

EVALUACIÓN DEL ESCALAMIENTO Y LA OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO A
PARTIR DE LA CEPA MUTADA *BURKHOLDERIA CEPACIA B27*.

LAURA XIMENA CORTÉS SÁNCHEZ
MARÍA PAULA GAYÓN CHAPARRO

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2020

EVALUACIÓN DEL ESCALAMIENTO Y LA OBTENCIÓN DE
POLIHIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE LA CEPA MUTADA *BURKHOLDERIA*
CEPACIA B27.

LAURA XIMENA CORTÉS SÁNCHEZ
MARÍA PAULA GAYÓN CHAPARRO

Proyecto integral de grado para optar el título de
INGENIERO QUÍMICO

Directora
NUBIA CARMENZA MORENO SARMIENTO
Ingeniera Química

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2020

NOTA DE ACEPTACIÓN

Ing. Nubia Liliana Becerra Ospina

Ing. Jaime Eduardo Arturo Calvache

BOGOTÁ D.C, febrero de 2020

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. MARIO POSADA GARCÍA- PEÑA

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA PEÑA

Vicerrectora Académica y de Postgrados (E)

Dra. ALEXANDRA MEJÍA GUZMÁN

Secretaria General

Dra. ALEXANDRA MEJÍA GUZMÁN

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ

Las directivas de la Fundación 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.

DEDICATORIAS

Este proyecto se lo dedico a Dios que siempre me acompaña y gracias a Él he llegado a donde estoy hoy en día.

También le dedico este logro a mis padres, a mi mamá por ser esa mujer incondicional, que siempre me apoya y da ánimos en las adversidades, a mi papá por estar pendiente de mí, siempre preguntando como estaba y como me estaba yendo. También este logro va dedicado a mi hermana mayor Lizeth por ser mi ejemplo a seguir, por ayudarme en cualquier dificultad y ser esa persona incondicional en mi vida que siempre me ayuda a ser mejor. También a mi hermana menor Ángela, por estar conmigo en todo momento.

Por otro lado, les agradezco a mis amigos que fueron parte de todo este camino de aprendizaje y superación, también por regalarme momentos de sonrisas y diversión en momentos difíciles.

Por último, pero no menos importante a mi compañera de tesis Paula Gayón, por siempre darme ánimos para seguir con el proyecto, porque además es una amiga incondicional y llena de cosas maravillosas. Gracias amiga, este triunfo es de las dos.

LAURA CORTÉS.

DEDICATORIA

A mi Mamá, que ha sido la persona más importante en mi vida y en este proceso académico, gracias por siempre estar ahí apoyándome con todo lo que me he propuesto y ayudándome a lograrlo, gracias por ese amor incondicional que me ha dado la fuerza para salir adelante, por ella es que he llegado hasta donde estoy y no puedo estar más agradecida y orgullosa de la mujer que es y la mujer que ha hecho de mí y de mi hermanita Angélica, quien desde que supe de su llegada fui muy feliz, espero ser un ejemplo a seguir para ella y se convierta en una gran mujer. Te amo mami y a ti también bebé.

A mi Papá, por el amor y confianza que me ha dado siempre, a mis tías Carmenza y Lola por su apoyo incondicional, a Lele porque me ha dado todo el amor del mundo y toda mi familia que ha estado pendiente de mí y apoyándome de igual manera durante toda mi vida y especialmente durante mi etapa universitaria. Estoy infinitamente agradecida por tenerlos en mi vida, por siempre darme consejos que hacen de mí una mejor persona y me siento muy feliz de tenerlos conmigo y por poder compartir este nuevo logro con ustedes. Los amo.

A mis amigos, a todos, por siempre estar ahí acompañándome en cada etapa de mi vida, muchas gracias por todos los momentos vividos, buenos o malos, espero tenerlos siempre en mi vida. Los quiero mucho.

A mi compañera de tesis y mi amiga Laura, porque siempre estuvo apoyándome durante este proceso que no fue nada fácil, me siento orgullosa de lo que hemos logrado. Te quiero amiga

María Paula Gayón Chaparro.

AGRADECIMIENTOS

Le agradecemos a nuestras familias por darnos la oportunidad de realizar y culminar nuestros estudios, por el apoyo brindado durante estos años de esfuerzo. Nos sentimos felices de poder compartir este logro junto a ellos.

Le agradecemos a la universidad de América y nuestros profesores, quienes fueron nuestros guías y los cuales nos brindaron los conocimientos necesarios para culminar esta etapa y convertirnos en los profesionales que ahora somos.

Al Instituto de Biotecnología y Bioprospección de la Universidad Nacional (IBUN) y la Ingeniera Nubia Moreno quienes nos abrieron sus puertas para llevar a cabo este proyecto y darnos la oportunidad de tener una experiencia enriquecedora.

Sin duda le agradecemos a la ingeniera Jeimy Macias y al ingeniero Sebastián Parra por el apoyo incondicional a lo largo del proyecto y quienes estuvieron estuvieron siempre dispuestos a compartir sus conocimientos.

CONTENIDO

RESUMEN	pág 19
INTRODUCCIÓN	20
OBJETIVOS	22
1. GENERALIDADES	23
1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS	23
1.1.1 Polihidroxibutirato (PHB).	25
1.2 BURHOLDERIA CEPACIA	26
1.2.1 Burkholderia Cepacia B27.	27
1.3 BALANCE DE MATERIA	30
1.3.1 Balance de materia en biorreactor.	31
1.4 CONTEO BACTERIANO	31
1.5 FERMENTACIÓN MICROBIANA	32
1.6 REGÍMENES OPERACIONALES DE LAS FERMENTACIONES	33
1.6.2 Fermentación fed-batch o lote alimentado.	33
1.7 ESCALAMIENTO	34
1.7.1 Niveles de Escalado.	35
1.7.1.1 Escala Laboratorio.	35
1.7.1.2 Escala Banco.	35
1.7.1.3 Escala piloto.	36
1.7.1.4 Escala semi industrial	36
1.7.1.5 Escala Industrial.	36
1.7.2 Parámetros.	37
1.7.2.1 Fenomenología de la Fermentación.	38
1.7.3 Transferencia de oxígeno en microorganismos	39
1.7.4 Coeficiente volumétrico de transferencia de masa	40
2. METODOLOGÍA	46
2.1 FERMENTACIÓN EN EL REACTOR DE 7 LITROS	46
2.1.1 Inoculación en el reactor de 7 litros.	48
2.1.2 Adición de pulsos a la fermentación.	49
2.1.3 Cuantificación de unidades formadores de colonias (UFC).	49
2.1.4 Cuantificación de biomasa y PHB presente en muestras de fermentación	50
2.2 ESCALAMIENTO	51
2.2.1 Determinación del coeficiente de transferencia de masa (K _{la}).	51
2.2.2 Determinación de condiciones de escalamiento.	53
2.3 FERMENTACIÓN EN EL REACTOR DE 100 LITROS	55

2.4 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PHB EN LAS FERMENTACIONES	56
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	59
3.1 BALANCE DE MASA	59
3.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO <i>BURKHOLDERIA CEPACIA B27</i>	61
3.3 CONDICIONES DE OPERACIÓN	64
3.4 EVALUACIÓN CONDICIONES	64
3.4.1 Primera Condición.	64
3.4.2 Segunda Condición.	67
3.4.3 Tercera Condición.	68
3.4.4 Cuarta Condición.	70
3.4.5 Comparación Condiciones.	72
3.5 ESCALAMIENTO	77
3.5.1 Determinación de condiciones de escalamiento.	78
3.6 VALIDACIÓN DE ESTRATEGIA DE ESCALAMIENTO	79
4. CONCLUSIONES	87
5. RECOMENDACIONES	88
BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXOS	93

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura química de PHA.	23
Figura 2. Ruta metabólica de producción de PHB a partir de la reducción del Acetil-coA.	26
Figura 3. Ilustración del balance de materia en un biorreactor.	31
Figura 4. Principio de un sustrato alimentado por lotes limitado con una fase inicial de lotes.	34
Figura 5. Resistencias a la transferencia de oxígeno de la burbuja de aire a la célula.	40
Figura 6. Método dinámica eliminación de gas a) suspensión de aireación y b) reanudación aireación.	42
Figura 7. Pendiente K_{La} .	43
Figura 8. Tren de inóculo reactor 7 litros.	49
Figura 9. Concentración crítica de oxígeno disuelto.	52
Figura 10. Tren de inóculo reactor 100 litros.	55
Figura 11. Representación gráfica del Balance de materia.	59
Figura 12. Representación gráfica del Balance de materia.	60

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Sustituciones del grupo radical.	24
Tabla 2. Principales nutrientes que al limitarse da lugar a la obtención de PHA en diferentes microorganismos.	24
Tabla 3. Cuadro comparativo del potencial de producción de la cepa <i>Burkholderia Cepacia B27</i> frente a otros trabajos realizados en el IBUN y externos.	28
Tabla 4. Correlaciones para la estimación del K_{La}	44
Tabla 5. Condiciones de operación en el reactor de 7 litros.	46
Tabla 6. Preparación medio LB.	47
Tabla 7. Preparación medio PHA.	47
Tabla 8. Preparación Micronutrientes.	48
Tabla 9. Tabla coeficientes Correlación de Cooper.	53
Tabla 10. Condiciones de operación en el reactor de 100 litros.	56
Tabla 11. Resultados de balance de masa para cada componente.	60
Tabla 12. Tasa de crecimiento (μ) fermentaciones reactor de 7 litros.	75
Tabla 13. Resultados determinación de K_{La} .	78
Tabla 14. Condiciones de operación en el reactor de 100 litros.	78
Tabla 15. Análisis de varianza de la biomasa reactores 7 y 100 litros.	82
Tabla 16. Análisis de varianza del PHB en reactores de 7 y 100 litros.	84
Tabla 17. Tasa de crecimiento (μ) reactores 7 y 100 litros.	84

LISTA DE GRAFICAS

	pág.
Gráfica 1. Concentración crítica de oxígeno disuelto.	52
Gráfica 2. Determinación de K_{La} .	53
Gráfica 3. Cinética de crecimiento Burkholderia Cepacia B27 a escala de 7L.	61
Gráfica 4. Cinética de producción de biomasa en fermentación por lotes.	62
Gráfica 5. Cinética de producción de PHB en fermentación por lotes.	63
Gráfica 6. Cinética de producción de Biomasa de la primera fermentación.	65
Gráfica 7. Cinética de producción de PHB de la primera fermentación.	66
Gráfica 8. Cinética de producción de Biomasa de la segunda fermentación.	67
Gráfica 9. Cinética de producción de PHB de la segunda fermentación.	68
Gráfica 10. Cinética de producción de Biomasa de la tercera fermentación.	69
Gráfica 11. Cinética de producción de PHB de la tercera fermentación.	70
Gráfica 12. Cinética de producción de Biomasa de la cuarta fermentación.	71
Gráfica 13. Cinética de producción de PHB de la cuarta fermentación.	72
Gráfica 14. Comparación de cinética de crecimiento de biomasa.	73
Gráfica 15. Comparación de cinéticas de producción de PHB.	74
Gráfica 16. Comparación Teórica vs Experimental de Biomasa.	76
Gráfica 17. Comparación teórica vs experimental de PHB.	77
Gráfica 18. Cinética de producción de biomasa reactor 100L.	79
Gráfica 19. Cinética de producción de PHB.Fuente: elaboración propia.	80
Gráfica 20. Comparaciones cinéticas de crecimiento Biomasa.	81
Gráfica 21. Comparaciones cinéticas de producción de PHB.	83
Gráfica 22. Superficie respuesta de reactor de 7 litros.	85
Gráfica 23. Superficie respuesta de reactor de 100 litros.	85

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Morfología macroscópica Burkholderia Cepacia B27.	pág. 29
Imagen 2. Morfología Burkholderia Cepacia B27.	30
Imagen 3. Colonias crecidas en la caja de Petri.	50
Imagen 4. Condiciones operación motor reactor 100 litros.	54
Imagen 5. Polímero seco después de ser centrifugado.	57
Imagen 6. Polvo uniforme antes de ser purificado.	57
Imagen 7. PHB puro antes de secarse en el horno.	58

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Ecuaciones y matriz gaussiana para la determinación de coeficientes del balance de masa.	94
Anexo B. Resultados de cinéticas de crecimiento, biomasa y phb en fermentación por lotes.	97
Anexo C. Resultados de cinéticas de biomasa y phb fermentaciones por lote alimentado.	99
Anexo D. Determinación de criterios para escalamiento.	109
Anexo E. Resultados de cinéticas de biomasa y phb en reactor de 100 litros.	119
Anexo F. Análisis de varianza entre fermentación 2 vs fermentación 1,3 y 4 en reactor de 7 litros.	120

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
LB	Luria Bertani
N_i	Número de impulsores
OD	Oxígeno disuelto
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
SDS	Dodecilsulfato sódico
UFC	Unidades formadoras de colonias
θ, β, γ	Coefficientes empíricos de la correlación de Cooper
K, α, K_1, K_2	Constantes de correlaciones
ϕ	Gas hold up

SÍMBOLOS

Símbolo	Término	Unidad
A	Área transversal de flujo de aire	m^2
C_L	Concentración de oxígeno en el líquido	mmol/L
C^*	Concentración de oxígeno en saturación	mmol/L
$\frac{dC_L}{dt}$	Cambio en la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo	$\frac{mmol/L}{s}$
D_i	Diámetro impulsor	m
H	Altura del líquido	m
K_{La}	Coefficiente de transferencia de masa	s^{-1}
N	Agitación	rpm
P_g	Potencia gaseada	W
Q	Caudal	m^3/s
q_o	Tasa específica de consumo de oxígeno	mmol/s
T	Diámetro del tanque	m
V_s	Velocidad de aireación superficial	m/s
X	Biomasa	g/L
$Y \frac{x+p}{sc}$		g/g

μ

Rendimiento biomasa
producto por fuente de
carbono
Velocidad específica de
crecimiento

1/h

GLOSARIO

AGAR: sustancia de consistencia gelatinosa que se utiliza para preparar medios de cultivo en los que se estudia y cultiva microorganismos.

BIORREACTOR: recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos.

FUENTE DE CARBONO: se refiere a la fuente del carbono usada por el organismo para su crecimiento y desarrollo. Un organismo se denomina heterótrofo si usa compuestos orgánicos procedente de otros organismos y autótrofo si su fuente del carbono es el dióxido de carbono (CO₂).

INOCULACIÓN: introducción de microorganismos vivos, muertos o atenuados, en un organismo de forma accidental o voluntaria.

INÓCULO: suspensión de microorganismos que se transfieren a un ser vivo o a un medio de cultivo a través de la inoculación.

MATERIALES POLIMERICOS: estos materiales están constituidos por macromoléculas., están formados (en su mayor parte) por átomos de elementos no metálicos unidos entre sí por enlaces covalentes y se las ha denominado con el nombre genérico de polímeros ya que son gigantescas moléculas constituidas por unidades repetitivas.

MEDIO DE CULTIVO: se constituye en el aporte de nutrientes indispensable para el crecimiento de los microorganismos. La composición precisa dependerá de la especie que se quiera cultivar.

MORFOLOGÍA: formar de las bacterias al microscopio, que está determinada por la rigidez de su pared celular. Se diferencia en cocos, bacilos y espirilos.

TASA DE CRECIMIENTO BACTERIANO: se entiende por crecimiento microbiano al aumento del número de microorganismos a lo largo de tiempo. Por tanto, se refiere al crecimiento de un único microorganismo. El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división.

RESUMEN

El presente trabajo de grado se realizó con base a lo previamente trabajado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN), en la producción de biopolímeros a partir de la cepa mutada *Burkholderia Cepacia B27* con el fin de realizar un escalamiento de dicho proceso desde un biorreactor de 7 litros a un reactor de 100 litros con adición de un pulso de fuente de carbono para maximizar la producción de polihidroxibutirato (PHB).

Lo primero que se realizó fue un balance de materia para conocer la cantidad de fuente de carbono, en este caso aceite vegetal, el cual se ingresará al medio con el fin de prolongar la fase exponencial y así aumentar el crecimiento celular y la acumulación del polímero.

Posteriormente se procedió a evaluar la estrategia de lote alimentado en las diferentes fermentaciones, para este fin se añadió un pulso de aceite vegetal durante la fase exponencial de la cinética de crecimiento de la cepa. Finalizando esta etapa se escogió la condición donde se obtuvo la mayor cantidad de polímero acumulado en las células la cual fue la estrategia número dos, con un pulso de 44.091g/L a la hora 22.

Después de haber obtenido la mejor estrategia para el escalamiento se calculó el coeficiente de transferencia de masa (K_{La}) y a partir de este se obtuvieron las condiciones de agitación y aireación las cuales fueron 191 rpm y 22.11 L/min respectivamente, estas se evaluaron en la escala de 100 litros.

Finalmente, con el escalamiento realizado en el reactor de 100 litros, se procede a purificar el material obtenido de las diferentes fermentaciones con el fin de validar la estrategia de escalamiento por medio de la producción final, obteniendo así una producción de 3,265g/L y 4,51g/L en el biorreactor de 7 litros y en el reactor de 100 litros respectivamente.

Palabras clave: Fermentación, escalamiento, *Burkholderia Cepacia B27*, lote alimentado, polihidroxibutirato.

INTRODUCCIÓN

El plástico es un material con una gran demanda debido a la versatilidad que puede presentar su uso. Gracias a sus características y propiedades como elasticidad, flexibilidad, capacidad para no oxidarse, impermeabilidad y baja conductividad térmica y eléctrica es empleado en la mayoría de las industrias.

Sin embargo, se desechan aproximadamente 8 millones de toneladas de este material en los océanos cada año, estos desechos plásticos tardan en descomponerse miles de años lo que causa acumulación en el ecosistema marino.

Por lo tanto, se ha trabajado en la producción de polímeros biodegradables a partir de microorganismos, hasta el momento se han identificado aproximadamente 300 especies bacterianas productoras de este tipo de polímero, aunque en la industria de los biopolímeros solo se utilizan unas pocas debido a que no todas tienen la misma eficiencia en la transformación de los sustratos y concentración final del polímero en sus células. Entre las bacterias más utilizadas en la industria se encuentran *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas putida*, *Azotobacter vinelandii* (Gram negativas) y del género *Bacillus*, incluyendo *B. Megaterium* y *B. Cereus*, también del género *Streptomyces*.¹

Entre dichos biopolímeros se encuentran los polihidroxialcanoatos (PHA's), lo cuales son un sustituto adecuado ya que al mezclarse con aditivos es posible conseguir propiedades mecánicas similares a los plásticos convencionales, por otra parte, al ser un material biodegradable se evitaría su acumulación. No obstante, para la obtención de estos biopolímeros se requiere una gran inversión monetaria y de tiempo, debido a que el proceso de fermentación a partir del cual se producen depende de varios factores como lo son: el tipo de microorganismos, la materia prima como las fuentes de carbono y nitrógeno, las condiciones de las operaciones y la purificación del producto final.

El grupo de bioprocesos y bioprospección del instituto de biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) ha realizado estudios sobre la producción de polihidroxibutirato (PHB), un tipo de PHA, a partir de la cepa mutada *Burkholderia Cepacia B27*, ya que este microorganismo ha reportado un porcentaje de producción del polímero de 86% en peso seco utilizando el aceite vegetal como

¹ SÁNCHEZ MORENO, Silvia Alexandra; MARÍN MONTOYA, Mauricio Alejandro; MORA MARTINEZ, Amanda Lucía; YEPES PÉREZ, María del Socorro. Identificación de bacterias productoras de Polihidroxialcanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. En: revista colombiana de biotecnología. Diciembre, 2012. Vol. 14, no. 2, p. 90.

fuentes de carbono² y se encuentra evaluando estrategias que aumenten la productividad de las fermentaciones.

Para contribuir con el avance en la producción industrial de PHA's este proyecto tiene como finalidad evaluar las condiciones para la producción de Polihidroxibutirato (PHB) a partir de la cepa mutada *Burkholderia Cepacia B27* en régimen alimentado a nivel de planta piloto. Se realizarán fermentaciones en un volumen de 7 litros añadiendo un pulso de fuente de carbono con el fin de obtener el mayor rendimiento en la producción de PHB esto se comprobará con la extracción del mismo, comparando la cantidad del producto entre fermentaciones. Posteriormente con la mejor estrategia, se realizará un escalamiento hasta los 100 litros mediante criterios y correlaciones y para finalizar se validará este escalamiento con el comportamiento de la fermentación y la cantidad obtenida de PHB.

² MENDEZ, Daniel; CABEZA, Iván; MORENO, Nubia; RIASCOS, Carlos. Mathematical Modelling and Scale-up of Batch Fermentation with *Burkholderia cepacia* B27 Using Vegetal Oil as Carbon Source to Produce Polyhydroxyalkanoates. En: AIDIC. 2016. Vol. 49. p. 277.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la estrategia del escalamiento y la obtención de Polihidroxiбутirato (PHB) por medio de la cepa mutada *Burkholderia Cepacia B27*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones de operación de la fermentación a nivel de 7 litros.
- Obtener PHB de acuerdo a las condiciones determinadas en el reactor de 7 litros.
- Establecer las condiciones de escalamiento a 100 litros de acuerdo a los resultados obtenidos en las fermentaciones de 7 litros.
- Validar la estrategia de escalamiento para producción de PHB en el reactor de 100 litros.

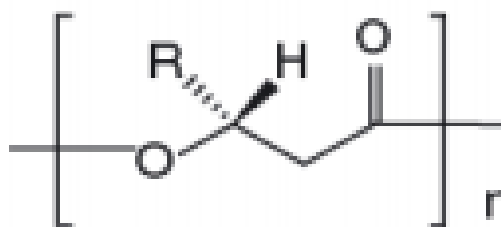
1. GENERALIDADES

En este capítulo se presentarán los conceptos de los polihidroxicanoatos, más específicamente de los polihidroxibutiratos y también del proceso de obtención de estos biopolímeros por medio de la cepa *Burkholderia Cepacia* B27. Por otra parte, se establecen los conceptos básicos de los balances de materia en biorreactores los cuales son de gran utilidad en este proyecto para la alimentación de la fermentación y la cuantificación bacteriana. Por último, se definirán los conceptos básicos y los criterios de escalamiento para este y finalmente el método para llevarlo a cabo.

1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son biopolímeros que se obtienen a partir de algunos microorganismos cuando estos los acumulan como reserva de carbono y energía en circunstancias de estrés como limitaciones de fuente de nitrógeno, fósforo, sulfuro o magnesio y exceso de fuente de carbono en el medio.³ En la Figura 1 se muestra la estructura química de los PHA.

Figura 1. Estructura química de PHA.



Fuente. ANDLER, Rodrigo Álvaro. Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. Technological and market aspects of microbial bioplastics production. En: USFX. 2013. P. 31.

El valor de n depende del grupo R y el microorganismo en el cual se produce, variando entre 100 y 3.000⁴. En la **tabla 1** se muestran los radicales más comunes y el nombre que recibe el polímero.

³ SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos.: Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. En: TEORÍA Y PRAXIS INVESTIGATIVA. vol. 5, no. 2, p. 79.

⁴ ANDLER, Rodrigo Álvaro. Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. Technological and market aspects of microbial bioplastics production. En: USFX. 2013. p. 31.

Tabla 1. Sustituciones del grupo radical.

Grupo R	Nombre del polímero	Abreviación
CH ₃	Poli(3-hidroxi butirato)	PHB
CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxi valerato)	PHV
CH ₂ CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxi hexanoato)	PHH _x

Fuente. ANDLER, Rodrigo Álvaro. Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. Technological and market aspects of microbial bioplastics production. En: USFX. 2013. P. 31.

El PHA es un polímero de ácidos hidroxialcanoicos que como se mencionó anteriormente se acumulan en algunos microorganismos bajo condiciones de estrés, sin embargo, no todos los microorganismos producen el biopolímero bajo las mismas condiciones de escasez de nutrientes, es por esto que en la **tabla 2** se muestran los principales nutrientes que al limitarse da lugar a la obtención de polihidroxialcanoatos en diferentes microorganismos.

Tabla 2. Principales nutrientes que al limitarse da lugar a la obtención de PHA en diferentes microorganismos.

Microorganismo	Nutriente limitante
<i>Alcaligenes latus</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Ralstonia eutropha</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Nitrógeno
<i>Pseudomonas sp. K.</i>	Magnesio
<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Azotobacter beijerinckii</i> <i>Rhizobium ORS571</i>	Oxígeno
<i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Caulobacter crescentus</i> <i>Pseudomonas oleovarans</i>	Fósforo

Fuente. CORDOVA, Jesús; GONZÁLEZ, Yolanda; GONZÁLEZ, Orfil; MEZA, Juan. Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. Noviembre, 2012. P. 80.

Por otro lado, la clasificación de los PHA se puede dar según la longitud de la cadena de los ácidos hidroxialcanoicos de los que se componen, si el polímero está formado por unidades monoméricas de 3 a 5 átomos de carbono y se denominan PHA de cadena corta (PHA-scl), estos se caracterizan por ser demasiados rígidos y frágiles; los PHA de cadena mediana (PHA-mcl) están constituidos por monómeros de 6 a 14 átomos de carbono, siendo estos más elásticos pero dotados de menos fuerza mecánica; y por último PHA mixtos que están compuestos de

cadena corta y cadena larga⁵. De igual manera, los polihidroxicanoatos pueden ser clasificados de acuerdo a la naturaleza de sus unidades monómeras, se denomina homopolímero si está formado por un solo tipo de unidades, mientras si está constituido por monómeros de distinta longitud de átomos de carbono en el mismo gránulo este se nombra como copolímero. Cabe decir que el tipo de PHA obtenido depende del microorganismo usado.⁶

Los polihidroxicanoatos tienen características físicas y mecánicas similares a las de los plásticos derivados del petróleo, pero tienen unas ventajas sobre estos y es que los PHA pueden ser sintetizados a partir de fuentes de carbono renovables, pueden ser asimilados por muchos microorganismos de suelos, mares, aguas residuales o lagos que los pueden degradar y no tienen efectos tóxicos ya que son biocompatibles los que les confiere características importantes para ser sustitutos de los plásticos convencionales⁷. Los PHAs tienen diversas aplicaciones entre las que se encuentran: empaques de larga y corta duración, injertos utilizados en medicina, productos de higiene y biocombustibles⁸.

1.1.1 Polihidroxi-butirato (PHB). Como se ha mencionado anteriormente, el polihidroxi-butirato es un polímero de reserva energética que se acumula en el interior de las células. El PHB es un termoplástico y cristalino, el cual es el más famoso y estudiado entre los PHA's ya que sus propiedades han sido comparadas con el polipropileno, ya que poseen puntos de fusión, grado de cristalinidad y temperatura de transición vítrea.⁹

La ruta bioquímica principal para la obtención del polihidroxi-butirato es a partir del acetil-coA, el cual es convertido a PHB mediante la intervención de tres enzimas biosintéticas como se puede observar en la siguiente figura.

⁵ CORDOVA, Jesús; GONZÁLEZ, Yolanda; GONZÁLEZ, Orfil; MEZA, Juan. GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda. "Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano." En: Revista internacional de contaminación ambiental. Noviembre, 2012. p. 80.

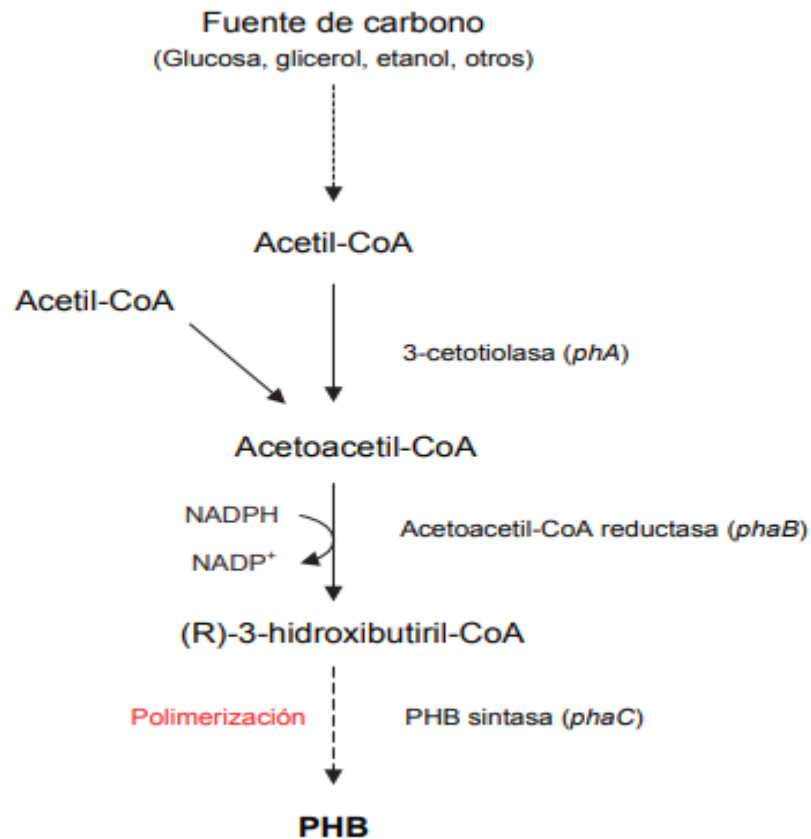
⁶ LEMOS DELGADO, Ana Carolina; MINA CORDOBA, Alexis. Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. En: INFORMADOR TÉCNICO. Mayo, 2015, vol. 79, no. 1, p. 93.

⁷ CORDOVA. Op. cit., p. 79.

⁸ SERRANO RIAÑO. Op. cit., p. 79

⁹ LÓPEZ, Jimmy. Biopolímeros de interés industrial. Síntesis y caracterización de polihidroxi-butirato (PHB). 2011, p. 12.

Figura 2. Ruta metabólica de producción de PHB a partir de la reducción del Acetil-coA.



Fuente. ANDLER, Rodrigo Álvaro. Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. Technological and market aspects of microbial bioplastics production. En: USFX. 2013. P. 31.

En el primer paso, la enzima 3-cetotiolasa condensa dos moléculas de acetil-coA para formar acetoacetil-coA, una segunda enzima, acetoacetil-coA reductasa permite la reducción de acetoacetil-coA, utilizando NADPH. Finalmente, la enzima PHB sintasa polimeriza 3-hidroxibutiril-coA a PHB, liberando la coenzima-A.¹⁰

1.2 BURHOLDERIA CEPACIA

El género Burkholderia está compuesto por: bacilos rectos; Gram negativos; oxidasa y catalasa positivos, son bacterias móviles con un flagelo polar único, son mesófilos y no esporulados. Su metabolismo es aerobio y utiliza el polihidroxibutirato como sustancia de reserva.

¹⁰ ANDLER. Op. Cit., p. 31.

El complejo *Burkholderia cepacia*, es un grupo de bacterias Gram negativas, aerobias y productoras de catalasa; compuestas de al menos nueve diferentes especies¹¹.

