

EVALUACIÓN DEL ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) POR FERMENTACIÓN A PARTIR DE LA  
BACTERIA MUTANTE *Burkholderia cepacia* B27 A NIVEL SEMI-INDUSTRIAL

KATHY STEPHANIE ARDILA AREVALO  
ANDRÉS CAMILO VILORIA GARCÍA

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ  
2017

EVALUACIÓN DEL ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) POR FERMENTACIÓN A PARTIR DE LA  
BACTERIA MUTANTE *Burkholderia cepacia* B27 A NIVEL SEMI- INDUSTRIAL

KATHY STEPHANIE ARDILA AREVALO  
ANDRÉS CAMILO VILORIA GARCÍA

Proyecto integral de grado para optar al título de  
INGENIERO QUÍMICO

Director

MSc. Daniel Alexander Méndez Reyes  
Ingeniero Agroindustrial y Magister en Ingeniería Química

Codirector

Ph.D. Iván Orlando Cabeza Rojas  
Ingeniero Químico, Magister en Energías Renovables y Doctorado en Recursos  
Naturales y Medio Ambiente

Codirectora

Ing. Jeimy Geraldin Macías Camacho  
Ingeniera Química y Estudiante de Maestría en Ingeniería Química

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ  
2017

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Bogotá D.C.: 27, abril,2017

## **DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente de la Universidad y rector del claustro

**Dr. JAIME POSADA DÍAZ**

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

**Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA**

Vicerrectora Académica y de Postgrados

**Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS**

Secretario General

**Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCÍA-PEÑA**

Decano de la Facultad de Ingenierías

**Dr. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI**

Director Programa de Ingeniería Química

**Dr. LEONARDO DE JESUS HERRERA GUTIERRZ**

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

*Para mis padres:*  
**NUBIA PATRICIA AREVALO CRUZ**  
**FELIX ABRAHAM ARDILA PATIÑO**

*Solo ustedes conocen mis noches de desvelo y de sueños, siempre creyeron en mi potencial y han sido un apoyo y gran ejemplo. Ahora que emprendo mi camino como ingeniera química, solo me resta recompensarlos y agradecerles toda la vida. Los amo inmensamente y me siento muy afortunada de ser su hija.*

*Kathy Stephanie Ardila Arévalo*

Para mis padres:  
*MARIA CECILIA GARCÍA VARGAS*  
*AGUIDULFO RENÉ VILORIA S.*

*Son el claro ejemplo de apoyo incondicional. El aporte de cada uno de ustedes fue esencial en este camino. Los amo demasiado, y quiero que sepan que todo el esfuerzo que hago día a día es una manera de agradecerles por todo su sacrificio. Soy tan afortunado en la vida de tener unos padres tan responsables como lo son ustedes. Mil gracias de nuevo, y esto es dedicado a ustedes.*

*Andrés Camilo Viloría García*

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer a nuestros padres porque estamos convencidos que con su ejemplo seremos unos profesionales exitosos y comprometidos, en generar soluciones a problemáticas sociales que permitan mejorar la calidad de vida de muchas personas.

Agradecemos al Ph.D. IVÁN ORLANDO CABEZA ROJAS , quien además de ser un excelente ingeniero, es un gran ser humano, lleno de principios, profesionalismo y sencillez, a quien admiraremos siempre y agradeceremos por creer en nuestras capacidades, depositando su voto de confianza, para apoyar su trabajo Post Doctoral en el Estudio del Proceso de Escalamiento para la Producción de Plásticos Verdes", investigación financiada por la convocatoria "Es Tiempo de Volver" de Colciencias y la Universidad Nacional de Colombia.

También queremos agradecerle a nuestro director de proyecto MSc. DANIEL ALEXANDER MÉNDEZ REYES, quien asumió la responsabilidad de dirigir nuestro trabajo, fue nuestro apoyo, demostrando ser un profesional íntegro, quien siempre dio lo mejor de su parte para que el proyecto se realizará de la mejor manera posible y a quien le deseamos lo mejor en su vida profesional.

Sin duda alguna, queremos agradecer a la Ing. JEIMY GERALDIN MACÍAS CAMACHO, porque a pesar de que nuestra línea de investigación era diferente a la desarrollada para su proyecto de maestría, siempre fue un apoyo fundamental para nosotros. Admiramos todo su esfuerzo y entrega como investigadora, es una mujer muy inteligente, quien siempre estuvo dispuesta a ayudarnos y compartirnos sus conocimientos.

Más que un proyecto de grado, es el resultado de un excelente trabajo en equipo, a cargo de grandes profesionales que respaldaron este proyecto y se han convertido en nuestro ejemplo a seguir, por su ética y gran calidad humana.

Finalmente queremos agradecer a la MSc. NUBIA MORENO SARMIENTO, quién nos dio la oportunidad de hacer parte del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) y se encargó de brindarnos los recursos necesarios para desarrollar la investigación, a nuestros compañeros del laboratorio de fermentaciones y del IBUN, quienes también hicieron parte de esta enriquecedora experiencia, y para finalizar a la Ing. ELIZABETH TORRES GÁMEZ, por brindarnos una orientación metodológica, llena de críticas constructivas, ideas útiles y soluciones eficaces ante los previstos presentados.



## CONTENIDO

	pág
<b>INTRODUCCIÓN</b>	17
<b>OBJETIVOS</b>	18
<b>1. GENERALIDADES</b>	19
<b>1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS</b>	18
<b>1.1.1 Polihidroxiбутirato (PHB)</b>	21
<b>1.1.1.1 <i>Burkholderia cepacia</i> B27</b>	22
<b>1.1.1.2 Biosíntesis del polihidroxiбутirato</b>	24
<b>1.2 ESCALAMIENTO</b>	25
<b>1.2.1 Parámetros de escalamiento</b>	26
<b>1.2.2 Método dinámico</b>	27
<b>1.2.2.1 Transferencia de oxígeno en los microorganismos</b>	27
<b>1.2.2.2 Interfase gas-líquido</b>	30
<b>1.2.2.3 Método Dinámico</b>	32
<b>1.2.2.4 Concentración crítica de oxígeno disuelto</b>	34
<b>1.2.2.5 Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (<math>K_{La}</math>)</b>	34
<b>1.2.3 Modelo empírico para evaluación hidrodinámica del sistema</b>	36
<b>1.2.4 Modelo empírico de Correlación de Cooper</b>	38
<b>1.2.5 Validación del modelo empírico</b>	42
<b>2. METODOLOGÍA</b>	44
<b>2.1 PROCESO DE FERMENTACIÓN</b>	45
<b>2.1.1 Protocolo de fermentación reactor 7 litros</b>	47
<b>2.1.2 Protocolo de fermentación reactor de 100 litros</b>	47
<b>2.1.3 Protocolo de fermentación reactor de 2000 litros</b>	48
<b>2.1.4 Descripción de los biorreactores de 7, 100 y 2000 litros</b>	49
<b>2.2 PROCESO DE ESCALADO</b>	50
<b>2.2.1 Modelo empírico para evaluación hidrodinámica</b>	51
<b>2.2.2 Método dinámico</b>	53
<b>2.2.3 Determinación de la potencia requerida</b>	54
<b>2.2.4 Técnicas de escalado</b>	55

<b>2.2.5 Estrategias de escalado</b>	59
<b>2.2.5.1 Métodos analíticos</b>	59
<b>2.2.5.2 Cuantificación de biomasa</b>	59
<b>2.2.5.3 Cuantificación de polímero</b>	59
<b>2.2.6 Validación del modelo empírico</b>	59
<b>3. RESULTADOS Y ANÁLISIS</b>	62
<b>3.1 EVALUACIÓN HIDRODINÁMICA EN EL REACTOR DE 7 LITROS</b>	62
<b>3.2 ESCALAMIENTO</b>	69
<b>4. CONCLUSIONES</b>	82
<b>5. RECOMENDACIONES</b>	83
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	84
<b>ANEXOS</b>	87

## LISTA DE ECUACIONES

	pág.
<b>Ecuación 1:</b> Flujo local de oxígeno	30
<b>Ecuación 2.</b> Flujo de oxígeno en el medio gaseoso y líquido.	31
<b>Ecuación 3.</b> Flujo de oxígeno en el medio gaseoso y líquido en equilibrio.	31
<b>Ecuación 4:</b> Resistencia de la constante global de transferencia de oxígeno	32
<b>Ecuación 5.</b> Cambio en la concentración de oxígeno disuelto con respecto al tiempo.	32
<b>Ecuación 6.</b> Flujo de oxígeno global (OTR)	32
<b>Ecuación 7.</b> Tasa de respiración del microorganismo <i>OUR</i>	33
<b>Ecuación 8.</b> Evaluación de la concentración de oxígeno disuelto con respecto al tiempo	34
<b>Ecuación 9.</b> Concentración de oxígeno disuelto al momento de la interrupción del aire.	35
<b>Ecuación 10.</b> Concentración de oxígeno disuelto durante la reanudación de inyección del oxígeno al medio de cultivo	36
<b>Ecuación 11.</b> Distancia axial rotable para el CCD	36
<b>Ecuación 12.</b> Distancia axial ortogonal del CCD	37
<b>Ecuación 13:</b> Modelo de ajuste para el diseño Central Compuesto	37
<b>Ecuación 14.</b> Correlación de Cooper.	38
<b>Ecuación 15.</b> Número de Reynolds	39
<b>Ecuación 16.</b> Potencia disipada por un agitador en un medio no gaseado	39
<b>Ecuación 17.</b> Potencia disipada por dos agitadores en un medio no gaseado	40
<b>Ecuación 18.</b> Número de Froude	41
<b>Ecuación 19.</b> Número de aireación	41
<b>Ecuación 20.</b> Relación de potencia disipada en un medio gaseado con respecto a uno no gaseado	41
<b>Ecuación 21.</b> Velocidad de aireación Superficial	42
<b>Ecuación 22.</b> Linealización de la Correlación de Cooper	56
<b>Ecuación 23.</b> Evaluación del $K_L a$ , bajo condiciones de velocidad superficial constantes.	57
<b>Ecuación 24.</b> Evaluación del $K_L a$ bajo condiciones Potencia-Volumen constantes	57
<b>Ecuación 25.</b> Repetibilidad de las mediciones del $K_L a$	60
<b>Ecuación 26.</b> Reproducibilidad de las mediciones de $K_L a$ entre el reactor de 7 y 100 litros	61

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Estructura química de algunos PHA, a) PH3B, b) PHV, c) PHBV	20
<b>Figura 2.</b> Placa con LB-agar, cloranfenicol y sembrada con B27 después de 24 horas de incubación	23
<b>Figura 3.</b> Burkholderia cepacia B27 en el factor de aumento 100x	23
<b>Figura 4.</b> Proceso de beta oxidación mitocondrial de aceite vegetal.	25
<b>Figura 5.</b> Resistencias para la transferencia de oxígeno des una burbuja de gas hasta la célula	29
<b>Figura 6.</b> Perfiles de la concentración del modelo de dos películas, transferencia de masa global por absorción	30
<b>Figura 7.</b> Caída de la tasa de consumo de oxígeno del microorganismo después de llegar a la concentración crítica	34
<b>Figura 8.</b> Método dinámico para determinar el $K_L a$ . a) Suspensión de aire y b) re oxigenación	35
<b>Figura 9.</b> Función de potencia versus Reynolds para un impulsor de turbina de 6 paletas planas	40
<b>Figura 10.</b> Diagrama general de la metodología	45
<b>Figura 11.</b> Protocolo de fermentación para reactor de 7 litros	47
<b>Figura 12.</b> Protocolo de fermentación para el reactor de 100 litros	48
<b>Figura 13.</b> Protocolo de fermentación para el reactor de 2000 litros	48
<b>Figura 14.</b> Estructura característica de un biorreactor	49
<b>Figura 15.</b> Puntos del Diseño Central Compuesto	52
<b>Figura 16.</b> Caída de concentración de oxígeno disuelto por debajo de la concentración crítica	53
<b>Figura 17.</b> Técnica de linealización de la correlación de Cooper	58
<b>Figura 18.</b> Estrategias de escalado para el reactor de 100 litros	59
<b>Figura 19.</b> Análisis de reproducibilidad del $K_L a$	60
<b>Figura 20.</b> Técnicas de regresión no lineal	70
<b>Figura 21.</b> Clasificación de los experimentos del reactor de 7 litros según velocidad superficial	71
<b>Figura 22.</b> Condiciones experimentales adicionales para el reactor de 7 litros que cumplen con $PV^{-1}$ constante.	71
<b>Figura 23.</b> Combinaciones de la técnica 4	72
<b>Figura 24.</b> Constante $\Theta$ para los experimentos de las técnicas desarrolladas	72
<b>Figura 25.</b> Combinaciones de la técnica 5	73
<b>Figura 26.</b> Determinación de las estrategias de escalado	74



## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Comparativo entre las principales propiedades físicas del P (3HB) con respecto a otros polímeros	21
<b>Tabla 2.</b> Composición del medio LB	46
<b>Tabla 3.</b> Composición del medio fermentativo PHA	46
<b>Tabla 4.</b> Composición de traza de micronutrientes	46
<b>Tabla 5.</b> Dimensiones de los reactores de 7, 100 y 2000 litros	50
<b>Tabla 6.</b> Relaciones geométricas de escalado	50
<b>Tabla 7.</b> Valores de los niveles de los factores del Diseño Central Compuesto	51
<b>Tabla 8.</b> Estandarización de los rangos de agitación y aireación realizados para el Bioflo BioFlo® /CelliGen® 115	52
<b>Tabla 9.</b> Diseño central compuesto para la evaluación del consumo de oxígeno de <i>Burkholderia cepacia</i> B27	52
<b>Tabla 10.</b> Técnicas para el ajuste de los coeficientes empíricos que acompañan la correlación de Cooper.	56
<b>Tabla 11.</b> Coeficientes del Modelo Cuadrático para el $KLa$ , biomasa y polímero	62
<b>Tabla 12.</b> Condición mínima de $KLa$ para el reactor de 7 litros	64
<b>Tabla 13.</b> Punto máximo de biomasa en la hora 24 en el reactor de 7 litros	66
<b>Tabla 14.</b> Punto máximo para la concentración de polímero	68
<b>Tabla 15.</b> Coeficientes de correlación de las técnicas para estimar coeficientes de Cooper	70
<b>Tabla 16.</b> Condiciones experimentales para las estrategias de escalamiento	74
<b>Tabla 17.</b> Evaluación de las estrategias de escalamiento respecto a la desviación de los $KLa$	75
<b>Tabla 18.</b> Repetibilidad de los experimentos 1 y 7 en el reactor de 7 litros	79
<b>Tabla 19.</b> Repetibilidad de los experimentos en el reactor de 100 litros	79
<b>Tabla 20.</b> Reproducibilidad del modelo con el cambio de escala	79
<b>Tabla 21.</b> Prueba t para medias entre dos muestras emparejadas, para cada estrategia del reactor 100 litros	80
<b>Tabla 22.</b> Productividades de los experimentos en las diferentes escalas	81
<b>Tabla 23.</b> Tasa de crecimiento $\mu$ ( $h^{-1}$ )	81

## GLOSARIO

**BACTERIAS AEROBIAS GRAM NEGATIVAS:** microorganismos procariotas, unicelulares, cuya pared celular está formada por dos membranas lipídicas y que necesitan el oxígeno para realizar sus procesos biológicos.

**HIDROXIÁCIDOS GRASOS:** moléculas compuestas de una cadena carbonada (12 a 24 carbonos) con un grupo carboxílico (COOH) y un grupo hidroxilo (OH).

**INOCULO:** cantidad de microorganismos introducidos en un medio de cultivo.

**MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVO:** medio que contiene uno o varios compuestos que inhiben el crecimiento de un determinado tipo de microorganismos y no afectan a otros tipos.

**MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVO:** medio que contiene uno o varios compuestos que inhiben el crecimiento de un determinado tipo de microorganismos y no afectan a otros tipos.

**TINCIÓN DE GRAM:** técnica usada para visualización de bacterias que permite determinar la forma, tamaño, morfologías celulares y reacción Gram (positiva o negativa).

**POLIHIDROXIALCANOATOS:** son poliésteres producidos por bacterias mediante procesos de fermentación de azúcares o lípidos

## RESUMEN

La baja degradabilidad de los polímeros sintéticos crea la necesidad de reemplazarlos por biopolímeros, como es el caso de los polihidroxicanoatos (PHA) que poseen propiedades fisicoquímicas similares a los plásticos convencionales, pero presentan altos costos de producción. La biosíntesis de los PHA es un proceso aerobio y como criterio de escalamiento se estableció el coeficiente de transferencia de oxígeno ( $K_{L,a}$ ), por ello, se realizó un estudio hidrodinámico de la fermentación, con un modelo empírico basado en un diseño central compuesto.

Esto para evaluar los efectos de la aireación y la agitación en el  $K_{L,a}$ , el crecimiento y la acumulación de la bacteria, buscando la mejor condición para el escalamiento, que fue 514 rpm y 13.5 L min<sup>-1</sup> con un  $K_{L,a}$  de 0.0074 s<sup>-1</sup>.

Para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno se siguió el método dinámico. Además, se desarrollaron cinco técnicas para estimar los coeficientes empíricos de Cooper, que relacionan el factor Potencia-Volumen y la velocidad superficial con el  $K_{L,a}$ .

Posteriormente, se determinaron las condiciones de operación para las siguientes escalas asegurando a partir de la ecuación de Cooper el criterio  $K_{L,a}$  constante. Las condiciones obtenidas para el reactor de 100 litros fueron 170 rpm y 148 L min<sup>-1</sup>, mientras que el reactor de 2000 litros operó a 25 rpm y 311 L min<sup>-1</sup>.

Finalmente, dentro del proceso de validación, se verificó que el criterio de escalamiento  $K_{L,a}$  tiene un coeficiente de varianza menor al 30% con el cambio de escala, lo que hace que el modelo empírico presente repetitividad y reproducibilidad.

**Palabras clave:** Aceite vegetal, bioproceso, *Burkholderia cepacia*, coeficiente de cooper, coeficiente volumétrico de oxígeno, escalamiento, polihidroxicanoatos.



## INTRODUCCIÓN

La baja degradabilidad de los polímeros sintéticos, ha provocado una gran problemática ambiental, para la cual, la alternativa más efectiva, resulta ser reemplazarlos por biopolímeros.

Los PHA son poliésteres producidos por bacterias, que mediante una modificación genética de éstas o del medio de cultivo, logran producir PHA de diferentes propiedades fisicoquímicas, similares a los plásticos convencionales. Sin embargo, el problema principal que presenta el proceso es su alto costo de producción, según Lee <sup>1</sup> aproximadamente de 16 USD/Kg de PHA, comparado con el costo de los plásticos convencionales que oscila alrededor de 1 USD/Kg de polímero producido.

Por ello, desde hace más de 20 años, el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, desarrolla investigaciones sobre: la modificación genética de la cepa, métodos de extracción del polímero y optimización del modelo cinético de la producción de PHA, por fermentación de aceite vegetal y teniendo como limitación la fuente de amonio.

El presente estudio, hizo parte de un macroproyecto de COLCIENCIAS titulado “Estudio de los Procesos de Escalamiento para la Producción de Plásticos Verdes”, con el apoyo del grupo de investigación de bioprocesos y bioprospección de la Universidad Nacional de Colombia y específicamente con su línea de investigación llamada Producción de biopolímeros tipo PHA, a partir de la bacteria Gram negativa *Burkholderia cepacia* B27 y se centró en escalar el proceso a partir del criterio de escalamiento,  $K_L a$ .

Para ello, en la escala de 7 litros, se estudió el efecto de la aireación y la agitación a partir de un modelo empírico basado en un diseño central compuesto en 3 variables respuesta: el  $K_L a$ , concentración de biomasa y de polímero. El  $K_L a$  se determinó por el método dinámico, mientras que la producción de biomasa y PHA se cuantificó por gravimetría. El objetivo del estudio hidrodinámico, fue determinar la condición experimental que mejor relacionaba las variables respuestas y así posteriormente, estimar los coeficientes empíricos de la correlación de Cooper, con el fin de establecer las condiciones Potencia/ Volumen ( $P V^{-1}$ ) que aseguraban la transferencia de oxígeno constante en los reactores de 100 y 2000 litros.

---

<sup>1</sup> LEE, Sang Yu. Plastic bacteria? Progress and prospects for Polyhydroxyalkanoates production of bacteria. En : Trends in biotechnology. Korea.1996 .Vol. 14, No. 11 . p. 431.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el escalamiento de la producción de polihidroxicanoatos (PHA), por fermentación, a través de la cepa mutante *Burkholderia cepacia* B27 a nivel Semi-Industrial.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los parámetros de escalamiento para la producción de polihidroxicanoatos (PHA) en un bioreactor escala banco.
- Evaluar los criterios de escalamiento desde un bioreactor piloto hasta un reactor Semi-industrial.
- Validar el modelo empírico desarrollado en las escalas evaluadas.

## 1. GENERALIDADES

En este capítulo se expondrán conceptos básicos de los polihidroxicanoatos (PHA) pero particularmente del polihidroxibutirato y su proceso de biosíntesis a partir de la *Burkholderia cepacia* B27. Luego se especifican conceptos básicos de escalamiento para un proceso biológico, además del método para hallar el criterio de escalamiento escogido y finalmente la aplicación del modelo de Cooper por el cual se escalará el proceso.

### 1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

“Los polihidroxicanoatos o PHA son poliésteres lineales producidos por bacterias mediante procesos de fermentación de azúcares o lípidos. Estas acumulan PHA como respuesta a condiciones de estrés, generalmente por limitación de nitrógeno, para luego utilizarlos como su fuente de carbono y por tanto de energía”<sup>2</sup>. De este modo, “los PHA son acumulados por la bacteria en forma de gránulos de lípidos intracelulares y pueden ser sintetizados a partir de diversas fuentes de carbono como azúcares (fructosa, maltosa, lactosa, xilosa, etc.), n -alcanos (hexano, octano, dodecano, etc.), ácidos n - alcanóicos (ácido acético, ácido propiónico, ácidos butírico, ácido valérico, ácido láurico, ácido oleico, etc)”<sup>3</sup>.

Consecuentemente, “los PHA resultan ser moléculas compuestas de 600 a 35000 unidades monoméricas de hidroxiaácidos grasos, su variedad depende de la naturaleza de sus radicales: grupos alquilo saturados o insaturados”<sup>4</sup>. A continuación, en la **Figura 1** se muestran algunos tipos de PHA y su estructura química, según Bugnicourt<sup>5</sup> en el caso del poli (3-hidroxibutirato) o PH3B cuyo radical es la molécula metil (CH<sub>3</sub>), el poli (3- hidroxivalerato) o PHV cuyo radical es el etil (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) y el poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) o PHBV que tiene como radicales los grupos metil y etil.

---

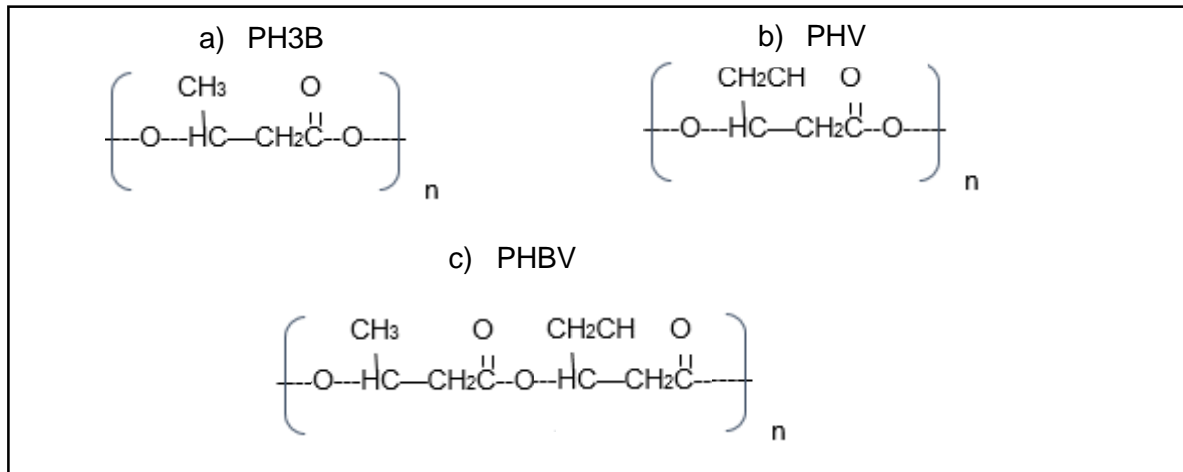
<sup>2</sup> BUGNICOURT, E.*et al.* Polyhydroxyalkanoates (PHA): Review of Synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. En: Express polymer letters. Febrero 2014.vol. 8, no. 11, p. 793.

<sup>3</sup> GIIN-YU, Amy Than.*et al.* Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. En : MDPI-Polymer. Marzo, 2014. vol. 6, no.3, p 711.

<sup>4</sup> Ibid.,p. 709

<sup>5</sup> BUGNICOURT.Op.cit. p.793.

**Figura 1.**Estructura química de algunos PHA, a) PH3B, b) PHV, c) PHBV



**Fuente:** BUGNICOURT, E. *et al.* Polyhydroxyalkanoates (PHA): Review of Synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. En: Express polymer letters. Febrero, 2014.vol. 8, no. 11, p. 793.

Además “la polimerización de los ácidos hidroxibutírico, sucede por la condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxibutírico) que forma un enlace éster con el grupo hidroxilo de otro monómero, gracias a la presencia de enzimas intracelulares”<sup>6</sup>. Debido a la gran variedad de monómeros identificados, “los PHA resultan tener una gran aplicación desde un material de empaque hasta productos médicos, por su biodegradabilidad, resistencia e inercia inmunológica”<sup>7</sup>.

A partir de un estudio preliminar de caracterización realizado por el Instituto de biotecnología, se identificó que la bacteria *Burkholderia cepacia* B27 produce PHA del tipo polihidroxibutirato (PHB), gracias a un análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), realizado a finales del 2016 que comprobó la presencia de metil-ésteres en las muestras del polímero producido. Sin embargo, aún se están desarrollando pruebas de caracterización, que permitan tener mayor certeza de la pureza y productividad de polihidroxibutirato (PHB).

<sup>6</sup> KHANNA, Shilpi and SRIVASTAVA, Ashok. A simple structured mathematical model for biopolymer (P3HB) production. En: Biotechnology progress. 2005. vol. 21, no. 3, p.831.

<sup>7</sup>BECERRA, Mónica. Producción de un polímero tipo polihidroxialcanoato (PHA) empleando residuos de la producción de biodiesel. Tesis de maestría Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia.2013.p 4.

**1.1.1 Polihidroxitirato (PHB).** Como lo expresa Bugnicourt<sup>8</sup> el PHB es un poliéster lineal del ácido 3-hidroxitirico, el cual es acumulado de forma intracelular en una amplia variedad de organismos Gram positivos y Gram negativos bajo condiciones de limitación de nutrientes, diferentes a la fuente de carbono.

Su peso molecular difiere según el microorganismo, las condiciones de crecimiento y el método de extracción.<sup>9</sup> La estructura del PHB se muestra en la molécula a) de la **Figura 1** y a continuación se aprecia en la **Tabla 1** González<sup>10</sup> realiza un comparativo de las principales propiedades físicas del PHB con respecto a distintos polímeros, evidenciándose que tiene una temperatura de fusión de 179 °C, una resistencia a la tracción de 40 MPa y un módulo de Young de 3.5 GPa, propiedades similares a las del polipropileno (PP).

