

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE
Ganoderma sp. EN MEDIO LÍQUIDO PARA SU POSTERIOR
ESCALAMIENTO A BIORREACTORES TIPO TANQUE AGITADO**

**PROYECTO DE GRADUACIÓN SOMETIDO A LA CONSIDERACIÓN
DE LA ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA COMO REQUISITO
FINAL PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN INGENIERÍA
QUÍMICA**

ALEJANDRO VARGAS LÓPEZ

**CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO
SAN JOSÉ, COSTA RICA**

2020

Hoja de Aprobación

Proyecto de graduación sometido a consideración de la Escuela de Ingeniería Química
como requisito final para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química

Sustentante:

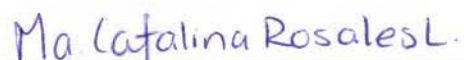
Alejandro Vargas López

Aprobado por:



Ing. Esteban Durán Herrera, Ph. D.
Director Académico.
Escuela de Ingeniería Química.

Presidente del Tribunal



Ing. Catalina Rosales López, M. Sc.
Profesora-Investigadora.
Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Directora del Proyecto



Ing. Jorge Mario Benavides Hernández.
Profesor.
Escuela de Ingeniería Química.

Lector del Proyecto



Ing. Jessica Montero Zamora, M. Sc.
Investigadora.
CENIBiot.

Lectora del Proyecto



Ing. Juliana Da Luz Castro.
Profesora.
Escuela de Ingeniería Química.
a.

Lector de Objetivos

Epígrafe

“Un título es una licencia para comenzar a aprender”

J.V.C.

“Encuentro más valiente a quién supera sus deseos, que a quién conquista a sus enemigos, ya que la victoria más dura es sobre uno mismo”

Aristóteles

Dedicatoria

*A mi madre y a mi padre,
por su amor incondicional y su esfuerzo genuino.
Porque nadie llega solo hasta donde está.*

Agradecimientos

A mi madre Yolanda, por su amor incondicional, su fortaleza inquebrantable y su actitud positiva. A mi padre Juan, quién me acompaña desde lejos, por ser un ejemplo de integridad, rectitud y superación, y por formarme junto con mi madre para convertirme en un ser humano decente. A mi hermano Esteban, por ser estar siempre a mi lado al crecer, y por hacerme ver las situaciones desde otros puntos de vista.

A mi novia Tatti, por tanto amor genuino, por estar en las buenas y en las malas durante todo este proceso de tesis, por acompañarme a crecer como profesional y como persona, y por todas las vivencias juntos a lo largo de estos años.

A los profesores que guiaron esta investigación. A Catalina, por darme la confianza de llevar a cabo este proyecto, por brindar todos los insumos necesarios y por formarme dentro del campo de la biotecnología. A Jorge y a Jessica, por colaborar con su criterio oportuno, así como con la lectura y correcciones del trabajo. A Carlos, por fungir como director temporal del proyecto, por presentarme el campo de la ingeniería de bioprocesos, y por apoyarme como profesor y como amigo.

Al personal del Centro de Investigación en Biotecnología, por tratarme como uno de los suyos a pesar de ser un extraño. A profesor Miguel Rojas por aceptarme como estudiante en el centro, y al profesor William Rivera por recibirme en el laboratorio de biocontrol. A Randall y a Alex por ayudarme con su conocimiento durante el proyecto. A David, Luis, Silvia, Karol, Anita, Patri, Rossy por su buena actitud, las risas y el apoyo.

A mis compañeros del CIB: Wendy, Javier, Diana, Felipe, Valeria, Daniela, Karla, Samara, Mariana, Tania, Michelle, Mariel, María José, Jimena Fuentes, Jimena Quirós, Paula, Pablo Bogantes, Pablo Delgado, por incontables ayudas, compañerismo y amistad.

A mis compañeros de carrera, Mauricio, Josué y María de Jesús, por crecer como profesionales juntos, por ser pilares de apoyo en los momentos difíciles del camino, por su cariño y amistad, para toda la vida.

A mis otros hermanos, Juan Carlos, Carlos y Rafael, por ser incondicionales, por brindarme su hombro cada vez que fue necesario, por incontables risas e historias, por ser la familia que uno escoge.

Finalmente, a mi querida Universidad de Costa Rica, por recibirme como un adolescente lleno de sueños e inquietudes, y prepararme para enfrentar la vida como un ser humano íntegro, humanista, y más cercano a cumplir mis metas.

Resumen

Los hongos del género *Ganoderma* son organismos que se han utilizado en la medicina tradicional de oriente, desde hace más de mil años, para el tratamiento de diversas afecciones a la salud. Recientemente, el cultivo de estos hongos en biorreactores tipo tanque agitado ha despertado interés en grupos de investigación alrededor del mundo, por ser una alternativa prometedora para la producción de ácidos ganodéricos y β -D-glucanos, metabolitos que han mostrado efectos contra algunos tipos de cáncer, diabetes, colesterol alto e hipertensión.

El objetivo principal de este trabajo fue establecer las condiciones de crecimiento de *Ganoderma sp.* en medio líquido, que produjeran la mayor concentración de biomasa seca en biorreactores tipo tanque agitado. Para esto, se plantearon experimentos para definir los valores más adecuados de las variables más relevantes, utilizando la concentración de biomasa seca como variable de respuesta. A nivel de matraz, se probaron diferentes componentes del medio de cultivo: aceite de oliva, sales de calcio y cobre, y tiamina. Además, se evaluó el efecto de la concentración de inóculo (6.6, 10.0 y 20.0 g/L) y se determinó la cinética de crecimiento del hongo. A nivel de biorreactor, se realizaron pruebas para definir la configuración de los impulsores, además se evaluó el efecto del flujo de aire (0.25 y 1.0 vvm) sobre la concentración de biomasa seca y el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La}). Después de haber definido las condiciones de cultivo, se realizó una propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 litros utilizando modelos matemáticos para el cálculo de la velocidad de agitación y flujo de aire.

Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que el aceite de oliva (1% v/v) y la tiamina (0.05 g/L) tuvieron efectos positivos sobre el crecimiento de *Ganoderma sp.* en medio líquido generando un incremento del 240% con respecto al medio comercial. En contraste, las sales de cobre y calcio (0.25 y 1.45 g/L), así como la concentración de inóculo, no tuvieron efectos estadísticamente significativos. La cinética de crecimiento a nivel de matraz mostró una tasa específica de crecimiento de $0.0087 \pm 0.0019 \text{ h}^{-1}$, y el comienzo de la fase estacionaria se observó a los 12 días de cultivo. A nivel de biorreactor, el uso de la configuración propela marina – paletas inclinadas – turbina Rushton (MA-PI-RT, inferior-medio-superior) permitió la mejor homogenización del contenido, además, el flujo de aire no mostró efectos significativos sobre la producción de biomasa ni el k_{La} . En conclusión, las condiciones de cultivo recomendadas para *Ganoderma sp.* en el biorreactor de tres litros son: medio de cultivo C2, inóculo de 10 g/L de biomasa fresca con 8 días de edad, configuración de impulsores MA-PI-RT, 350 rpm, 0.5 L/min a 300 kPa, 30 °C, pH 5.5 y 100% pO₂ inicial, con las cuales se obtuvo una concentración final de biomasa seca de 22.62 g/L a los 12 días. Para el escalamiento a biorreactores de 70 litros se recomienda estudiar dos condiciones: 200 rpm con 1.0 L/min y 250 rpm con 3.0 L/min.

Índice General

RESUMEN	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE CUADROS.....	XV
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO1. MARCO CONCEPTUAL.....	3
1.1 EL REINO FUNGI	3
1.1.1 Características generales.....	4
1.1.1.1 Organismos eucariotas	4
1.1.1.2 Organismos heterótrofos.....	4
1.1.1.3 Organismos inmóviles	5
1.1.1.4 Presencia de pared celular.....	5
1.1.1.5 Formación de esporas	5
1.1.1.6 Hifa como unidad celular básica.....	5
1.1.2 Requerimientos nutricionales	6
1.1.2.1 Fuentes de carbono	6
1.1.2.2 Macronutrientes	7
1.1.2.2.1 Nitrógeno.....	8
1.1.2.2.2 Fósforo, azufre, potasio y magnesio.....	8
1.1.2.3 Micronutrientes	9
1.1.2.3.1 Iones metálicos (microelementos).....	9
1.1.2.3.2 Vitaminas	10
1.1.3 Condiciones físicas	11
1.1.3.1 Temperatura	11
1.1.3.2 pH.....	12
1.1.3.3 Oxígeno.....	13
1.1.3.4 Potencial del agua	14
1.1.3.5 Luz	15

1.1.4	Aprovechamiento de los hongos y sus metabolitos por el ser humano.....	16
1.2	EL FILO BASIDIOMYCOTA.....	18
1.2.1	Estructura celular, ciclo de vida y mecanismos de reproducción	18
1.3	EL GÉNERO GANODERMA	20
1.3.1	Características generales	20
1.3.2	Metabolitos de interés comercial.....	22
1.3.2.1	Ácidos ganodéricos	23
1.3.2.2	β -D-glucanos	24
1.3.3	Condiciones de cultivo en placa y en medio líquido.....	25
1.3.3.1	Composición del medio de cultivo.....	25
1.3.3.2	Condiciones físicas.....	27
1.4	CULTIVO DE MICROORGANISMOS EN BIORREACTORES TIPO TANQUE AGITADO.....	29
1.4.1	Características principales.....	29
1.4.2	Modos de operación	31
1.4.3	Desarrollo de procesos de fermentación en biorreactores tipo tanque agitado	33
1.4.3.1	Etapas de un bioproceso	33
1.4.3.1.1	Introducción o reactivación del microorganismo	33
1.4.3.1.2	Multiplicación inicial del microorganismo.....	34
1.4.3.1.3	Tren de inóculo	34
1.4.3.1.4	Preparación del medio de cultivo y del biorreactor	35
1.4.3.1.5	Inoculación del biorreactor y producción del compuesto de interés ...	35
1.4.3.2	Optimización de variables a nivel de matraz	36
1.4.3.2.1	Concentración y tipo de inóculo	36
1.4.3.2.2	Cinética de crecimiento y tiempo de cultivo	37
1.4.4	Variables relevantes en el diseño y operación de biorreactores tipo tanque agitado.....	39
1.4.4.1	Geometría y configuración del biorreactor	39
1.4.4.2	Agitación	41

1.4.4.2.1	Tipos de impulsores	42
1.4.4.2.2	Régimen hidrodinámico y número de Reynolds	44
1.4.4.2.3	Tiempo de mezclado y homogenización	45
1.4.4.2.4	Esfuerzo cortante y velocidad de corte.....	47
1.4.4.3	Aireación.....	48
1.4.4.3.1	Tipos de difusores	49
1.4.4.3.2	Retención del gas, diámetro de las burbujas y área superficial específica	51
1.4.4.3.3	Regímenes de flujo y dispersión del gas	53
1.4.4.3.4	Coefficiente volumétrico de transferencia de masa.....	56
1.4.5	Escalamiento de bioprocesos en biorreactores tipo tanque agitado.....	59
1.4.5.1	Principios de similaridad y criterios de escalamiento.....	60
1.4.5.1.1	Principios de similaridad.....	61
1.4.5.1.2	Criterios de escalamiento	62
1.4.5.2	Análisis de regímenes	64
1.4.5.3	Consumo de energía en biorreactores tipo tanque agitado	65
1.4.5.3.1	Consumo de potencia por agitación mecánica	66
1.4.5.3.2	Consumo de potencia por aireación	67
CAPÍTULO 2.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL, EQUIPO Y MATERIALES	71
2.1	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	71
2.1.1	Obtención y mantenimiento de la cepa de <i>Ganoderma sp.</i>	72
2.1.1.1	Obtención y reactivación de la cepa	72
2.1.1.2	Mantenimiento de la cepa	72
2.1.2	Pruebas en matraz	72
2.1.2.1	Determinación de la composición del medio de cultivo.....	72
2.1.2.2	Definición de la concentración del inóculo	74
2.1.2.3	Identificación de la cinética de crecimiento	75

2.1.3	Pruebas en biorreactor	76
2.1.3.1	Establecimiento de la configuración de los impulsores	76
2.1.3.2	Determinación del flujo de aire	77
2.1.4	Propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.....	78
2.1.4.1	Determinación de la densidad y viscosidad dinámica del medio de cultivo	78
2.1.4.2	Determinación de la velocidad de agitación y flujo de aire para los biorreactores de 70 L.....	79
2.1.5	Análisis estadístico.....	81
2.2	EQUIPO.....	81
2.2.1	Biorreactor de 3 L	81
2.2.1.1	Envase de vidrio	82
2.2.1.2	Tapa de acero inoxidable.....	82
2.2.1.3	Piezas y sensores	83
2.2.1.4	El biocontrolador y la bioconsola.....	87
2.2.2	Otros equipos.....	89
2.3	MATERIALES	90
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		93
3.1	DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	93
3.2	DEFINICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO	100
3.3	IDENTIFICACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MATRAZ	103
3.4	ESTABLECIMIENTO DE LA CONFIGURACIÓN DE LOS IMPULSORES EN EL BIORREACTOR DE 3 L.....	106
3.5	DETERMINACIÓN DEL FLUJO DE AIRE EN EL BIORREACTOR DE 3 L.....	111
3.6	PROPUESTA DE ESCALAMIENTO A BIORREACTORES DE 70 L.....	118
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		131
CAPÍTULO 5. NOMENCLATURA.....		133
CAPÍTULO 6. REFERENCIAS		139
CAPÍTULO 7. APÉNDICE A. DATOS EXPERIMENTALES.....		153

CAPÍTULO 8.	APÉNDICE B. RESULTADOS INTERMEDIOS.....	163
CAPÍTULO 9.	APÉNDICE C. MUESTRA DE CÁLCULO	187
CAPÍTULO 10.	APÉNDICE D. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	209
10.1	PREPARACIÓN DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.....	209
10.2	PREPARACIÓN DEL INÓCULO	211
10.3	PREPARACIÓN DEL BIORREACTOR DE 3 L	211
10.3.1	Esterilización, calibración del sensor de pH y llenado del biorreactor.....	212
10.3.2	Calibración del sensor de oxígeno disuelto, medición del k_{La} e inoculación del biorreactor	212