- *B. Cepacia*
- *B. multivorans*
- *B. cenocepacia*
- *B. vietnamiensis*
- *B. stabilis*
- *B. ambifaria*
- *B. dolosa*
- *B. anthina*
- *B. pyrrocinia*

1.2.1 Burkholderia Cepacia B27. En este trabajo el microorganismo que se utilizó para llevar a cabo el proyecto fue la cepa *Burkholderia cepacia B27*, esta bacteria se obtuvo mediante una mutación al azar mediante un transposón de *Ralstonia Eutropha* y *Burkholderia sp 2G57* provenientes del Valle del Cauca la cual fue aislada y caracterizada¹²; después de estas mutaciones mencionadas, se seleccionaron las cepas con mayor acumulación del polímero PHA, estas cepas obtenidas por el método alcanzaron proceso de fermentación una acumulación de PHA en 2,5 L utilizando las condiciones básicas de la cepa 2G57 que hacen parte del grupo de las *Burkholderia cepacia*, la cual fue luego denominada como *Burkholderia cepacia B27*.

Para garantizar que las cepas no sufrieran mutaciones genéticas en el transcurso del trabajo, y la concentración de biomasa fuera lo más homogénea posible durante la preparación del inóculo, fue necesaria la elaboración de un stock de trabajo que constó de 70 crioviales cada uno con 800µL. Las bacterias fueron reproducidas en medio LB (BECERRA 2013) con un 30% de glicerol como crioconservante y congeladas a una temperatura de -20°C.

Según Méndez¹³, el potencial de la bacteria *Burkholderia Cepacia B27* frente a otras cepas, está en la capacidad de acumulación del polímero, ya que como se observa en la tabla 3, el porcentaje de acumulación de polímero está en uno de los

¹¹ "Burkholderia." *Emerging Infectious Diseases* 15.11 (2009): 1801. Web.

¹² ARDILA AREVALO, Kathy Stephanie; VILORIA GARCÍA, Andrés Camilo. Evaluación del escalamiento de la producción de polihidroxicanoatos (pha) por fermentación a partir de la bacteria mutante *Burkholderia cepacia b27* a nivel semi-industrial. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de América. 2017.p 22.

¹³ 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. 87.

más altos, comparados entre cepas con sustratos similares de aceite y sustratos como sacarosa¹⁴.

Tabla 3. Cuadro comparativo del potencial de producción de la cepa *Burkholderia Cepacia* B27 frente a otros trabajos realizados en el IBUN y externos.

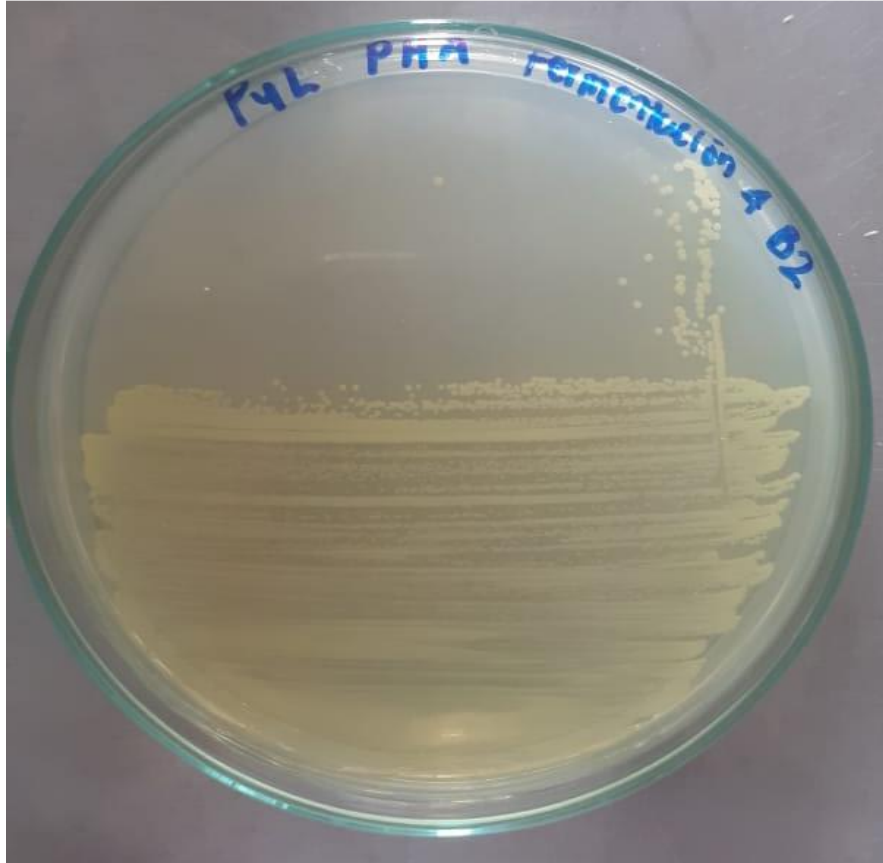
Criterio	Méndez (2016)	Acosta (2007)	Da Cruz Pradella et al. (2012)	Kahar et al. (2004)	López-Cuellar et al (2011)
Microorganismo	<i>Burkholderia 28aracte B27</i>	<i>B. 28aracte 2G57</i>	<i>Cupriavidus 28aracte</i> DSM 545	<i>Ralstonia eutropha H16</i> ATCC17699	<i>W. eutropha</i> ATCC 17699
Fuente de carbono	Mezcla de aceite de maíz y soya (Mazorca de oro grasco)	Sacarosa	Aceite de soya	Aceite de soya	Aceite de Canola
Alimentación	Pulso	Lote alimentado	Lote	Pulso	Lote alimentado
X (g/L)	18,5	21,93	83	126	
PHA (g/L)	15,91	6,2	67,23	95,76	18,27
% Acumulación	86	28,27	81	76	89
Y_{x+p}^{sc}	0,89	0,07	0,83	0,76	0,68
Productividad (g/L.h)	0,85	0,21	2,5	1,76	0,46

Fuente. MENDEZ REYES, Daniel Alexander. 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 de Colombia. 2016. p. 87

La cepa utilizada en este trabajo se caracteriza macroscópicamente por medio de la siembra de la bacteria en medio LB- Agar, después de 24h de incubación se observa su morfología y crecimiento.

¹⁴ Ibid., p. 87

Imagen 1. Morfología macroscópica *Burkholderia Cepacia B27*.



Fuente: elaboración propia.

Color: Amarillo

Tamaño: Pequeño

Forma: Regular, colonias puntiformes¹⁵

Textura: Pegajosa y cremosa.

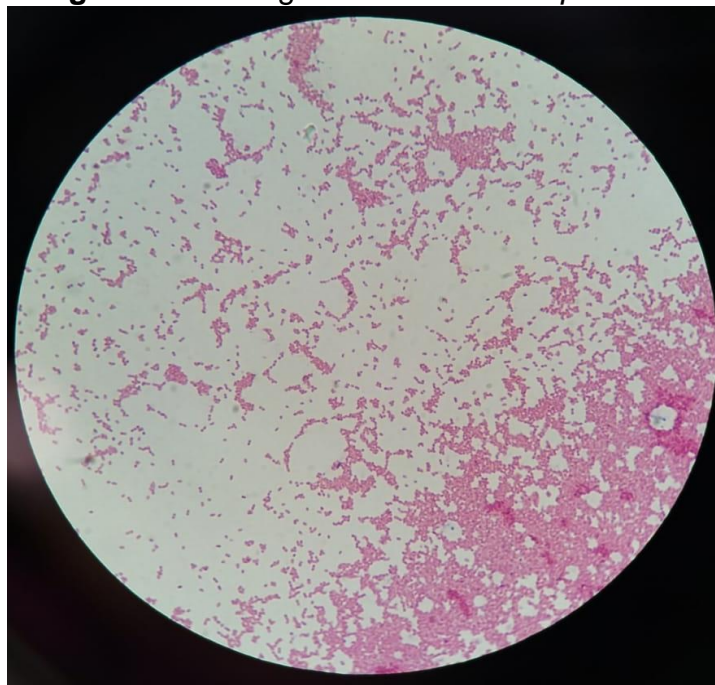
Elevación: Convexo.

Borde: Entero.

Para evidenciar su morfología microscópica se realizó una prueba de tinción de Gram a una muestra con al menos 24h de crecimiento la cual se observó en un microscopio en el factor de aumento 100x.

¹⁵ ARDILA. Op. cit., p. 23

Imagen 2. Morfología *Burkholderia Cepacia* B27.



Fuente: elaboración propia.

Gram: Gram Negativas

Forma: Puntiforme, generalmente bacilos.

Agrupación: Individual, pero puede formar cadenas de tamaño variable¹⁶.

1.3 BALANCE DE MATERIA

El objetivo de un balance de masa es conocer la cantidad de materia que entra y sale de un proceso. Su fundamento es la ley de la conservación de la energía, la cual dice que “la materia no se crea ni se destruya, solo se transforma.”¹⁷

Este fundamento se describe de mejor manera mediante la ecuación general del balance de materia (Ecuación 1).

Ecuación 1. Balance de materia general.

$$\text{Entrada} + \text{generación} - \text{salida} - \text{consumo} = \text{Acumulación}$$

Fuente. ROJAS, Andrés. Fundamentos de procesos químicos. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. 2012. p. 95.

¹⁶ ARDILA. Op. cit., p. 23-24

¹⁷ ROJAS, Andrés. Fundamentos de procesos químicos. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. 2012. p. 95.

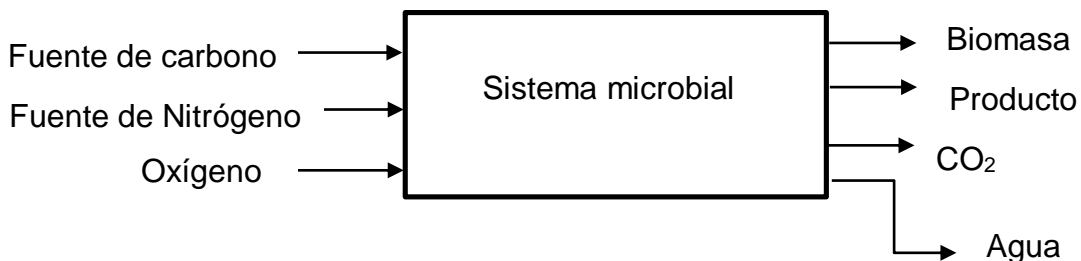
Cabe aclarar que cuando el sistema se encuentra en estado estacionario la acumulación es cero debido a que las variables del proceso no cambian con el tiempo.

1.3.1 Balance de materia en biorreactor. Un adecuado conocimiento del metabolismo del microorganismo de interés conduce a la determinación de los compuestos que intervienen en el balance de materiales de un bioproceso. Las reacciones del anabolismo utilizan los materiales producidos por el catabolismo de la fuente de carbono. Los átomos de los diferentes elementos son reordenados en el proceso metabólico y la cantidad total de cada elemento, incorporada en la célula, es igual a la cantidad removida del ambiente.

En la concentración de las células generalmente están incluidas las grandes moléculas complejas formadas en el anabolismo. La concentración de biomasa es el punto de partida para la evaluación del consumo de sustrato. Todos los elementos requeridos para la formación de compuestos, o para la formación de productos, o de subproductos particulares del metabolismo, debe tenerse en cuenta en la ecuación del balance.¹⁸

El consumo de nutrientes, la velocidad de crecimiento del microorganismo y la formación del producto de interés deben tenerse en cuenta. En la **Figura 3** se ilustra el balance general de materia en un biorreactor en donde entran los nutrientes esenciales para el crecimiento celular y salen los metabolitos que el microorganismo produce.

Figura 3. Ilustración del balance de materia en un biorreactor.



Fuente: DUARTE, Alberto. Introducción a la ingeniería bioquímica. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.1995. p. 52

1.4 CONTEO BACTERIANO

El conteo bacteriano consiste en señalar la magnitud de la población bacteriana en una muestra. Existen varias técnicas para realizar este conteo, pero en el presente trabajo se va a realizar mediante el recuento en placa.

¹⁸DUARTE, Alberto. Introducción a la ingeniería bioquímica. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.1995. p. 52-53.

Esta técnica se basa en contar las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en un mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de la muestra de estudio; ese microorganismo es capaz de formar una colonia, es decir una UFC. En orden para que las colonias puedan contarse de una manera confiable, se realizan unas disoluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo.¹⁹

1.5 FERMENTACIÓN MICROBIANA

La fermentación microbiana se trata del uso de microorganismos para producir un producto de uso humano o de utilidad veterinaria, este microorganismo puede ser modificado genéticamente o no. Las técnicas actuales permiten el uso de microorganismos para mejorar el rendimiento y a la eficiencia en la obtención de diversos productos, no obstante, estos microorganismos ya sean naturales o manipulados genéticamente deben estar en un ambiente favorable para su óptimo crecimiento y la máxima expresión del producto que se busca, para poder ser obtenido a nivel industrial.

Quintero²⁰ sugiere que para llevar a cabo exitosamente una fermentación es necesario ciertos requerimientos como lo son: la acertada selección del microorganismo que tenga las características adecuadas para el proceso y/o producto deseado, suministrar un medio de crecimiento ideal y, por último, controlar las condiciones establecidas para desarrollar apropiadamente la fermentación.

Sin embargo, estos requerimientos, aunque son los más importantes en la fermentación no son los únicos a tener en cuenta, ya que, se deben considerar las características físicas y de operación del fermentador, así como también, se deben tener en cuentas los procedimientos de antes y después de la fermentación²¹, como lo son los pre inóculos y las técnicas de purificación del producto de interés.

En la actualidad se han logrado avances en los diseños de los fermentadores, los cuales son el instrumento en donde se logra el ambiente controlado y propicio para lograr el crecimiento microbiano.²²

¹⁹ CAMACHO, A; GILES, M; ORTEGÓN, A; PALAO, M; SERRANO, B. y VELÁZQUEZ, O. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2 ed. Facultad de Química, UNAM. México. 2009. p. 1.

²⁰ 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.17.

²¹ Ibid., p.18.

²² Scribd [En línea]. [Consultado: 6 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/234876345/FERMENTACION-MICROBIANA>

1.6 REGÍMENES OPERACIONALES DE LAS FERMENTACIONES

Existen diversos modos para realizar una fermentación, entre los cuales se incluye proceso por lotes, fed batch y continua.

1.6.1 Fermentación por lotes. En esta fermentación todos los nutrientes necesarios para el crecimiento se adicionan al principio del proceso, sin interrumpirlo, por ende, el consumo y concentraciones de los componentes del cultivo no pueden ser controlados. Sin embargo, las condiciones como temperatura, pH y espuma si son posibles controlarlos para que no generen inconvenientes en la fermentación. Lo anteriormente dicho sugiere que la biomasa y productos de interés se extraen hasta finalización del proceso²³.

1.6.2 Fermentación fed-batch o lote alimentado. El proceso de Fed- Batch o lote alimentado, es una estrategia modificada de la fermentación batch, es el modo de operación más utilizado en la industria de los bioprocesos, en el cual los microorganismos son inoculados y crecen bajo un régimen batch por cierta cantidad de tiempo, luego los nutrientes se agregan durante la fermentación para alimentarlos. En estos procesos, la alimentación se determina con base a la limitación del sustrato en el medio y el tiempo en el que se debe agregar en un punto en donde el sustrato no se encuentre en exceso mientras el crecimiento microbiano esté a su máxima expresión.²⁴

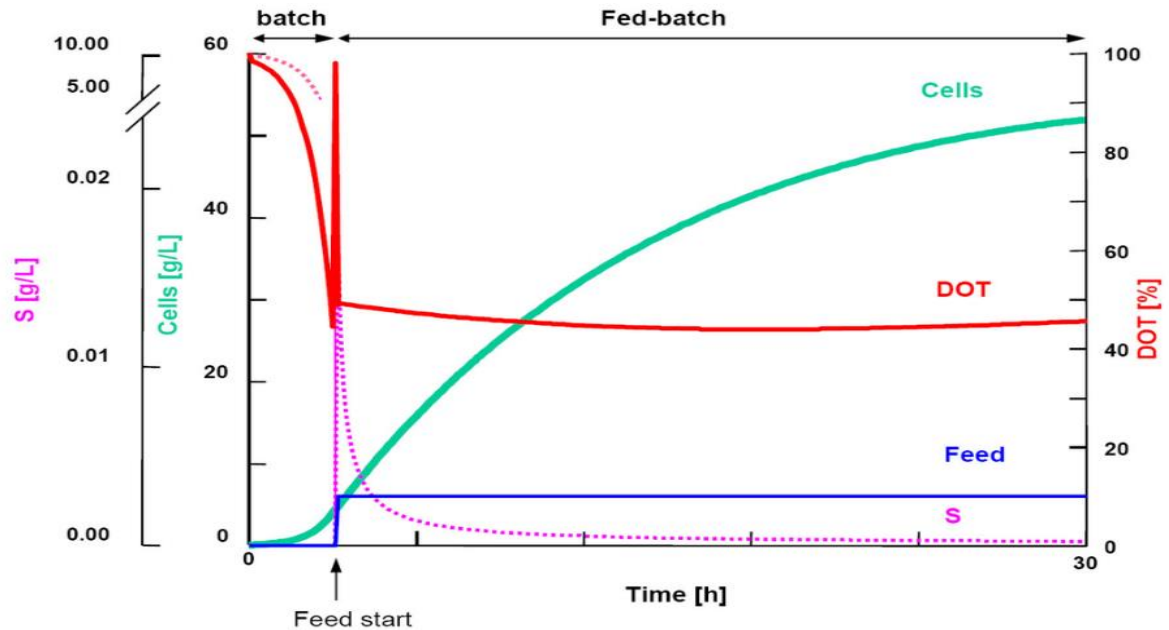
Debido a la alimentación de nutrientes, la acumulación excesiva de biomasa se espera a que ocurra en la fase exponencial, y es por esto que la fermentación de lote alimentado es la mejor estrategia para los bioprocesos que requieren de mayor densidad de biomasa o mayor rendimiento cuando el producto de interés está directamente relacionado con el crecimiento bacteriano.²⁵

²³ LIM, Henry y SHIN, Hwa. Fed-Batch Cultures: Principles and Applications of Semi-Batches bioreactors. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. 452 p. ISBN: 978-0-521-511336-4. p. 1.

²⁴ HARO, José. Informe unidad II [En línea]. México. 2015. [Consultado: 20 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/289120260/Informe-Unidad-II-Biorreactores-Jose-Nabor-Haro-Gonzalez>

²⁵ SHA, Ma y YANG, Ying. A Beginner's Guide to Bioprocess Modes – Batch, FedBatch, and Continuous Fermentation. En: Eppendorf. No 408, 2019, p. 1-2.

Figura 4. Principio de un sustrato alimentado por lotes limitado con una fase inicial de lotes.



Fuente: FED BATCH CULTURE [sitio web]. Alchetron. The Free Social Encyclopedia. Alchetron.com [Consultado: junio 13, 2019]. Disponible en: <https://alchetron.com/Fed-batch-culture>

Con esta estrategia de lote alimentado es posible ajustar las concentraciones de los nutrientes en el medio y las velocidades de alimentación con el fin de mantener las constantes las concentraciones de los nutrientes o aumentar la producción del producto de interés, lo que hace llamativa esta técnica en numerosos procesos.²⁶

1.6.3 Fermentación continua. En este régimen la adición de nutrientes a la fermentación se realiza de forma continua, mientras que por otra corriente se extrae biomasa, productos y residuos que se generan. Esta estrategia posee algunas desventajas, ya que es muy factible que se contamine el proceso con otros microorganismos, también pueden presentarse mutaciones indeseadas por los largos periodos en los que debe mantenerse la fermentación. Las operaciones en estado estacionario como esta son poco utilizadas en la industria, debido a que no presenta gran rendimiento frente a las de los procesos en estado dinámico²⁷.

1.7 ESCALAMIENTO

Durante el diseño de proceso o desarrollo de nuevos productos o tecnologías existe una etapa de investigación y desarrollo, la cual es la parte en donde se determinan

²⁶ MENDEZ. Op. cit., p. 50

²⁷ LIM. Op. Cit., p. 2.

las unidades de medidas para así poder definir un sistema grande a partir de un sistema pequeño, y empezar con el desarrollo del proyecto.²⁸

1.7.1 Niveles de Escalado. Para realizar un escalamiento hay 5 niveles que se deben conocer ya que cada una tiene diferentes limitaciones en función de unos parámetros. En el campo de la biotecnología es muy común su diferenciación mediante el volumen de producción.²⁹

1.7.1.1 Escala Laboratorio. En esta escala el objetivo principal es comprobar los datos y métodos extraídos de la literatura para luego poder construir una fuente de datos para la formulación de modelos teóricos.³⁰

Las hipótesis construidas a partir de la literatura se aceptan o rechazan a nivel de laboratorio y también se construyen las herramientas y procedimientos bases para el trabajo en escala de banco o plata piloto. Esta etapa se realiza con el fin de obtener, recuperar y purificar un producto de interés, de igual manera su análisis y caracterización.

En los procesos biotecnológicos, también se llevan a cabo para:

- Selección de cepas y su evaluación.
- Optimizar el medio y demás variables que se vean afectadas durante el proceso experimental.
- Información a corto plazo de tiempo a muy bajo precio.³¹

1.7.1.2 Escala Banco. En la escala banco, a comparación de la escala a laboratorio, se trabaja con un carácter más tecnológico, se utilizan equipos con características geométricas similares a las del nivel a plata piloto, de igual manera estos equipos requieren mayor automatización de los equipos y su instrumentación. Se hace con el fin de validar los procedimientos y resultados obtenidos en la escala anterior, adicionalmente se amplían los conocimientos y la información obtenida.

Los estudios que se llevan a cabo a esta escala conforman un paso importante para reducir costos en la investigación y en algunos casos evitar el paso de una investigación a escala piloto.

Otros objetivos de esta etapa son:

- Revelar la esencia de los fenómenos que ocurren durante los procesos.
- Revelar los pasos controlantes o críticos en las operaciones.

²⁸ MUÑOZ, Eduardo. Escalamiento de procesos de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática de con células permeabilizadas de *Candida Apicola*. . CIATEJ.2016. p. 24.

²⁹ PEREZ, Francisco. Escalado de una torre de absorción. Universidad de Sevilla. 2016. p. 4.

³⁰ Ibid., p.5.

³¹ GONZALEZ, Roberto. Principios básicos de escalado. CECYEN. 2000. p. 13.

- Verificar las hipótesis de los modelos matemáticos utilizados.
- Aportar información para futuros diseños de ingeniería y sus cálculos.³²

1.7.1.3 Escala piloto. Los estudios que se realizan en esta escala conllevan a un alto costo de producción, pero estos son claves para poder llevar el proceso a nivel industrial, es por esto que es clave que en las etapas anteriores a la escala piloto tengan un buen desarrollo y sean estudiados los suficiente para poder tener validación de los datos obtenidos con el fin de que en la planta piloto se puedan cumplir estos objetivos.

- Evaluar la factibilidad de un proceso tecnológico.
- Obtener la información para el diseño de una planta comercial.
- Obtener cantidades de productos con fines de ensayo o promoción.

En los procesos biotecnológicos se espera cumplir con los siguientes objetivos:

- Confirmar los datos obtenidos a nivel de banco y verificar los criterios de escalado.
- Seleccionar las estrategias de esterilización del medio y concentración y purificación de productos
- Obtener cantidades de productos para pruebas de caracterización, toxicológicas y verificación de la viabilidad del proceso.
- Ofrecer una información de validación a un costo relativamente alto.³³

1.7.1.4 Escala Semi- industrial. De igual manera que en la etapa de planta piloto, esta etapa costosa y se utiliza para comprobar el proceso que se quiere llevar a un nivel industrial, su construcción es similar a la de una planta industrial sin embargo su capacidad de producción es menor (1/10 de la industrial) en donde se acopla su funcionamiento y también sirve como modelo para futuras plantas.³⁴

1.7.1.5 Escala Industrial. Esta etapa es la final, producto de investigaciones en las etapas anteriores para llevar a cabo un proceso con el fin de la creación de un producto o la implementación de un proceso, algunas veces esta escala sirve para para la creación de modelos a escalas inferiores con diferentes fines, de igual manera en esta etapa se puede verificar las mejoras o equipos tecnológicos.³⁵

³² Ibid., p. 14

³³ Ibid., p. 15

³⁴ Ibid., p. 14

³⁵ PEREZ., Op. Cit., p. 5

1.7.2 Parámetros. El objetivo principal del escalamiento es aumentar la escala de una reacción biológica de manera que no reduzca su productividad.³⁶

Para realizar un buen escalamiento según Xia³⁷, siempre se debe seleccionar como base, la propiedad de transporte más crítica para el rendimiento del bioproceso; esta propiedad no es fácil de definir debido a la sensibilidad o respuestas que puedan tener los microorganismos frente a los fenómenos de transporte presentes en la fermentación los cuales se ven afectados por el tamaño de agitador, la velocidad de agitación y aireación. Por lo tanto, el parámetro de escalamiento se elige de acuerdo a cada microorganismo, sus necesidades y las limitaciones que se presentan³⁸.

Normalmente las variables más difíciles de controlar en el cambio de escala son la temperatura y la concentración de oxígeno, ya que en el primer caso el control se dificulta al adicionar y retirar calor a través de una superficie de contacto³⁹.

Existen diferentes criterios de escalamiento que están asociados a las variables que afectan significativamente el proceso de fermentación, estos según Durango⁴⁰ son:

- Número de Reynolds
- Tiempo de mezcla
- Velocidad en la punta del impulsor
- Potencia por unidad de volumen (P/V)
- Coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($K_L a$).

No obstante, según Quintero⁴¹, el número de Reynolds no asegura un buen cambio de escala porque P/V es muy pequeño, también declara que el tiempo de mezcla requiere un gran consumo de potencia por lo cual los costos de operación se elevarían significativamente.

Por otro lado, escalar utilizando el criterio de la velocidad de punta del impulsor disminuye el $K_L a$ al someter a las células a grandes esfuerzos constantes,

³⁶ Lydersen, B. D' Elia, N. Nelson, K. Bioprocess Engineering: Systems, Equipment and Facilities. John Wiley & Sons, 1994. p. 17.

³⁷XIA, Jianye, *et al.* Advances and Practices of Bioprocess Scale-up. En: East China University of Science and Technology, 2015. p. 4.

³⁸ JIMENEZ, Isabel y ROJAS, CAROLINA. Escalamiento para la producción de un biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis subesp. Kurstaki* en fermentadores de 14 y 250L con base en la transferencia de oxígeno. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de los Andes. 2003. p. 41.

³⁹ DUARTE. Op. cit., p. 491

⁴⁰ 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.

⁴¹ QUINTERO. Op. cit., p. 332.

disminuyendo así la potencia por unidad de volumen proporcionalmente aumenta la escala de producción⁴².

Por tales motivos, Quintero⁴³ concluye que los mejores criterios de escalamiento son la relación potencia por unidad de volumen (P/V) y Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_{La}). Cabe resaltar, que el primer caso se utiliza en su mayoría para procesos viscosos o el crecimiento es filamentoso, mientras que el K_{La} es de los más utilizados para procesos aerobios⁴⁴.

1.7.2.1 Fenomenología de la Fermentación. A través del tiempo se han trabajado fermentaciones sólidas para la producción de bioproductos, sin embargo, últimamente se ha requerido hacerlas mediante fermentación sumergida, ya que requieren de un medio líquido para tener un proceso con mayor control y que exista una homogenización de los nutrientes. En este tipo de fermentaciones existen unas variables importantes las cuales determinan el comportamiento dentro del fluido, como lo son la agitación, la aireación y la temperatura.

➤ **Aireación.** Cuando se realizan fermentaciones con microorganismos aerobios es importante que haya un suministro de oxígeno para que los requerimientos metabólicos de estos organismos se cumplan, existe una demanda de oxígeno en el medio debido a la oxidación de la fuente de carbono su transformación en las células, esta demanda se satisface por medio de la aireación en el medio de cultivo.

Sin embargo, se debe tener especial cuidado debido a que una aireación violenta o de muy baja potencia podría llegar a afectar de diferentes formas la transferencia de oxígeno, en el primer caso se podría llegar a arrastrar el microorganismo en la burbuja de aire y por otro lado una baja aireación podría ser insuficiente para la respiración y posteriormente muerte celular.

Que tan rápido las células consumen el oxígeno en los biorreactores nos indica la velocidad de aireación a la que se debe transferir al medio.

Es por esto que es esencial conocer la forma en que se da la transferencia de oxígeno del medio hacia el microorganismo y como es el consumo de este, todo esto con el fin de determinar los requerimientos energéticos y de proceso como lo es la aireación y la agitación.⁴⁵

⁴² Ibid.,p. 332

⁴³ Ibid.,p. 332

⁴⁴ NAUHA, Elina; VISURI, Olli; VERMASVUORI, Raisa y ALOPÆUS, Ville. A new simple approach for the scale-up aerated stirred tanks. En: Aalto University, School of Chemical Technology. 2014. p. 2.

⁴⁵ GARCÍA, Cirpiano; GONZÁLEZ, María; MEDRANO, Hiram; SOLÍS, Aquiles. Estudio de las condiciones de mezclado en fermentador para la producción de blastosporas de *Beauveria bassiana*. Art. p. 48. 2013

➤ **Agitación.** Este es un factor muy importante para tener en cuenta para llevar a cabo una fermentación líquida, ya que ayuda al medio a crear o mejorar el contacto entre dos o más fases, en el caso de las fermentaciones microbianas, normalmente se presentan 3 fases las cuales son sólido, líquido y gas.

Las sales disueltas, sustratos y metabolitos componen la fase líquida del medio, las células individuales, sustratos insolubles o productos del metabolismo que precipitan hacen parte de la fase sólida y por último, la fase gaseosa aporta al medio la reserva del suministro de oxígeno con el fin de eliminar el CO₂.

Proporcionar un sistema adecuado de agitación mejorará la dispersión del aire en las soluciones de los nutrientes, homogenizar el medio para igualar la concentración de los nutrientes en el biorreactor y los líquidos inmiscibles y de la misma manera también ayuda a romper las burbujas de aire para evitar el fenómeno de coalescencia.

➤ **Temperatura.** Para que una fermentación se realice de manera controlada, la temperatura es otro factor que influye directamente, debido a que cuando el microorganismo crece bajo una temperatura menor a la óptima, la velocidad de crecimiento disminuye hasta que se produzca muerte celular en el medio, por otro lado, cuando el medio se encuentra a una temperatura mayor, el microorganismo disminuye su rendimiento respecto al producto proteico. Es por esto que se debe definir un rango de temperatura estrecha la cual se debe mantener de forma constante.⁴⁶

1.7.3 Transferencia de oxígeno en microorganismos. Cuando se realizan fermentaciones con microorganismos aerobios es importante que haya un suministro de oxígeno para que los requerimientos metabólicos de estos organismos se cumplan, existe una demanda de oxígeno en el medio debido a la oxidación de la fuente de carbono y la transformación de las células, esta demanda se satisface por medio de la aireación y la agitación del medio de cultivo. Que tan rápido las células consumen el oxígeno en los biorreactores nos indica la velocidad de aireación a la que se debe transferir a este.