**Tabla 1.** Comparativo entre las principales propiedades físicas del P (3HB) con respecto a otros polímeros

Polímero	Temperatura de fusión (°C)	Módulo de Young (GPa)	Fuerza Tensil (MPa)	Elongación (%)	Temperatura de transición (°C)
<b>P(3HB)</b>	179	3.5	40	5	4
<b>P(3HB-co-3HV)</b>					
3 mol% 3HV	170	2.9	38	----	----
14 mol% 3HV	150	1.5	35	----	----
25 mol% 3HV	137	0.7	30	----	----
<b>P(3HB-co-4HV)</b>					
3 mol% 4HV	166	----	28	445	----
10 mol% 4HV	159	----	24	242	----
25 mol% 4HV	50	30	17	591	----
<b>P(4HB)</b>	53	149	104	1000	----
<b>P(3HHx-co-3HO)</b>	61	----	10	300	----
<b>P(3HB-co-3HHx)</b>	52	----	20	850	- 4
<b>Polipropileno</b>	170	1.7	34.5	400	45
<b>Polietileno-</b>	262	2.2	56	7300	3400
<b>Teraftalato</b>					
<b>Poliestireno</b>	110	3.1	50	----	21
<b>Nylon-6.6</b>	265	2.8	83	60	----

**Fuente:** GONZÁLEZ, Yolanda. *et al.* Síntesis y biodegradación de Polihidroxitiratos: Plásticos de origen microbiano. En: Revista internacional Contaminación Ambiental.2013. vol 29, p. 81.

Según lo reportado por Giin-Yu<sup>11</sup>, existen diferentes bacterias que acumulan PHA entre ellas: *Azohydromonas*, *Pseudomonas*, *Caulobacter*, *Hydrogenomas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Burkholderia*, entre otras. Un ejemplo de ello es la

<sup>8</sup> BUGNICOURT. Op. cit., p.793

<sup>9</sup> Ibid., 793.

<sup>10</sup> GONZÁLEZ, Yolanda. *et al.* Síntesis y biodegradación de Polihidroxitiratos: Plásticos de origen microbiano. En: Revista internacional Contaminación Ambiental.2013. vol 29, p. 81.

<sup>11</sup> GIIN-YU. Op., cit.p.713-717.

*Azotobacter lata* que a partir de residuos de malta como fuente de carbono, acumula el 70% de su peso seco en forma de PHA<sup>12</sup>. Por otro lado, *Halomonas boliviensis* LCI a partir de almidón hidrolizado presenta un 56% de PHA respecto a su peso seco<sup>13</sup>. Otro ejemplo es la especie *Pseudomonas putida* GO16<sup>a</sup> que a partir del ácido tereftálico acumula 27 % de PHA<sup>14</sup>. Finalmente la especie de interés para esta investigación es la *Burkholderia sp.* USM, que teniendo como fuente de carbono ácido láurico, oléico, palmítico y esteárico, acumula entre el 1 al 69% de PHA con respecto al peso seco de la célula<sup>15</sup>.

**1.1.1.1 *Burkholderia cepacia* B27.** Es un grupo de bacilos Gram negativos fermentadores, mesófilos y no esporulados, tienen un metabolismo aerobio y según Verlinden<sup>16</sup> como sustancia de reserva de carbono utilizan el polihidroxibutirato. A partir de un estudio realizado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, por medio de un tamizaje de suelo en el Valle del Cauca, se aisló la cepa nativa *Burkholderia cepacia* 2G57, identificando 70 genes en su genoma, de los cuales 3 están asociados con la biosíntesis de PHA (*pha A*, *pha B*, *pha C*), 2 genes asociados a la degradación de PHA (Depolimerasa y un precursor de la depolimerasa) y 1 gen regulador (*pha K*).

*Burkholderia cepacia* B27 se obtuvo a partir del proceso de mutagénesis de transposón mini-Tn5 de la cepa *E. coli* S17 con el gen productor *pha B* de la cepa *Rashtonia eutropha* H16, según Flórez *et al*<sup>17</sup> para aumentar la acumulación intracelular de PHA, en un rango de 53 al 83 % peso seco, utilizando aceite vegetal como fuente de carbono<sup>18</sup>.

Para observar las características macroscópicas de la cepa *Burkholderia cepacia* B27, se realiza una siembra de la bacteria en un medio LB (Luria Bertoni) - agar con 3.4 mg L<sup>-1</sup> de cloranfenicol y luego de 24 horas de incubación se evidencia su crecimiento en **Figura 2**.

---

<sup>12</sup> Ibid., p. 713.

<sup>13</sup> Ibid., p.714.

<sup>14</sup>Ibid., p. 715.

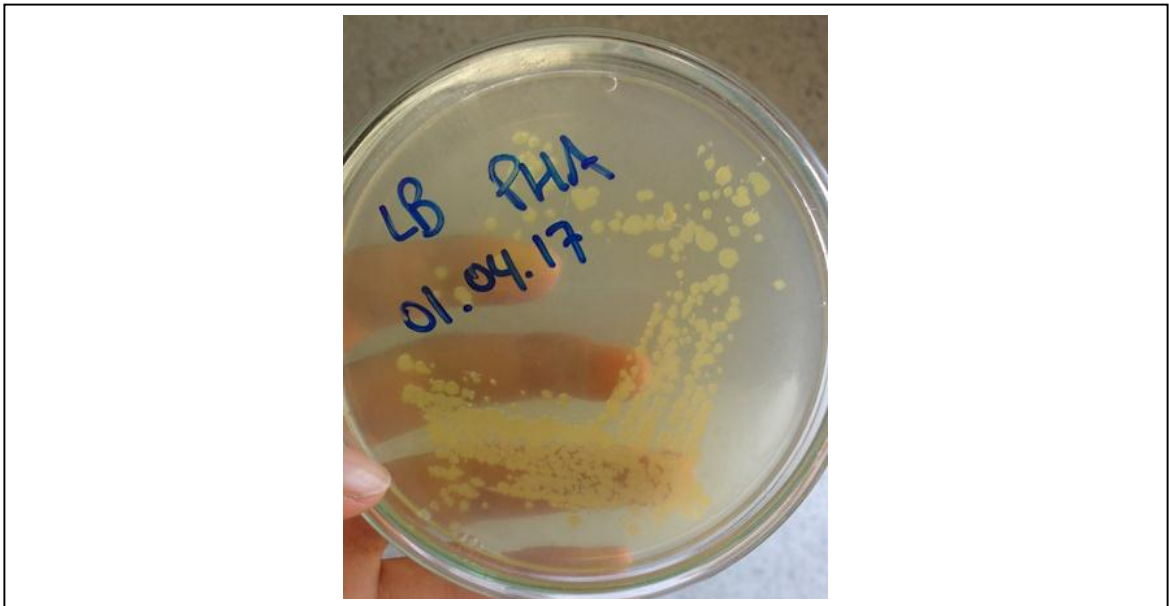
<sup>15</sup> Ibid., p. 713.

<sup>16</sup> VERLINDEN R.A.J. *et al.* Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. En: Applied microbiology,2007.vol.102, p.1442.

<sup>17</sup> FLOREZ, D. *et al.* Mutagenesis studies for enhancement of PHA production by *Burkholderia cepacia* 2G57, isolated from Colombian soils. En: International Symposium on Biopolymers Santos-Brazil.2014.p.92.

<sup>18</sup>Ibid., p. 92.

**Figura 2.** Placa con LB-agar, cloranfenicol y sembrada con B27 después de 24 horas de incubación



**Color:** Amarillo

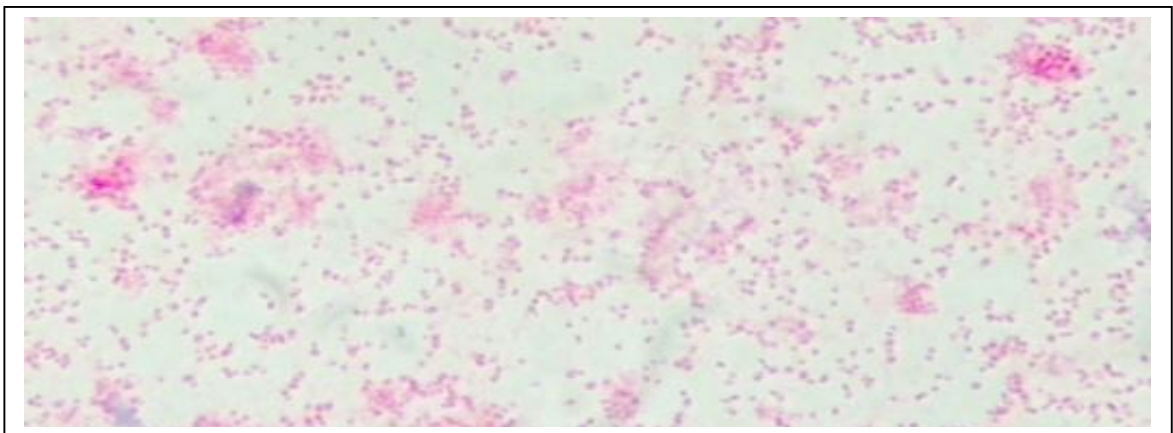
**Tamaño:** Pequeño

**Forma:** Regular, colonias puntiformes

**Superficie:** Convexa

Para evidenciar las características microscópicas de la **Figura 3**, se utiliza una prueba conocida como Tinción de Gram, después del periodo de incubación a 32°C durante 24 horas.

**Figura 3.** *Burkholderia cepacia* B27 en el factor de aumento 100x



**Gram:** Gram Negativas

**Forma:** Pleomorfas, generalmente Bacilos.

**Agrupación:** Individual, pero puede formar cadenas de tamaño variable.

**Quistes:** Ausente.

**1.1.1.2 Biosíntesis del polihidroxitirato.** El proceso de biosíntesis de PHB según Andler y Díaz <sup>19</sup> está vinculado con la ruta metabólica de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos o aceites, que incluye procesos como la glucólisis, el ciclo de Krebs, entre otros. “La  $\beta$ -oxidación es una ruta catabólica en la que cada vez que se repite una secuencia de cuatro reacciones (oxidación, hidratación, oxidación y tiolisis) en un sistema aerobio, la cadena del ácido graso se acorta en dos átomos de carbono, en forma de acetil-coA”<sup>20</sup>.

Como se muestra en la **Figura 4**, la fuente de carbono utilizada fue un aceite vegetal compuesto en un 90% de ácido linoléico y la bacteria a cargo de la biosíntesis es la bacteria modificada genéticamente *Burkholderia cepacia* B27, la cual después de realizar la ruta catabólica  $\beta$ -oxidación y la condensación de dos moléculas de acetil-CoA “produce Acetoacetil-CoA, molécula posteriormente reducida a partir de la enzima Piruvato Deshidrogenasa en Hidroxibutiril –CoA , que es la unidad monomérica del Polihidroxitirato”<sup>21</sup>. Es importante resaltar que bajo condiciones desequilibradas de nutrientes (es decir, cuando un nutriente esencial como el nitrógeno y el fósforo esta en presencia de exceso de carbono), “los niveles de coenzima A (CoA) son no inhibidores, lo que permite que el acetil-CoA sea dirigido hacia la producción de PHA” <sup>22</sup>.

---

<sup>19</sup> ANDLER, Rodrigo y DÍAZ, Álvaro. Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. En: INGENERARE 27. 2013. p. 31.

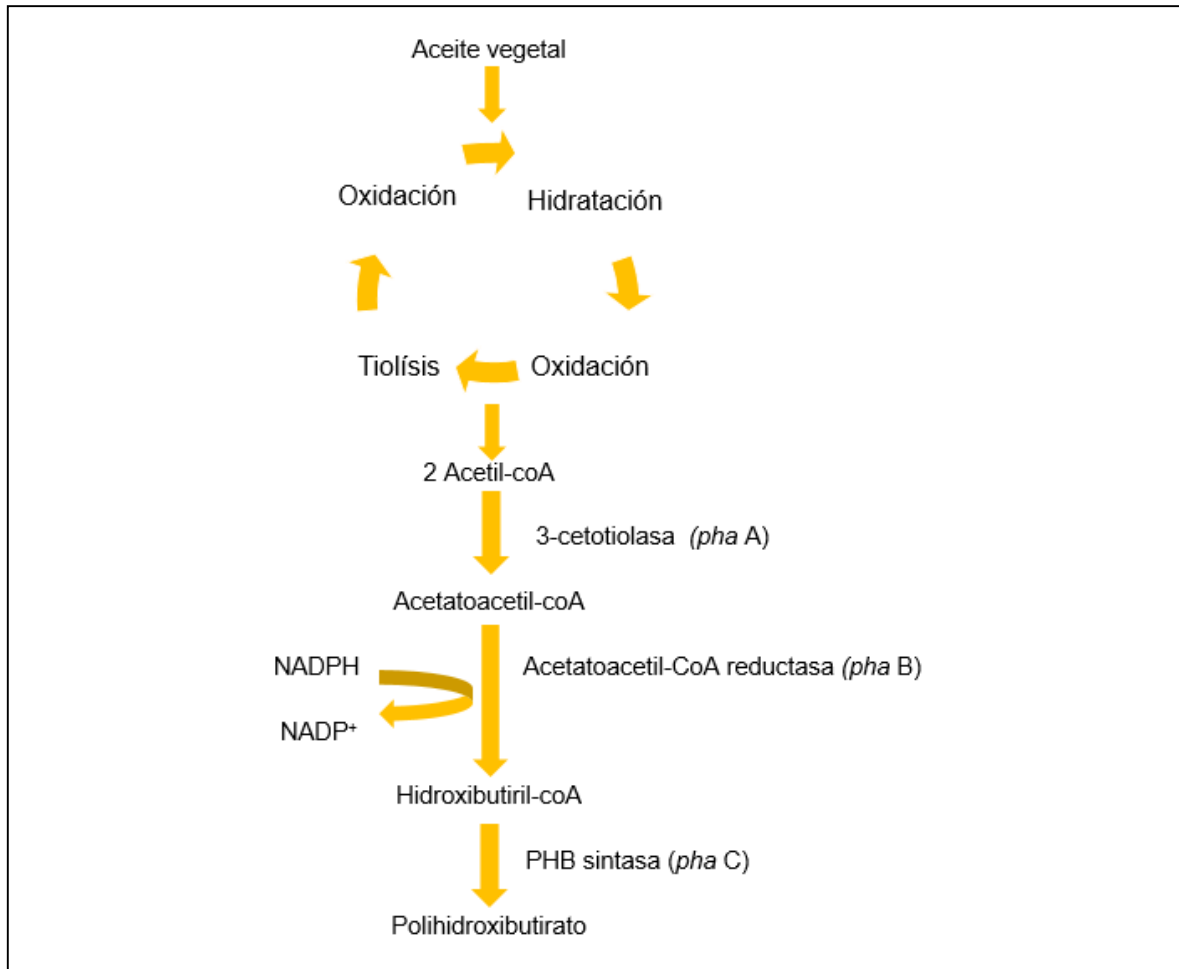
<sup>20</sup>Ibid., p. 31.

<sup>21</sup> Ibid, p 712.

<sup>22</sup> Ibid, p 709.



**Figura 4.** Proceso de beta oxidación mitocondrial de aceite vegetal.



**Modificado;** ANDLER, Rodrigo y DIAZ, Álvaro. Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. En: Ingengerare 27. 2013. p. 31.

## 1.2 ESCALAMIENTO

Después de expresar los conceptos más relevantes para la investigación sobre el PHB, es pertinente especificar los conceptos más importantes sobre escalado, que permitan cumplir con el objetivo general del presente proyecto. Existen varios factores influyentes en el escalado de un bioproceso, la primera aproximación es definir los parámetros de escalamiento más utilizados y seleccionar el más importante como criterio de escalamiento.

**1.2.1 Parámetros de escalamiento.** Tal como lo expresa Ruíz<sup>23</sup> los fenómenos más relevantes en el escalado de bioprocesos son: la velocidad de agitación, la velocidad de aireación y las relaciones geométricas. Esto se debe a que los microorganismos pueden experimentar cambios en su metabolismo por las condiciones hidrodinámicas. “En microorganismos filamentosos está comprobado que una variación en la viscosidad del medio, dificulta la transferencia de masa, la transferencia de calor y el mezclado, por ello es recomendable analizar el régimen de flujo, evaluando el efecto de los gradientes de la concentración de oxígeno” <sup>24</sup>.

Durango <sup>25</sup> explica la existencia de factores de escalado que afectan de manera considerable la productividad de la fermentación. Entre ellos se pueden encontrar: tiempo de mezcla o también llamado tiempo de homogenización, velocidad en la punta del impulsor, potencia por unidad de volumen ( $P V^{-1}$ ), número de Reynolds, coeficiente volumétrico de transferencia de masa  $K_L a$  y similitud geométrica del reactor, entre otros. Sin embargo, según Durango <sup>26</sup>, si se selecciona el número de Reynolds se generan  $P V^{-1}$  pequeños, mientras que escoger el tiempo de mezclado genera altos costos por el uso de potencias altas, por lo que no son buenos criterios de escalamiento. Por otro lado, Quintero<sup>27</sup> establece que cuando se escoge la velocidad del impulsor para aquellas células microbianas sensibles a grandes esfuerzos cortantes, disminuye la potencia por unidad de volumen bajo una misma proporción en el que la escala aumenta, provocando a su vez una disminución de la transferencia de masa. Por ello, en términos generales Durango<sup>28</sup> sugiere como los mejores criterios de escalamiento: el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_L a$ ) y la relación Potencia-Volumen. Claro está, que este último es más usado para medios fermentativos viscosos, y la transferencia de masa no sea crítica.

Los métodos para estimar el criterio de escalamiento  $K_L a$  pueden ser químicos o físicos. García y Gómez<sup>29</sup>, establecen que los métodos químicos fueron al principio más aceptados, sin embargo, más adelante estos no fueron recomendados para determinar el coeficiente de transferencia de oxígeno ( $K_L a$ ) para biorreactores aireados. La razón principal son los cambios en las propiedades fisicoquímicas del líquido y su inestabilidad de equilibrio químico, por lo que esto puede provocar altos

---

<sup>23</sup> RUÍZ Angela. Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante. Tesis doctoral, Medellín. Universidad Nacional de Colombia. 2009. p.21.

<sup>24</sup> Ibid,p.22

<sup>25</sup>DURANGO Patricia. Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo *Saccharomyces* spp. A nivel laboratorio. Tesis de pregrado, Medellín. Universidad EAFIT. 2007,p.48.

<sup>26</sup> Ibid.,p.48.

<sup>27</sup> QUINTERO ,Rodolfo. “Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones”. Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Editorial Alhambra Mexicana S.A., México 13 D.F., 1981.p. 332.

<sup>28</sup> Ibid, p. 49.

<sup>29</sup> GARCÍA, Felix y GÓMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En: *Biotechnology Advances*. 2009.vol. 27, p. 157.

porcentajes de error en los valores de  $K_L a$ .<sup>30</sup>

Por otro lado, el uso de los métodos físicos que se caracterizan por el uso de sensores de oxígeno con el fin realizar monitoreo del cambio de concentración disuelta de oxígeno con respecto al tiempo durante la absorción y desorción del oxígeno en la solución fermentativo García y Gómez<sup>31</sup>. Por ello, el método escogido fue el dinámico, su estabilidad y bajo costo de medida.

**1.2.2 Método dinámico.** “Es el método físico más utilizado porque presenta bajos costos en el análisis del diferencial de oxígeno con respecto al tiempo; por otro lado, las medidas son independientes de la solubilidad de oxígeno, y puede ser desarrollada sin incluso saberlo. En la práctica es la mejor manera para medir el  $K_L a$  en pequeños volúmenes y es el más usado para el escalado”<sup>32</sup>.

Como lo expresa Doran<sup>33</sup>, este método es válido si se cumplen los siguientes principios:

- La fase líquida está bien mezclada.
- El tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno disuelto sea menor que el inverso del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.
- La formación de películas del medio fermentativo que impidan la lectura del sensor es despreciable.

Además Doran<sup>34</sup> establece que para utilizar el método dinámico y determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, se tienen en cuenta distintos fenómenos como lo son: la transferencia de oxígeno al medio (Capacidad de recuperación de oxígeno bajo un tiempo determinado), tasa de respiración (respiración de toda la población bacteriana presente en el medio) y concentración crítica (Concentración de oxígeno disuelto mínimo antes de que se produzca hipoxia).

**1.2.2.1 Transferencia de oxígeno en los microorganismos.** En los procesos biológicos ocurren distintos fenómenos de manera simultánea, entre estos están el transporte de sustratos y reacciones bioquímicas.

La manera como se relacionan estos eventos establece un determinado comportamiento en un bioproceso: en ocasiones, el transporte de sustratos a las células ocurre a una alta tasa comparado con la tasa de transferencia de oxígeno;

---

<sup>30</sup> Ibid., p. 157

<sup>31</sup> Ibid., p. 158.

<sup>32</sup> FLORES, Elías *et al.* Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. En: *Journal of fermentation and bioengineering*. 1997. vol. 83, no. 6, p. 561-564.

<sup>33</sup> DORAN Pauline. *Bioprocess engineering principles*. 2 ed. Oxford; Academic Press, 2012. ISBN 978-0-12-220851-5. p. 417.

<sup>34</sup> Ibid., p. 418.

que son gobernadas por la cinética de las reacciones. Incluso, cuando la transferencia de masa es menor a las velocidades de reacciones biológicas (que sucede en la mayoría de los casos), según García <sup>35</sup> la tasa de transporte del oxígeno sería la etapa limitante que controla el bioproceso. Cuando un microorganismo requiere una especie gaseosa en un medio líquido, existe mecanismos para mejorar su perfil de concentración y de este modo favorecer la formación del producto de interés. Además, la inyección de oxígeno en el medio líquido (por inyección de aire debido a su disponibilidad y bajo costo), favorece la obtención de un producto deseado al ser correctamente absorbido por el microorganismo.

Como comenta Doran<sup>36</sup>, normalmente por efecto de cizalla en sistemas de aireación; las burbujas de gas a velocidades turbulentas causan deformaciones e incluso ruptura de la burbuja, esto genera la formación de burbujas de menor tamaño, mejorando así la transferencia de oxígeno. Claro está, que en emulsiones como lo comenta Caro<sup>37</sup> esto no sucede y al contrario la transferencia de oxígeno queda afectada.

Doran<sup>38</sup> también expresa que las células tienen diferentes niveles de sensibilidad a los mecanismos de cizallamiento como lo son:

- Interacción entre las células
- Remolinos turbulentos
- Colisiones de las células con los agitadores
- Colisiones de las células con las superficies fijas del recipiente
- Formación de cizalla en las capas cercanas en los rodetes y otros.

“En un fluido en contacto con una superficie sólida, en condiciones donde existe movimiento de un fluido, hay una región inmediatamente cercana a la superficie sólida (interfase) en donde el fluido se mantiene en reposo, conocida como la película del fluido”<sup>39</sup>. Para este caso la transferencia de oxígeno sucede entre dos películas de gas y líquido formado en cada extremo de la interfase (pared de la burbuja), tal como se puede ver en la **Figura 6**.

Durante toda la transferencia desde el interior de la burbuja de oxígeno hasta el citoplasma de la bacteria, coexisten dos interfases Gas-Líquido y Líquido-Sólido. Tal como se puede ver en la **Figura 5**, la fase gaseosa es representada por el oxígeno dentro de la burbuja, seguido de la interfase G-L, donde el oxígeno debe pasar por

---

<sup>35</sup> GARCÍA. Op. Cit., p.153.

<sup>36</sup> DORAN, Op. cit.,p.402.

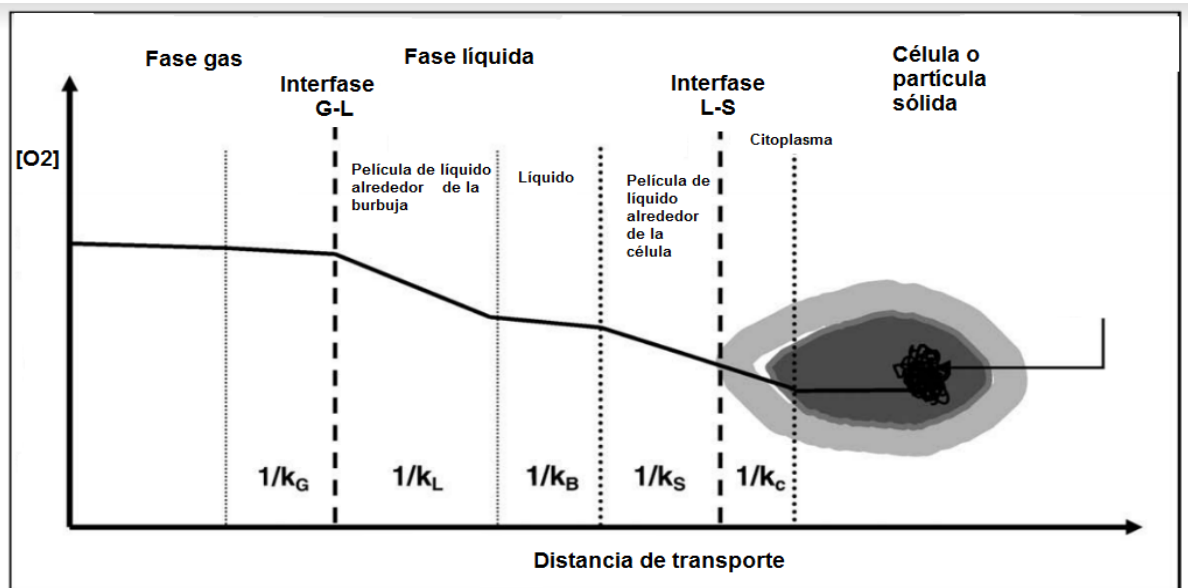
<sup>37</sup> CARO, Ainhoa. Biodesulfuración de fracciones petrolíferas: tratamiento de dibenzotiofeno en distintas condiciones de operación. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. 2006, p.94-95.

<sup>38</sup> DORAN.Op. cit. , p. 267.

<sup>39</sup> GARCÍA. Op,cit, p.157.

dos resistencias ( película del gas y líquido), posteriormente se encuentra la interfase L-S que consta de la resistencia producida por la película del líquido y la producida por la parte solida de la bacteria antes de llegar al citoplasma. Como se mencionó anteriormente, la tasa de transferencia de sustrato (incluyendo la respiración del oxígeno por la bacteria) es mayor a la tasa de transferencia que se producen en la Interfase G-L, por ello las resistencias producidas entre esta interfase son las que predominan en todo el proceso, y por esta razón la constante de resistencia global de transferencia de oxígeno queda representada como la **Ecuación 4**.

**Figura 5.** Resistencias para la transferencia de oxígeno des una burbuja de gas hasta la célula



**Modificado:** GARCÍA, Felix y GÓMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En: Biotechnology Advances. 2009.vol.27.p.156.

