de la velocidad de transferencia de oxígeno

Se generaron perfiles de la evolución de la velocidad de transferencia de oxígeno (*oxygen transfer rate*, OTR) para las dos condiciones de proceso estudiadas, y considerando las dos condiciones del inóculo empleado. Para ello, se hizo un análisis en línea de la velocidad de transferencia de oxígeno a lo largo de todo el cultivo, realizando el balance de materia anteriormente descrito, a partir del registro de la composición del gas a la entrada y salida del reactor. Debido a complicaciones en el registro de los datos en línea, no pudo obtenerse el perfil correspondiente a la 2ª réplica a N constante. Los perfiles obtenidos se muestran en la Figura 8.19 a.

Para ambos escenarios de suministro de potencia gaseada, los perfiles fueron muy similares, lo que indica que este parámetro no se vio afectado por la condición de proceso.

El valor promedio de la OTR máxima fue de 27.3 mmol O₂/L h. Este valor corresponde a condiciones de alta transferencia de oxígeno, de acuerdo con lo reportado por Flores et al. (2020), cuya OTR máxima fue de 19 mmol O₂/L·h para esta misma cepa en cultivos en matraz. En el caso de las fermentaciones con “inóculos tardíos”, se observa un desfase en los valores máximos del perfil de OTR para la condición de Pg/V constante. Esto se debió a un mayor aletargamiento en la cinética de crecimiento observado para esta réplica en particular, que persistió pese a la normalización de los datos (ver Figura 8.11 b). En cuanto a la condición de N constante, se observa un descenso en la OTR cercano a las 18 horas normalizadas, el cual se explica por una limitación por fuente de carbono que experimentó el cultivo en ese instante (momentos antes de la segunda adición de glucosa).

De manera general, alrededor de las 12 h normalizadas se observa un máximo en la OTR. Estas velocidades de transferencia máximas son efecto de la mayor demanda de oxígeno por parte de las células, al alcanzarse concentraciones celulares del orden de 10⁹ cel/mL, llevando a una caída en los valores de TOD, como se observa en la Figura 8.19 b.

De acuerdo con la ecuación $OTR = k_L a (C^* - C_L)$, un aumento del valor de OTR puede deberse tanto al incremento en el término “ $k_L a$ ” como en el término “ $C^* - C_L$ ”. Como se observa en la Figura 8.19, los valores máximos de OTR correspondieron a valores de TOD cercanos a 10%, lo que implica que el término $(C^* - C_L)$ presenta valores grandes. A su vez, para tales momentos de las fermentaciones, todavía no se registraba el abrupto descenso en los valores de $k_L a$. Por ende, esta combinación de valores relativamente altos para ambos términos trajo como resultado tales valores máximos de OTR.

Sin embargo, no fue posible determinar con exactitud dichos valores de $k_L a$ empleando el método de balance de gases, ya que se está fuera del estado estacionario (*steady-state*). Lo anterior implicaría asumir variaciones mínimas sobre el consumo de oxígeno por parte de las células, para resolver así la ecuación $\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C_L) - q_{O_2} \cdot C_x$, llevando a resultados imprecisos.

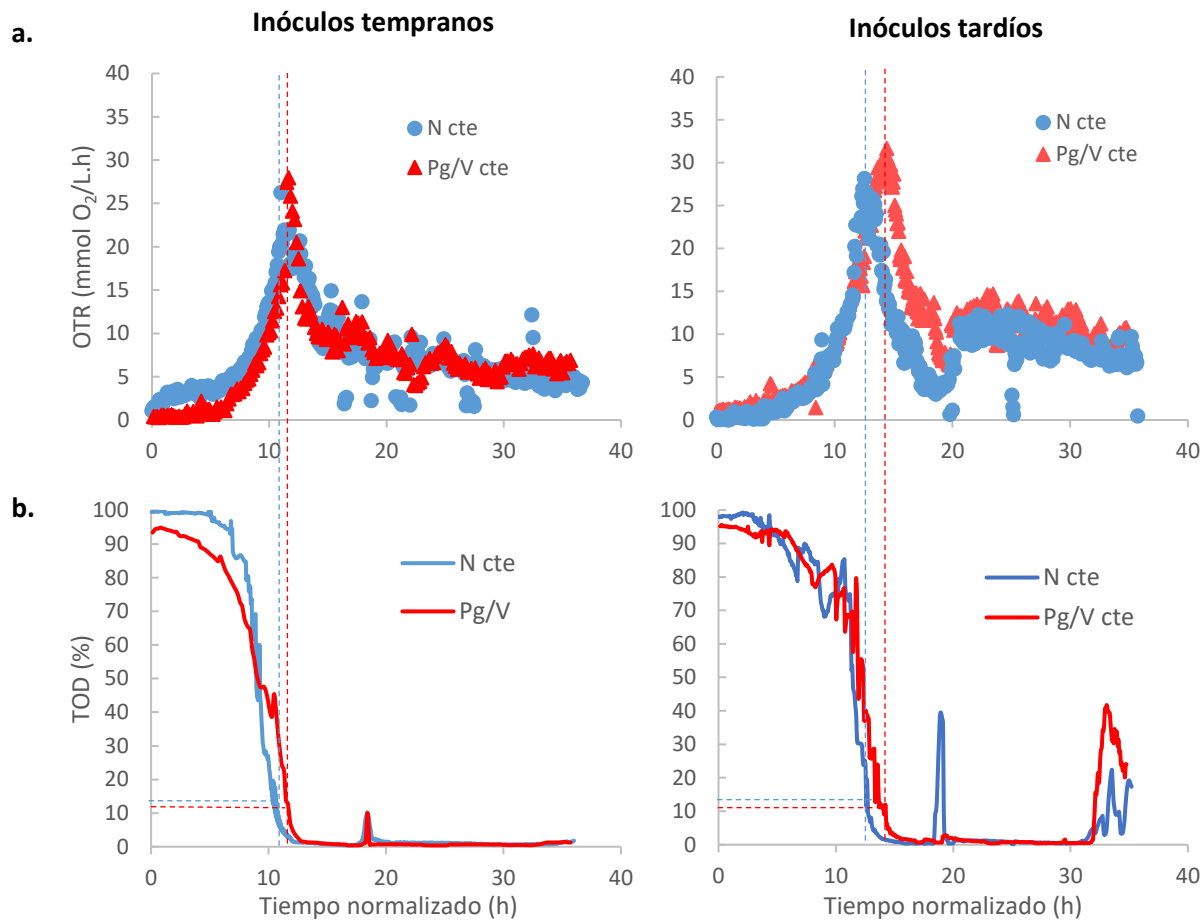


Figura 8.19. Evolución de los perfiles observados en las fermentaciones para producción de PGA por *B. velezensis* 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L: **a)** OTR y **b)** TOD. Las líneas punteadas indican la correspondencia entre los valores máximos de OTR y los porcentajes de TOD registrados.

En el caso de las fermentaciones con “inóculos tempranos”, la determinación del k_{La} a las 12 horas normalizadas se realizó mediante el método de balance de gases. No obstante, estos valores de k_{La} ya no corresponden a los valores máximos relacionados a los perfiles de OTR, ya que los picos se observan a las 11.5 horas normalizadas (minutos antes de las 12 horas).

Por otro lado, cabe resaltar que, a partir de las 20 horas, existe una diferencia entre los valores de OTR según la condición del inóculo empleado. Para las fermentaciones con “inóculos tempranos”, los valores de OTR fueron menores que para las fermentaciones con

“inóculos tardíos”. Esta diferencia podría deberse a las variaciones en las viscosidades alcanzadas, de modo que las mayores viscosidades conllevaron a menores velocidades de transferencia de oxígeno, mediante a afectaciones sobre el k_{La} .

Posteriormente, se calculó la velocidad específica de consumo de oxígeno, q_{O_2} . Al igual que para el k_{La} , este parámetro se obtuvo por el método dinámico de degasificación y por el método de balance de gases. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8.20.

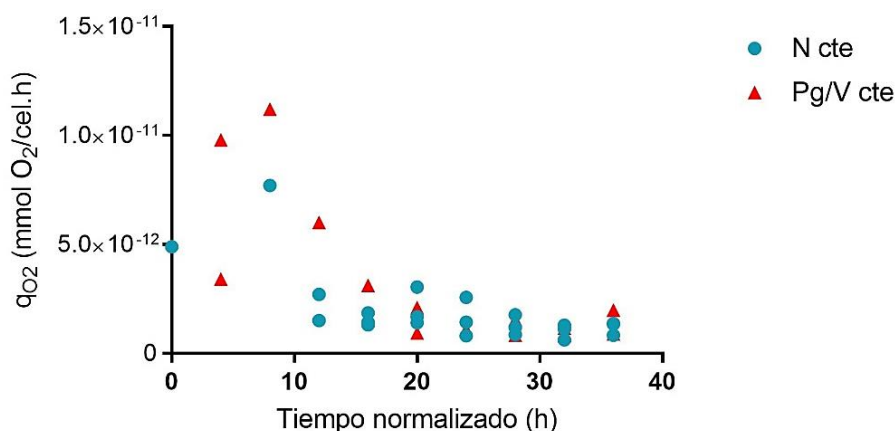


Figura 8.20. Evolución de la q_{O_2} observada en las fermentaciones para producción de PGA por *B. velezensis* 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L. Los datos presentados corresponden tanto a cultivos realizados con “inóculos tempranos” como con “inóculos tardíos”.

La tendencia observada fue una disminución de este parámetro a lo largo del proceso, para ambas condiciones de suministro de potencia gaseada. Las velocidades de consumo cayeron a valores menores a 2×10^{-12} mmol O_2 /cel·h. Estos valores mínimos resultan inferiores a los obtenidos por Cristiano-Fajardo (2020), para cultivos continuos con el mismo microorganismo (11.7×10^{-12} mmol O_2 /cel·h, para una tasa de dilución de 0.25 h^{-1}), que además se asumen constantes a lo largo de la fermentación.

A partir de las 16 horas normalizadas, la disminución aquí observada en el consumo de oxígeno fue consecuencia de la disminución en OTR, que a su vez es efecto del cambio en las características fisicoquímicas del sistema, principalmente la viscosidad (quien pudo haber repercutido negativamente sobre el k_L , como se mencionó anteriormente).

Esta similitud en las tendencias observadas para la transferencia de oxígeno para ambas condiciones de proceso sugiere que el valor de los parámetros k_{La} y OTR no queda determinado únicamente por la potencia gaseada entregada al medio ni por la viscosidad del mismo, sino que el involucramiento de otras variables juega un papel igual de importante, como lo reveló el estudio de la distribución de tamaños de burbuja, del cual se hablará en la siguiente sección.

8.9 Evolución de las distribuciones de tamaños de burbuja

8.9.1 Análisis de las imágenes adquiridas

Las imágenes obtenidas con el sistema de videoendoscopía a lo largo de las fermentaciones, tanto a condiciones de N constante y Pg/V constante, presentaron diferencias en su nitidez, número de objetos y regularidad de estos. Los cambios en la nitidez fueron debidos al aumento en la opacidad del medio, al incrementarse la biomasa y la viscosidad, así como por la producción de metabolitos extracelulares.

Se realizó la captura de imágenes para dos fermentaciones conducidas a N constante y dos más conducidas a Pg/V constante. Sin embargo, para la primera adquisición realizada (2ª réplica a N constante), no se realizaron los ajustes adecuados a los parámetros de apertura de lente y ganancia de la cámara, lo que generó imágenes de menor nitidez. Por tal motivo, dichas imágenes fueron consideradas como preliminares, y los resultados obtenidos de su análisis no se incluyen en este trabajo.

En las Figuras 8.21 y 8.22 se muestran algunas de las imágenes obtenidas para las fermentaciones con “inóculos tardíos”, conducidas a velocidad de agitación constante y potencia gaseada constante, respectivamente.

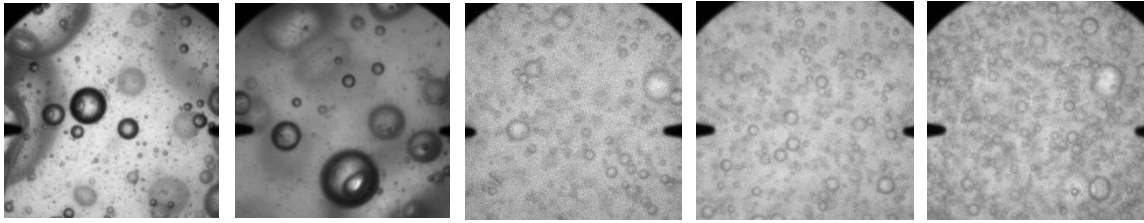


Figura 8.21. Imágenes de videoendoscopia de la fermentación con *B. velezensis* para la producción de PGA, conducida en condiciones de agitación constante (400 rpm) y 0.8 vvm, empleando “inóculos tardíos”. De izquierda a derecha: 0, 8, 16, 28 y 36 h normalizadas.

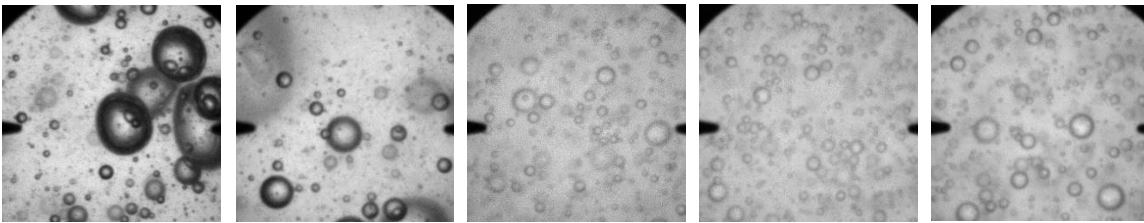


Figura 8.22. Imágenes de videoendoscopia de la fermentación con *B. velezensis* para producción de PGA, conducida en condiciones de potencia gaseada constante (1.1 W/L) y 0.8 vvm, empleando “inóculos tardíos”. De izquierda a derecha: 0, 8, 16, 28 y 36 h normalizadas.

De manera general, las imágenes correspondientes al inicio de las fermentaciones se caracterizan por ser bastante nítidas, donde las estructuras pueden apreciarse con mayor facilidad, ya que muestran bordes bien definidos. Es en estos primeros tiempos de muestreo donde también se observa la presencia de estructuras deformes y de gran tamaño, lo que indica un mayor grado de coalescencia del medio.

A tiempos intermedios del proceso (entre las 12 y 20 h), se aprecia una disminución en la cantidad de objetos observables en cada imagen, pudiendo ser resultado de la adición de antiespumante.

Finalmente, a partir de las 24 horas, se observa un aumento en la cantidad de objetos por imagen, así como la ausencia de estructuras deformes y de gran tamaño. No obstante, debido al aumento en la viscosidad del medio, así como al aumento en la concentración celular, el medio se torna opaco y pierde nitidez. Por tal motivo, el análisis de este tipo de

imágenes se vuelve más complicado, lo que impide detectar objetos de diámetro menor a 7 pixeles (97.16 μm).

8.9.2 Distribución de tamaños de burbuja y diámetro Sauter

Para cada tiempo de muestreo, se analizaron 700 objetos; a partir de los cuales se obtuvieron la media, la moda y el diámetro Sauter, así como las distribuciones de tamaños de burbuja, representadas mediante gráficas de Fracción de volumen acumulado y de Densidad de Probabilidad de Número (DPN). En los Anexos III y IV se muestra una imagen representativa de cada tiempo de muestreo, así como los gráficos de DPN y las medidas estadísticas de los diámetros, correspondiente a la fermentación conducida a velocidad de agitación constante y las dos fermentaciones conducidas a potencia gaseada constante.

Puesto que el suministro de potencia determina en gran medida el tamaño de las burbujas observadas en un sistema agitado (Alves et al., 2002), se esperaba que el mantener el valor de P_g/V constante conllevara un mayor control sobre los tamaños de burbujas a lo largo del proceso. No obstante, la evolución de las distribuciones de volumen acumulado obtenidas para la condición de P_g/V constante fue bastante similar al comportamiento observado para la condición de N constante, las cuales se muestran en la Figura 8.23.

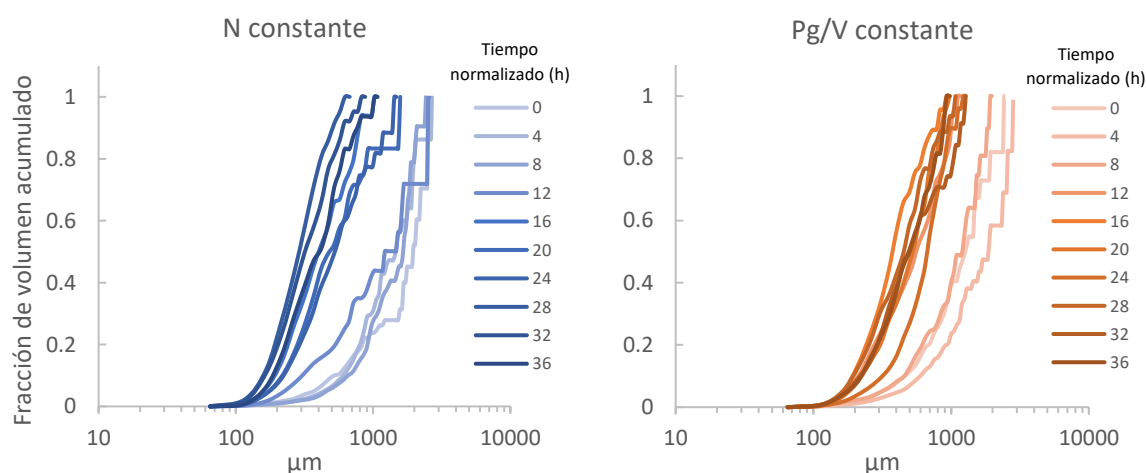


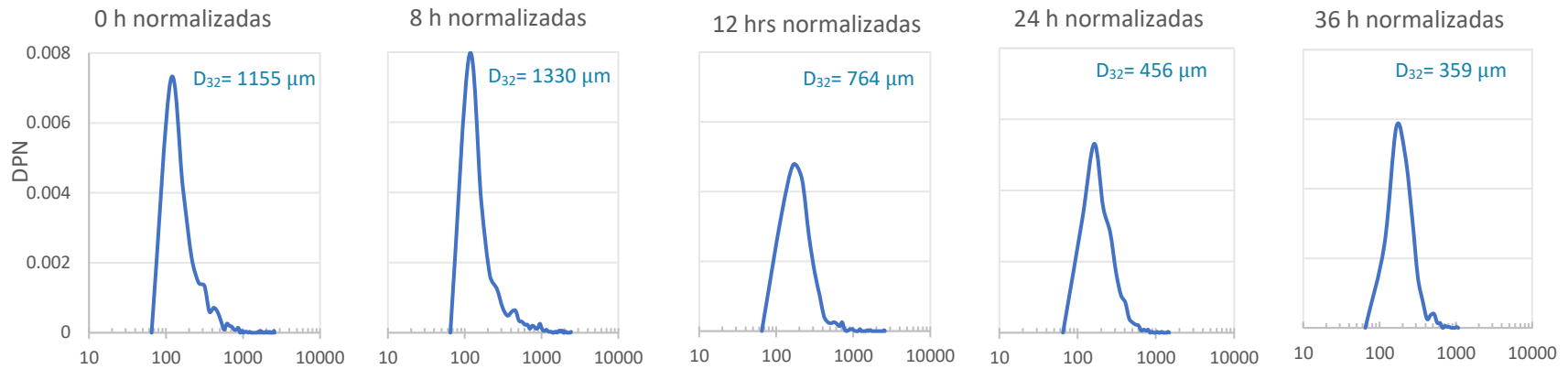
Figura 8.23. Distribuciones de volumen acumulado de burbujas observadas en las fermentaciones con *B. velezensis* 83 para producción de PGA empleando “inóculos tardíos” en biorreactor de 100 L.