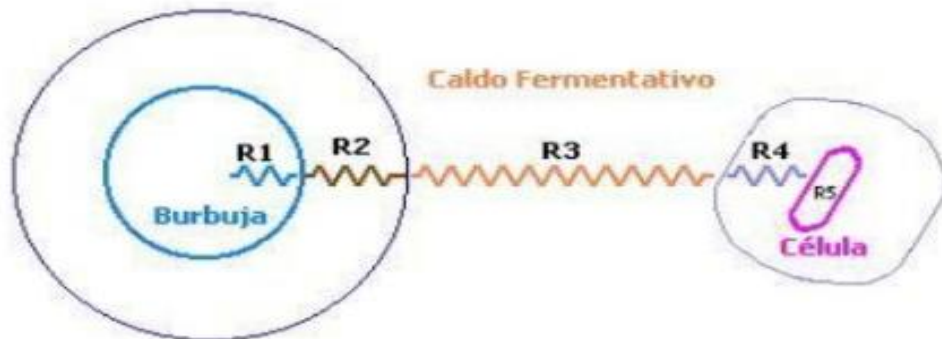
Es por esto que es esencial conocer la forma en que se da la transferencia de oxígeno del medio hacia el microorganismo y como es el consumo de este, todo esto con el fin de determinar los requerimientos energéticos y de proceso como lo es la aireación y la agitación.⁴⁷

⁴⁶ MORENO, Lina; PEREZ, Adrián; RAMIREZ, Margarita; FRANCO, Marcela. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno utilizadas en la elaboración de inoculantes biológico para arveja (*Pisum sativum*) y soya (*Glycine max*). Revista Colombiana de Biotecnología. p. 50. 2014.

⁴⁷ ATEHORTÚA, Lucía; QUINTERO, Juan; TORRES, Ana. Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno de microorganismos incluyendo el tiempo del electrodo de oxígeno. En: Revista Facultad Ingeniería Universidad de Antioquia. No 43. p. 40.

Según Quintero⁴⁸ la transferencia de oxígeno hasta las células se rige por un mecanismo que contiene una serie de resistencias como se muestra en la **Figura 5**.

Figura 5. Resistencias a la transferencia de oxígeno de la burbuja de aire a la célula.



Fuente: JIMENEZ, Isabel y ROJAS, CAROLINA. Escalamiento para la producción de un biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis subesp. Kurstaki* en fermentadores de 14 y 250L con base en la transferencia de oxígeno. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de los Andes. 2003. p. 32

Donde R1 y R2 respectivamente representan la transferencia de oxígeno a través de las películas de gas y líquido que rodean las burbujas de aire, R3 es la resistencia que tiene el caldo fermentativo el cual debe atravesar la burbuja; R4 representa la película de líquido que circunda a la célula la cual debe traspasar, por último, R5 es la resistencia de la reacción bioquímica intramolecular⁴⁹.

Quintero⁵⁰ sostiene que la mayor resistencia la da la película de líquido que rodea la burbuja de aire debido a la baja solubilidad del oxígeno en el agua, esto produce que el fenómeno de transferencia este controlado por la fase líquida.

1.7.4 Coeficiente volumétrico de transferencia de masa K_{La} . Cuando se quiere escalar las condiciones de operación de un equipo dado a otra, es necesario establecer una relación entre las variables para así poder confirmar la similitud en el medio al momento de hacer un cambio de escala. Es por eso, que el control ambiental depende de las limitaciones de los equipos disponibles. La variable que nos determina la capacidad de un fermentador es el K_{La} y es por eso que se escoge normalmente como criterio principal de escalamiento.⁵¹

El K_{La} , se utiliza para medir en el reactor la capacidad de aireación, y este depende de las condiciones de operación entre las cuales podemos encontrar la tasa de

⁴⁸ QUINTERO. Op. cit., p. 82

⁴⁹ Ibid., p 82

⁵⁰ Ibid., p 82

⁵¹ Ibid., p. 98

aireación, el diseño de la turbina y la tasa de agitación, como también depende del diseño del mismo.⁵²

Como se mencionó anteriormente, los criterios más utilizados para escalar un proceso fermentativo son: la potencia volumétrica (P/V) y el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_La). Este último, es el criterio principal para los casos de fermentaciones aerobias debido a que la alimentación de oxígeno es el principal inconveniente⁵³. Dicho coeficiente depende de diferentes variables, diseño y condiciones de operación en el biorreactor que incluyen: la agitación y aireación, temperatura, estructura del microorganismo, viscosidad y composiciones del medio de cultivo, entre otros. Se emplea principalmente para medir la capacidad de aireación en el reactor y cambia durante toda la fermentación.⁵⁴

Por otro lado, a través de las correlaciones empíricas o métodos físicos se puede determinar el K_La , entre estas correlaciones mencionadas se pueden encontrar las de Cooper, Fukuda, Hospodka, Taguchi, Humphrey, Westertep y Hatch, entre otros⁵⁵.

Sin embargo, la manera más certera para determinar el criterio K_La es mediante métodos físicos, debido a que tienen como propósito la medición mediante sensores de oxígeno la concentración del OD en el medio de fermentación⁵⁶.

1.7.4.1 Método dinámico de eliminación de gas. Se encuentra entre los métodos físicos que se mencionaron anteriormente para la determinación del K_La . Con el uso de esta técnica se tiene una valoración del reactor más real debido a que se lleva a cabo durante la fermentación.

Este procedimiento consiste en la suspensión de la aireación en el reactor, lo cual causa una caída lineal de la concentración de OD debido al consumo del microorganismo, luego de esto se reanuda la aireación y la concentración del oxígeno disuelto vuelve a su valor inicial⁵⁷. Este comportamiento descrito anteriormente se puede ver en la **figura 6**.

⁵² SEPÚLVEDA, Paul. Evaluación de la velocidad de dilución en un proceso de fermentación continuo de *Escherichia Coli* recombinante productora de α -Amilasa. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de los Andes. 2005. p. 37.

⁵³ MARÍN, Miguel. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_La) y potencia gaseada (Pg/V) como criterios de escalamiento del bioproceso para la producción de dextranasa recombinante en *Pichia pastoris*. Tesis de doctorado. Aguascalientes. Universidad autónoma de Aguascalientes. 2019.

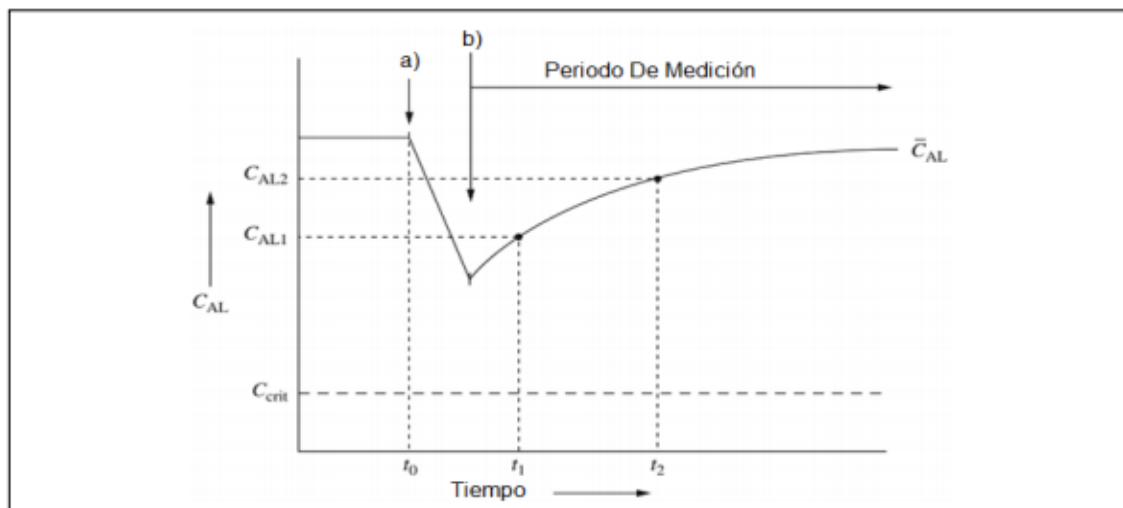
⁵⁴ SEPÚLVEDA. Op. cit., p. 37

⁵⁵ Ibid., p 82

⁵⁶ QUIRÓS, Jose Pablo. Determinación de modelos para la predicción de los coeficientes volumétricos de transferencia de masa (K_La) oxígeno-medio de cultivo en biorreactores tipo tanque agitado. Proyecto de grado. San José. Universidad de Costa Rica. 2014.

⁵⁷ SEPÚLVEDA. Op. cit., p. 37

Figura 6. Método dinámica eliminación de gas a) suspensión de aireación y b) reanudación aireación.



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

En la figura 5, la pendiente entre la línea ab es la medida de la aireación del cultivo y la línea b hasta el final del periodo de medición es el aumento de concentración de OD desde la transferencia de oxígeno a la solución hasta la toma del OD por las células⁵⁸.

Para realizar la medición de este coeficiente por medio del método dinámico se realiza a partir del seguimiento del consumo del oxígeno disuelto con respecto al tiempo y a la tasa de respiración del microorganismo, como se puede ver expresada en la **ecuación 2**.

Ecuación 2

$$\frac{dc_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L) - xq_o$$

Fuente: SEPÚLVEDA, Paul. Evaluación de la velocidad de dilución en un proceso de fermentación continuo de *Escherichia Coli* recombinante productora de α -Amilasa. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de los Andes. 2005. p. 38.

En donde $K_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y la fuerza impulsora es $(C^* - C_L)$, siendo C^* la concentración de la fase líquida en equilibrio en el seno del gas⁵⁹, para la determinación del $K_L a$, también es importante conocer la

⁵⁸ SEPÚLVEDA. Op. cit., p. 38

⁵⁹ GARCIA OCHOA, Felix. Y GOMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En: BIOTECHNOLOGY ADVANCES. vol. 27, no. 2, p. 157.

tasa de respiración de los microorganismos en donde x es la concentración de biomasa en el medio y q_o es la tasa específica de consumo de oxígeno⁶⁰. Luego, al despejar el término C_L de la ecuación 2 se tiene:

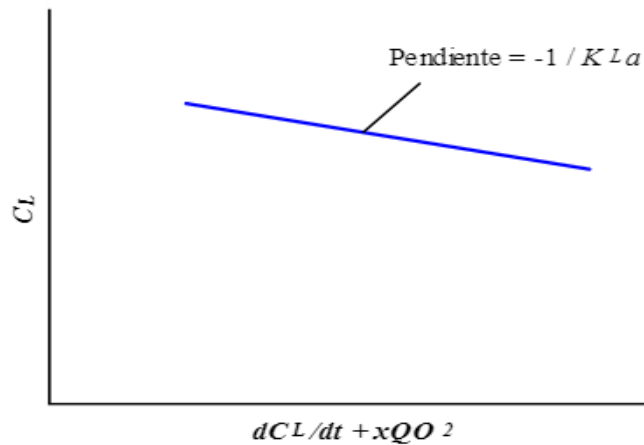
Ecuación 3

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

Fuente: SEPÚLVEDA, Paul. Evaluación de la velocidad de dilución en un proceso de fermentación continuo de *Escherichia Coli* recombinante productora de α -Amilasa. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de los Andes. 2005. p. 37.

Así, al momento de graficar C_L contra $(dC_L/dt + xq_o)$, dará una línea recta con una pendiente $(-1/K_L a)$. De la manera en que se observa en la **figura 7**.

Figura 7. Pendiente $K_L a$.



Fuente: SEPÚLVEDA, Paul. Evaluación de la velocidad de dilución en un proceso de fermentación continuo de *Escherichia Coli* recombinante productora de α -Amilasa. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de los Andes. 2005. p. 37.

1.7.5 Correlaciones empíricas. Con el fin de hallar el coeficiente de transferencia de masa ($K_L a$), se han propuesto ecuaciones adimensionales como dimensionales anteriormente en la literatura. Para realizar estas correlaciones se tienen en cuenta los parámetros que afectan la transferencia de masa como lo son la aireación, la agitación y otro factor importante, la viscosidad, ya que se ha demostrado que el aumento de la viscosidad del fluido disminuye el valor del $K_L a$.⁶¹

⁶⁰ DORAN Pauline. Bioprocess engineering principles. 2 ed. Oxford: Academic Press, 2012. ISBN 978-0-12-220851-5. p. 394.

⁶¹ JIMENEZ. Op. cit., p. 38

Las correlaciones utilizadas para estimar el coeficiente de transferencia de masa más importante que se han estado desarrollando durante los últimos 30 años se muestran en la **tabla 4**.

Tabla 4. Correlaciones para la estimación del K_La .

Correlación	Autor
$K_La = 0,0635 * P_V^{0,95} * V_S^{0,67}$	Cooper
$K_La = K * P_V^{0,4} * V_S^{0,5}$	Richards
$K_La = (2 + 2,8)Ni * P_V^{0,56} * V_S^{0,7} * N^{0,5} * 10^{-3}$	Fukuda
$K_La = 0,56 * P_V^{0,72} * V_S^{0,11}$	Hospodka
$K_La = 1,78 * P_V^{0,33} * V_S^{0,56}$	Taguchi
$K_La = (\alpha + \beta)(N^{4/3} * D_i^{1/4} * V_S^{1/2})$	
$K_La = K \left[\frac{1 - \phi}{H} (ND_i - N_o D_i) \sqrt{\frac{\rho T}{\sigma}} \right]$	Humprey
$K_La = KV_S^{0,45}$	Hatch

Fuente: 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.86.

Como se observó en la **tabla 4**, las correlaciones para el K_La , sin embargo, ninguna de las mencionadas anteriormente se puede utilizar de manera general, es por esta razón que surgió una ecuación general que permitiera determinar de manera más acertada el coeficiente de transferencia de masa⁶².

Ecuación 4. Ecuación general para determinar el K_La .

$$Kla = k' \left(\frac{Pg}{v} \right)^\alpha (Vs)^\beta (\mu)^\gamma$$

Fuente: 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.90.

1.7.5.1 Correlación de Cooper. Para realizar el escalamiento, además del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, es necesaria la implementación de una ecuación matemática la cual va a relacionar el K_La con las condiciones de operación y las propiedades fisicoquímicas del medio⁶³.

⁶² QUINTERO. Op. cit., p. 98

⁶³ ARDILA. Op. cit., p. 38

Sin embargo, como se mencionó en la **sección 1.7.5** la **ecuación 4** permite determinar de manera acertada el K_{La} . Sin embargo, esta ecuación puede ser modificada dando como resultado la correlación de Cooper (**Ecuación 5**), la cual es utilizada en el modelo empírico, en donde Ardila y Vilorio⁶⁴, en su proceso de escalado, realizan una regresión lineal para definir las constantes no empíricas del sistema y así, poder relacionar los parámetros de escalamiento.

Ecuación 5. Correlación de Cooper.

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

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

En donde:

θ, β, γ : Coeficientes empíricos
 P_g : Potencia requerida
 V : Volumen del medio fermentativo
 V_s : Velocidad de aireación Superficial

A partir de la **Ecuación 6**, utilizada por Fernández (2007) en su escalamiento, de donde se rescata el valor de la velocidad de aireación superficial del aire y con el área transversal del flujo de aire se conoce el valor del caudal necesario para implementar en el fermentador.

Ecuación 6.

$$Q = A * V_s$$

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 KLa . Tesis para maestría. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia.2007.p.46.

En donde:

V_s : Velocidad de aireación superficial, m/s
 A : Área transversal del flujo de aire, m²

⁶⁴ Ibid., p. 38

2. METODOLOGÍA

En este capítulo se explicará detalladamente cada una de las actividades realizadas en el proyecto, se divide en cinco partes, las cuales abarcan las fermentaciones en cada uno de los reactores, el escalamiento por correlaciones especificando cada paso, la extracción y purificación del polihidroxi butirato y por ultimo las pruebas de calidad que se le realizaron al biopolímero.

2.1 FERMENTACIÓN EN EL REACTOR DE 7 LITROS

Las fermentaciones se efectuaron en un BioFlo CelliGen® 115, durante 72 horas y con un volumen de trabajo de 5 litros, las condiciones de operación se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Condiciones de operación en el reactor de 7 litros.

Condición	Valores de operación
Agitación	500 rpm
Aireación	13,5 L min ⁻¹
Temperatura	32°C
pH	7

Fuente: ARDILA AREVALO, Kathy Stephanie; VILORIA GARCÍA, Andrés Camilo. Evaluación del escalamiento de la producción de polihidroxi alcanoatos (pha) por fermentación a partir de la bacteria mutante *Burkholderia cepacia b27* a nivel semi-industrial. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de América. 2017.p 46.

Se han realizado estudios con el fin de determinar las mejores condiciones de crecimiento para la cepa mutada *Burkholderia cepacia B27*. En el año 2017 Ardila y Viloria⁶⁵ realizaron fermentaciones evaluando como afecta la agitación y aireación en el microorganismo en un reactor de 7 litros, en donde concluyeron que las mejores condiciones de crecimiento y acumulación son 13,5L min⁻¹ y 500rpm.

Por otra parte, la temperatura es ideal para el crecimiento celular debido a que es un microorganismo mesófilo lo cual quiere decir que crece en rangos de temperatura de 30-35°C. Se le evaluó la temperatura de crecimiento a la cepa *Burkholderia cepacia B27* en donde se encontró que a 32°C el crecimiento de biomasa fue de 0,27g/L-h y producción de PHB de 0,19g/L-h⁶⁶.

Rodríguez (2015)⁶⁷ afirma que la mayoría de las bacterias crecen de forma adecuada en pH neutro (entre 6,5 y 7,5) ya que cuando se presenta un ambiente ácido esto causa un mal funcionamiento en el interior de la célula dado que se ve

⁶⁵ Ibid., p.68

⁶⁶ MENDEZ. Op. cit., p. 33

⁶⁷ RODRIGUEZ, María. Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación. Tesis de doctorado. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. 2015. p. 21

forzada a expulsar los iones de H⁺ que entren. Por esta razón este microorganismo crece en un pH neutro para que ni los aniones ni cationes afecten de manera significativa el funcionamiento celular.

Para llevar a cabo las fermentaciones se debe preparar previamente el pre-inóculo y la inoculación en medio PHA. El pre-inóculo consiste en dejar crecer la cepa durante 24 horas en un medio LB estéril a 200rpm y 32 ° C. (Ver **Tabla 6**)

Por otro lado, el medio PHA previamente esterilizado, se inocula con el medio LB pasadas las 24 horas de incubación, el medio PHA se deja igualmente durante 24 horas a 200rpm y 32°C. (Ver **Tabla 7**)

Todos los inóculos se realizaron en Erlenmeyer con una cabeza de aire de 1/5 del volumen total y se les ajustó el pH en 7 antes de esterilizar.

Tabla 6. Preparación medio LB.

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de Levadura	5
Triptosa	10
NaCl	10

Fuente: ARDILA AREVALO, Kathy Stephanie; VILORIA GARCÍA, Andrés Camilo. Evaluación del escalamiento de la producción de polihidroxialcanoatos (pha) por fermentación a partir de la bacteria mutante *Burkholderia cepacia* b27 a nivel semi-industrial. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de América. 2017. p. 46

Tabla 7. Preparación medio PHA.

Componente	Concentración
KH_2PO_4	2,65 g/L
Na_2HPO_4	3,34 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,8 g/L
Componente	Concentración
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/L
Micronutrientes	2 ml/L
Aceite Vegetal	20 g/L
Antiespumante	2 ml/L

Fuente: VILORIA, Andrés et al., Volumetric Oxygen Mass Transfer Coefficient Determination and Hydrodynamic Optimization of Polyhydroxyalkanoate Production with Vegetal Oil as Carbon Source. *Research gate*. Vol 57. 2017

Uno de los componentes fundamentales para el crecimiento celular son los micronutrientes (Ver **tabla 8**), debido a que sin estos no se podrían realizar

numerosas funciones metabólicas. Estos se disuelven en una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 1N.

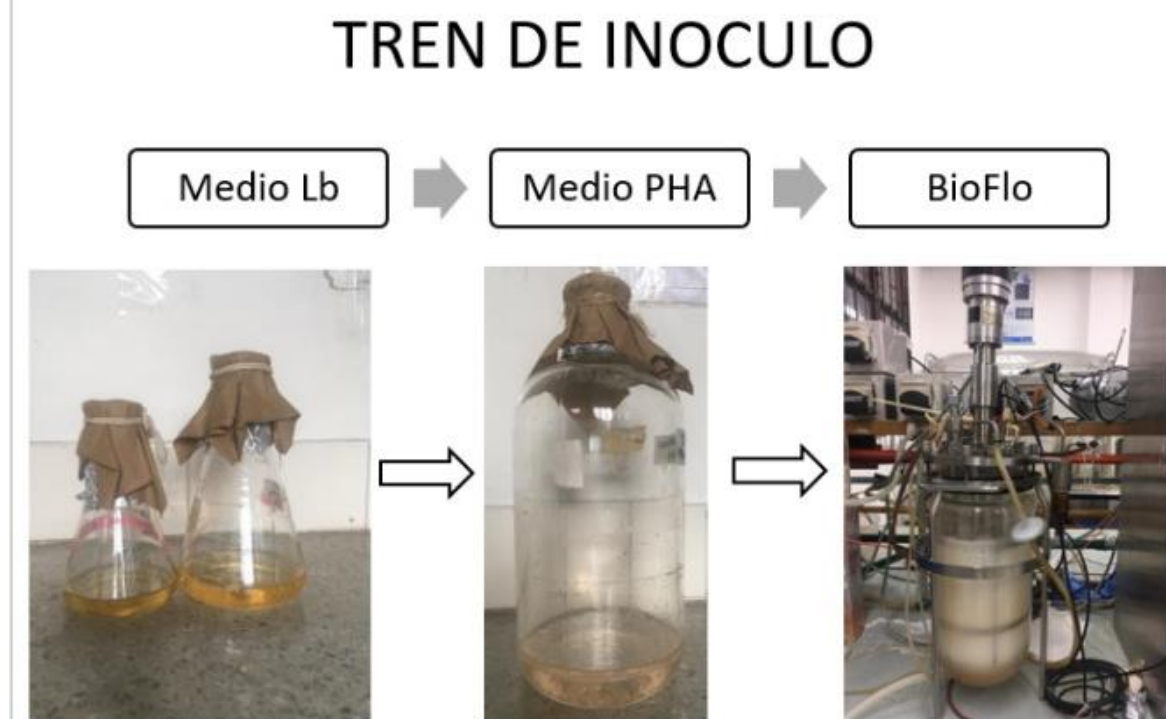
Tabla 8. Preparación Micronutrientes.

Componente	Concentración (g/L)
FeSO₄	2
CaCl₂	2
CuCl₂·6H₂O	0,2
CuCl₂·2H₂O	0,01
NiCl₂·6H₂O	0,2
MnCl₂·4H₂O	0,03
ZnSO₄·7H₂O	0,1
H₃BO₃	0,3
NaMoO₄·2H₂O	0,03

Fuente: ARDILA AREVALO, Kathy Stephanie; VILORIA GARCÍA, Andrés Camilo. Evaluación del escalamiento de la producción de polihidroxialcanoatos (pha) por fermentación a partir de la bacteria mutante *Burkholderia cepacia* b27 a nivel semi-industrial. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de América. 2017. p. 46.

2.1.1 Inoculación en el reactor de 7 litros. Para realizar fermentaciones en el reactor de 7 litros como se nombró en la **sección 2.1** se debe realizar un protocolo de inoculación, comenzando por el medio LB de 50mL el cual se dejó crecer en agitación durante 24 horas para posteriormente inocular el medio PHA de 450mL, al finalizar las 24 horas este último medio se convierte en el inóculo del reactor de 7 litros en donde se mencionó anteriormente se trabaja con un volumen efectivo de 5 litros.

Figura 8. Tren de inóculo reactor 7 litros.



Fuente: elaboración propia.

2.1.2 Adición de pulsos a la fermentación. En las horas escogidas para las 4 fermentaciones, con el fin de agregar el pulso de fuente de carbono al medio para aumentar la producción del biopolímero, se siguieron los pasos descritos a continuación.

Lo primero que se realizó fue la medición de la cantidad de aceite Mazorca de Oro, ya que es la fuente de carbono del microorganismo, después se mandó el aceite en un envase de vidrio a una autoclave con el fin de esterilizarlo para que al momento de ingresar al medio no alterara sus composiciones. Al momento de agregar al pulso a cada fermentación se adecuó el lugar para evitar cualquier contaminación al medio, después de esterilizar las herramientas que se utilizaron se agregó el pulso con la ayuda de una bomba peristáltica, la cual tenía una manguera con un tubo de acero inoxidable el cual se flameaba previamente al ingreso del aceite, después de que todo el pulso fuera agregado se flameó de nuevo las entradas al reactor y se continuó con el proceso.

2.1.3 Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC). Como se explicó anteriormente no fue posible realizar una medición de fuente de carbono, por lo cual se realizaron cuantificaciones de unidades formadoras de colonias, para así elaborar la cinética de crecimiento de la cepa y determinar la mejor opción para agregar los pulsos.

Para la cuantificación de las UFC lo primero que se hizo fue tomar la muestra con el microorganismo y pasarlo por un vortex, a continuación, se recoge 1ml de muestra y se diluye en un tubo con 9ml de solución salina, seguido a esto, se toma otro mililitro del tubo y se diluye en otros 9 mL de solución salina, se realiza este procedimiento hasta diluir la muestra en 6 tubos. Para finalizar, se siembra en 6 cajas de Petri, 100µl de cada uno de los tubos y se rastrilla cuidadosamente por toda la caja para que quede bien esparcida la muestra, se tapa y se deja crecer durante 48h, pasado este tiempo se cuentan las colonias que aparezcan en la caja.

Imagen 3. Colonias crecidas en la caja de Petri.



Fuente: elaboración Propia.

2.1.4 Cuantificación de biomasa y PHB presente en muestras de fermentación.

La cuantificación de la biomasa y PHB se debe realizar de forma periódica, ya que de esta manera se realiza un seguimiento del crecimiento y comportamiento de la fermentación.

Para llevar a cabo dicha cuantificación se realiza el método gravimétrico propuesto por Yang⁶⁸ el cual dice que se debe tomar 15ml de muestra de la fermentación 3 veces al día y dividirla en 3 falcón pesados con anterioridad, posteriormente centrifugar a 3700rpm durante 10 minutos, pasado este tiempo desechar el

⁶⁸ Yang, J., Huang, J., Y Ni, J. Mathematical modeling of the batch fermentation of Zoogloea sp. GY3 used for synthesizing polyhydroxyalkanoates. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 81(5), 789-793. 2006

sobrenadante y resuspender nuevamente con agua destilada hasta alcanzar el volumen inicial, esto se realiza tres veces con el fin de limpiar la muestra de biomasa del medio de fermentación. Para finalizar se llevan los 3 falcón a un horno a 80°C y se deja secar durante 2 días para así pesarlo y conocer la cantidad de biomasa presente en cada muestra.

La cuantificación del PHB se realiza de forma similar al de la biomasa, como lo sugiere Méndez⁶⁹, sin embargo, al finalizar los lavados con agua se pesan los tubos falcón para agregarle dodecilsulfato sódico (SDS), un detergente tensoactivo que ayuda en la lisis celular, del cual se añaden 0,55ml de una solución al 20% por gramo de muestra y se lleva a un baño termoestático a 80°C durante 1 hora con el fin de romper las células de los microorganismos. Posteriormente se centrifuga nuevamente a 3700rpm durante 10 minutos y se efectúan tres lavados con agua destilada para remover completamente la biomasa residual. Al finalizar los lavados, se llevan los tres tubos falcón a un horno a 80°C durante 2 días, pasado este tiempo se pesan y así se conoce la cantidad de polímero presente en cada muestra.

2.2 ESCALAMIENTO

Para realizar el escalamiento, se escogió como criterio el coeficiente de transferencia de masa (K_La) como se había mencionado con anterioridad, este se dejó fijo entre las dos escalas (7 y 100 litros).

2.2.1 Determinación del coeficiente de transferencia de masa (K_La). La determinación se realiza por el método dinámico de eliminación de gas explicado en la sección 1.7.1.1 a la hora 5 de la fermentación. Para llevar a cabo este método, primero se debe determinar el punto crítico de concentración de OD en la fermentación.

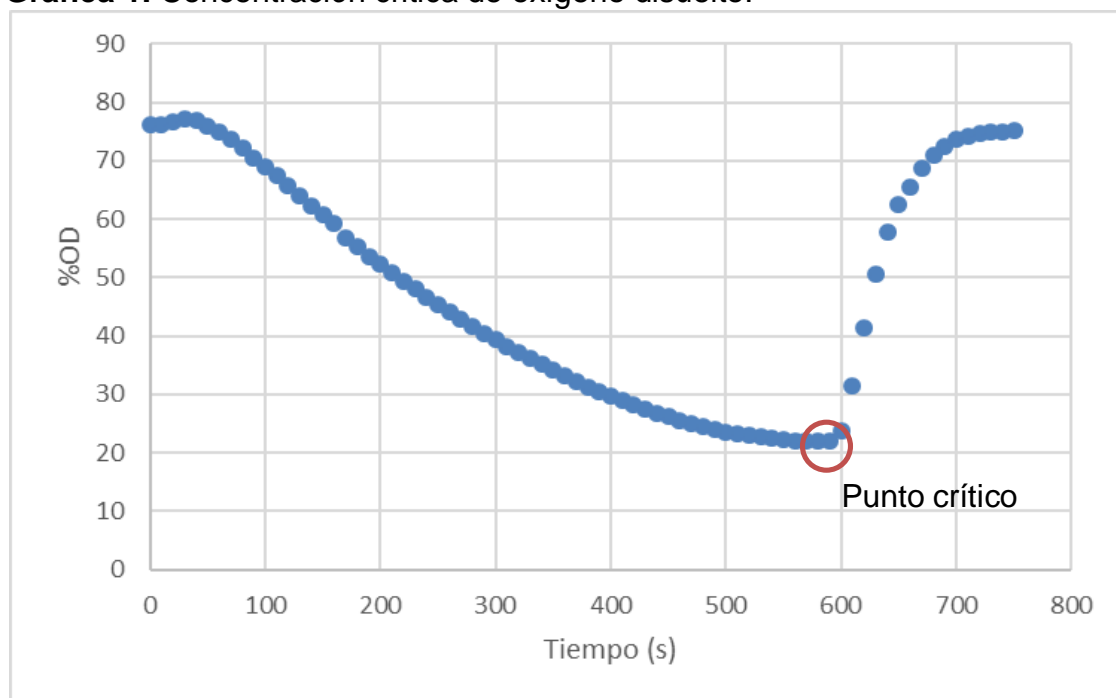
Para establecer este punto crítico se debe retirar la aireación y agitación de la fermentación, como consecuencia se presenta un decaimiento lineal de la concentración de OD, al estabilizarse, se debe reanudar el suministro de aire al reactor para que la concentración de oxígeno disuelto aumente hasta que este vuelva a estabilizarse⁷⁰, este procedimiento se realizó por triplicado con el fin de tener total certeza de este punto. Posteriormente se gráfica %OD vs el tiempo, estas gráficas se presentan en el **ANEXO D**, cuando se presente un cambio de pendiente en el decaimiento de la concentración de oxígeno disuelto, este valor se tomará como el punto crítico. Como se presenta en la **Figura 9**, según Ardila y Vilorio⁷¹ este cambio de pendiente señala que el consumo de oxígeno es inferior por estar limitando, restringiendo así la respiración de los microorganismos.

⁶⁹ MENDEZ. Op. cit., p. 55

⁷⁰ SEPÚLVEDA. Op. cit., p. 56

⁷¹ ARDILA. Op. cit., p. 53

Gráfica 1. Concentración crítica de oxígeno disuelto.