**1.2.2.2 Interfase gas-líquido.** El fenómeno por el cual una sustancia se desplaza desde el seno de una fase a la interfase, como se observa en la **Figura 6**, se conoce como transferencia de masa. Dentro de la teoría de película, según Guzmán<sup>40</sup> un flux de masa  $N_i$  es proporcional al gradiente de una concentración  $C$  hasta una concentración interfase  $C_i$ , asociados con una constante de proporcionalidad ( $k$ ) que relaciona la diferencia de las concentraciones y la velocidad de transferencia en términos de flux molar, conocida como coeficiente de transferencia de masa, parámetros establecidos en la **Ecuación 1**.

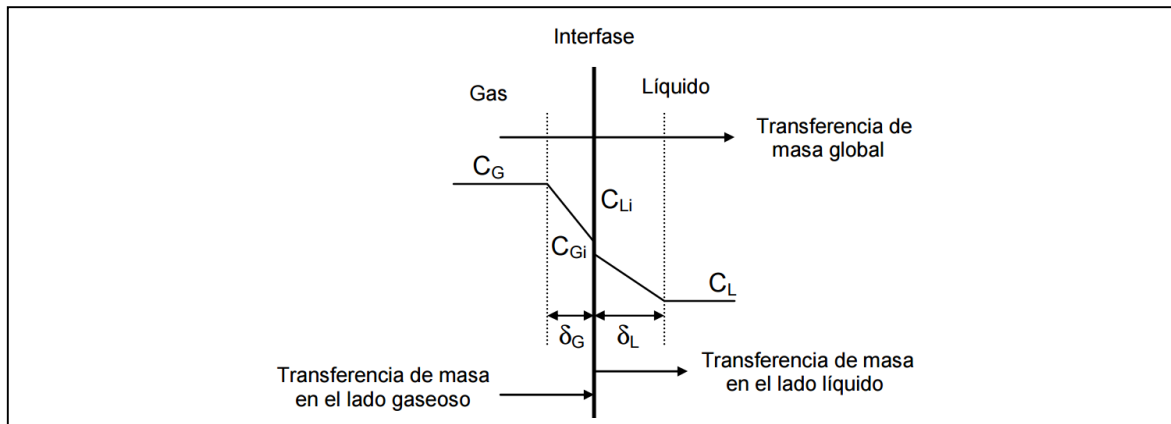
**Ecuación 1:** Flujo local de oxígeno

$$N_i = k(C_i - C)$$

**Fuente:** GUZMÁN, Didier y BERMÚDEZ, Mónica. Modelamiento de la transferencia de oxígeno para el cultivo de microorganismos en un biorreactor de columna de burbujeo. Tesis de pregrado, Manizales. Universidad Nacional de Colombia.2013.p.18.

Donde  $k$  puede tener subíndices  $L$  o  $G$  dependiendo si corresponde para la constante local en la fase gaseosa o líquida.

**Figura 6.**Perfiles de la concentración del modelo de dos películas, transferencia de masa global por absorción



**Fuente:** GUZMÁN, Didier y BERMÚDEZ, Mónica. Modelamiento de la transferencia de oxígeno para el cultivo de microorganismos en un biorreactor de columna de burbujeo. Tesis de pregrado, Manizales. Universidad Nacional de Colombia.2013. p.19.

Guzmán<sup>41</sup> manifiesta que la transferencia de masa ocurre únicamente entre senos de fluido, aunque se encuentren perfectamente mezclados, la turbulencia en cada fluido disminuye a medida que se acerca a la interfase. Adicionalmente, el autor

<sup>40</sup> GUZMÁN, Didier y BERMÚDEZ, Mónica. Modelamiento de la transferencia de oxígeno para el cultivo de microorganismos en un biorreactor de columna de burbujeo. Tesis de pregrado, Manizales. Universidad Nacional de Colombia.2013.p.18.

<sup>41</sup> Ibid.,p.19.

comenta que, para efectos prácticos, como no existe resistencia en la interfase (en el medio de ambas películas), las resistencias en este punto se pueden considerar en equilibrio.

En un estado estable, dentro del balance de transferencia de oxígeno en la Interfase G-L no existen acumulaciones, así que la velocidad de transferencia de oxígeno en la película gaseosa y la líquida tienen la misma velocidad de transferencia de oxígeno, de esa forma se reescribe la **Ecuación 1** como la **Ecuación 2** mostrada por García y Gómez <sup>42</sup> :

**Ecuación 2.** Flujo de oxígeno en el medio gaseoso y líquido.

$$J^0 = k_G(p_G - p_i) = k_L(C_i - C_L)$$

**Fuente:** GARCÍA, Felix y GÓMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En: Biotechnology Advances. 2009.vol.27. p.155.

Donde el flujo de oxígeno se encuentra en [mol O<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ].

Las concentraciones y presiones parciales de interfase son prácticamente indeterminables de manera física, se expresa la **Ecuación 2** en términos de concentraciones en el equilibrio, por la **Ecuación 3**:

**Ecuación 3.** Flujo de oxígeno en el medio gaseoso y líquido en equilibrio.

$$J^0 = k_G(p_G - p^*) = k_L(C^* - C_L)$$

**Fuente:** GARCÍA, Felix y GÓMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En: Biotechnology Advances. 2009.vol.27.p.155.

Donde  $p_G$  es la presión parcial del gas,  $p^*$  es la presión de saturación del gas en equilibrio,  $C^*$  concentración de oxígeno en equilibrio y  $C_L$  concentración del oxígeno en el seno del líquido en la burbuja<sup>43</sup>. Como se puede evidenciar la expresión de transferencia en la fase gaseosa mostrada en la **Figura 5** se encuentra en términos de presiones parciales, se utiliza la ecuación de Henry que explica la solubilidad de un gas en un líquido como una relación directa de la presión parcial ejercida en el mismo por un gas. El cual la expresión se muestra de la siguiente manera ( $p^* = C^* \cdot H$ ). Por lo tanto, se sustituye en la **Ecuación 3**, y posteriormente se procede a realizar un análisis de resistencias locales para cada expresión en la resistencia global, tal como se muestra en la **Ecuación 4**.

La ley de Henry es una medida directa de la relación entre las fracciones molares

<sup>42</sup>GARCÍA, Felix y GÓMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En: Biotechnology Advances. 2009.vol.27.155 p.

<sup>43</sup> Ibid., 155 p.

de oxígeno en el líquido ( $X_o$ ) y en el gas ( $Y_o$ ) cuando se encuentran en equilibrio. Por ello, cuando un gas es muy poco soluble en un líquido ( como es el caso del oxígeno en un medio acuoso), la curva de equilibrio del sistema tiene a aumentar su pendiente, lo cual provoca que la constante de Henry también tome valores muy altos, y esto hace a que la expresión que acompaña la constante de Henry en la **Ecuación 4**, tome valores muy pequeños. Por lo tanto, la constante global queda resumida en la constante local de transferencia en el medio líquido. Tal como lo soporta también García y Gómez<sup>44</sup>.

**Ecuación 4:** Resistencia de la constante global de transferencia de oxígeno

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{Hk_G} + \frac{1}{k_L}$$

**Fuente:** GARCÍA, Felix y GÓMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En: Biotechnology Advances. 2009.vol.27.p.156.

**1.2.2.3 Método Dinámico.** El método dinámico para la determinación del  $K_{L,a}$  queda expresado inicialmente por la **Ecuación 5**. Esta constante es obtenida a partir del seguimiento del consumo del oxígeno disuelto con respecto al tiempo y a la tasa de respiración del microorganismo.

La expresión OTR hace referencia al flujo global de oxígeno expresado como se muestra en **Ecuación 6**, teniendo implícito el coeficiente Volumétrico de transferencia de oxígeno  $K_{L,a}$  y la fuerza impulsora ( $C^* - C_L$ ), mientras que  $C^*$  es la concentración de la fase líquida en equilibrio en el seno del gas<sup>45</sup>.

**Ecuación 5.** Cambio en la concentración de oxígeno disuelto con respecto al tiempo.

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = OTR - OUR$$

**Fuente:** GARCÍA, Felix y GÓMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En: Biotechnology Advances. 2009.vol.27.p.156.

**Ecuación 6.** Flujo de oxígeno global (OTR)

$$OTR = K_{L,a}(C^* - C_{AL})$$

**Fuente:** GARCÍA, Felix y GÓMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En: Biotechnology Advances. 2009.vol.27.p.157.

<sup>44</sup> Ibid.,p.156.

<sup>45</sup> Ibid, p.157.



Dónde:

$C_{AL}$  = Concentración de oxígeno disuelto

$C^*$  = Concentración de saturación de oxígeno

$K_La$  = Coeficiente Volumétrico de transferencia de oxígeno

Dentro de la determinación del  $K_La$  además de conocer el flujo de oxígeno es importante saber la tasa de respiración de los microorganismos. Doran<sup>46</sup> sugiere evaluar este consumo en el método dinámico, expresado como OUR, tal como se expresa en la **Ecuación 7**:

**Ecuación 7.** Tasa de respiración del microorganismo *OUR*

$$OUR = q_0x$$

**Fuente:** DORAN Pauline. Bioprocess engineering principles. 2 ed. Oxford: Academic Press, 2012. ISBN 978-0-12-220851-5.p. 394.

Donde la  $x$  es concentración de biomasa en el medio y  $q_0$  es la tasa específica de consumo de oxígeno [ $\text{mmol O}_2 \text{ g peso seco}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ].

Duarte <sup>47</sup> estipula que cuando se realiza la interrupción de la inyección de oxígeno al medio (**Figura 8** segmento a-b) la tasa global de transferencia de oxígeno toma un valor muy cercano a cero, porque en este proceso la transferencia de masa es casi nula debido a que no existe entrada de oxígeno, así que la **Ecuación 5** queda resumida únicamente con la tasa de respiración de los microorganismos, mostrada en la **Ecuación 7**:

“La inherente demanda de oxígeno depende principalmente de la naturaleza de la cepa, las características y las condiciones nutricionales del medio. Sin embargo, cuando la tasa transferencia de oxígeno al medio es menor a la tasa de respiración del microorganismo, la disposición de mismo disminuye a tal punto en el que el microorganismo queda limitado, en este punto se conoce como concentración crítica”<sup>48</sup>.

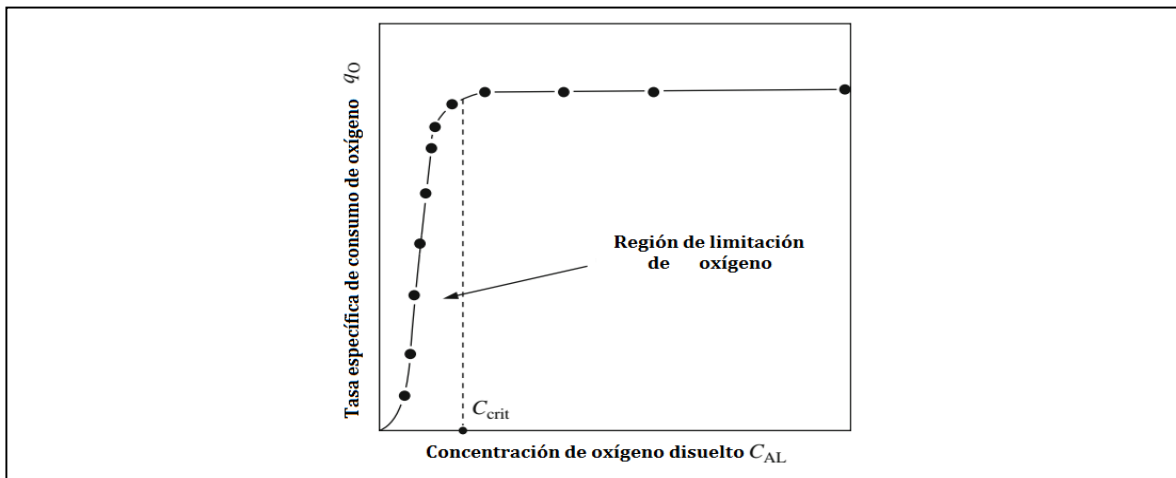
<sup>46</sup> DORAN Pauline. Bioprocess engineering principles. 2 ed. Oxford:Academic Press, 2012. ISBN 978-0-12-220851-5.p. 394.

<sup>47</sup> DUARTE, Alberto. Introducción a la Ingeniería Bioquímica. Santafé de Bogotá: 1995.

<sup>48</sup> DORAN. Op. cit. p.395.

**1.2.2.4 Concentración crítica de oxígeno disuelto.** “Cuando la disponibilidad del oxígeno empieza a ser menor con respecto al consumo total de la cepa en el medio, tal como se muestra en la **Figura 7**, se establece que el sistema alcanza una concentración crítica, que en otras palabras, es la concentración mínima de oxígeno presente en el medio cuando la tasa de consumo del microorganismo es constante”<sup>49</sup>. En concentraciones inferiores a este valor, la bacteria estaría limitada por la baja concentración de oxígeno y no tendría la disponibilidad necesaria para su proceso de respiración. Debido a ello, es pertinente estimar el criterio de escalamiento  $K_La$  por encima de la concentración crítica de oxígeno.

**Figura 7.** Caída de la tasa de consumo de oxígeno del microorganismo después de llegar a la concentración crítica



**Fuente:** DORAN Pauline. Bioprocess engineering principles. 2 ed. Oxford: Academic Press, 2012. 903 p. ISBN 978-0-12-220851-5.p.362.

**1.2.2.5 Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_La$ ).** El método dinámico para la determinación del  $K_La$  queda expresado por la **Ecuación 8**. Esta constante es obtenida a partir del seguimiento del consumo del oxígeno disuelto con respecto al tiempo (OTR) y a la tasa de respiración del microorganismo (OUR).

**Ecuación 8.** Evaluación de la concentración de oxígeno disuelto con respecto al tiempo

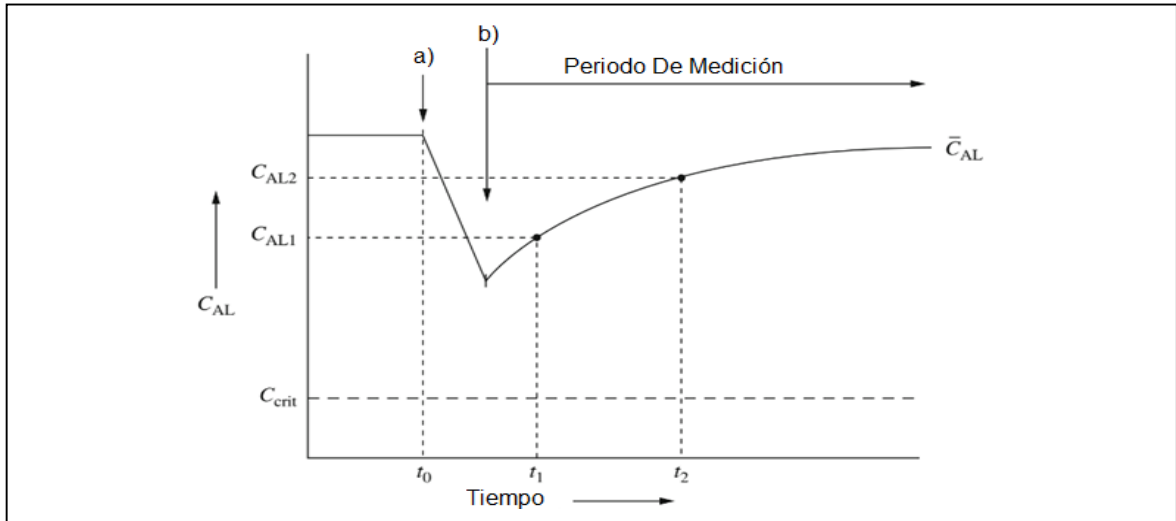
$$\frac{dC_{AL}}{dt} = K_La(C^* - C_{AL}) - q_{Ox}$$

**Fuente:** DORAN Pauline. Bioprocess engineering principles.2 ed. Oxford: Academic Press, 2012. 903 p. ISBN 978-0-12-220851-5.p.418.

<sup>49</sup> Ibid.,p.362.

La tasa de respiración es obtenida mediante una suspensión del flujo de aire hasta el punto b) que debe ser una concentración superior a la concentración crítica de oxígeno, tal como se ve en la **Figura 8**. La **Ecuación 7** se integra desde la concentración en el punto a) hasta el punto b), obteniéndose la **Ecuación 9**. La pendiente de dicha ecuación representa el negativo de la respiración celular presente en el medio.

**Figura 8.** Método dinámico para determinar el  $K_L a$ . a) Suspensión de aire y b) re oxigenación



**Fuente:** DORAN Pauline. Bioprocess engineering principles.2 ed. Oxford: Academic Press, 2012. 903 p. ISBN 978-0-12-220851-5.p.418.

**Ecuación 9.** Concentración de oxígeno disuelto al momento de la interrupción del aire.

$$\int_{C^*}^{C_{AL}} C_{AL} = -q_0 x \int_0^t dt \quad \longrightarrow \quad C_{AL} = -q_0 x t + C^*$$

**Fuente:** TORRES, Ana. et al . Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno en microorganismos incluyendo el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno. En: Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquía. 2008.vol 43.p.36.

Se reanuda el flujo de aire hasta alcanzar el equilibrio , tal como se observa en la **Figura 8**. Teniendo esto, se determina la concentración de oxígeno disuelto  $C_L$  por la **Ecuación 10**. A partir de esta ecuación, se grafica en el eje x  $\left(\frac{dC_{AL}}{dt} + q_0 x\right)$  y por otro lado el eje y  $C_L$ , para así determinar con la pendiente la constante volumétrica de transferencia de oxígeno, que esta representado como el negativo del inverso de la pendiente.

**Ecuación 10.** Concentración de oxígeno disuelto durante la reanudación de inyección del oxígeno al medio de cultivo

$$C_L = C^* - \frac{1}{K_L a} \left( \frac{dC_L}{dt} + q_{O_2} x \right)$$

**Fuente:** TORRES, Ana. QUINTERO, Díaz. ATEHORTÚA, Lucía. Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno en microorganismos incluyendo el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno. Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquía. 2008.vol 43.p.36.

**1.2.3 Modelo empírico para evaluación hidrodinámica del sistema.** Según las consideraciones de Santos *et al*<sup>50</sup> existen diferentes diseños experimentales complejos para modelar y optimizar bioprocesos, como es el caso del diseño Box-Behnken, Plackett-Burman y Central compuesto. Éstos permiten determinar el efecto de los factores y la interacción entre ellos. El cual, dentro de estos diseños, el central compuesto (DCC) presenta mayores ventajas, porque es posible desarrollar una ecuación que relacione los factores de manera tal que se pueda realizar una superficie respuesta con pocos datos experimentales.

El DCC consiste de un diseño factorial estándar a dos niveles, pero con dos corridas adicionales para cada factor. Las corridas adicionales, llamadas puntos estrella, son localizadas en distancias pequeñas debajo del nivel bajo de un factor y a la misma distancia arriba del nivel alto, esto permite la estimación de la curvatura con respecto a ese factor. Mientras un factor cambia, los otros son fijados en sus valores centrales con el uso de Statgraphics<sup>51</sup>. A continuación, se muestran las posibles características que puede tener el diseño experimental:

**Puede ser rotatable:** Los puntos estrella se ubican a una distancia axial ( $\alpha$ ) en la que la varianza de la respuesta predicha sea igual para todos los puntos lo cual es la misma distancia del centro del diseño (en unidades estándar).<sup>52</sup>

**Ecuación 11.** Distancia axial rotatable para el CCD

$$\alpha = \sqrt[4]{F}$$

**Fuente:** STATGRAPHICS. Diseño de experimentos -Diseño de superficie de respuesta. [visitado 18 feb., 2017]. Disponible en internet: <<<http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE%20%20Diseno%20de%20Superficies%20de%20Respuesta.pdf>>>.

<sup>50</sup> SANTOS, Danyelle *et al*. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. En: Biocatalysis and agriculture biotechnology. Febrero.2014.vol. 3.p. 48-57.

<sup>51</sup> STATGRAPHICS. Diseño de experimentos -Diseño de superficie de respuesta. [visitado 18 feb., 2017]. Disponible en internet: <<<http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE%20%20Diseno%20de%20Superficies%20de%20Respuesta.pdf>>>.

<sup>52</sup> Ibid., p. 7

Donde  $F$  es el número de corridas, sin contar los puntos al centro (puntos medios entre el nivel bajo y alto de todos los factores).

**Puede ser ortogonal:** Los puntos estrella se pueden ubicar a una distancia axial que asegura que todos los términos de segundo orden son ortogonales de cualquier otro. La propiedad de la distancia axial depende sobre el número de puntos al centro, tal como se muestra en la **Ecuación 12**<sup>53</sup>:

**Ecuación 12.** Distancia axial ortogonal del CCD

$$\alpha = \sqrt[4]{\frac{(\sqrt{2k + n_c + F} - \sqrt{F})^2 * F}{4}}$$

**Fuente:** STATGRAPHICS. Diseño de experimentos -Diseño de superficie de respuesta. [visitado 18 feb., 2017]. Disponible en internet: <<<http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE%20%20Diseno%20de%20Superficies%20de%20Respueta.pdf>>>.

Donde  $n_c$  es el número de puntos al centro,  $k$  es el número de niveles y  $F$  es el número de corridas.

Para efectos de esta investigación, el modelo obtenido permite estudiar los efectos significativos e interacciones entre la aireación ( $X_1$ ) y la agitación ( $X_2$ ), seleccionadas como variables independientes, mientras que el coeficiente de transferencia de oxígeno ( $K_L a$ ), la producción de biomasa y PHA son consideradas como variables respuesta ( $Y$ ). La relación matemática entre las respuestas ( $Y$ ) con las variables independientes  $X_1$  y  $X_2$ , como lo considera Priyadharshini y Bakthavatsalam<sup>54</sup> se determina mediante la **Ecuación 13**:

**Ecuación 13:** Modelo de ajuste para el diseño Central Compuesto

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$$

**Fuente:** PRIYADHARSHINI, Dayana y BAKTHAVATSALAM, A.K. Optimization of phenol degradation by the microalga *Chorella pyrenoidosa* using Plackett- Burman Design and Response surface methodology. En: Bioresource Technology. 2017.vol.207. p. 152.

Donde  $\beta_0$  es un término constante;  $\beta_1$  y  $\beta_2$  son coeficientes de regresión lineal;  $\beta_{11}$  y  $\beta_{22}$  son coeficientes de regresión cuadrática y  $\beta_{12}$  es el coeficiente de regresión que representa la interacción entre las variables independientes.

<sup>53</sup> Ibid., p. 7

<sup>54</sup> PRIYADHARSHINI, Op., cit. p. 152.

Adicionalmente al coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, para realizar el escalamiento, es necesario utilizar una ecuación matemática conocida la correlación de Cooper, **Ecuación 14**, que relaciona el  $K_L a$  con las condiciones de operación y las propiedades fisicoquímicas del medio; para ello se establece la potencia requerida, a partir de números adimensionales.

**1.2.4 Modelo empírico de Correlación de Cooper.** Según el procedimiento realizado por Fernández<sup>55</sup> en su proceso de escalado, mediante las condiciones del diseño de experimentos, se realiza una regresión no lineal para definir los las constantes empíricas del sistema (Ver **Ecuación 14**), y relacionar los parámetros de escalamiento de la transferencia de masa por medio de la correlación de Cooper.

**Ecuación 14.** Correlación de Cooper.

$$K_L a = \theta \left( \frac{P_g}{V} \right)^\beta V_s^\gamma$$

**Fuente:** DORAN Pauline. Bioprocess engineering principles.2 ed. Oxford: Academic Press, 2012. 903 p. ISBN 978-0-12-220851-5.p.418

Donde:

$P_g$  : Potencia requerida  
 $V$  : Volumen del medio fermentativo  
 $V_s$  : Velocidad de aireación Superficial  
 $\theta, \beta, \gamma$  : Coeficiente empírico

A partir de un estudio previo de escalamiento con *Ralstonia eutropha* realizado en el año 2007, en el IBUN, Fernández<sup>56</sup> manifiesta, que la potencia requerida hace parte del factor de Potencia-Volumen ( $P V^{-1}$ ) y se determina a partir de las propiedades fisicoquímicas del medio Viscosidad ( $\mu$ ), Densidad ( $\rho$ ) y números adimensionales principalmente<sup>57</sup>. El procedimiento para determinar la Potencia Gaseada por Volumen y la Velocidad superficial se muestra en la **sección 1.2.4**. Las ecuaciones aplicadas se muestran a continuación.

El número de Reynolds describe la transición de un fluido de su régimen laminar a turbulento. Según Perry<sup>58</sup>, cuando el régimen da mayor a 10000, es turbulento.

---

<sup>55</sup> FERNÁNDEZ, Diego. Escalamiento de la fermentación con *Ralstonia eutropha* para la producción de polihidroxibutirato (PHB) basado en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $K_L a$ . Tesis para maestría. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 2007. p.44

<sup>56</sup> FERNÁNDEZ. Op.cit.p.46.

<sup>57</sup> Ibid., p.45

<sup>58</sup> PERRY. Manual del Ingeniero Químico. México, D.F: McGraw-Hill Interamericana, 1992.p. 423.

**Ecuación 15.**Número de Reynolds

$$Re = \frac{n D_a \rho}{\mu}$$

**Fuente:** FERNÁNDEZ,Diego. Escalamiento de la fermentación con *Ralstonia eutropha* para la producción de polihidroxibutirato (PHB) basado en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $K_L a$ .Tesis para maestría. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia.2007.p.46.

Donde:

n : Velocidad de agitador, rad/s

$\mu$  : Viscosidad Dinámica, Pa/s

$\rho$  : Densidad del fluido, Kg/m<sup>3</sup>

$D_a$  : Diámetro de impulsor, m

Como la manifiesta Duarte<sup>59</sup>, a partir de la gráfica que relaciona el número de potencia  $N_p$  y el Re para tanques agitados con deflectores y sin deflectores, se establece el número de potencia  $N_p$ , para deteminar la potencia disipada, tal como muestra la **Ecuación 16** :

**Ecuación 16.** Potencia disipada por un agitador en un medio no gaseado

$$Pd = N_p \rho n^3 D_a$$

**Fuente;** FERNÁNDEZ, Diego. Escalamiento de la fermentación con *Ralstonia eutropha* para la producción de polihidroxibutirato (PHB) basado en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $K_L a$ .Tesis para maestría. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia.2007.p.46.