Índice de Figuras

Figura 1.1. Clasificación taxonómica del reino <i>Fungi</i> hasta el rango de <i>Filo</i> (Ruggiero, y otros, 2015).....	4
Figura 1.2. Estructura básica de una hifa (Arenas, 2014).	19
Figura 1.3. Ciclo de vida general de un hongo del filo <i>Basidiomycota</i> (Webster & Weber, 2007).....	20
Figura 1.4. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa <i>Ganoderma sp</i> utilizada en esta investigación. Izquierda: cuerpo fructífero del hongo. Derecha: hifas y esporas teñidas con azul de lactofenol, observadas a través de un microscopio óptico a 40X. Imágenes cortesía del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (2019).	22
Figura 1.5. Estructura química de los ácidos ganodéricos. Izquierda: variante A, derecha: variante B (Xu, Zhao, & Zhong, 2010).	23
Figura 1.6. Estructura química de los β -D-glucanos. A: estructura primaria de la cadena polimérica. B: estructura terciaria de la triple hélice. (Sanodiya, Thakur, Baghel, Prasad, & Bisen, 2009).	24
Figura 1.7. Esquema básico de un biorreactor tipo tanque agitado (Pereira & Leib, 2008).	30
Figura 1.8. Fases de una curva de crecimiento típica para microorganismos en sistemas de cultivo discontinuos (Godia-Casablancas, y otros, 2005).	37
Figura 1.9. Dimensiones relevantes en el diseño de un tanque agitado (McCabe, Smith, & Harriot, 2007).	40
Figura 1.10. Impulsores de flujo radial utilizados en biorreactores tipo tanque agitado. Izquierda: turbina de paletas rectas, centro: turbina de disco de paletas rectas (Rushton), derecha: turbina de disco de paletas cóncavas (Smith) (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004).....	43
Figura 1.11. Impulsores de flujo axial utilizados en biorreactores tipo tanque agitado. Izquierda: propela marina, centro: turbina de paletas inclinadas (flujo mixto), derecha: impulsor Lightnin A315 (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004).....	43
Figura 1.12. Concentración del trazador con respecto al tiempo durante la determinación del tiempo de mezclado de un sistema de agitación (Doran, 2013).	46

Figura 1.13. Esquema de algunos difusores de aire utilizados en biorreactores tipo tanque agitado. Izquierda: difusor de tubos perforados en anillo, centro: difusor poroso, derecha: difusor de boquilla única (Chain, Paladino, Callow, Ugolini, & van der Sluis, 1952).	50
Figura 1.14. Patrones de dispersión del gas para turbinas Rushton en biorreactores tipo tanque agitado según el régimen de dispersión. Izquierda: régimen de inundación, centro: régimen de carga, derecha: régimen de dispersión completa (Doran, 2013)....	55
Figura 1.15. Patrones de dispersión del gas para impulsores de flujo axial descendente en biorreactores tipo tanque agitado según el régimen de dispersión. Izquierda: régimen de carga directa, derecha: régimen de carga indirecta (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004).	56
Figura 1.16. Trayectoria promedio de una molécula de oxígeno desde la burbuja de gas hasta el sitio de reacción en la célula (García-Ochoa & Gómez, 2009).	57
Figura 2.1. Diagrama de equipo del biorreactor de 3 L (Applikon Biotechnology, 2008). 82	
Figura 2.2. Distribución de los accesorios en la tapa del biorreactor de 3 L (Applikon Biotechnology, 2008).....	83
Figura 2.3. Diagrama de equipo del biocontrolador y la bioconsola (Applikon Biotechnology, 2004).....	88
Figura 3.1. Diagrama de Pareto (superior), diagrama de efectos principales (medio) y diagrama de interacciones (inferior), elaborados en Minitab 19, para diseño factorial utilizado en la determinación de la composición del medio de cultivo.	95
Figura 3.2. Concentración de biomasa seca obtenida a los 14 días con el medio C, C2 y PDB.	100
Figura 3.3. Concentración de biomasa seca e índice de crecimiento obtenidos a los 14 días para diferentes concentraciones de inóculo.	101
Figura 3.4. Cinética de crecimiento de <i>Ganoderma sp.</i> a nivel de matraz.	103
Figura 3.5. Distribución de biomasa en el biorreactor para la configuración MA – PI a los 5 días de cultivo.	107
Figura 3.6. Distribución de biomasa en el biorreactor para la configuración MA – PI – RT a los 5 días de cultivo.	109
Figura 3.7. Concentración de biomasa seca obtenida a los 12 días, y coeficiente volumétrico de transferencia de masa del oxígeno (k_{La}) previo a inoculación, para los dos flujos de aire estudiados en el biorreactor tipo tanque agitado.....	112

Figura 8.1. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la primera repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 0.25 vvm.....	174
Figura 8.2. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 0.25 vvm.....	174
Figura 8.3. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 0.25 vvm.....	175
Figura 8.4. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la cuarta repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 0.25 vvm.....	175
Figura 8.5. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la primera repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 1.00 vvm.....	176
Figura 8.6. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 1.00 vvm.....	176
Figura 8.7. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 1.00 vvm.....	177
Figura 8.8. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la cuarta repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 1.00 vvm.....	177

Índice de Cuadros

Cuadro 1.1. Fuentes de carbono utilizadas comúnmente por los hongos (Kavanagh, 2011).	7
Cuadro 1.2. Fuentes de nitrógeno utilizadas comúnmente por los hongos (Deacon, 2006). 8	8
Cuadro 1.3. Otros macroelementos requeridos por los hongos (Kavanagh, 2011)......	9
Cuadro 1.4. Microelementos requeridos para el crecimiento de los hongos (Kavanagh, 2011).	10
Cuadro 1.5. Vitaminas del complejo B requeridas para el crecimiento de los hongos (Griffin, 1994).	11
Cuadro 1.6. Clasificación de los hongos de acuerdo con los rangos de temperatura tolerables y óptimos para su crecimiento (Deacon, 2006).	12
Cuadro 1.7. Clasificación de los hongos de acuerdo con sus requerimientos y capacidad de tolerancia del oxígeno (Deacon, 2006).	13
Cuadro 1.7. (Continuación) Clasificación de los hongos de acuerdo con sus requerimientos y capacidad de tolerancia del oxígeno (Deacon, 2006).	14
Cuadro 1.8. Compuestos de interés comercial producidos mediante cultivos de hongos (El-Enshasy, 2007) (Adrio & Demain, 2003).	17
Cuadro 1.8. (Continuación) Compuestos de interés comercial producidos mediante cultivos de hongos (El-Enshasy, 2007) (Adrio & Demain, 2003).	18
Cuadro 1.9. Parámetros utilizados como criterios de escalamiento en operaciones con biorreactores tipo tanque agitado (Schmidt, 2005).	62
Cuadro 1.9. (Continuación) Parámetros utilizados como criterios de escalamiento en operaciones con biorreactores tipo tanque agitado (Schmidt, 2005).	63
Cuadro 1.10. Efecto de los diferentes criterios de escalamiento en las variables de operación de un biorreactor tipo tanque agitado (Amanullah, Buckland, & Nienow, 2004).	63
Cuadro 1.11. Tiempo característico de diferentes fenómenos en la operación de biorreactores tipo tanque agitado (Palomares, Lara, & Ramírez, 2010).	64
Cuadro 2.1. Composición del medio de cultivo base.	73
Cuadro 2.2. Factores y niveles estudiados en la prueba de medios de cultivo.	73
Cuadro 2.3. Distribución de los niveles de las variables en los medios de cultivo probados.	73

Cuadro 2.4. Modelos matemáticos utilizados en la determinación de la tasa específica de crecimiento de <i>Ganoderma sp.</i> a nivel de matraz (Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & Van't Riet, 1990).....	76
Cuadro 2.5. Configuración de impulsores probadas en biorreactor.....	77
Cuadro 2.6. Parámetros de operación calculados para la evaluación de diferentes criterios de escalamiento.	80
Cuadro 2.7. Dimensiones del envase de vidrio del biorreactor de 3 L (Applikon Biotechnology, 2008).....	82
Cuadro 2.8. Nomenclatura utilizada en la Figura 2.2 para la distribución de accesorios en la tapa del biorreactor.....	83
Cuadro 2.9. Características de los impulsores utilizados en el biorreactor (Applikon Biotechnology, 2008).....	84
Cuadro 2.10. Dimensiones del difusor poroso utilizado en el biorreactor (Applikon Biotechnology, 2008).....	85
Cuadro 2.11. Características del biorreactor de 70 L utilizado en la propuesta de escalamiento (Applikon Biotechnology, 2009).....	89
Cuadro 2.12. Otros equipos utilizados en la investigación.....	89
Cuadro 2.12. (Continuación) Otros equipos utilizados en la investigación.....	90
Cuadro 2.13. Reactivos químicos puros utilizados en este trabajo.....	90
Cuadro 2.14. Componentes complejos utilizados en la elaboración de medios de cultivo.....	91
Cuadro 2.15. Composición del medio de cultivo PDA y PDB.....	91
Cuadro 2.16. Otras sustancias utilizadas en este trabajo.	91
Cuadro 3.1. Verificación de los supuestos estadísticos del diseño factorial 2 ³ utilizado en la determinación de la composición del medio de cultivo ($\alpha=0.05$).	93
Cuadro 3.2. Concentración de biomasa seca para cada tratamiento probado en la optimización del medio de cultivo.	94
Cuadro 3.3. Concentración de biomasa seca de cada pareja de tratamientos analizada por el método de comparaciones múltiples de Tukey para la interacción aceite de oliva – tiamina.....	97
Cuadro 3.4. Diferencia de concentración de biomasa seca de cada grupo de tratamientos analizada por el método de comparaciones múltiples de Tukey para los factores principales.	97

Cuadro 3.5. Diferencia de concentración de biomasa seca de cada grupo de tratamientos analizada por el método de comparaciones múltiples de Tukey para las interacciones.	98
Cuadro 3.6. Concentración de biomasa seca de cada pareja de tratamientos analizada por el método de comparaciones múltiples de Tukey para la interacción sales – tiamina.	98
Cuadro 3.7. Verificación de los supuestos estadísticos del ANOVA de un solo factor utilizado en la determinación de la concentración del inóculo ($\alpha=0.05$).	100
Cuadro 3.8. Tasa específica de crecimiento de <i>Ganoderma sp.</i> en cultivo sumergido, obtenida a partir de diferentes modelos de crecimiento.	104
Cuadro 3.9. Distribución de biomasa en el volumen del biorreactor para las diferentes configuraciones de impulsores utilizadas.	107
Cuadro 3.10. Verificación de los supuestos estadísticos del ANOVA de un solo factor utilizado en la determinación del flujo de aire ($\alpha=0.05$).	111
Cuadro 3.11. Número de flujo, número de Froude y número de Froude crítico de la propela marina (MA) para los flujos de aire probados en las fermentaciones en biorreactor.	115
Cuadro 3.12. Concentración de biomasa seca de <i>Ganoderma sp.</i> obtenida en biorreactores tipo tanque agitado a escala de laboratorio.	117
Cuadro 3.13. Parámetros de operación para los casos A y B en el biorreactor de 3 L.	119
Cuadro 3.14. Parámetros de operación para cada escenario de escalamiento en el biorreactor de 50 L.	121
Cuadro 3.15. Parámetros de operación para cada escenario de escalamiento en el biorreactor de 50 L, con respecto a los valores correspondientes en el biorreactor de 2 L.	123
Cuadro 3.16. Condiciones de operación y valores esperados para cada parámetro el biorreactor de 50 L.	129
Cuadro 3.16. (Continuación) Condiciones de operación y valores esperados para cada parámetro el biorreactor de 50 L.	130
Cuadro 7.1. Masa de la placa vacía, placa con muestra húmeda y placa con muestra seca, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de medios de cultivo.	153
Cuadro 7.2. Masa de la placa vacía, placa con muestra húmeda y placa con muestra seca, a los 14 días, para las pruebas realizados con medio C suplementado y medio comercial PDB.	154

Cuadro 7.3. Masa de la placa vacía, placa con muestra húmeda y placa con muestra seca, del inóculo, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo (B.H. biomasa húmeda).....	154
Cuadro 7.4. Masa del filtro vacío, filtro con muestra húmeda y filtro con muestra seca, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo. .	154
Cuadro 7.4. (Continuación) Masa del filtro vacío, filtro con muestra húmeda y filtro con muestra seca, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo.....	155
Cuadro 7.5. Masa de la placa o filtro vacío, con muestra húmeda y con muestra seca, con respecto al tiempo, para la cinética de crecimiento en matraz.	155
Cuadro 7.5. (Continuación) Masa de la placa o filtro vacío, con muestra húmeda y con muestra seca, con respecto al tiempo, para la cinética de crecimiento en matraz.....	156
Cuadro 7.6. Masa de la placa vacía, con muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la primera réplica con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L.	156
Cuadro 7.7. Masa de la placa o filtro vacío, con muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L.	157
Cuadro 7.8. Masa de la placa vacía, con muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la primera réplica con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.	158
Cuadro 7.9. Masa de la placa o filtro vacío, con muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.	158
Cuadro 7.9. (Continuación) Masa de la placa o filtro vacío, con muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.	159
Cuadro 7.10. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la primera repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 0.25 vvm.	159
Cuadro 7.11. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 0.25 vvm.	159
Cuadro 7.11. (Continuación) Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 0.25 vvm.	160
Cuadro 7.12. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 0.25 vvm.	160

Cuadro 7.13. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la cuarta repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm.....	160
Cuadro 7.14. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la primera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.....	161
Cuadro 7.15. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.....	161
Cuadro 7.16. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.....	161
Cuadro 7.16. (Continuación) Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.....	162
Cuadro 7.17. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la cuarta repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.....	162
Cuadro 7.18. Masa del picnómetro vacío, con agua y con medio de cultivo para las tres réplicas realizadas en la medición de la densidad del medio de cultivo.....	162
Cuadro 7.19. Tiempo de vaciado del bulbo del viscosímetro de Ostwald para las cuatro repeticiones realizadas en la medición de la viscosidad del medio de cultivo.	162
Cuadro 8.1. Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de medios de cultivo.	163
Cuadro 8.2. Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, a los 14 días, para para las pruebas realizados con medio C suplementado y medio comercial PDB.....	164
Cuadro 8.3. Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, del inóculo, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo.	164
Cuadro 8.4. Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo.	164
Cuadro 8.4. (Continuación) Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo.	165
Cuadro 8.5. Índice de crecimiento de cada réplica, y promedio, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo.	165