De manera general, las distribuciones acumulativas muestran una disminución de los tamaños de burbuja a lo largo del proceso, tanto para condiciones de N constante como de Pg/V constante. Los mayores tamaños de burbuja se observaron durante las primeras horas (0, 4 y 8 horas normalizadas) para ambas condiciones de suministro de potencia gaseada, con tamaños máximos de hasta 2800 μm .

Dado que en un sistema viscoso prevalecen los fenómenos de coalescencia, se esperaba observar un incremento en el tamaño de las burbujas conforme aumentara la viscosidad del medio (posterior a las 12 h). Sin embargo, ambas condiciones de proceso presentaron disminuciones drásticas (desplazamiento de las curvas hacia el lado izquierdo de los gráficos), así como un rango más acotado -entre el inicio y el final de las curvas- de los tamaños observados (de 65 a 1500 μm).

En la Figura 8.24 se muestran, los gráficos de DPN y los valores del D_{32} , correspondientes a las fermentaciones con "inóculos tardíos". Las distribuciones obtenidas para los primeros tiempos de proceso se caracterizaron por ser altas y coleadas hacia la derecha, para ambas condiciones. Al transcurrir el proceso, estas distribuciones fueron disminuyendo tanto en altura como en la longitud de sus colas, lo cual indica una mayor homogeneidad del sistema.

a.



b.

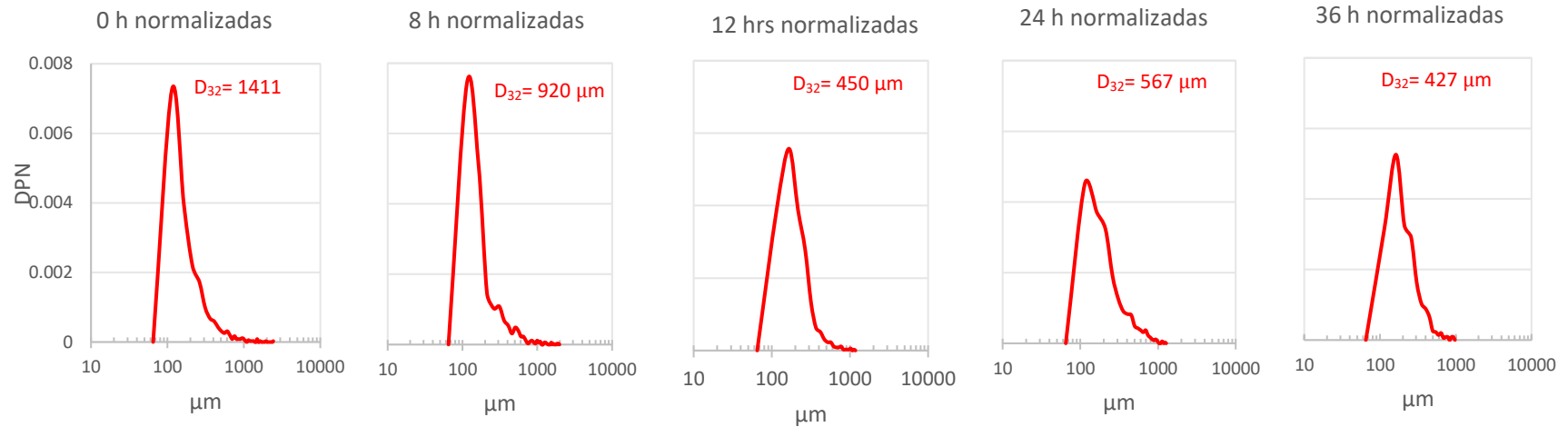


Figura 8.24. Distribuciones de Probabilidad de Número para diferentes tiempos de cultivo obtenidas de las fermentaciones para producción de PGA por *B. velezensis* 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada: **a)** N cte y, **b)** Pg/V cte, en biorreactor de 100 L empleando “inóculos tardíos”.

A pesar de que las distribuciones de tamaños de burbuja mostraron una evolución similar para condiciones de N constante y P_g/V constante, existieron diferencias circunstanciales entre las distribuciones obtenidas para cada condición, para algunos tiempos de cultivos. Como se mencionó en la Sección 8.7.2, a partir de las 8 h de proceso se registran adiciones de antiespumante al medio, para controlar el nivel de espuma. Estas adiciones prevalecieron a lo largo de las fermentaciones, con volúmenes totales adicionados comprables, pero los momentos puntuales de cada adición variaron circunstancialmente entre condiciones. Este hecho resulta relevante, ya que la presencia de antiespumante representa una fuerte interferencia sobre la dinámica de formación y ruptura de burbujas. De acuerdo con Abdolahi y colaboradores (2005), las partículas sólidas de silicón que componen el antiespumante penetran en la lamela de la burbuja, formando un puente hidrofóbico que la desestabiliza, propiciando así su ruptura. Por otro lado, Morao et al. (1999) señalan que la adición de antiespumante provoca dos efectos opuestos sobre el área interfacial, que se contrarrestan entre sí: i) una disminución en la tensión superficial, que lleva al aumento en el área de transferencia; y ii) un aumento en la coalescencia, que la disminuye. Aunado a esto, cabe resaltar las ligeras diferencias que existieron entre las viscosidades máximas alcanzadas para los cultivos con “inóculos tardíos” (Sección 8.7.1). Por tales motivos, realizar comparaciones puntuales entre condiciones para cada tiempo de cultivo no resultaría adecuado, ya que las características fisicoquímicas pudieron variar entre ambas condiciones para los mismos tiempos. Los tiempos de cultivo fungen como guía para indicar las características generales del sistema conforme al avance de las fermentaciones.

Para las primeras horas de cultivo (0 a 8 h), el medio se caracterizó por presentar un comportamiento newtoniano y muy bajas viscosidades ($\sim 0.001 \text{ mPa} \cdot \text{s}$), ya que aún no se detectaba la presencia de PGA, así como tampoco de biosurfactantes. Tales características resultaron en la obtención de distribuciones unimodales altas y alargadas, tanto para los procesos conducidos a N constante como a P_g/V constante. De acuerdo con los gráficos de DPN, la moda para estas poblaciones de burbujas correspondió a un diámetro $104 \mu\text{m}$. Por otro lado, estas distribuciones también mostraron colas pronunciada al extremo derecho,

al observarse objetos de gran tamaño, aunque mucho menos abundantes. Dado que el diámetro Sauter está fuertemente influenciado por el diámetro máximo detectado (Zhou & Kresta, 1998), resultó coherente obtener los mayores valores de D_{32} para estos momentos de las fermentaciones, y para las condiciones de N y P_g/V constante.

A partir de las 12 horas, se observó un ligero desplazamiento de los picos hacia la derecha, incrementándose las modas a $165 \mu\text{m}$, así como una disminución de sus alturas. Es en este momento del proceso donde también se observa una disminución del diámetro Sauter ($< 900 \mu\text{m}$) comparado con el valor obtenido en horas anteriores. Puesto que a partir de las 12 h se observó el aumento en la viscosidad del sistema (debido a la presencia de PGA en el medio), para la condición de N constante se esperaba un aumento en el valor del D_{32} , como consecuencia de: 1) la caída de la potencia gaseada suministrada (Alves et al., 2002); y 2) el aumento en la viscosidad aparente del medio (Connor et al., 1990). Mientras que para la condición de P_g/V constante, al mantener la misma energía suministra al sistema, se esperaba que el D_{32} también se mantuviera relativamente constante, pese al aumento en la viscosidad. Esto fue contrario a los resultados obtenidos, ya que, para ambas condiciones operacionales, se registró una disminución del diámetro Sauter.

Conforme fue transcurriendo el proceso y hasta el final de los cultivos, las distribuciones mostraron pocos cambios en cuanto a altura y posición, variando únicamente en la longitud de sus colas, para ambas condiciones de proceso. Esto generó una a una mayor disminución del valor de D_{32} .

En la Figura 8.25 se muestra la evolución del D_{32} , contrastado con los parámetros fisicoquímicos involucrados (presentados anteriormente como contraste ante el comportamiento del k_La), para ambas condiciones de proceso. Como se mencionó en la Sección 8.8, el aumento en la viscosidad del medio ocasionó una disminución en los valores del k_La del sistema; no obstante, los resultados obtenidos del análisis de imágenes muestran que, pese a dicho aumento en la viscosidad, hubo una disminución en el tamaño de burbuja (Figura 8.25 a y c). Aún más, la disminución en los valores del D_{32} se observó tanto en las fermentaciones con “inóculos tempranos” como en las fermentaciones con “inóculos

tardíos”, a pesar de que la viscosidad varió significativamente entre estas condiciones, lo que sugiere que la viscosidad del medio tuvo un bajo efecto que sobre los valores del D_{32} .

Por otra parte, después de las 16 horas normalizadas, el haber mantenido un suministro de potencia gaseada constante no mostró haber tenido efecto sobre el tamaño de burbuja, ya que, pese a la caída en la potencia gaseada en el proceso conducido a N constante, los valores del D_{32} evolucionaron de manera similar que para la condición de P_g/V constante (Figura 8.25 b).

El comportamiento en la evolución del diámetro Sauter podría explicarse por el aumento en la concentración de los metabolitos surfactina y bacilomicina (Figura. 8.16 a y b), ya que la disminución en este parámetro fue coincidente con el incremento en las concentraciones de tales compuestos. Estos son moléculas anfipáticas que presentan una fuerte actividad como biosurfactantes, con concentraciones críticas micelares (CCM) de 9 y 28 ppm (Thimon et al., 1992). De acuerdo con Painmanakul et al. (2005), la presencia de surfactantes en el medio incrementa el área interfacial de transferencia (a), al reducir el tamaño de burbuja. No obstante, el efecto surfactante de estos compuestos no se refleja en la evolución de la tensión superficial del sistema (Figura 8.25 d), ya que este parámetro estuvo fuertemente influenciado por la adición de antiespumante al medio.

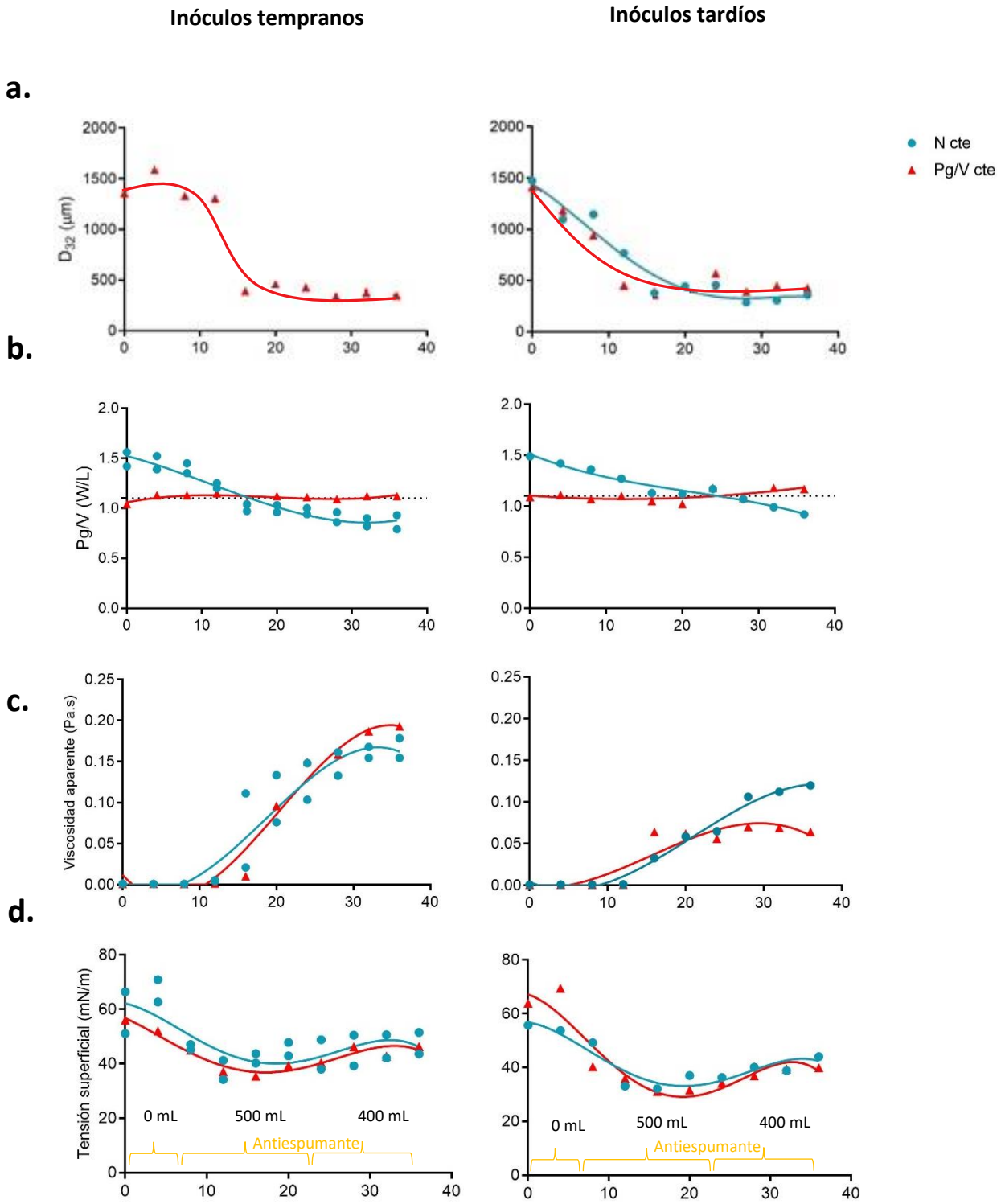


Figura 8.25. Comparación entre la evolución del **a)** diámetro Sauter; **b)** suministro de potencia gaseada; **c)** viscosidad; y **d)** tensión superficial; observada en las fermentaciones para producción de PGA por *B. velezensis* 83 para los dos escenarios de suministro de potencia gaseada (N cte y Pg/V cte) en biorreactor de 100 L.

Este efecto positivo de las sustancias tensioactivas sobre la transferencia de oxígeno también fue observado por Pulido-Mayoral & Galindo (2004), quienes estudiaron el efecto de la concentración y tipo de proteína sobre los valores del k_{La} y la distribución de tamaños de burbuja en suspensiones de *Trichoderma harzianum*. Más aún, en su trabajo de maestría, Cuervo-Amaya (2016) concluye que es la tensión superficial quien determina el tamaño de las burbujas libres, en un medio trifásico agua-aire-aceite, cuando se trabaja bajo condiciones de potencia gaseada constante.

No obstante, esta disminución del tamaño de burbuja, y el consecuente aumento en el área interfacial, resulta contradictoria a la tendencia observada para el k_{La} . Como anteriormente se mencionó, esto podría explicarse por el incremento en la viscosidad del sistema, aumentándose la resistencia a la transferencia y probablemente disminuyendo el valor del coeficiente másico de transferencia (k_L). Aunado a esto, es posible que, aunque la presencia de biosurfactantes juegue un papel favorable para el área interfacial, su misma presencia podría perjudicar aún más sobre los valores del k_L . Esto es debido a que la presencia de surfactantes modifica la composición y el grosor de la cubierta de líquido alrededor de las burbujas, al formarse una monocapa de moléculas de surfactante en la interfase, incrementando así la resistencia a la transferencia (García-Ochoa & Gómez, 2009; Painmanakul et al., 2005).

Esta posible sinergia entre el aumento en la viscosidad y la presencia de biosurfactantes también podría haber sido responsable de las caídas observadas en los perfiles de las velocidades de transferencia de oxígeno, OTR (Figura 8.19 a). Como se mencionó en la Sección 8.8.1, la disminución en los valores de OTR a partir de las 12 horas normalizadas se atribuyó a la disminución en los valores del k_{La} , causados principalmente por aumento en la viscosidad del sistema. No obstante, la abrupta caída en los valores de OTR observada entre las 12 y las 16 horas normalizadas coincide con el inicio en la cuantificación de surfactina (Figura 8.16 a), la caída en los valores del D_{32} (Figura 8.25 a) y con el inicio en el aumento de la viscosidad del sistema (Figura 8.25 c). Lo anterior indicaría, nuevamente, que el aumento en la viscosidad y la presencia de biosurfactantes afectaron negativamente sobre el término k_L , mientras que el término a se vio favorecido por la presencia de estos

últimos. De manera global, estas afectaciones sobre el k_L conllevaron a la disminución en los valores del k_{La} , lo cual se reflejó en los perfiles de OTR.

8.10 Interrelación entre las variables de proceso y las funciones objetivo k_{La} y D_{32}

Con el objetivo de identificar la relación que pudiera existir entre las diferentes variables fisicoquímicas y operacionales del proceso y las funciones objetivo, k_{La} y el D_{32} , se realizó una serie de gráficos. En el eje de las abscisas, se muestran las variables de proceso, mientras que en el eje de las ordenadas se incluye la variable respuesta obtenida (k_{La} o D_{32}). Se hizo distinción entre los dos escenarios de potencia gaseada considerados (N constante y Pg/V constante), comparándolos con el panorama general de todos los datos obtenidos (“Global”). No se diferenció entre las fermentaciones con inóculos “tempranos” y “tardíos”, ya que ambos escenarios mostraron las mismas tendencias.

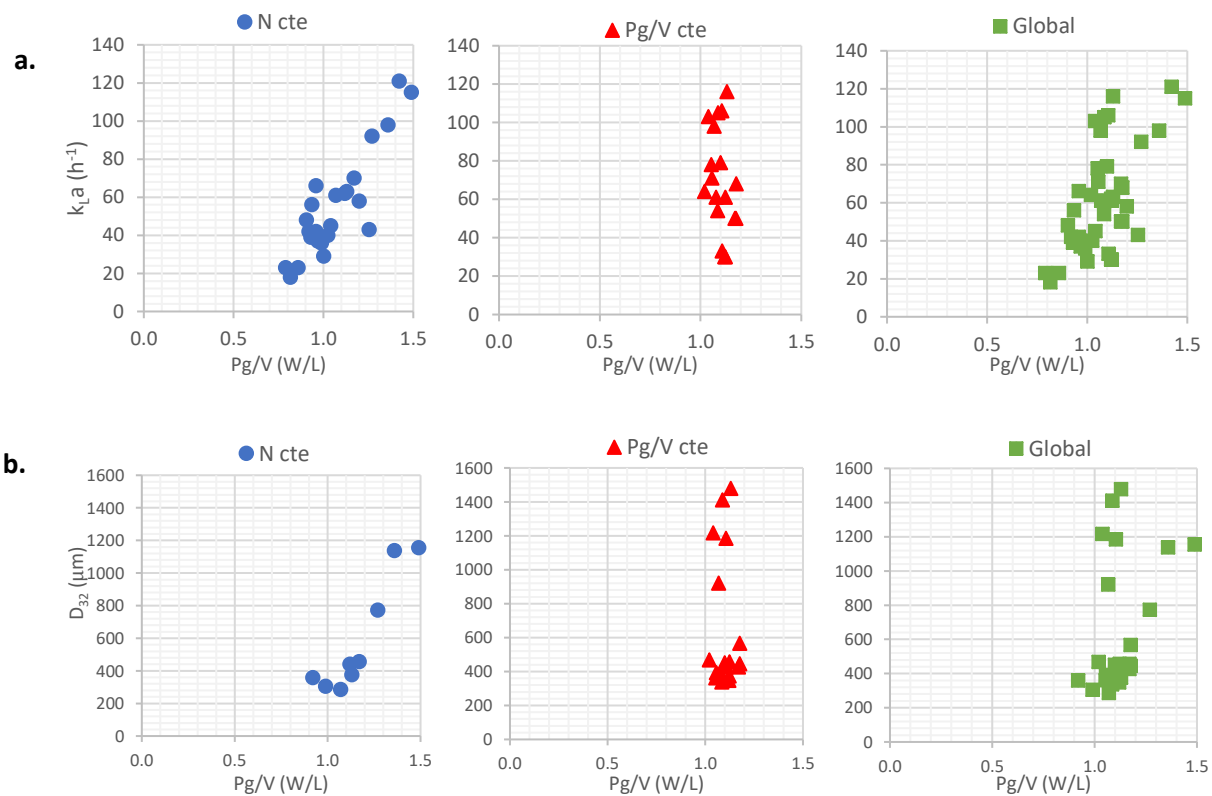


Figura 8.26. Relaciones obtenidas para los datos del a) k_{La} y b) D_{32} como función del suministro de potencia gaseada, para las fermentaciones conducidas para los escenarios independientes de N constante y Pg/V ; y para el escenario global.