Donde:

n : Velocidad de agitador, rad/s

$\rho$  : Densidad del fluido, Kg/m<sup>3</sup>

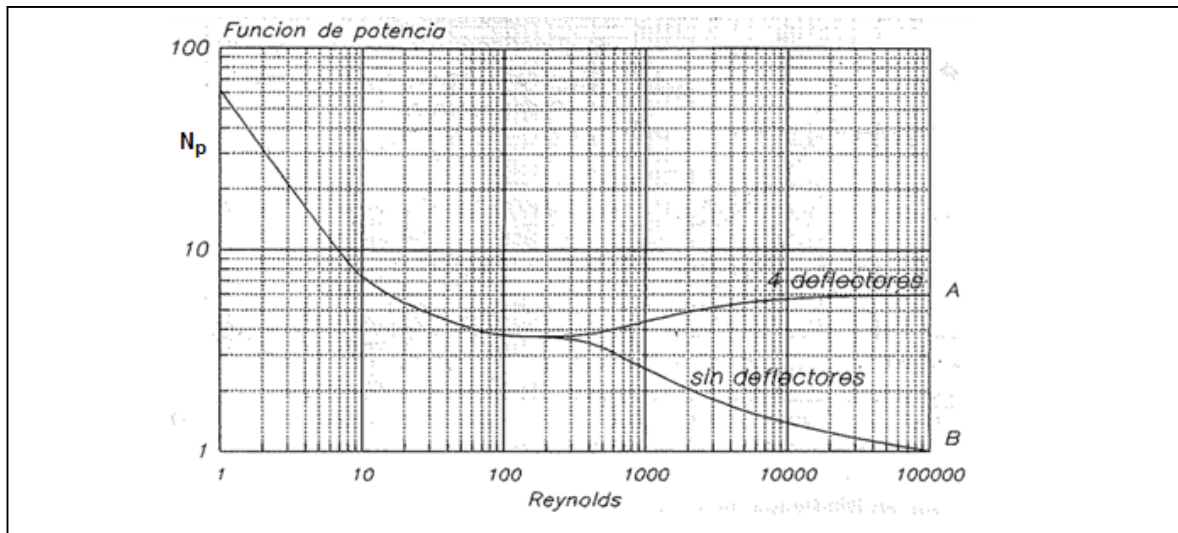
$D_a$ : Diámetro de impulsor, m

$N_p$  : Numero de Potencia (obtenido de la **Figura 9**)

---

<sup>59</sup> DUARTE, Alberto. Introducción a la ingeniería bioquímica. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.1995. p.417.

**Figura 9.** Función de potencia versus Reynolds para un impulsor de turbina de 6 paletas planas



La potencia disipada para un agitador se expresa como  $P_d$ . Para el caso de que se esté realizando agitación mediante dos agitadores ( $P_T$ ) se debe corregir la **Ecuación 16**, tal como se muestra en la **Ecuación 17**.

**Ecuación 17.** Potencia disipada por dos agitadores en un medio no gaseado

$$P_T = \sqrt{2} * P_d$$

**Fuente;** FERNÁNDEZ, Diego. Escalamiento de la fermentación con *Ralstonia eutropha* para la producción de polihidroxibutirato (PHB) basado en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $K_L a$ . Tesis para maestría. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 2007. p.46.

Donde:

$P_T$  : Potencia corregida

$P_d$  : Potencia disipada

El número de Froude es un número adimensional que relaciona el efecto de las fuerzas de inercia con las de gravedad sobre un fluido. Mostrado en la **Ecuación 18**



### Ecuación 18. Número de Froude

$$Fr = \frac{n^2 D_a}{g}$$

**Fuente;** FERNÁNDEZ, Diego. Escalamiento de la fermentación con *Ralstonia eutropha* para la producción de polihidroxibutirato (PHB) basado en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $K_L a$ . Tesis para maestría. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 2007. p.46.

Donde:

$n$  : Velocidad de agitador, rad/s

$D_a$  : Diámetro de impulsor, m

$g$  : Gravedad, m/s<sup>2</sup>

El número de aireación mostrado en la **Ecuación 19**, representa la relación entre la velocidad al cual está entrando el aire al medio y la velocidad del agitador. Es decir, que se mire la capacidad de repartición que el agitador realiza al caudal de gas que está entrando al medio.

### Ecuación 19. Número de aireación

$$A = \frac{Q}{n D_a^3}$$

**Fuente;** FERNÁNDEZ, Diego. Escalamiento de la fermentación con *Ralstonia eutropha* para la producción de polihidroxibutirato (PHB) basado en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $K_L a$ . Tesis para maestría. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 2007. p.46.

Donde:

$Q$  : Caudal de aire, m<sup>3</sup>/s

$D_a$  : Diámetro de impulsor, m

$n$  : Velocidad de agitador, rad/s

La **Ecuación 20** relaciona los números adimensionales, características del reactor, y características del medio para determinar la potencia gaseada, con el fin de calcular el factor ( $P_g$ ).

**Ecuación 20.** Relación de potencia disipada en un medio gaseado con respecto a uno no gaseado

$$\log \frac{P_g}{P_T} = -192 * \left( \frac{D_a}{D_r} \right)^{4.38} * Re^{0.115} * Fr^{1.96 * \frac{D_a}{D_r}} * A$$

**Fuente;** FERNÁNDEZ, Diego. Escalamiento de la fermentación con *Ralstonia eutropha* para la producción de polihidroxibutirato (PHB) basado en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $K_L a$ . Tesis para maestría. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 2007. p.47

Donde:

$P_g$  : Potencia gaseada

$P_T$  : Potencia corregida

$D_a$  : Diámetro de agitadores

$D_r$  : Diámetro del reactor

$Re$  : Número de Reynolds

$Fr$  : Número de Froude

$A$  : Número de aireación

Finalmente se determina la velocidad de aireación superficial con la **Ecuación 21**, que representa la velocidad del aire en todo el área transversal del reactor.

### **Ecuación 21.** Velocidad de aireación Superficial

$$V_s = \frac{Q}{A}$$

**Fuente;** FERNÁNDEZ, Diego. Escalamiento de la fermentación con *Ralstonia eutropha* para la producción de polihidroxibutirato (PHB) basado en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $K_L a$ . Tesis para maestría. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 2007. p.46.

Donde:

Q: Caudal, m<sup>3</sup>/s

A: Área transversal de flujo del aire, m<sup>2</sup>

**1.2.5 Validación del modelo empírico.** La validación es la confirmación, a través de evidencias objetivas de que se cumplen con los requisitos particulares para un uso específico previsto. El proceso de validación se realiza por medio de diferentes métodos<sup>60</sup>:

- Calibración utilizando patrones de referencia o materiales de referencia
- Comparación con resultados obtenidos con otros métodos
- Evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado
- Evaluación de la incertidumbre de los resultados basada en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y en la experiencia práctica
- Validación mediante el análisis de la repetibilidad y reproducibilidad.

**1.2.5.1 Repetibilidad.** Cercanía entre los resultados de mediciones sucesivas de la misma magnitud por medir, efectuadas en las mismas condiciones de mediciones. Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento de medición, el mismo observador, el mismo instrumento de medición utilizado en las mismas condiciones, el mismo lugar y repetición dentro de un período de tiempo corto. La

---

<sup>60</sup> LLAMOSA, Enrique. *et al* . Promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica NTC- ISO/IEC 17025. En: *Sci. Tech.* 2007.p. 458

repetibilidad se puede expresar en forma cuantitativa, en función de las características de dispersión de los resultados<sup>61</sup>.

**1.2.5.2 Reproducibilidad.** Cercanía entre los resultados de las mediciones de la misma magnitud por medir, efectuada bajo condiciones de medición diferentes. Para que una expresión de la reproducibilidad sea válida, es necesario especificar las condiciones que cambian. Las condiciones que cambian pueden ser entre otras: El principio de medición, el método de medición, el observador, el instrumento de medición, el patrón de referencia, el lugar, las condiciones de uso y el tiempo. La reproducibilidad se puede expresar en forma cuantitativa, en función de las características de dispersión de los resultados.<sup>62</sup>

---

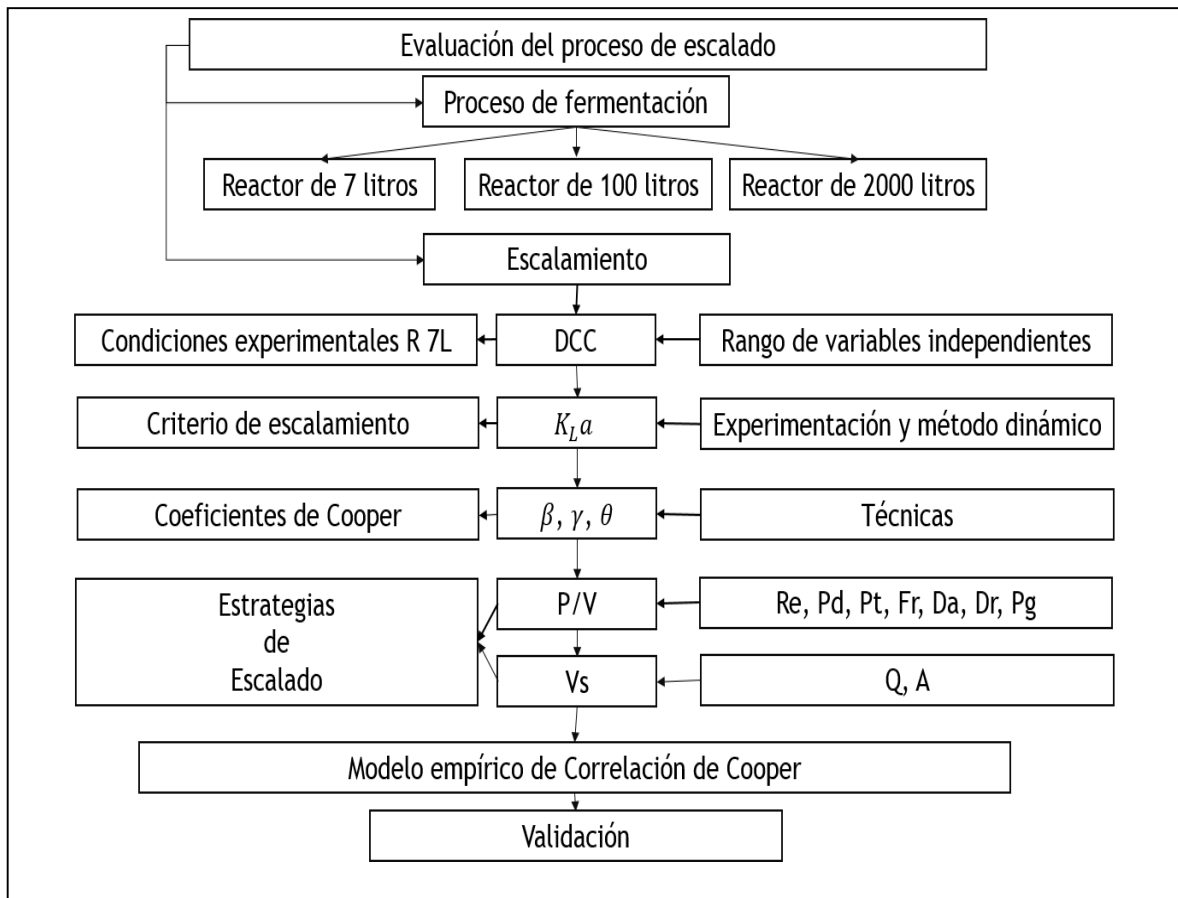
<sup>61</sup> Ibid.,p.458.

<sup>62</sup> Ibid.p.458.

## 2. METODOLOGÍA

Como se puede ver en la **Figura 10**, el capítulo de metodología se divide en dos grandes secciones. La primera, los procesos de fermentativos llevados a cabo, en la que se especifican las condiciones de experimentación en cada escala del proceso y las características físicas de los reactores. En la segunda parte se muestra el proceso de escalado, empezando con el estudio hidrodinámico en el reactor de 7 litros de volumen total, posteriormente se muestran los pasos para determinar el  $K_{La}$  usando el método dinámico. Luego, se hallan las variables que acompañan la correlación de Cooper para cada uno de los experimentos evaluados en la escala base usando los números adimensionales, características geométricas del reactor y características del medio. Después, se procede a realizar distintas técnicas de regresión no Lineal, con el fin de determinar los coeficientes empíricos de la Correlación de Cooper. La selección de las dos mejores técnicas permitirá efectuar el cálculo de las condiciones para el reactor de 100 litros de capacidad y así poder evaluar la desviación de los experimentales con los datos arrojados por el modelo. Seguidamente, se desarrollan estrategias de escalado que relacionarán las técnicas usadas en las fermentaciones y los efectos de desviación producidos en el escalamiento de 100 litros, lo que permitirá determinar la mejor técnica y  $K_{La}$  para continuar con el escalado. Finalmente, se desarrolla el procedimiento de validación de datos, lo que permitirá saber si los datos experimentales con los datos teóricos obtenidos, son aceptables desde el punto de vista estadístico.

**Figura 10.** Diagrama general de la metodología



## 2.1 PROCESO DE FERMENTACIÓN

Los procesos de fermentación constan de 3 etapas fundamentales: pre inoculación, inoculación y producción.

La etapa de pre inoculación consiste en incubar la cepa en un medio LB a 32 °C y 200 rpm durante 24 horas en condiciones asépticas. ( Ver **Tabla 2**)

Las etapas de inoculación se explican en el protocolo de MENDEZ<sup>63</sup>, realizados en un medio PHA.(Ver **Tabla 3**)

Los protocolos de inoculación se muestran en las **Figura 11**, **Figura 12** y **Figura 13** para el reactor de 7 litros, 100 litros y 2000 L, respectivamente. Todos los inóculos

<sup>63</sup> MÉNDEZ, Daniel. Modelamiento matemático y optimización del proceso de producción de polihidroxialcanoatos empleando la bacteria Burkholderia cepacia B27 a partir de ácidos grasos. Tesis de maestría. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.2016.p.51.

que se realizaron en el Erlenmeyer tienen una cabeza de aire de 1/ 5.

**Tabla 2.** Composición del medio LB

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g L<sup>-1</sup>)</b>
Triptosa	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5
<b>Ajustar el pH a 7, esterilizar y después adicionar</b>	
Cloranfenicol	0.0034 (g L <sup>-1</sup> )

**Tabla 3.** Composición del medio fermentativo PHA

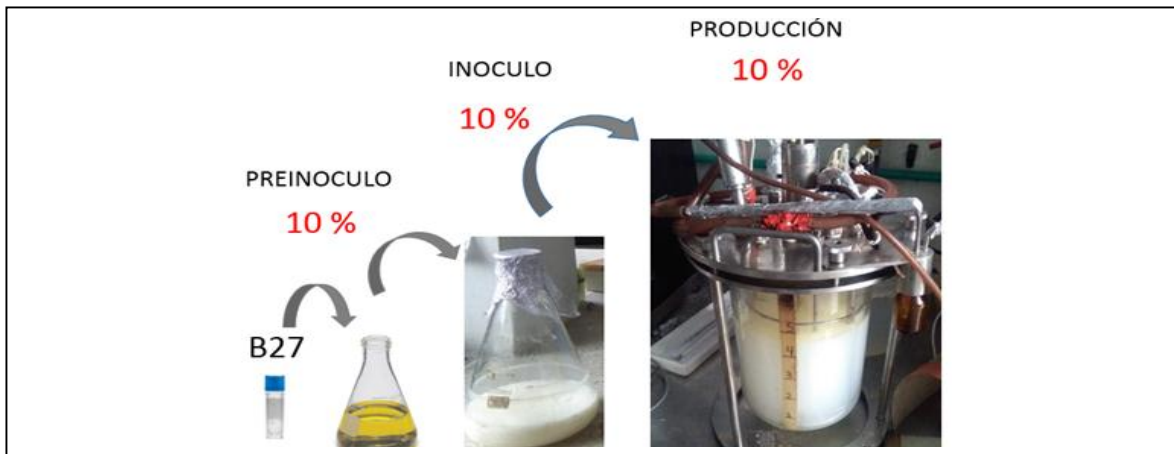
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.65 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.39 g L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.8 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	0.3 g L <sup>-1</sup>
Aceite vegetal	21.89 ml/L
Tween 80	5 ml/L
Antiespumante base silicona	2 ml/L
Traza de micronutrientes	2 ml/L

**Tabla 4.** Composición de traza de micronutrientes

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g L<sup>-1</sup>)</b>
FeSO <sub>4</sub>	2
CaCl <sub>2</sub>	2
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.2
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01
NiCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.2
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.03
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.3
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.3
<b>Disolver en 1 litro de una solución de HCl 1 N</b>	

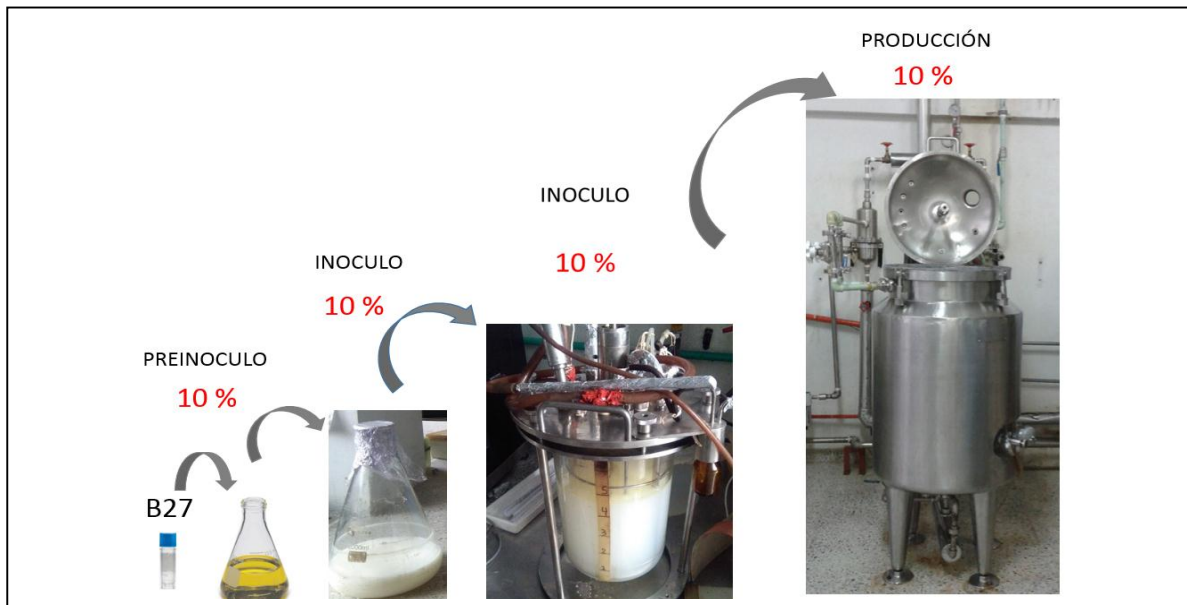
**2.1.1 Protocolo de fermentación reactor 7 litros.** Los experimentos se llevaron a cabo en un BioFlo CelliGen® 115 (Eppendorf, Estados Unidos), como se observa en la **Figura 11**, se compone de una fase de preinoculación el cual ocurre en un medio LB de 50 ml con un inóculo que se deja crecer durante 24 horas. Posteriormente, la inoculación sucede en un matraz de 2 litros en un medio PHA que luego de pasar 24 horas a 32°C y 200 rpm, este se convierte en el inóculo para el reactor de 7 litros. Los experimentos evaluados en esta escala fueron a un volumen de trabajo de 5 litros y con las condiciones experimentales determinadas por el diseño de experimentos central compuesto. Para construir el modelo empírico que relacione las variables independientes de proceso ( Aireación y Agitación) con las variables dependientes (biomasa, polímero y  $K_La$ )

**Figura 11.** Protocolo de fermentación para reactor de 7 litros



**2.1.2 Protocolo de fermentación reactor de 100 litros.** El procedimiento de inoculación para el reactor de 100 Litros se muestra en la **Figura 12**. El protocolo es el mismo que el reactor de 7 litros, solamente que éste se convierte en el inóculo final para el reactor de 100 litros. El tiempo de fermentación de es 24 horas bajo una temperatura de 32°C a diferentes condiciones experimentales, llamadas en la investigación estrategias de escalado, establecidas a partir de  $K_La$  seleccionados por el DCC y las técnicas de escalado que presentes mejor correlación. Éstas se explicarán en detalle en las **secciones 2.2.4 y 2.2.5**.

**Figura 12.** Protocolo de fermentación para el reactor de 100 litros



**2.1.3 Protocolo de fermentación reactor de 2000 litros.** El protocolo de fermentación para el reactor de 100 litros se repite, solamente que éste se convierte en el último inóculo para el reactor de 2000 litros. El tiempo de fermentación de 24 horas bajo una temperatura de 32°C y las condiciones de operación para el reactor de 100 litros fueron 170 rpm y 148 L min<sup>-1</sup>, y para el reactor de 2000 litros fueron 25 rpm y 311 L min<sup>-1</sup>

**Figura 13.** Protocolo de fermentación para el reactor de 2000 litros

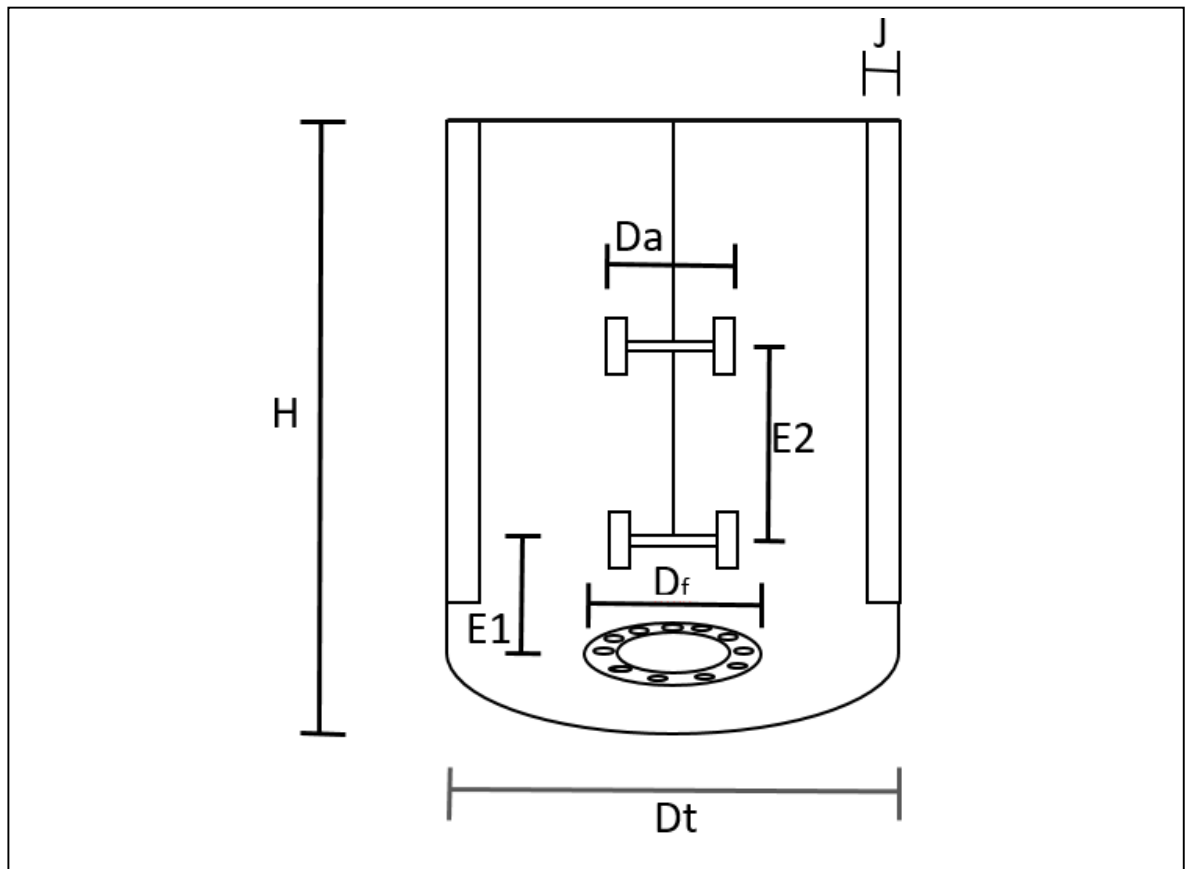




**2.1.4 Descripción de los biorreactores de 7, 100 y 2000 litros.** La estructura general de un biorreactor se muestra en la **Figura 14**. El fermentador de 7 litros fue BioFlo CelliGen® 115 (Eppendorf, Estados Unidos) de mezcla perfecta, agitado por dos impulsores de turbina (Rushton) de 6 paletas, acoplados al eje de rotación. Además cuenta con 1 set de 4 baffles de platos separados uniformemente, sensor de oxígeno disuelto (%OD) Inpro 6950i G (Mettler Toledo, Urdoff Suiza), sensor de pH y sensor de temperatura; también sistemas de control de temperatura y de alimentación de sustrato, base y ácido<sup>64</sup>.

En cuanto al reactor de 100 litros y 2000 litros tienen una geometría similar al reactor de 7 litros, son fermentadores agitados por dos impulsores de turbina (Rushton) de 6 paletas, acoplados al eje de rotación, que cuentan con 4 baffles separados uniformemente, sensor de oxígeno disuelto, sensor de pH y de temperatura. Finalmente, las dimensiones de los reactores de 7, 100 y 2000 L se evidencian en la **Tabla 5**.

**Figura 14.** Estructura característica de un biorreactor



<sup>64</sup>FERNÁNDEZ, Diego. Escalamiento De La Fermentación Con *Ralstonia Eutropha* Para La Producción De Polihidroxibutirato (PHB) Basado En El Coeficiente Volumétrico De Transferencia De Oxígeno  $K_L a$ . Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, 2007, p. 29.

**Tabla 5.** Dimensiones de los reactores de 7, 100 y 2000 litros

Sección	Fermentadores		
	7 litros	100 litros	2000 litros
D <sub>t</sub> Diámetro del reactor	0.0173 m	0.4600 m	1.3000 m
D <sub>a</sub> Diámetro del impulsor	0.077 m	0.2300 m	0.7900 m
W Ancho de la paleta	0.015 m	0.0390 m	0.0800 m
L Longitud de paleta	0.019 m	0.0630 m	0.1850 m
J Ancho de baffle	0.016 m	0.0400 m	0.2200 m
D <sub>F</sub> Diametro de la flauta	0.04 m	0.3200 m	0.6000 m

Además de las dimensiones geométricas mencionadas en la **Tabla 5**, se establecen distancias entre impulsores para cada reactor y alturas de los medios fermentativos, con el fin de mantener las siguientes relaciones de escalado establecidas por McCabe<sup>65</sup> y determinadas para los sistemas de fermentación como se muestra en la **Tabla 6**. Donde E<sub>1</sub> es la distancia entre el último agitador y la flauta, E<sub>2</sub> es la distancia entre impulsores.

Es importante aclarar que la evaluación hidrodinámica y el escalado al reactor de 100 litros se inició con el fermentador de 7 litros. Posteriormente, para el escalado de 2000 litros, se inició con un fermentador de 10 litros que mantenía las relaciones geométricas del 7 litros (Ver **Tabla 6**).

**Tabla 6.** Relaciones geométricas de escalado

Relaciones de escalado	Fermentadores		
	7 litros	100 litros	2000 litros
S <sub>1</sub> = D <sub>a</sub> /D <sub>t</sub>	0.4	0.5	0.6
S <sub>2</sub> = E <sub>1</sub> /D <sub>a</sub>	0.1	0.1	0.1
S <sub>3</sub> = J/D <sub>t</sub>	0.2	0.2	0.1
S <sub>4</sub> = H/D <sub>t</sub>	1.3	1.3	0.6
S <sub>5</sub> = D <sub>F</sub> /E <sub>1</sub>	1.3	1.3	1.2
S <sub>6</sub> = E <sub>2</sub> /H	0.5	0.5	1.1

**Fuente:** McCabe Warren et al. Operaciones unitarias en ingeniería química. Cuarta edición Editorial : McGraw-Hill, Inc. ISBN 84-481-1918-5. 1998.p.259.