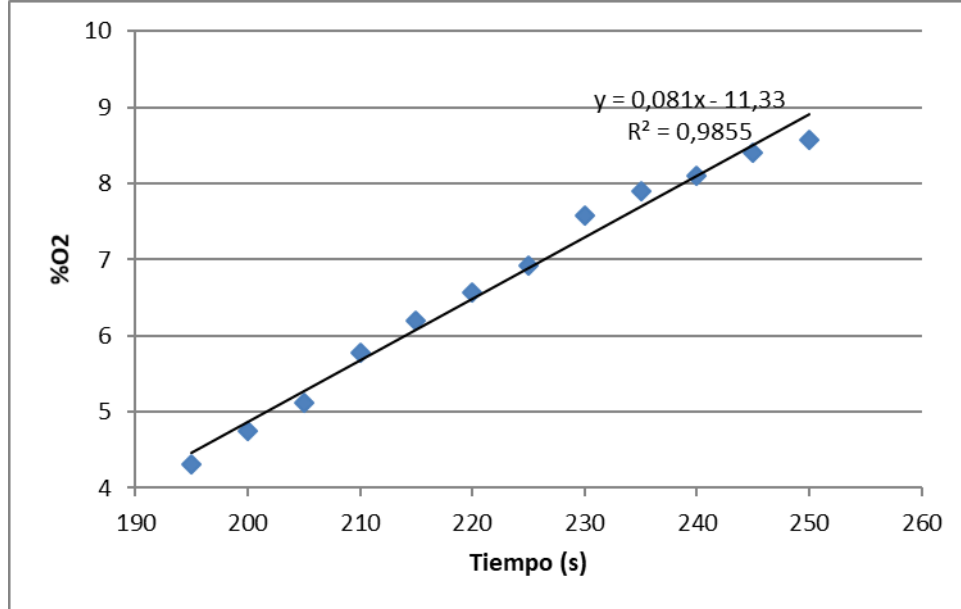
Fuente: elaboración propia.

A continuación, se determinó el K_{La} de manera similar al punto crítico de concentración de oxígeno, debido a que, también se debe retirar la aireación de la fermentación hasta antes de que llegue a la concentración crítica de OD, y reanudar la aireación hasta alcanzar nuevamente el valor inicial⁷². Este experimento se realizó por triplicado, y de igual manera se realizaron gráficas las cuales se pueden encontrar en el **ANEXO D** para así determinar el K_{La} mediante la **Ecuación 2**.

A continuación, se realizará una muestra de la determinación del K_{La} mediante la técnica de eliminación de gases. En la **gráfica 1** se presenta la recta y su respectiva ecuación resultante de graficar %OD vs tiempo, mediante la cual es posible establecer el coeficiente de transferencia de masa, según la **Ecuación 2** el K_{La} es la pendiente de esa recta, en este caso 0,081. Los resultados de cada uno de los experimentos se encuentran en la **sección 3.5**.

⁷² SEPÚLVEDA. Op. cit., p. 56

Gráfica 2. Determinación de K_{La} .



Fuente: elaboración propia.

2.2.2 Determinación de condiciones de escalamiento. Mediante la correlación de Cooper (Ecuación 4) fue posible determinar las condiciones de trabajo para el reactor de 100 litros.

Ardila y Viloría⁷³ establecieron los coeficientes empíricos de Cooper, los cuales se muestran en la Tabla 9. Ellos realizaron las debidas validaciones de los datos con el objetivo de escalar.

Tabla 9. Tabla coeficientes Correlación de Cooper.

θ	8,0666E-01	R^2 0,99
β	-3.6484E-01	
γ	4,9118E-01	

Fuente: ARDILA AREVALO, Kathy Stephanie; VILORIA GARCÍA, Andrés Camilo. Evaluación del escalamiento de la producción de polihidroxicanoatos (pha) por fermentación a partir de la bacteria mutante *Burkholderia cepacia b27* a nivel semi-industrial. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de América. 2017.

El propósito del presente trabajo es determinar si el pulso de fuente de carbono en la fermentación afecta la producción de PHB, estos pulsos fueron determinados de acuerdo a la velocidad de crecimiento como se evidencia en la **sección 3.1**. Por esta razón se utilizaron las constantes de un trabajo realizado con anterioridad en el instituto cuyo objetivo era establecer los parámetros de escalamiento. Dichos

⁷³ ARDILA. Op. cit., p. 53

parámetros son utilizados para las investigaciones que se desarrollan con la cepa mutada *Burkholderia Cepacia B27*.

De igual manera, estos datos fueron utilizados ya que el coeficiente de regresión de este modelo es de 0,99 lo cual demuestra que satisface perfectamente la correlación de Cooper y sirven de herramienta para validar el escalamiento de la estrategia de lote alimentado.

Para continuar con la determinación de las condiciones de escalamiento, se estableció como limitante el motor de agitación del reactor de 100 litros, ya que, la máxima potencia que alcanza son 3600 watts como se observa en la **imagen 4** en donde se muestran las especificaciones del mismo, sin embargo, se tomó un valor de 3000 watts el cual se controlaba mediante un reostato para no llevar al límite el motor y evitar que las células sufrieran lisis celular a causa de la velocidad.

Imagen 4. Condiciones operación motor reactor 100 litros.



Fuente: elaboración propia.

Reemplazando los datos conocidos en la correlación de Cooper (**ecuación 5**), los cuales son la potencia gaseada, el volumen del reactor y los coeficientes presentados en la **tabla 9** se procedió a determinar la velocidad de aireación (V_s) necesaria para obtener el mismo valor de K_{La} en la fermentación en el reactor de 100L.

$$0,0818 = 8,0666E - 01 \left(\frac{3000w}{0,06m^3} \right)^{-3,6484E-01} V_s^{4,9118E-01}$$

$$V_s = 29,328m/s$$

Por último, se realizaron las correspondientes conversiones para finalmente determinar las condiciones de operación en el reactor de 100 litros y llevar a cabo el escalamiento.

Estas conversiones incluyen la determinación de la aireación (Q) a partir de la velocidad de aireación superficial (Vs), para este fin se estableció el área transversal del difusor de un orificio y así hallar el caudal requerido para el reactor de 100L y mantener el K_La determinado, esto mediante la **ecuación 5**.

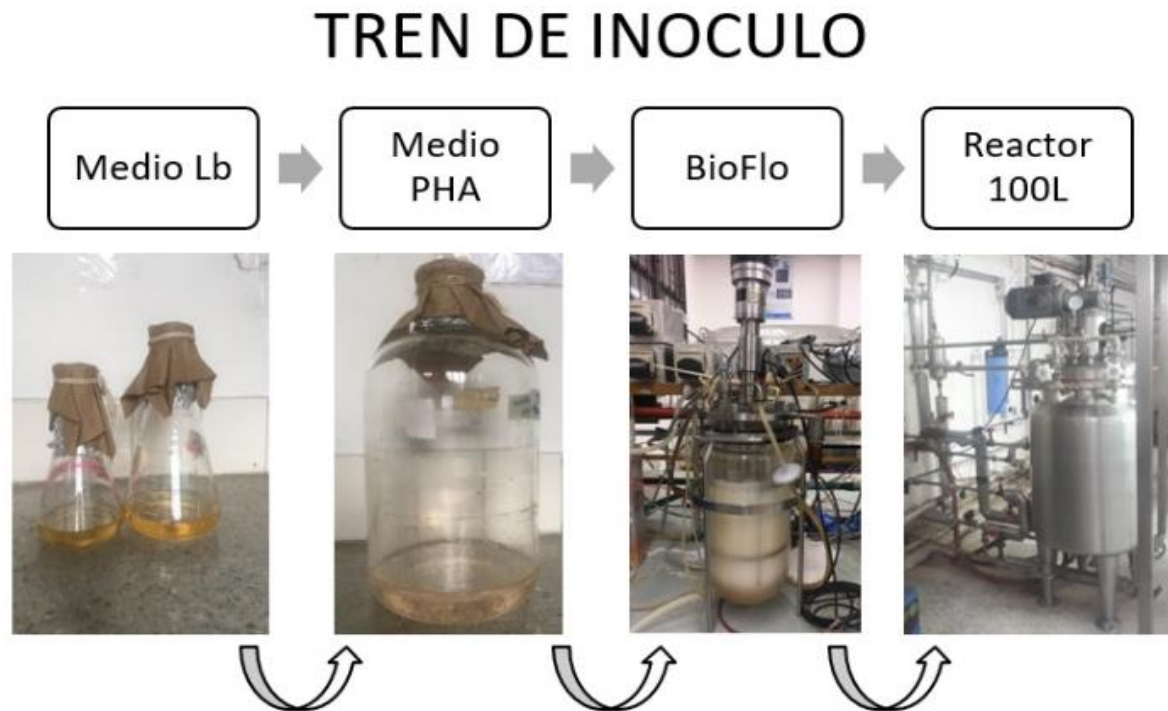
$$A = \pi r^2 = \pi (2 \times 10^{-3})^2 = 1,2566 \times 10^{-5} \text{ m}^2$$
$$Q = 1,2566 \times 10^{-5} \text{ m}^2 * 29,328 \text{ m/s} = 3,6855 \text{ m}^3/\text{s} \rightarrow 22,11 \text{ L/min}$$

2.3 FERMENTACIÓN EN EL REACTOR DE 100 LITROS

Las fermentaciones se llevaron a cabo a 32°C durante 48h en donde la acumulación de polihidroxibutirato está en su mayor punto.

La inoculación en el reactor de 100 litros se efectúa de la misma manera que para el reactor de 7 litros, la única diferencia es que este último reactor pasa a ser el inóculo para el reactor de 100, el protocolo de inoculación se presenta en la **figura 10**.

Figura 9. Tren de inóculo reactor 100 litros.



Fuente: elaboración propia.

Las condiciones de operación se hallaron anteriormente con la correlación de Cooper, las cuales se muestran a continuación:

Tabla 10. Condiciones de operación en el reactor de 100 litros.

Condición	Valores de operación
Agitación	191 rpm
Aireación	22,11 L/min
Temperatura	32°C
pH	7

Fuente: elaboración propia.

Para realizar un seguimiento a las fermentaciones, también se llevaron a cabo cuantificaciones de biomasa y PHB descritos en las **secciones 2.1.3 y 2.1.4.**

2.4 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PHB EN LAS FERMENTACIONES

Al finalizar cada fermentación se desocupa el contenido del reactor en botellas de 2 litros, las cuales son llevadas a esterilizar. Posteriormente se centrifuga lo que se produjo al finalizar la fermentación a 3700rpm durante 10 minutos para así separar el medio de fermentación de la biomasa y PHB, se desecha el sobrenadante y se pesa el pellet y se añade 0,55ml de solución al 20% de SDS por gramo de biomasa, a continuación, se lleva a un baño termostático a 80°C durante 1 hora para efectuar la lisis celular como se nombró anteriormente.

Pasado este tiempo se centrifuga de nuevo a 3700rpm durante 10 minutos y se realizan 3 lavados con agua destilada con el fin de remover completamente la biomasa del PHB. Al finalizar los lavados se sirve el polímero en bandejas o cajas de Petri y se llevan a un horno a 80°C durante 2 días.

Imagen 5. Polímero seco después de ser centrifugado.



Fuente: elaboración propia.

Cuando ya esté completamente seco (**Imagen 5**) se desprende de la bandeja o de la caja y se muele con un molino de cuchillas hasta obtener un polvo uniforme (**Imagen 6**), después, se purifica con cloroformo añadiéndole 10ml por gramo de polvo, esta mezcla se agita a 250rpm durante una hora y se filtra en cajas de Petri para las fermentaciones de 7 litros. Por otro lado, para las de 100 litros se destila el cloroformo y se separa del polímero.

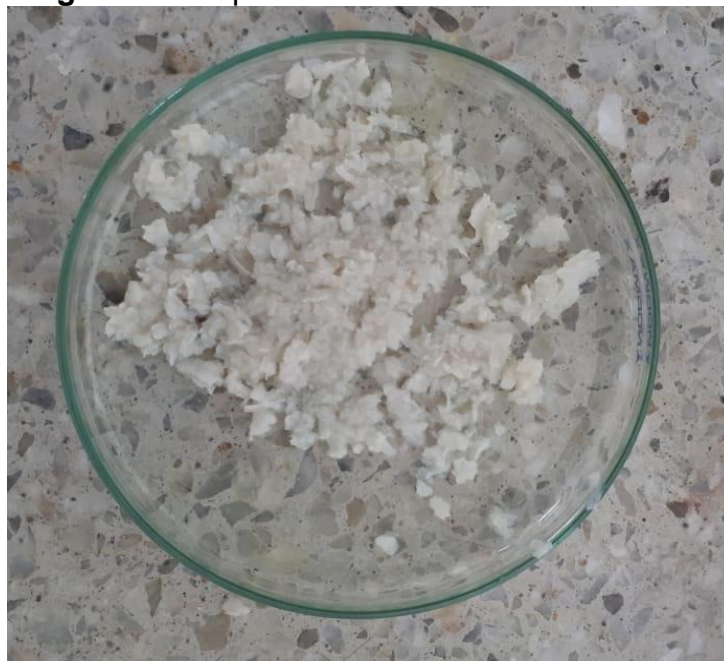
Imagen 6. Polvo uniforme antes de ser purificado.



Fuente: elaboración propia.

A continuación, se realiza una última purificación con metanol para retirar completamente el aceite en el polímero, se agrega 8ml de alcohol por gramo de PHB y se agita a 250rpm durante 40 minutos, pasado este tiempo se centrifuga a 3700rpm durante 10 minutos y se realizan 2 lavados con agua. Al finalizar los lavados se lleva a secar el polímero a un horno a 80°C durante 1 día.⁷⁴

Imagen 7. PHB puro antes de secarse en el horno.



Fuente: elaboración propia.

⁷⁴ RAMOS, Andrés et al., Purification of Poly (3-hydroxybutyrate) Produced by Fatty Acid Fermentation Using Organic Polar Solvents. *Chemical engineering transactions*. vol 67.2008

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En este capítulo se analizarán todos los procedimientos llevados a cabo en el presente trabajo, desde la realización de la cinética de crecimiento con la cual se identificaron los puntos donde agregar los pulsos de fuente de carbono en las siguientes fermentaciones, las cuales fueron realizadas en un biorreactor con volumen de 7L, esto con el fin de obtener la mejor condición para aumentar la producción de polihidroxibutirato. El parámetro con el cual se obtuvo la mejor acumulación se validó en un reactor con una capacidad de 100L, por medio de un escalamiento cuyo parámetro principal fue el coeficiente de transferencia de masa (K_La).

3.1 BALANCE DE MASA

Por medio de los balances de materia y la determinación de los compuestos que intervienen en este, se puede predecir el comportamiento esperado en el biorreactor y es por esto que en el presente trabajo y con el fin de conocer la cantidad de fuente de carbono necesaria para poder obtener 18g/L de biomasa, la cual fue reportada por Méndez⁷⁵ en el instituto de biotecnología (IBUN), se realizó un balance de materia en el cual se tomó como el reactivo principal y producto de interés al ácido Linoleico y a la biomasa, respectivamente.

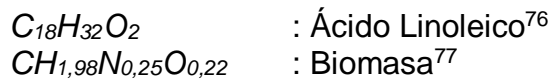
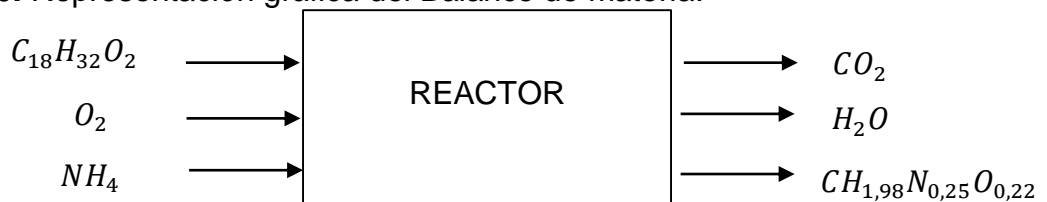


Figura 10. Representación gráfica del Balance de materia.



Fuente: elaboración propia.

⁷⁵ MENDEZ. Op. cit., p. 85

⁷⁶ Salud omega 3. [sitio web]. [Consultado: 29 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://saludomega3.com/ácidos-grasos/ácido-linoleico>

⁷⁷ TORRES OSPINA, Catalina. Formulación de un modelo metabólicamente estructurado para la producción de Polihidroxicanoatos (PHA) a partir de *Burkholderia cepacia*. Tesis maestría. Bogotá. 2019.

Como se mencionó anteriormente, este balance se realizó con base en el ácido Linoleico, ya que este ácido representa el 56,36% del aceite Mazorca de Oro, el cual se utilizó como fuente de carbono en las fermentaciones.

Para conocer los coeficientes de la ecuación de balance se hizo una matriz gaussiana, la cual arrojó las ecuaciones adjuntas en el **Anexo A**, para así poder determinar la concentración de ácido Linoleico, que es el componente de interés.

Tabla 11. Resultados de balance de masa para cada componente.

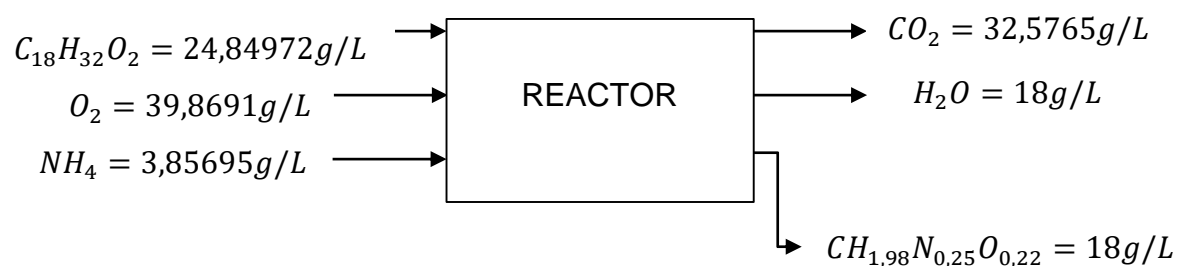
Coeficientes	Valores (mol/L)
a	0,088749
b	1,245909
c	0,214275
d	0,740376
e	1
f	0,8571

Fuente: elaboración propia.

Después de haber obtenido los coeficientes anteriores, se realizaron las respectivas conversiones para cada uno de los elementos que constituyen el balance de materia (**Figura 12**). Y con esto determinar la cantidad de ácido linoleico la cual fue de 24,34972g/L, este valor es el necesario según el balance para obtener los 18g/L de biomasa ya mencionados anteriormente. Conociendo la proporción del ácido Linoleico dentro del aceite vegetal, se pudo establecer la cantidad necesaria de fuente de carbono la cual es de 44,091g/L.

Este valor obtenido de aceite vegetal es el utilizado en la adición del pulso para cumplir con la estrategia de lote alimentado y aumentar la producción de la biomasa a la cantidad propuesta como objetivo.

Figura 11. Representación gráfica del Balance de materia.

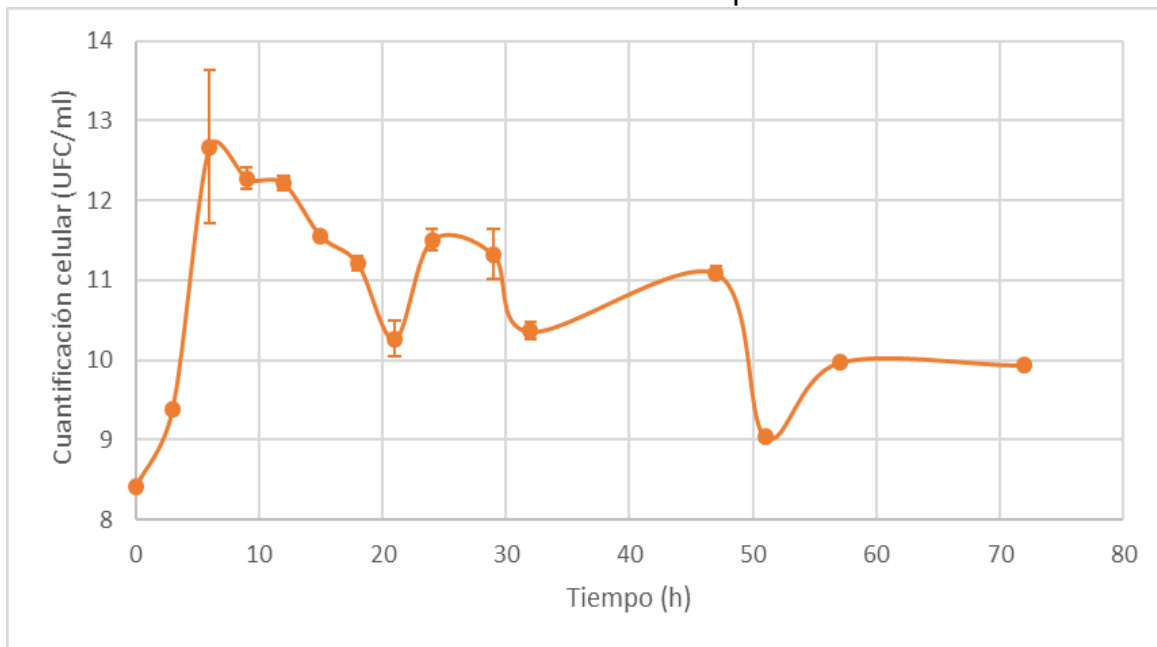


Fuente: elaboración propia.

3.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO *BURKHOLDERIA CEPACIA B27*

Los datos graficados a continuación se evaluaron con base en la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC), producción de biomasa y PHA durante la fermentación por lotes durante 72 horas en BioFlo CelliGen® 115 de 7 litros en donde se maneja un volumen efectivo de 5 litros.

Gráfica 3. Cinética de crecimiento *Burkholderia Cepacia B27* a escala de 7L.



Fuente: elaboración Propia.

En la **gráfica 3** donde se presenta cinética de crecimiento bacteriano, en la cual se evidencia la ausencia de la fase de adaptación del microorganismo, debido a que durante el tren de inóculo la cepa tuvo un tiempo de acondicionamiento en el medio, y como resultado, la fermentación en el biorreactor inició en la fase exponencial, la cual se ve contemplada durante las 6 primeras horas, en esta fase se da el crecimiento celular y consumo de los nutrientes. Según Duarte⁷⁸, en esta etapa no hay limitación de nutrientes, por lo tanto, las células se replican a la máxima velocidad permitida por las condiciones existentes en el medio.

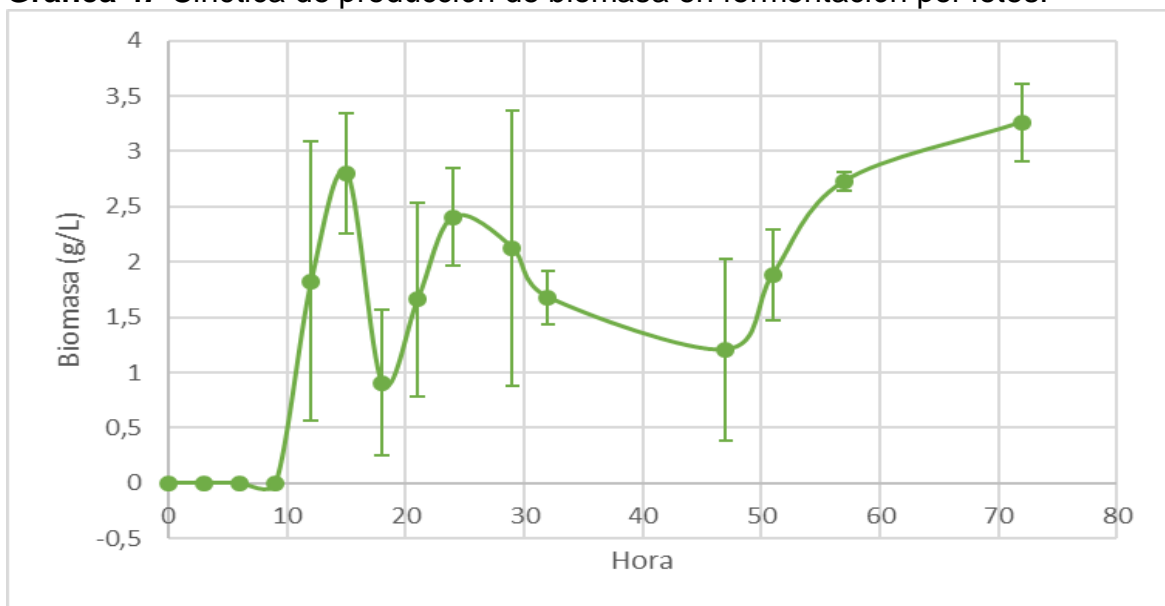
A partir de la hora 6 se empieza a ver el decrecimiento celular lo cual indica el comienzo de la fase de latencia, donde el suministro de los nutrientes esenciales para el crecimiento disminuye, en consecuencia, la velocidad de replicación

⁷⁸ DUARTE. Op. Cit., p.265

bacteriana desciende hasta hacerse casi nula⁷⁹. Otra característica de esta etapa es el balance que se presenta entre las células vivas y muertas.⁸⁰

No obstante, a lo largo de la cinética se presentan numerosas fluctuaciones lo cual indica que el medio en algunos momentos no era el ideal para el crecimiento de la *Burkholderia*, puesto que el pH debe mantenerse entre 6 y 7 y este disminuyó significativamente hasta llegar a 4 en las horas 20 y 51 lo cual provocó que las células detuvieran su crecimiento, debido a que el reactor no cuenta con un sensor de pH y por tal razón no se puede ajustar esta condición inmediatamente, sin embargo, esta condición fue estabilizada, por lo cual los microorganismos continuaron su crecimiento.

Gráfica 4. Cinética de producción de biomasa en fermentación por lotes.



Fuente: elaboración propia.

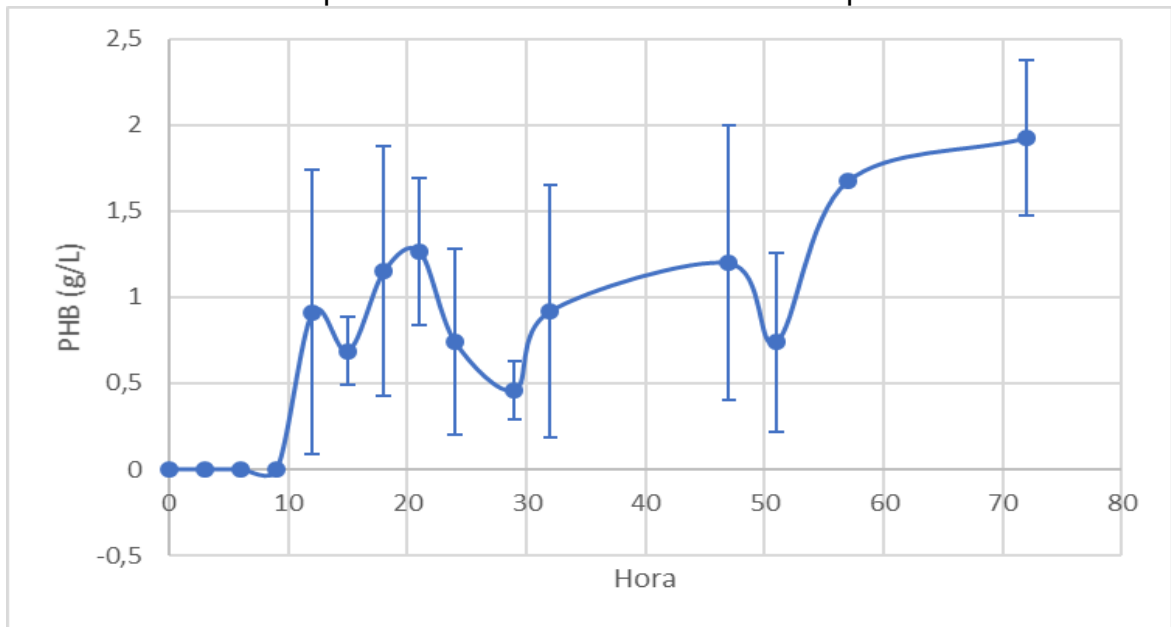
Esta gráfica muestra la cantidad de biomasa en peso seco producida durante la fermentación y como se va incrementando a través del tiempo. Se observa que durante las primeras 9 horas no hay producción de biomasa, esto se debe a que la cantidad de las células que se encuentran en el medio es muy reducida en las primeras horas, lo cual, dificulta la cuantificación de biomasa y este valor tiende a cero.

⁷⁹ BENINTENDE, Silvia y SANCHEZ, Cecilia. Crecimiento bacteriano [En línea]. Entre Ríos. Argentina. [Consultado: 26 de agosto de 2019]. Disponible en: http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano

⁸⁰ Ibid., p. 4

Alrededor de la hora 12 se evidencia que la producción de biomasa aumenta significativamente debido a la acumulación de células vivas y muertas en el medio, este aumento se da hasta la hora 15 aproximadamente, sin embargo se observa un decrecimiento previo a la hora 20 y a la hora 50, ya que como se explicó anteriormente en la cinética de crecimiento de la *Burkholderia B27*, esto se debe a que durante la fermentación hubo cambios en el ambiente y el pH, lo que ocasionó estos cambios en el crecimiento de las células, sin embargo, estas condiciones se estabilizaron y las células continuaron con el proceso de crecimiento como se observa en la **gráfica 4**.

Gráfica 5. Cinética de producción de PHB en fermentación por lotes.



Fuente: elaboración propia.

De acuerdo a lo explicado en la sección 1.1.1 , el polihidroxitirato se acumula en el interior de las células en situaciones de estrés como lo es el agotamiento de las fuentes de carbono y nitrógeno.

En la gráfica anterior se puede observar que, así como en la cinética de crecimiento de la biomasa, la acumulación de polímero las primeras 9 horas tiene un valor de 0, esto debido a que la cantidad de PHB que se encuentra en las células es tan pequeño, este valor tiende a 0, y a partir de esta hora y hasta finalizar la fermentación se ve que la acumulación empieza a aumentar significativamente, con unas excepciones en las horas 15,30 y 50, en donde por cambios de pH y condiciones del medio, este se desestabilizó y provocó estas caídas de polímero, sin embargo se puede ver que al momento de estabilizar estas condiciones el crecimiento empieza a darse de igual manera a como se venía presentando.

3.3 CONDICIONES DE OPERACIÓN

En la **sección 2.1** se detallan las condiciones fijas de operación en un BioFlo CelliGen® 115 de 7 litros en donde se maneja un volumen efectivo de 5 litros.

Sin embargo, en el desarrollo de este trabajo se establecieron otras condiciones de operación variables como lo son la cantidad de fuente de carbono a utilizar y el momento en el cual añadirlo, las cuales fueron determinadas gracias al balance de materia y cinética de crecimiento de la cepa de estudio.

Al determinar dichas condiciones se procede a llevar a cabo las fermentaciones en régimen de lote alimentado las cuales se mostrarán en la **sección 3.4**.