La relación existente entre el suministro de potencia gaseada y las variables de respuesta se muestra en la Figura 8.26. La hipótesis de este trabajo plantea que el suministro de potencia determinaría en gran medida la transferencia de oxígeno, esto en primera instancia a través del tamaño de burbuja, y este, a su vez, sobre el k_{La} . Esto parecería ser cierto para el k_{La} , con base en lo observado el escenario conducido a N constante (Figura 8.26 a), donde la disminución en P_g/V fue concordante con la disminución del k_{La} . No obstante, lo contrario se observó al considerar el escenario de P_g/V constante, donde para un mismo valor de suministro de potencia gaseada (1.1 W/L) se obtuvieron múltiples valores de k_{La} , con lo que se refuta la hipótesis planteada. La misma tendencia se observa para el D_{32} . Además, el comportamiento de esta variable de respuesta resulta bastante atípico y contrario a lo teóricamente esperando, ya que la disminución en P_g/V conllevó a menores valores de D_{32} . Lo anterior indica que P_g/V no fue la variable determinante para k_{La} ni para D_{32} , a lo largo de las fermentaciones con *B. velezensis*.

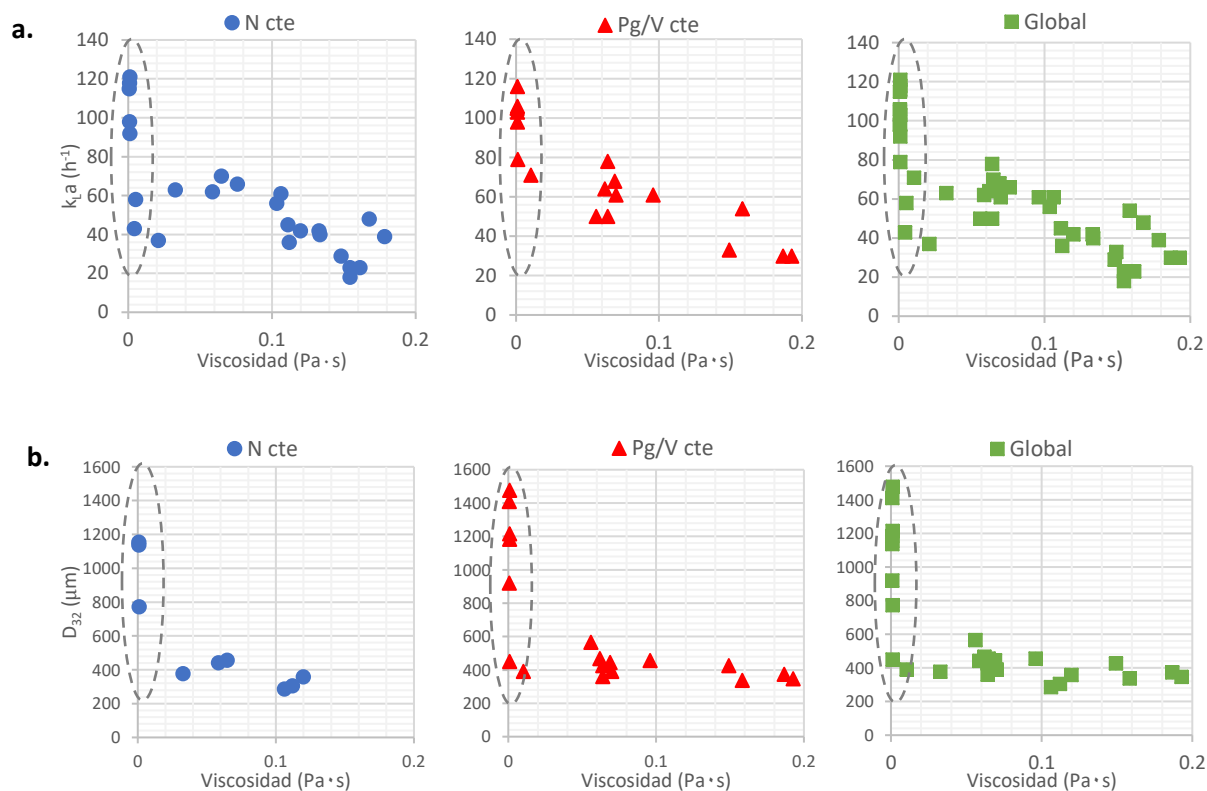


Figura 8.27. Relaciones obtenidas para los datos del **a)** k_{La} y **b)** D_{32} como función de la viscosidad, para las fermentaciones conducidas para los escenarios independientes de N constante y P_g/V ; y para el escenario

global. Los puntos experimentales resaltados en óvalos punteados corresponden a valores obtenidos entre las 0 y las 12 horas normalizadas.

La Figura 8.27 muestra la relación existente entre la viscosidad y las variables de respuesta. En el caso del k_{La} , se observa una gran similitud entre las tendencias obtenidas tanto para N constante como para Pg/V constante (Figura 8.27 a), a diferencia de lo observado para esta variable de respuesta como función del suministro de potencia gaseada (Figura 8.26 a). Esto se observa en el escenario global, donde no existe segregación entre cada escenario individual de suministro de potencia gaseada. En la Figura 8.27 a se observa que, a muy bajas viscosidades ($0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}$, observadas durante las primeras 12 horas normalizadas de cultivo), los valores de k_{La} se encuentran en un rango de entre 120 y 80 h^{-1} . Esto sugiere que la caída inicial en los valores del k_{La} no fue debida al aumento en la viscosidad del sistema. Este hecho pudo deberse a la adición de antiespumante o bien, al incremento en la concentración de biomasa, ya que ambos factores pudieran conformar una barrera física en la superficie de las burbujas de aire, dificultando la transferencia de oxígeno (García-Ochoa & Gómez, 2009). Sin embargo, una vez que la viscosidad del sistema fue aumentando, se observó la disminución paulatina en los valores del k_{La} . Algo similar sucede con el perfil del D_{32} (Figura 8.27 b), donde, a muy bajas viscosidades, se observan múltiples valores de D_{32} . Sin embargo, al aumentar la viscosidad, el D_{32} alcanza sus mínimos valores y se vuelve insensible al aumento de esta variable, indicando un comportamiento atípico del sistema.

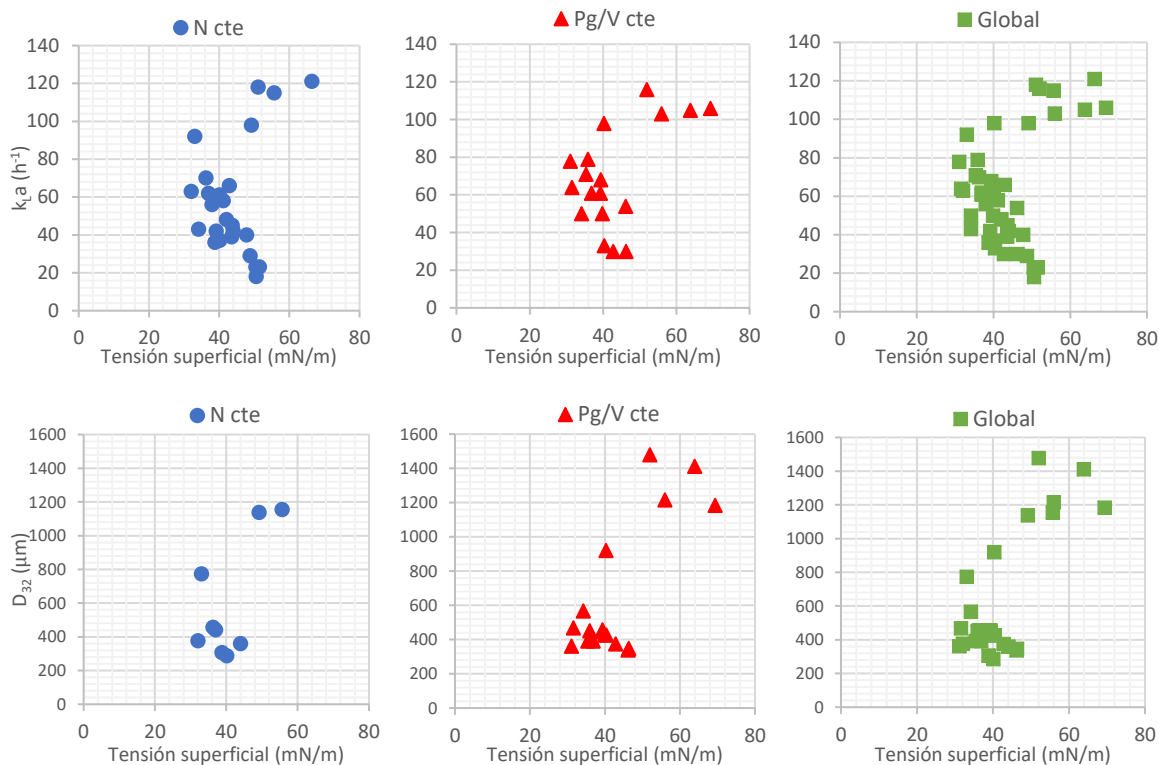


Figura 8.28. Relaciones obtenidas para los datos del **a)** k_{La} y **b)** D_{32} como función de la tensión superficial, para las fermentaciones conducidas para los escenarios independientes de N constante y Pg/V ; y para el escenario global.

Por último, la relación entre la tensión superficial y las variables de respuesta se muestra en la Figura 8.28. En este caso, ni el k_{La} ni el D_{32} parecen seguir una tendencia establecida como función de la tensión superficial, para ninguna de las dos condiciones de proceso estudiadas. Este comportamiento pudo estar asociado a la adición de antiespumante al medio, factor que puede estar enmascarando los posibles efectos debidos a la presencia de biosurfactantes. Se puede concluir que la tensión superficial, por sí sola, es un mal parámetro para predecir cualesquiera de éstas dos variables de respuesta.

Por otro lado, cabe resaltar que las tendencias observadas para los datos del k_{La} y el D_{32} , en función de las diferentes variables de proceso, son muy similares entre sí. Esta similitud sugeriría un cierto grado de correlación entre ambas variables de respuesta, como se muestra en la Figura 8.29. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la tendencia observada para el D_{32} es contraria a lo que se hubiera esperado. Se observa que el

incremento en el tamaño de burbuja corresponde a un aumento en los valores del k_{La} , hecho que es teóricamente contradictorio (Doran, 2013; Garcia-Ochoa & Gomez, 2009).

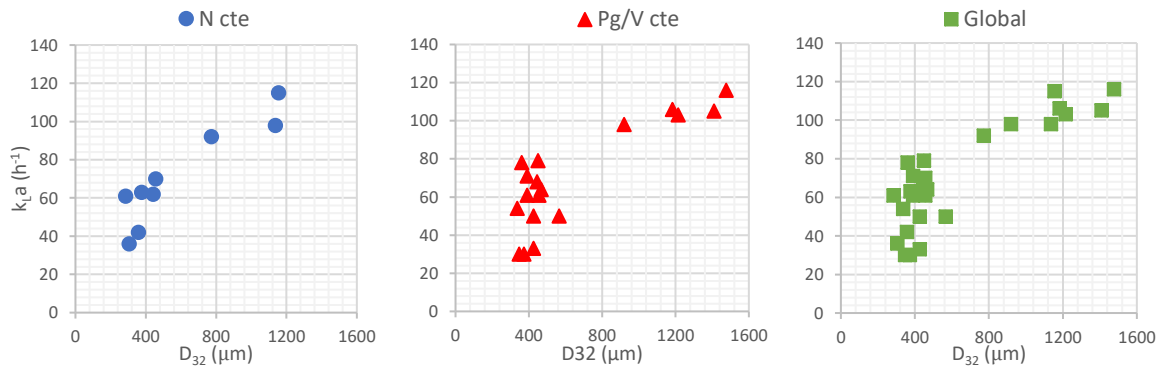


Figura 8.29. Relaciones obtenidas para los datos del k_{La} como función del D_{32} ; para las fermentaciones conducidas para los escenarios independientes de N constante y Pg/V ; y para el escenario Global.

Esta disminución en los valores de k_{La} , pese a la reducción del tamaño de burbuja (y el consecuente incremento del área interfacial), sugiere una importante afectación al k_L del sistema. Cabe aclarar que el área interfacial es a su vez la relación entre el *hold-up* del sistema (Φ) y el tamaño de burbuja (D_{32}). A pesar de que no se realizaron determinaciones experimentales de este parámetro, se piensa que el *hold-up* también incrementó a lo largo de las fermentaciones, ya que nivel de espuma dentro del reactor aumentó considerablemente a lo largo del cultivo.

Como se describió anteriormente en las Secciones 8.8 y 8.9, tales afectaciones sobre el k_L pudieron ser resultado del efecto sinérgico de los siguientes factores:

- 1) La caída en el suministro de potencia gaseada (en las fermentaciones conducidas a N constante), ya que k_L depende de la intensidad de la turbulencia del sistema, expresado como función de la energía disipada (Garcia-Ochoa & Gomez, 2004).
- 2) El aumento en la viscosidad aparente del medio que, por una parte, reduce la velocidad de ascenso de las burbujas (especialmente las pequeñas), agotando su capacidad de transferencia de oxígeno al mantenerlas inmersas por largos periodos de tiempo; y que, por otro lado, conlleva a un aumento en el grosor de las capas de

líquido que rodean a las burbujas, lo que incrementa la resistencia a la transferencia (Doran, 2013 b).

- 3) La presencia de biosurfactantes, ya que estos pueden aumentar la resistencia a la transferencia de oxígeno al formar una monocapa de moléculas en la interfase gas-líquido (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009; Painmanakul et al., 2005).

8.11 Obtención de correlaciones

Habiendo identificado las variables del sistema que mayor relación presentaron con las variables de respuesta k_La y D_{32} , se generó una serie de correlaciones, con el objetivo proponer una relación numérica que permita predecir dichos parámetros.

8.11.1 Correlaciones para la estimación del k_La

Con el objetivo de conocer la relación y el impacto que las variables tanto fisicoquímicas como reológicas del sistema tienen sobre el k_La , se generó una serie de correlaciones de la forma

$$k_La = C1 \left(\frac{Pg}{V} \right)^a (\eta_{ef})^b (\sigma)^c$$

donde Pg/V es el suministro de potencia gaseada volumétrica (W/m^3), σ es la tensión superficial (N/m), mientras que η_{ef} es la viscosidad efectiva ($Pa \cdot s$). Este último parámetro corresponde a la viscosidad aparente observada a la velocidad de deformación efectiva en el biorreactor, la cual es proporcional a la velocidad de agitación (Metzner & Otto, 1957):

$$\dot{\gamma}_{ef} = k_s N \quad (\text{Ec. 8.1})$$

donde k_s es la constante adimensional de Metzner & Otto, cuyo valor considerado fue de 11.5. En el caso de las fermentaciones conducidas a Pg/V constante, el valor de la velocidad de deformación efectiva fue incrementándose a lo largo del proceso como consecuencia del aumento en la velocidad de agitación, abarcando valores de 69 a 82.5 s^{-1} . Para las fermentaciones a N constante, este valor fue de 77 s^{-1} .

De acuerdo con las tendencias observadas en la Sección 8.9, se generaron cuatro correlaciones para la estimación del k_{La} : incluyendo las tres variables (Pg/V , σ y η_{ef}), la combinación de Pg/V y η_{ef} , incluyendo Pg/V únicamente (para conocer su influencia individual sobre el k_{La}), e incluyendo η_{ef} de manera individual (debido a que esta fue la variable que mayor relación mostró tener sobre los valores del k_{La}).

Los datos de k_{La} empleados para generar las correlaciones fueron aquellos obtenidos por el método de balance de gases para todas las fermentaciones y por el método dinámico de degasificación. Se emplearon los datos obtenidos para las dos condiciones de cultivo (N constante y Pg/V constante) y para ambas condiciones de inóculo (inóculos “tempranos” y “tardíos”), conformando un total de 43 puntos experimentales.

En la Tabla 8.3 se muestran los valores de los coeficientes obtenidos para cada variable considerada y el coeficiente de correlación (R^2).

Lo primero a resaltar en las correlaciones generadas son los valores del coeficiente de correlación, R^2 , los cuales son bajos (< 0.70). Esto es indicativo de la gran dispersión de los datos experimentales, y las limitantes que esto implica para la obtención de correlaciones precisas a partir de un sistema tan complejo. Las correlaciones con mayor R^2 fueron tanto la que incluye las tres variables, como la que sólo incluye la potencia gaseada volumétrica y la viscosidad (correlaciones 1 y 2). Para esta última, los valores de los exponentes para Pg/V y η_{ef} sufrieron mínimas modificaciones al eliminar la variable σ . Esto indica que el incluir la tensión superficial no conlleva a una mejora en el ajuste obtenido, ya que, como se mencionaba en la Sección 8.9, el comportamiento de esta variable (influenciado principalmente por la adición de antiespumante) lo convierte en un mal predictor del k_{La} .

Tabla 8.3. Correlaciones para la estimación del $k_L a$.

						Gráfico de correlación
Correlación	C1	a	b	c	R ²	
1 $k_L a = C1 \left(\frac{Pg}{V}\right)^a (\eta_{ef})^b (\sigma)^c$	6.2×10^{-6}	0.92	-0.15	-0.26	0.67	
2 $k_L a = C1 \left(\frac{Pg}{V}\right)^a (\eta_{ef})^b$	8.1×10^{-6}	1.00	-0.14	---	0.67	
3 $k_L a = C1 \left(\frac{Pg}{V}\right)^a$	1.7×10^{-9}	2.29	---	---	0.43	
4 $k_L a = C1 (\eta_{ef})^b$	7.9×10^{-3}	---	-0.18	---	0.62	

La correlación 3, que sólo incluye la variable Pg/V , presenta el menor valor de R^2 (0.43). Esto confirma lo observado en la Sección 8.9, donde se señala a Pg/V como un mal parámetro para predecir los valores de k_{La} . Esto es especialmente notorio en las fermentaciones conducidas a Pg/V constante, donde para un mismo valor de Pg/V se obtuvieron diversos valores de k_{La} , como se observa en el gráfico de dispersión generado para esta correlación.

Por otro lado, al considerar la viscosidad como única variable para estimar el k_{La} se obtiene un valor de R^2 de 0.62. Pese a que este valor es cercano al valor máximo obtenido (0.67), se observa una segregación en la dispersión de los puntos experimentales, donde la mayoría de los datos se agrupa en los valores extremos de la recta correspondiente a la correlación para el k_{La} , y pocos de ellos se dispersan en la parte media. Esto podría corresponder a lo observado en la Sección 8.9, donde se señala que el primer registro de caída en los valores del k_{La} no fue ocasionado por el aumento en la viscosidad del sistema. Este hecho se refleja en la acumulación de datos en la parte superior derecha de la recta de la correlación (valores máximos). De manera similar, la aglomeración de datos en la parte inferior de la recta correspondería a los datos de k_{La} obtenidos una vez registrado el aumento en la viscosidad del sistema.