## 2.2 PROCESO DE ESCALADO

El criterio de escalamiento seleccionado fue el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno K<sub>L</sub>a, el primer paso para determinarlo es evaluar el efecto de la aireación y la agitación en este criterio. Para ello se desarrolló un diseño central

<sup>65</sup> McCabe Warren et al. Operaciones unitarias en ingeniería química. Cuarta edición Editorial : McGraw-Hill, Inc. ISBN 84-481-1918-5. 1998.p.259.

compuesto.

**2.2.1 Modelo empírico para evaluación hidrodinámica.** El estudio hidrodinámico del sistema se basó en un diseño de experimentos central compuesto (DCC), evaluado con un software estadístico. Los factores a evaluar fueron la agitación y la aireación, indispensables en el proceso de transferencia de oxígeno. El diseño central compuesto se planteó incluyendo las siguientes etapas:

- Definir respuestas: Se establece por separado las tres variables respuesta  $K_L a$ , biomasa (g L<sup>-1</sup>) y polímero (g L<sup>-1</sup>).
- Definir factores experimentales: Se establece el rango de los factores como 100 – 500 rpm y 5 – 22 L min<sup>-1</sup> para agitación y aireación, respectivamente. Estos rangos se determinaron a partir de las especificaciones técnicas del equipo.

Desarrollo del DCC: El diseño de experimentos consta de 2 factores: aireación  $X_1$  y agitación  $X_2$ . Para el primer caso, los rangos de agitación ingresados al diseño se encuentran entre 100 y 500 rpm, mientras que el rango de aireación se toma entre 5 y 22 Lmin<sup>-1</sup>, dichos valores son parecidos a los rangos utilizados por (Marquis et al. 1989). Para los límites superiores e inferiores de cada uno de los factores, el Diseño Central Compuesto (DCC) toma valores por encima y por debajo del límite de las condiciones del diseño. El primer caso, los valores fijados a partir de los límites superiores de aireación y agitación son 22.6 Lmin<sup>-1</sup> y 514.8 rpm, respectivamente. Mientras que, los valores en los límites inferiores de aireación y agitación son 4.3 Lmin<sup>-1</sup> y 105.1 rpm ( Ver

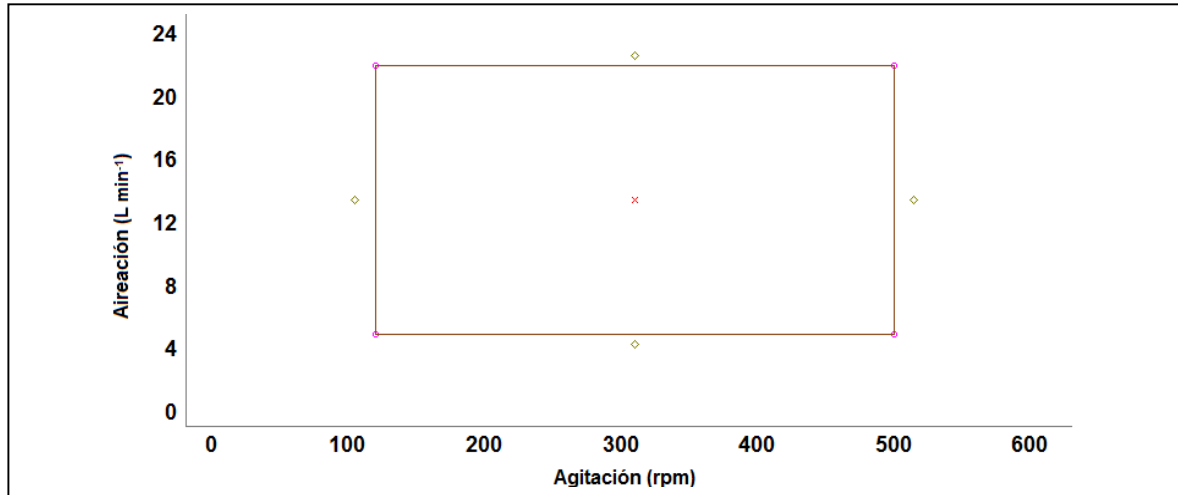
**Figura 15**). Cada factor se evalúa en el diseño mediante 5 niveles, desarrolladas en 10 corridas, como se muestra en la **Tabla 7** y

**Figura 15**. En la **Tabla 8**, se realiza una clasificación de las condiciones de operación que comprenden el diseño central compuesto.

**Tabla 7.** Valores de los niveles de los factores del Diseño Central Compuesto

Aireación (Lmin <sup>-1</sup> )	4.3	5	13.5	22	22.6
Agitación (rpm)	105.1	120	310	500	514.8

**Figura 15.** Puntos del Diseño Central Compuesto



**Tabla 8.** Estandarización de los rangos de agitación y aireación realizados para el Bioflo BioFlo® /CelliGen® 115

<b>Agitación</b>	Baja	105 a 120 rpm
	Media	121 a 310 rpm
	Alta	$\geq 311$ rpm
<b>Aireación</b>	Baja	4 a 5 L min <sup>-1</sup>
	Media	5.1 a 13.5 L min <sup>-1</sup>
	Alta	$\geq 13.6$ L min <sup>-1</sup>

Las combinaciones de las condiciones experimentales anteriores se muestran en la **Tabla 9**, donde se desarrolló en un software estadístico STATGRAPHICS XVI (Versión de prueba). Este diseño permite la construcción de las ecuaciones de segundo grado que permiten relacionar los factores en las variables dependientes, y así poder obtener una superficie de respuesta.

**Tabla 9.** Diseño central compuesto para la evaluación del consumo de oxígeno de *Burkholderia cepacia* B27

Experimento	Aireación ( L min <sup>-1</sup> )	Agitación (rpm)
1	13.5	310.0
2	5.0	120.0
3	5.0	500.0
4	22.6	310.0
5	4.3	310.0
6	13.5	105.1
7	13.5	514.8
8	22.0	120.0
9	22.0	500.0
10	13.5	310.0

A partir de las condiciones arrojadas por el programa, se muestra a continuación el procedimiento del método dinámico. El usado para determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa ( $K_La$ ).

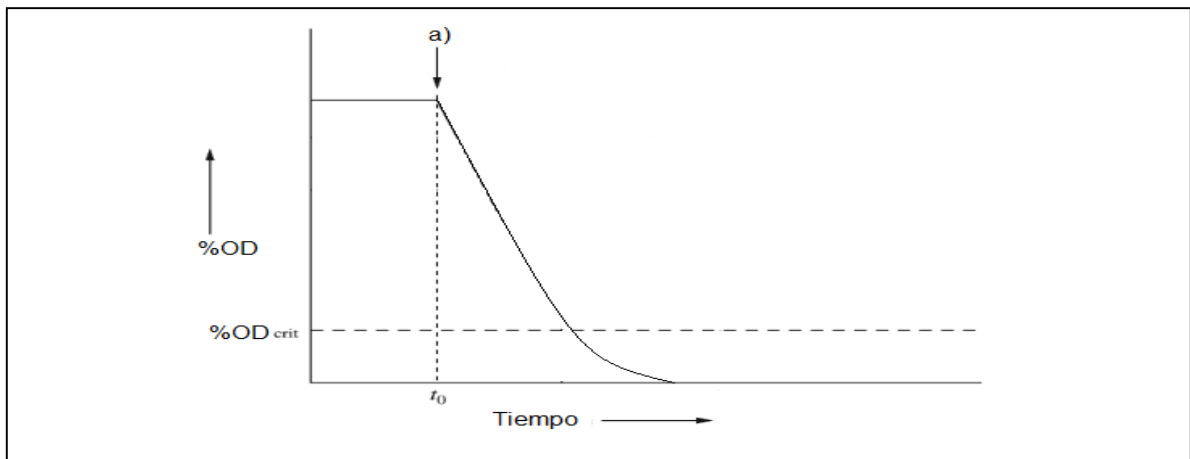
**2.2.2 Método dinámico.** El método dinámico se desarrolló en el **Anexo E**, mediante el seguimiento de porcentajes de aire (%OD) con respecto al tiempo, donde el **100 %OD** corresponde al 20.95 % v/v de oxígeno disuelto. El proceso para calcular la concentración de oxígeno disuelto en términos de  $\text{mmol O}_2 \text{ L}^{-1}$  se muestra en el **Anexo B**.

El método dinámico se desarrolló para todas las fermentaciones a la hora 24 al momento de realizar la inoculación en el BioFlo®/CelliGen® 115, los procedimientos pertinentes para determinar el  $K_La$ , se estructuran en 3 partes: Determinar la concentración crítica, la tasa de respiración del microorganismo presente en la fermentación, y finalmente la obtención del  $K_La$  a partir del cálculo de la capacidad del re oxigenación del medio fermentativo.

#### 2.2.2.1 Determinación de la Concentración crítica para cada experimento.

Las pruebas de caída del porcentaje de oxígeno disuelto en el medio, mediante la interrupción total del flujo de aire, como se observa en el punto a) de la **Figura 16**, se muestran en el **Anexo C**. Cuando exista un cambio en la pendiente en dicha caída, este valor se tomará como concentración crítica. Ya que el cambio de pendiente indicará que la tasa de consumo de oxígeno es menor debido a su baja disponibilidad limitando por tanto la respiración del microorganismo.

**Figura 16.** Caída de concentración de oxígeno disuelto por debajo de la concentración crítica



**2.2.2.2 Desorción.** Es la primera etapa del método dinámico, aquí se determina el OUR que es la tasa de respiración de todos los microorganismos. Las pendientes que indican la tasa de respiración de los microorganismos para cada experimento

muestran en el **Anexo D**.

**2.2.2.3 Absorción.** Luego para la determinación del  $K_L a$  se evalúa un rango de los datos más relevantes de la recuperación del % OD, que según DORAN son limitados con dos puntos internos de medición del balance de oxígeno de manera arbitraria (**Figura 8** entre  $C_{AL1}$  y  $C_{AL2}$ ), por ello en este trabajo se estandariza un rango para todas las fermentaciones evaluadas, escogiendo un intervalo que desestima el 15% de los datos iniciales (Rango que incluye el comienzo de recuperación de oxígeno que afecta en la medida del  $K_L a$ ) y el 45% de los datos finales (Rango donde la recuperación del oxígeno comienza a equilibrarse). Por lo tanto, la medida para el cálculo del  $K_L a$  sucede en el rango medio de recuperación de oxígeno, debido a que en este rango se realiza con mayor certeza la medida de la capacidad de recuperación del oxígeno disuelto en el medio. En la sección de **Anexos E**, se muestra las respectivas gráficas que relaciona el aumento del porcentaje recuperación de oxígeno disuelto en el medio.

**2.2.2.4 Coeficiente Volumétrico De Transferencia De Oxígeno ( $K_L a$ ).** Las gráficas en el que se determinar el  $K_L a$  para cada experimento se muestra en el **Anexo E**, se realiza el cálculo de los coeficientes de transferencia de oxígeno para cada experimento, calculados a partir de la **Ecuación 10**, donde el  $K_L a$  es el inverso negativo de la pendiente.

**2.2.3 Determinación de la potencia requerida.** En el diseño de experimentos se tiene en cuenta las agitaciones en unidades de revoluciones por minuto y las aireaciones en  $L \text{ min}^{-1}$ . La correlación de Cooper que es la ecuación usada para el escalado, se encuentra en términos del Potencia-Volumen que implícitamente también depende de la Velocidad superficial, por esto, es necesario usar varias herramientas ingenieriles que permiten estimar las nuevas condiciones para las demás escalas teniendo en cuenta varias variables presentes en el proceso, por esta razón es necesario estimar la potencia requerida por unidad volumen en el que se tiene en cuenta todas estas variables.

A continuación, la determinación del factor Potencia/Volumen ( $P V^{-1}$ ) se realiza mediante el siguiente procedimiento:

- Establecer las condiciones de aireación y agitación.
- Determinar la densidad y viscosidad del medio a la hora en el que el  $K_L a$  se mida (Para este caso es a la hora 24).
- Determinar Reynolds, mediante la **Ecuación 15**
- Determinar el número de Potencia a partir del Reynolds en la **Ecuación 17**.

- Determinar la potencia disipada por un impulsor sin aireación, mediante la **Ecuación 16**.
- Determinar la potencia disipada por dos impulsores sin aireación mediante la **Ecuación 17**.
- Determinar el número de Froude, mediante la **Ecuación 18**.
- Determinar el número de aireación, mediante la **Ecuación 19**.
- Determinar la relación de Potencia gaseada y potencia no gaseada para dos impulsores, mediante la **Ecuación 20**.
- Determinar la relación Potencia gaseada sobre el volumen del medio utilizado.
- Mediante la relación del caudal de aireación y el área transversal del reactor se calcula la velocidad superficial con la **Ecuación 21**.

Posterior a la determinación de variables utilizadas en la correlación de Cooper, se procede a la determinación del coeficiente empíricos de dicho modelo, para ello se desarrollan las técnicas de escalado.

**2.2.4 Técnicas de escalado.** Luego de determinar las variables de agitación y aireación en términos de Potencia-Volumen y velocidad superficial, se procede a desarrollar las técnicas de escalado. Estas hacen referencia a distintas técnicas para la determinación de los coeficiente empíricos de la correlación de Cooper ( $\theta, \beta, \gamma$ ) mediante el desarrollo de una matriz de decisión teniendo como criterio de evaluación el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Tal como se muestra en la **Tabla 10** se evaluaron 5 técnicas, las primeras tres técnicas fueron desarrolladas mediante una regresión no lineal con la ayuda de un programa estadístico llamado Statgraphics Centurion XVIII XVII (Periodo de prueba), y por otro lado las dos restantes mediante una linealización de la correlación de Cooper.

**Tabla 10.** Técnicas para el ajuste de los coeficientes empíricos que acompañan la correlación de Cooper.

Técnica	Herramienta	Descripción
1	Regresión no Lineal	Sin tratamiento de datos
2	Regresión no Lineal	Tratamiento de datos con mayor desviación estándar
3	Regresión no Lineal	Tratamiento de datos con respecto a $P V^{-1}$ más altos
4	Linealización de la correlación de Cooper	Linealización
5	Linealización de la correlación de Cooper	Linealización + Tratamiento de datos con mayor desviación

En el caso de la técnica 1, se tuvieron en cuenta todos los datos experimentales, mientras que en la técnica 2, se desestimaron las condiciones experimentales que presentaban mayor desviación estándar por el método Tukey. A partir de la guía del programa estadístico Statgraphics Centurion, este método utiliza ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los datos evaluados mientras controla la tasa de error por familia que especifique.

En cuanto a la técnica 3, la regresión no lineal se realizó desestimando las condiciones experimentales, en las que se presentaban los valores de  $PV^{-1}$  más altos, debido a las limitaciones operacionales para el escalado (agitación impartido por el motor y flujo de aire por el compresor).

Las técnicas 4 y 5 se basan en estimar los coeficientes empíricos a partir de una linealización de la correlación de Cooper, mediante la aplicación de logaritmos naturales, como se evidencia en la **Ecuación 22**

**Ecuación 22.** Linealización de la Correlación de Cooper

$$\ln(K_L a) = \ln \theta + \beta * \ln \frac{P_g}{V} + \beta * \ln V_s$$

Donde:

$\theta, \beta, \gamma$  : Coeficientes empíricos

$P_g$  : Potencia Gaseada, Watts

$V$  : Volumen del medio,  $m^3$

$V_s$  : Velocidad superficial,  $m s^{-1}$



Para realizar la determinación de las constantes, se hizo un análisis en dos partes evaluando una variable mientras la otra se mantiene constante. Para el primer caso, en el diseño de experimentos algunas condiciones comparten valores de velocidad superficial cercanas y/o constantes. Para ello, la **Ecuación 23** se grafica como  $-\ln(K_L a)$  versus  $\ln \frac{P_g}{V}$  como variable independiente, generándose una recta, cuya pendiente corresponde al valor de  $-\beta$ .

**Ecuación 23.** Evaluación del  $K_L a$ , bajo condiciones de velocidad superficial constantes.

$$-\ln(K_L a) = -cte - \beta * \ln \frac{P_g}{V}$$

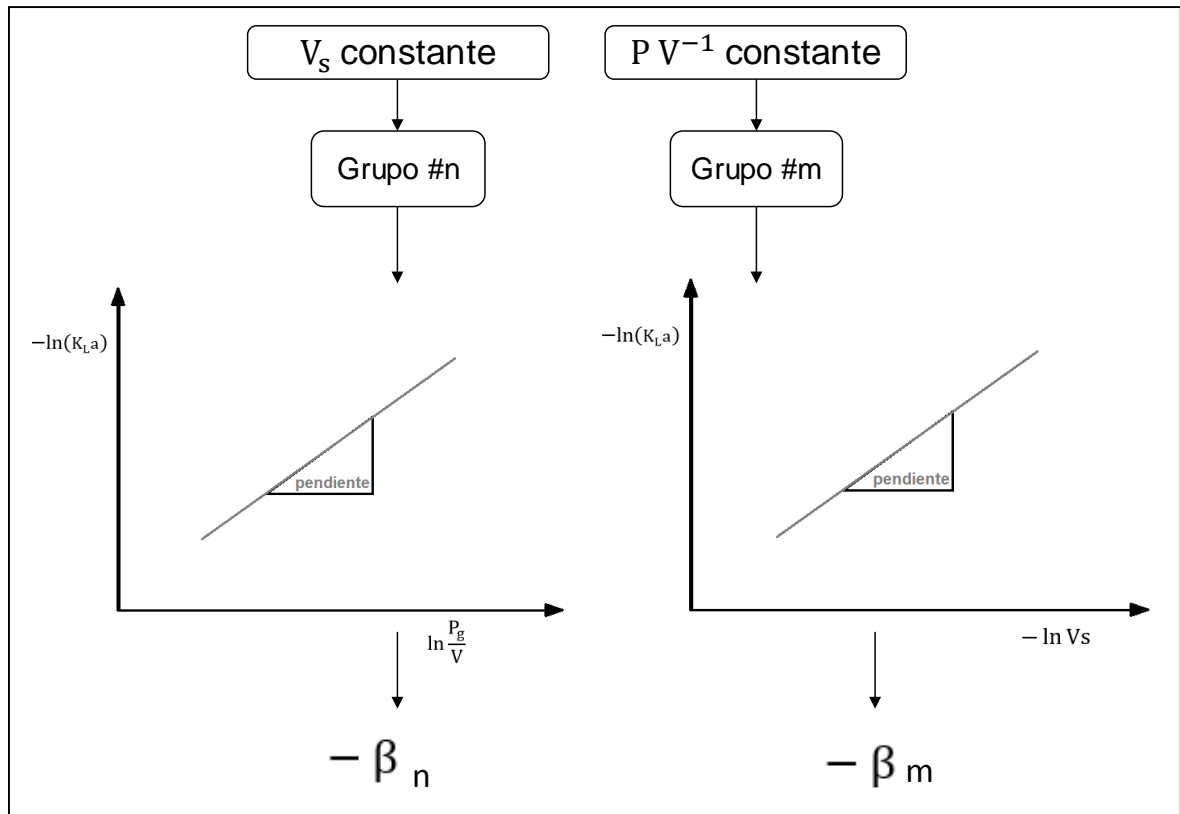
El siguiente paso es evaluar las condiciones de  $K_L a$  en las cuales la relación Potencia-Volumen se mantenga constante, y por tanto la velocidad superficial cambiaría. Para su cálculo se grafica la **Ecuación 24**,  $-\ln(K_L a)$  versus  $-\ln V_s$  como variable independiente, la pendiente de dicha recta corresponde al valor de  $\gamma$ .

**Ecuación 24.** Evaluación del  $K_L a$  bajo condiciones Potencia-Volumen constantes

$$-\ln(K_L a) = -cte + \gamma * (-\ln V_s)$$

La diferencia entre las técnicas 4 y 5, es que en la técnica 4 ( **Figura 17**), se agrupan todas las condiciones experimentales en 3 grupos de  $V_s$  constante, mientras que en la técnica 5 se desestima el grupo de datos con mayor desviación estándar.

**Figura 17.** Técnica de linealización de la correlación de Cooper



Los cálculos realizados para cada una de las técnicas. El procedimiento general se muestra a continuación:

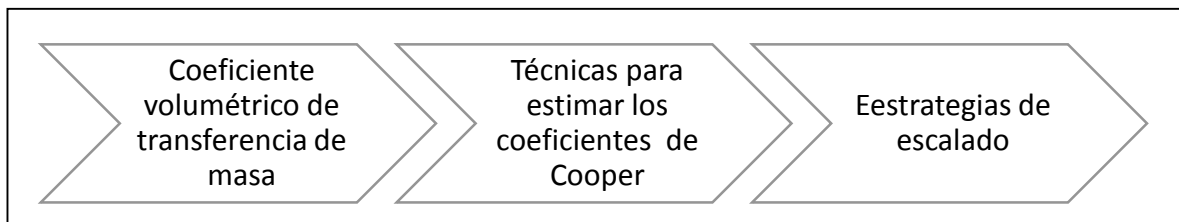
1. Desarrollo de la regresión no Lineal con el programa estadístico, sin eliminación de datos, se basa en el ingreso de la totalidad de los experimentos con sus valores de  $K_L a$ ,  $P V^{-1}$  y  $V_s$ .
2. Determinar los porcentajes de error para cada experimento, error promedio, error máximo y desviación de errores de la técnica 1.
3. Desarrollar la regresión no Lineal con el tratamiento de los tres datos con mayor error porcentual o desviación.
4. Determinar los nuevos porcentajes de error para cada experimento, error promedio, error máximo y desviación de errores de la técnica 2.
5. Desarrollar de la regresión no Lineal de aquellos experimentos donde tienen la relación  $P V^{-1}$  menor a  $260 \text{ W m}^3$ . Se basa en la eliminación condiciones que tiene relación  $P V^{-1}$  altos.
6. Determinar los nuevos porcentajes de error para cada experimento, error promedio, error máximo y desviación de errores de la técnica 3.
7. Comparar los resultados de los pasos 2, 4 y 6, si se llega a un coeficiente de correlación inferior al 0.97 seguir con las técnicas 4 y 5, sino terminar el proceso.

8. Realizar una regresión lineal, mediante la evaluación de los efectos de cada grupo de experimentos que comparten características parecidas de Potencia-Volumen y/o velocidad superficial.
9. Determinar los errores para cada experimento de la técnica 4.
10. Finalizar el proceso del desarrollo de la técnica 5, que se basa en hacer una corrección de la técnica 4 descartando el grupo de experimentos que compartan errores comunes de medición.
11. Realizar una comparación de todos los coeficientes de correlación propuestos para todas las técnicas.

Todo este procedimiento se encuentra desarrollado en el **ANEXO I**.

**2.2.5 Estrategias de escalado.** Las llamadas estrategias de escalado hace referencia a las condiciones de operación del reactor de 100 litros estimados a partir de las técnicas seleccionadas junto con el  $K_La$  que corresponde a las condiciones de mayor producción de biomasa en el 7 litros , como se puede ver en la **Figura 18**.

**Figura 18.** Estrategias de escalado para el reactor de 100 litros



**2.2.5.1 Métodos analíticos.** Para evaluar la producción de biomasa y PHA en los diferentes experimentos es necesario determinar la concentración de ellas en distintas horas de muestreo.

**2.2.5.2 Cuantificación de biomasa.** La concentración de biomasa se estableció por el método gravimétrico a partir del protocolo utilizado por Méndez<sup>66</sup> se muestra en el **ANEXO G**.

**2.2.5.3 Cuantificación de polímero.** Para cuantificar el PHA obtenido, se parte del protocolo utilizado Méndez<sup>67</sup>, el cual se describe en el **ANEXO H**.

**2.2.6 Validación del modelo empírico.** La validación del proceso de escalado se

<sup>66</sup>MÉNDEZ, Daniel. Modelamiento matemático y optimización del proceso de producción de polihidroxialcanoatos empleando la bacteria Burkholderia cepacia B27 a partir de ácidos grasos. Tesis de maestría. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.2016.p. 106-107.

<sup>67</sup>Ibid., p.104-105.

estableció por repetibilidad y reproducibilidad en los valores de  $K_La$ , y la confirmación de los resultados mediante la prueba t..

Para el caso de la repetibilidad, como se muestra en la **Ecuación 25** se evaluaron las repeticiones de las mediciones del  $K_La$  para los experimentos 1 y 7, desarrollados en el reactor de 7 litros.

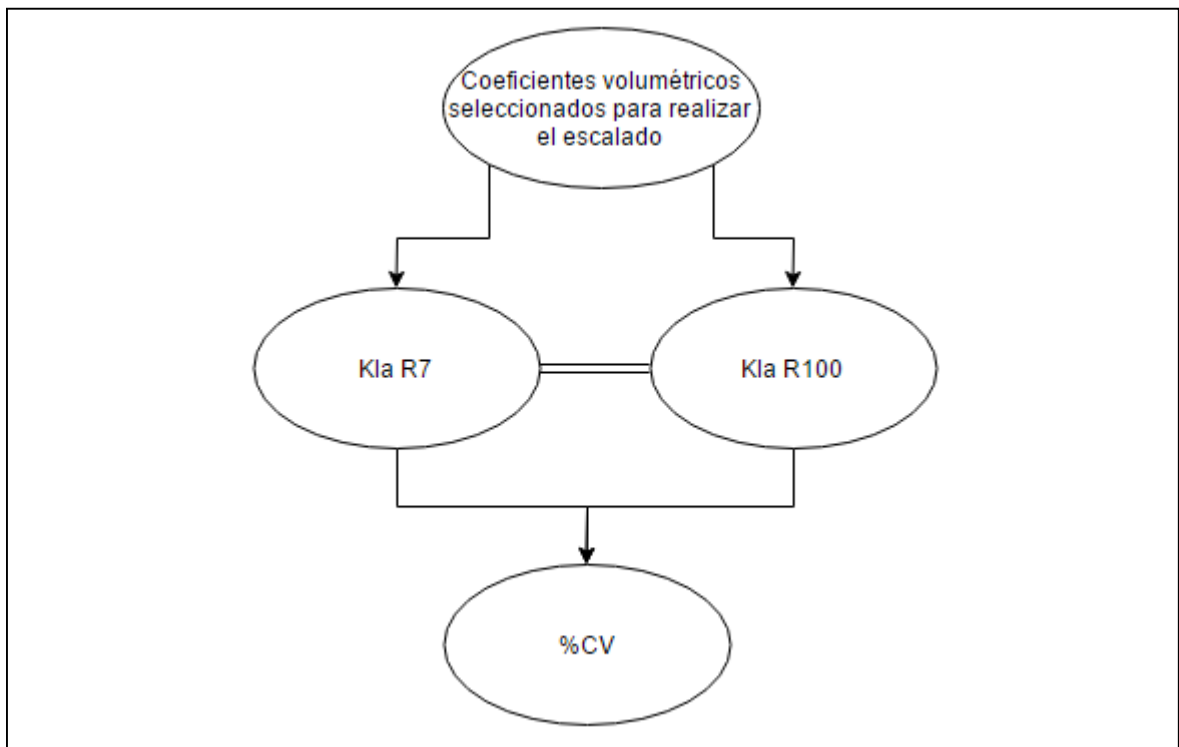
**Ecuación 25.** Repetibilidad de las mediciones del  $K_La$

$$Repetibilidad = \frac{\overline{X_{KLa R-x \text{ exp } n}}}{S_{\text{exp } n}}$$

Donde  $x$  es la escala del reactor que se evalúa,  $n$  es el experimento,  $\overline{X_{KLa R-x \text{ exp } n}}$  es el promedio de las mediciones de  $K_La$  para el experimento y  $S_{\text{exp } n}$  es la desviación estándar entre los datos del experimento.