3.4 EVALUACIÓN CONDICIONES

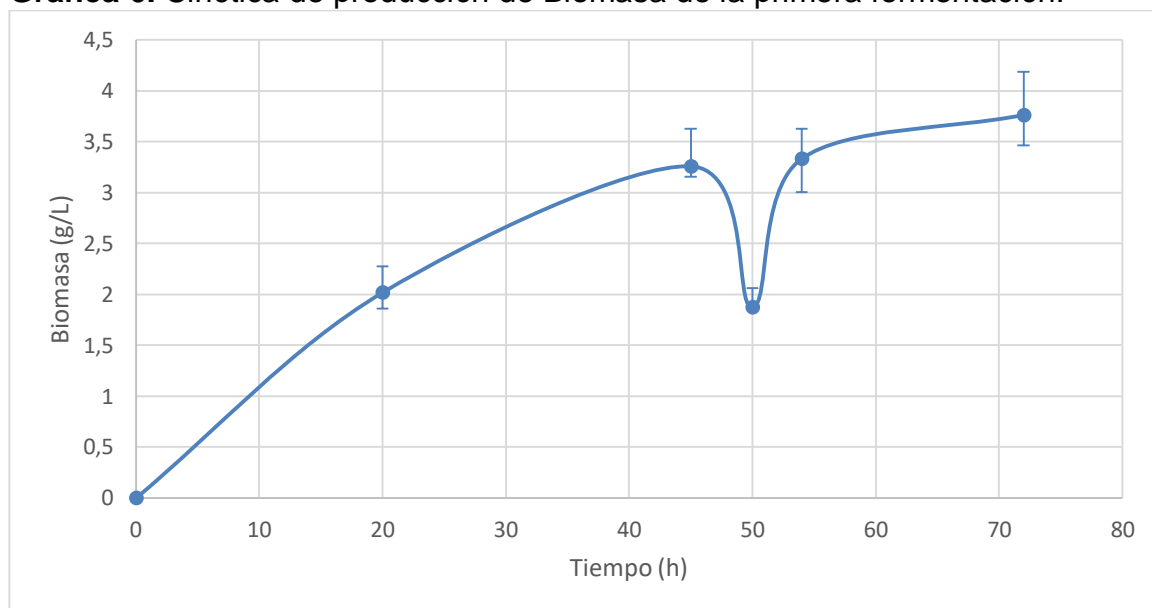
Con el fin de aumentar la producción de polihidroxitirato, se efectuaron 4 fermentaciones con la estrategia de lote alimentado. Para validar dicha estrategia, Méndez⁸¹ evaluó cuatro fermentaciones, tres de ellas las realizó añadiendo pulsos de sustrato en la fase exponencial del crecimiento de la bacteria y la última por alimentación constante.

Los resultados demostraron que con la adición de un solo pulso de la etapa exponencial es posible aumentar la producción de PHB. Por ello, el método seleccionado fue agregar una sola vez fuente de carbono en la fase exponencial en cada una de las fermentaciones.

3.4.1 Primera Condición. En la primera fermentación se le agregó un pulso de 44,091g/L de aceite vegetal en la mitad de la fase exponencial (gráfica 2) la cual es la hora tres.

⁸¹ MENDEZ. Op. cit., p.83-86

Gráfica 6. Cinética de producción de Biomasa de la primera fermentación.



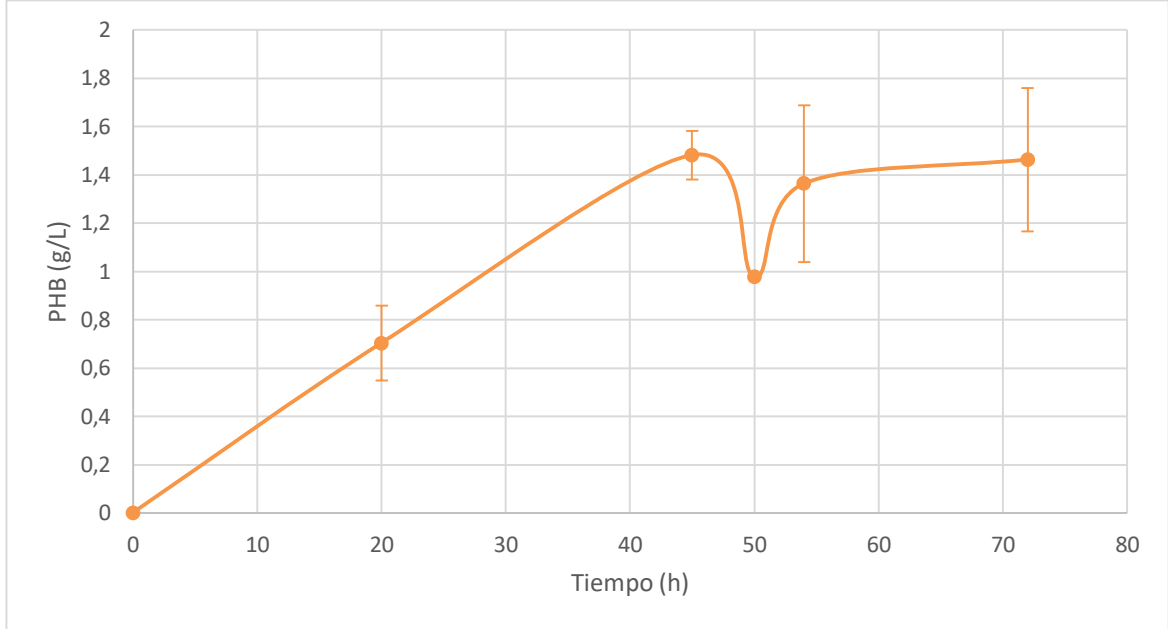
Fuente: elaboración propia.

En la **gráfica 6** se observa que la cantidad de biomasa aumenta significativamente con la adición de este pulso, ya que en la fermentación por lotes en las primeras 9 horas no hay mayor producción de biomasa mientras que en esta fermentación se evidencia que hay obtención a lo largo del proceso. Este incremento es muy importante ya que el producto de interés es intracelular.

Sin embargo, a la hora 50 decae el crecimiento celular, por la disminución de los nutrientes en el medio de cultivo y a la desestabilización de ciertas condiciones como el pH en el medio (**anexo C**), el cual se acidifica debido a la producción de PHB causando así la lisis celular⁸², esto consiste en la ruptura del material celular provocando que el polímero se desprenda de la célula y quede disperso en el medio, no obstante, esta última condición fue estabilizada a un valor de 7 lo que proporcionó un reajuste en el medio. Por otro lado, las células que sobrevivieron al desajuste del pH utilizaron el polímero presente como reserva energética para así poder mantenerse vivas hasta la finalización de la fermentación.

⁸² RODRIGUEZ. Op. cit., p. 25

Gráfica 7. Cinética de producción de PHB de la primera fermentación.



Fuente: elaboración propia.

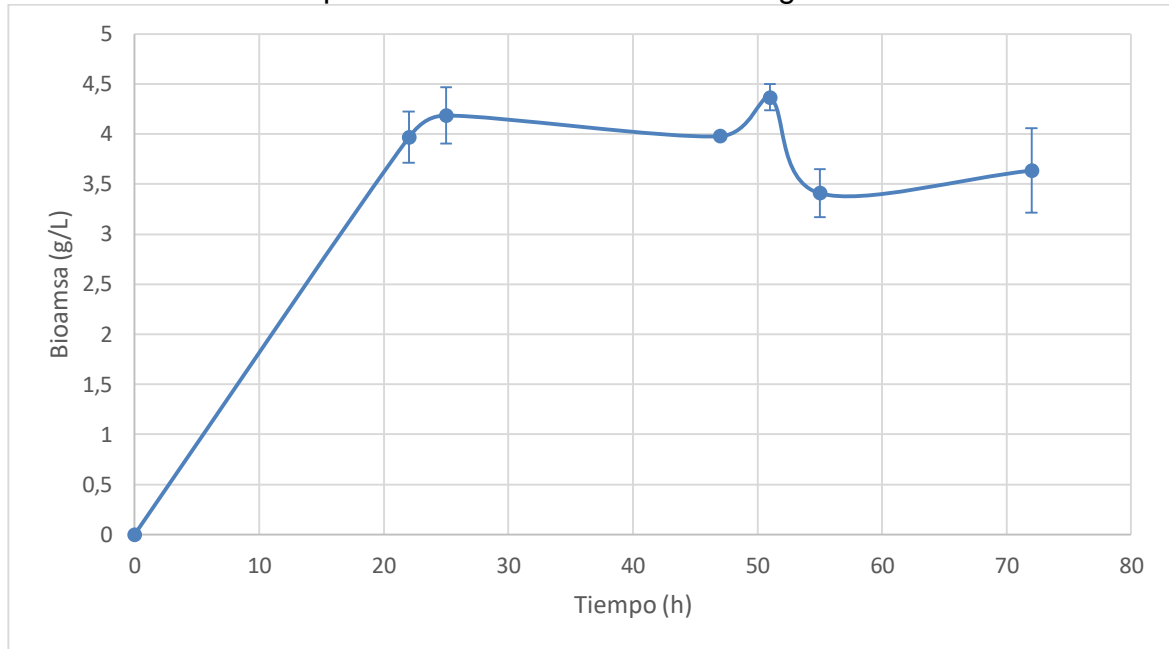
Por otro lado, en la producción de PHB se observó que al principio de la fermentación la producción mejoró, así como se evidencia en la **gráfica 7**, ya que como se sabe es un producto intracelular.

Durante la fermentación se reportó una buena acumulación del polímero, sin embargo, en la hora 50 se presentó una disminución en la producción del biopolímero como sucedió de igual manera con la producción de la biomasa, esta decadencia como se dijo anteriormente se presentó ya que las células durante la desestabilización del medio perdieron el polímero que estuvieron almacenado durante la fermentación hasta ese punto y las células que sobrevivieron lo utilizaron como reserva energética, luego de este punto, cuando en el medio se volvió a ajustar, la producción del polímero se dio de igual manera a como se estaba dando en la fermentación.

Aunque durante la fermentación no se evidencian muchos cambios significativos en el comportamiento de la biomasa y el PHB, la producción final reportada de esta estrategia no es superior a la que se reportó en la fermentación por lotes, es por esta razón que se decide intentar un nuevo pulso para poder lograr una acumulación final mayor.

3.4.2 Segunda Condición. En la segunda fermentación se evaluó un pulso de 44,091 g/L el cual fue agregado al botellón en la hora 22, esto debido a que en la cinética de la producción de biomasa de la fermentación por lotes se evidenció una caída la cual se quería evitar.

Gráfica 8. Cinética de producción de Biomasa de la segunda fermentación.



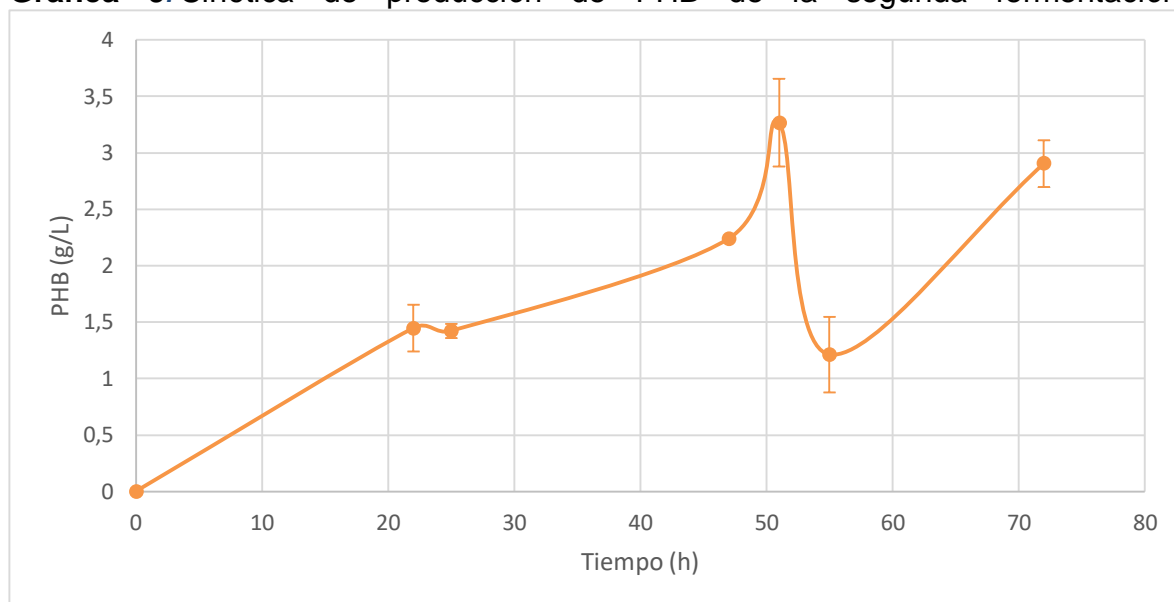
Fuente: elaboración propia.

La **gráfica 8** muestra la producción de biomasa en la fermentación 2, en donde se evidenció que durante las primeras 22 horas hay un crecimiento exponencial debido al consumo de nutrientes en el medio por las células del microorganismo. Luego de este punto, donde se agregó el pulso, se puede ver que el crecimiento de la biomasa siguió aumentando de una forma exponencial evitando la caída de la producción que se dio en la fermentación por lotes (gráfica 3).

Después de la hora 50 se presente un decrecimiento en la cantidad de las células en el medio, esto debido a como se mencionó en la sección 3.4.1, hubo una caída en el pH (**anexo c**) el cual afecto el medio y de igual manera a las células provocando una acidez en el medio que conlleva a la lisis celular. Después de que el pH se vuelve a estabilizar, las células que sobrevivieron a este cambio se recuperan y continúan hasta el final de la fermentación. Según García⁸³ las células reanudan su crecimiento cuando las condiciones de crecimiento sean propicias, como sucede en cada una de los procesos fermentativos en este proyecto.

⁸³ GARCÍA, Rosa. Modificaciones microbiológicas, fisicoquímicas y organolépticas de vegetales envasados en atmósfera modificada. Bases para el establecimiento de los modelos predictivos del crecimiento microbiano. Tesis de doctorado. Córdoba. Universidad de Córdoba. 1995. p. 136.

Gráfica 9. Cinética de producción de PHB de la segunda fermentación.



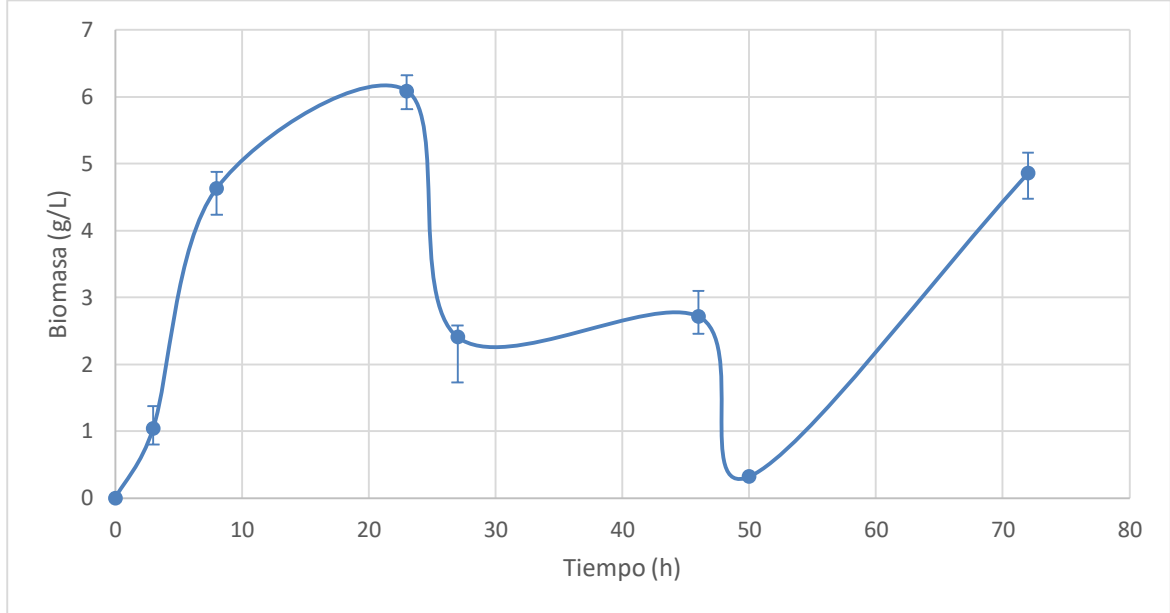
Fuente: elaboración propia.

La producción de PHB se mantuvo en crecimiento constante durante las primeras 50 horas como se puede observar en la **gráfica 9**, después de este punto hubo una disminución considerable en la acumulación del polímero ya que en esta etapa empieza la fase de muerte como se comentó anteriormente, por ende, como mecanismo de sobrevivencia, los microorganismos comienzan a agotar su reserva de carbono, en este caso el PHB. Al momento en que la producción de polímero se da, los nutrientes empiezan a ser cada vez más escasos y el medio se va acidificando, lo que produce que las células, como se mencionó en la sección 3.4.1 sufran una lisis celular y ocurra una ruptura que provoque que pierdan el polímero almacenado el cual es utilizado como reserva energética por las células que sobreviven a este fenómeno. Una vez el medio vuelva a estabilizarse en términos del pH, estas células vuelven a reactivarse y por consiguiente a almacenar de nuevo el polímero.

Aunque hubo un aumento en la producción de polihidroxibutirato en esta fermentación es posible incrementarla aún más, para tal fin se recomienda finalizar la fermentación alrededor de la hora 50, ya que, en este momento se presenta el pico de producción más alto en la gráfica de crecimiento de biomasa (gráfica 6) y en la gráfica de acumulación de PHB (gráfica 7), con valores de 4,5 g/L y 3,3 g/L respectivamente.

3.4.3 Tercera Condición. En la tercera fermentación se agregó un pulso de 44,091g/L al final de la fase exponencial como se muestra en la gráfica 1 (hora 6) con el fin de mantener dicha fase durante más tiempo.

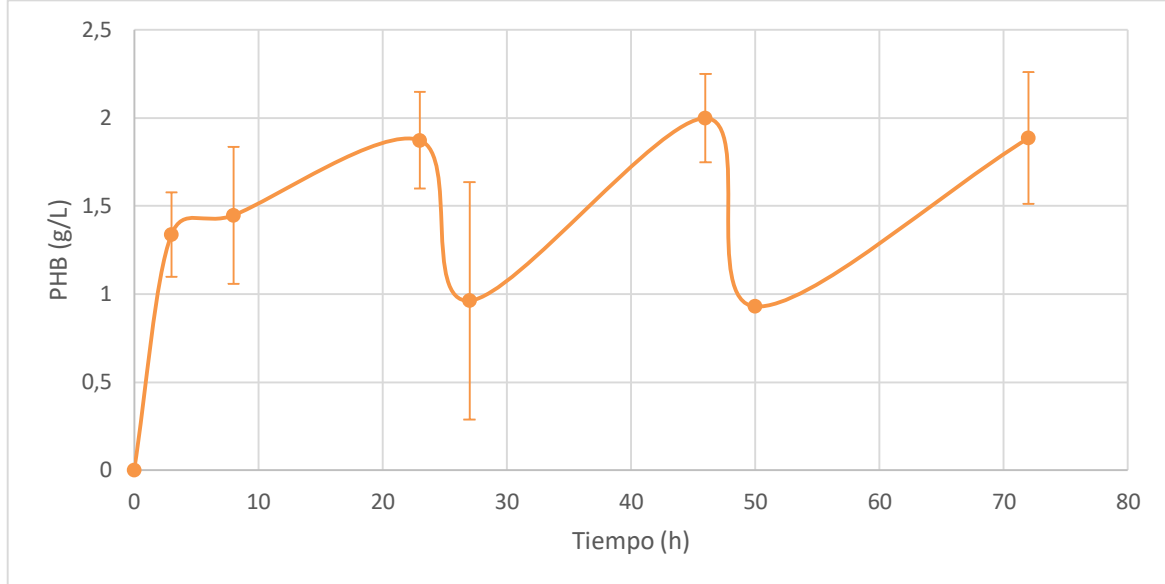
Gráfica 10. Cinética de producción de Biomasa de la tercera fermentación.



Fuente: elaboración propia.

En la **gráfica 10** se puede comprobar que la estrategia del lote alimentando con el pulso, el cual fue agregado al final de la fase exponencial, arrojó los resultados esperados ya que prolonga esta fase hasta la hora 22 en donde hay un consumo de nutrientes y una tasa de crecimiento acelerada. Luego de este punto, como consecuencia del rápido crecimiento de las células, se presentó un agotamiento de nutrientes y se acidificó el medio por la producción de metabolitos lo cual produjo la lisis celular y la cantidad de células disminuyó considerablemente, sin embargo, después de la hora 27 hasta la hora 46 se presenta una fase estacionaria en la cual el número de células se mantiene constante. A la hora 50 se evidencia nuevamente un decaimiento en el crecimiento, no obstante, en el medio esta presenta una gran cantidad PHB el cual las células utilizaron como nutrientes y presentan de nuevo un crecimiento vertiginoso hasta el final de la fermentación.

Gráfica 11. Cinética de producción de PHB de la tercera fermentación.



Fuente: elaboración propia.

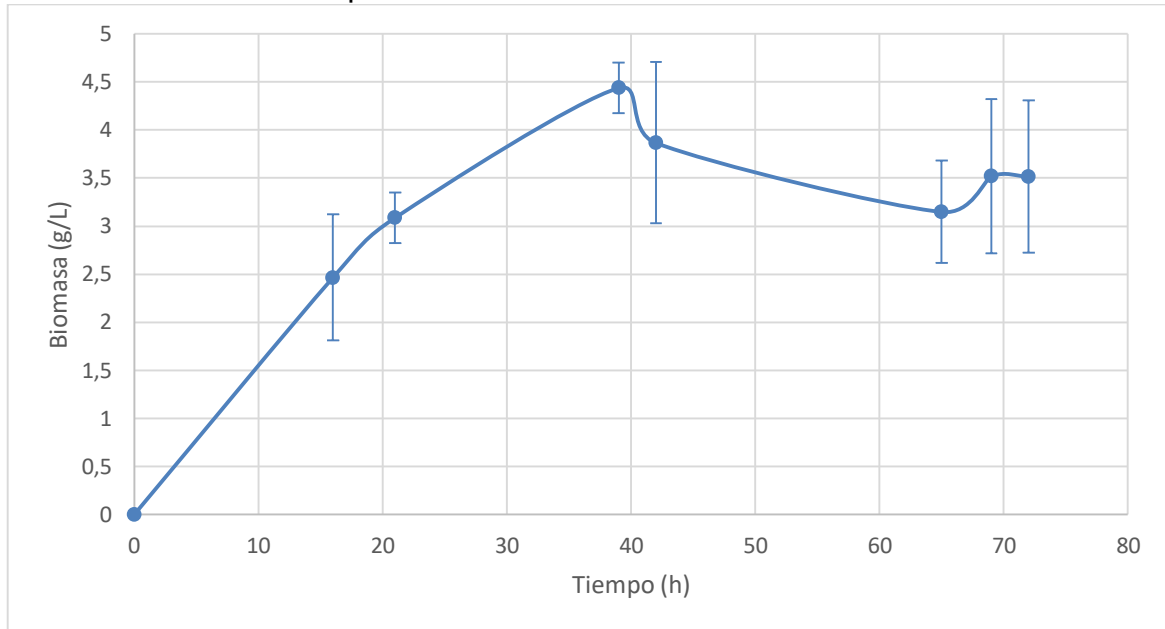
En la producción de PHB se ve un comportamiento similar al de la biomasa, como se evidencia en la **gráfica 11** debido a que como se ha mencionado con anterioridad este producto es intracelular, sin embargo, cuando se presentan limitaciones de los nutrientes en el medio las células empiezan a utilizar el polímero ya acumulado como fuente de energía para sobrevivir. En este caso se presentó dicha situación en las horas 27 y 50, por lo cual se produjeron 2 caídas en la producción del polímero.

De igual manera como sucedió en el crecimiento de la biomasa, se incrementó la acumulación de polihidroxibutirato al finalizar la fermentación debido al estrés por el que se sometieron los microorganismos, ya que, en esta fase de muerte hay insuficiencia de nutrientes esenciales para el buen crecimiento de los mismos y por dicha razón se incrementa la acumulación del polímero.

Debido a estas caídas la producción de PHB se vio afectada, por lo que se obtuvieron al finalizar el proceso 1,8834 g/L de polihidroxibutirato sin purificar, por lo cual se descartó definitivamente este pulso, dado que la obtención del producto de interés fue insuficiente.

3.4.4 Cuarta Condición. En la cuarta fermentación no se añadieron pulsos durante la fermentación, puesto que se agregaron 44,091g/L en el medio de crecimiento con el fin de incrementar la cantidad de biomasa y por lo tanto el producto de interés (PHB).

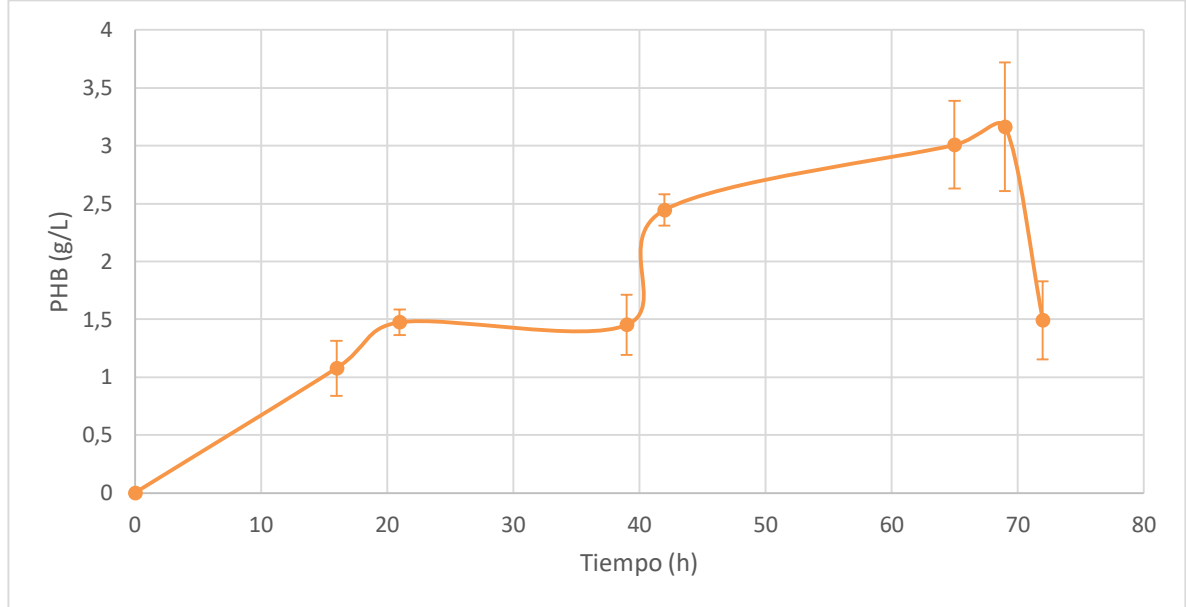
Gráfica 12. Cinética de producción de Biomasa de la cuarta fermentación.



Fuente: elaboración propia.

La producción de biomasa en la cuarta fermentación, como se puede ver en la **gráfica 12**, tiene un crecimiento exponencial hasta la hora 39. Hasta este punto el crecimiento, aunque es bueno, no supera la producción alcanzada en las fermentaciones anteriores (Gráfica 3 y 5). Luego de este punto el crecimiento tiene una caída considerable y continúa decreciendo levemente hasta la hora 65, debido a las condiciones que presentaba el medio en este momento, después de esto, se eleva un poco el crecimiento hasta finalizar la fermentación, ya que como se ha dicho con anterioridad, las condiciones en el medio se estabilizaron y esto fomentó nuevamente el crecimiento.

Gráfica 13. Cinética de producción de PHB de la cuarta fermentación.



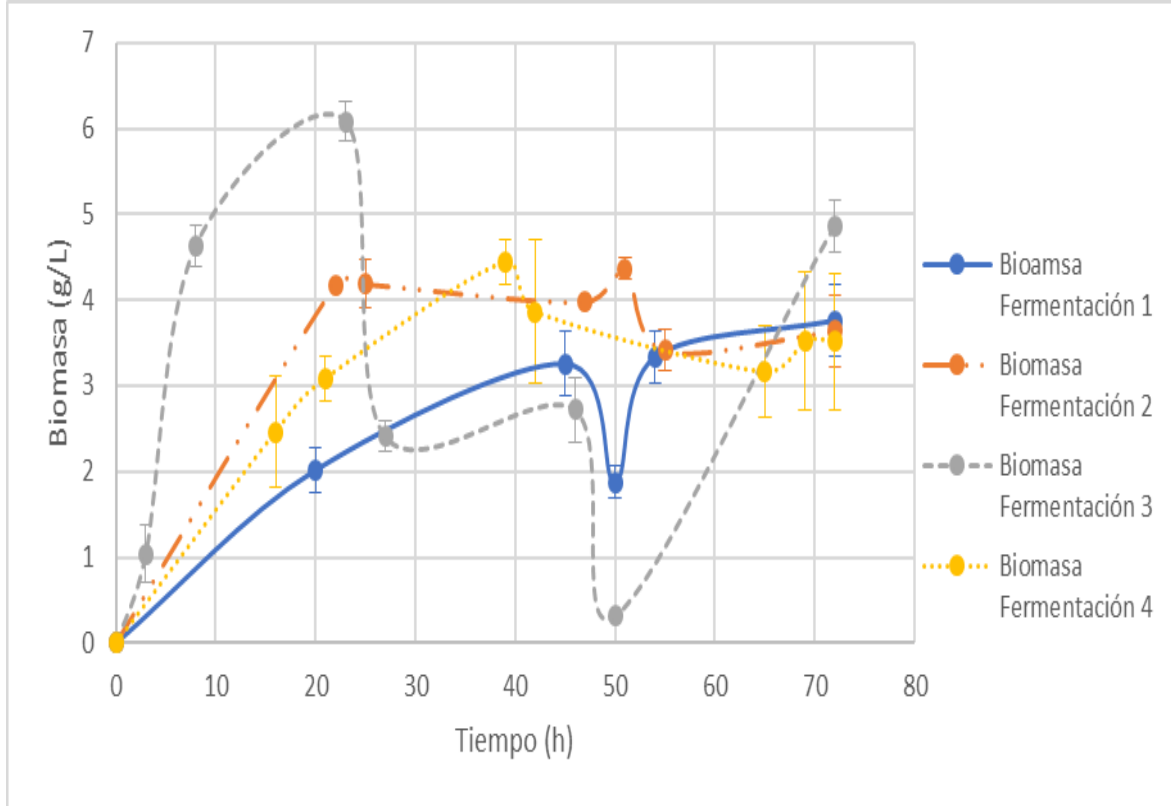
Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, la producción de polímero se presenta de forma casi constante en esta fermentación (**gráfica 13**) hasta finalizarla, en donde se presentó un descenso muy importante en la acumulación debido a que como se ha mencionado las células consumen el polímero como fuente de energía para su supervivencia, por esta razón la acumulación de PHB en las células disminuyó significativamente.

Por consiguiente, se obtuvo al finalizar la fermentación 1,5g/L de polihidroxibutirato sin purificar, esta producción sigue siendo insuficiente, por lo cual esta última fermentación no es viable para ser escalada.

3.4.5 Comparación Condiciones. Las gráficas 13 y 14 muestran claramente las comparaciones entre cada una de las fermentaciones explicadas anteriormente.

Gráfica 14. Comparación de cinética de crecimiento de biomasa.