Cuadro 8.6. Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, con respecto al tiempo, para la cinética de crecimiento en matraz.	165
Cuadro 8.6. (Continuación) Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, con respecto al tiempo, para la cinética de crecimiento en matraz.	166
Cuadro 8.7. Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la primera réplica de la corrida con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L.	166
Cuadro 8.7. (Continuación) Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la primera réplica de la corrida con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L.	167
Cuadro 8.8. Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica de la corrida con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L.	167
Cuadro 8.8. (Continuación) Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica de la corrida con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L.	168
Cuadro 8.9. Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la primera réplica de la corrida con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.	168
Cuadro 8.9. (Continuación) Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la primera réplica de la corrida con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.	169
Cuadro 8.10. Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica de la corrida con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.	169
Cuadro 8.10. (Continuación) Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica de la corrida con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.	170
Cuadro 8.11. Biomasa seca neta, volumen neto y concentración de biomasa seca, a los 12 días, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.	170
Cuadro 8.12. $-\ln(1-OD)^*$ con respecto al tiempo para la primera repetición de la medición del k_La con un flujo de aire de 0.25 vvm ($OD = pO_2/100$).	171
Cuadro 8.13. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_La con un flujo de aire de 0.25 vvm.	171

Cuadro 8.14. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm.	171
Cuadro 8.15. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la cuarta repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm.	172
Cuadro 8.16. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la primera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.	172
Cuadro 8.17. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.	172
Cuadro 8.17. (Continuación) $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.	173
Cuadro 8.18. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.	173
Cuadro 8.19. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la cuarta repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.	173
Cuadro 8.20. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa del oxígeno de cada réplica, y promedio, para cada tratamiento realizado en la prueba de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.	178
Cuadro 8.21. Masa y densidad, del agua y del medio de cultivo, para las tres réplicas realizadas en la medición de la densidad del medio de cultivo.	178
Cuadro 8.22. Viscosidad cinemática y dinámica para las cuatro repeticiones realizadas en la medición de la viscosidad del medio de cultivo.	178
Cuadro 8.23. Potencia volumétrica sin aireación, factor de aireación y potencia volumétrica con aireación, de cada impulsor, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.	178
Cuadro 8.23. (Continuación) Potencia volumétrica sin aireación, factor de aireación y potencia volumétrica con aireación, de cada impulsor, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.	179
Cuadro 8.24. Potencia volumétrica total con aireación, velocidad superficial del gas y coeficiente volumétrico de transferencia de masa, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.	179
Cuadro 8.25. Número de Reynolds, velocidad de punta y velocidad de corte, de cada impulsor, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.	179

Cuadro 8.26. Eficiencia de bombeo, tasa específica de disipación de energía por agitación y tasa específica efectiva de disipación de energía por agitación, de cada impulsor, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L...	180
Cuadro 8.27. Potencia específica por expansión isotérmica del gas, tasa específica de disipación de energía por expansión del gas y tasa específica de disipación de energía total, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.	180
Cuadro 8.28. Tiempo de mezclado y razón de mezclado-oxigenación, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.	181
Cuadro 8.29. Número de flujo con aireación, número de Froude disponible y crítico, número de potencia con aireación y retención del gas, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.	181
Cuadro 8.30. Potencia eléctrica del motor con aireación, potencia específica del compresor por compresión adiabática del gas, potencia eléctrica del compresor y potencia eléctrica total, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.	181
Cuadro 8.31. Eficiencia de mezclado y de transferencia de oxígeno, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.	181
Cuadro 8.32. Potencia volumétrica sin aireación, factor de aireación y potencia volumétrica con aireación, de cada impulsor, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.	182
Cuadro 8.33. Potencia volumétrica total con aireación, velocidad superficial del gas, flujo específico de aire y coeficiente volumétrico de transferencia de masa, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.	182
Cuadro 8.34. Número de Reynolds, velocidad de punta y velocidad de corte, de cada impulsor, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.	183
Cuadro 8.35. Eficiencia de bombeo, tasa específica de disipación de energía por agitación y tasa específica efectiva de disipación de energía por agitación, de cada impulsor, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L. .	183
Cuadro 8.36. Potencia específica por expansión isotérmica del gas, tasa específica de disipación de energía por expansión del gas y tasa específica de disipación de energía total, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.	184

Cuadro 8.37. Tiempo de mezclado y razón de mezclado-oxigenación, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.	184
Cuadro 8.38. Número de flujo con aireación, número de Froude disponible y crítico, número de potencia con aireación y retención del gas, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.	184
Cuadro 8.39. Potencia eléctrica del motor con aireación, potencia específica del compresor por compresión adiabática del gas, potencia eléctrica del compresor y potencia eléctrica total, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.	185
Cuadro 8.40. Eficiencia de mezclado y de transferencia de oxígeno, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.	185
Cuadro 10.1. Volumen de las disoluciones utilizadas en la preparación de los diferentes medios de cultivo.	210

Introducción

El descubrimiento, diseño, desarrollo y producción comercial de nuevos fármacos es un proceso complejo que requiere de la participación de profesionales de múltiples disciplinas a través de todas sus etapas. Se estima que el costo de introducir un nuevo agente terapéutico al mercado puede ascender a más de 1 000 millones de dólares, los cuales son distribuidos en cada una de las etapas de desarrollo, durante períodos que pueden extenderse por más de 10 años (Muntha, 2016). A pesar de las dificultades, esta actividad es vital para la sociedad debido a que existen enfermedades que no cuentan con tratamientos adecuados.

Históricamente, una gran cantidad de medicamentos se han desarrollado a partir de metabolitos secundarios provenientes de organismos como plantas y hongos (Vedegas & Li, 2009). La diversidad bioquímica que presentan los seres vivos les confiere la habilidad de sintetizar una gran cantidad de compuestos, muchos de ellos con actividad biológica en los seres humanos (Demain & Sánchez, 2009). Algunas de estas moléculas han tenido un impacto significativo en la medicina y en la sociedad tras su descubrimiento, como, por ejemplo: la morfina, aislada de la planta *Papaver somniferum* (Vedegas & Li, 2009), y la penicilina, aislada de hongos del género *Penicillium* (Campos-Muñiz, Cuadra-Zelaya, Rodríguez-Esquivel, & Fernández, 2007).

Tomando en cuenta el potencial de los metabolitos como fuente de nuevos fármacos, muchos investigadores han enfocado su atención hacia el estudio de compuestos naturales (Ji, Li, & Zhang, 2009). Particularmente, la medicina tradicional de China, Japón y Corea ha utilizado hongos del género *Ganoderma* durante cientos de años para el tratamiento de diversas afecciones a la salud (Paterson, 2006). Investigaciones previas con estos hongos han identificado más de 400 compuestos bioactivos con potencial uso terapéutico y farmacéutico (Sanodiya, Thakur, Baghel, Prasad, & Bisen, 2009), entre los cuales sobresalen 2 familias: los ácidos ganodéricos y los polisacáridos.

Los hongos del género *Ganoderma* crecen de forma escasa en la naturaleza, por lo que la extracción directa de los metabolitos de interés no es sostenible a gran escala (Berovic, y otros, 2003). Debido a esto se han explorado otros métodos de cultivo del hongo en un entorno controlado, como, por ejemplo: cultivo en sustratos sólidos o cultivo sumergido en medios líquidos. Éste último método es atractivo debido a su empleo robusto en la industria, particularmente en biorreactores tipo tanque agitado, para la producción de ácidos orgánicos, enzimas y antibióticos (Spadiut, Herwig, & Posch, 2013). El cultivo sumergido permite reducir el tiempo de operación y aumentar los rendimientos, en comparación con el cultivo sólido, sin embargo, esta tecnología también presenta retos importantes.

En la naturaleza, estos hongos crecen sobre la superficie de madera de árboles muertos, las cuales le proporcionan soporte y nutrientes al hongo (Webster & Weber, 2007). Al cultivarse en medio líquido, el crecimiento se vuelve desordenado y da lugar a la formación de dos tipos de estructuras macroscópicas: filamentos dispersos o agregados de biomasa (pellets). Cada morfología presenta diferentes patrones de consumo de nutrientes y generación de productos, además de modificar las características reológicas del medio de forma distinta (Wagner, Mitchell, Lanzi-Sasaki, Guilherme, & Lopes de Almeida-Amazonas, 2004). Esta relación entre morfología, reología del medio y productividad ha sido documentada extensivamente en la literatura, y depende de una gran cantidad de factores, como, por ejemplo: composición del medio de cultivo, procedencia, edad y concentración del inóculo, temperatura, pH del medio, velocidad de agitación, flujo de aire (Gibbs, Seviour, & Schmid, 2000), entre otras.

Ante este escenario, el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica se encuentra realizando investigaciones para establecer las condiciones de crecimiento de una especie del género *Ganoderma* recolectada en Costa Rica, con el fin de obtener altas concentraciones de los metabolitos terapéuticos. El presente proyecto pretende aportar al establecimiento de dichas condiciones a nivel de matraz y de biorreactor, identificar posibles problemas operativos relacionados con el sistema de cultivo, así como proponer los parámetros de escalamiento a biorreactores de mayor capacidad. Esto permitirá establecer una plataforma adecuada para la producción de los compuestos bioactivos de manera rápida, confiable y con el menor costo posible.

Capítulo 1. Marco conceptual

El primer capítulo de este trabajo trata sobre los conceptos necesarios para comprender el desarrollo del proyecto. Se examinan aspectos básicos sobre la fisiología de los hongos, como su ciclo de vida y requerimientos esenciales de crecimiento, haciendo énfasis en los hongos del filo *Basidiomycota*. Seguidamente se discute sobre el hongo de interés para este trabajo, sus metabolitos bioactivos y sus efectos farmacológicos. Posteriormente, se explica el cultivo de organismos en biorreactores tipo tanque agitado, las variables que influyen en el proceso y las diferentes estrategias de cultivo según el propósito de la operación. Finalmente se hace una revisión sobre el proceso de escalamiento de fermentaciones en biorreactores tipo tanque agitado, su objetivo y los criterios utilizados comúnmente.

1.1 EL REINO FUNGI

Los organismos denominados popularmente como “hongos” son todos aquellos que conforman el reino *Fungi*, uno de los 5 reinos principales del dominio *Eukarya* (Ruggiero, y otros, 2015). La delimitación del reino *Fungi* sigue siendo motivo de disputa entre la comunidad científica, y es común que se presenten reacomodos en las clasificaciones taxonómicas gracias al avance de técnicas de secuenciación genética (Deacon, 2006). Ejemplo de esto es el hecho de que, durante muchos años, los organismos pertenecientes al reino *Fungi* se clasificaron en conjunto con los del reino *Plantae* (plantas), esto debido a que comparten características como la presencia de una pared celular y el hecho de ser organismos “inmóviles” (Curtis, Barnes, Schnek, & Massarini, 2008). Hoy en día, los sistemas de clasificación taxonómica toman en cuenta aspectos genómicos, evolutivos y metabólicos además de los aspectos morfológicos y ecológicos que dominaron la disciplina años atrás (Ruggiero, y otros, 2015). En la Figura 1.1 se puede observar la clasificación taxonómica del reino *Fungi* hasta el rango de *Filo*.

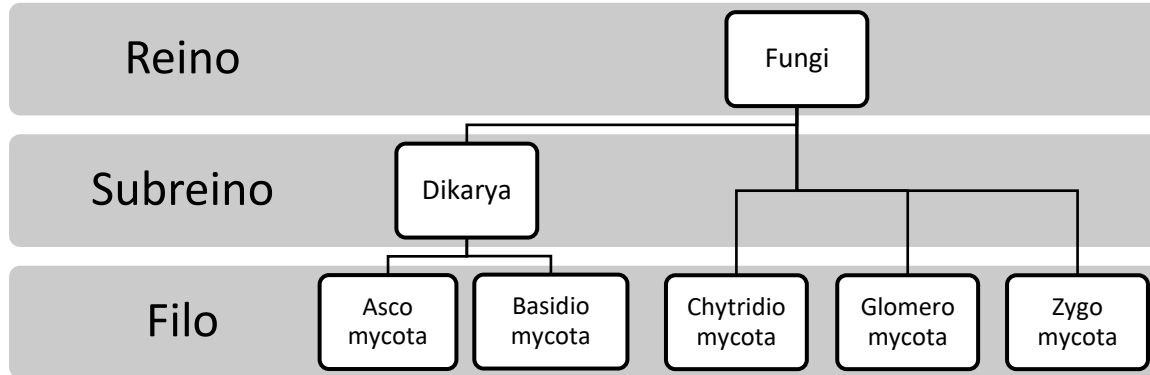


Figura 1.1. Clasificación taxonómica del reino *Fungi* hasta el rango de *Filo* (Ruggiero, y otros, 2015).

1.1.1 Características generales

Los hongos son organismos sumamente complejos y diversos; pueden existir como seres microscópicos, como en el caso de las levaduras, o como organismos macroscópicos capaces de formar estructuras de gran tamaño, como el género estudiado en esta investigación. A pesar de esta variabilidad, existen características comunes que son compartidas por una mayoría de los organismos pertenecientes a este reino, a continuación, se mencionan algunas.

1.1.1.1 Organismos eucariotas

Todos los organismos pertenecientes al reino *Fungi* presentan un núcleo definido, delimitado por una membrana nuclear. Los organismos del subreino *Dikarya* presentan células con dos núcleos definidos. Una característica particular de los núcleos de estos organismos es que son haploides, es decir, presentan un único ejemplar de cada cromosoma. Además de un núcleo definido, las células de los hongos contienen organelas, como mitocondrias, vacuolas, aparatos de Golgi, retículos endoplasmáticos, ribosomas y corpúsculos de Woronin (Webster & Weber, 2007).

1.1.1.2 Organismos heterótrofos

En cuanto a su nutrición, los hongos son organismos heterótrofos, es decir, obtienen sus nutrientes del medio que los rodea (Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2012). El mecanismo

principal para la obtención de nutrientes es la absorción, la cual ocurre muchas veces posterior a la excreción de enzimas para la degradación de la materia orgánica compleja de su entorno (Deacon, 2006).