En cuanto a la reproducibilidad ( **Ecuación 26** ) ésta fue establecida mediante la comparación de los valores de  $K_La$  en la escala de 100 litros con respecto a los obtenidos en escala de 7 litros, como se observa en la **Figura 19**.

**Figura 19.** Análisis de reproducibilidad del  $K_La$



**Ecuación 26.**Reproducibilidad de las mediciones de  $K_La$  entre el reactor de 7 y 100 litros

$$\text{Reproducibilidad} = \frac{\overline{X_{KLa R 7-100}}}{S_{\overline{X_{KLa R 7-100}}}}$$

Donde  $\overline{X_{KLa R 7-100}}$  es el promedio de las mediciones de  $K_La$  del reactor de 7 y de 100 litros y  $S_{\overline{X_{KLa R 7-100}}}$  es la desviación de los datos experimentales en las 2 escalas de trabajo.

Dentro del análisis de validación se evalúa el coeficiente de varianza de los  $K_La$  a las distintas escalas, que según Llamosa *et. al*<sup>68</sup> debe estar en un rango menor al 30% para poder un modelo estadísticamente aceptable.

Finalmente, se confirma las estrategias que son reproducibles mediante el análisis de prueba t el que se basa en una prueba de hipótesis de la media de dos poblaciones distribuidas normalmente, en el que se sigue una distribución t bajo la hipótesis nula. El nivel de significancia es del 0.05.

---

<sup>68</sup> LLAMOSA, Enrique.*et al* . Promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica NTC- ISO/IEC 17025. En: *Sci. Tech.* 2007.p. 458

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los resultados se analizarán según el orden en que se realizó el escalamiento del proceso fermentativo, desde la evaluación hidrodinámica en el reactor de 7 litros. Posteriormente, se hizo la estimación de los coeficientes empíricos de Cooper a partir de 5 técnicas, con el fin de relacionar la Potencia-Volumen, la velocidad superficial y el  $K_La$ . Después, a partir de las 2 mejores técnicas, se establecen las estrategias de escalado para el reactor de 100 litros, con el fin de evaluar los posibles efectos en las variables respuesta por el cambio de escala. Posteriormente, se determina la condición experimental para el reactor de 2000 litros. Finalmente, se validó el  $K_La$  a partir del análisis de repetitividad y reproducibilidad verificando que el coeficiente de varianza (CV) fuera menor al 30%.

#### 3.1 EVALUACIÓN HIDRODINÁMICA EN EL REACTOR DE 7 LITROS

A partir de las condiciones estimadas por el diseño de experimentos, se evaluaron tres variables respuesta, tal como se puede ver en la **Tabla 11**, los modelos empíricos obtenidos presentan coeficientes de relación cercanos a 1.

**Tabla 11.** Coeficientes del Modelo Cuadrático para el  $K_La$ , biomasa y polímero

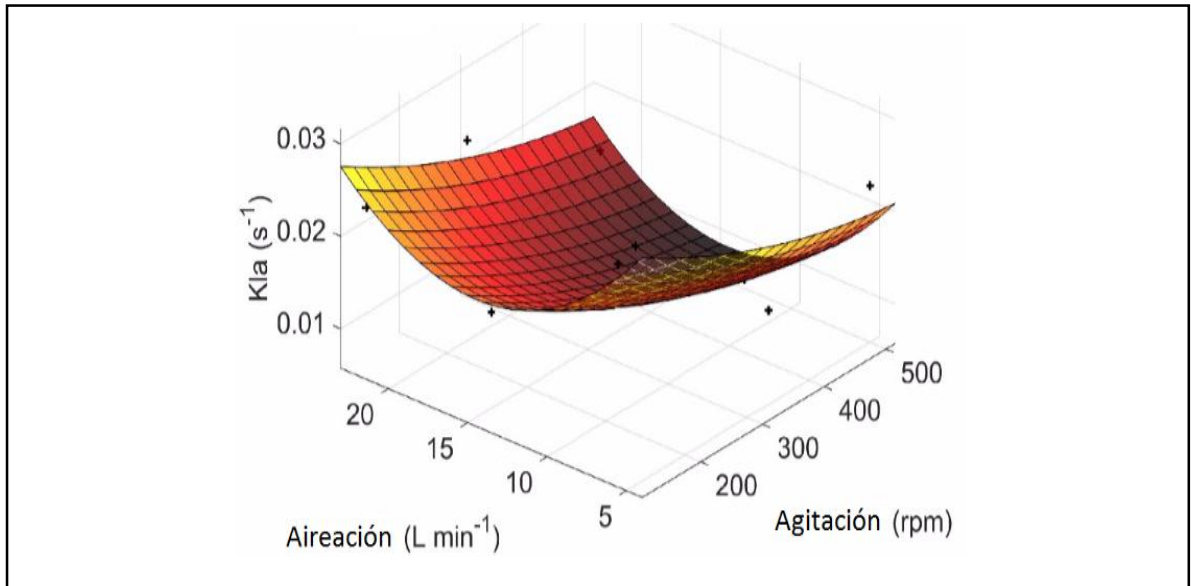
	<b>Variable de respuesta</b>		
	<b><math>K_La</math></b>	<b>Biomasa</b>	<b>Polímero</b>
$\beta_1$	$-1.3480 \times 10^{-0,4}$	$-5.3398 \times 10^{-03}$	$1.5785 \times 10^{-03}$
$\beta_2$	$-1.7116 \times 10^{-03}$	$1.2757 \times 10^0$	$2.0526 \times 10^0$
$\beta_{12}$	$-1.7368 \times 10^{-06}$	$1.1316 \times 10^{-03}$	0.0000
$\beta_{11}$	$1.5947 \times 10^{-07}$	$-5.0941 \times 10^{-06}$	$-3.2857 \times 10^{-06}$
$\beta_{22}$	$9.0639 \times 10^{-05}$	$-5.4193 \times 10^{-02}$	$-7.6218 \times 10^{-02}$
$\beta_0$	$5.3165 \times 10^{-02}$	$2.0768 \times 10^0$	$-5.6053 \times 10^0$
$R^2$	0.9858	0.9001	0.8756

Los modelos para el  $K_La$ , biomasa y polímero indicaron que los porcentajes de los datos que no se encuentran representados por el modelo fueron de 1.42 %, 9.99% y 12.44%, respectivamente. Para el caso del polímero, como su cuantificación requiere más procedimientos experimentales, era de esperarse una mayor desviación de los datos.

Las variables respuesta fueron analizadas por separado con respecto a los efectos principales de interacción de la agitación y la aireación en cada una.

Para el primer caso, la superficie respuesta del efecto de los factores en el  $K_{La}$ , se muestra en **Gráfica 1**. Sin embargo, el análisis detallado de los efectos de las variables independientes en el  $K_{La}$  se realiza respecto a la **Gráfica 2**.

**Gráfica 1.** Superficie de respuesta para el  $K_{La}$  con respecto a la aireación y la agitación



En términos generales, el valor del  $K_{La}$  disminuye cuando aumenta la agitación tal como se puede ver en la **Gráfica 2**. Este comportamiento es explicado por Caro<sup>69</sup>, porque en tanques agitados con emulsiones como medio fermentativo, el  $K_{La}$  no aumenta con la aireación. Adicional a esto, uso de surfactantes (Tween 80 y antiespumante) genera una disminución de la tensión superficial del medio, provocando que la tensión superficial de las burbujas sea mayor con respecto al medio porque las altas agitaciones generan burbujas pequeñas y rígidas. A pesar de que no se midió el tamaño de partícula, si se evidencia en el **ANEXO M**, que, para las condiciones del diseño de agitaciones medias y altas, el número de aireación ( $N_a$ ) mantuvo valores por debajo de 0.20, esto significa que el agitador no estuvo inundado por la cantidad de flujo entrante y por tanto se presentó una mayor homogenización del oxígeno en el medio.

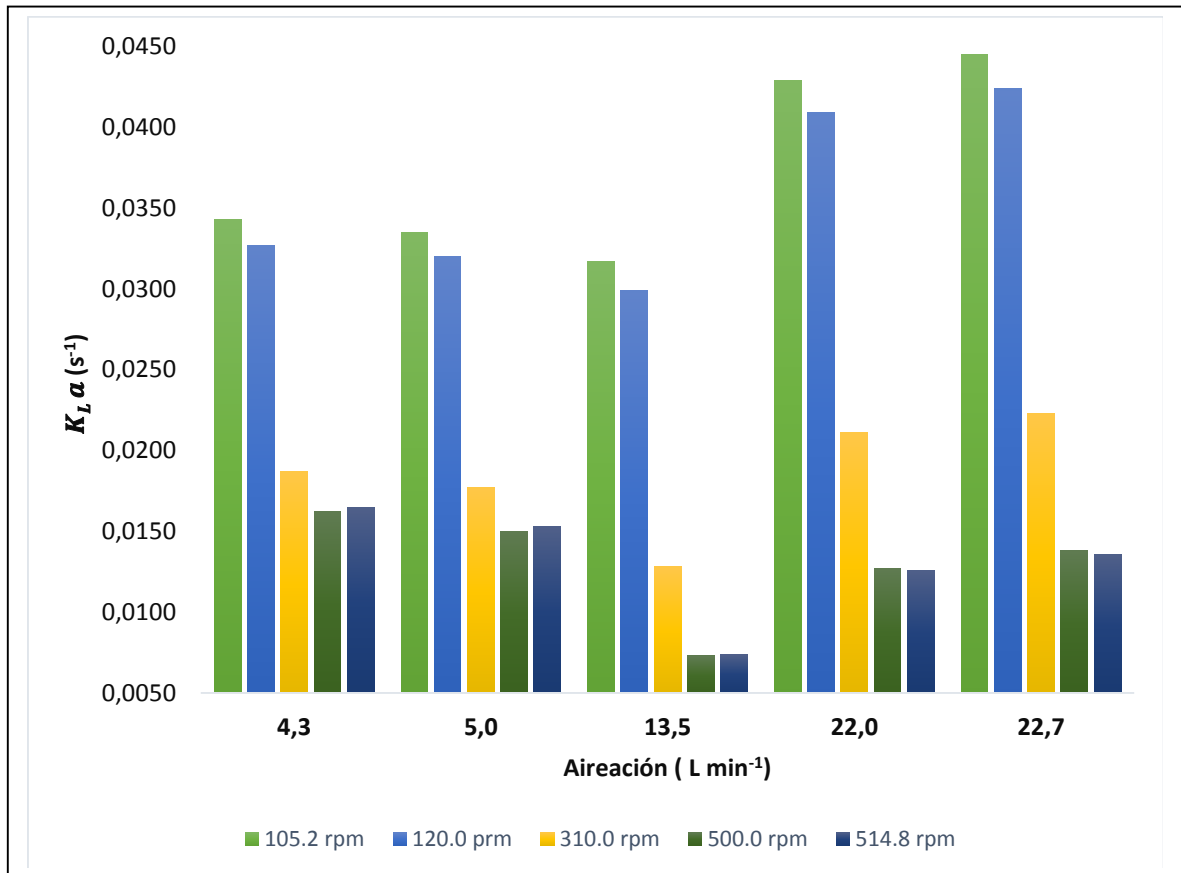
También se evidencia en la **Gráfica 2** que en las condiciones experimentales de aireación de  $13.5 \text{ L min}^{-1}$  sin importar la agitación se presentan los menores valores de  $K_{La}$ . Como lo expresa FINN<sup>70</sup> a esas condiciones de fermentación, a pesar de que existe la mayor resistencia posible a la transferencia de oxígeno en el sistema,

<sup>69</sup> CARO PARDÁ, Ainhoa. Bidesulfuración de fracciones petrolíferas: tratamiento de dibenzotiofeno en distintas condiciones de operación. Universidad de Alcalá, 2006, p.94-95.

<sup>70</sup> FINN, R. K. Agitation-aeration in the laboratory and in industry. En: BACTERIOLOGICAL REVIEWS. Diciembre. vol. 18, no. 4, p. 258

el microorganismo presenta un buen crecimiento bacteriano. Por esta razón, se determinaron las mejores condiciones de aireación y agitación, donde el  $K_{L,a}$  es mínimo como se observa en la **Tabla 12**.

**Gráfica 2.** Efectos principales de interacción de la agitación y la aireación en el  $K_{L,a}$



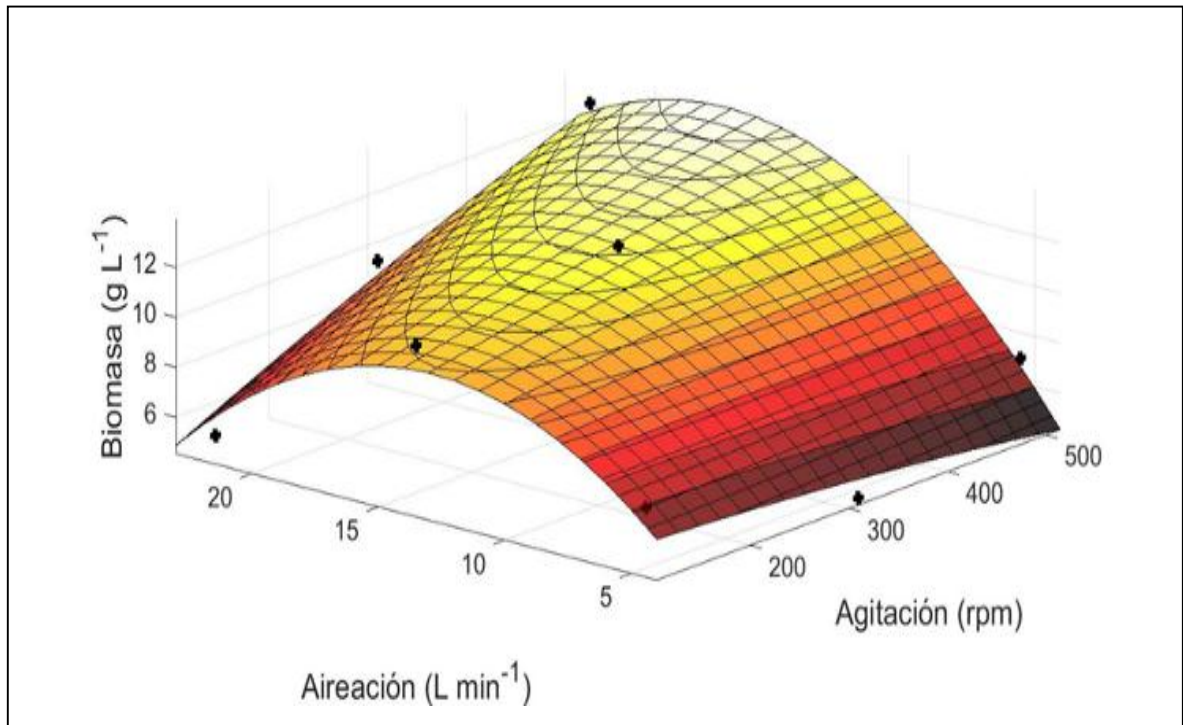
**Tabla 12.** Condición mínima de  $K_{L,a}$  para el reactor de 7 litros

Factores		$K_{L,a}$ (s <sup>-1</sup> )
Agitación (rpm)	500	0.0073
Aireación (L min <sup>-1</sup> )	14	

La superficie respuesta que representa la concentración de biomasa con respecto a los factores del diseño de manera general, se muestra en la **Gráfica 3**. Sin embargo a partir de la **Gráfica 4** se puede realizar un análisis más detallado.



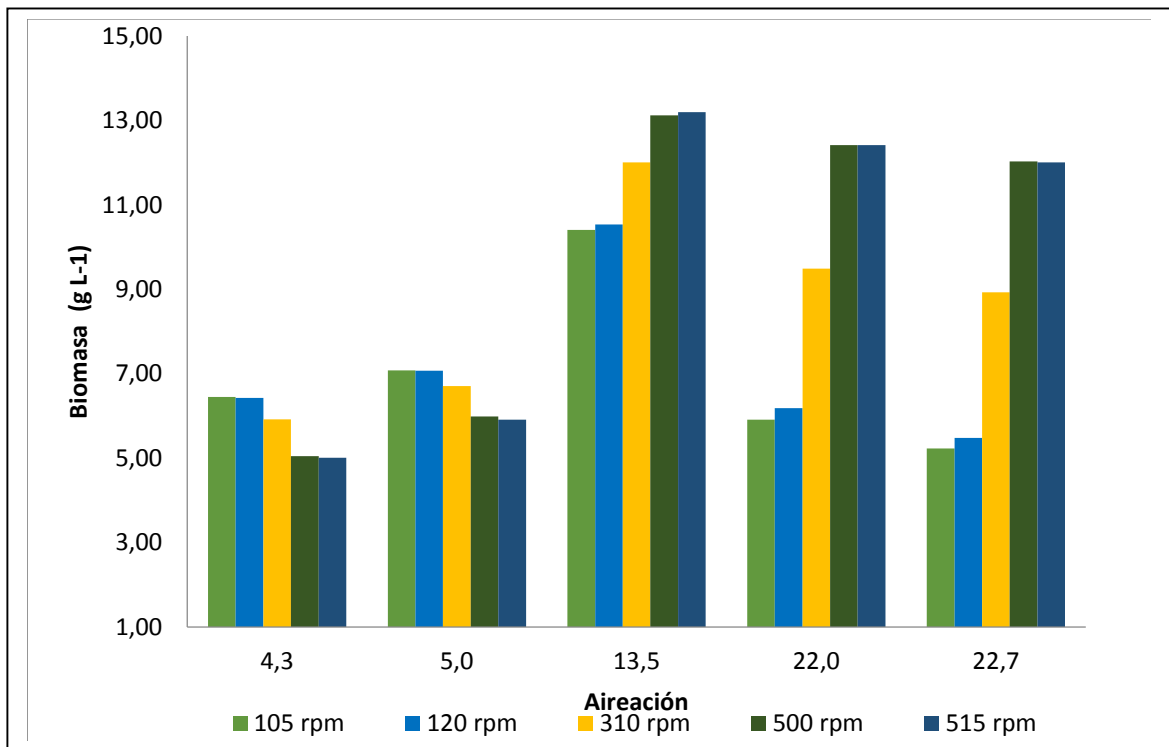
**Gráfica 3.** Superficie respuesta de la interacción entre biomasa, aireación y agitación



Con respecto al efecto de la aireación y la agitación en la concentración de biomasa evidenciado en la **Gráfica 4**, se encontró que en aireaciones medias (13.5 L min<sup>-1</sup>) se presenta las máximas producciones de biomasa sin importar la agitación del sistema, esto es un posible indicador de que la bacteria no sufre un estrés mecánico. Este fenómeno es distinto al estudio realizado por García<sup>71</sup> con *Enterobacter cloacae*, donde se evidencia una degradación de la pared celular de la bacteria en agitaciones altas, por lo cual es posible que *Burkholderia* presente una pared celular más resistente.

<sup>71</sup> GARCIA-OCHOA, Felix, et al. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. En: BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL. vol. 49, no. 3, p. 291

**Gráfica 4.** Efectos principales de interacción de la agitación y aireación en la biomasa en la hora 24 de fermentación.



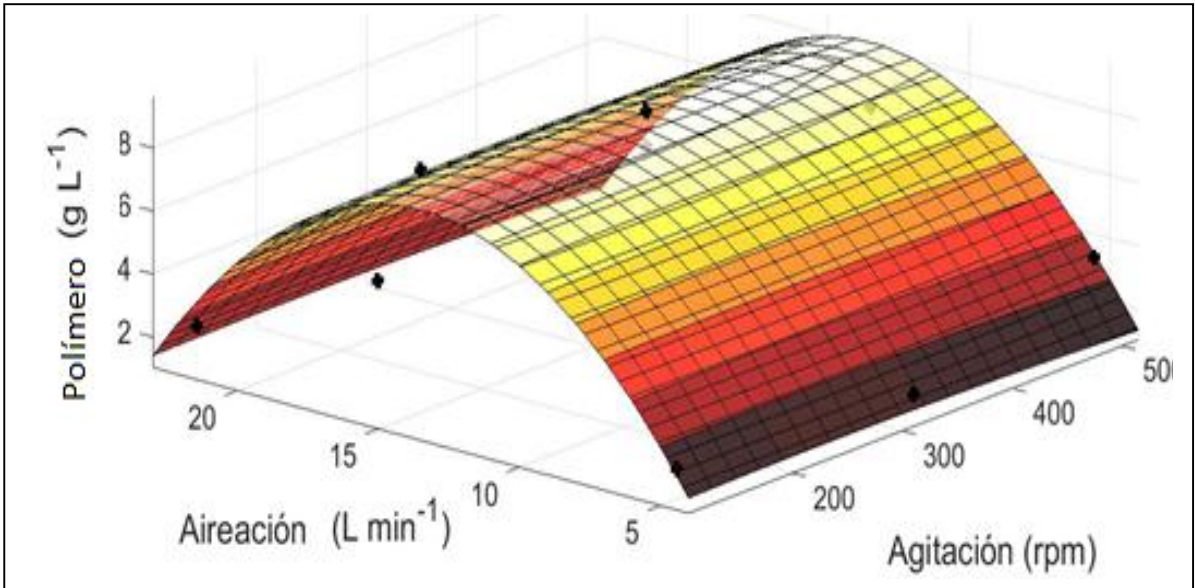
A partir del modelo empírico, variando las condiciones de aireación y agitación, se determinó el punto máximo de concentración de biomasa, como se observa en la **Tabla 13**, con el fin de establecer la máxima concentración que podría alcanzarse a la hora 24.

**Tabla 13.** Punto máximo de biomasa en la hora 24 en el reactor de 7 litros

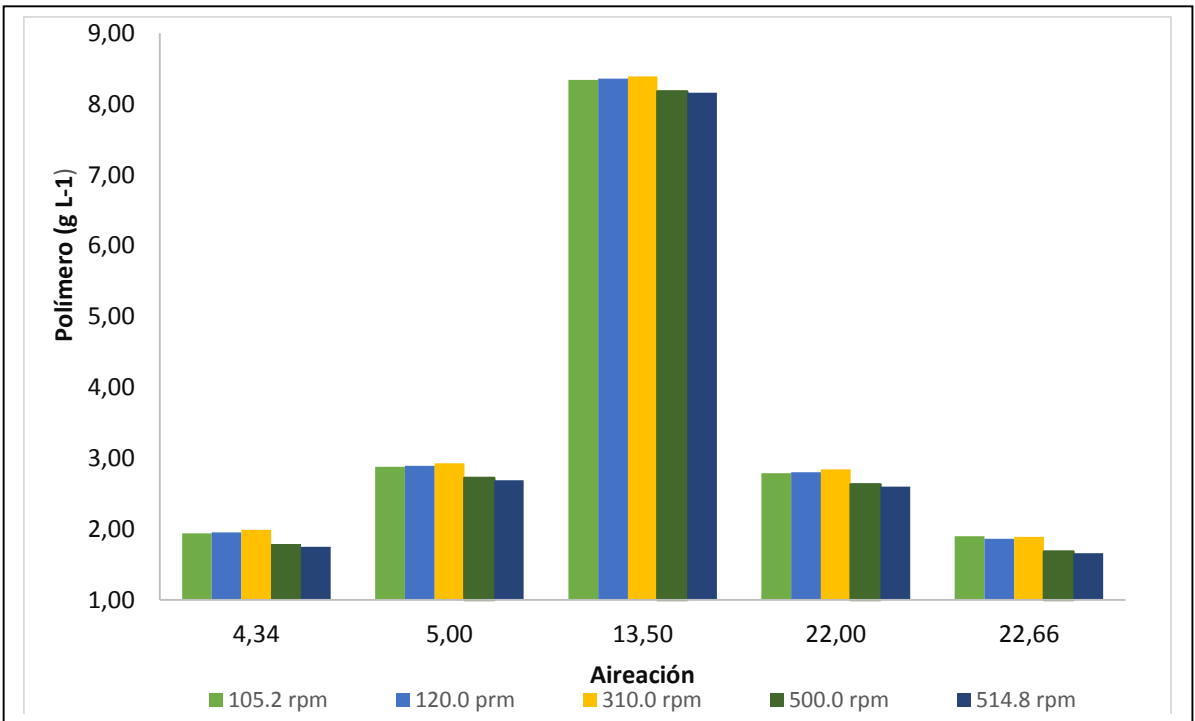
Factores	Biomasa (g L <sup>-1</sup> )	
Agitación (rpm)	514.8	13.91
Aireación (L min <sup>-1</sup> )	17.1	

En lo referente a la acumulación de polímero, la **Gráfica 5** es la superficie respuesta de la concentración de polímero con respecto a la aireación y la agitación. Sin embargo, se hará un análisis detallado de los efectos en la **Gráfica 6**.

**Gráfica 5.** Superficie respuesta de polímero con respecto a la aireación y agitación



**Gráfica 6** Efectos de la interacción entre la aireación y la agitación en el polímero en la hora 24 de fermentación



En la **Gráfica 6** se evidencia que la producción de polímero depende principalmente de la aireación, porque su variación es insignificante respecto a la agitación. En términos generales, las mejores condiciones de crecimiento y acumulación se presentan en aireación de 13.5 L min<sup>-1</sup>. Además, cuando existen altos flujos de oxígeno, el tiempo de retención de este en el medio disminuye, y por lo tanto no alcanzan a generarse gradientes de concentración.

El punto máximo de concentración de polímero, se estimó a partir del modelo empírico, variando las condiciones de aireación y agitación, como se observa en la **Tabla 14** con el fin de conocer la mayor acumulación de polímero posible a la hora 24 de fermentación.