En consideración a lo anterior, la correlación número 2 resultaría la más apropiada para la estimación del k_{La} , siendo mayor el efecto la variable η_{ef} que el de la variable Pg/V , como se observó al evaluar el efecto individual de dichas variables. No obstante, la inclusión de Pg/V representa una mejora en el ajuste a los datos experimentales.

Por otro lado, como era de esperarse, los coeficientes correspondientes a la viscosidad presentan valores negativos. No obstante, el valor absoluto de estos coeficientes resulta menor a los reportados en la literatura, en el rango de -0.2 a -0.7 (Garcia-Ochoa & Gomez, 2004; Xie et al., 2014.b; Yagi & Yoshida, 1975). Esto podría sugerir que, pese a la que el aumento en la viscosidad sí fue determinante para el descenso en los valores de k_{La} , su efecto podría haber sido atenuado, hasta cierto punto, por la presencia de biosurfactantes, al obtenerse un coeficiente similar al reportado por Albal et al. (1983).

8.11.2 Correlaciones para la estimación del D_{32}

De manera similar, se generaron cuatro correlaciones empíricas para la estimación del diámetro Sauter en función de las variables fisicoquímicas aquí estudiadas. Los datos empleados fueron aquellos correspondientes a las réplicas indicadas en la Sección 8.7, provenientes tanto de las fermentaciones a N constante como a P_g/V constante, incluyendo las fermentaciones con inóculos tanto “tempranos” como “tardíos”, conformando un total de 27 puntos experimentales. Los valores de los coeficientes obtenidos para cada variable considerada y el coeficiente de correlación (R^2) se muestran en la Tabla 8.4.

Lo primero a resaltar son los valores de coeficientes de correlación obtenidos, mayores a los obtenidos para las correlaciones para el k_{La} . Sin embargo, las gráficas de correlación (en particular para las correlaciones 2 y 4) sugieren que el mayor coeficiente de correlación sólo es indicativo de que el número de puntos y la distancia de ellos –que puede ser grande- por arriba y por debajo de la curva de regresión, es similar. Asimismo, los datos de las correlaciones 2 y 3 se concentran alrededor de dos puntos del eje de las abscisas. Esto indica que, para estos casos, un mayor valor de los R^2 no necesariamente indica que la línea de regresión prediga adecuadamente los valores experimentales.

La correlación con mayor valor de R^2 fue aquella que incluye las tres variables y en donde los datos se distribuyeron a lo largo de los ejes (correlación 1). Es de notar que, al eliminar la tensión superficial de la correlación 1 (lo que da la correlación 2), el coeficiente de correlación disminuye de 0.83 a 0.76, y los datos se agrupan alrededor de dos puntos en el eje de las abscisas.

Tabla 8.4. Correlaciones para la estimación del D_{32} .

						Gráfico de correlación
Correlación	C1	a	b	c	R ²	
1 $D_{32} = C1 \left(\frac{Pg}{V}\right)^a (\eta_{ef})^b (\sigma)^c$	5.0×10^{-5}	0.60	-0.16	0.78	0.83	
2 $D_{32} = C1 \left(\frac{Pg}{V}\right)^a (\eta_{ef})^b$	5.3×10^{-6}	0.54	-0.20	---	0.76	
3 $D_{32} = C1 \left(\frac{Pg}{V}\right)^a$	4.1×10^{-11}	2.33	---	---	0.14	
4 $D_{32} = C1 (\eta_{ef})^b$	2.3×10^{-4}	---	-0.20	---	0.76	

Al analizar el efecto individual del término Pg/V (correlación 3), el bajo valor para el coeficiente de correlación obtenido ($R^2 = 0.14$) indica que, al igual que para el k_{La} , Pg/V no es un buen predictor para definir el D_{32} . Lo anterior se hace evidente en las fermentaciones conducidas a Pg/V constante, donde para un único valor de Pg/V se determinaron diversos valores de D_{32} , los cuales muestran una segregación en el gráfico de correlación.

Por otro lado, al considerar únicamente el efecto de la viscosidad sobre el D_{32} (correlación 4) se obtiene un valor de R^2 relativamente alto (0.76), lo que indica que la fuerte relación existente entre estos parámetros. Esto confirma el nulo aporte de la inclusión del parámetro Pg/V , ya que se obtuvo el mismo valor de R^2 que cuando este parámetro sí es considerado (correlación 2). No obstante, al igual que para la correlación 2, se observa la agrupación de los datos en dos puntos en el eje de las abscisas. Este comportamiento confirma lo observado en la Sección 8.9 donde, para muy bajas viscosidades se observaron diversos valores de D_{32} , y al alcanzar su valor mínimo, este parámetro se mantuvo estable, mostrándose insensible al aumento en la viscosidad (ver Figura 8.27 b).

Por otro lado, dado que la viscosidad guarda una relación directa con el valor de D_{32} (ya que mayores viscosidades generan estructuras de mayor tamaño, al incrementar el grado de coalescencia del medio), el coeficiente para esta variable debería presentar valores positivos. Sin embargo, para todas las correlaciones que incluyen esta variable, se obtuvieron coeficientes negativos. Esto describe un comportamiento atípico del sistema, donde ocurrieron dos eventos simultáneos, pero que no guardan relación directa: 1) el aumento en la viscosidad, por la acumulación de PGA; y 2) la disminución (y estabilización) del diámetro Sauter, causado posiblemente por la presencia de biosurfactantes en el medio. Por lo tanto, todas las correlaciones donde se incluya la viscosidad reflejan este hecho, a pesar de que estas contradigan lo teóricamente esperado.

Algo similar a lo anterior sucede al considerar la variable Pg/V , cuyo exponente debería presentar signos negativos, ya que, a mayor energía suministrada al medio, menor será el tamaño de las estructuras generadas. Para este sistema, la mayor caída en los valores de Pg/V (en las fermentaciones conducidas a N constante) coincidió con la disminución del D_{32} .

El haber observado este mismo comportamiento en las fermentaciones conducidas a Pg/V constante (donde se esperaba un mayor control sobre el D_{32}), indica el poco efecto que la potencia gaseada tuvo sobre el tamaño de burbuja para este sistema.

En vista de lo anterior, a pesar de que las correlaciones obtenidas describen el fenómeno observado en este sistema, presentando incluso coeficientes de correlación relativamente altos (> 0.75), todas ellas predicen comportamientos opuestos a lo teóricamente establecido.

Para este sistema en particular, se propone que la presencia de los biosurfactantes, surfactina y bacilomicina, fue la causa principal de la disminución del diámetro Sauter, donde concentraciones bajas de estos compuestos fueron suficientes para alcanzar los mínimos valores de D_{32} registrados (ya que presentan concentraciones críticas micelares son de 9 y 28 ppm, respectivamente). Por ende, el aumento en su concentración (que se observó a la par del aumento en la viscosidad) ya no presentó mayores efectos sobre el tamaño de las burbujas.

Finalmente, cabe resaltar que, debido a la complejidad que presentó este sistema, muchas de las correlaciones reportadas en la literatura para la predicción del k_{La} (Garcia-Ochoa & Gomez, 2004; Ogut & Hatch, 1988; Xie et al., 2014.b; Yagi & Yoshida, 1975) habrían fallado al intentar estimar este parámetro en función de las diferentes variables (sobre todo en función de Pg/V) a lo largo del proceso. Lo anterior es todavía más evidente en el caso del D_{32} , donde el empleo de correlaciones como las reportadas por Alves et al. (2002), Bhavaraju et al. (1978) o Bouaifi et al. (2001) llevaría a sobrestimar los valores reales para este parámetro. Tales correlaciones reflejan los comportamientos observados para sistemas modelo, donde el aumento en Pg/V conlleva a menores valores del D_{32} ; mientras que el incremento en la viscosidad y en la tensión superficial genera burbujas de mayor tamaño, efectos que resultaron opuestos a lo observado en este trabajo.

El sistema biológico empleado en este trabajo para el estudio de la transferencia de oxígeno resultó ser altamente complejo, debido a las diversas interacciones entre las variables fisicoquímicas y operacionales, hecho que dificultó la obtención de correlaciones. Sin

embargo, los resultados aquí obtenidos evidenciaron que las observaciones establecidas a partir del estudio de sistemas modelo pueden no ser definitivas para un sistema biológico real.

8.12 Modelamiento reológico de los caldos de cultivo

Mediante las pruebas de flujo cortante simple, se descartó la existencia de esfuerzos normales cuantificables. Dado que serían estos esfuerzos los que tendrían un verdadero impacto sobre la potencia gaseada suministrada al sistema, se decidió descartar el impacto de la viscoelasticidad sobre la transferencia de oxígeno.

No obstante, el carácter viscoelástico de los caldos de cultivo fue determinado mediante pruebas oscilatorias, como se describió anteriormente. A partir de estos resultados, el comportamiento viscoelástico de los caldos de cultivo puede ser interpretado mediante el ajuste al modelo de Maxwell generalizado, a partir del cual se obtuvieron los tiempos de relajación y módulos de corte.

Muchos modelos reológicos hacen una analogía mecánica de los componentes viscoso y elástico que presenta el material. El componente elástico es representado por un resorte, considerado como sólido ideal que obedece a la ley de Hooke de elasticidad ($\tau_E = G_0 \gamma_E$). El componente viscoso se representa a través de un pistón, considerado como un fluido ideal que obedece a la ley de Newton de viscosidad ($\tau_V = \eta_0 \dot{\gamma}_V$). Una representación gráfica de la analogía mecánica del modelo de Maxwell se muestra en la Figura 8.30.

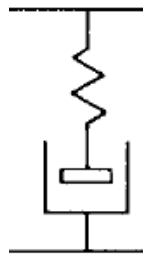


Figura 8.30. Analogía mecánica del modelo de Maxwell (adaptado de Barnes, 2000).

El modelo de Maxwell considera la deformación total del material como la suma de las deformaciones del resorte (parte elástica) y del pistón (parte viscosa):

$$\gamma = \gamma_E + \gamma_V \quad (\text{Ec. 8.2})$$

Diferenciando la ecuación anterior y sustituyendo por las definiciones de las leyes de Hooke y Newton, se obtiene

$$\frac{d\gamma}{dt} = \dot{\gamma} = \frac{1}{G_0} \left(\frac{d\tau}{dt} \right) + \frac{\tau}{\eta_0} \quad (\text{Ec. 8.3})$$

O bien,

$$\eta_0 \dot{\gamma} = \lambda_0 \left(\frac{d\tau}{dt} \right) + \tau \quad (\text{Ec. 8.4})$$

Donde $\lambda_0 = \eta_0/G_0$, y corresponde al tiempo de relajación (o tiempo de Maxwell), que puede interpretarse como el tiempo que le toma a una macromolécula para ser estirada cuando se le aplica una deformación (Steffe, 1992).

El modelo de Maxwell es comúnmente usado para interpretar información generada a partir de pruebas oscilatorias de soluciones poliméricas. Si la deformación es armónica, $\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t)$, entonces $\dot{\gamma} = \gamma_0 \omega \text{cos}(\omega t)$. Esta relación puede sustituirse en la ecuación anterior para obtener funciones dependientes de la frecuencia para fluidos de Maxwell:

$$G' = \frac{G\omega^2\lambda_0^2}{1+\omega^2\lambda_0^2} \quad (\text{Ec. 8.5})$$

$$G'' = \frac{G\omega\lambda_0}{1+\omega^2\lambda_0^2} \quad (\text{Ec. 8.6})$$

$$\eta'' = \frac{\eta}{1+\omega^2\lambda_0^2} \quad (\text{Ec. 8.7})$$

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} = \frac{1}{\omega\lambda_0} \quad (\text{Ec. 8.8})$$

Cuando $G' = G''$, $\tan(\delta) = 1$, y $\lambda_0 = 1/\omega$.

El modelo generalizado de Maxwell, o modelo multimodal, puede tener un número finito o infinito de elementos de Maxwell, cada uno con diferente tiempo de relajamiento (Figura 8.31).

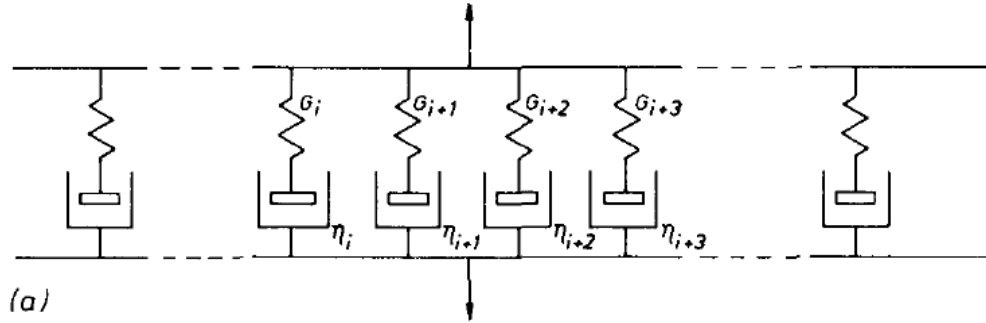


Figura 8.31. Analogía mecánica del modelo de Maxwell generalizado (adaptado de Barnes, 2000).

Para este modelo, las funciones dependientes de la frecuencia vienen dadas por la sumatoria de cada uno de los elementos considerados:

$$G' = \sum_{i=1}^n \frac{G_{0i} \omega^2 \lambda_{0i}^2}{1 + \omega^2 \lambda_{0i}^2} \quad (\text{Ec. 8.9})$$

$$G'' = \sum_{i=1}^n \frac{G_{0i} \omega \lambda_{0i}^2}{1 + \omega^2 \lambda_{0i}^2} \quad (\text{Ec. 8.10})$$

Únicamente los espectros obtenidos para muestras con concentraciones mayores a 6.7 g/L de PGA pudieron ser empleados para este modelamiento, ya que, a estas concentraciones, los módulos G' y G'' evolucionan hasta un alcanzar un punto de cruce.

En la Figura 8.32 se muestra el ajuste al modelo de los datos experimentales obtenidos para las muestras correspondiente a las 32 horas de cultivo normalizadas, bajo condiciones de N constante y Pg/V constante. Para el ajuste se emplearon 4 modos, cuyos tiempos de relajación y módulos de corte se muestran en la Tabla 8.4.

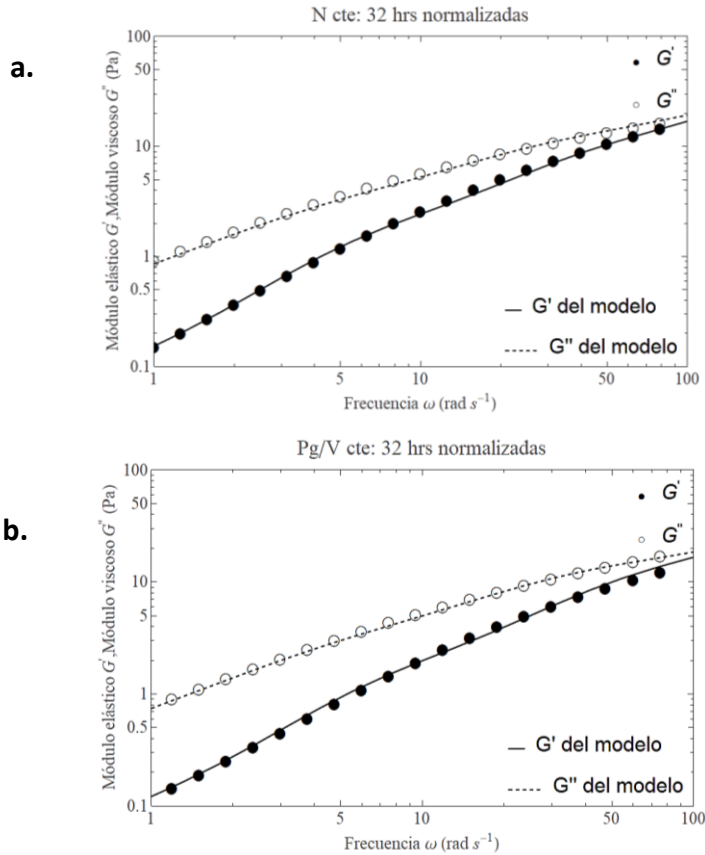


Figura 8.32. Módulo elástico (círculos llenos) y módulo viscoso (círculos vacíos) en función de la frecuencia angular bajo condiciones de **a)** N constante y **b)** Pg/V constante. Las líneas continua y punteada representan la predicción del modelo multimodal de Maxwell, para los módulos elástico y viscoso, respectivamente.

Tabla 8.5. Parámetros obtenidos del ajuste al modelo generalizado de Maxwell para los datos experimentales correspondientes a las 32 horas normalizadas bajo condiciones de N constante y Pg/V constante.

N constante								
G_{0i} (Pa)				λ_{0i} (s)				λ_0
$i = 1$	$i = 2$	$i = 3$	$i = 4$	$i = 1$	$i = 2$	$i = 3$	$i = 4$	0.0065
0.10	2.03	10.63	50.4	2.00	0.1834	0.0268	0.0035	
Pg/V constante								
G_{0i} (Pa)				λ_{0i} (s)				λ_0
$i = 1$	$i = 2$	$i = 3$	$i = 4$	$i = 1$	$i = 2$	$i = 3$	$i = 4$	0.0063
0.094	1.75	13.50	51.0	1.86	0.1575	0.0215	0.0028	

Como se muestra en la Tabla 8.5, los resultados obtenidos para ambas condiciones de proceso fueron comparables entre sí, lo que indica que las diferencias en el suministro de potencia gaseada no repercutieron en el carácter viscoelástico del PGA producido por *B. velezensis*. De este modo se obtuvo un tiempo característico de Maxwell (λ_0) promedio de 0.0064 segundos. Para un fluido viscoso perfecto, este valor se aproxima a cero, dado que el decaimiento en su deformación es instantáneo al eliminarse la tensión a la que fue sometido. Por otro lado, para un sólido elástico, este valor tiende a infinito, ya que no se presenta decaimiento de la deformación causada (UPV, 2008).

Para una solución polimérica, la existencia de un determinado número de tiempos de relajación corresponde a un número igual de eventos de relajación, que ocurren tanto intra como inter molecularmente. Para este tipo de soluciones, el tiempo de relajación más largo (λ_{01}) corresponderá a la mayor escala de longitud del material, es decir, a la molécula entera y las interacciones intermoleculares que ocurren en el medio, como entrelazamientos y fenómenos de reptación (Del Giudice et al., 2017). Para este biopolímero, se ha reportado que, a pH 7.2, las cadenas de PGA adoptan una conformación de enrollamiento aleatoria (*random coil*). A altas concentraciones de PGA (> 1g/L), esta conformación promueve que cadenas de polímero se solapen y se entrelacen (Wang et al., 2017).

Los tiempos de relajación subsecuentes, λ_{02} y λ_{03} , podrían corresponder a eventos de relajación desarrollándose a escalas de longitud cada vez menores, como son en segmentos de la cadena de monómeros, e inclusive interacciones entre las fases continua y dispersa (Del Giudice et al., 2017).

Finalmente, el tiempo de relajación más corto, λ_{04} , correspondería a interacciones propias del solvente, ya que a altas frecuencias de oscilación (correspondientes a tiempos cortos) únicamente las moléculas del solvente manifiestan movimiento.