1.1.1.3 Organismos inmóviles

Al igual que las plantas, los hongos no son organismos capaces de desplazarse de un lugar a otro, en su lugar, tienden a crecer sobre la superficie de los sustratos que utilizan como fuente de alimentación. El crecimiento o elongación de sus células, así como la emisión de esporas les confiere la capacidad de colonizar áreas con mayor disponibilidad de alimento (Curtis, Barnes, Schnek, & Massarini, 2008).

1.1.1.4 Presencia de pared celular

Los hongos presentan una pared celular, además de la membrana plasmática, compuesta en su mayoría por quitina (polímero de N-acetilglucosamina), y en menor grado por glucanos (polímero de glucosa). Esta es otra característica que comparten con los organismos del reino *Plantae* (Webster & Weber, 2007).

1.1.1.5 Formación de esporas

Las esporas son estructuras microscópicas que cumplen una función reproductiva para el organismo. Con la excepción de los hongos unicelulares, como las levaduras, todos los hongos producen esporas de algún tipo como mecanismo de reproducción sexual o asexual. El tamaño, forma y origen de las esporas varía en gran medida entre diferentes especies (Deacon, 2006).

1.1.1.6 Hifa como unidad celular básica

Las células de todos los hongos multicelulares se denominan hifas, y se diferencian de las células de otros organismos por el hecho de ser estructuras tubulares alargadas y delgadas,

que pueden estar divididas en compartimientos más pequeños, los cuales pueden intercambiar material entre sí (Kavanagh, 2011).

1.1.2 Requerimientos nutricionales

Los hongos requieren de una serie de compuestos químicos para llevar a cabo los procesos asociados a su subsistencia, crecimiento y reproducción. Como se mencionó anteriormente, estos organismos son heterótrofos, por lo que deben obtener dichos compuestos del entorno que los rodea. Asimismo, los hongos son organismos quimioorganótrofos, por lo que requieren de fuentes de carbono orgánicas para la obtención de energía y como donadoras de electrones. Otras características de estos es que son aerobios, lo que significa que requieren de oxígeno molecular como aceptor final de electrones, y, no son diazótrofos, es decir, no son capaces de fijar nitrógeno molecular del ambiente (Kavanagh, 2011).

Los compuestos químicos requeridos por los hongos pueden dividirse en 3 grupos: fuentes de carbono, macronutrientes (necesarios en concentraciones de mmol/L) y micronutrientes (necesarios en concentraciones de $\mu\text{mol/L}$). Los nutrientes también pueden clasificarse como esenciales, es decir, deben estar presentes en el medio puesto que el organismo no puede sintetizarlos por su cuenta; o no esenciales, lo que significa que pueden producirse a partir de otros compuestos del medio. Cada uno de estos grupos se describirá a continuación.

1.1.2.1 Fuentes de carbono

Este grupo de nutrientes es el de mayor importancia para los hongos debido a que proporciona el material para construir los esqueletos de carbono de todas las moléculas necesarias para el organismo, lo cual lo convierte en un nutriente esencial. Además de esto, la oxidación de estos compuestos permite generar adenosín trifosfato (ATP), principal portador de energía del organismo, así como regenerar (reducir) el cofactor nicotinamida-adenina dinucleótido (NADH), principal fuente de electrones para las reacciones de oxidación-reducción (Griffin, 1994).

Los hongos son capaces de utilizar una gran cantidad de compuestos como fuentes de carbono, que van desde hidrocarburos o alcoholes de bajo peso molecular, hasta biopolímeros complejos de alto peso molecular (Deacon, 2006). En el Cuadro 1.1 se resumen algunas fuentes de carbono utilizadas por los hongos unicelulares y pluricelulares.

Cuadro 1.1. Fuentes de carbono utilizadas comúnmente por los hongos (Kavanagh, 2011).

Fuente de carbono	Ejemplos	Descripción
Monosacáridos	Glucosa, galactosa, fructosa	Utilizadas por una gran mayoría de los organismos, particularmente la glucosa.
Disacáridos	Sacarosa, maltosa, lactosa	Si una levadura puede consumir maltosa, generalmente no podrá consumir lactosa, y viceversa.
Polisacáridos	Celulosa, almidón	Muchos hongos filamentosos pueden degradar la celulosa presente en los árboles.
Hidrocarburos	C ₁₂ -C ₁₈ n-Alcanos	Utilizados por muchas levaduras y algunos hongos filamentosos.
Alcoholes	Metanol, etanol, glicerol	Sustratos de preferencia para algunas especies de levaduras y hongos filamentosos.
Ácidos orgánicos	Ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico	Pueden ser consumidos por algunas levaduras en entornos aerobios.
Ácidos grasos	Ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico	Pueden ser consumidos por algunas levaduras denominadas "oleaginosas"
Biopolímeros	Lignina	Únicamente utilizada por degradadores de lignina, muchos pertenecientes al filo <i>Basidiomycota</i> .

1.1.2.2 Macronutrientes

Existen siete elementos químicos que pueden considerarse macronutrientes, los cuales son: nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, fósforo, azufre, potasio y magnesio, y también son nutrientes esenciales. En este apartado se comentará acerca de cinco de estos, dejando el hidrógeno y

oxígeno para el apartado de condiciones físicas. Se dará particular importancia al nitrógeno por su presencia en gran cantidad de macromoléculas.

1.1.2.2.1 Nitrógeno

Es elemento requerido en mayor cantidad entre los macronutrientes, y por esta razón puede ser el factor limitante para el crecimiento de un hongo ya sea en la naturaleza, o en el laboratorio. En el interior de las células, el nitrógeno se encuentra presente como el grupo funcional *amino* (-NH₂), el cual es indispensable para la construcción de moléculas como proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas y cofactores enzimáticos (Griffin, 1994). Las posibles fuentes de nitrógeno accesibles para los hongos se resumen en el Cuadro 1.2.

Cuadro 1.2. Fuentes de nitrógeno utilizadas comúnmente por los hongos (Deacon, 2006).

Fuente de nitrógeno	Ejemplos	Descripción
Sales de amonio	NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ NO ₃	Fuente inorgánica más accesible. Se incorpora al metabolismo a través de la reacción con ácido α -cetoglutarico. Provoca una disminución importante en el pH del entorno. Algunos hongos no pueden utilizarla, entre ellos, muchos del filo <i>Basidiomycota</i> .
Sales de nitrato	NaNO ₃ , KNO ₃ , NH ₄ NO ₃	Fuente inorgánica más abundante en los suelos. Se transforma en amonio mediante las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa, y posteriormente sigue el mismo proceso que el amonio. Muchas levaduras y hongos del filo <i>Basidiomycota</i> son incapaces de utilizarla.
Aminoácidos	Glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico	Fuente de nitrógeno con mayor facilidad de uso, puede ser utilizada por todas las especies de hongos. A partir de un solo aminoácido es posible obtener los restantes por medio de reacciones de transaminación.

1.1.2.2.2 Fósforo, azufre, potasio y magnesio

Los otros macroelementos indispensables para el crecimiento de los hongos son: fósforo, azufre, potasio y magnesio. En el Cuadro 1.3 se describe la función de cada uno de estos, así como las posibles fuentes desde donde los hongos pueden obtener esos nutrientes.

Cuadro 1.3. Otros macroelementos requeridos por los hongos (Kavanagh, 2011).

Macroelemento	Fuente	Descripción
Fósforo	NaH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄	Elemento requerido para la síntesis de ácidos nucleicos, ATP, NADH, fosfolípidos e intermediarios del metabolismo. Se almacena en forma de polifosfatos en las vacuolas.
Azufre	MgSO ₄ , K ₂ SO ₄ , Na ₂ SO ₄ , Metionina	Elemento requerido para la síntesis de los aminoácidos metionina y cisteína, vitaminas y cofactores enzimáticos.
Potasio	KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , KCl	Elemento requerido para la regulación del balance iónico y como cofactor enzimático.
Magnesio	MgCl ₂ , MgSO ₄	Elemento requerido como cofactor enzimático y como componente estructural de las células.

1.1.2.3 Micronutrientes

Existen 2 grupos de micronutrientes requeridos por los hongos: los iones metálicos (microelementos), y los factores de crecimiento, los cuales son mayoritariamente vitaminas (Griffin, 1994). Por su naturaleza inorgánica, los iones metálicos son nutrientes esenciales. En contraste, las vitaminas pueden ser producidas por la mayoría de los hongos, sin embargo, estas pueden convertirse en nutrientes esenciales para algunas especies de hongos bajo ciertas condiciones de cultivo (Kavanagh, 2011). En su gran mayoría, estas sustancias funcionan como cofactores enzimáticos indispensables para el metabolismo de las células. A continuación, se describen ambos grupos de micronutrientes.

1.1.2.3.1 Iones metálicos (microelementos)

Este grupo de micronutrientes se compone de ocho elementos, de los cuales, siete son de la familia de los metales de transición (bloque “d”), y uno es del grupo de los alcalinotérreos, todos en su forma de cationes. En el Cuadro 1.4 se describe cada elemento y su función correspondiente.

Cuadro 1.4. Microelementos requeridos para el crecimiento de los hongos (Kavanagh, 2011).

Microelemento	Fuente	Descripción
Calcio	CaCl ₂ , CaSO ₄	Requerido para la actividad de ciertas enzimas y para la transducción de señales de estrés.
Hierro	FeCl ₃ , Fe-EDTA	Requerido como componente estructural en los grupos hemo (porfirinas) y en los citocromos.
Cobre	CuSO ₄ , CuCl ₂	Requerido para la función de algunas enzimas y procesos de pigmentación.
Zinc	ZnCl ₂ , ZnSO ₄	Requerido como cofactor enzimático, particularmente en el metabolismo de ácidos orgánicos.
Níquel	NiCl ₂ , NiSO ₄	Requerido para el funcionamiento de la enzima ureasa.
Manganeso	MnCl ₂ , MnSO ₄	Requerido como cofactor de enzimas del ciclo de Krebs y la síntesis de ácidos nucleicos.
Cobalto	CoCl ₂	Requerido como componente estructural de la cianocobalamina (vitamina B ₁₂).
Molibdeno	Na ₂ MoO ₄	Requerido para la actividad de ciertas enzimas, particularmente en el metabolismo del nitrato.

1.1.2.3.2 Vitaminas

Por otra parte, las vitaminas son compuestos orgánicos con estructuras muy diversas. Comúnmente, estos compuestos se clasifican de acuerdo con su solubilidad, en liposolubles e hidrosolubles, y se nombran mediante la asignación de letras del abecedario. Las vitaminas liposolubles se nombran A, D, E y K, sin embargo, cada denominación corresponde a un grupo de compuestos con pequeñas diferencias estructurales entre sí (Ledesma-Amaro, Santos, Jiménez, & Revuelta, 2013). En contraste, las vitaminas hidrosolubles, y su denominación, corresponden a estructuras químicas definidas, y se clasifican en dos grupos, el complejo B (8 compuestos) y la vitamina C. Por su solubilidad en agua y su función metabólica, las vitaminas del complejo B han sido las más estudiadas en la formulación de medios de cultivo para microorganismos, por lo que se describirá este grupo a mayor profundidad en el Cuadro 1.5.

Cuadro 1.5. Vitaminas del complejo B requeridas para el crecimiento de los hongos (Griffin, 1994).

Vitamina	Fórmula molecular	Descripción
Tiamina (B ₁)	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS	Cofactor de las carboxilasas.
Riboflavina (B ₂)	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	Componente del FADH, cofactor de las deshidrogenasas.
Niacina (B ₃)	C ₆ H ₅ NO ₂	Componente del NADH y NADPH, cofactores de las deshidrogenasas.
Ácido pantoténico (B ₅)	C ₉ H ₁₇ NO ₅	Componente de la coenzima-A.
Piridoxina (B ₆)	C ₈ H ₁₁ NO ₃	Cofactor de las transaminasas.
Biotina (B ₇)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	Coenzima en reacciones de carboxilación.
Ácido fólico (B ₉)	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	Coenzima en reacciones de transferencia de grupos metilo.
Cianocobalamina (B ₁₂)	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	Coenzima en reacciones de transferencia de grupos metilo.

1.1.3 Condiciones físicas

Además de los requerimientos nutricionales (químicos), los hongos requieren de una serie de condiciones físicas en su entorno para desarrollar su ciclo de vida. Es común que estos parámetros físicos varíen con el tiempo y con la ubicación en un ecosistema, por lo que los hongos deben ser capaces de crecer dentro de rangos aceptables para cada variable. Por esta razón, los hongos (y todos los organismos) se clasifican según los valores máximos, mínimos y óptimos de cada variable física (Deacon, 2006). Entre todas las condiciones físicas a las que los organismos están expuestos en la naturaleza, existen cinco que se han estudiado de forma más extensa, las cuales son: temperatura, pH, oxígeno, potencial del agua, y luz. A continuación, se detallará cada una de estas.

1.1.3.1 Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros físicos más estudiados en el cultivo de microorganismos, ya que influye en una gran cantidad de procesos bioquímicos, particularmente en la velocidad y en el equilibrio termodinámico de las reacciones catalizadas por enzimas (von Stockar, 2013). De acuerdo con la temperatura óptima preferida por el organismo, los hongos

pueden clasificarse como mesófilos, psicrófilos o termófilos, en donde la gran mayoría de estos se encuentran en el primer grupo. Además de esta clasificación, los hongos también pueden ser psicotolerantes o termotolerantes, esto es, pueden soportar bajas o altas temperaturas sin sufrir daños considerables (Deacon, 2006). En el Cuadro 1.6 se muestran los rangos de temperatura que definen cada clasificación, así como ejemplos de algunos hongos pertenecientes a dichos grupos.

Cuadro 1.6. Clasificación de los hongos de acuerdo con los rangos de temperatura tolerables y óptimos para su crecimiento (Deacon, 2006).