**Tabla 14.** Punto máximo para la concentración de polímero

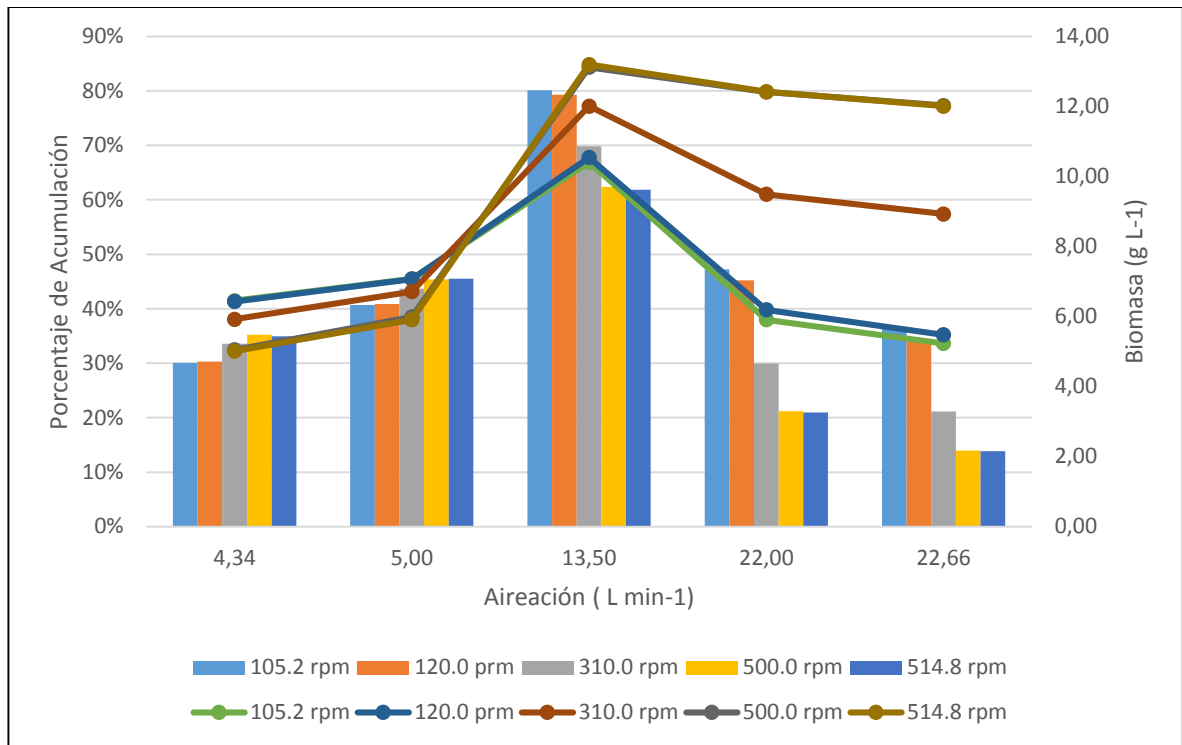
<b>Factores</b>	<b>Polímero (g L<sup>-1</sup>)</b>	
Agitación (rpm)	240	8.40
Aireación (L min <sup>-1</sup> )	13.5	

Para relacionar la evaluación de la formación de biomasa con respecto al polímero se determina el porcentaje de acumulación para cada una de las condiciones experimentales, como se observa en la **Grafica 7**. Las barras representan los porcentajes de acumulación de polímero, mientras que la tendencia (las líneas) representan la formación de biomasa. En altas condiciones de aireación existen concentraciones de biomasa altas, similar a lo reportado por Báez<sup>72</sup> quien encontró este comportamiento para *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecalis*. Sin embargo, *Burkholderia cepacia* B27 disminuye su capacidad de acumulación bajo las mismas condiciones, esto es debido a que el microorganismo no se encuentra en un ambiente de estrés ni limitación de sustratos, y por tanto este no tendría estímulo para acumular el polímero.

---

<sup>72</sup> Idid., p. 66

**Gráfica 7.** Concentración de biomasa y porcentaje de acumulación en la hora 24 con respecto a la aireación y la agitación



Con base en el análisis anterior se decidió evaluar el escalamiento bajo dos criterios:  $K_{La}$  y porcentaje de acumulación. Se escogió la condición de  $K_{La}$  del experimento 7 de  $13.5 \text{ L min}^{-1}$  y 514 rpm. Por otro lado, la condición de mayor productividad, fue el experimento 1 con  $13.5 \text{ L min}^{-1}$  y 310 rpm. Cabe resaltar al medir concentraciones de polímero, con el baño termostato y el agente SDS existe una desnaturalización de proteínas, que al disminuir su densidad pueden ser separadas con los lavados. Sin embargo, puede que los datos de polímero presenten un bajo porcentaje de sobreestimación.

### 3.1 ESCALAMIENTO

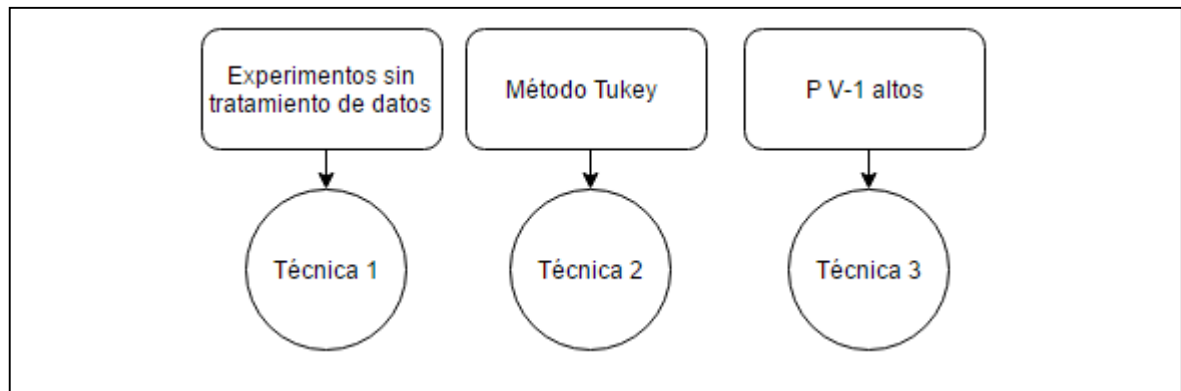
**3.2.1 Técnicas para determinar los coeficientes empíricos de Cooper.** Los cálculos de las 5 técnicas mencionados en la **sección 2.2.4** se muestran en el **ANEXO I**. La selección de las técnicas se hizo en base a los coeficientes de correlación evidenciados en la **Tabla 15**, con el fin de aplicar las técnicas de mejor predicción con respecto a los datos experimentales.

**Tabla 15.** Coeficientes de correlación de las técnicas para estimar coeficientes de Cooper

Técnica	R <sup>2</sup>
1	0.84
2	0.91
3	0.93
4	0.74
5	0.99

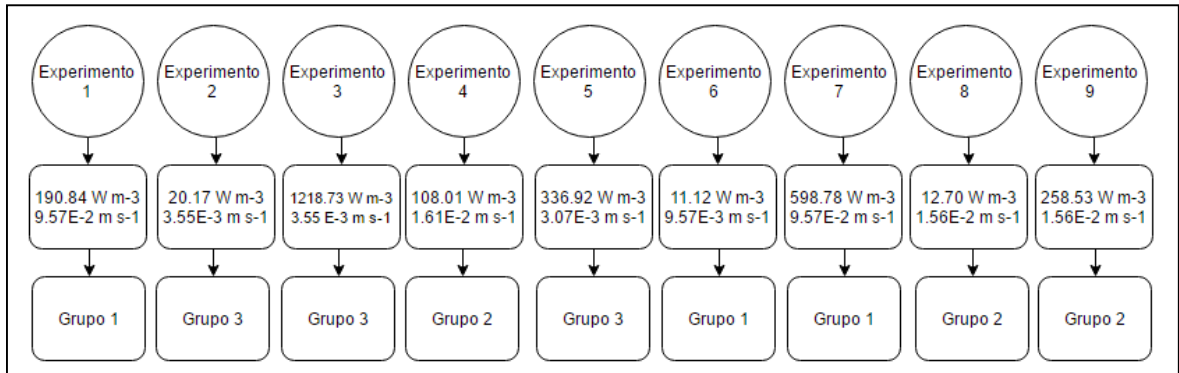
Las diferencias entre las técnicas 1, 2, 3 basadas en regresión no lineal se observan en la **Figura 20**. En cuanto a la técnica 1, el modelo no representa el 16% de los datos experimentales, siendo poco confiable porque solo 10 puntos representan el modelo. Para la técnica 2, se desarrolló un tratamiento de datos llamado Tukey, por el cual se desestimó 3 condiciones experimentales que no presentaban el 95% de confianza. Debido a las limitaciones operacionales de los equipos disponibles en el Instituto de Biotecnología, se desarrolló la técnica 3 desestimando los valores  $P V^{-1}$  altos (mayores a  $300 W m^{-3}$ ). Además, según las limitaciones técnicas, se establece el rango útil del modelo, en el que se presenta un mejor coeficiente de determinación.

**Figura 20.** Técnicas de regresión no lineal



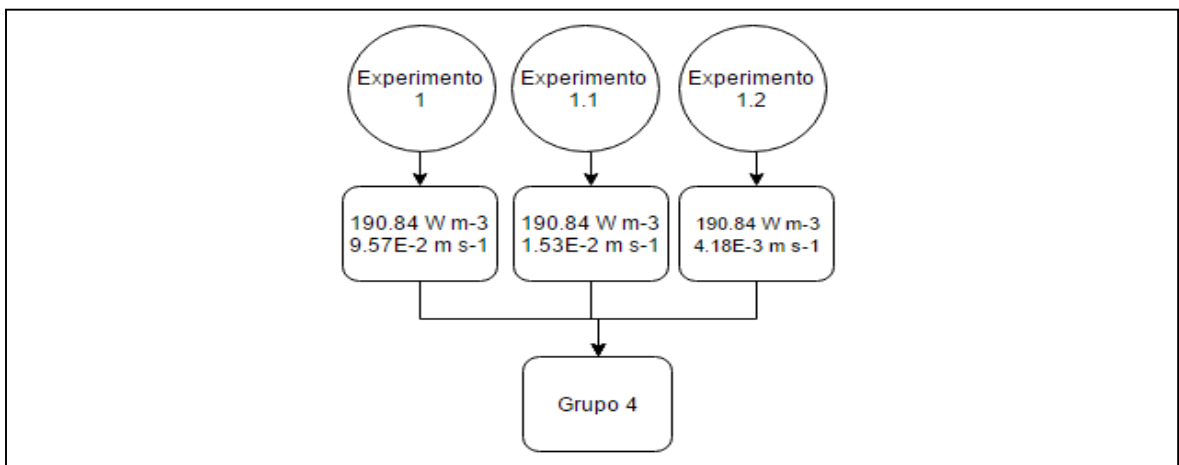
Con el fin de mejorar el coeficiente de determinación, se desarrollaron dos técnicas adicionales (4 y 5), basadas en la linealización de la correlación de Cooper. Para aplicar las técnicas, fue necesario inicialmente clasificar los experimentos en grupos donde se presentarán valores muy cercanos de velocidad superficial (**Figura 21**).

**Figura 21.** Clasificación de los experimentos del reactor de 7 litros según velocidad superficial



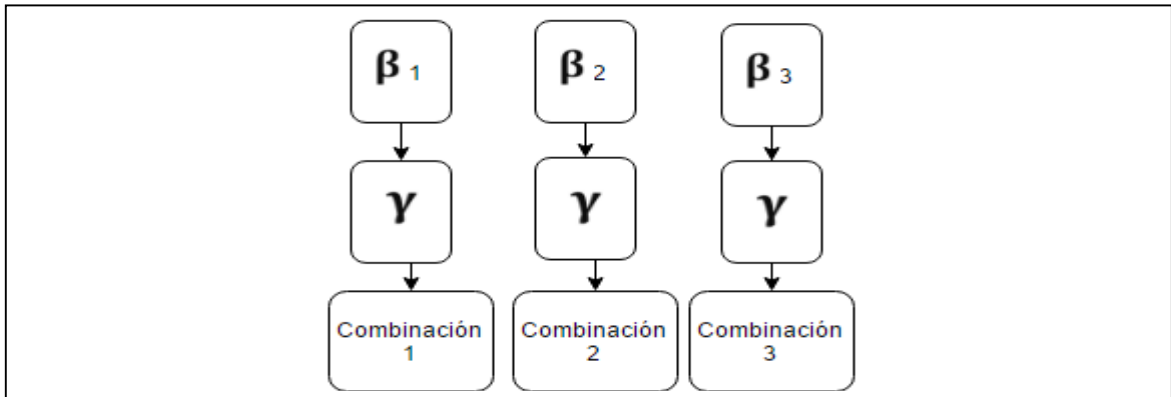
También era necesario realizar un análisis para condiciones donde el factor  $PV^{-1}$  fuera constante, sin embargo, como este fenómeno no se evidencio fue necesario seleccionar un  $PV^{-1}$  y estimar unas nuevas condiciones experimentales para el reactor de 7 litros, que cumplieran con ese factor constante ( **Figura 22**), a partir de herramientas ingenieriles (números adimensionales, características del medio y reactor).

**Figura 22.** Condiciones experimentales adicionales para el reactor de 7 litros que cumplen con  $PV^{-1}$  constante.



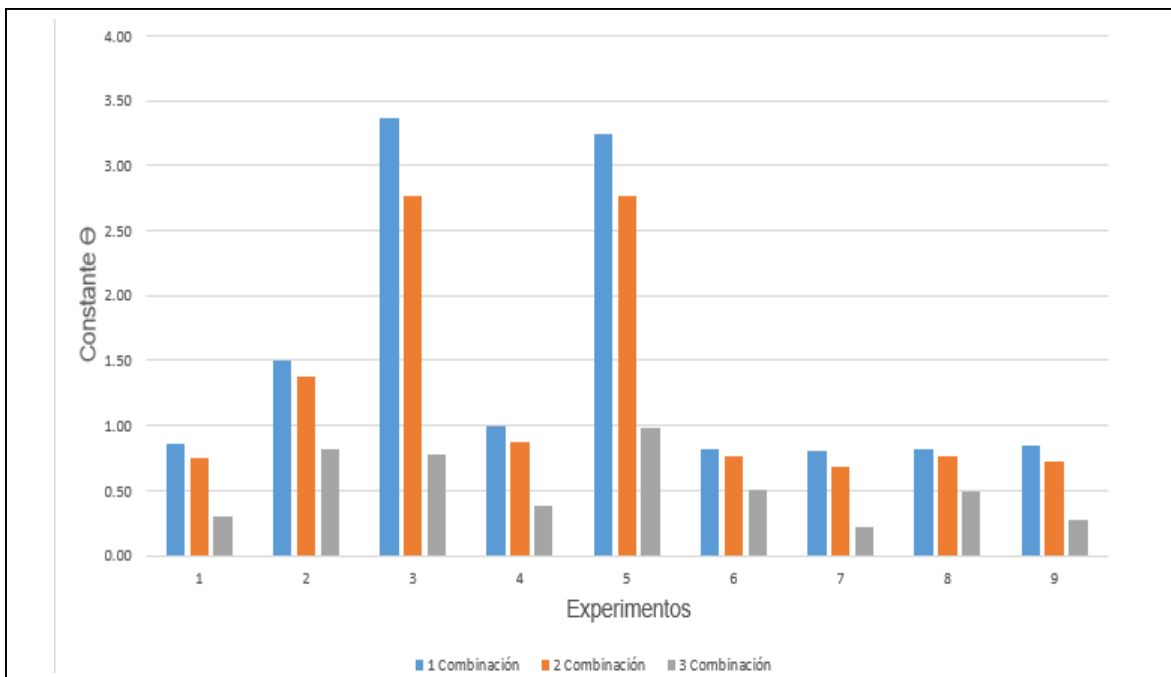
Para la técnica 4, a partir del protocolo explicado en **Figura 17** , de los 3 grupos de experimentos de  $V_s$  contante, se estiman 3 coeficientes  $\beta$ , que se relacionan con el factor  $\gamma$  obtenido de la evaluación de  $PV^{-1}$  constante, para obtener 3 combinaciones (**Figura 23** ), con el fin de evaluar los valores de constante  $\theta$  fuera de la tendencia.

**Figura 23.** Combinaciones de la técnica 4



Los valores de la constante  $\Theta$  de la correlación de Cooper para cada una de las combinaciones mostradas en el protocolo de escalado (**ANEXO I**), se muestran en la **Figura 24**. Se evidenció que en los experimentos 2,5 y 3, los coeficientes  $\Theta$  presentan una desviación apreciable de la tendencia. Además, como se muestra en el **ANEXO I** estos experimentos comparten características de aireaciones similares (4.3 y 5 L min<sup>-1</sup>) pues conforman un mismo grupo para la determinación de la constante  $\beta$ . Esto puede explicarse, porque en aireaciones bajas, el sensor presentaba inestabilidad en las mediciones, provocando aumento en los errores experimentales.

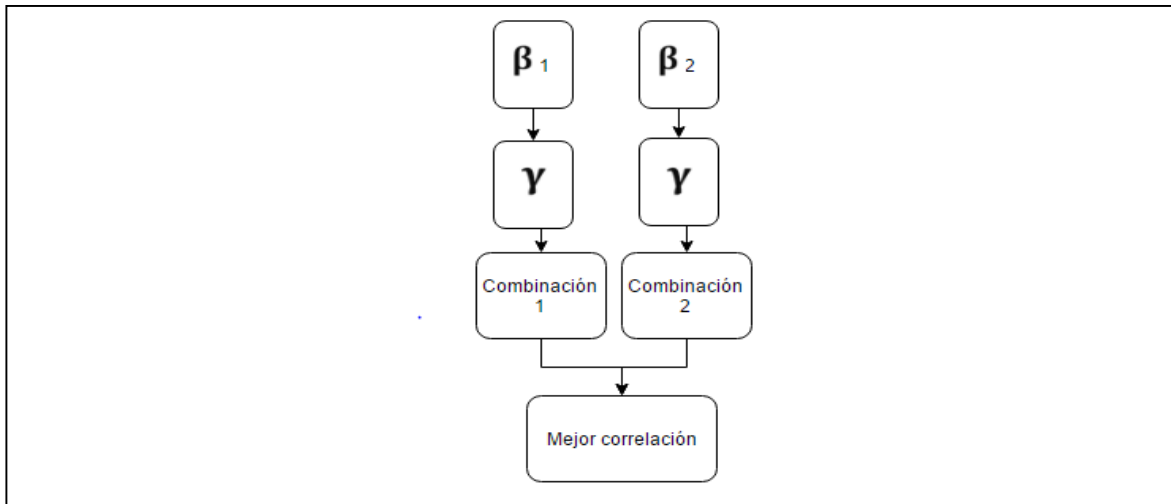
**Figura 24.** Constante  $\Theta$  para los experimentos de las técnicas desarrolladas





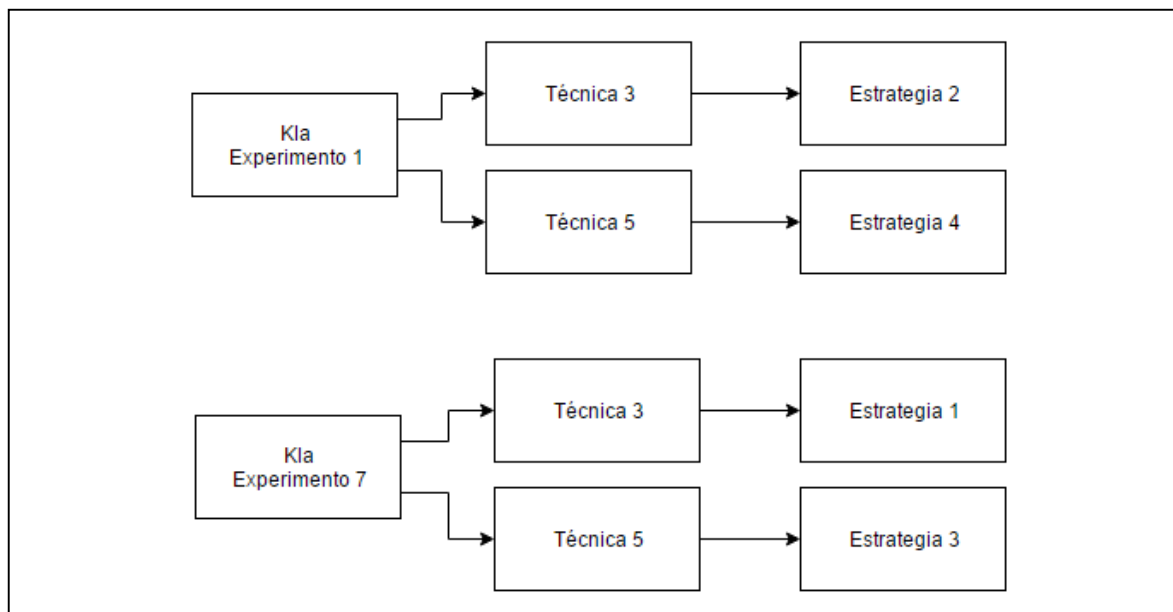
Debido a lo anterior, en la técnica 5, además de utilizar el método de linealización para la correlación de Cooper, se desestima el grupo 3 con valores de bajos, obteniéndose solo 2 combinaciones ( **Figura 25**). Según los valores de  $R^2$  de la **Tabla 15**, los coeficientes empíricos que mejor relacionan  $K_L a$  en términos de Potencia-Volumen y velocidad superficial, se obtienen a partir de la técnica 5 y se seleccionó la combinación 2 de coeficientes  $\beta$  y  $\gamma$  para estimar el coeficiente  $\theta$ .

**Figura 25.** Combinaciones de la técnica 5



**3.2.2. Estrategias para generar las condiciones de escalamiento.** A partir de los experimentos 1 y 7, se evaluaron las condiciones del escalamiento para el reactor de 100 litros, utilizando los coeficientes de Cooper estimados a partir de las técnicas 3 y 5, que como se había comentado anteriormente fueron las que tuvieron mejor correlación. Tal como se observa en la **Figura 26**, las condiciones de escalamiento de las estrategias 2 y 4, se estimaron respecto al experimento 1 del reactor de 7 litros, mientras que las condiciones de las estrategias 1 y 3 se estimaron respecto a las condiciones del experimento 7 del reactor de 7 litros.

**Figura 26.** Determinación de las estrategias de escalado



Las condiciones experimentales para cada estrategia de escalado se muestran en la **Tabla 16**. A partir de los  $K_{La}$  obtenidos experimentalmente, se realizó un análisis de coeficiente de varianza (CV) mostrado en la **Tabla 17**, para evaluar si el criterio de escalado se mantenía constante con el cambio de escala, que las mejores estrategias de escalado son las 3 y 4 porque presentan un CV inferior al 30%, el cual según Llamosa *et al*<sup>73</sup> se encuentra en este rango de varianza aceptable, es decir que el sistema es reproducible.

**Tabla 16.** Condiciones experimentales para las estrategias de escalamiento

Estrategia	Aireación 7 L (L min <sup>-1</sup> )	Agitación 7 L (rpm)	Aireación 100 L (L min <sup>-1</sup> )	Agitación 100 L (rpm)
1	13.5	514	209	205
2	13.5	310	318	140
3	13.5	514	150	170
4	13.5	310	68	180

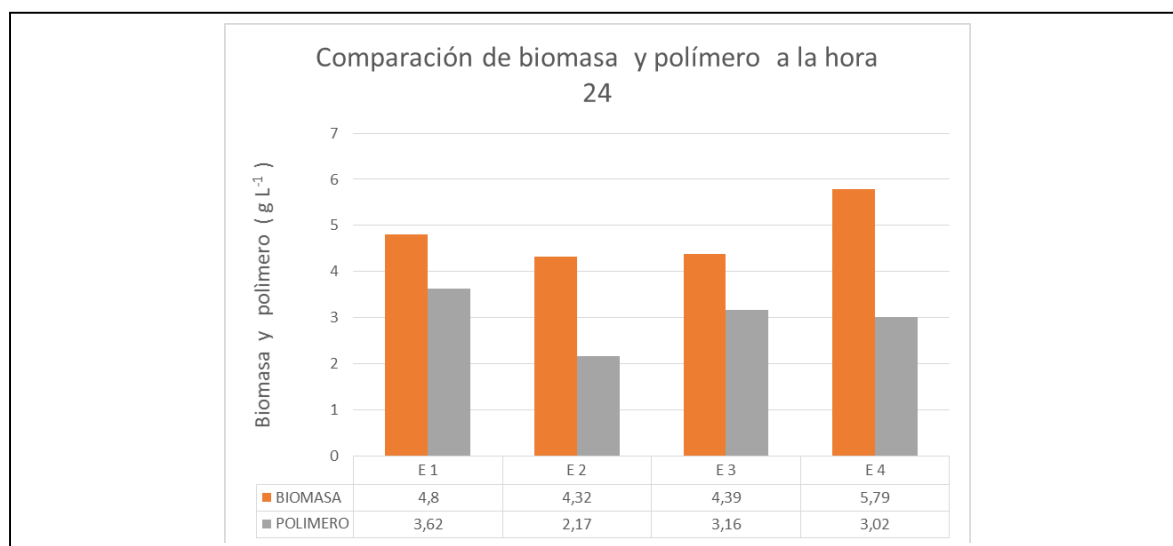
<sup>73</sup> LLAMOSA, Enrique. *et al.* Promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica NTC- ISO/IEC 17025. En: *Sci. Tech.* 2007.p. 458.

**Tabla 17.** Evaluación de las estrategias de escalamiento respecto a la desviación de los  $K_{L,a}$

Estrategia	$\overline{K_{L,a}}$		%CV
	Reactor 7 L	Reactor 100 L	
1	0,0074	0.0210	67.5
2	0,0120	0.0387	74.3
3	0,0074	0,0104	23.7
4	0,0120	0,0104	10.2

Por otro lado, se recopilaron los datos de concentración de biomasa y polímero obtenidos a la hora 24 para las 4 estrategias de escalado en la **Gráfica 8**. Se evidencia una disminución en la concentración tanto de biomasa como de polímero, cuyo fenómeno puede estar afectado por varios factores, entre los cuales Atkinson<sup>74</sup> comenta que en procesos bacterianos la temperatura es un factor importante que debe evaluarse en el cambio de escala, porque a pesar de que se realice un control de temperatura global, en consecuencia al aumento del flujo del aire se puede generar una disminución focalizada de la temperatura.

**Gráfica 8.** Concentraciones de biomasa y polímero de las 4 estrategias de escalado (reactor de 100 litros)

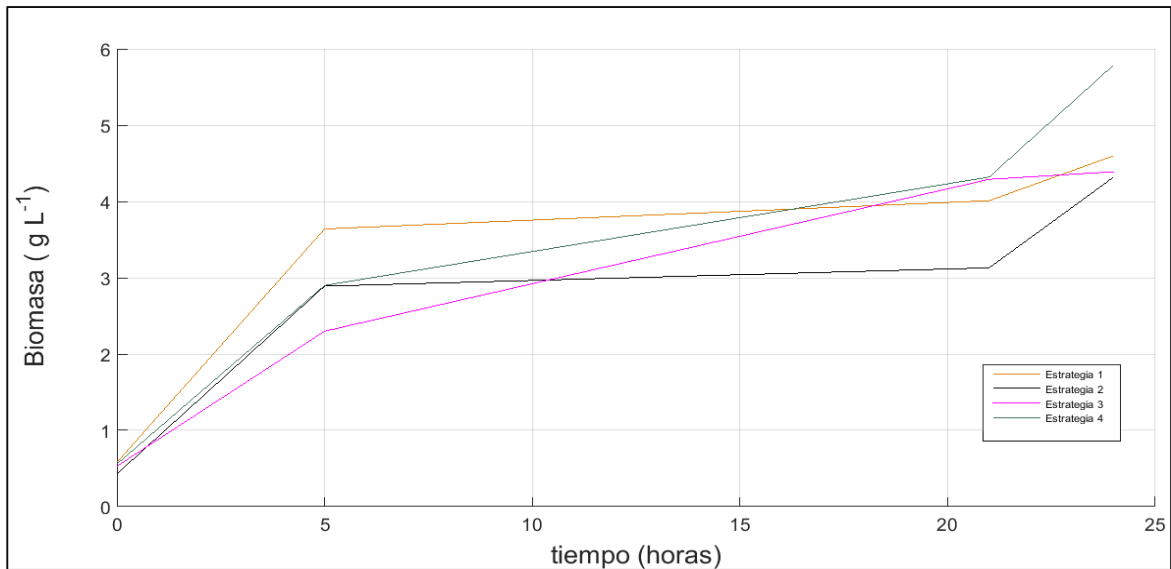


Es importante aclarar que se realizó también el seguimiento del cambio de las concentraciones de biomasa y polímero con respecto al tiempo de fermentación, con solo 4 horas de muestreo, porque el objetivo del trabajo, era comparar las productividades a la hora 24 que es donde se estaba realizando la medición del  $K_{L,a}$ .