9. CONCLUSIONES

- ✓ Las fermentaciones con *Bacillus velezensis* 83 presentaron una caída de hasta el 40 % del valor inicial de Pg/V , al operar a una velocidad de agitación constante.
- ✓ Bajo condiciones de potencia gaseada constante, los valores de k_{La} y D_{32} no se mantuvieron constantes, ambos disminuyeron a lo largo del proceso, al igual que lo hicieron bajo condiciones de N constante (donde Pg/V disminuyó a lo largo del cultivo).
- ✓ En primera instancia, los valores del k_{La} fueron abatidos posiblemente por la adición de antiespumante; posteriormente su disminución estuvo mayormente relacionada al incremento en la viscosidad del sistema. Los valores del k_{La} pudieron correlacionarse con las variable viscosidad (η) y suministro de potencia (Pg/V), de la siguiente forma:
$$k_{La} = 8.1 \times 10^{-6} \left(\frac{Pg}{V}\right)^{1.0} (\eta_{ef})^{-0.14} \quad (R^2 = 0.67);$$
 siendo el efecto de η_{ef} superior al de Pg/V .
- ✓ El aumento en la viscosidad disminuyó la velocidad de transferencia de oxígeno, lo que a su vez ocasionó la disminución de la velocidad específica de consumo de oxígeno de *B. velezensis* 83, tanto para condiciones de N constante y Pg/V constante.
- ✓ Las tendencias de las predicciones obtenidas respecto a los valores de D_{32} en función de las principales variables del proceso fueron opuestas a lo teóricamente esperado. Se hipotetiza que el comportamiento del D_{32} estuvo influenciado principalmente por la presencia de biosurfactantes en el medio, ya que bajas concentraciones de tales compuestos (< 10 ppm) fueron suficientes para disminuir drásticamente los valores de dicho parámetro.
- ✓ El decremento del k_{La} a lo largo de los cultivos, tanto en condiciones de N constante como de Pg/V constante, sólo podría ser explicado por una disminución importante del k_L , ya que el D_{32} también disminuyó durante el cultivo (incrementándose la superficie de transferencia).
- ✓ Los caldos de cultivo con concentraciones de PGA superiores a 6.7 g/L, obtenidos bajo los dos esquemas de suministro de potencia gaseada, presentaron comportamiento

viscoelástico y ajustaron al modelo de Maxwell generalizado de 4 modos, presentando un tiempo de relajamiento de 0.0064 segundos.

De forma global, puede decirse que, aunque la disipación de energía es un factor determinante para definir el tamaño de las estructuras formadas y la transferencia de oxígeno en un tanque agitado, su impacto individual se vio minimizado por la complejidad de las interacciones entre las variables fisicoquímicas y operacionales involucradas. El particular comportamiento observado en este sistema, especialmente para el D_{32} , no hubiera podido estimarse a partir del uso de correlaciones encontradas en la literatura, obtenidas a partir de fluidos modelo. Los resultados aquí obtenidos reflejan la compleja interrelación de los múltiples factores presentes en un bioproceso real, hecho que constituye el principal aporte de este trabajo.

10. PERSPECTIVAS

El estudio de la transferencia de oxígeno durante las fermentaciones con *Bacillus velezensis* 83 para la producción de PGA permitió identificar cómo las variaciones en las características fisicoquímicas y reológicas del sistema influyeron sobre los valores del k_{La} y las distribuciones de tamaños de burbuja. Estas afectaciones no pudieron ser contrarrestadas por el suministro de potencia gaseada constante retroajustada, obteniéndose resultados comparables a lo observado bajo condiciones de agitación constante.

El incremento en el área interfacial de transferencia de oxígeno aquí observado (derivado de la disminución en el tamaño de burbuja), sugiere que la caída en los valores del k_{La} fueron efecto de fuertes afectaciones sobre el k_L del sistema. Por tanto, resulta necesario investigar en qué medida este término es afectado por las diferentes variables fisicoquímicas y operacionales, en sistemas tan complejos como los procesos fermentativos reales.

Por otro lado, como complemento a este trabajo se propone el estudio de la transferencia de oxígeno mediante el empleo de fluidos modelo con características fisicoquímicas y reológicas similares al modelo biológico aquí empleado. De esta manera, sería posible evaluar los efectos independientes de: 1) el aumento de la viscosidad, y 2) la presencia de agentes biosurfactantes sobre la transferencia de oxígeno, así como su efecto combinado. Además, debido a que el sistema biológico aquí empleado presentó perturbaciones importantes (como lo fueron la adición de antiespumante y las diferencias en las viscosidades máximas alcanzadas), el emplear sistemas inertes permitiría un mayor control de las condiciones del sistema, otorgando una mayor reproducibilidad a los resultados.

Por otra parte, se propone buscar la automatización del control del suministro de potencia en el biorreactor multipuerto de escala piloto. Esto minimizaría las oscilaciones que se observan al modificar de manera manual la velocidad de agitación, lo que facilitaría la operación en escenarios de P_g/V constante para futuros trabajos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdolahi, F., Moosavian, M. A., & Vatani, A. (2005). The mechanism of action of antifoams. *Journal of Applied Sciences*, 5(6), 1122–1129. <https://doi.org/10.3923/jas.2005.1122.1129>
- Albal, R., Shah, Y., & Schumpe, A. (1983). Mass transfer in multiphase agitated contactors. *The Chemical Engineering Journal*, 27, 61–80.
- Alves, S., Maia, C., Vasconcelos, J., & Serralheiro, A. (2002). Bubble size in aerated stirred tanks. *Chemical Engineering Journal*, 89(1–3), 109–117. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(02\)00008-6](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(02)00008-6)
- Amanullah, A., Buckland, B., & Nienow, A. (2004). Mixing in the fermentation and cell culture industries. En *Handbook of industrial mixing science and practice* (pp. 1071–1110). JOHN WILEY & SONS, INC.
- Ascanio, G., Castro, B., & Galindo, E. (2004). Measurement of power consumption in stirred vessels - A review. *Chemical Engineering Research and Design*, 82, 1282–1290. <https://doi.org/10.1205/cerd.82.9.1282.44164>
- Bajaj, I. B., & Singhal, R. S. (2010). Effect of aeration and agitation on synthesis of poly (γ -glutamic acid) in batch cultures of *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(4), 635–640. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0059-2>
- Barnes, H. (2000). Linear viscoelasticity and time effects. En *A handbook of elementary rheology* (pp. 81–105). University of Wales, Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics.
- Bhavaraju, S., Russell, T., & Blanch, H. (1978). The design of gas sparged devices for viscous liquid systems. *American Institute of Chemical Engineers*, 24(3), 454–466.
- Bouaifi, M., Hebrard, G., Bastoul, D., & Roustan, M. (2001). A comparative study of gas hold-up, bubble size, interfacial area and mass transfer coefficients in stirred gas – liquid reactors and bubble columns. *Chemical Engineering and Processing*, 40, 97–111.
- Brito-Bazan, M., Cuervo-Amaya, D. H., Corkidi, G., & Galindo, E. (2017). Air and oil dispersions in a four-phase fermentation model, studied under varying physicochemical conditions and retrofitted constant gassed power input. *Chemical Engineering Research and Design*, 120, 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.02.019>
- Buescher, J. M., & Margaritis, A. (2007). Microbial biosynthesis of polyglutamic acid biopolymer and applications in the biopharmaceutical, biomedical and food industries. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1), 1–19. <https://doi.org/10.1080/07388550601166458>
- Calderbank, P. (1958). Physical rate process in industrial fermentation. Part I: The interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation. *Transactions of the Institution of Chemical Engineers*, 36, 443–463.
- Chmiel, H., Krischke, W., Schmid, U., Schiitoff, M., Walitza, E., & Wessling, V. (1990). Rheology and mass transfer in mycelial fermentation broth. En D. Springer (Ed.), *Third European Rheology Conference and Golden Jubilee Meeting of the British Society of Rheology*. (pp. 104–106). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-009-0781-2_41
- Connor, C., Randall, E. & Goodall, C. (1990). Measurement of the effects of physical and chemical variables on

- bubble size. *International Journal of Mineral Processing*, 28, 139–149.
- Cooper, C., Fernstrom, G., & Miller, S. (1944). Performance of agitated gas-liquid contractors. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 36(6), 504–509.
- Córdova-Aguilar, M. S. (2003). *Estudio de las dispersiones de aceite, biomasa y aire en un sistema modelo de fermentación tetrafásica*. Tesis de doctorado en Biotecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cristiano-Fajardo, S. A. (2020). *Producción de metabolitos asociados al sobreflujo de carbono, crecimiento y esporulación de Bacillus velezensis 83 en función de la velocidad específica de consumo de glucosa*. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cristiano, S. (2012). *Estrategia de cultivo en lote alimentado para el crecimiento vegetativo y la producción de esporas de Bacillus subtilis 83*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cuervo-Amaya, D. H. (2016). *Dispersión de aceite y aire en un tanque de mezclado bajo condiciones de potencia constante y concentraciones variables de surfactantes (proteína) y sólidos (biomasa micelar)*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Del Giudice, F., Haward, S. J., & Shen, A. Q. (2017). Relaxation time of dilute polymer solutions: A microfluidic approach. *Journal of Rheology*, 61(2), 327–337. <https://doi.org/10.1122/1.4975933>
- Doran, P. (2013) a. Mixing. En *Bioprocess engineering principles* (Segunda Ed, pp. 255-300). Oxford, UK: Elsevier.
- Doran, P. (2013) b. Mass transfer. En *Bioprocess engineering principles* (Segunda Ed, pp. 378–434). Oxford, UK: Elsevier.
- Fahim, S., Dimitrov, K., Gancel, F., Vauchel, P., Jacques, P., & Nikov, I. (2012). Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21. *Bioresource Technology*, 126, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.019>
- Flores, C., Medina-Valdez, A., Peña, C., Serrano-Carreón, L., & Galindo, E. (2020). Oxygen transfer rate determines molecular weight and production of poly (γ -glutamic acid) as well as carbon utilization by *Bacillus velezensis* 83. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(9), 2383–2392. <https://doi.org/10.1002/jctb.6420>
- Gabelle, J. C., Augier, F., Carvalho, A., Rousset, R., & Morchain, J. (2011). Effect of tank size on k_{La} and mixing time in aerated stirred reactors with non-Newtonian fluids. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 89(5), 1139–1153. <https://doi.org/10.1002/cjce.20571>
- Galaction, A. I., Cascaval, D., Oniscu, C., & Turnea, M. (2004). Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal*, 20(1), 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.02.005>
- Galindo, E. (1996). Fermentadores: Operaciones de transferencia. En *V Curso Latinoamericano de Biotecnología* (pp. 157–207). Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad

Católica de Valparaíso.

- Galindo, E., & Nienow, A. W. (1992). Mixing of highly viscous simulated xanthan fermentation broths with the Lightnin A-315 impeller. *Biotechnology Progress*, 8(3), 233–239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bp00015a009>
- García-Cerna, S. (2017). *Estudio de los patrones de flujo y de el $k_{L,a}$ local en un biorreactor prototipo de escala piloto*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Zacatepec.
- García-Ochoa, F., Castro, E. G., & Santos, V. E. (2000). Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(9), 680–690. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00272-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00272-6)
- García-Ochoa, F., & Gomez, E. (1998). Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions. *Biochemical Engineering Journal*, 1, 1–10.
- García-Ochoa, F., & Gomez, E. (2004). Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, 59(12), 2489–2501. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.02.009>
- García-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153–176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
- García-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E., & Merchuk, J. C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 289–307. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.01.011>
- García-Rentería, R. V. (2018). *Análisis local de la dispersión de aire y transferencia de oxígeno en caldos de fermentación no-newtonianos, a escala piloto*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas (en trámite). Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gogate, P. R., Beenackers, A. A. C. M., & Pandit, A. B. (2000). Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: A critical review. *Biochemical Engineering Journal*, 6(2), 109–144. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00081-4)
- Gómez-Pazarín, K. (2014). *Capacidad viscosificante del alginato producido por Azotobacter vinelandii en cultivos en matraces agitados sometidos a bajos consumos de potencia*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Grenville, R., Giacomelli, J., Padron, G., & Brown, D. (2017). Mixing: Impeller performance in stirred tanks. *Chemical Engineering*, 124(8), 42–51.
- Holguín-Salas, A. (2019). *Estudio de la dispersión multifásica y el área interfacial de transferencia de masa a nivel local, en un sistema modelo de fermentación micelial de cuatro fases*. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas (en trámite). Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jakobsen, H. A., Lindborg, H., & Dorao, C. A. (2005). Modeling of bubble column reactors: Progress and limitations. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44(14), 5107–5151. <https://doi.org/10.1021/ie049447x>

- Karimi, A., Golbabaei, F., Mehrnia, M. R., Neghab, M., Mohammad, K., Nikpey, A., & Pourmand, M. R. (2013). Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, *10*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1735-2746-10-6>
- Kawase, Y., & Hashimoto, N. (1996). Gas hold-up and oxygen transfer in three-phase external-loop airlift bioreactors: Non-Newtonian fermentation broths. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *65*(4), 325–334. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199604\)65:4<325::AID-JCTB440>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199604)65:4<325::AID-JCTB440>3.0.CO;2-R)
- Kerdouss, F., Bannari, A., & Proulx, P. (2006). CFD modeling of gas dispersion and bubble size in a double turbine stirred tank. *Chemical Engineering Science*, *61*(10), 3313–3322. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.11.061>
- Kunioka, M. (1995). Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) from l-glutamine, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *44*(3–4), 501–506. <https://doi.org/10.1007/BF00169951>
- Laakkonen, M., Moilanen, P., Alopaeus, V., & Aittamaa, J. (2007). Modelling local bubble size distributions in agitated vessels. *Chemical Engineering Science*, *62*(3), 721–740. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.10.006>
- Lessard, R. R., & Zieminski, S. A. (1971). Bubble coalescence and gas transfer in aqueous electrolytic solutions. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals*, *10*(2), 260–269. <https://doi.org/10.1021/i160038a012>
- Li, H., Xu, H., Li, S., Feng, X., Xu, H., & Ouyang, P. (2011). Effects of dissolved oxygen and shear stress on the synthesis and molecular weight of welan gum produced from *Alcaligenes* sp. CGMCC2428. *Process Biochemistry*, *46*(5), 1172–1178. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.007>
- Linek, V., Hovorka, F., Opletal, M., Haidl, J., Moucha, T., Rejl, F. J., & Kordac, M. (2012). Power and mass transfer correlations for the design of multi-impeller gas-liquid contactors for non-coalescent electrolyte solutions. *Chemical Engineering Journal*, *209*, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.08.005>
- Lucatero, S., Larralde-Corona, C. P., Corkidi, G., & Galindo, E. (2003). Oil and air dispersion in a simulated fermentation broth as a function of mycelial morphology. *Biotechnology Progress*, *19*(2), 285–292. <https://doi.org/10.1021/bp020118e>
- Luo, Z., Guo, Y., Liu, J., Qiu, H., Zhao, M., Zou, W., & Li, S. (2016). Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid : current progress , challenges , and future perspectives. *Biotechnology for Biofuels*, *9*(134), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0537-7>
- Marten, M. R., Velkovska, S., Khan, S. a, & Ollis, D. F. (1996). Rheological, mass transfer, and mixing characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. *Biotechnology Progress*, *12*(95), 602–611. <https://doi.org/10.1021/bp950066b>
- Martín, M., Montes, F. J., & Galán, M. A. (2008). Bubbling process in stirred tank reactors I: Agitator effect on bubble size, formation and rising. *Chemical Engineering Science*, *63*, 3212–3222. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2008.03.028>
- Martín, M., Montes, F. J., & Galán, M. A. (2010). Mass transfer rates from bubbles in stirred tanks operating with viscous fluids. *Chemical Engineering Science*, *65*, 3814–3824.

<https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.03.015>

- Medina, A. (2019). *Estudio del consumo de potencia, velocidad de transferencia y consumo de oxígeno en cultivos de Bacillus amyloliquefaciens 83 en matraces agitados para la producción de ácido γ -poliglutámico*. Tesis de Licenciatura en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Metzner, A., & Otto, R. E. (1957). Agitation of non-Newtonian fluids. *American Institute of Chemical Engineers*, 3(1), 3–10. <https://doi.org/10.1002/aic.690030103>
- Morao, A., Maia, C., Fonseca, M., Vasconcelos, J., Alves, S., & Mora, A. (1999). Effect of antifoam addition on gas-liquid mass transfer in stirred fermenters. *Bioprocess Engineering*, 20, 165–172.
- Nienow, A. W. (1990). Agitators for mycelial fermentations. *Trends in Biotechnology*, 8, 224–233. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90180-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90180-6)
- Nienow, A., & Ulbrecht, J. (1985). Gas-liquid mixing and mass transfer in high viscosity liquids. En J. Ulbrecht & G. Patterson (Eds.), *Mixing of liquids by mechanical agitation* (pp. 203–238). Gordon and Breach Science Publishers.
- Ogut, A. L. I., & Hatch, R. T. (1988). Oxygen transfer into Newtonian and non-Newtonian fluids in mechanically agitated vessels. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 66(February).
- Painmanakul, P., Loubière, K., Hébrard, G., Mietton-peuchot, M., & Roustan, M. (2005). Effect of surfactants on liquid-side mass transfer coefficients. *Chemical Engineering Science*, 60, 6480–6491. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.04.053>
- Parthasarathy, R., Jameson, G., & Ahmed, N. (1991). Bubble breakup in stirred vessels - Predicting the Sauter mean diameter. *Transactions of the Institution of Chemical Engineers*, 69, 295–301.
- Paul, E., Atiemo-Obeng, V., Kresta, S. (Ed.). (2004). Fluids: rheology and model fluids. En *Handbook of industrial mixing science and practice* (pp. 148–152). JOHN WILEY & SONS, INC.
- Pulido-Mayoral, N., & Galindo, E. (2004). Phases dispersion and oxygen transfer in a simulated fermentation broth containing castor oil and proteins. *Biotechnology Progress*, 20(5), 1608–1613. <https://doi.org/10.1021/bp030064o>
- Ramsay, J., Simmons, M. J. H., Ingram, A., & Stitt, E. H. (2016). Mixing of Newtonian and viscoelastic fluids using “butterfly” impellers. *Chemical Engineering Science*, 139, 125–141. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.09.026>
- Ranade, V., Ulbrecht, J. (1977). Gas dispersion in agitated viscous inelastic and viscoelastic liquids. *Proc. 2nd. Europ. Conf. Mixing.*, 83–100.
- Regestein née Meissner, L., Arndt, J., Palmen, T. G., Jestel, T., Mitsunaga, H., Fukusaki, E., & Büchs, J. (2017). Investigation of poly(γ -glutamic acid) production via online determination of viscosity and oxygen transfer rate in shake flasks. *Journal of Biological Engineering*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0065-4>
- Richard, A., & Margaritis, A. (2002). Production and mass transfer characteristics of non-Newtonian biopolymers for biomedical applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(4), 355–374. <https://doi.org/10.1080/07388550290789559>