Clasificación	Rango de temperaturas (°C)		Ejemplos
	Tolerables	Óptimas	
Psicrófilo	0-20	0-16	<i>Sclerotinia borealis</i> , <i>Typhula idahoensis</i>
Mesófilo	0-50	10-40	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Ganoderma sp.</i>
Termófilo	20-50	40-50	<i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Chaetomium thermophile</i>

1.1.3.2 pH

La influencia del pH sobre el crecimiento de los hongos también se ha estudiado extensamente en la literatura, sin embargo, la identificación de sus efectos ha sido más complicada que en el caso de la temperatura (Griffin, 1994). En primera instancia, los hongos tienden a alterar el pH de su entorno de forma importante a medida que van creciendo, lo cual se debe a la absorción de iones inorgánicos (sales minerales) y a la excreción de ácidos orgánicos o iones H^+ al medio. A pesar de este efecto sobre su entorno, el pH interno de los hongos (citoplasma) se mantiene estable alrededor de un valor de 7, independientemente de la acidez o alcalinidad del medio que los rodea (Deacon, 2006). Esto quiere decir que la influencia del pH sobre el crecimiento de los hongos se da de forma indirecta, a través de la alteración de la estructura química de los diferentes compuestos presentes en el medio, lo cual modifica su solubilidad y capacidad para ser absorbidos por las células (Griffin, 1994).

De acuerdo con los intervalos de pH tolerables y óptimos, los hongos pueden clasificarse como neutrófilos, acidófilos o alcalófilos, aunque estos intervalos no están tan bien definidos como sus análogos de temperatura. La mayoría de estos organismos pueden tolerar valores de pH de 4.0 y 8.5 (inclusive 3.0 o 9.0 para algunas especies), pero encuentran su valor óptimo entre 5.0 y 7.0 (Deacon, 2006). Más aún, muchos medios de cultivo comerciales como Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Sabouraud Dextrosa (SDA), Agar Czapek-Dox (CDA), o sus versiones sin agar, presentan valores de pH entre 5.5 y 5.6 (Atlas, 2010).

1.1.3.3 Oxígeno

La concentración de oxígeno es probablemente la condición física más relevante para el desarrollo del ciclo de vida de los hongos, esto debido a su participación en procesos metabólicos vitales. Su función más importante es aceptar los electrones de la enzima citocromo oxidasa al final de la cadena respiratoria, la cual se encarga de producir la mayor cantidad de moléculas de ATP y de oxidar nuevamente las moléculas de NADH y FADH (Griffin, 1994). Además de esta función, el oxígeno es sustrato de una clase de enzimas llamadas monooxigenasas, encargadas de catalizar reacciones de hidroxilación que son indispensables para la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides (Kavanagh, 2011).

A pesar de su función indispensable en la gran mayoría de los hongos, algunos de estos organismos son capaces de tolerar bajas concentraciones de este elemento, otros pueden subsistir en su ausencia total, e inclusive, para algunas especies este gas es altamente tóxico. Estas características permiten clasificar a los hongos (y a cualquier otro organismo) en diferentes grupos, los cuales se describen en el Cuadro 1.7.

Cuadro 1.7. Clasificación de los hongos de acuerdo con sus requerimientos y capacidad de tolerancia del oxígeno (Deacon, 2006).

Clasificación	Metabolismo		Tolerancia al oxígeno	Ejemplos
	Aeróbico	Anaeróbico		
Aerobios obligados	Sí	No	Si	<i>Armillaria mellea, Ganoderma sp.</i>

Cuadro 1.7. (Continuación) Clasificación de los hongos de acuerdo con sus requerimientos y capacidad de tolerancia del oxígeno (Deacon, 2006).

Clasificación	Metabolismo		Tolerancia al oxígeno	Ejemplos
	Aeróbico	Anaeróbico		
Anaerobios facultativos	Si	Si	Si	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Fermentativos obligados	No	Si	Si	<i>Aqualinderella fermentans</i> , <i>Blastocladiella ramosa</i>
Anaerobios obligados	No	Si	No	<i>Neocallismastix sp.</i> , <i>Piromyces sp.</i> , <i>Caecomyces sp.</i>

1.1.3.4 Potencial del agua

El agua es uno de los componentes indispensables para la subsistencia de cualquier organismo vivo, ya que funge como el medio (solvente) en el cual se llevan a cabo todos los procesos biológicos propios de las células. Para entender el efecto que tiene el agua sobre el crecimiento de los hongos, no basta con tomar en cuenta la cantidad total presente en un entorno determinado, ya que hay múltiples factores que influyen en la disponibilidad de este componente para las células. Por esta razón, es necesario definir el concepto de potencial del agua, el cual se refiere al potencial químico del agua en una mezcla, por unidad de volumen, con respecto al del agua pura a una temperatura y presión de referencia (Griffin, 1994). En condiciones de equilibrio termodinámico, este parámetro se relaciona con otros factores de acuerdo con la ecuación (1.1):

$$\Psi_w = \Psi_\pi + \Psi_m + \Psi_P + \Psi_g \quad (1.1)$$

En donde:

Ψ_w : Potencial del agua, MPa.

Ψ_π : Potencial osmótico, MPa.

Ψ_m : Potencial de matriz, MPa.

Ψ_P : Potencial hidrostático, MPa.

Ψ_g : Potencial gravitacional, MPa.

Como se puede observar en la ecuación anterior, todos los parámetros corresponden a diferentes formas de presión, ya que esta magnitud es la encargada de regir el transporte de fluidos. La definición del potencial osmótico corresponde a la de presión osmótica de van't Hoff; el potencial hidrostático, se define simplemente como el valor de la presión absoluta del sistema; el potencial gravitacional corresponde al aporte de la gravedad a la presión hidrostática (Deacon, 2006). Por otra parte, el potencial de matriz involucra a las fuerzas que experimenta el agua debido a sus interacciones con componentes sólidos del medio, entre las cuales se encuentran las fuerzas de adhesión, cohesión y la capilaridad, producto de la tensión superficial (Passioura, 1980).

Una vez definido el potencial del agua, es posible explicar sus efectos sobre el desarrollo del ciclo de vida de los hongos. En primer lugar, una de las funciones de esta variable es la de permitir la absorción de nutrientes del medio y la secreción de subproductos metabólicos y enzimas al entorno. En segundo lugar, los mecanismos de crecimiento y reproducción dependen del establecimiento de un potencial de agua adecuado para generar las fuerzas requeridas para la elongación de las hifas y la secreción de las esporas (Deacon, 2006). Finalmente, los hongos pueden clasificarse de acuerdo con su tolerancia a potenciales de agua bajos o altos, sin embargo, no existe un consenso en cuanto a los rangos límite para cada clasificación. El rango completo de potenciales de agua posibles para los hongos se extiende desde 0 MPa hasta -69 MPa, en donde la mayoría de estos organismos crecen adecuadamente a -2.5 MPa.

1.1.3.5 Luz

Debido a su metabolismo heterotrófico, los hongos no requieren luz solar para la generación de energía (ATP) o poder reductor (NADH, NADPH o FADH), por lo que el efecto de esta condición física sobre su crecimiento es prácticamente despreciable. Sin embargo, la luz si puede tener efectos en el metabolismo secundario y en los procesos reproductivos de los hongos. En particular, se ha observado que la luz con longitudes de onda dentro del rango visible, infrarrojo cercano y ultravioleta cercano, puede estimular la biosíntesis de pigmentos

como carotenoides, en respuesta a las especies reactivas de oxígeno que se producen por la radiación. Además, la luz puede inducir la expresión de rutas metabólicas secundarias capaces de sintetizar compuestos como fitohormonas, terpenoides o polipéptidos con funciones antibióticas o micotóxicas (Tisch & Schmoll, 2010). Por otro lado, la exposición a la luz puede desencadenar la formación de las estructuras reproductivas de los hongos, como los cuerpos fructíferos de algunos organismos del filo *Basidiomycota*, así como su esporulación. En contraste, esa misma exposición puede suprimir la formación de esporas en otras especies (Deacon, 2006).

1.1.4 Aprovechamiento de los hongos y sus metabolitos por el ser humano

El ser humano ha utilizado hongos, o compuestos generados por estos, para obtener productos de interés desde la época de los egipcios, quienes usaron las levaduras para elaborar pan a partir de harina de trigo (Papagianni, 2004). Los compuestos sintetizados por los hongos se dividen en dos grupos: metabolitos primarios o secundarios, de acuerdo con el rol que desempeñan en el metabolismo de estos seres vivos. Los metabolitos primarios son compuestos químicos que se generan por las reacciones enzimáticas encargadas de proveer la materia prima, la energía y el poder reductor necesarios para el crecimiento del organismo. Las rutas metabólicas que están involucradas en estas reacciones están distribuidas casi universalmente entre todos los organismos, y tienden a estar más activas durante la fase de crecimiento exponencial. Algunos ejemplos de estos metabolitos son: azúcares, aminoácidos, lípidos simples, alcoholes y ácidos orgánicos (Kavanagh, 2011).

En contraste, los metabolitos secundarios son compuestos producidos por rutas metabólicas muy específicas que se encuentran únicamente en grupos particulares de organismos. Su función biológica no está relacionada con el crecimiento del hongo, sino más bien con procesos de diferenciación morfológica, esporulación, reproducción y defensa ante depredadores, por lo que tienden a concentrarse durante la fase estacionaria. Entre este grupo de metabolitos se encuentran: antibióticos, micotoxinas, pigmentos y hormonas (Keller, Turner, & Bennett, 2005).

A nivel industrial existe una gran cantidad de compuestos que son manufacturados a través de fermentaciones con hongos. Por ejemplo, la producción de ácido cítrico se realiza en su mayoría mediante la fermentación de *Aspergillus niger* en biorreactores tipo tanque agitado. Se estima que la producción anual total de ácido cítrico fue de 600 000 toneladas métricas para el año 2002 (Anastassiadis, Aivasidis, & Wandrey, 2002). La producción de penicilinas y cefalosporinas depende de las fermentaciones con *Penicillium sp.* y *Cephalosporium sp.*, respectivamente. Desde su descubrimiento (Campos-Muñiz, Cuadra-Zelaya, Rodríguez-Esquivel, & Fernández, 2007), estos antibióticos han permitido salvar la vida de millones de seres humanos (Lee Ventola, 2015). En el Cuadro 1.8 se recopilan más ejemplos de productos obtenidos a partir del cultivo industrial de hongos.

Cuadro 1.8. Compuestos de interés comercial producidos mediante cultivos de hongos (El-Enshasy, 2007) (Adrio & Demain, 2003).

Tipo de producto	Compuesto	Hongo
Fármacos	Lovastatina	<i>Aspergillus terreus</i>
	Pneumocandina	<i>Glarea lozoyensis</i>
	Griseofulvina	<i>Penicillium patulum</i>
	Ciclosporina	<i>Cylinrocarpum lucidum</i>
Enzimas	Glucosa oxidasa	<i>Aspergillus niger</i>
	Xylanasa	<i>Aspergillus awamori</i>
	Glucamilasa	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Celulasa	<i>Trichoderma reesei</i>
Micotoxinas	Aflatoxinas	<i>Aspergillus sp.</i>
	Tricotecenos	<i>Fusarium sp.</i>
	Ácido giberélico	<i>Gibberella fujikuroi</i>
	Alcaloide ergótico	<i>Claviceps purpurea</i>
Productos alimentarios	Cerveza	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Pan	<i>Ashbya gossypii</i>
	Riboflavina	<i>Fusarium culmorum</i>
	Biotina	<i>Fusarium culmorum</i>
Ácidos orgánicos	Ácido glucónico	<i>Aspergillus niger</i>
	Ácido kójico	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Ácido itacónico	<i>Aspergillus terreus</i>
	Ácido linoleico	<i>Martierella isabellina</i>

Cuadro 1.8. (Continuación) Compuestos de interés comercial producidos mediante cultivos de hongos (El-Enshasy, 2007) (Adrio & Demain, 2003).

Tipo de producto	Compuesto	Hongo
Pigmentos	Monascorubramina	<i>Monascus</i>
	Rubropunctamina	<i>purpureus</i>
	Astaxantina	<i>Phaffia rhodozyma</i>
	Betacaroteno	<i>Blakeslea trispora</i>

1.2 EL FILO BASIDIOMYCOTA

El filo Basidiomycota está compuesto por más de 30 000 especies de hongos, algunas de las cuales tienen relación directa con las actividades de los seres humanos. Los cuerpos fructíferos de especies como *Lentinula edodes* (Shiitake) o *Agaricus bisporus* (Portobello) son comestibles para los seres humanos, en contraste, aquellos de *Amanita phalloides* resultan ser altamente tóxicos. Otros hongos como *Heterobasidion annosum* provocan pérdidas millonarias en la industria de la madera por el daño ocasionado a especies de coníferas como pinos y abetos (Webster & Weber, 2007). La característica principal de los hongos de este filo es el hecho de que la meiosis y la formación de esporas sexuales ocurre en células especializadas llamadas basidios, las cuales están ubicadas en las terminaciones de las hifas. Las esporas sexuales son producidas afuera de los basidios y están soportadas por estructuras denominadas esterigmas (Griffin, 1994).

1.2.1 Estructura celular, ciclo de vida y mecanismos de reproducción

En el caso de los hongos del filo *Basidiomycota*, la unidad celular básica es la hifa, la cual tiene una forma alargada y delgada en comparación con las formas esféricas de las células de otros organismos, como se observa en la Figura 1.2. Las hifas poseen una pared celular constituida de quitina, un polisacárido formado por unidades de N-acetilglucosamina, y glucanos, formados por unidades de glucosa en su mayoría, además de poseer una membrana plasmática conformada por una bicapa fosfolipídica. Las hifas de algunos hongos contienen subdivisiones internas que la separan en varios compartimientos. Estas divisiones se llaman septos y pueden contener uno o varios orificios que permiten el transporte de plasma y organelas

entre los compartimientos. Los hongos poseen más de un núcleo celular en cada hifa y estos pueden movilizarse a través de los poros en los septos.

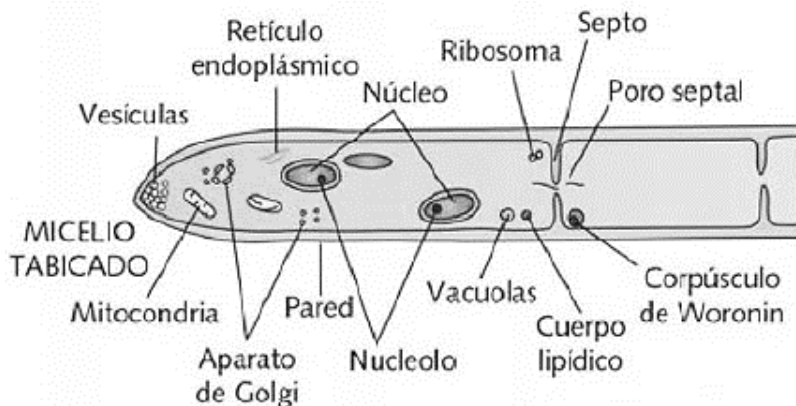


Figura 1.2. Estructura básica de una hifa (Arenas, 2014).