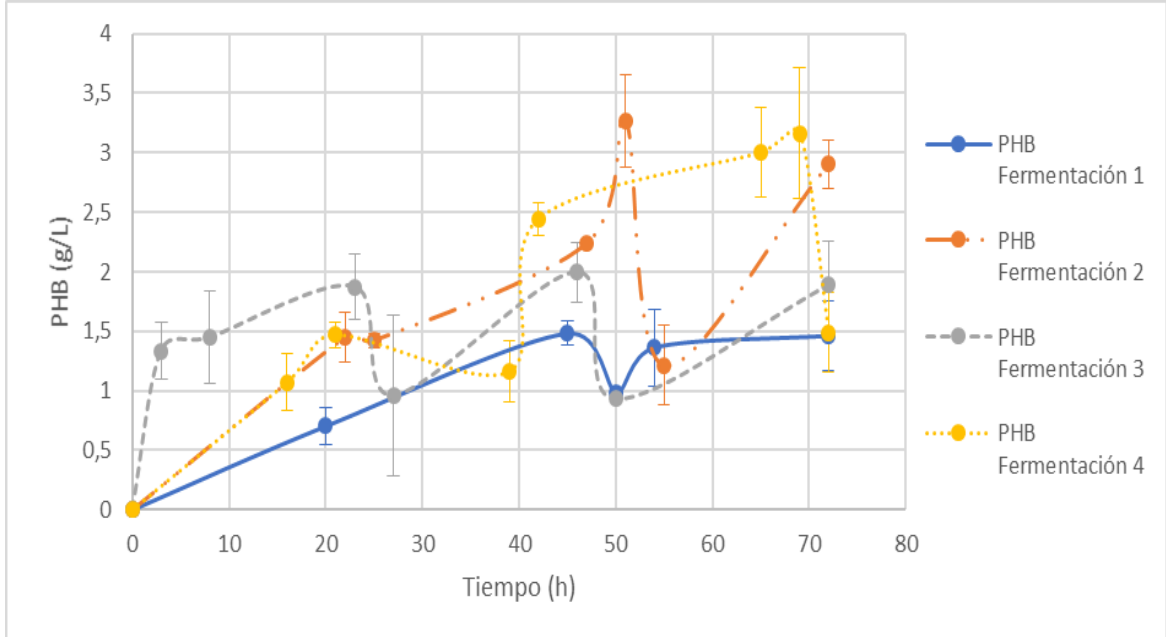
Fuente: elaboración propia.

Con base a lo analizado en las gráficas de crecimiento de biomasa anteriores (**gráficas 6, 8,10 y 12**) se puede ver con más claridad todo el proceso fermentativo con los diferentes pulsos agregados y el crecimiento celular que hubo en cada uno.

Según los resultados arrojados por la gráfica 13, la fermentación número 3 es la que después de las 72 horas reporta una cantidad de biomasa alta (4,85g/L) comparada con las fermentaciones 1,2 y 4 cuyas producciones fueron de 3,76g/L, 3,63g/L y 3,51g/L respectivamente. A pesar de que esta fermentación es la que mayor biomasa reporta entre todas las estrategias durante las 72 horas presentó decrecimiento en varios puntos respecto a la biomasa y su crecimiento estuvo por debajo de las otras estrategias en varias ocasiones.

Por otro lado, las estrategias a tener en cuenta son la 2 y la 4 debido a que a lo largo de la fermentación presentan un comportamiento similar entre ellas como se observa en la gráfica 13 en donde en un lapso de tiempo desde la hora 25 hasta la 55 son las que mayor crecimiento de biomasa reportan en comparación a la fermentación 1, en donde este crecimiento no supera los 3,5g/L.

Gráfica 15. Comparación de cinéticas de producción de PHB.



Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, al comparar las cuatro cinéticas de producción de PHB se corrobora que la segunda fermentación es la mejor estrategia para obtener mayor cantidad de polihidroxibutirato, ya que esta no presenta muchas fluctuaciones y al final de la fermentación reporta una acumulación de aproximadamente 3 g/L, esta producción es mayor que las reportadas en las estrategias 1,3 y 4 las cuales fueron de 1,48 g/L, 1,80g/L y 1,50g/L respectivamente y no alcanzaron a superar la cantidad producida en la fermentación por lotes (Gráfica 5) en donde se reportó una producción de 1,89g/L.

Aunque la producción de PHB se haya mejorado con la técnica de lote alimentado comparándola con la acumulación presentada en la fermentación por lotes (2,98 g/L y 1,89 g/L respectivamente), esta producción no supera la reportada anteriormente en el IBUN. Méndez⁸⁴ en el año 2.016, reportó una producción de 15 g/L de polihidroxibutirato, realizando fermentaciones por lote alimentado, sin embargo, a esta fermentación se le adicionó un pulso de medio de cultivo con mayor cantidad de aceite vegetal y sulfato de amonio lo que contribuyó al crecimiento de la bacteria al reponer los nutrientes esenciales, por ende, también se presenta mayor acumulación de PHB.

⁸⁴ Ibid., p. 85

Tabla 12. Tasa de crecimiento (μ) fermentaciones reactor de 7 litros.

Fermentación 1		Fermentación 2		Fermentación 3		Fermentación 4	
<i>Biomasa</i>	<i>PHB</i>	<i>Biomasa</i>	<i>PHB</i>	<i>Biomasa</i>	<i>PHB</i>	<i>Biomasa</i>	<i>PHB</i>
0,0045	0,017	0,0013	0,0255	0,022	0,019	5,00E-04	0,019

Fuente: elaboración propia.

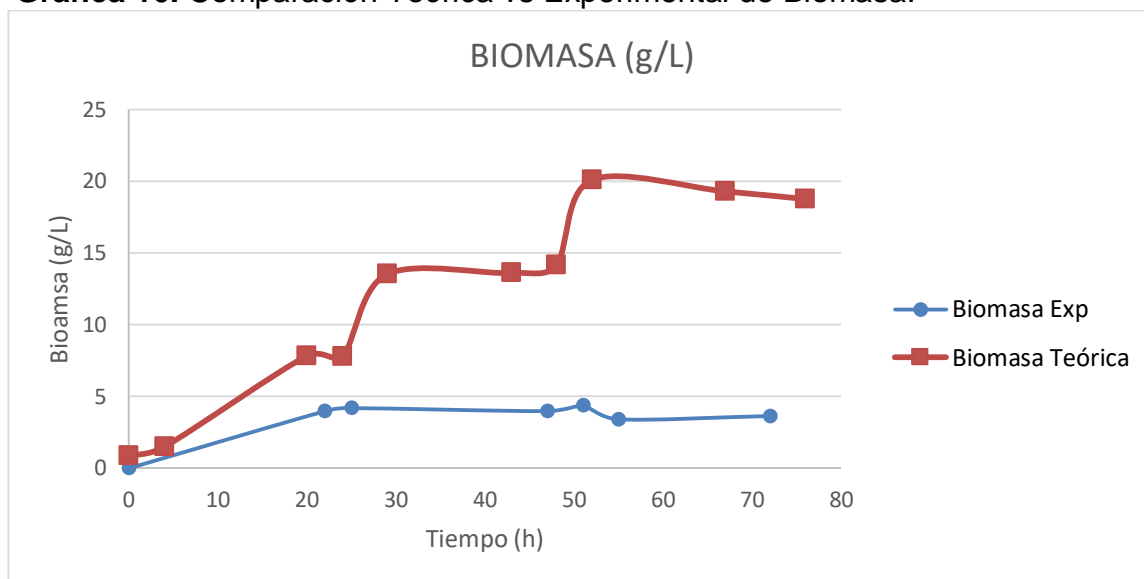
Otro factor importante que se tuvo en cuenta para escoger la estrategia número 2 es la tasa de crecimiento, la cual indica el incremento a través del tiempo de la producción de polímero dentro de las células en la fermentación. En la **tabla 12** se observa que las tasas de crecimiento de biomasa de la fermentación 3 es la mayor como se evidenció en la **gráfica 14**, sin embargo, la tasa de crecimiento para la producción de PHB no reporta la mejor producción, por otro lado, la fermentación 2 se obtuvo una baja cantidad de biomasa, no obstante, la cantidad de polímero no es directamente proporcional a la cantidad de células, sino que se da a la capacidad de producción de las células y las condiciones del medio.

Pero al momento de medir el μ de la producción de PHB se corrobora que fermentación número 2 es la mayor entre las 4 fermentaciones realizadas como se había discutido en la **gráfica 15**, por esta razón se seleccionó esta estrategia como la mejor para ser escalada.

3.4.6 Comparaciones Teórico vs Experimental. En el año 2.016 en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, se llevó a cabo un estudio realizado por Méndez, en el cual su objetivo era modelar el proceso de producción de PHB a partir de la cepa mutada *Burkholderia Cepacia B27*. En este trabajo, Méndez estudio el comportamiento de la fermentación al añadirle pulsos de medio de cultivo.

En la gráfica 16 se compara el crecimiento de la biomasa a través del tiempo con el trabajo realizado por Méndez y la mejor estrategia encontrada en este trabajo.

Gráfica 16. Comparación Teórica vs Experimental de Biomasa.



Fuente: elaboración propia.

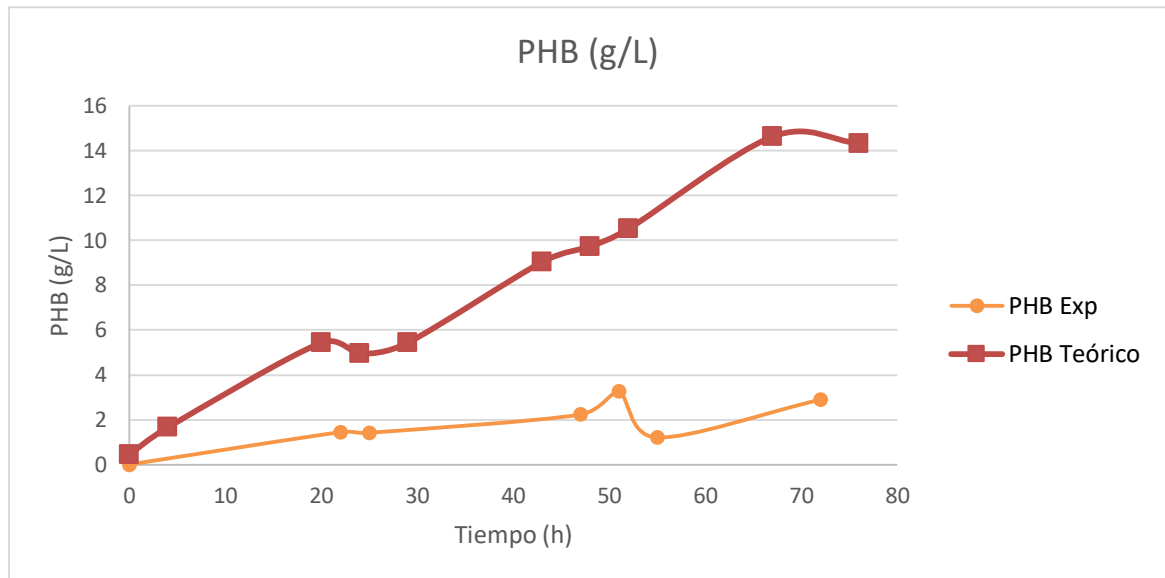
En este caso Méndez⁸⁵ reporta una producción final de 18,77g/L debido a que en este proceso se realizó un pulso a la hora 26 en el cual se agregó medio de cultivo con concentraciones elevadas de fuente de carbono (216g/L) y nitrógeno (28g/L). Estos factores contribuyen al crecimiento celular dado que hay más cantidad de nutrientes en el medio.

Por otro lado, durante la estrategia evaluada en este proyecto el crecimiento de la biomasa, aunque fue constante durante toda la fermentación no supera la reportada anteriormente, puesto que a este proceso solo se le añadió fuente de carbono en menor proporción (44,091g/L) la cual no fue suficiente para estimular el crecimiento celular hasta la cantidad propuesta (18g/L), también un factor importante es que en esta fermentación no se agregó fuente de nitrógeno la cual afecta directamente en el proceso.

En la gráfica 17 se compara la acumulación de PHB en la fermentación llevada a cabo por Méndez y la realizada en el presente trabajo.

⁸⁵ MENDEZ. Op. cit., p. 85

Gráfica 17. Comparación teórica vs experimental de PHB.



Fuente: elaboración propia.

La producción de polímero en el trabajo de Méndez⁸⁶ se presenta de manera exponencial a lo largo de la fermentación debido a que hubo un mayor crecimiento en la biomasa, la producción final en esta fermentación fue de 14,33g/L la cual es 7 veces mayor a la reportada en este trabajo (2,905g/L), sin embargo es evidente que a lo largo de la estrategia de producción evaluada en este proyecto se presenta una producción constante de polihidroxibutirato, por lo cual es válido concluir que la capacidad de acumulación de PHB en la cepa mutada *Burkholderia Cepacia* B27 ha disminuido en estos años.

3.5 ESCALAMIENTO

El escalamiento se realizó en volúmenes de 7 a 100 litros, para este propósito se realizó la determinación del coeficiente de transferencia de masa (K_{La}) por medio del método dinámico explicado anteriormente, el valor obtenido fue de $0,08185s^{-1}$ (**ANEXO D**). La **tabla 13** muestra los resultados obtenidos en cada una de las fermentaciones realizadas para determinar este criterio.

⁸⁶Ibid., p. 85

Tabla 13. Resultados determinación de K_{La} .

Repeticiones	FERMENTACIÓN 1	FERMENTACIÓN 2
$K_{La} 1 (s^{-1})$	0,0799	0,0747
$K_{La} 2 (s^{-1})$	0,082	0,0834
$K_{La} 3 (s^{-1})$	0,09	0,081
PROMEDIO (s^{-1})	0,084	0,0797
K_{La} Final (s^{-1})	0,0818	

Fuente: elaboración propia.

Marín⁸⁷ realizó el escalamiento de una fermentación por lote alimentado en la cual utilizó como criterio el K_{La} , la determinación de este criterio se llevó a cabo mediante la técnica de eliminación de gas, en el cual no se tomó en cuenta el pulso realizado en la fermentación, esto debido a que el K_{La} no se vio afectado por la alimentación de nutrientes al medio. Por esta razón la determinación de este criterio se efectuó a la hora 5, en donde el porcentaje de oxígeno disuelto había disminuido considerablemente.

Por lo tanto, este valor es similar al obtenido por Ardila y Vilorio⁸⁸ el cual fue de $0,073s^{-1}$, lo cual era de esperarse, ya que las condiciones de operación eran las mismas.

3.5.1 Determinación de condiciones de escalamiento. Como se dijo en la sección 2.2.2 la determinación de condiciones para el reactor de 100 litros se realizó mediante la correlación de Cooper. En la tabla 14 se muestra las condiciones halladas para realizar el escalamiento en el fermentador.

Tabla 14. Condiciones de operación en el reactor de 100 litros.

Condición	Valores de operación
Agitación	191 rpm
Aireación	22,11 L/min

Fuente: elaboración propia.

Aunque se esperaba que las condiciones fueran parecidas a las de Ardila y Vilorio⁸⁹ por la similitud en el K_{La} , quienes obtuvieron un valor de K_{La} de $0,073 s^{-1}$ y la de este proyecto fue de $0,0818s^{-1}$. Esto no sucedió, porque ellos evaluaron diferentes condiciones de operación para validar así los coeficientes determinados por ellos, de igual manera, ellos determinaron de forma diferente la potencia gaseada y en consecuencia esto modificó la velocidad de aireación superficial.

⁸⁷ MARÍN. Op. cit., p. 70

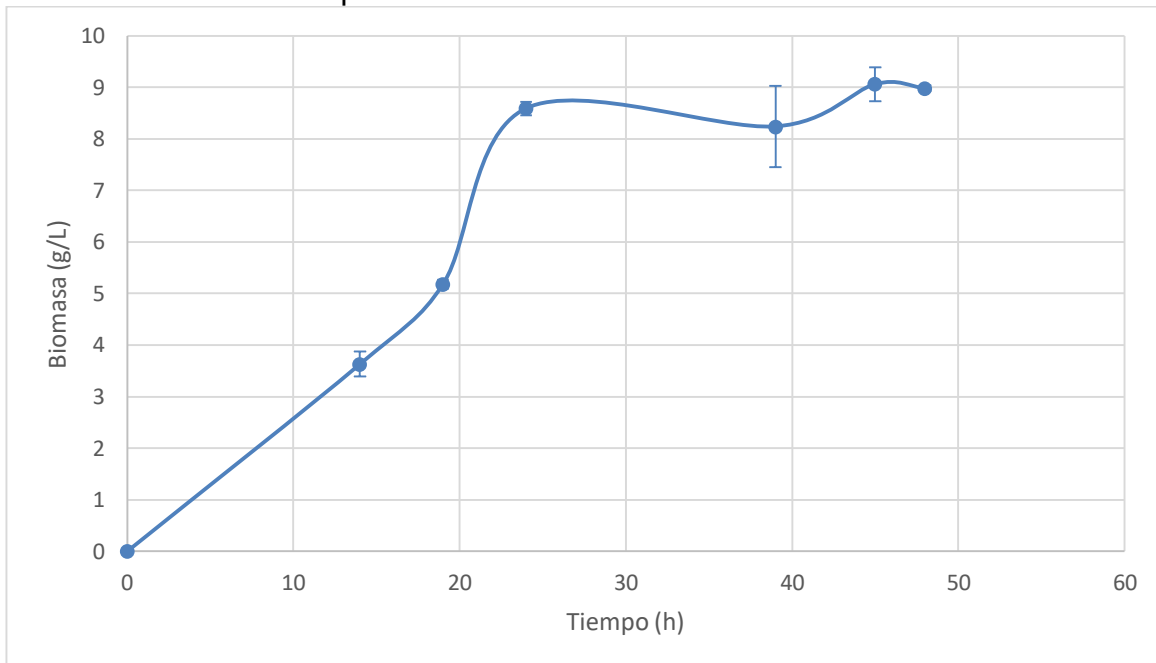
⁸⁸ ARDILA. Op. cit., p. 82

⁸⁹ Ibid., p. 74

3.6 VALIDACIÓN DE ESTRATEGIA DE ESCALAMIENTO

Para validar la estrategia de escalamiento se realizó una fermentación en el reactor de 100 litros, con las condiciones de agitación y aireación encontradas anteriormente. Esta fermentación se hace con el fin de corroborar la adición del pulso a las 22 horas y la producción final reportada en la estrategia escogida en el reactor de 7 litros.

Gráfica 18. Cinética de producción de biomasa reactor 100L.

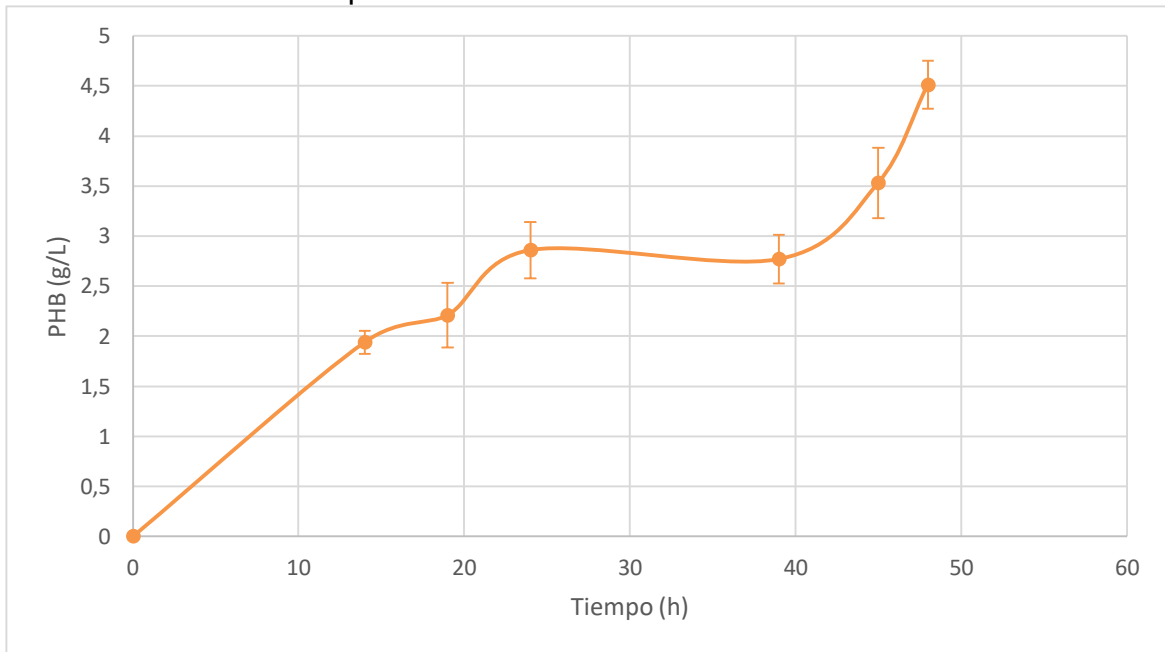


Fuente: elaboración propia.

La **gráfica 18** se puede observar, durante toda la fermentación se ve un incremento constante en el crecimiento bacteriano sin caídas significativas que afectaran la producción final.

Por otro lado, las barras de error muestran una dispersión menor a 2g/L entre los diferentes puntos de la cinética, esto quiere decir que entre las repeticiones realizadas no se observa una diferencia notable y afirma su confiabilidad.

Gráfica 19. Cinética de producción de PHB.

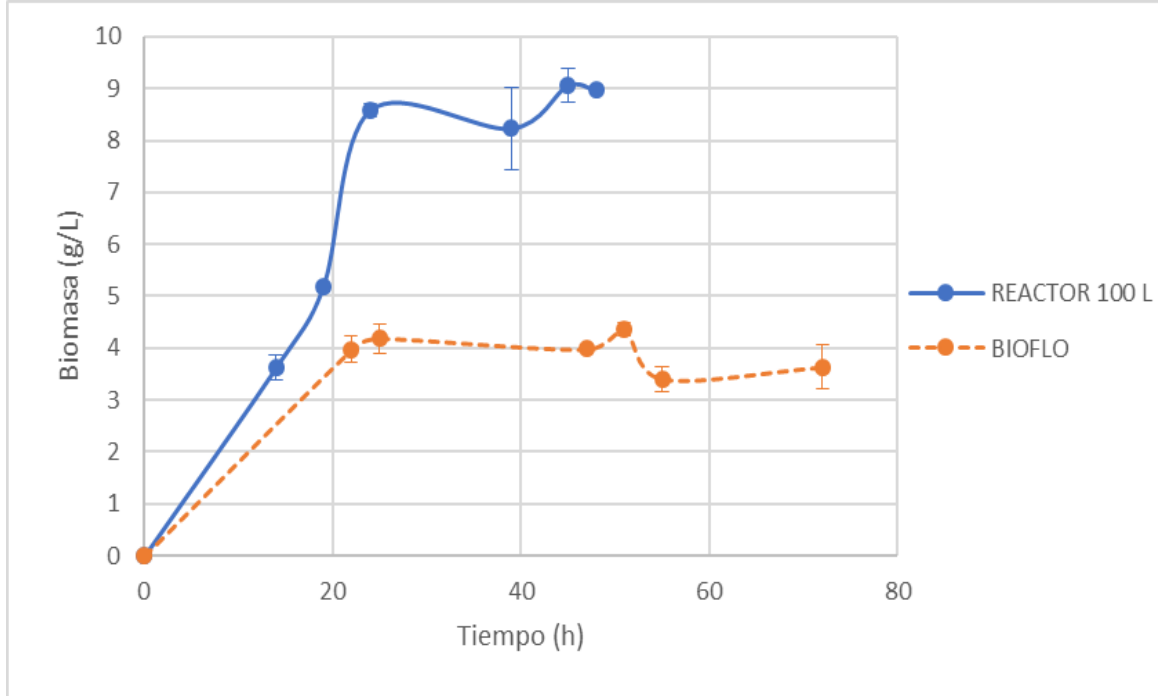


Fuente: elaboración propia.

En la **gráfica 19** se puede observar que la acumulación del polihidroxitirato tuvo un comportamiento similar a la de la producción de la biomasa, mostrando así un incremento constante y al final de la fermentación (hora 48) se reporta un valor de polímero de 4,51 g/L, obteniendo así el comportamiento esperado.

Por último, para validar el escalamiento se hizo una comparación en la producción, esta se observa en las gráficas de las cinéticas de biomasa y PHB en el biorreactor y el reactor de 100 litros como se muestra a continuación.

Gráfica 20. Comparaciones cinéticas de crecimiento Biomasa.



Fuente: elaboración propia.

La **gráfica 20** valida la estrategia de escalamiento puesto que las dos fermentaciones se llevaron a cabo con las mismas condiciones de operación exceptuando la aireación y agitación ya que estas eran necesarias modificarlas para realizar el escalamiento. Como se observa en la **gráfica 20** las dos cinéticas tienen un comportamiento semejante hasta la hora 20, a partir de esa hora el crecimiento de biomasa en el reactor de 100 litros empieza aumentar su velocidad y supera la del biorreactor, debido a que durante el proceso se regularon estrictamente las condiciones en el medio para así evitar perturbaciones que pudieran provocar cambios negativos en el comportamiento. Sin embargo, en las dos fermentaciones se mantuvo el crecimiento constante hasta la hora 48 sin que se presentaran caídas significativas.

Tabla 15. Análisis de varianza de la biomasa reactores 7 y 100 litros.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	7	43,68	6,24	11,97596
Columna 2	7	23,546833	3,3638333	2,303002

ANÁLISIS DE VARIANZA

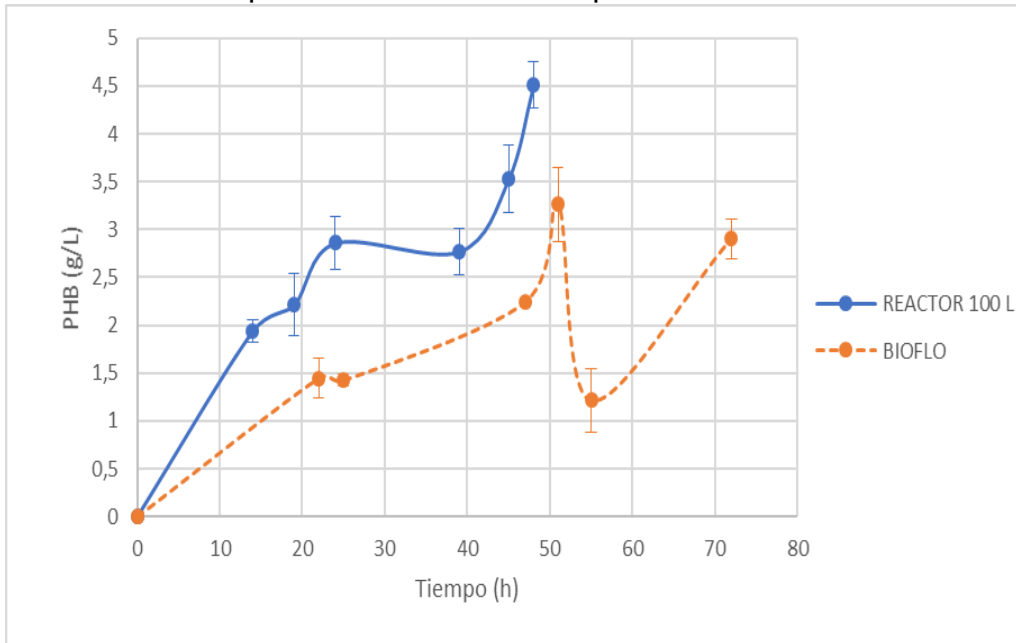
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	28,953	1	28,953	4,055	0,06701	4,7472
Dentro de los grupos	85,673	12	7,139			
Total	114,62	13				

Fuente: elaboración propia.

En la **tabla 15** se realizó un análisis estadístico ANOVA de un factor, el cual indica y determina si las diferencias entre las medias de los dos fermentadores son estadísticamente significativas se llega a esta conclusión basándose en los valores de F, cuando el valor de F crítico es mayor al valor real de F.

Para la producción de biomasa, como se observa en la **tabla 15**, entre el fermentador de 7 y 100 las diferencias entre las medias no son estadísticamente significativas, lo que quiere decir que no hay suficientes datos para rechazar la hipótesis de que las medidas de estos dos grupos son significativamente iguales.

Gráfica 21. Comparaciones cinéticas de producción de PHB.



Fuente: elaboración propia.

De igual manera en la **gráfica 21** se corrobora la estrategia de escalamiento, ya que las dos cinéticas presentan un comportamiento similar a lo largo de la fermentación, en donde la producción de PHB mantuvo un crecimiento constante hasta la hora 48. En este punto se reporta en el reactor de 100 litros una producción de 4,51g/L, superando así la cantidad obtenida en el reactor de 7 litros en este mismo punto que fue de 3,265 g/L.

Tabla 16. Análisis de varianza del PHB en reactores de 7 y 100 litros.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	7	17,82	2,545714	1,98942
Columna 2	7	12,493	1,784714	1,23508

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,026923	1	2,0269	1,257	0,28411	4,747
Dentro de los grupos	19,34707	12	1,6122			
Total	21,37400	13				

Fuente: elaboración propia.

Del mismo modo en que se realizó el análisis de varianza para la biomasa en las dos escalas, también se hizo este análisis de PHB estos resultados se muestran en la **tabla 16** en donde se pudo observar de igual manera que no existe diferencia entre la media de los valores de polímero entre las dos fermentaciones analizadas.

Tabla 17. Tasa de crecimiento (μ) reactores 7 y 100 litros.

Reactor 7L		Reactor 100L	
<i>Biomasa</i>	<i>PHB</i>	<i>Biomasa</i>	<i>PHB</i>
0,0013 h ⁻¹	0,0255 h ⁻¹	0,0247 h ⁻¹	0,0196 h ⁻¹

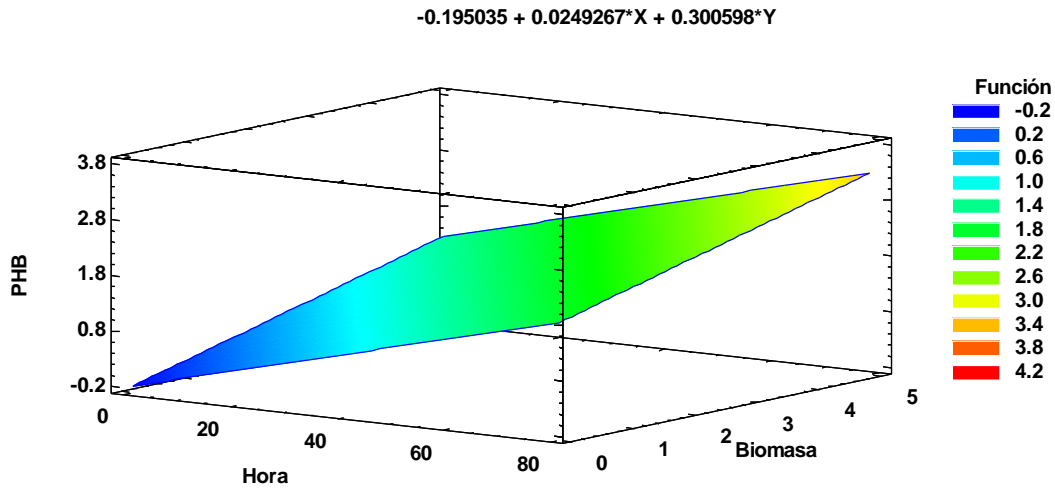
Fuente: elaboración propia.

También, en la **tabla 17** se evaluó la tasa de crecimiento en las dos escalas, la cual nos indica el crecimiento que tiene el microorganismo durante la fermentación respecto al tiempo, para así poder validar de otra manera esta estrategia de escalamiento.