- Richard, A., & Margaritis, A. (2003). Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(3), 299–305. <https://doi.org/10.1002/bit.10568>
- Routledge, S. J. (2012). Beyond de-foaming: the effects of antifoams on bioprocess productivity. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201210014>
- Scharmm, G. (2000). *A Practical Approach to Rheology and Rheometry* (2nd Edition). Karlsruhe, Germany: HAAKE.
- Schumpe, A., & Deckwer, W. D. (1987). Viscous media in tower bioreactors: Hydrodynamic characteristics and mass transfer properties. *Bioprocess Engineering*, 2(2), 79–94. <https://doi.org/10.1007/BF00369528>
- Shaligram, N. S., & Singhal, R. S. (2010). Surfactin - a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), 119–134.
- Shih, I., Lin, C., Wu, J., & Hsieh, C. (2009). Production of antifungal lipopeptide from *Bacillus subtilis* in submerged fermentation using shake flask and fermentor. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26(6), 1652–1661. <https://doi.org/10.1007/s11814-009-0237-0>
- Soriano-Peña, E. (2016). *Efecto de la limitación nutricional en la esporulación de Bacillus amyloliquefaciens 83*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Steffe, J. (1992). Viscoelasticity. En F. Press (Ed.), *Rheological methods in food process engineering* (2a Edición, pp. 294–348). Michigan, USA.
- Thimon, L., Peyoux, F., Maget-Dana, R., & Michel, G. (1992). Surface-active properties of antifungal lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69(1), 92–93. <https://doi.org/10.1007/BF02635884>
- UPV, U. P. de V.-. (2008). *Comportamiento Mecánico Dinámico de Materiales Poliméricos | 47/93 | UPV*. España: YouTube. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=yMigzS3RkqE&t=814s>
- Valdivieso, C., Valdivieso, R., & Valdivieso, O. (2011). Determinación del tamaño muestral mediante el uso de árboles de decisión. *Investigación & Desarrollo: Revista Periódica de Difusión Científica de La Universidad Privada Boliviana*, 1(11), 148–176. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.23881/idupbo.011.1>
- Vrábel, P., Van der Lans, R. G. J. M., Luyben, K. C. A. M., Boon, L., & Nienow, A. W. (2000). Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers: modelling and measurements. *Chemical Engineering Science*, 55, 5881–5896.
- Wang, L., Chen, J., Wang, L., Wu, S., Zhang, G., Ye, X., & Shi, Q. (2017). Conformations and molecular interactions of poly- γ -glutamic acid as a soluble microbial product in aqueous solutions. *Scientific Reports*, (April), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13152-2>
- Wilming, A., Begemann, J., Kuhne, S., Regestein, L., Bongaerts, J., Evers, S., Büchs, J. (2013). Metabolic studies of γ -polyglutamic acid production in *Bacillus licheniformis* by small-scale continuous cultivations. *Biochemical Engineering Journal*, 73, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.008>

- Xie, M., Xia, J., Zhou, Z., Chu, J., Zhuang, Y., & Zhang, S. (2014).a. Flow pattern , mixing , gas Hold-up and mass transfer coefficient of triple-impeller configurations in stirred tank bioreactors. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *53*, 5941–5953. <https://doi.org/10.1021/ie400831s>
- Xie, M., Xia, J., Zhou, Z., Zhou, G., Chu, J., & Zhuang, Y. (2014).b. Power consumption , local and average volumetric mass transfer coefficient in multiple-impeller stirred bioreactors for xanthan gum solutions. *Chemical Engineering Science*, *106*, 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.10.032>
- Yagi, H., & Yoshida, F. (1975). Gas absorption by Newtonian and non-Newtonian fluids in sparged agitated vessels. *Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development*, *14*(4), 488–493. <https://doi.org/10.1021/i260056a024>
- Zeng, W., Chen, G., Guo, Y., Zhang, B., Dong, M., Wu, Y., Liang, Z. (2017). Production of poly- γ -glutamic acid by a thermotolerant glutamate-independent strain and comparative analysis of the glutamate dependent difference. *AMB Express*, *7*(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0512-0>
- Zhou, G., & Kresta, S. M. (1998). Correlation of mean drop size and minimum drop size with the turbulence energy dissipation and the flow in an agitated tank. *Chemical Engineering Science*, *53*(11), 2063–2079. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(97\)00438-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(97)00438-7)
- Zhou, G., Tanguy, P. A., & Dubois, C. (2000). Power consumption in a double planetary mixer with non-Newtonian and viscoelastic materials. *Chemical Engineering Research and Design*, *78*(3), 445–453. <https://doi.org/10.1205/026387600527347>

ANEXO I. Cálculo de la velocidad de agitación para el escalamiento de la fermentación con *Bacillus velezensis* 83, de un volumen de trabajo de 2 a 100 L.

Ecuaciones empleadas :

$$Pg = 0.0312 * Re^{0.064} * Fr^{-0.156} * Na^{-0.38} * \left(\frac{T}{D}\right)^{0.8} * P$$

$$Re = \frac{\rho ND^2}{\eta} \quad Fr = \frac{DN^2}{g} \quad Na = \frac{F}{ND^3} \quad P = N_p \rho N^3 D^5$$

Datos:

VARIABLE	FERMENTADOR 2 L	FERMENTADOR 100 L
T: Diámetro del tanque (m)	0.13	0.47
D: Diámetro del impulsor (m)	0.045	0.157
Ni: Número de impulsores	2	3
F: Flujo de aireación (m ³ /s)	2.67 X 10 ⁻⁵	1.3X10 ⁻³
N: Velocidad de agitación (rps)	15	¿?
V: volumen (l)	2	100
ρ: Densidad (kg/m ³)		1000
η: viscosidad (kg/m.s)		0.001
Np= Número de potencia para turbina Rushton (-)		5.0

Sustituyendo valores y resolviendo para el **fermentador de 2 L**:

$$Re = 30\,375 \quad Fr = 1.0321 \quad Na = 0.020 \quad P = 3.11 \text{ watts}$$

$$Pg = 1.95 \text{ W}$$

Multiplicando por el número de impulsores:

$$Pg_{Total} = Pg * Ni = 1.95 * 2 = 3.9 \text{ W}$$

Dividiendo entre el volumen total:

$$\frac{Pg_{Total}}{V} = \frac{3.9 \text{ W}}{2 \text{ L}} = 1.95 \text{ W/L}$$

Para el **fermentador de 100 L**, el valor de P_g teórico para 1 impulsor es obtenido multiplicando el resultado anterior por el volumen total y dividiendo entre el número de impulsores:

$$P_g = \frac{P_{g_{Total}} * V}{N_i} = \frac{1.95 \frac{W}{L} * 100 L}{3} = \mathbf{65 W}$$

Sustituyendo las ecuaciones de Re , Fr , Na y P en la ecuación para obtener P_g , se obtiene:

$$P_g = 0.0312 * \left(\frac{\rho N D^2}{\eta}\right)^{0.064} * \left(\frac{D N^2}{g}\right)^{-0.156} * \left(\frac{F}{N D^3}\right)^{-0.38} * \left(\frac{T}{D}\right)^{0.8} * (N_p \rho N^3 D^5)$$

Despejando N de la ecuación anterior, queda:

$$N^{3.133} = \frac{P_g}{0.0312 * \left(\frac{\rho D^2}{\eta}\right)^{0.064} * \left(\frac{D}{g}\right)^{-0.156} * \left(\frac{F}{D^3}\right)^{-0.38} * \left(\frac{T}{D}\right)^{0.8} * (N_p \rho D^5)}$$

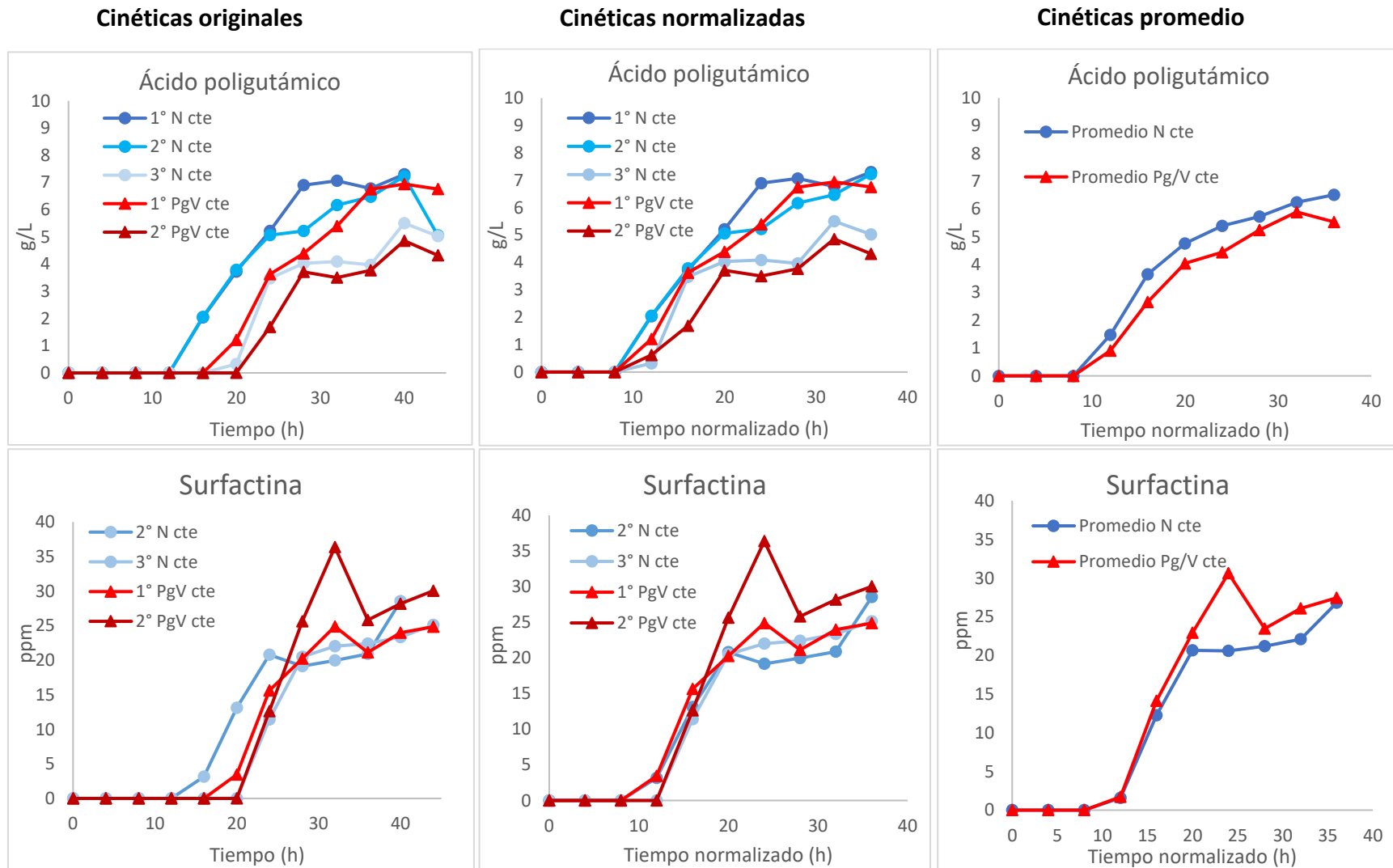
Sustituyendo los valores correspondientes al fermentador de 100 L, se obtiene:

$$N^{3.13} = 330$$

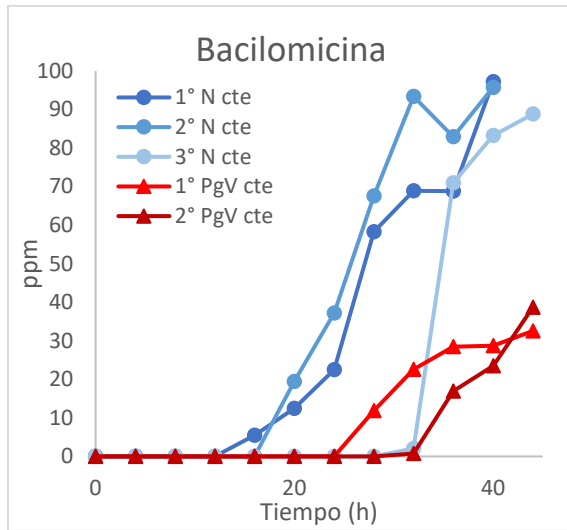
$$\mathbf{N = 6.4 rps = 389 rpm}$$

De este modo, se determinó que la velocidad de agitación para las fermentaciones realizadas a escala piloto debía ser de 389 rpm. Para fines prácticos, se decidió redondear este valor a 400 rpm.

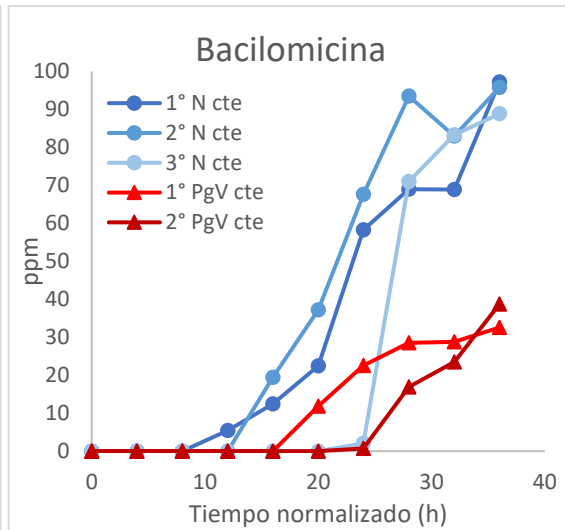
ANEXO II. Cinéticas obtenidas para los diferentes parámetros evaluados durante las fermentaciones con *Bacillus velezensis* 83, bajo condiciones de velocidad de agitación constante (N cte) y potencia gaseada constante (Pg/V constante).



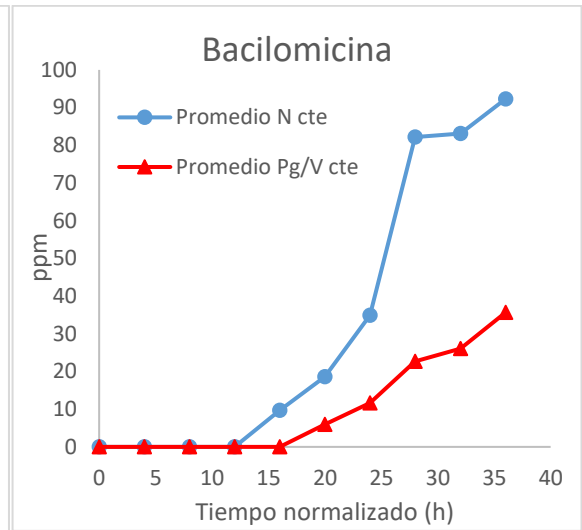
Cinéticas originales



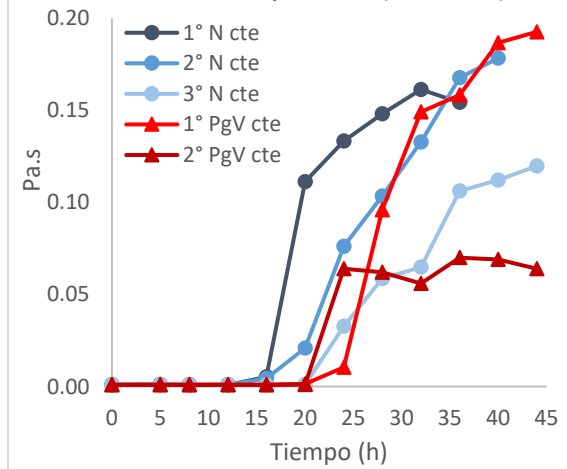
Cinéticas normalizadas



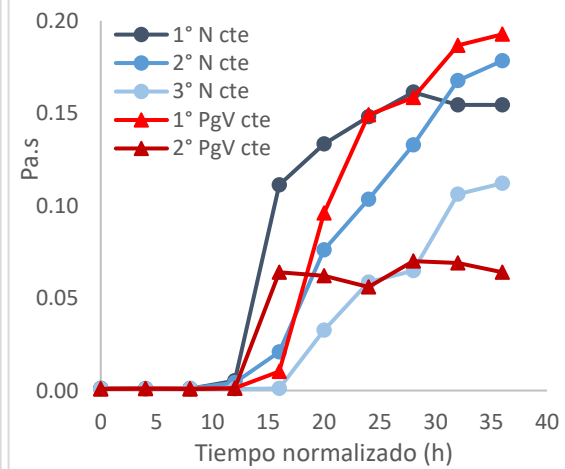
Cinéticas promedio



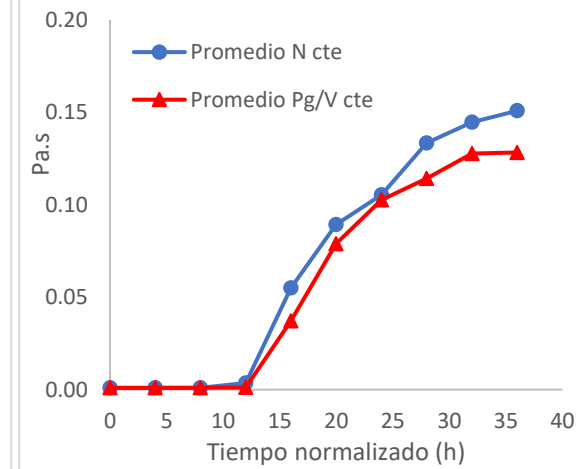
Viscosidad aparente (a 100 s⁻¹)



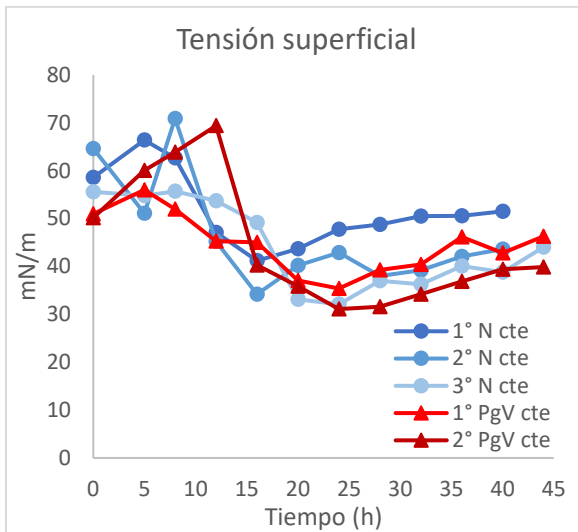
Viscosidad aparente (a 100 s⁻¹)



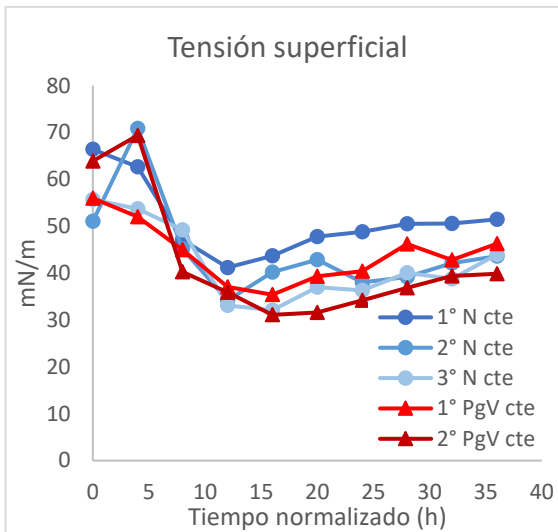
Viscosidad aparente (a 100 s⁻¹)