El ciclo de vida de los hongos en la naturaleza es sumamente diverso. En la Figura 1.3 se puede observar el ciclo de vida de forma esquemática. Inicialmente, las esporas (basidiosporas, en este caso) se desprenden de los basidios y caen sobre la superficie. Si las condiciones del entorno son favorables, las esporas germinarán dando origen a las hifas, las cuales crecen en longitud únicamente en sus extremos. Otro mecanismo de crecimiento de las hifas es la ramificación, la cual permite el crecimiento lateral en zonas distintas a los extremos; en algunas ocasiones dichas ramificaciones pueden producir esporas asexuales denominadas oídios. Al conjunto de hifas de un hongo se le denomina *micelio* (Webster & Weber, 2007).

En las primeras etapas de crecimiento, las hifas contienen un único núcleo proveniente de las esporas de las cuales germinaron; a este conjunto de hifas se le llama micelio primario. Posteriormente, en un proceso conocido como plasmogamia, las hifas del micelio primario se fusionan dando origen al micelio secundario, el cual posee hifas con dos núcleos. El micelio secundario comenzará a crecer tridimensionalmente con el fin de conformar el cuerpo fructífero del hongo, estructura característica de cada especie. En el cuerpo fructífero ocurrirán los procesos sexuales que darán paso a la conformación de los basidios, los cuales a su vez producirán las esporas sexuales con el fin de buscar zonas con mejores condiciones de crecimiento (Webster & Weber, 2007).

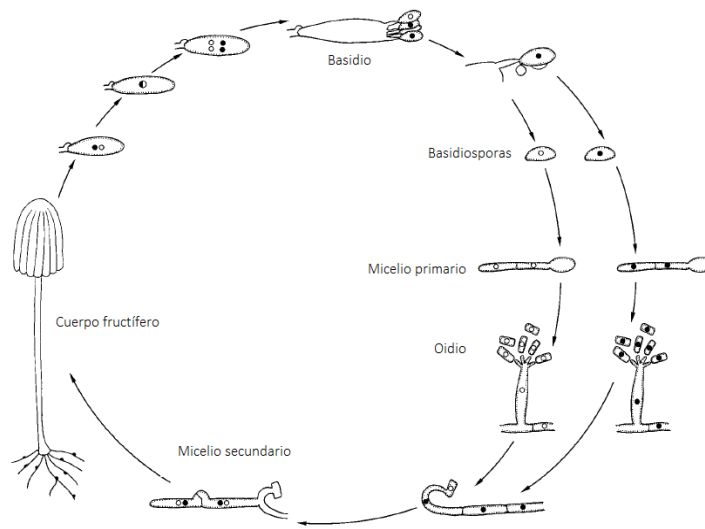


Figura 1.3. Ciclo de vida general de un hongo del filo *Basidiomycota* (Webster & Weber, 2007).

1.3 EL GÉNERO GANODERMA

Los hongos del género *Ganoderma* son parte de filo *Basidiomycota* y se han utilizado en la medicina tradicional de China, Japón y Corea desde hace más cientos de años. A nivel comercial existen formulaciones basadas en cuerpos fructíferos molidos o extractos de estos que se venden como suplementos nutricionales (Paterson, 2006). Seguidamente se describirán algunas características relevantes de estos hongos, así como sus metabolitos de interés.

1.3.1 Características generales

El nombre de este género de hongos proviene de las palabras griegas “gano”, que significa brillante, y “derma” que significa piel (Lloyd, y otros, 2018). La clasificación taxonómica completa para este género es (Index Fungorum Partnership, 2020):

1. Reino: *Fungi (Mycota)*
2. Subreino: *Dikarya*
3. Filo: *Basidiomycota*
4. Subfilo: *Agaricomycotina*
5. Clase: *Agaricomycetes*
6. Subclase: *Incertae sedis*
7. Orden: *Polyporales*
8. Familia: *Polyporaceae*
9. Género: *Ganoderma*

El hábitat natural de estos hongos comprende bosques tropicales y templados distribuidos en casi todos los continentes; se han reportado especies nativas de América, Europa, Asia y África. Comúnmente se les encuentra creciendo sobre la corteza de los árboles, cerca de su base, y debido a la forma de sus cuerpos fructíferos se les conoce popularmente con el nombre de “orejas de palo” (Alvarenga-Ventuolo, Salazar-Aguilar, Rosales-López, & Canessa-Amador, 2014). En cuanto a su alimentación, los hongos del género *Ganoderma* son organismos saprófitos, lo cual significa que obtienen los nutrientes de la degradación de materia orgánica muerta, particularmente madera. Los organismos saprófitos se clasifican, según el tipo de degradación que producen sobre la madera, en dos categorías. Los degradadores de celulosa (brown-rot) excretan enzimas que hidrolizan los enlaces de la celulosa y hemicelulosa para liberar los monosacáridos que los constituyen, dejando intacta la lignina. En contraste, los degradadores de lignina (white-rot) excretan enzimas especializadas para degradar este componente y convertirlo en compuestos orgánicos más sencillos, dejando de lado una capa de celulosa de color blanco, la cual le otorga el nombre a este tipo de saprófitos. Este último es el caso de los hongos del género *Ganoderma* (Webster & Weber, 2007).

De acuerdo con el repositorio de Index Fungorum Partnership (2020), existen más de 450 especies de *Ganoderma* reportadas en la literatura. La especie más comúnmente mencionada en artículos científicos, así como en productos comerciales es *G. lucidum*, esto debido a que fue la primera especie descrita por Karsten en 1881 (Zhou, y otros, 2014). Sin embargo, dada la gran diversidad genética de los hongos, existen múltiples subespecies o variedades de *G. lucidum*, las cuales varían según la región de recolección del material. A pesar de la popularidad de esta especie, existen otras que han sido parte de numerosos estudios científicos, como, por ejemplo: *G. applanatum*, *G. australe*, *G. boninense*, *G. lingzhi*, *G. resinaceum*, *G. stipitatum*, *G. tsugae*, entre otras (Lloyd, y otros, 2018). En el caso de Costa Rica, se han identificado 9 especies distintas: *G. australe*, *G. amazonense*, *G. dorsale*, *G. longistipitatum*, *G. oerstedii*, *G. orbiforme*, *G. perzonatum*, *G. resinaceum* y *G. stipitatum* (Ruíz-Boyer & Rodríguez-González, 2020).

En cuanto a su estructura microscópica, las esporas, hifas y micelio corresponden, a grandes rasgos, a las mencionadas para otros hongos del filo *Basidiomycota* en secciones anteriores. Por otra parte, las estructuras macroscópicas, los cuerpos fructíferos, se reconocen por su coloración roja-naranja intensa y satinada, así como por su forma similar a la de una oreja humana (Naranjo-Montoya, 2014). En la Figura 1.4 se muestran imágenes de la cepa de *Ganoderma* utilizada en este trabajo.



Figura 1.4. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa *Ganoderma sp* utilizada en esta investigación. Izquierda: cuerpo fructífero del hongo. Derecha: hifas y esporas teñidas con azul de lactofenol, observadas a través de un microscopio óptico a 40X. Imágenes cortesía del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (2019).

1.3.2 Metabolitos de interés comercial

Al igual que con otros organismos recopilados en el Cuadro 1.8, los hongos del género *Ganoderma* han despertado interés comercial debido a la producción de extractos y compuestos puros con efectos sobre la salud humana. En el caso de este hongo en particular, los compuestos de interés son metabolitos secundarios en su mayoría, entre los cuales se encuentran triterpenoides, polisacáridos, esteroides, polipéptidos, ácidos grasos, entre otros (Sanodiya, Thakur, Baghel, Prasad, & Bisen, 2009). De estos metabolitos, dos grupos sobresalen por

encima del resto, los ácidos ganodéricos y los β -D-glucanos, los cuales han mostrado actividad farmacológica contra diversas afecciones humanas (Paterson, 2006). A continuación, se describen estos grupos con mayor detalle.

1.3.2.1 Ácidos ganodéricos

Los ácidos ganodéricos son triterpenoides (derivados oxigenados de los triterpenos) tetracíclicos, derivados del lanosterol, cuyos esqueletos pueden contener 30, 27 o 24 átomos de carbono. Debido a las numerosas sustituciones posibles en los carbonos en las posiciones 3, 7, 11, 12, 15, 22, 23, 24 y 25, existe una gran cantidad de variantes para este tipo de metabolitos (Liang, y otros, 2019). En la Figura 1.5 se muestran las estructuras de las variantes A y B de estos compuestos.

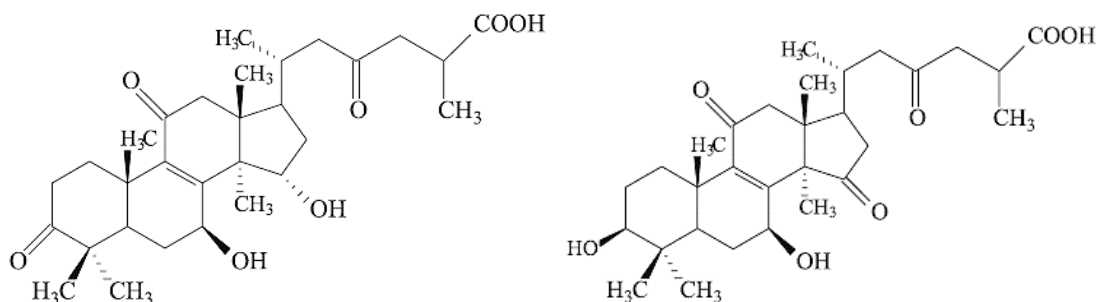


Figura 1.5. Estructura química de los ácidos ganodéricos. Izquierda: variante A, derecha: variante B (Xu, Zhao, & Zhong, 2010).

Estos compuestos se han aislado de los cuerpos fructíferos, laminillas, micelio y esporas de diferentes especies de *Ganoderma sp.* desde 1982, año en que se aislaron las variantes A y B. A pesar de que su función fisiológica y su ruta metabólica no se han identificado con total certeza, existen hipótesis que sugieren que su parecido estructural con el lanosterol y el ergosterol le confieren un origen y roles similares (Xu, Zhao, & Zhong, 2010). El ergosterol es el esteroide más importante en los hongos, y su función principal es regular la permeabilidad y fluidez de la membrana, aunque no se descartan otras funciones en las interacciones entre los hongos y otros organismos en su entorno (Rodrigues, 2018). A nivel farmacológico, los efectos más relevantes de estos metabolitos han sido: actividad citotóxica contra células de hepatoma (tumor en el hígado), inhibición de la síntesis de colesterol, actividad antihistamínica,

inhibición de la enzima α -glucosidasa (reducción de concentración de glucosa en sangre) y actividad antihipertensiva (Liang, y otros, 2019).

1.3.2.2 β -D-glucanos

Los polisacáridos más importantes producidos por *Ganoderma sp.* son los β -D-glucanos, los cuales son polímeros de D-piranosas, en su mayoría D-glucosa, que se encuentran enlazados linealmente mediante enlaces β -1,3, y lateralmente mediante enlaces β -1,6. La distribución de pesos moleculares tiene un rango entre 10^3 y 10^6 Da, y son solubles en agua caliente (Nie, Zhang, Li, & Xie, 2013). Debido al gran tamaño de estas moléculas, su estructura terciaria juega un papel importante en su actividad biológica. La conformación tridimensional de estos compuestos se asemeja a la del ADN en su carácter helicoidal, sin embargo, los β -D-glucanos forman una triple hélice estabilizada por los puentes de hidrógeno y por las cadenas laterales (Lu, y otros, 2020). En la Figura 1.6 se muestra la estructura primaria y terciaria de forma simplificada.

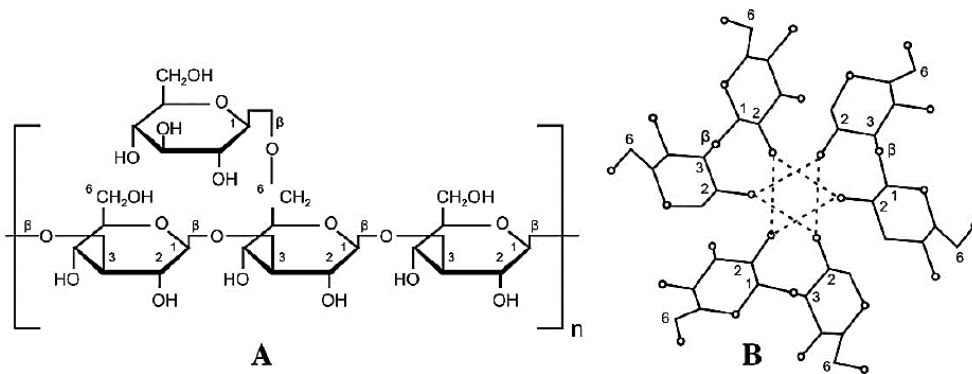


Figura 1.6. Estructura química de los β -D-glucanos. A: estructura primaria de la cadena polimérica. B: estructura terciaria de la triple hélice. (Sanodiya, Thakur, Baghel, Prasad, & Bisen, 2009).

Estos polisacáridos se han purificado de los cuerpos fructíferos, micelio, esporas y medio de cultivo de diferentes especies de *Ganoderma sp.*, y comúnmente se clasifican, según su ubicación en los sistemas de cultivo, en extracelulares o intracelulares. Contrario al caso de los ácidos ganodéricos, la función biológica de los D-glucanos (en sus conformaciones α y β) si se encuentra definida con precisión. Su función principal es ser componentes estructurales

de la pared celular de los hongos, en conjunto con la quitina. Además, se ha encontrado que estos compuestos funcionan como señales de alerta para los sistemas de defensa de plantas y mamíferos (Ruiz-Herrera & Ortiz-Castellanos, 2019). En cuanto a sus efectos farmacológicos, los más importantes son: modulación (estimulación) del sistema inmunológico, capacidad antioxidante, actividad antiinflamatoria, efecto hepatoprotector y actividad hipolipídica (reducción de triglicéridos) (Lu, y otros, 2020).