Respecto a la biomasa, se puede ver que hay una gran diferencia entre los dos reactores, siendo la del de 7 litros la menor, esto debido a que como se había mencionado anteriormente durante la fermentación de menor escala hubo puntos donde se presentaron alteraciones en el medio las cuales ocasionaron caídas en la producción de biomasa, con respecto a la producción de PHB hay gran similitud en el incremento del polímero a lo largo de las fermentaciones, validando así la estrategia de escalamiento.

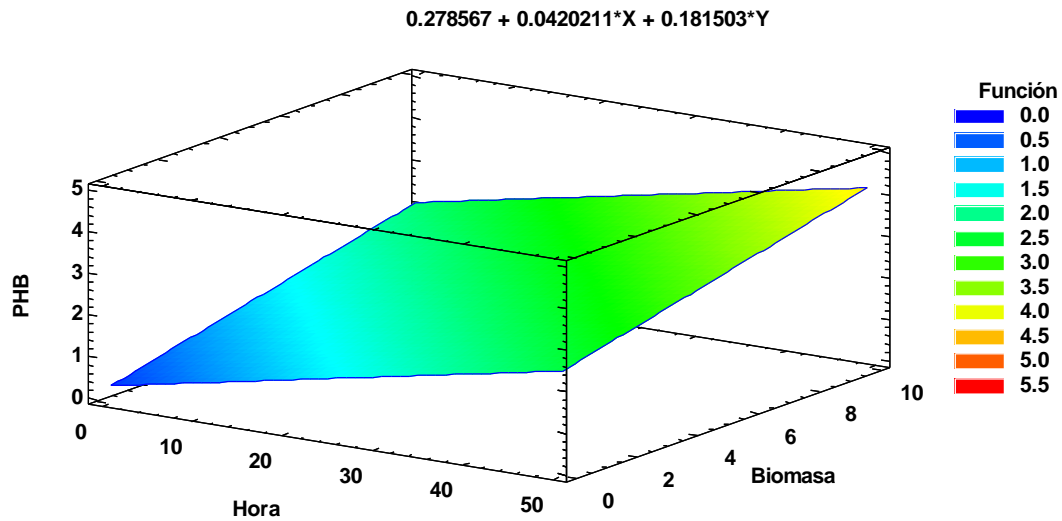
Finalmente se realizaron gráficas de superficie respuesta con el fin de evidenciar de manera más clara las similitudes entre las fermentaciones entre el reactor de 7 litros y 100 litros.

Gráfica 22. Superficie respuesta de reactor de 7 litros.



Fuente: elaboración propia.

Gráfica 23. Superficie respuesta de reactor de 100 litros.



Fuente: elaboración propia.

Se evidencia que se presenta una mayor concentración de PHB en la fermentación de 100 litros debido a que el escalamiento se realizó correctamente ya que al agregar la misma cantidad de fuente de carbono a la misma hora en las dos

fermentaciones se mejoró la producción dada la capacidad. También es evidente en ambas gráficas (gráfica 22 y gráfica 23) que el polihidroxiбутirato es proporcional a la biomasa, ya que es un metabolito primario el cual está asociado con el crecimiento celular.

4. CONCLUSIONES

- Se determinó por medio del balance de materia la cantidad de ácido linoléico que se debe agregar para aumentar la producción de PHB el cual fue de 24,349g/L, esta concentración se agrega por medio de la fuente de carbono en este caso aceite vegetal, en donde este ácido tiene una concentración de 56%, la cantidad de aceite vegetal por litro de medio efectivo es de 44,091g/L.
- Por medio de las cinéticas de crecimiento del microorganismo y la biomasa se determinaron 4 horas en las que se debe agregar la fuente de carbono, las cuales fueron la hora 0; antes de iniciar la fermentación, la hora 3; la mitad de la fase exponencial, hora 6; al finalizar la fase exponencial y hora 22 donde decae el crecimiento de la biomasa.
- Se obtuvo polihidroxibutirato (PHB) por el régimen alimentado y se comprobó que mediante la adición del pulso de fuente de carbono a la fermentación en la hora 22 es posible aumentar en un 43% la producción respecto a una fermentación por lotes ya que este pulso evita caídas significativas en la cinética que perturben el comportamiento final.
- Se estableció como criterio de escalamiento el $K_{La} = 0,08185 \text{ s}^{-1}$ el cual fue determinado en la escala de 7 litros mediante el método de eliminación de gas. Y utilizando la correlación de Cooper se establecieron las condiciones de escalamiento para el reactor de 100 litros, las cuales fueron la agitación y la aireación y como resultado se obtuvieron 191 rpm y 22,11 L/min.
- Se validó la estrategia de escalamiento por medio del comportamiento de la cinética de crecimiento de biomasa y producción de polihidroxibutirato (PHB) entre la fermentación realizada a escala de 7 litros y 100 litros y del análisis estadístico ANOVA en donde los resultados obtenidos muestran que entre los datos obtenidos no hay una diferencia estadística significativa y que la estrategia de lote alimentado se ejecutó correctamente.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar la medición del consumo de los nutrientes durante la fermentación para hacer reposición de estos y así mejorar la producción y acumulación de la biomasa y el polímero a lo largo del proceso fermentativo.
- Evaluar la reposición del medio de cultivo mediante la estrategia de lote alimentado con el fin de mejorar la producción final del polímero.
- Validar la estrategia de escalamiento con la medición del coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) para así tener otro parámetro que compruebe la estrategia.
- Controlar de manera más rigurosa las condiciones del medio durante la fermentación para evitar cambios importantes en el comportamiento de la biomasa y el polímero.
- Evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno realizando fermentaciones con reposición de este nutriente y realizando análisis donde se compare los efectos de la fuente de carbono y nitrógeno en la cepa.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDLER, Rodrigo Álvaro. Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. Technological and market aspects of microbial bioplastics production. En: USFX. 2013.
- ARDILA AREVALO, Kathy Stephanie; VILORIA GARCÍA, Andrés Camilo. Evaluación del escalamiento de la producción de polihidroxicanoatos (pha) por fermentación a partir de la bacteria mutante *Burkholderia cepacia* b27 a nivel semi-industrial. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de América. 2017.
- ATEHORTÚA, Lucía; QUINTERO, Juan; TORRES, Ana. Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno de microorganismos incluyendo el tiempo del electrodo de oxígeno. En: Revista Facultad Ingeniería Universidad de Antioquia. No 43. p. 40.
- BENINTENDE, Silvia y SANCHEZ, Cecilia. Crecimiento bacteriano [En línea]. Entre Ríos. Argentina. [Consultado: 26 de agosto de 2019]. Disponible en: http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano
- CAMACHO, A; GILES, M; ORTEGÓN, A; PALAO, M; SERRANO, B. y VELÁZQUEZ, O. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2 ed. Facultad de Química, UNAM. México. 2009.
- CÓRDOVA, Jesús; GONZÁLEZ, Yolanda; GONZÁLEZ, Orfil; MEZA, Juan. GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda. "Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano." En: Revista internacional de contaminación ambiental. Noviembre, 2012.
- DORAN Pauline. Bioprocess engineering principles. 2 ed. Oxford: Academic Press, 2012. ISBN 978-0-12-220851-5.
- DUARTE, Alberto. Introducción a la ingeniería bioquímica. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.1995.
- DURANGO, Patricia. Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo *Saccharomyces* spp. A nivel laboratorio. Tesis de pregrado, Medellín. Universidad EAFIT. 2007.
- FED BATCH CULTURE [sitio web]. Alchetron. The Free Social Encyclopedia. Alchetron.com [Consultado: junio 13, 2019]. Disponible en: <https://alchetron.com/Fed-batch-culture>

FERNÁNDEZ, Diego. Escalamiento de la fermentación con *Ralstonia Eutropha* para la producción de polihidroxibutirato (PHB) basado en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno *KLa*. Tesis para maestría. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 2007.

GARCÍA, Cirpiano; GONZÁLEZ, María; MEDRANO, Hiram; SOLÍS, Aquiles. Estudio de las condiciones de mezclado en fermentador para la producción de blastosporas de *Beauveria bassiana*. Art. 2013.

GARCÍA, Rosa. Modificaciones microbiológicas, fisicoquímicas y organolépticas de vegetales envasados en atmósfera modificada. Bases para el establecimiento de los modelos predictivos del crecimiento microbiano. Tesis de doctorado. Córdoba. Universidad de Córdoba. 1995

GARCIA OCHOA, Felix. Y GOMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En: BIOTECHNOLOGY ADVANCES. vol. 27, no. 2.

GONZALEZ, Roberto. Principios básicos de escalado. CECYEN. 2000.

HARO, José. Informe unidad II [En línea]. México. 2015. [Consultado: 20 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/289120260/Informe-Unidad-II-Biorreactores-Jose-Nabor-Haro-Gonzalez>

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Compendio de normas para trabajos escritos. NTC-1486-6166. Bogotá D.C. El instituto, 2018 ISBN 9789588585673.

JIMENEZ, Isabel y ROJAS, CAROLINA. Escalamiento para la producción de un biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis subesp. Kurstaki* en fermentadores de 14 y 250L con base en la transferencia de oxígeno. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de los Andes. 2003.

LEMONS DELGADO, Ana Carolina; MINA CORDOBA, Alexis. Polihidroxialcanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. En: INFORMADOR TÉCNICO. Mayo, 2015, vol. 79, no. 1.

LIM, Henry y SHIN, Hwa. Fed-Batch Cultures: Principles and Applications of Semi-Batches bioreactors. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. 452 p. ISBN: 978-0-521-511336-4.

LÓPEZ, Jimmy. Biopolímeros de interés industrial. Síntesis y caracterización de polihidroxibutirato (PHB). 2011.

LYDERSEN, B. D' Elia, N. Nelson, K. Bioprocess Engineering: Systems, Equipment and Facilities. John Wiley & Sons, 1994.

MARÍN, Miguel. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_{La}) y potencia gaseada (P_g/V) como criterios de escalamiento del bioproceso para la producción de dextranasa recombinante en *Pichia pastoris*. Tesis de doctorado. Aguascalientes. Universidad autónoma de Aguascalientes. 2019.

MENDEZ, Daniel; CABEZA, Iván; MORENO, Nubia; RIASCOS, Carlos. Mathematical Modelling and Scale-up of Batch Fermentation with *Burkholderia cepacia* B27 Using Vegetal Oil as Carbon Source to Produce Polyhydroxyalkanoates. En: AIDIC. 2016. Vol. 49.

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

MORENO, Lina; PEREZ, Adrián; RAMIREZ, Margarita; FRANCO, Marcela. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno utilizadas en la elaboración de inoculantes biológico para arveja (*Pisum sativum*) y soya (*Glycine max*). Revista Colombiana de Biotecnología. 2014.

MUÑOZ, Eduardo. Escalamiento de procesos de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática de con células permeabilizadas de *Candida Apicola*. CIATEJ. 2016.

NAUHA, Elina; VISURI, Olli; VERMASVUORI, Raisa y ALOPAEUS, Ville. A new simple approach for the scale-up aerated stirred tanks. En: Aalto University, School of Chemical Technology. 2014.

PEREZ, Francisco. Escalado de una torre de absorción. Universidad de Sevilla. 2016.

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.

QUIRÓS, Jose Pablo. Determinación de modelos para la predicción de los coeficientes volumétricos de transferencia de masa (K_{La}) oxígeno-medio de cultivo en biorreactores tipo tanque agitado. Proyecto de grado. San José. Universidad de Costa Rica. 2014.

RAMOS, Andrés et al., Purification of Poly (3-hydroxybutyrate) Produced by Fatty Acid Fermentation Using Organic Polar Solvents. *Chemical engineering transactions*. vol 67. 2008

RODRIGUEZ, María. Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación. Tesis de doctorado. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. 2015.

ROJAS, Andrés. Fundamentos de procesos químicos. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. 2012. p. 95

SALUD OMEGA 3. [Sitio web]. [Consultado: 29 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://saludomega3.com/acidos-grasos/acido-linoleico>

SÁNCHEZ MORENO, Silvia Alexandra; MARÍN MONTOYA, Mauricio Alejandro; MORA MARTINEZ, Amanda Lucía; YEPES PÉREZ, María del Socorro. Identificación de bacterias productoras de Polihidroxialcanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. En: revista colombiana de biotecnología. Diciembre, 2012. Vol. 14, no. 2.

Scrib [En línea]. [Consultado: 6 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/234876345/FERMENTACION-MICROBIANA>

SEPÚLVEDA, Paul. Evaluación de la velocidad de dilución en un proceso de fermentación continuo de *Escherichia Coli* recombinante productora de α -Amilasa. Tesis de pregrado. Bogotá. Universidad de los Andes. 2005.

SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos.: Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. En: TEORÍA Y PRAXIS INVESTIGATIVA. Vol. 5, no. 2.

SHA, Ma y YANG, Ying. A Beginner's Guide to Bioprocess Modes – Batch, FedBatch, and Continuous Fermentation. En: Eppendorf. No 408, 2019.

TORRES OSPINA, Catalina. Formulación de un modelo metabólicamente estructurado para la producción de Polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de *Burkholderia cepacia*. Tesis maestría. Bogotá. 2019.

XIA, Jianye, *et al.* Advances and Practices of Bioprocess Scale-up. En: East China University of Science and Technology, 2015.

YANG, J., HUANG, J., Y Ni, J. Mathematical modeling of the batch fermentation of *Zoogloea* sp. GY3 used for synthesizing polyhydroxyalkanoates. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 81(5), 789-793. 2006

ANEXOS

ANEXO A.

ECUACIONES Y MATRIZ GAUSSIANA PARA LA DETERMINACION DE COEFICIENTES DEL BALANCE DE MASA

$$f: \text{biomasa} = 18\text{g/L} \longrightarrow 0,8571\text{mol/L}$$

- Balance de Carbono:

$$aC_{18} \rightarrow dC + fC \longrightarrow 18a = d + f$$

- Balance de Oxígeno:

$$aO_2 + bO_2 \rightarrow dO_2 + eO + fO_{0,22} \longrightarrow 2a + 2b = 2d + e + 0,22f$$

- Balance de Hidrógeno:

$$aH_{32} + cH_4 \rightarrow eH_2 + fH_{1,98} \longrightarrow 32a + 4c = 2e + 1,98f$$

- Balance de Nitrógeno:

$$cN \rightarrow fN_{0,25} \longrightarrow c = 0,25f$$

Eliminación Gauss-Jordan

En la columna f se pusieron los datos de la biomasa objetivo en moles (0,8571 mol/L) multiplicado por el coeficiente respectivo de cada componente debido a que en la matriz gaussiana se deja una columna con los valores que se quieren alcanzar.

Tabla 18. Matriz Gaussiana

Compuesto/Coeficiente	a	b	c	d	e	f
C	18	0	0	1	0	0,8571
H	32	0	4	0	-2	1,6971
O	2	2	0	-2	-1	0,1886
N	0	0	1	0	0	0,2143

- Solución

Compuesto/Coeficiente	a	b	c	d	e	f
C	1	0	0	0,0555	0	0,0476
H	32	0	4	0	-2	1,6971
O	2	2	0	-2	-1	0,1886
N	0	0	1	0	0	0,2143

Compuesto/Coeficiente	a	b	c	d	e	f
C	1	0	0	0,0555	0	0,0476
H	0	0	4	-1,7777	-2	0,1734
O	0	2	0	-2,1111	-1	0,09334
N	0	0	1	0	0	0,2143

Compuesto/Coeficiente	a	b	c	d	e	f
C	1	0	0	0,0555	0	0,0476
H	0	1	0	-1,0555	-0,5	0,0467
O	0	0	4	-1,7777	-2	0,1734
N	0	0	1	0	0	0,2143

Compuesto/Coeficiente	a	b	c	d	e	f
C	1	0	0	0,0555	0	0,0476
H	0	1	0	-1,0555	-0,5	0,0467
O	0	0	1	0	0	0,2143
N	0	0	4	-1,7777	-2	0,1734

Compuesto/Coeficiente	a	b	c	d	e	f
C	1	0	0	0,0555	0	0,0476
H	0	1	0	-1,0555	-0,5	0,0467
O	0	0	1	0	0	0,2143
N	0	0	0	-1,7777	-2	-0,6838

Compuesto/Coeficiente	a	b	c	d	e	f
C	1	0	0	0,0555	0	0,0476
H	0	1	0	-1,0555	-0,5	0,0467
O	0	0	1	0	0	0,2143
N	0	0	0	1	1,125	0,3846

Compuesto/Coeficiente	a	b	c	d	e	f
C	1	0	0	0	-0,0625	0,0262

H	0	1	0	0	0,6875	0,4527
O	0	0	1	0	0	0,2143
N	0	0	0	1	1,125	0,3846

a: 0,0262-0,0625e

b: -0,3166+1,5625e

c: 0,2143

d: 0,384624+ 1,125e

e: 1

ANEXO B.

RESULTADOS DE CINÉTICAS DE CRECIMIENTO, BIOMASA Y PHB EN FERMENTACIÓN POR LOTES.

Tabla 19. Recuento de unidades formadoras de colonias.

Hora	UFC (UFC/mL)
0	8,414
3	9,380
6	12,672
9	12,278
12	12,221
15	11,562
18	11,217
21	10,267
24	11,505
29	11,323
32	10,361
47	11,091
51	9,043
57	9,973
72	9,937

Tabla 20. Cuantificación de biomasa en la fermentación.

Hora	BIOMASA (g/L)
0	0
3	0
6	0
9	0
12	1,8466
15	2,8
18	0,9066
21	1,6667
24	2,4067
29	2,1267
32	1,68

47	1,22
51	1,8867
57	2,7267
72	3,26

Tabla 21. Cuantificación de PHB en la fermentación.

Hora	PHA (g/L)
0	0
3	0
6	0
9	0
12	0,91333
15	0,6867
18	1,16
21	1,2667
24	0,7467
29	0,64
32	0,92
47	1,21
51	0,74
57	1,6733
72	1,9244

ANEXO C.

RESULTADOS DE CINÉTICAS DE BIOMASA Y PHB EN FERMENTACIONES POR LOTE ALIMENTADO.

- Fermentación 1

Tabla 22. Cuantificación de biomasa y PHB en el primer experimento de la primera fermentación.

BIOFLO 1				
0h				
BIOMASA (g/L)	0	0	0	0
PHB (g/L)	0	0	0	0
20h				
BIOMASA (g/L)	2,7	2,74	0,06	1,833
PHB (g/L)	1,08	0,7	--	0,89
45h				
BIOMASA (g/L)	0,48	1,32	7,18	2,993
PHB (g/L)	1,6	1,6	1,46	1,553
50h				
BIOMASA (g/L)	2,14	2	1,88	2,006
PHB (g/L)	0,9	0,4	1,62	0,973
54h				
BIOMASA (g/L)	3,48	3,34	3,8	3,54
PHB (g/L)	2,08	1,84	0,86	1,593
72h				
BIOMASA (g/L)	3,32	3,34	3,72	3,46
PHB (g/L)	0,92	2,14	1,96	1,673

Tabla 23. Cuantificación de biomasa y PHB en el segundo experimento de la primera fermentación.

BIOFLO 2				
0h				
BIOMASA (g/L)	0	0	0	0
PHB (g/L)	0	0	0	0
20h				
BIOMASA (g/L)	2,64	3,9	0,06	2,2
PHB (g/L)	0,38	0,22	1,84	0,813

45h				
BIOMASA (g/L)	3,24	4,26	3,06	3,52
PHB (g/L)	1,26	1,56	--	1,41
50h				
BIOMASA (g/L)	0	1,74	--	1,74
PHB (g/L)	0,98	0,98	0,98	0,98
54h				
BIOMASA (g/L)	3,02	3,1	3,24	3,12
PHB (g/L)	0,6	0,72	2,08	1,133
72h				
BIOMASA (g/L)	4	4,76	3,42	4,06
PHB (g/L)	1,38	0,84	1,54	1,253

Tabla 24. Cuantificación de biomasa y PHB en el tercer experimento de la primera fermentación.

BIOFLO 3				
0h				
BIOMASA (g/L)	0	0	0	0
PHB (g/L)	0	0	0	0
20h				
BIOMASA (g/L)	2,45	1,97	1,76	2,06
PHB (g/L)	1,08	0,456	0,765	0,767
45h				
BIOMASA (g/L)	2,39	1,32	3,45	2,387
PHB (g/L)	1,6	0,976	1,45	1,342
50h				
BIOMASA (g/L)	1,597	2,065	1,53	1,730
PHB (g/L)	0,9	0,854	0,997	0,917
54h				
BIOMASA (g/L)	3	3,156	3,54	3,232
PHB (g/L)	1,432	1,032	2,59	1,684
72h				
BIOMASA (g/L)	4,06	3,542	3,054	3,552
PHB (g/L)	1,654	0,996	1,54	1,396

Tabla 25. Promedio de datos, pH y desviaciones estándar.

HORA	BIOMASA	PHB	DS BIOMASA	DS PHB	pH	AJUSTE pH
0	0	0	0	0	7	
20	2,017	0,703	0,259	0,156	6,5	
45	3,257	1,482	0,372	0,101	6	
50	1,873	0,977	0,189	0,005	4,63	7
54	3,330	1,363	0,297	0,325	6,75	
72	3,760	1,463	0,424	0,297	6,05	

- **Fermentación 2**

Tabla 26. Cuantificación de biomasa y PHB en el primer experimento de la segunda fermentación.

BIOFLO 1				
0h				
BIOMASA (g/L)	0	0	0	0
PHB (g/L)	0	0	0	0
22h				
BIOMASA (g/L)	3,72	4,72	4	4,146
PHB (g/L)	1,16	0,82		1,3
25h				
BIOMASA (g/L)	1,38	2,7	4,18	3,987
PHB (g/L)	3,02	0,54	0,84	1,467
47h				
BIOMASA (g/L)	3,48	3,58	--	3,98
PHB (g/L)	2,24	--	--	2,24
51h				
BIOMASA (g/L)	2,4	4,7	5,72	4,273
PHB (g/L)	3,5	4,26	--	3,54
55h				
BIOMASA (g/L)	2,04	1,96	1,72	3,24
PHB (g/L)	1,84	1,44	--	1,45
72h				
BIOMASA (g/L)	1,64	2,42	2	3,34
PHB (g/L)	1,6	0,92	0,24	2,76

Tabla 27. Cuantificación de biomasa y PHB en el segundo experimento de la segunda fermentación.

BIOFLO 2				
0h				
BIOMASA (g/L)	0	0	0	0
PHB (g/L)	0	0	0	0
22h				
BIOMASA (g/L)	3,92	3,62	3,82	3,787
PHB (g/L)	1,02	1,68	2,08	1,593
25h				
BIOMASA (g/L)	3,06	4,44	5,66	4,386
PHB (g/L)	--	1,52	1,24	1,38
51h				
BIOMASA (g/L)	4,96	5	3,42	4,46
PHB (g/L)	2,98	1,2	2,04	2,99
55h				
BIOMASA (g/L)	4,08	2,6	4,06	3,58
PHB (g/L)	1,48	0,12	0,24	0,976
72h				
BIOMASA (g/L)	5,06	2,6	4,14	3,933
PHB (g/L)	0,88	5,22	--	3,05

Tabla 28. Cuantificación de biomasa y PHB en el tercer experimento de la segunda fermentación.

BIOFLO 3				
0h				
BIOMASA (g/L)	0	0	0	0
PHB (g/L)	0	0	0	0
6h				
BIOMASA (g/L)	6	4,72	4,96	5,227
PHB (g/L)	1,1	2,14	1,32	1,52
22h				
BIOMASA (g/L)	1	1,4	--	1,2
PHB (g/L)	2,5	--	3,96	3,23
27h				
BIOMASA (g/L)	2,86	2,32	4,96	3,64
PHB (g/L)	3	2,34	2,92	2,753

46h				
BIOMASA (g/L)	6,32	0,62	--	3,47
PHB (g/L)	3,72	3,08	--	3,4
50h				
BIOMASA (g/L)	4,96	3,72	--	4,34
PHB (g/L)	0,08	0,2	1,22	0,5
72h				
BIOMASA (g/L)	2,4	4,28	--	3,34
PHB (g/L)	1,06	4,82	1,86	2,58

Tabla 29. Promedio de datos, pH y desviaciones estándar.

HORA	BIOMASA (g/L)	PHB (g/L)	DS BIOMASA	DS PHB	pH	AJUSTE pH
0	0	0	0	0	7	
22	3,967	1,447	0,255	0,207	6,47	
25	4,187	1,423	0,283	0,061	6,40	
47	3,980	2,240	0,000	0,000	6,06	
51	4,367	3,265	0,132	0,389	6,00	
55	3,410	1,213	0,240	0,335	5,34	7
72	3,637	2,905	0,420	0,205	6,17	

- **Fermentación 3**

Tabla 30. Cuantificación de biomasa y PHB en el primer experimento de la tercera fermentación.

BIOFLO 1				
0h				
BIOMASA (g/L)	0	0	0	0
PHB (g/L)	0	0	0	0
3h				
BIOMASA (g/L)	1,08	1,58	1,18	1,28
PHB (g/L)	1,72	0,5	1,28	1,167
8h				
BIOMASA (g/L)	3,36	4,08	5,9	4,447
PHB (g/L)	1,82	0,78	0,28	0,96
23h				
BIOMASA (g/L)	6,88	5,94	5,94	6,253

PHB (g/L)	2,78	1,16	1,1	1,68
48h				
BIOMASA (g/L)	1,92	2,66	--	2,29
PHB (g/L)	1,98	1,74	--	1,86
72h				
BIOMASA (g/L)	6,56	4,48	4,48	5,173
PHB (g/L)	3,1	0,3	0,96	1,453

Tabla 31. Cuantificación de biomasa y PHB en el segundo experimento de la tercera fermentación.

BIOFLO 2				
0h				
BIOMASA (g/L)	0	0	0	0
PHB (g/L)	0	0	0	0
3h				
BIOMASA (g/L)	--	0,6	1	0,8
PHB (g/L)	1,86	1,82	0,84	1,507
8h				
BIOMASA (g/L)	3,96	5,08	--	4,52
PHB (g/L)	1,48	1,54	--	1,51
23h				
BIOMASA (g/L)	5,88	5,96	--	5,92
PHB (g/L)	2,4	2,82	0,98	2,067
27h				
BIOMASA (g/L)	2,86	2,2	--	2,53
PHB (g/L)	0,8	0,22	0,44	0,487
48h				
BIOMASA (g/L)	3,88	2,64	2,6	3,04
PHB (g/L)	1,06	1,72	2,76	1,847
72h				
BIOMASA (g/L)	4,44	4,68	4,56	4,56
PHB (g/L)	2,66	2,5	1,18	2,113

Tabla 32. Cuantificación de biomasa y PHB en el tercer experimento de la tercera fermentación.

BIOFLO 3				
0h				
BIOMASA (g/L)	0	0	0	0
PHB (g/L)	0	0	0	0
6h				
BIOMASA (g/L)	--	3,24	6,58	4,91
PHB (g/L)	1,5	1,4	2,72	1,873
27h				
BIOMASA (g/L)	3,32	2,4	2,16	2,28
PHB (g/L)	1,7	--	1,18	1,44
46h				
BIOMASA (g/L)	2,54	3,84	2,04	2,807
PHB (g/L)	2,6	--	1,98	2,29
50h				
BIOMASA (g/L)	0,56	0,08	--	0,32
PHB (g/L)	1,16	0,7	--	0,93
72h				
BIOMASA (g/L)	5,02	5,12	4,36	4,833
PHB (g/L)	2,46	2,18	1,64	2,093

Tabla 33. Promedio de datos, pH y desviaciones estándar.

HORA	BIOMASA (g/L)	PHB (g/L)	DS BIOMASA	DS PHB	pH	AJUSTE pH
0	0	0	0	0	7	
3	1,040	1,337	0,339	0,240	6,95	
8	4,626	1,448	0,249	0,389	6,87	
23	6,087	1,873	0,236	0,273	6,35	
27	2,405	0,963	0,177	0,674	5,42	7
46	2,712	1,999	0,384	0,252	6,11	
50	0,320	0,930	0,000	0,000	5,38	7
72	4,856	1,887	0,307	0,375	6,45	

- Fermentación 4

Tabla 34. Cuantificación de biomasa y PHB en el primer experimento de la cuarta fermentación.

BIOFLO 1				
0h				
BIOMASA (g/L)	0	0	0	0
PHB (g/L)	0	0	0	0
16h				
BIOMASA (g/L)	2,98	2,18	--	2,58
PHB (g/L)	1,24	0,76	0,42	0,807
21h				
BIOMASA (g/L)	2,78	3,26	--	3,02
PHB (g/L)	1,14	1,88	--	1,51
39h				
BIOMASA (g/L)	4,42	4,24	5,56	4,74
PHB (g/L)	0,16	2,16	--	1,16
42h				
BIOMASA (g/L)	2,8	2,2	3,7	2,9
PHB (g/L)	2,28	2,24	2,82	2,447
65h				
BIOMASA (g/L)	3,62	3,44		3,53
PHB (g/L)	3,1	3,78		3,44
69h				
BIOMASA (g/L)	2,88	6,48	1,5	3,62
PHB (g/L)	3,52	3,18		3,35
72h				
BIOMASA (g/L)	3,24	0,36	4,26	2,62
PHB (g/L)		2,08	0,32	1,2

Tabla 35. Cuantificación de biomasa y PHB en el segundo experimento de la cuarta fermentación.

BIOFLO 2				
0h				
BIOMASA (g/L)	0	0	0	0
PHB (g/L)	0	0	0	0
16h				
BIOMASA (g/L)	1,26	2,26	--	1,76

PHB (g/L)	0,6	1,26	1,7	1,187
21h				
BIOMASA (g/L)	2,9	2,5	3,2	2,867
PHB (g/L)	1,02	1,68	--	1,35
39h				
BIOMASA (g/L)	4,38	4,3	4,34	4,34
PHB (g/L)	1,64	1,68	--	1,66
42h				
BIOMASA (g/L)	4,26	4,3	4,32	4,293
PHB (g/L)	2,32	2,84	--	2,58
65h				
BIOMASA (g/L)	2,58	2,5	--	2,54
PHB (g/L)	2,36	3,22	2,64	2,74
69h				
BIOMASA (g/L)	3,64	1,1	3,28	2,673
PHB (g/L)	3,6	1,48	--	2,54
72h				
BIOMASA (g/L)	3,7	4,46	4,2	4,12
PHB (g/L)	1,3	1,9	2,38	1,86

Tabla 36. Cuantificación de biomasa y PHB en el tercer experimento de la cuarta fermentación.

BIOFLO 3				
0h				
BIOMASA (g/L)	0	0	0	0
PHB (g/L)	0	0	0	0
16h				
BIOMASA (g/L)	3,96	2,16	2,38	3,06
PHB (g/L)	1,3	1,18	--	1,24
21h				
BIOMASA (g/L)	3,74	3,02	--	3,38
PHB (g/L)	1,62	1,5	--	1,56
39h				
BIOMASA (g/L)	3,96	4,52	--	4,24
PHB (g/L)	1,36	1,92	1,32	1,533
42h				
BIOMASA (g/L)	3,98	--	4,84	4,41

PHB (g/L)	1,9	3,04	1,98	2,307
65h				
BIOMASA (g/L)	3,74	3,02	--	3,38
PHB (g/L)	3,58	2,1		2,84
69h				
BIOMASA (g/L)	5,76	0,66	6,38	4,267
PHB (g/L)	--	3,4	3,8	3,6
72h				
BIOMASA (g/L)	3,62	4	--	3,81
PHB (g/L)	1,14	0,58	2,5	1,407

Tabla 37. Promedio de datos, pH y desviaciones estándar.