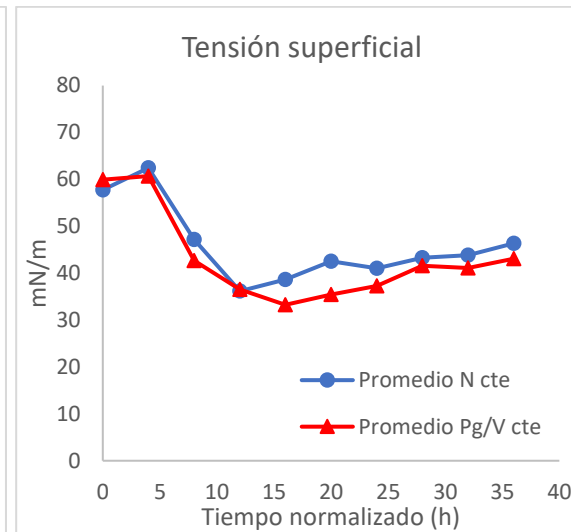
Cinéticas originales



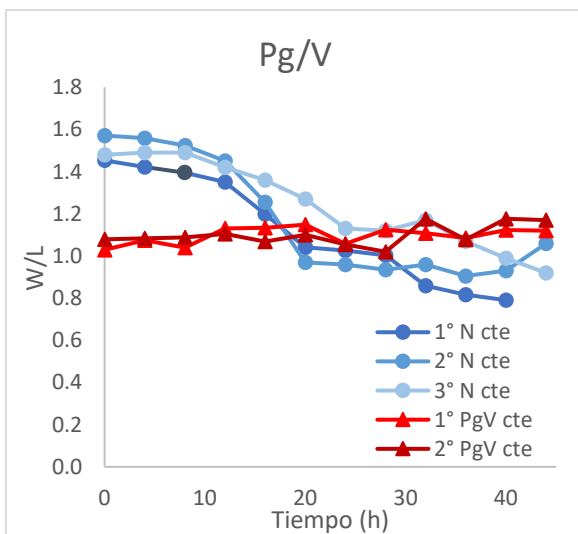
Cinéticas normalizadas



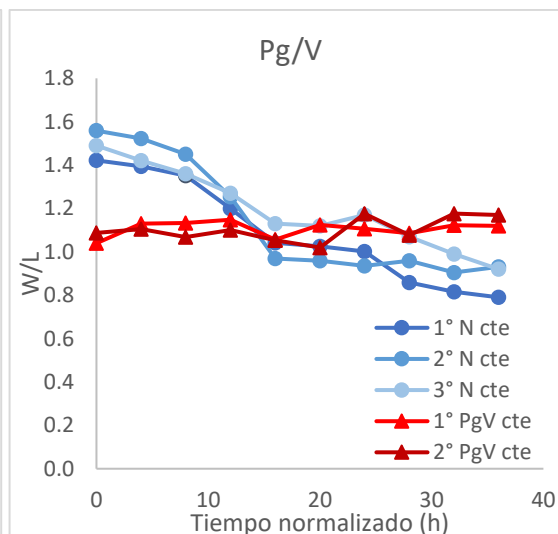
Cinéticas promedio



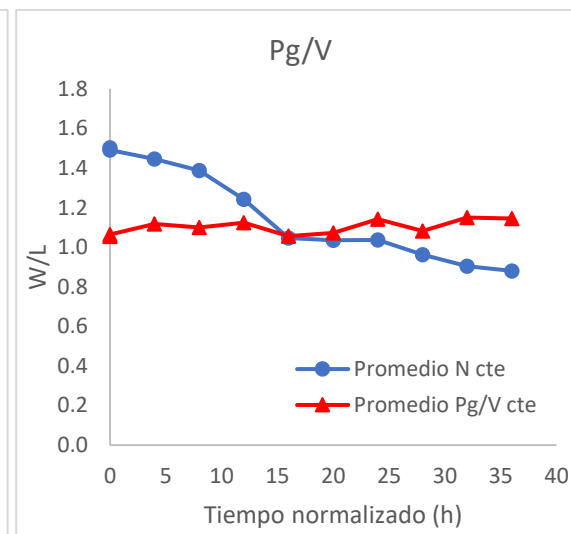
Pg/V



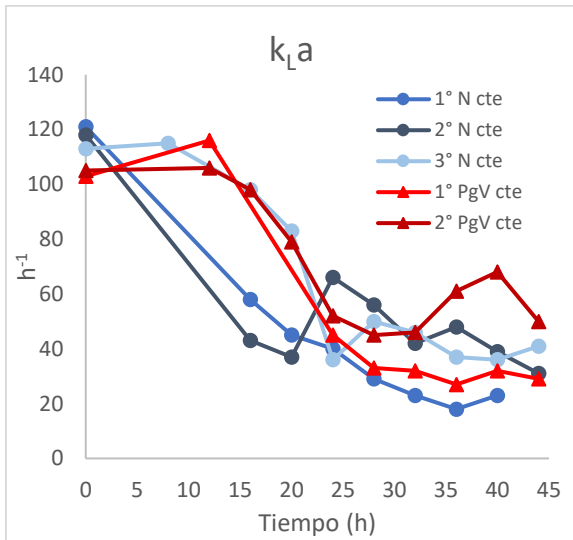
Pg/V



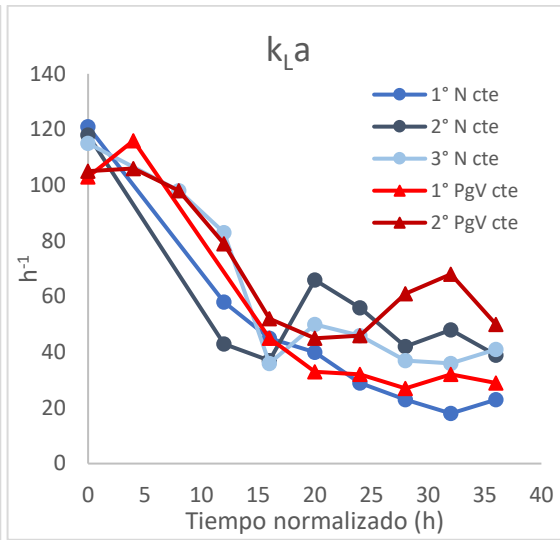
Pg/V



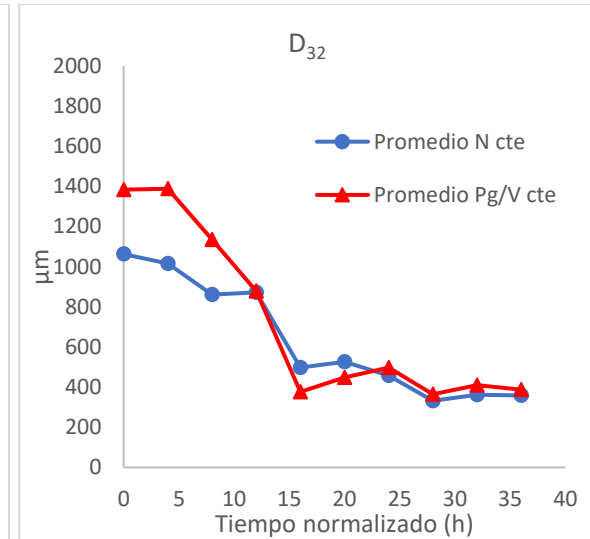
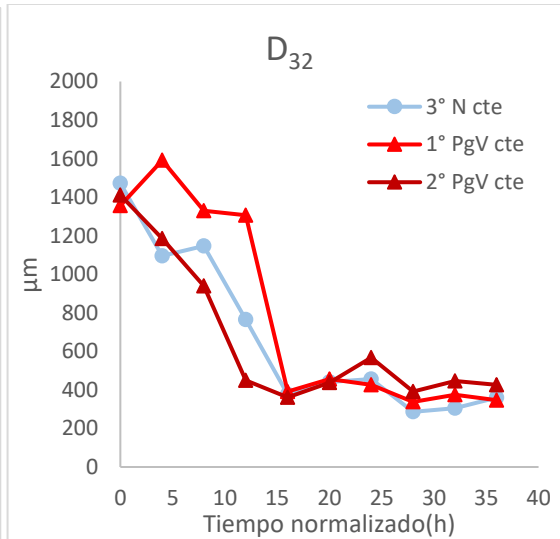
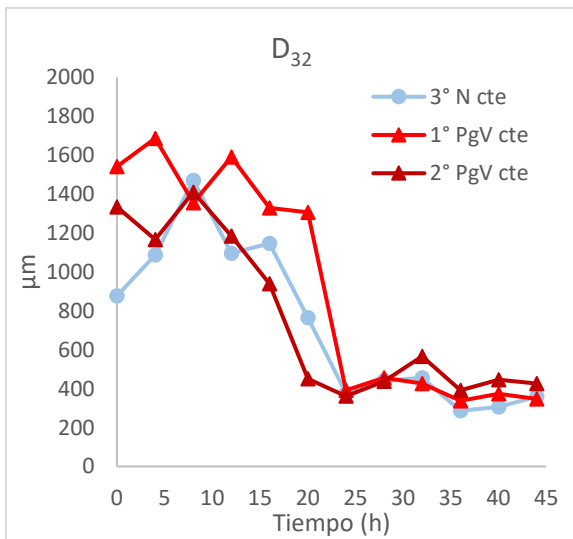
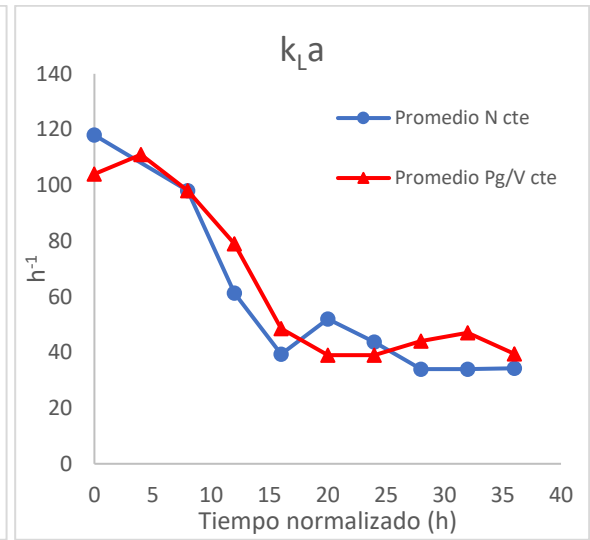
Cinéticas originales



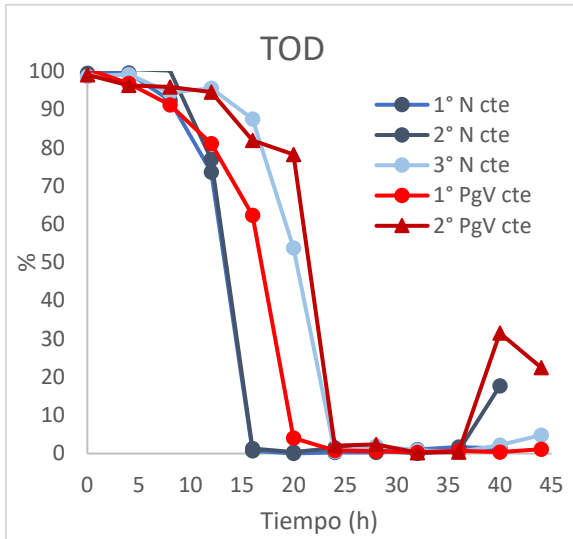
Cinéticas normalizadas



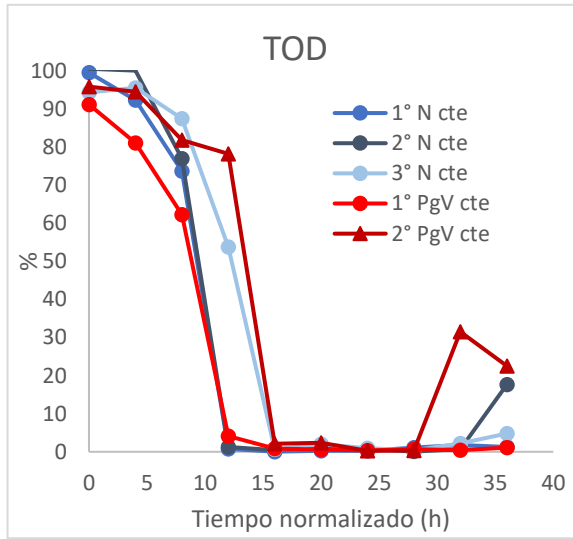
Cinéticas promedio



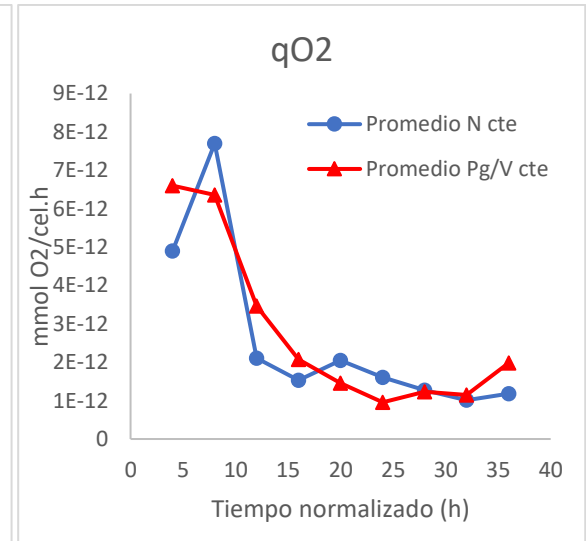
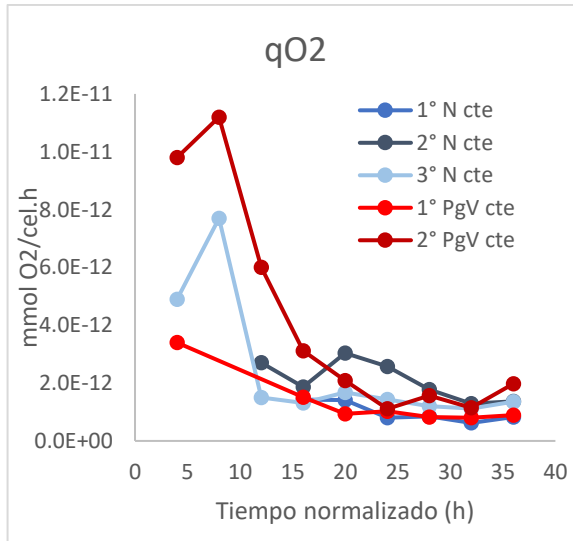
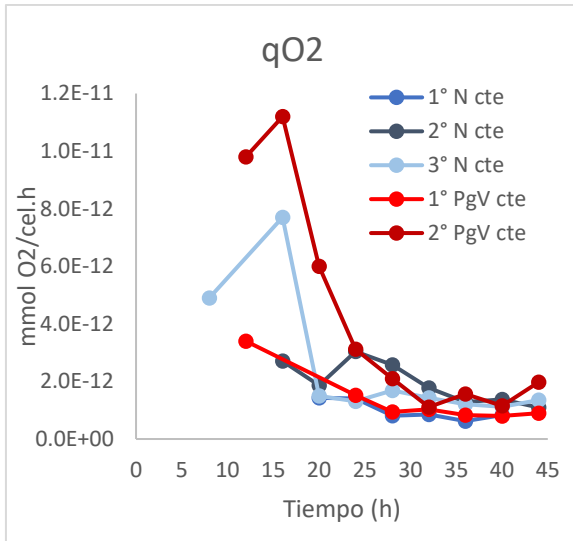
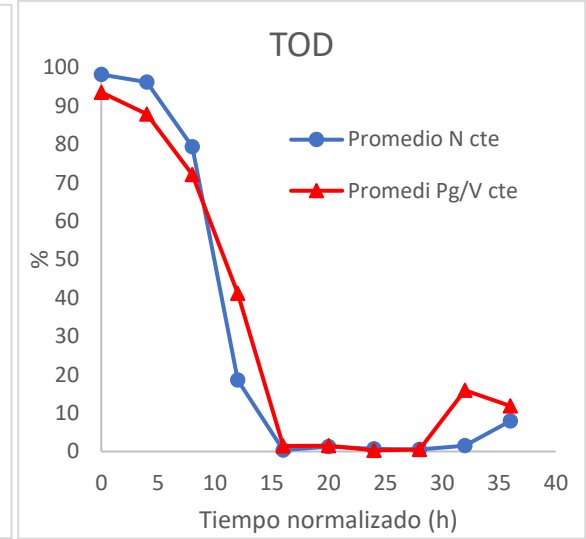
Cinéticas originales



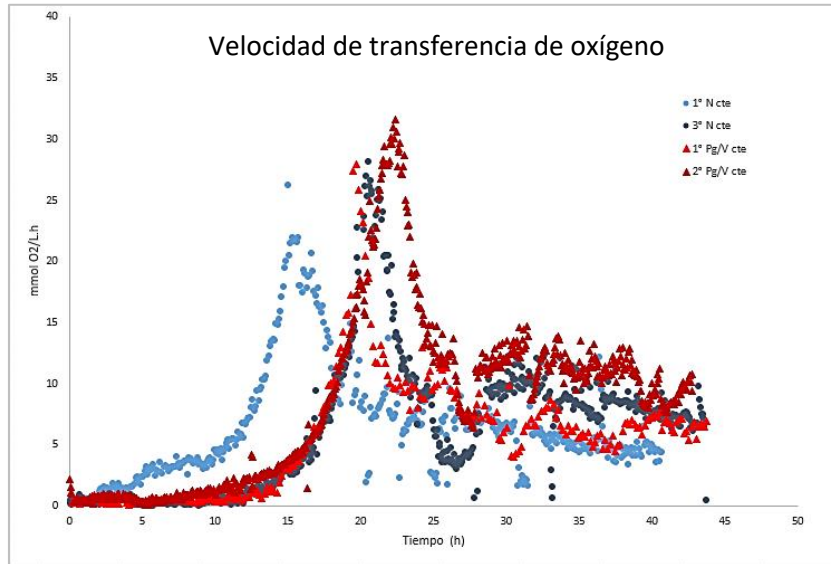
Cinéticas normalizadas



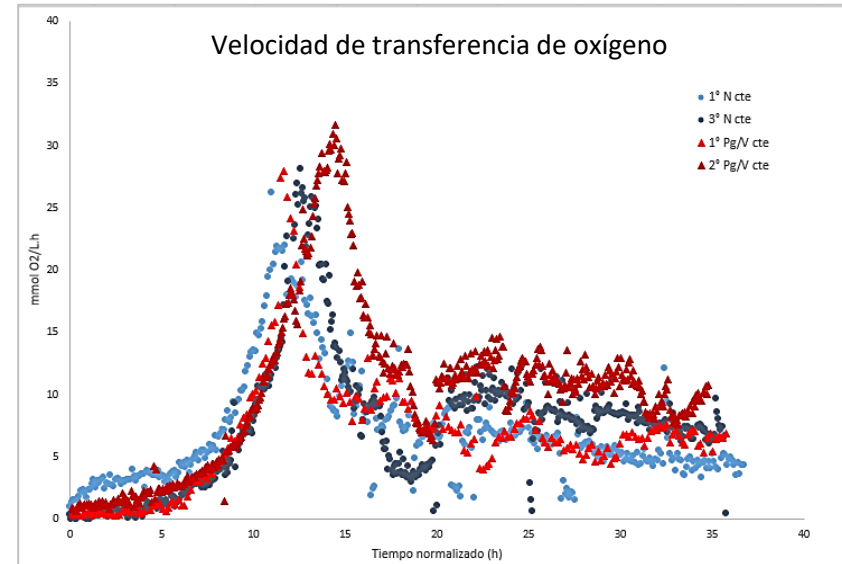
Cinéticas promedio



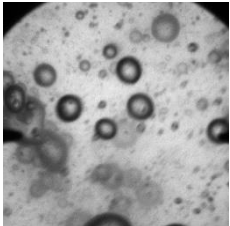
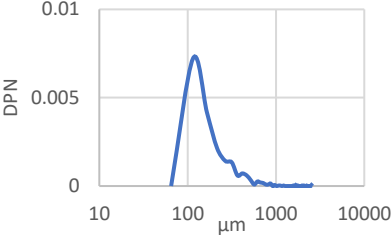
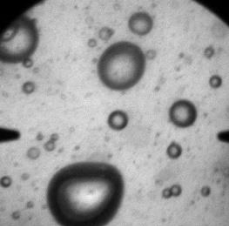
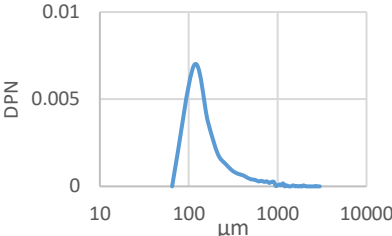
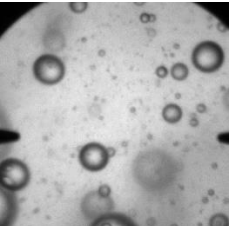
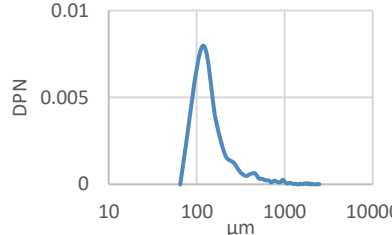
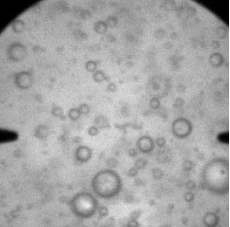
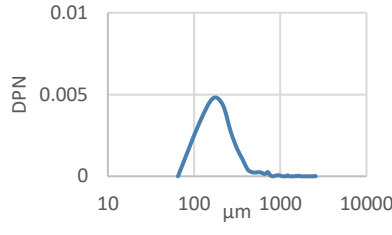
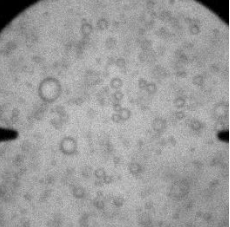
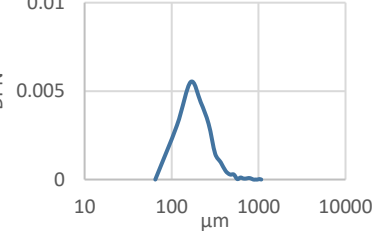
Cinéticas originales