1.3.3 Condiciones de cultivo en placa y en medio líquido

El interés comercial en *Ganoderma sp.* ha propiciado el estudio de las condiciones de cultivo del organismo, y su efecto sobre la producción de la biomasa y los metabolitos bioactivos. Estas investigaciones comprenden el estudio del efecto de la composición del medio de cultivo y las condiciones físicas de crecimiento. Seguidamente se describirá de forma breve algunos hallazgos relevantes.

1.3.3.1 Composición del medio de cultivo

De acuerdo con una revisión reciente por Berovic y Podgornik (2019), las investigaciones acerca de los efectos de la composición del medio de cultivo se han centrado en las fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y en la adición de aceites de origen vegetal. Otros componentes como polímeros, surfactantes o elicitores también se han investigado, pero su efecto no es de interés particular en este trabajo.

Con respecto a las fuentes de carbono, se ha reportado que azúcares simples como glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa y manosa son adecuados para el crecimiento de *Ganoderma sp.* (Jayasinghe, y otros, 2008). Otros autores han utilizado fuentes complejas de carbono, como harina de cebada (Torres-López, Quintero-Díaz, & Atehortua-Garcés, 2011), azúcar sin refinar (Chang, Tsai, & Houn, 2006) o extracto de papa (Berovic, y otros, 2003). Estas fuentes complejas permiten obtener mayores concentraciones de biomasa en algunos casos, debido a que aportan otros nutrientes además del carbono, sin embargo, muchos autores han optado por utilizar fuentes definidas como glucosa o lactosa para cultivos en medio líquido.

En cuanto a las fuentes de nitrógeno, se han investigado fuentes orgánicas definidas (aminoácidos) y complejas (Chang, Tsai, & Houn, 2006), así como fuentes inorgánicas como sales de amonio o nitratos (Paliya, Chaudhary, Verma, & Prasad, 2014). Los resultados han mostrado que *Ganoderma sp.* tiene preferencia por las fuentes orgánicas complejas, como peptonas, extracto de levadura o extractos de cereales (soya, trigo, cebada) (Berovic & Podgornik, 2019). Fang y Zhong (2002) reportaron que el mayor crecimiento de biomasa se presentó cuando se utilizó peptona y extracto de levadura al mismo tiempo, en concentraciones iguales (5 g/L). Esta combinación de fuentes de nitrógeno ha sido la preferida en estudios en medio líquido.

En lo que concierne a las sales inorgánicas, existen investigaciones que se han centrado en el rol de los macroelementos (K, Mg, P, S), mientras que otras han explorado los efectos de los microelementos (metales de transición). Las fuentes de macroelementos que se han utilizado mayoritariamente han sido KH_2PO_4 (en ocasiones junto a K_2HPO_4) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, cuyos efectos positivos sobre el crecimiento del hongo han sido reportados por Simonic *et al* (2008), Avtonomova *et al* (2006) y Torres-López *et al* (2011). Por otro lado, los microelementos que han mostrado efectos positivos sobre la producción de biomasa y metabolitos secundarios de *Ganoderma sp.* son: CuCl_2 (1 mM) (Tang & Zhu, 2010); FeSO_4 (50 mg/L), NaSeSO_3 (25 mg/L) y ZnSO_4 (75 mg/L) (Cui & Zhang, 2011); CaCl_2 (10 mM, sobre ácidos ganodéricos) (Xu & Zhong, 2012) y Mn^{2+} (10 mM, sobre ácidos ganodéricos) (Xu, Xia, & Zhong, 2014).

La adición de aceites de origen vegetal, así como ácidos grasos puros, también se ha investigado en cultivos de *Ganoderma sp.* en medio líquido. Chang, Tsai y Houn (2006) probaron diferentes tipos de aceites vegetales y encontraron que el aceite de oliva (3.96 g/L) y el aceite de cártamo (3.44 g/L) produjeron las mayores concentraciones de biomasa y polisacáridos. Por otro lado, Yang, Ke y Kuo (2000) reportaron que la adición de ácido oleico puro (1.5 g/L), así como aceite de oliva (1% v/v), estimularon el crecimiento del hongo a nivel de matraz, resultado que coincide con lo encontrado por Feng *et al* (2017) para ácido oleico (3% v/v).

Adicionalmente, pocos autores han estudiado el efecto de factores de crecimiento, como las vitaminas del complejo B, sobre el cultivo de *Ganoderma sp.* Jo *et al* (2009) investigaron la adición de las vitaminas B1, B2, B3, B6 y B7 a medios de cultivo semisólidos, obteniendo una mejora en el crecimiento con la vitamina B1 (tiamina) y B7 (biotina). De forma similar, Torres-López *et al* (2011) reportaron que la adición de tiamina (0.05 g/L) fue beneficiosa para la producción de biomasa en medio líquido.

1.3.3.2 Condiciones físicas

Según Berovic y Podgornik (2019), el pH y la concentración de oxígeno son las variables físicas que más se ha estudiado en cultivos de *Ganoderma sp.* a nivel de placa y en medio líquido. La tercera condición que más se ha investigado es la temperatura, mientras que otras variables como el potencial del agua o la irradiación de luz se han explorado con poca frecuencia.

Con respecto al pH, diferentes grupos de investigación han reportado valores entre 3.5 y 6.5 como óptimos para la producción de biomasa y metabolitos de *Ganoderma sp.* Fang y Zhong (2002) estudiaron el efecto del pH inicial del medio de cultivo a nivel de matraz, y encontraron que la generación de biomasa y ácidos ganodéricos incrementó al utilizar un valor de 6.5. En tanto, un pH de 3.5 fue beneficioso para la producción de polisacáridos, mismo valor encontrado por Papinutti (2010). Kapoor y Sharma (2014) investigaron un rango amplio de pH (3.0 – 12.0) en medio líquido, y reportaron que el crecimiento del hongo fue mayor a un pH de 5.0, lo cual coincide con lo reportado por Jayasinghe *et al* (2008); además, valores de pH superiores a 7.0 fueron perjudiciales para la cepa estudiada. Por otro lado, Kim, Park y Yun (2005) obtuvieron la mayor concentración de biomasa al utilizar un pH de 4.0 al inicio del cultivo.

En cuanto a la concentración de oxígeno, ésta se ha estudiado tanto en la fase gas como en la fase líquida. Utilizando cultivos estáticos en medio líquido, Zhang, Tang y Zhong (2010) probaron diferentes porcentajes de oxígeno en la fase gas (21, 60, 80 y 100%), y encontraron que, tanto la concentración de biomasa como la de ácidos ganodéricos fue mayor con un 80%

de oxígeno. A nivel de biorreactor, Fazenda, Harvey y McNeil (2010) investigaron el efecto del control de la concentración de oxígeno disuelto, sobre el crecimiento y morfología de *Ganoderma sp.* Controlando el porcentaje de oxígeno disuelto en 20%, la concentración de biomasa se incrementó considerablemente, no obstante, la producción de polisacáridos fue mayor cuando no se controló dicha variable. Por otra parte, Tang y Zhong (2003) estudiaron el efecto del porcentaje de oxígeno y de la velocidad de suministro de oxígeno (coeficiente volumétrico de transferencia de masa) en un biorreactor tipo tanque agitado. Utilizando un porcentaje de oxígeno disuelto de 25% obtuvieron un crecimiento de biomasa más alto, mientras que un porcentaje de 10% favoreció la producción de los metabolitos secundarios, tendencia que concuerda con lo reportado por Fazenda *et al* (2010). En lo que concierne a la tasa de transferencia de oxígeno, un valor de 78.2 h^{-1} produjo la mayor concentración de biomasa, a pesar de que dicho valor no fue el más alto que utilizaron los autores.

La influencia de la temperatura también se ha investigado en cultivos de *Ganoderma sp.* a nivel de placa Petri y de matraz. Jo *et al* (2009), así como Jayasinghe *et al* (2008) reportaron que el rango de temperatura óptimo para el crecimiento del hongo en medio semisólido es entre $25 - 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. De forma similar, Kapoor y Sharma (2014) encontraron un rango entre $25 - 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, también a nivel de placa. Anteriormente, Yang y Liao (1998) encontraron que temperaturas en el rango de $30-35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ promovieron la producción de polisacáridos en cultivos en medio líquido a nivel de matraz. Por otra parte, Feng *et al* (2016) utilizaron una estrategia de control de temperatura para la producción de ácidos ganodéricos en un biorreactor tipo tanque agitado. Inicialmente, los autores utilizaron una temperatura de $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para obtener una tasa específica de crecimiento elevada; después, la temperatura se redujo a $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para minimizar la inhibición de la síntesis de triterpenoides. En la mayoría de las investigaciones sobre el cultivo de *Ganoderma sp.* en medio líquido, la temperatura de preferencia ha sido $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

El efecto de otras variables físicas menos convencionales, como la exposición a la luz, se ha explorado en algunos artículos. Zhang y Tang (2008) investigaron la influencia de la intensidad, longitud de onda y tiempo de exposición, sobre el crecimiento y producción de metabolitos secundarios de *Ganoderma sp.* en medio líquido. Utilizando una estrategia de exposición de tres etapas (tres intensidades y tiempos de exposición), con luz blanca (400-740

nm), obtuvieron una producción de ácidos ganodéricos casi cuatro veces mayor a la del control. De forma similar, Zapata *et al* (2009) reportaron una mayor concentración de biomasa en medio líquido, al utilizar luz azul (425-475 nm) de forma continua.

1.4 CULTIVO DE MICROORGANISMOS EN BIORREACTORES TIPO TANQUE AGITADO

El aprovechamiento comercial de la biomasa y metabolitos generados por los microorganismos requiere del establecimiento de sistemas de cultivo eficientes, seguros y económicamente factibles, que permitan la manufactura de los compuestos con altos rendimientos en tiempos razonables (Asnaghi, Smith, Martin, & Wendt, 2015). Para este fin, se han desarrollado equipos denominados biorreactores, o fermentadores, los cuales se pueden definir como los recipientes en los que se llevan a cabo reacciones bioquímicas mediante el uso de células vivas o enzimas (Wang & Zhong, 2007). El objetivo principal de un fermentador es proporcionar un entorno que permita el contacto directo de los distintos componentes, en sus fases correspondientes, y que mantenga las variables físicas, químicas y biológicas en los valores más adecuados para la operación del proceso (Kato, Horiuchi, & Yoshida, 2015). En las siguientes secciones se profundizará acerca de las características, variables y desarrollo de procesos en un biorreactor tipo tanque agitado, como el que se utilizó en esta investigación.

1.4.1 Características principales

Los biorreactores tipo tanque agitado son los equipos más utilizados para la producción de metabolitos a nivel industrial (Villadsen, Nielsen, & Lidén, 2011). Las principales ventajas que ofrece este diseño son su versatilidad, capacidad de manejo de múltiples fases (líquidos, sólidos, gases) y fluidos de alta viscosidad, velocidades altas de transferencia de masa y homogeneidad del contenido (Shuler & Kargi, 2002).

Este tipo de equipos se componen de un tanque cilíndrico cerrado, usualmente con un fondo redondeado, que contienen un sistema de agitación mecánica por medio de impulsores montados sobre un eje central. Cerca de las paredes del tanque se colocan tres o cuatro deflectores

para prevenir la formación de vórtices que se puedan formar por la agitación. Para el cultivo de microorganismos que requieren de algún sustrato gaseoso (oxígeno o dióxido de carbono), se incluye también un difusor de gases, cuya salida se coloca justo debajo del impulsor inferior. El gas sale del equipo a través de un condensador, cuyo fin es el de recuperar el líquido arrastrado por el flujo de los gases (Doran, 2013) En la Figura 1.7 se muestra un ejemplo de estos fermentadores.

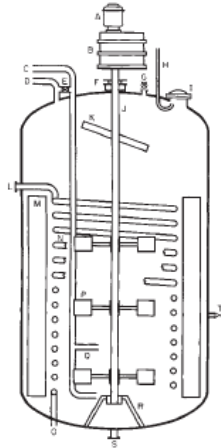


Figura 1.7. Esquema básico de un biorreactor tipo tanque agitado (Pereira & Leib, 2008).

Los biorreactores modernos cuentan con diversos sistemas para la medición y control de variables, los cuales forman parte de la estructura del equipo. Para el control de la temperatura, estos equipos incluyen un sensor y un sistema de intercambio de calor, ya sea por medio de chaquetas (externas) o serpentines (internos). En el caso del pH, se incluye un sensor y un sistema de adición de ácidos y bases mediante bombas peristálticas. En cuanto al oxígeno disuelto, los biorreactores contienen un sensor correspondiente, y el control se realiza a partir de variaciones en la velocidad de agitación y el flujo de aire (Shuler & Kargi, 2002).

Existen otros sistemas de control de variables menos utilizados, como el control del nivel del líquido, el cual se compone de un sensor de nivel y un sistema de adición de antiespumante mediante una bomba peristáltica; o el control de la presión del equipo, el cual involucra un sensor correspondiente y un sistema de control de una válvula a la salida del condensador.

Finalmente, los biorreactores tipo tanque agitado incluyen puertos para la adición o sustracción de líquidos, con los cuales se puede añadir medio de cultivo o tomar muestra del contenido (Doran, 2013).

1.4.2 Modos de operación

Otra característica importante de los sistemas de cultivo para microorganismos es el modo en el que operan con respecto al flujo de materia hacia o desde el equipo, ya que esto influye directamente en los balances de materia y energía del proceso. En este sentido, los fermentadores pueden operar en tres modos distintos: discontinuo (batch), semicontinuo (fed-batch) o continuo (Villadsen, Nielsen, & Lidén, 2011).