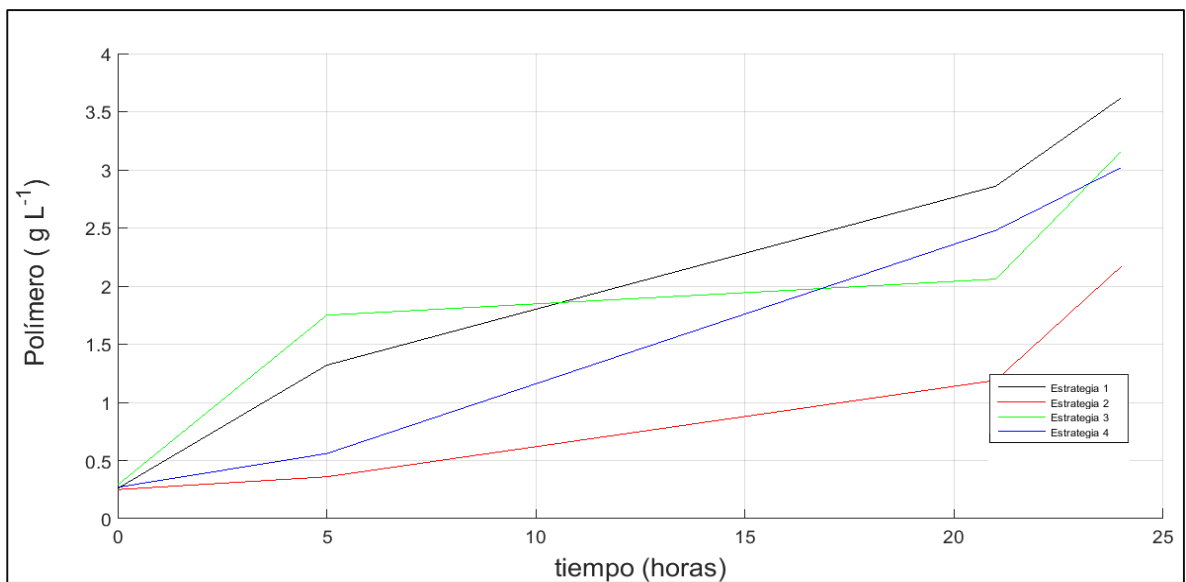
<sup>74</sup> ATKINSON, B. and MAVITUNA, F. Biochemical engineering and biotechnology handbook. Macmillan, 1983. ISBN 978033332740. P.287

El seguimiento para el reactor de 100 L se realizó con las condiciones para cada estrategia de escalado. La tasa de crecimiento (**Gráfica 9**) y acumulación (**Gráfica 10**) se ven afectadas por la condición de aireación y agitación. El crecimiento y la acumulación se ven favorecidos en estrategias con agitaciones altas (170 -205 rpm), comportamiento similar al presentado en la escala de 7 litros.

**Gráfica 9.** Concentraciones de biomasa en el reactor de 100 litros



**Gráfica 10.** Concentraciones de polímero en reactor de 100 litros



En cuanto al reactor de 2000 litros, existía una limitación operacional sobre el máximo flujo de aire que el compresor puede proporcionar, que correspondió a 320

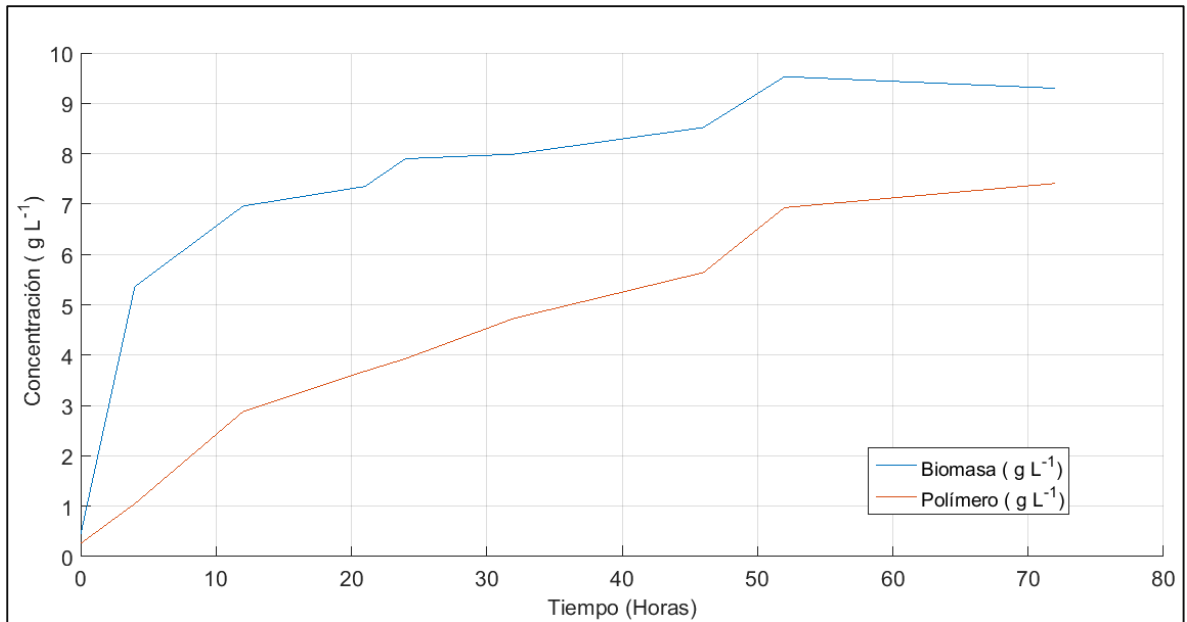
L min<sup>-1</sup>. Debido a que la estrategia 3 de escalado, obtenida a partir de la técnica 5, presenta un coeficiente de varianza aceptable y además cumple con las limitaciones, se selecciona para estimar las condiciones del reactor de 2000 litros que correspondieron a una agitación de 25 rpm y 311 L min<sup>-1</sup>, manteniendo el K<sub>L</sub>a constante del experimento 7 del reactor base.

Para la fermentación de 2000 litros no fue posible determinar el K<sub>L</sub>a debido que se presume que en la condición de 320 L min<sup>-1</sup> el microorganismo tenía la concentración de oxígeno limitante para realizar su proceso de respiración. Esto se evidenció porque durante toda la fermentación el porcentaje de oxígeno disuelto del medio, estuvo en 0%, lo que significa que cuando el oxígeno entraba en contacto con el medio ya encontraba disponible para consumir, y el microorganismo lo consumía de inmediato, es decir que la tasa de respiración fue igual a la tasa total de oxígeno, por lo tanto no hubo un diferencial de concentración con respecto al tiempo en la **Ecuación 5**. Además se deduce que el microorganismo tuvo la cantidad de oxígeno suficiente porque el pH tuvo un comportamiento decreciente durante las 72 horas de fermentación, encontrándose un rango de 6.8 y 7, factor que indica que se puede evidenciar que el microorganismo estuvo respirando durante esas horas de fermentación produciéndose ácido carbónico proveniente del dióxido de carbono generado por el microorganismo que según Cooper<sup>75</sup> le confiere acidez al medio. Si el microorganismo hubiese estado limitado por oxígeno, no se hubiera observado un decrecimiento en el pH, y se hubiese evidenciado un aumento en la concentración del oxígeno disuelto como consecuencia de la disminución de la población bacteriana. En la **Grafica 11** se muestran el crecimiento del microorganismo y su respectiva formación de polímero en el reactor de 2000 litros, con las condiciones de operación de 32 °C, pH de 7, aireación de 320 L min<sup>-1</sup> y agitación de 25 rpm. En esta gráfica se observa que bajo esta condición el microorganismo tiene su fase exponencial entre la hora 0 y 4 con una concentración de biomasa de 4.122 g L<sup>-1</sup> y alcanza su máxima concentración de biomasa en la hora 72 de 7.173 g L<sup>-1</sup>.

---

<sup>75</sup> COOPER, Paul. Carbon dioxide hits bacteria with bad acid. SSN: 1744-7933. p. 1

**Gráfica 11.**Concentraciones de biomasa y polímero en el reactor de 2000 L para 72 horas de fermentación



En la **Figura 27** se aprecia una pequeña muestra del polímero después de su respectivo proceso de tratamiento.

**Figura 27.**Polímero después del tratamiento



Para establecer que se cumplió con la evaluación del escalamiento se realizó una validación del modelo, determinando la repetibilidad entre las repeticiones de los experimentos a escala de 7 litros y 100 litros en la

**Tabla 18**, mientras que la reproducibilidad se entre el modelo por el cambio de escala en la **Tabla 19**.

**Tabla 18.** Repetibilidad de los experimentos 1 y 7 en el reactor de 7 litros

	$K_{L,a}$	$K_{L,a}$	$\overline{K_{L,a}}$	S	CV	% CV	
<b>EXP 1</b>	0.0124	0.0122	0.0115	0.0120	0.0005	0.0393	3.9
<b>EXP 7</b>	0.0074	0.0074	0.0075	0.0074	0.0001	0.0078	0.8

**Tabla 19.** Repetibilidad de los experimentos en el reactor de 100 litros

	$K_{L,a}$	$K_{L,a}$	$\overline{K_{L,a}}$	S	CV	% CV	
<b>1</b>	0.0188	0.0234	0.0209	0.0210	0.0023	0.1095	10.9
<b>2</b>	0.0376	0.0424	0.0362	0.0387	0.0033	0.0840	8.4
<b>3</b>	0.0098	0.0124	0.0091	0.0104	0.0017	0.1667	16.7
<b>4</b>	0.0099	0.0102	0.0111	0.0104	0.0006	0.0600	6.0

Como se observa en la **Tabla 18**, las mediciones de  $K_{L,a}$  tanto para el experimento 1 y 7 (los experimentos de mayores productividades) presentan una buena repetitividad debido a que tiene una varianza menor al 10%, esto se debe a la precisión del sensor utilizado durante las mediciones. Estas condiciones fueron seleccionadas por su productividad, las cuales fueron mayores para la escala de 7, como se muestra en la **Tabla 22**. Para el cambio de escala se evalúa la reproducibilidad del criterio de escalamiento la **Tabla 20**, donde el modelo es reproducible para las condiciones experimentales determinadas por las estrategias de escalamiento 3 y 4 porque se encuentran en el rango aceptable según Llamosa *et al.*<sup>76</sup> que es entre 10% al 30%.

**Tabla 20.** Reproducibilidad del modelo con el cambio de escala

$K_{L,a}$ R-7	$K_{L,a}$ R-100	$\overline{K_{L,a}}$	S	CV	%CV
0.0074	0.0210	0.0142	0.0096	0.6759	67.6
0.0120	0.0387	0.0254	0.0189	0.7439	74.4
0.0074	0.0104	0.0089	0.0021	0.2378	23.8
0.0120	0.0104	0.0112	0.0012	0.1028	10.3

<sup>76</sup> LLAMOSA, Enrique. *et al.* . Promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica NTC- ISO/IEC 17025. En: *Sci. Tech.* 2007.p. 458

Además, se realizó la validación por medio de la prueba t para medias de dos muestras emparejadas, con una distribución de datos normal, un diseño equilibrado para estimar la varianza de la diferencia entre las medias.

**Tabla 21.** Prueba t para medias entre dos muestras emparejadas, para cada estrategia del reactor 100 litros

	Estrategia 1		Estrategia 2		Estrategia 3		Estrategia 4	
	$K_{La}$ R-7	$K_{La}$ R-100	$K_{La}$ R-7	$K_{La}$ R-100	$K_{La}$ R-7	$K_{La}$ R-100	$K_{La}$ R-7	$K_{La}$ R-100
Media	0.0074	0.0210	0.0120	0.0387	0.0074	0.010	0.01203	0.00104
Varianza	$3.3 \times 10^{-9}$	$5.3 \times 10^{-6}$	$2.2 \times 10^{-7}$	$1.0 \times 10^{-5}$	$3.3 \times 10^{-9}$	$3.0 \times 10^{-6}$	$2.2 \times 10^{-7}$	$3.9 \times 10^{-7}$
Observaciones	3	3	3	3	3	3	3	3
Coefficiente de Pearson	-0.0501	---	0.5033	---	-0.0501	---	-0.9996	---
Diferencia hipotética de las medias	0	---	0	---	0	---	0	---
Grados de libertad	2	---	2	---	2	---	2	---
Estadístico t	-10.2127	---	-	---	-2.9230	---	2.5789	---
P(T<=t) una cola	0.0047	---	0.0022	---	0.0499	---	0.0615	---
Valor crítico de t (una cola)	2.9199	---	2.9119	---	2.9199	---	2.9199	---
P(T<=t) dos colas	0.0095	---	0.0043	---	0.0998	---	0.1232	---
Valor crítico de t (dos colas)	4.3026	---	4.3026	---	4.3026	---	4.3026	---

Como se observa en la **Tabla 21**, teniendo en cuenta que la hipótesis nula planteada fue que las mediciones de  $K_{La}$  en la escala de 7 litros son iguales respecto a las de 100 litros, por lo cual como las estrategias 1 y 2 presentan un valor P(T<=t) dos colas menor a la significancia  $\alpha = 0.05/2$ , la hipótesis nula es rechazada. Según lo anterior, se confirma que las estrategias 3 y 4 presentan mejor distribución normal y por tanto menores desviaciones en las mediciones, considerándose aceptada la hipótesis nula para estos casos.

Por último, como se puede observar en la **Tabla 22**, las condiciones hidrodinámicas del sistema y la escala de evaluación, tienen un efecto en la tasa de crecimiento del microorganismo. Para los experimentos 1 y 7 se evidencia que las condiciones



hidrodinámicas del sistema no tienen una influencia significativa en esta variable de respuesta. Sin embargo, el cambio de escala presenta una disminución en la tasa de crecimiento, que puede estar asociada a diferentes factores como, por ejemplo, la temperatura que deben evaluarse posteriormente.

**Tabla 22.** Productividades de los experimentos en las diferentes escalas

Exp./ Est.	Productividad 7 L		Productividad 100 L		Productividad 2000 L	
	Biomasa (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PHA (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Biomasa (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PHA (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Biomasa (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PHA (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
1	0.50	0.36	0.20	0.15	0.33	0.16
2	0.29	0.08	0.24	0.13	---	---
3	0.31	0.15	0.18	0.13	---	---
4	0.39	0.04	0.18	0.09	---	---
5	0.20	0.09	---	---	---	---
6	0.47	0.40	---	---	---	---
7	0.48	0.25	---	---	---	---
8	0.22	0.10	---	---	---	---
9	0.54	0.17	---	---	---	---

En el caso del reactor de 2000 L, a pesar de que no se pudo obtener un valor de  $K_{L,a}$ , se observó la tasa de crecimiento es similar con respecto al reactor base, por tanto, las condiciones con las que se realizó el escalado fueron favorables.

**Tabla 23.** Tasa de crecimiento  $\mu$  (h<sup>-1</sup>)

Exp./Est.	Reactor de 7 L	Reactor de 100 L	Reactor de 2000 L
1	0.42	0.18	0.31
2	0.24	0.16	---
3	0.30	0.16	---
4	0.35	0.22	---
5	0.17	---	---
6	0.39	---	---
7	0.41	---	---
8	0.18	---	---
9	0.50	---	---

#### 4. CONCLUSIONES

- A partir de la evaluación hidrodinámica del sistema, con el diseño de experimentos central compuesto, se estableció que la agitación tiene un efecto inverso en el  $K_{L,a}$  y que en la condición de aireación de  $13.5 \text{ L min}^{-1}$  independientemente de la condición de agitación, se presentan las mayores concentraciones de biomasa, polímero. Además la condición experimental seleccionada para el proceso de escalado fue de  $K_{L,a} = 0.073 \text{ s}^{-1}$ , es la misma en la que se presentó un buen crecimiento bacteriano y una buena acumulación, siendo de  $514.8 \text{ rpm}$  y  $13.5 \text{ L min}^{-1}$ .
- Se estableció como criterio de escalamiento el  $K_{L,a} = 0.073 \text{ s}^{-1}$  obtenido en la escala de 7 litros. La determinación de los coeficientes empíricos de Cooper por la linealización corregida (Técnica 5), fue satisfactorio, pues el modelo presentó un coeficiente de determinación de 0.99, mostrando buena predicción de la relación del  $K_{L,a}$  con la velocidad superficial y el factor  $PV^{-1}$ .
- La validación del modelo empírico se realizó por repetibilidad encontrándose un CV menor al 20% en todas las experimentaciones del reactor de 7 litros y 100 litros. En cuanto a la reproducibilidad de las mediciones de  $K_{L,a}$  de los experimentos del reactor de 7 litros respecto a los experimentos del reactor de 100 litros, se encontró que solamente las estrategias 3 y 4 presentan valores dentro de los límites de aceptabilidad del CV, menores al 30 %.
- A pesar de que no fue posible medir el  $K_{L,a}$  y que el porcentaje de oxígeno se mantuvo en cero en el reactor de 2000 litros bajo la condición de operación de  $320 \text{ L/min}^{-1}$  y  $25 \text{ rpm}$ , se evidenció que el microorganismo creció durante las 72 horas de fermentación. Esto debido a que su actividad metabólica se mantuvo activa, porque se evidenció un decrecimiento en el pH, debido al ácido carbónico producido por la reacción del  $\text{CO}_2$  con el agua.

## 5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de otras variables que afectan la productividad de la fermentación por el cambio de escala, debido a que a pesar de mantener constante el coeficiente de transferencia de masa, la temperatura, el pH y la composición del medio, no fue posible mantener la misma productividad al cambiar la escala.
- Hacer el balance estequiométrico para validar si bajo la condición de aire encontrada en donde el porcentaje de oxígeno es 0% realmente sea la concentración mínima de oxígeno que requiere el microorganismo para respirar
- Realizar el estudio de la ruta metabólica de la bacteria *Burkholderia cepacia* B27 para explicar más a fondo el proceso biológico de la bacteria a determinadas condiciones de estrés.
- Se recomienda a partir del estudio de la ruta metabólica se podría evaluar que otras reacciones se llevan a cabo en el proceso y así saber la composición química del sobrenadante al aplicar el método gravimétrico.
- Hacer un seguimiento del cambio de concentración de polímero y de biomasa de manera más rigurosa, con el fin de tener una vista más amplia de las cinéticas en las demás escalas.

## BIBLIOGRAFIA

ATKINSON,B. and MAVITUNA,F. Biochemical engineering and biotechnology handbook. Macmillan, 1983. ISBN 9780333332740.p. 1271

ANDLER, Rodrigo y DÍAZ, Álvaro. Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. En: INGENERARE 27. 2013. p. 29-36.

ARNÁIZ , Carmen.ISAC, Laura y LEBRATO, Julián. Determinación de biomasa en procesos biológicos. En: Tecnología del agua. 2000.vol. 205. p.45-52.

BAEZ,Antonino and SHILOACH,Joseph. Effect of elevated oxygen concentration on bacteria, yeasts, and cells propagated for production of biological compounds. En: Microbial cell factories. vol. 13, no. 1, p. 181-188.

BECERRA, Mónica. Producción de un polímero tipo polihidroxicanoato (PHA) empleando residuos de la producción de biodiesel.Tesis de maestría Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia.2013.p. 128.

BUGNICOURT, E. CINELLI, P. LAZZERI, A. and ALVAREZ, V. Polyhydroxyalkanoates (PHA): Review of Synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. En: Express polymer letters. Febrero, 2014.vol. 8, no. 11, p. 791-808.

Douglas, A. and Donald, M. Introducción a la química analítica. Segunda Edición. Barcelona: Reverté, 1986. ISBN: 84-291-7511-3.p. 76-98.

DORAN Pauline. Bioprocess engineering principles.2 ed.Oxford;Academic Press, 2012. ISBN 978-0-12-220851-5. p.903.

DUARTE, Alberto. Introducción a la ingeniería bioquímica. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.1995. p.417.

DURANGO Patricia. Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo *Saccharomyces* spp. A nivel laboratorio. Tesis de pregrado, Medellín. Universidad EAFIT. 2007.p.136.

FERNÁNDEZ,Diego. Escalamiento de la fermentación con *Ralstonia eutropha* para la producción de polihidroxibutirato (PHB) basado en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $K_L a$ .Informe técnico. Bogotá. Instituto de Biotecnología .2007.p.47.

FINN,R. K. Agitation-aeration in the laboratory and in industry. En: BACTERIOLOGICAL REVIEWS. Diciembre.vol. 18, no. 4, p. 254-274.

FLORES, Elías. PÉREZ, Fermín and DE LA TORRE, Mayra. Scale-up of Bacillus thuringiensis fermentation based on oxygen transfer. En: Journal of fermentation and bioengineering. 1997. Vol. 83, no. 6, p. 561-564.

FLOREZ, D. SUAREZ,Zulma. MERCHÁN, Nuri. PEÑA, Luis. OLMOS, Liliana and MORENO, Nubia. Mutagenesis studies for enhancement of PHA production by Burkholderia cepacia 2G57, isolated from colombian soils. En: International Symposium on Biopolymers Santos-Brazil.2014.

GARCÍA, Félix and GÓMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En: Biotechnology Advances. 12/11/2008. p. 153-176.

CARO, Ainhoa. BIODESULFURACIÓN DE FRACCIONES PETROLÍFERAS: TRATAMIENTO DE DIBENZOTIOFENO EN DISTINTAS CONDICIONES DE OPERACIÓN. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. 2006, p.157.

GIIN-YU, Amy Than. CHIA-LUNG, Chain. LING, Li. LIYA, Ge. LIN, Wang. INDAH, Nigtyas. YANHONG, Li. LEI, Zhao. YU, Mo and JING-YUAN, Wang. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. En : MDPI-Polymer. Marzo, 2014. vol. 6, no.3, p 709-831.

GONZALEZ ,Roberto. Principios Básicos De Escalado. Cuba.: Universidad de Matanzas, 2000.

GUZMÁN, Didier y BERMÚDEZ, Mónica. Modelamiento de la transferencia de oxígeno para el cultivo de microorganismos en un biorreactor de columna de burbujeo. Tesis de pregrado, Manizales. Universidad Nacional de Colombia.2013.p.131.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogotá: El instituto, 2008. p.110 .

\_\_\_\_\_. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá: El instituto, 2008. p. 45.

\_\_\_\_\_. Referencias documentales para fuentes de informaciones electrónicas. NTC 4490. Bogotá: El instituto, 1998.p.33.

KHANNA, Shilpi and SRIVASTAVA, Ashok. A simple structured mathematical model for biopolymer (P3HB) production. En: *Biotechnology progress*. 2005. vol. 21, no. 3, p. 830-838.

LLAMOSA, Enrique.MEZA, Luis y BOTERO, Marcela. Promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica NTC- ISO/IEC 17025. En: *Sci. Tech*. 2007.p. 455-460.

LEE, Sang Yu. Plastic bacteria? Progress and prospects for Polyhydroxyalkanoates production of bacteria. En : *Trends in biotechnology*. Korea.1996 .Vol. 14, No. 11 . p. 431-438.

VERLINDEN, R.A.J. HILL, DJ.KENWARD, MA. WILLIAMS, CD and RADECKA, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. En: *Applied microbiology*,2007.vol.102, p.1437-1449.

MCCABE, W. SMITH, J. and HARRIOT, P. Operaciones unitarias en ingeniería química. Cuarta edición Editorial : McGraw-Hill, Inc. ISBN 84-481-1918-5. 1998.p. 1114.

MENDEZ,Daniel. Modelamiento matemático y optimización del proceso de producción de polihidroxicanoatos empleando la bacteria *Burkholderia cepacia* B27 a partir de ácidos grasos. Tesis de Maestría. Bogotá. Universidad Nacional.2016.p. 135.

MENDEZ, Daniel. CABEZA, Iván. MORENO, Nubia and RIASCOS, Carlos. Mathematical modelling and scale-up of batch fermentation with *Burkholderia cepacia* B27 using vegetal oil as carbon source to produce polyhydroxyalkanoates. En: *Chemical engineering transactions*.vol 49,2016, p. 277-282

PERRY. Manual del Ingeniero Químico. Sexta edición.México, D.F: McGraw-Hill Interamericana, 1992.vol 2. ISBN 97-010-0013-7.p.1285.


PRIYADHARSHINI,Dayana and BAKTHAVATSALAM, A.K.Optimization of phenol degradation by the microalga *Chorella pyrenoidosa* using Plackett- Burman Design and Response surface methodology. En: *Bioresource Technology*. 2017.vol.207. p. 150-156.

QUINTERO ,Rodolfo. "Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones". Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Editorial Alhambra Mexicana S.A., México 13 D.F., 1981. p.332.

RUÍZ Angela. Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante. Tesis doctoral, Medellín. Universidad Nacional de Colombia. 2009. p.175.

SANTOS, Danyelle. BRANDAO Yana. RUFINO, Raquel. LUNA, Juliana, SALGUEIRO Alexandra, SANTOS, Valdemir and SARUBBO Leonie. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. En: Biocatalysis and agriculture biotechnology. Febrero.2014.vol. 3.p. 48-57.

TORRES, Ana. QUITERO, Díaz y ATEHORTÚA, Lucía. Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno en microorganismos incluyendo el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno. En: Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquía. 2008.vol 43.p. 33-41.

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

## AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES


Nosotros, Kathy Stephanie Ardila Arévalo y Andrés Camilo Viloria García en calidad de titulares de la obra Evaluación del escalamiento de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA), por fermentación a partir de la cepa mutante Burkholderia cepacia B27, a nivel semi industrial elaborada en el año 2016 , autorizamos al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que nos corresponden y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).




Al respecto como Autores manifestamos conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autor(es) establezco (establecemos) las siguientes condiciones de uso de mí (nuestra) obra de acuerdo con la **licencia Creative Commons** que se señala a continuación:



	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	<input checked="" type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	<input type="checkbox"/>

Licencias completas: [http://co.creativecommons.org/?page\\_id=13](http://co.creativecommons.org/?page_id=13)

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a su(s) autor(es).

De igual forma como autor (es) autorizo (amos) la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:

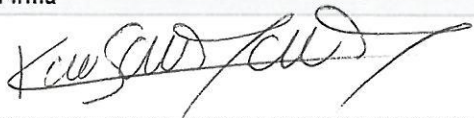
AUTORIZO (AUTORIZAMOS)	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD-ROM y/o Impreso	X	
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación		X

Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicaré (indicaremos), en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO
		X

Para constancia se firma el presente documento en (la ciudad), a los 18 días del mes de mayo del año 2017

EL(LOS) AUTOR(ES):

Autor 1

<b>Nombres</b>	<b>Apellidos</b>
Kathy Stephanie	Ardila Arévalo
<b>Documento de identificación No</b>	<b>Firma</b>
1019102973 de Bogotá	

Autor 2

<b>Nombres</b>	<b>Apellidos</b>
Andrés Camilo	Viloria García
<b>Documento de identificación No</b>	<b>Firma</b>
1019104109 de Bogotá	