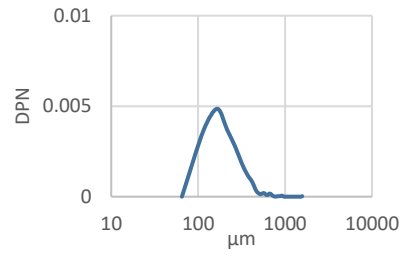
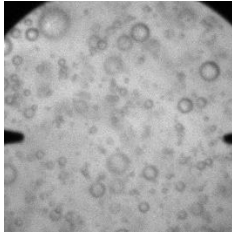
Cinéticas normalizadas



ANEXO III. Distribuciones de tamaños de burbuja y diámetros característicos obtenidos durante la fermentación con *B. velezensis* para la producción de PGA, bajo condiciones de N constante

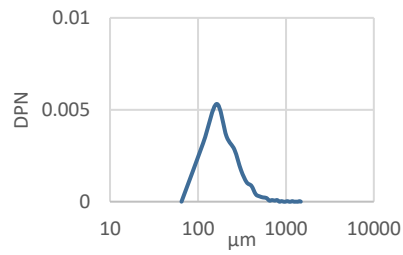
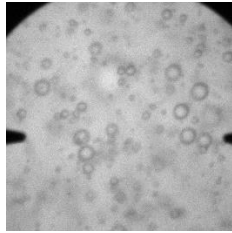
Tiempo normalizado	DPN	Parámetros estadísticos
0 h	 	<p>Diámetro promedio: 255 μm Diámetro Sauter: 1154 μm Moda: 104 μm</p>
4 h	 	<p>Diámetro promedio: 306 μm Diámetro Sauter: 1073 μm Moda: 104 μm</p>
8 h	 	<p>Diámetro promedio: 292 μm Diámetro Sauter: 1137 μm Moda: 97 μm</p>
12 h	 	<p>Diámetro promedio: 260 μm Diámetro Sauter: 773 μm Moda: 152 μm</p>
16 h	 	<p>Diámetro promedio: 234 μm Diámetro Sauter: 376 μm Moda: 173 μm</p>

20 h



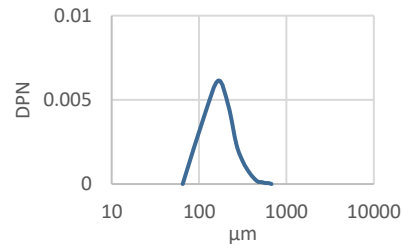
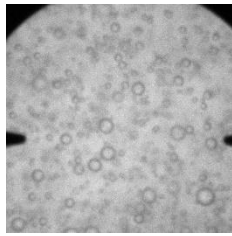
Diámetro promedio: 241 μm
Diámetro Sauter: 441 μm
Moda: 139 μm

24 h



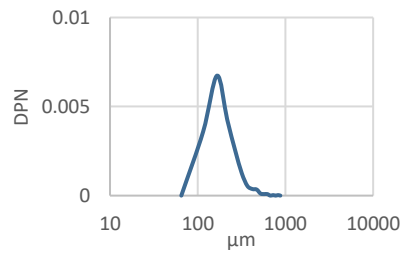
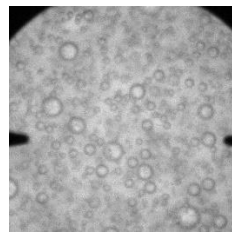
Diámetro promedio: 242 μm
Diámetro Sauter: 456 μm
Moda: 180 μm

28 h



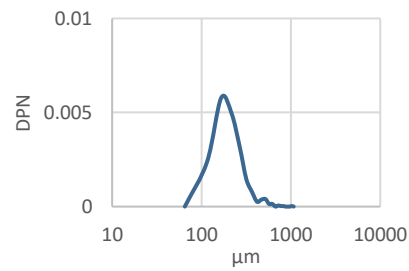
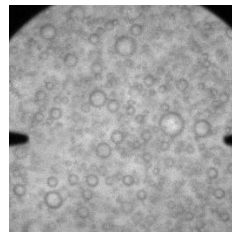
Diámetro promedio: 209 μm
Diámetro Sauter: 286 μm
Moda: 138 μm

32 h



Diámetro promedio: 213 μm
Diámetro Sauter: 306 μm
Moda: 159 μm

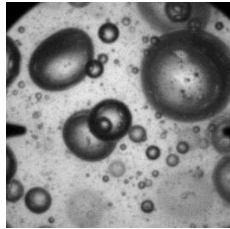
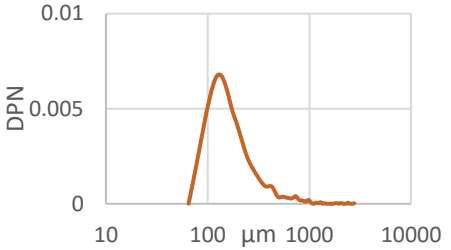
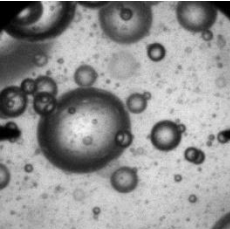
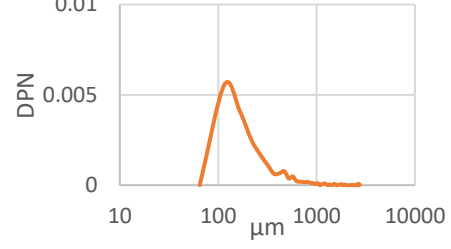
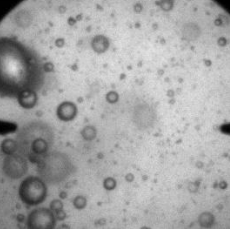
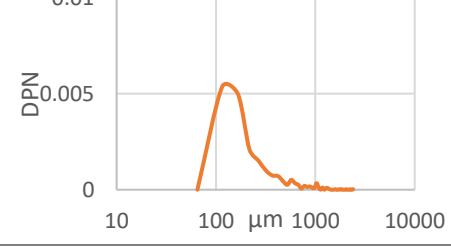
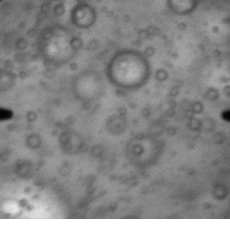
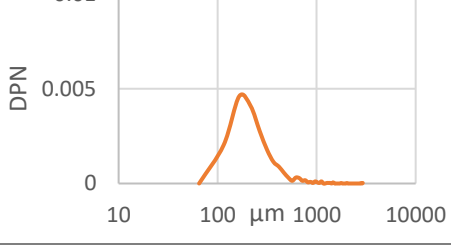
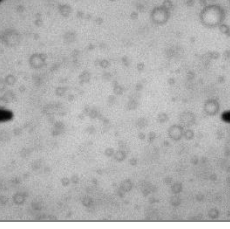
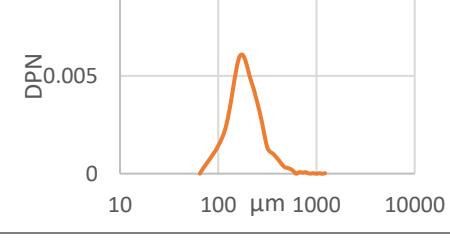
36 h



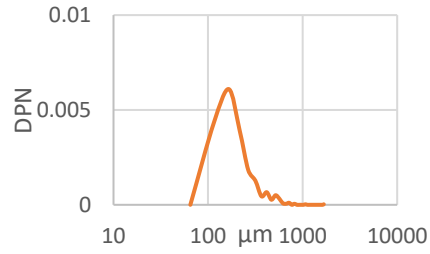
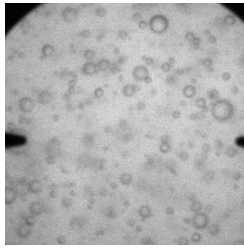
Diámetro promedio: 234 μm
Diámetro Sauter: 360 μm
Moda: 194 μm

ANEXO IV. Distribuciones de tamaños de burbuja y diámetros característicos obtenidos durante la fermentación con *B. velezensis* para la producción de PGA, bajo condiciones de Pg/V constante.

1ª RÉPLICA

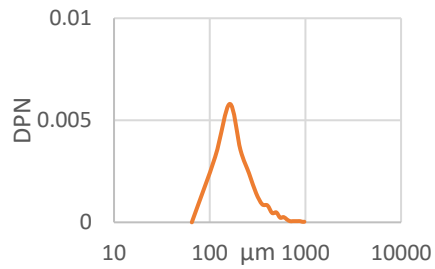
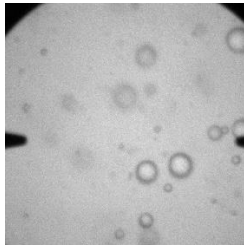
Tiempo normalizado	DPN	Parámetros estadísticos
<p>0 h</p> 		<p>Diámetro promedio: 295 μm Diámetro Sauter: 1216 μm Moda: 104 μm</p>
<p>4 h</p> 		<p>Diámetro promedio: 318 μm Diámetro Sauter: 1478 μm Moda: 124 μm</p>
<p>8 h</p> 		<p>Diámetro promedio: 305 μm Diámetro Sauter: 1330 μm Moda: 124 μm</p>
<p>12 h</p> 		<p>Diámetro promedio: 302 μm Diámetro Sauter: 1306 μm Moda: 173 μm</p>
<p>16 h</p> 		<p>Diámetro promedio: 240 μm Diámetro Sauter: 391 μm Moda: 201 μm</p>

20 h



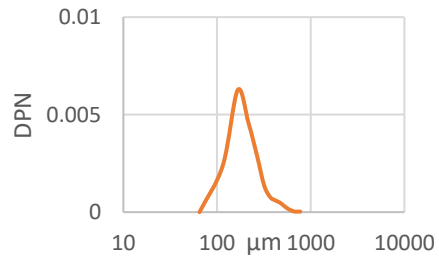
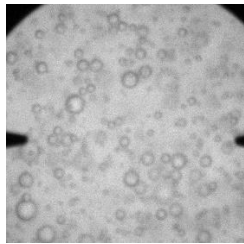
Diámetro promedio: 235 μm
Diámetro Sauter: 457 μm
Moda: 173 μm

24 h



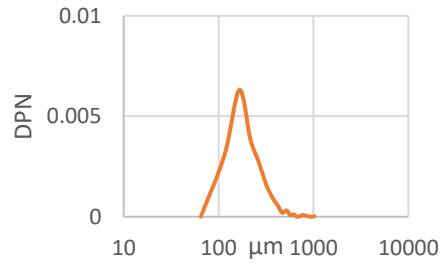
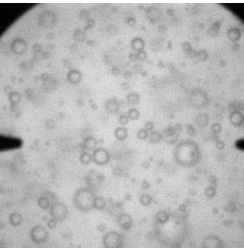
Diámetro promedio: 242 μm
Diámetro Sauter: 427 μm
Moda: 152 μm

28 h



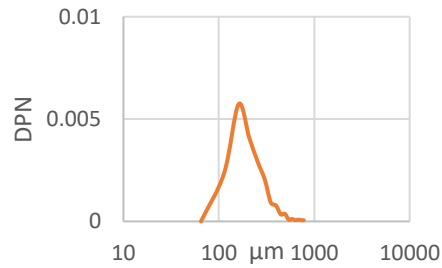
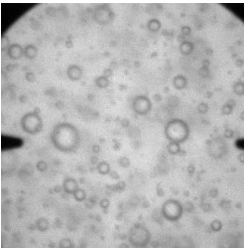
Diámetro promedio: 232 μm
Diámetro Sauter: 338 μm
Moda: 152 μm

32 h



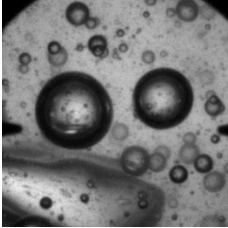
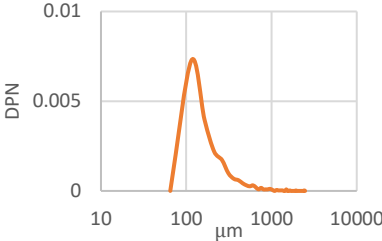
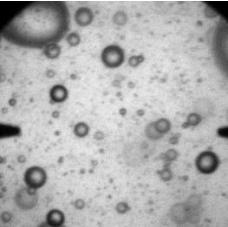
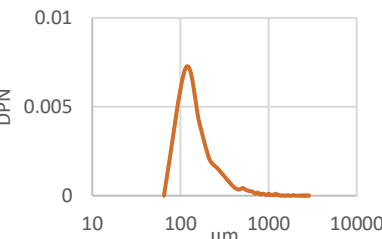
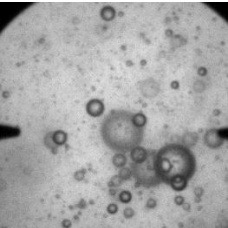
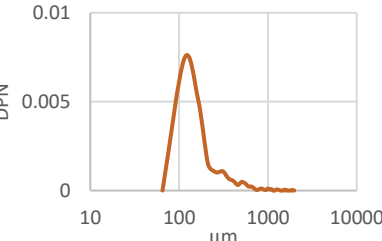
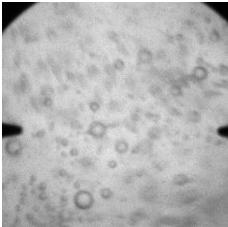
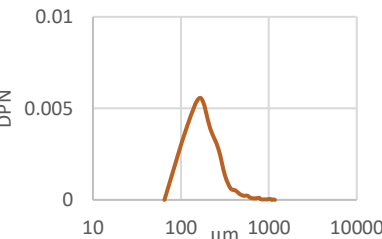
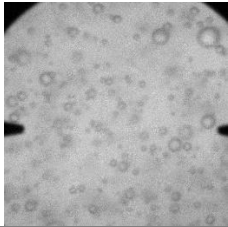
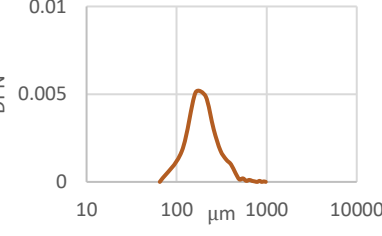
Diámetro promedio: 236 μm
Diámetro Sauter: 374 μm
Moda: 146 μm

36 h

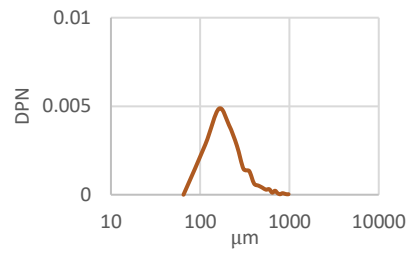
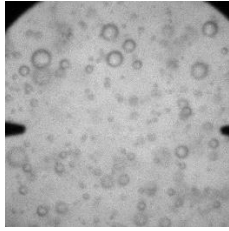


Diámetro promedio: 233 μm
Diámetro Sauter: 347 μm
Moda: 166 μm

2ª RÉPLICA

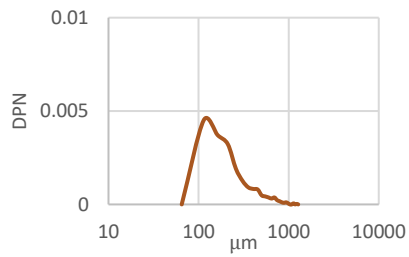
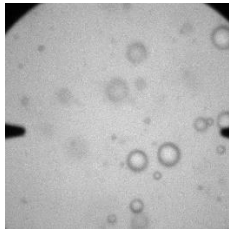
Tiempo normalizado	DPN	Parámetros estadísticos
0 h 	 <p>DPN vs μm (log scale). Peak at approximately 104 μm.</p>	Diámetro promedio: 256 μm Diámetro Sauter: 897 μm Moda: 104 μm
4 h 	 <p>DPN vs μm (log scale). Peak at approximately 104 μm.</p>	Diámetro promedio: 270 μm Diámetro Sauter: 1184 μm Moda: 104 μm
8 h 	 <p>DPN vs μm (log scale). Peak at approximately 124 μm.</p>	Diámetro promedio: 251 μm Diámetro Sauter: 1007 μm Moda: 124 μm
12 h 	 <p>DPN vs μm (log scale). Peak at approximately 152 μm.</p>	Diámetro promedio: 235 μm Diámetro Sauter: 450 μm Moda: 152 μm
16 h 	 <p>DPN vs μm (log scale). Peak at approximately 180 μm.</p>	Diámetro promedio: 243 μm Diámetro Sauter: 361 μm Moda: 180 μm

20 h



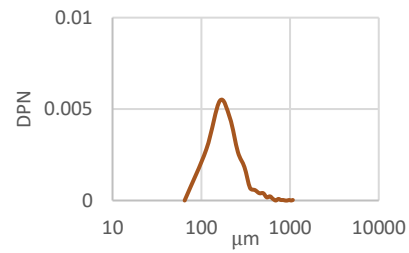
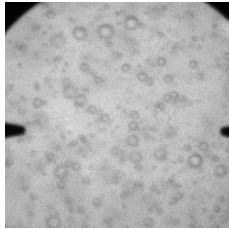
Diámetro promedio: 253 μm
Diámetro Sauter: 438 μm
Moda: 138 μm

24 h



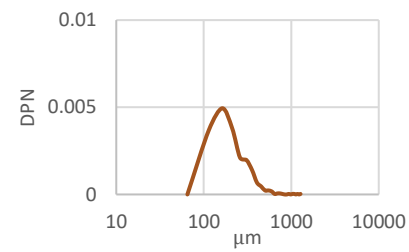
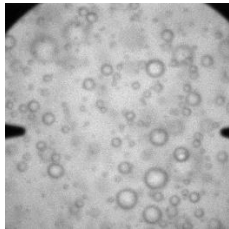
Diámetro promedio: 279 μm
Diámetro Sauter: 567 μm
Moda: 124 μm

28 h



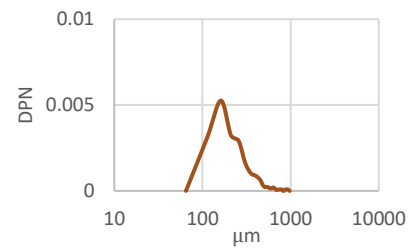
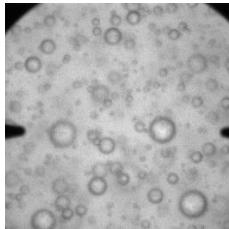
Diámetro promedio: 234 μm
Diámetro Sauter: 391 μm
Moda: 152 μm

32 h



Diámetro promedio: 237 μm
Diámetro Sauter: 445 μm
Moda: 152 μm

36 h



Diámetro promedio: 246 μm
Diámetro Sauter: 426 μm
Moda: 180 μm