HORA	BIOMASA (g/L)	PHB (g/L)	DS BIOMASA	DS PHB	pH	AJUSTE pH
0	0	0	0	0	7	
16	2,467	1,078	0,657	0,236	6,44	
21	3,089	1,473	0,264	0,110	6,28	
39	4,440	1,451	0,265	0,260	6	
42	3,868	2,444	0,840	0,137	5,06	7
65	3,150	3,007	0,534	0,379	6,75	
69	3,520	3,163	0,801	0,554	6,43	
72	3,517	1,489	0,792	0,338	6,11	

ANEXO D.

DETERMINACIÓN DE CRITERIOS PARA ESCALAMIENTO.

- **Primer experimento**

Tabla 38. Seguimiento de porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo y datos para la determinación del punto crítico de oxígeno.

Tiempo (s)	%OD	Tiempo (s)	%OD	Tiempo (s)	%OD
0	76,1	320	37,1	640	57,7
10	76,1	330	36,1	650	62,6
20	76,6	340	35,1	660	65,6
30	77,1	350	34,1	670	68,8
40	76,9	360	33,1	680	71
50	76	370	32,2	690	72,5
60	74,9	380	31,3	700	73,6
70	73,6	390	30,5	710	74,3
80	72,2	400	29,7	720	74,8
90	70,6	410	28,9	730	74,9
100	69	420	28,2	740	75
110	67,5	430	27,5	750	75,1
120	65,8	440	26,8		
130	64,1	450	26,2		
140	62,3	460	25,6		
150	60,7	470	25		
160	59,4	480	24,5		
170	56,7	490	24,1		
180	55,2	500	23,6		
190	53,7	510	23,3		
200	52,3	520	22,9		
210	50,8	530	22,7		
220	49,4	540	22,5		
230	48	550	22,3		
240	46,7	560	22,1		
250	45,4	570	22		
260	44,1	580	22		
270	42,9	590	21,9		
280	41,6	600	23,7		

290	40,5	610	31,4
300	39,3	620	41,3
310	38,2	630	50,5

Grafica 21. Determinación de punto crítico en primer experimento.

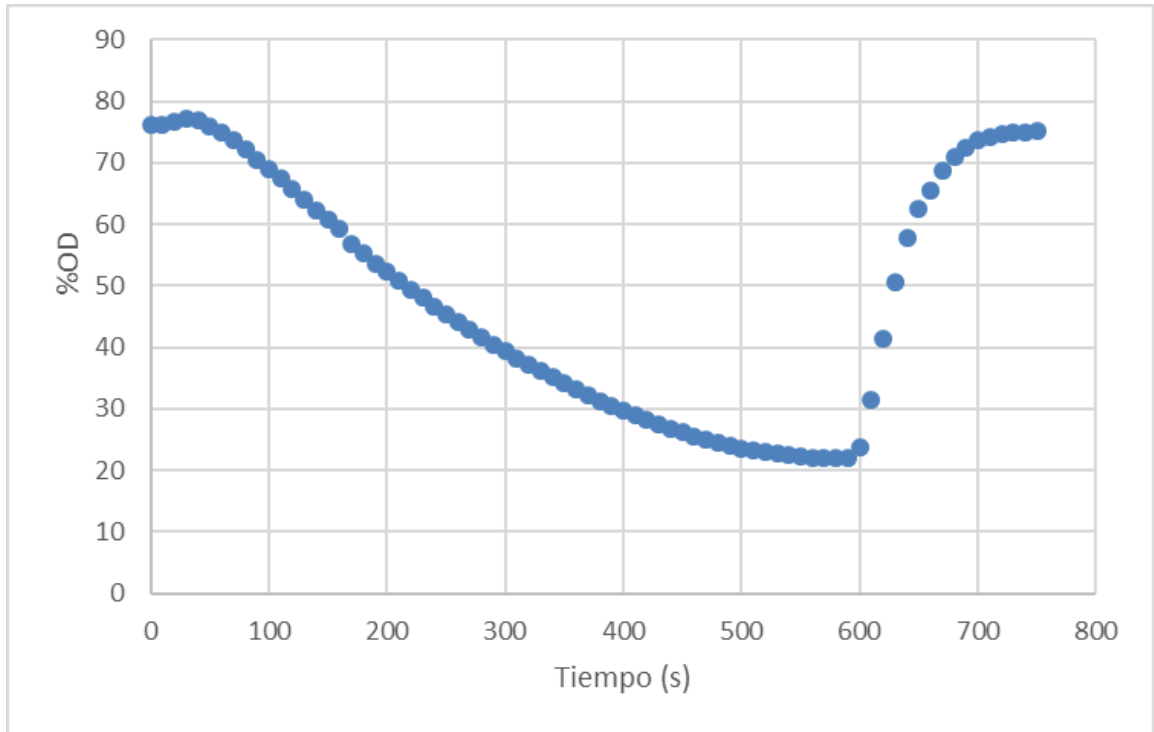
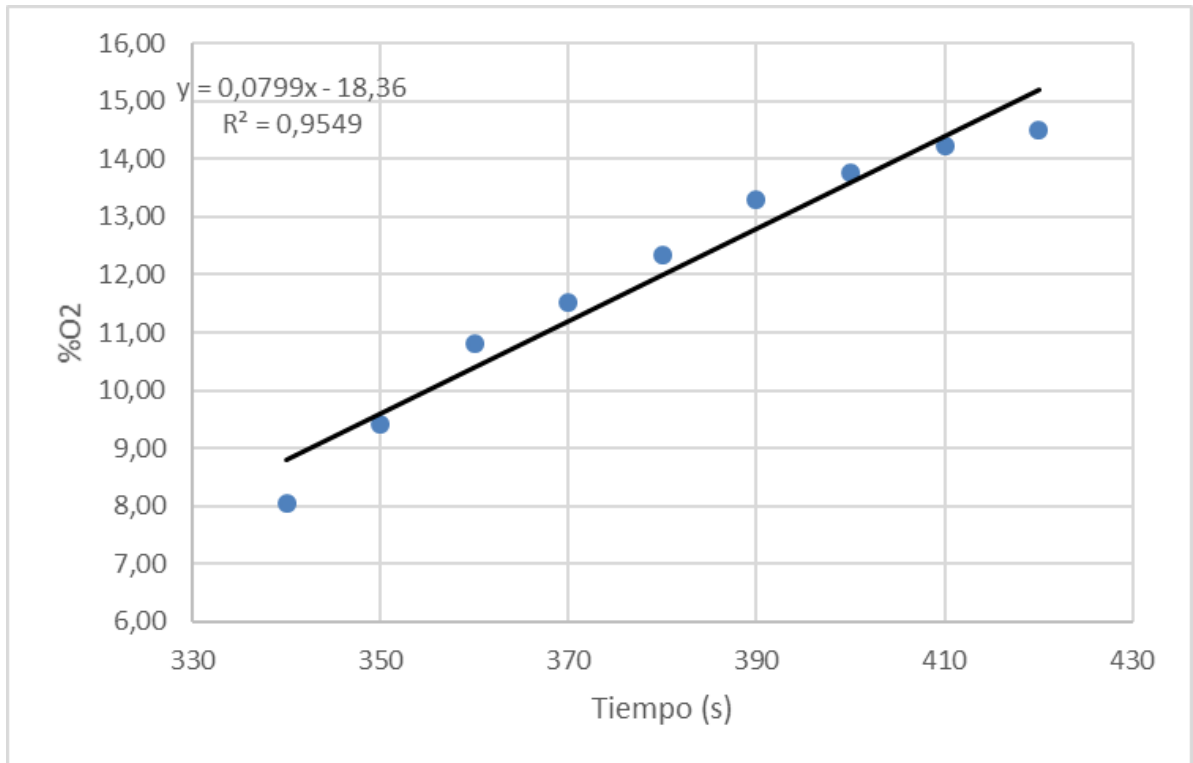


Tabla 39. Seguimiento de porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo y datos para la determinación del K_{La} .

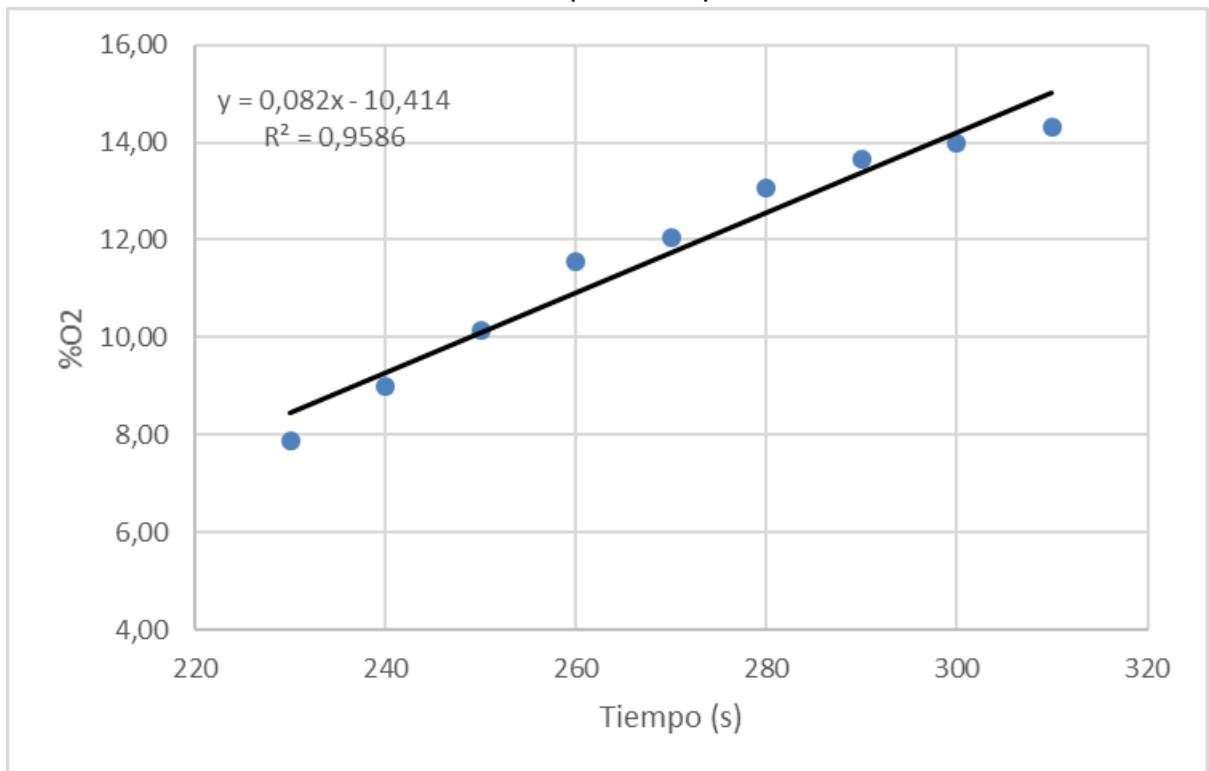
Tiempo (s)	K_{La1} O_2	K_{La2} O_2	K_{La3} O_2
0	14,868	14,826	14,7
10	14,889	14,826	14,679
20	15,12	15,078	14,91
30	15,267	15,414	15,225
40	15,015	15,141	15,015
50	14,721	14,448	14,448
60	14,406	13,965	13,986
70	14,07	13,398	13,608
80	13,818	12,999	13,314
90	13,587	12,642	13,02
100	13,356	12,285	12,705

110	13,167	11,949	12,348
120	12,936	11,676	11,991
130	12,684	11,277	11,634
140	12,495	10,941	11,277
150	12,243	10,626	10,941
160	12,033	10,353	10,584
170	11,823	9,975	10,248
180	11,613	9,66	9,891
190	11,445	9,345	9,555
200	11,172	9,03	9,219
210	11,004	8,715	8,904
220	10,794	8,211	8,589
230	10,584	7,896	8,274
240	10,374	8,988	7,938
250	10,122	10,143	7,686
260	9,891	11,55	8,715
270	9,723	12,033	10,227
280	9,45	13,062	11,361
290	9,282	13,65	12,054
300	9,03	13,986	12,873
310	8,82	14,322	13,461
320	8,547	14,511	13,881
330	7,602	14,616	14,175
340	8,043	14,658	14,364
350	9,408	14,7	14,49
360	10,815	14,7	14,553
370	11,529		14,595
380	12,348		14,616
390	13,293		
400	13,755		
410	14,238		
420	14,49		
430	14,616		
440	14,721		
450	14,763		
460	14,805		
470	14,805		

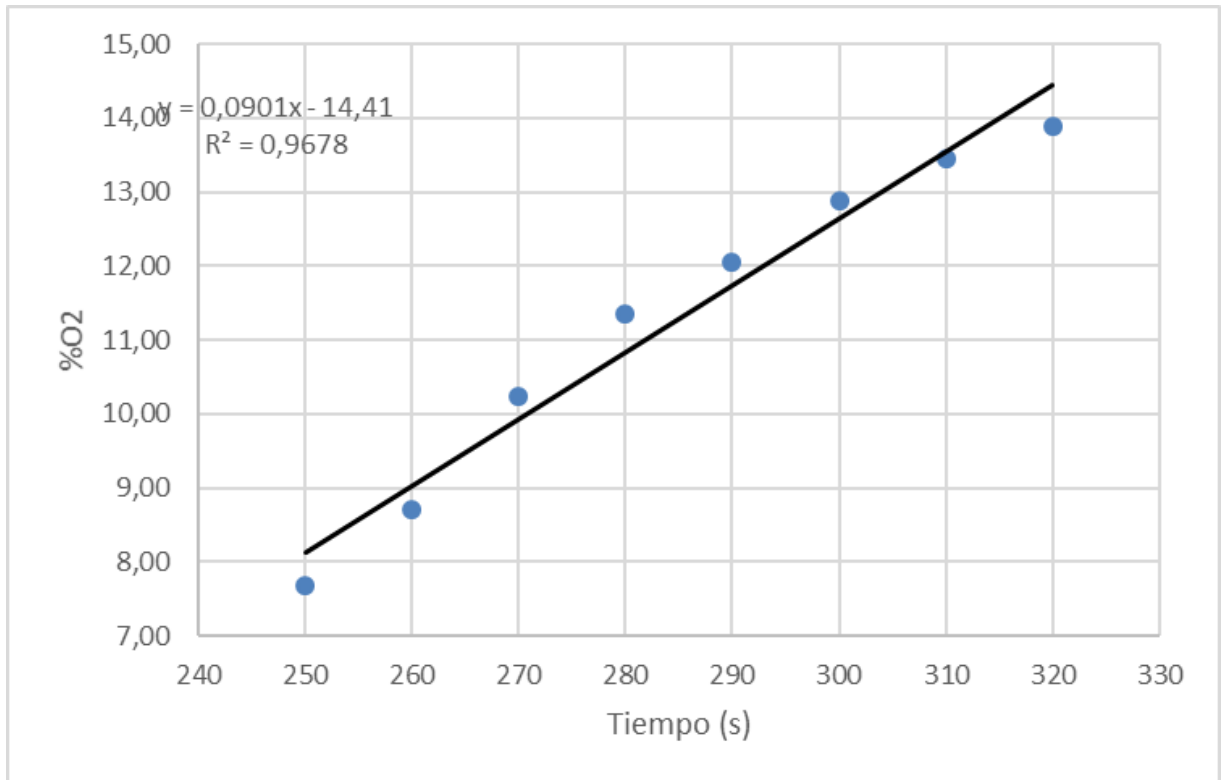
Grafica 22. Determinación de K_{La} 1 en primer experimento.



Grafica 23. Determinación de K_{La} 2 en primer experimento.



Grafica 24. Determinación de K_{La} 3 en primer experimento.



- Segundo experimento

Tabla 40. Seguimiento de porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo y datos para la determinación del punto crítico de oxígeno.

Tiempo (s)	%OD	Tiempo (s)	%OD
0	12,012	165	1,47
5	12,201	170	1,239
10	12,411	175	1,05
15	12,537	180	0,924
20	12,453	185	0,819
25	12,054	190	0,693
30	11,886	195	0,609
35	11,466	200	0,525
40	11,235	205	0,462
45	11,046	210	0,399
50	10,857	215	0,336
55	10,773	220	0,294
60	10,752	225	0,273
65	10,647	230	0,231
70	10,479	235	0,21
75	9,681	240	0,189
80	9,219	245	0,189
85	8,484	250	0,168
90	7,98	255	0,168
95	7,497	260	0,147
100	6,783	265	0,147
105	6,321	270	0,126
110	5,649	275	0,126
115	4,998	280	0,126
120	4,599		
125	4,032		
130	3,675		
135	3,171		
140	2,877		
145	2,583		
150	2,205		
155	1,848		

160	1,659
-----	-------

Grafica 25. Determinación de punto crítico en segundo experimento.

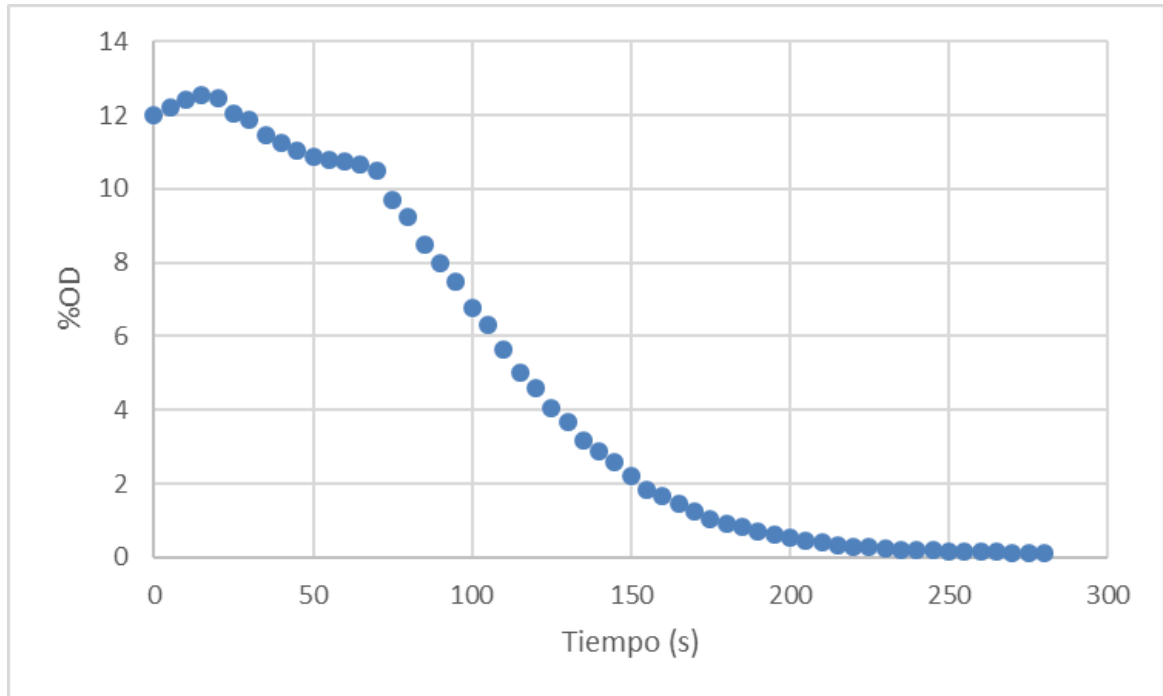


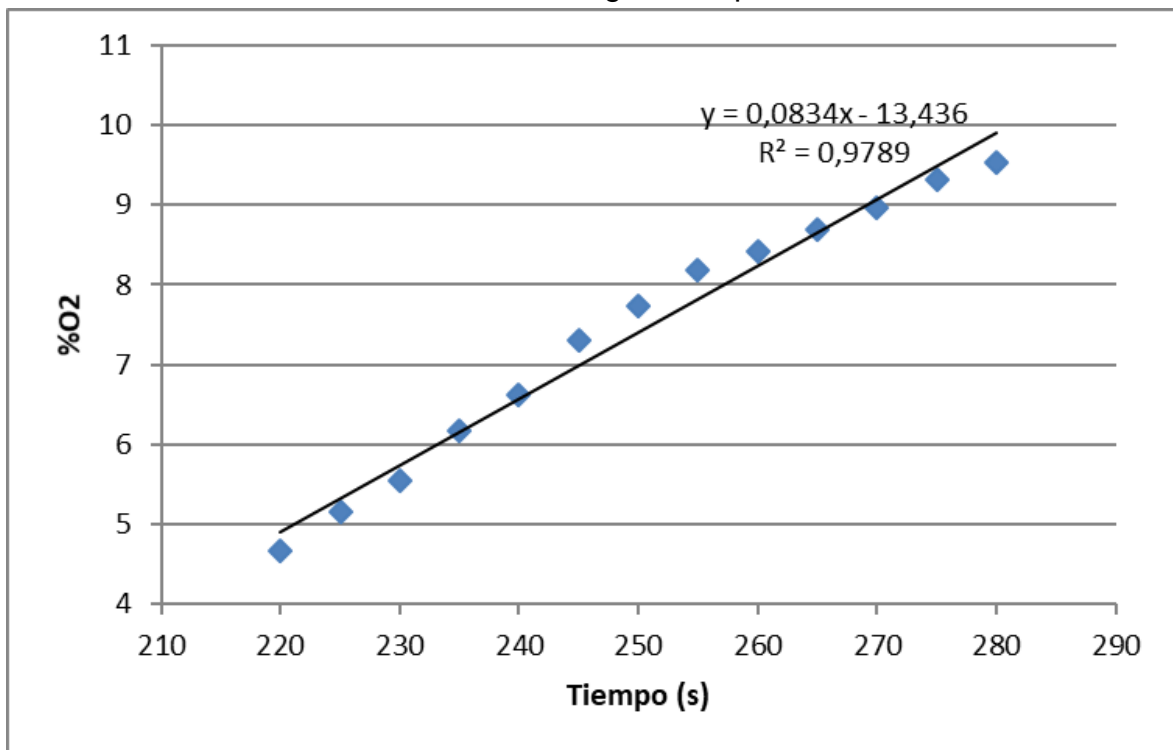
Tabla 41. Seguimiento de porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo y datos para la determinación del K_{La} .

Tiempo (s)	$k_{La1} O_2$	$K_{La2} O_2$	$K_{La3} O_2$
0	10,29	10,5	10,206
5	10,353	10,563	10,164
10	10,395	10,605	10,143
15	10,458	10,689	10,122
20	10,521	10,731	10,164
25	10,605	10,773	10,311
30	10,668	10,752	10,416
35	10,731	10,626	10,5
40	10,773	8,358	10,563
45	10,773	10,164	10,395
50	10,731	9,933	10,206
55	10,605	9,597	10,059
60	10,5	9,366	9,87
65	10,269	9,051	9,597

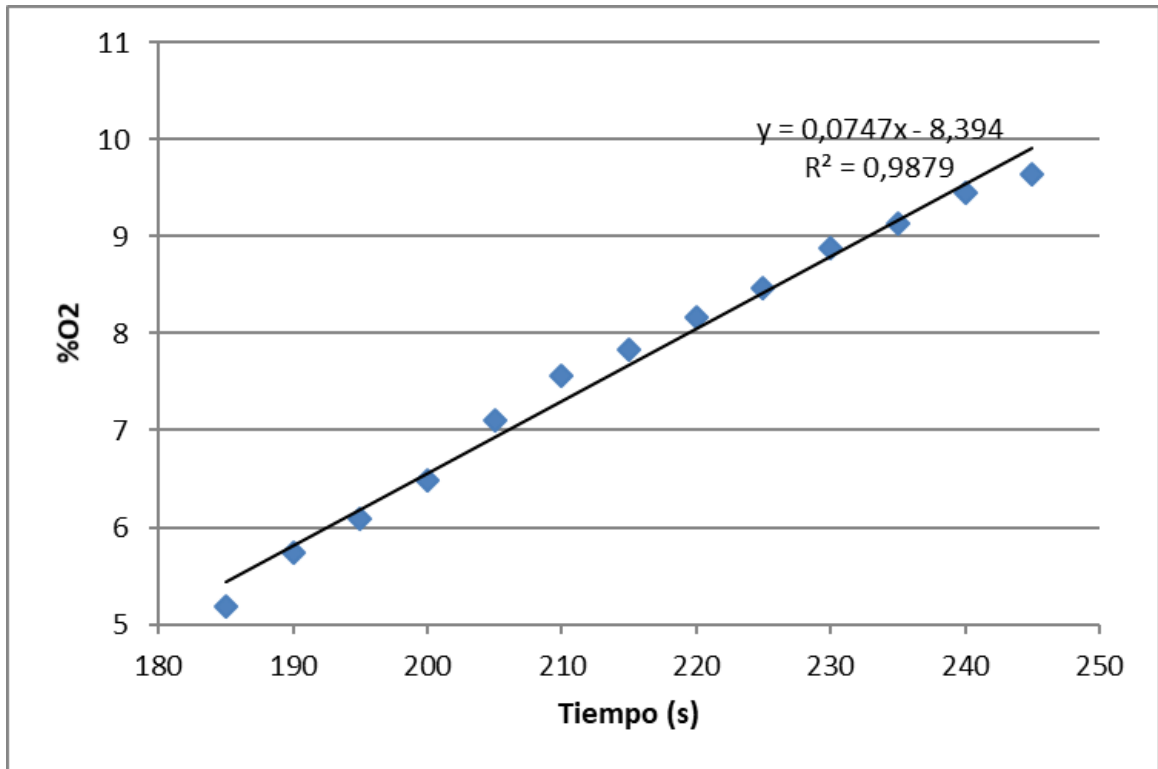
70	10,122	8,715	9,324
75	9,891	8,505	9,114
80	9,744	8,169	8,904
85	9,471	7,938	8,568
90	9,282	7,581	8,232
95	8,946	7,056	8,022
100	8,715	6,657	7,665
105	8,358	6,405	7,434
110	8,127	6,216	7,203
115	7,749	5,964	6,846
120	7,497	5,523	6,636
125	7,119	5,166	6,3
130	6,888	4,977	5,985
135	6,531	4,578	5,565
140	6,069	4,368	5,355
145	5,754	4,284	5,082
150	5,586	4,83	4,641
155	5,334	5,397	4,347
160	5,25	5,628	3,927
165	4,767	5,649	3,885
170	4,578	5,166	4,116
175	4,368	4,998	4,578
180	4,221	5,019	4,494
185	4,095	5,187	4,368
190	4,032	5,733	4,284
195	4,242	6,09	4,305
200	4,452	6,489	4,746
205	4,536	7,098	5,124
210	4,515	7,56	5,775
215	4,515	7,833	6,195
220	4,662	8,169	6,573
225	5,145	8,463	6,93
230	5,544	8,883	7,581
235	6,174	9,135	7,896
240	6,615	9,45	8,106
245	7,308	9,639	8,4
250	7,728	9,849	8,568
255	8,19	9,954	8,757

260	8,421	10,08	8,967
265	8,694	10,143	9,072
270	8,967	10,227	9,219
275	9,324	10,248	9,261
280	9,534	10,29	9,345
285	9,786	10,311	9,387
290	9,933	10,311	9,45
295	10,101	10,311	9,534
300	10,206		9,597

Grafica 26. Determinación de K_{La} 2 en segundo experimento.



Grafica 27. Determinación de K_{La} 3 en segundo experimento.



ANEXO E.

RESULTADOS DE CINÉTICAS DE BIOMASA Y PHB EN REACTOR DE 100 LITROS.

Tabla 42. Cuantificación de biomasa y PHB en el reactor de 100 litros.

REACTOR 100 LITROS			
14H			
BIOMASA (g/L)	3,46	3,8	3,63
PHB (g/L)	2,02	1,94	--
19H			
BIOMASA (g/L)	5,24	5,12	5,18
PHB (g/L)	2,44	1,98	2,21
24H			
BIOMASA (g/L)	8,68	8,5	8,59
PHB (g/L)	2,66	3,06	2,86
39H			
BIOMASA (g/L)	8,8	7,68	8,24
PHB (g/L)	2,6	2,94	2,77
45H			
BIOMASA (g/L)	8,72	9,4	9,06
PHB (g/L)	3,28	3,78	3,53
48H			
BIOMASA (g/L)	9,02	8,94	8,98
PHB (g/L)	4,34	4,68	4,51

Tabla 43. Promedio de datos y desviación estándar.

HORA	BIOMASA (g/L)	PHB (g/L)	DS BIOMASA	DS PHB
0	0	0	0	0
14	3,63	1,94	0,240	0,113
19	5,18	2,21	0,085	0,325
24	8,59	2,86	0,127	0,283
39	8,24	2,77	0,792	0,240
45	9,06	3,53	0,325	0,354
48	8,98	4,51	0,057	0,240

ANEXO F.

ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE FERMENTACIÓN 2 VS FERMENTACIÓN 1,3 Y 4 EN REACTOR DE 7 LITROS.

Tabla 44. Análisis de varianza de biomasa fermentación 2 y 1 en reactor 7 litros.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	8	27,30622	3,413277	2,347036		
Columna 2	6	14,23666	2,372777	1,925650		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,711909	1	3,711909	1,709408	0,2155584	4,74722
Dentro de los grupos	26,05750	12	2,171459			
Total	29,76941	13				

Tabla 45. Análisis de varianza de PHB fermentación 2 y 1 en reactor 7 litros.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	8	14,60077	1,825097	0,86420		
Columna 2	6	5,988333	0,998055	0,33344		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>

Entre grupos	2,345135	1	2,345135	3,64685	0,08036684	4,747225
Dentro de los grupos	7,716689	12	0,643057			
Total	10,06182	13				

Tabla 46. Análisis de varianza de biomasa fermentación 2 y 3 en reactor 7 litros.

Análisis de varianza de un factor							
RESUMEN							
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>			
Columna 1	8	27,30622	3,413277	2,347036			
Columna 2	8	22,045	2,755625	5,085159			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Entre grupos	1,730028	1	1,730028	0,465549	0,5061746	4,600	
Dentro de los grupos	52,02537	14	3,716097				
Total	53,75539	15					

Tabla 47. Análisis de varianza de PHB fermentación 2 y 3 en reactor 7 litros.

Análisis de varianza de un factor					
RESUMEN					
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Columna 1	8	14,60077	1,825097	0,86420	
Columna 2	8	10,43666	1,304583	0,44637	
ANÁLISIS DE VARIANZA					

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,083738	1	1,083738	1,65383	0,21930143	4,600109
Dentro de los grupos	9,174058	14	0,655289			
	10,25779					
Total	7	15				

Tabla 48. Análisis de varianza de biomasa fermentación 2 y 4 en reactor 7 litros.

Análisis de varianza de un factor						
<i>RESUMEN</i>						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	8	27,30622	3,413277	2,347036		
Columna 2	8	24,05	3,00625	1,811216		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,662686	1	0,662686	0,318733	0,58130342	4,600
Dentro de los grupos	29,10777	14	2,079126			
Total	29,77045	15				

Tabla 49. Análisis de varianza de PHB fermentación 2 y 4 en reactor 7 litros.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	8	14,60077	1,825097	0,864209		
Columna 2	8	14,10555	1,763194	1,115146		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico o para F</i>
Entre grupos	0,015327	1	0,015327	0,015487	0,9027285	4,600
Dentro de los grupos	13,85548	14	0,989677			
Total	13,87081	15				