El modo discontinuo se caracteriza por operar como un sistema cerrado, en donde no existen flujos de materia hacia o desde el biorreactor, lo cual implica que todo el contenido del sistema (medio de cultivo y células) debe introducirse antes del arranque del equipo. Un aspecto que se debe resaltar es que existen procesos que no son estrictamente discontinuos, pero que se consideran como tales debido a que los flujos de materia son muy pequeños en comparación con la cantidad de materia en el equipo. Ejemplos de dichos flujos son la inyección y salida de gases (aire o dióxido de carbono), el arrastre y evaporación de líquido, y la adición de ácidos, bases, antiespumantes o inductores (Godia-Casablanca, y otros, 2005). En la ecuación (1.2) se muestra el balance de masa para este modo (Liu S. , 2013).

$$\frac{dC_j}{dt} = r_j \quad (1.2)$$

En donde:

C_j : Concentración del componente j , mol/m³.

t : Tiempo, s.

r_j : Velocidad de reacción del componente j , mol/m³ s.

Una parte importante de los compuestos producidos a escala comercial funciona con este modo de operación debido a las ventajas que presenta en términos de flexibilidad, control de parámetros y aseguramiento de la inocuidad. Sin embargo, sus desventajas incluyen bajas

productividades, en comparación con otros modos, tiempos extensos entre lotes debido a descarga, limpieza, esterilización y recarga, y altos costos operativos (Villadsen, Nielsen, & Lidén, 2011).

Los otros dos modos de operación posibles para un biorreactor tipo tanque agitado son: el modo semicontinuo (fed-batch) y el modo continuo (quimiostato). En el modo semicontinuo, el sistema cuenta con un flujo de entrada de materia, pero no con un flujo de salida, por lo que la cantidad total de masa aumenta con el tiempo. El flujo de entrada se compone usualmente de medio de cultivo, o algunos componentes de este, y puede seguir distintos esquemas de alimentación (Katoh, Horiuchi, & Yoshida, 2015). Las ventajas que permite la operación en fed-batch incluyen la extensión de la fase exponencial de crecimiento y el control de la concentración de sustrato en el medio, lo cual es preferible en los casos en los que el microorganismo o el producto es inhibido por concentraciones elevadas de nutrientes. Por otro lado, las desventajas de este modo incluyen un mayor consumo de medio de cultivo y la necesidad de procesar un volumen mayor de líquido en los procesos de purificación (Villadsen, Nielsen, & Lidén, 2011).

Finalmente, el modo discontinuo funciona como un sistema abierto en donde existen flujos de materia hacia el biorreactor y desde éste. El flujo de entrada consiste en medio de cultivo (sustrato), al igual que en el caso del fed-batch, mientras que el flujo de salida incluye el sustrato que no se consumió junto con las células y los metabolitos producidos. Una particularidad de este modo de operación es que es el único que permite que el sistema de reacción llegue al estado estacionario, en donde las concentraciones de todos los componentes dejan de variar con respecto al tiempo (Katoh, Horiuchi, & Yoshida, 2015). La operación en modo continuo es deseable en la mayoría de los procesos de producción de metabolitos, ya que presenta una alta productividad, los costos operativos más bajos y el funcionamiento más estable. No obstante, este modo también presenta desventajas, entre las cuales se encuentran: poca flexibilidad, mayor riesgo de contaminación y riesgo de alteraciones genéticas por mutaciones espontáneas, lo cual puede implicar una pérdida de productividad parcial, o inclusive, total (Villadsen, Nielsen, & Lidén, 2011)

1.4.3 Desarrollo de procesos de fermentación en biorreactores tipo tanque agitado

A nivel de investigación, la etapa de desarrollo de procesos se enfoca en determinar las condiciones físicas, químicas y biológicas que maximicen el desempeño de un sistema de cultivo, para un producto y microorganismo determinados, a través de todas las etapas del bioproceso. Para este fin, es necesario conocer las etapas de un bioproceso, las variables involucradas en cada etapa, y su optimización.

1.4.3.1 Etapas de un bioproceso

Comúnmente, las etapas de un bioproceso se dividen en dos fases. La primera, llamada “upstream” (corriente arriba), contempla las etapas de introducción o reactivación del microorganismo, multiplicación inicial del material (en medio líquido o semisólido), expansión del inóculo (en medio líquido a nivel de matraz), preparación del medio de cultivo y del equipo (limpieza y esterilización del biorreactor principal), y generación del compuesto de interés en el biorreactor de producción (Lindskog, 2018). La segunda fase, denominada “downstream” (corriente abajo), incluye las etapas de recuperación, purificación, concentración y formulación del producto de interés, así como el tratamiento de los desechos generados durante el proceso (Pieracci, Armando, Westoby, & Thommes, 2018). Por el enfoque de este trabajo, se describirá las etapas de la fase upstream.

1.4.3.1.1 Introducción o reactivación del microorganismo

La primera etapa en el desarrollo de un bioproceso es obtener el microorganismo con el que se va a trabajar en forma pura (un único organismo) y activa (en crecimiento). En el caso de organismos que se obtienen directamente desde su entorno natural, existen protocolos definidos para su aislamiento y cultivo a nivel de laboratorio, los cuales implican la recolección, descripción, sanitización, introducción, purificación y conservación del material (Alvarenga-Ventuolo, Salazar-Aguilar, Rosales-López, & Canessa-Amador, 2014). Una vez que se obtiene el cultivo puro y se está seguro de su identidad, es común que se preserve una muestra

del material en congeladores, a muy bajas temperaturas, para evitar contaminaciones o mutaciones genéticas. En caso de que el microorganismo ya se encuentre debidamente aislado, el primer paso para la producción de compuestos de interés mediante bioprocesos consiste en descongelar las células y transferir una muestra a una placa Petri con medio de cultivo semisólido apropiado, empleando las técnicas asépticas pertinentes (Lindskog, 2018).

1.4.3.1.2 Multiplicación inicial del microorganismo

La segunda etapa consiste en cultivar el microorganismo en el medio semisólido por un período de tiempo determinado con el fin de que se adapte a las nuevas condiciones de crecimiento. Es importante monitorear el crecimiento del organismo en la placa Petri con el fin de trasladar una muestra del cultivo a una placa nueva antes de que éste llegue a la fase de crecimiento estacionario; esta técnica se conoce como subcultivo. En el caso de los hongos filamentosos, la muestra se toma del micelio que se encuentra en la sección de la placa más alejada del punto de inoculación, el cual se conoce como micelio distal (Quesada-Chanto, 2013).

1.4.3.1.3 Tren de inóculo

Una vez que se ha logrado obtener un cultivo en placa de forma estable, la tercera etapa consiste en obtener una mayor cantidad de biomasa hasta llegar a la concentración deseada para inocular el fermentador de producción. En el caso de las fermentaciones en fase líquida, es en esta etapa en donde se lleva a cabo el cambio y adaptación al nuevo medio de cultivo (Quesada-Chanto, 2013). En el contexto de operación industrial a esta etapa se le conoce como tren de inóculo o tren de semilla, y consta de cultivos sucesivos en recipientes cada vez más grandes. Cuando el microorganismo ha agotado los nutrientes disponibles en el medio de cultivo, éste se traslada a un recipiente de mayor tamaño y se añade medio fresco. Este proceso se repite hasta lograr la concentración necesaria (Lindskog, 2018).

1.4.3.1.4 Preparación del medio de cultivo y del biorreactor

En la cuarta etapa del proceso se debe preparar el medio de cultivo y el equipo que se va a utilizar para el proceso. La preparación del medio de cultivo depende de la cantidad y tipo de nutrientes que contenga, ya que existen componentes que pueden reaccionar entre sí o degradarse durante el proceso de esterilización por calor. Si se presenta alguna de esas limitantes, es recomendable preparar soluciones individuales de los componentes sensibles y esterilizarlas por aparte, utilizando otros métodos como filtración a través de filtros con un tamaño de poro de 0.2 μm . Posteriormente se deben mezclar los componentes de forma estéril (Quesada-Chanto, 2013). En el caso del biorreactor, la preparación del equipo consiste en el lavado de todas las partes, lo cual se lleva a cabo con agua, detergentes y sanitizantes, y tiene el propósito de eliminar residuos orgánicos e inorgánicos. Posteriormente, las diferentes partes deben ensamblarse apropiadamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, el fermentador debe esterilizarse, lo cual suele llevarse a cabo con calor a 121 °C por 20-30 minutos. En algunos casos, el medio de cultivo se puede esterilizar junto con el biorreactor, en otros casos se esterilizan por aparte y luego el equipo se carga previo a la inoculación. Otro paso importante consiste en la calibración de los sensores, la cual depende del sensor en particular, habiendo algunos que deben calibrarse antes de la esterilización, y otros después de ésta (Godia-Casablancas, y otros, 2005).

1.4.3.1.5 Inoculación del biorreactor y producción del compuesto de interés

Finalmente, la última etapa de la fase upstream consiste en la producción del compuesto de interés en el fermentador de mayor tamaño. Una vez que el biorreactor se encuentra debidamente armado, esterilizado y cargado con el medio de cultivo, el siguiente paso es realizar la inoculación, la cual consiste en introducir el microorganismo de interés en el sistema. La concentración, edad y tipo de inóculo tienen influencia sobre el desempeño del proceso, por lo que son variables que también deben estudiarse en el desarrollo de bioprocesos (Quesada-Chanto, 2013). Posterior a la inoculación del biorreactor, se deben activar los sistemas de

control (agitación, aireación, temperatura, pH, oxígeno disuelto, nivel y presión) y recolección de datos. Después de esto, el sistema se encuentra listo para sustentar el crecimiento del microorganismo y la producción del compuesto de interés.

1.4.3.2 Optimización de variables a nivel de matraz

La cantidad y diversidad de variables que influyen en un bioproceso es muy extensa, y los métodos de optimización deben tomar en cuenta las interacciones que existen entre variables físicas, químicas y biológicas. Para los objetivos de este trabajo, se partirá del hecho de que ya se ha definido la identidad del microorganismo, por lo que la optimización de variables biológicas como el vector de expresión, rutas metabólicas o selección de mutantes (Villadsen, Nielsen, & Lidén, 2011) no se tomarán en cuenta. Con respecto a las variables restantes como la composición del medio de cultivo, temperatura, pH, concentración, edad y procedencia del inóculo, efecto de aditivos químicos o físicos (surfactantes, antiespumantes, micropartículas), estas suelen optimizarse en la etapa de cultivos en medio líquido a nivel de matraz (Quesada-Chanto, 2013), previo al proceso de expansión del inóculo. Para este fin, es común que se utilicen diseños estadísticos de experimentos para evaluar los efectos e interacciones de cada variable (Mandenius & Brundin, 2008). En secciones anteriores se describió el efecto de los componentes del medio de cultivo y las condiciones físicas sobre el crecimiento de los hongos, por lo que a continuación se describirá la influencia de las variables relacionadas al inóculo.

1.4.3.2.1 Concentración y tipo de inóculo

La concentración del inóculo se refiere a la cantidad de biomasa o células, por unidad de volumen, que se introduce en el sistema de cultivo al inicio del proceso de fermentación. Esta variable afecta a cualquier proceso de fermentación independientemente del tipo de organismo que se utilice, y puede influir en parámetros como la duración de cada fase de crecimiento (ver sección 1.4.3.2.2), la concentración final de biomasa, el consumo de sustrato y la generación del producto (Okonkowski, Kizer-Bentley, Listner, Robinson, & Chartrain,

2005). Por otra parte, el tipo de inóculo se refiere al tipo de células que se utilicen para inocular el fermentador (Papagianni, 2004). En el caso de los hongos filamentosos, los tipos de inóculo disponibles son: esporas, micelio cultivado en medio semisólido o pellets de biomasa cultivados en medio líquido. Esta variable puede afectar los mismos parámetros que la concentración del inóculo, además de afectar la morfología de cultivos sumergidos con este tipo de organismos (Junker, y otros, 2004).

1.4.3.2.2 Cinética de crecimiento y tiempo de cultivo

El término cinética de crecimiento se refiere a la variación en la concentración de células o biomasa de un organismo a través del tiempo. En un sistema de cultivo que opere en modo discontinuo, la curva de crecimiento de la mayoría de los microorganismos presentará cuatro fases claramente distinguibles, si se deja que el cultivo se desarrolle por tiempo suficiente. Estas fases se muestran en la Figura 1.8. La primera fase se conoce con el nombre de fase de latencia o fase “lag”, y se caracteriza por presentar variaciones muy pequeñas en la concentración de células. En esta etapa se lleva a cabo la adaptación del microorganismo al nuevo entorno al que está expuesto mediante la síntesis de las enzimas o metabolitos necesarios. La duración de esta fase (parámetro más relevante de esta etapa) depende de muchos factores, como la concentración, edad y tipo de inóculo, la composición del medio de cultivo, las condiciones físicas del entorno y las diferencias entre el medio nuevo y el medio del cual proceden las células (Katoh, Horiuchi, & Yoshida, 2015).

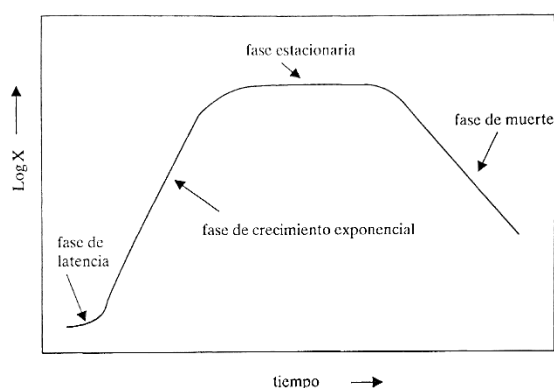


Figura 1.8. Fases de una curva de crecimiento típica para microorganismos en sistemas de cultivo discontinuos (Godia-Casablancas, y otros, 2005).

Una vez que el organismo se ha adaptado al nuevo sistema de cultivo, comienza la segunda fase de crecimiento denominada fase de crecimiento exponencial. Esta etapa se caracteriza por un incremento importante en la concentración de células, la cual tiende a aumentar de manera constante. En esta fase es donde se da el mayor consumo de sustratos, así como la producción de metabolitos primarios y de subproductos del metabolismo. El parámetro más importante de esta etapa es la tasa específica de crecimiento (μ , h^{-1}), la cual se define como la pendiente de la recta que describe la variación de la concentración de células con respecto al tiempo para esta fase. Este parámetro es particular de cada organismo y de las características químicas y físicas de su entorno, especialmente de la temperatura y la concentración de sustrato. Para realizar la inoculación de medios de cultivo se recomienda utilizar células que se encuentren en esta etapa, ya que poseen una mayor actividad (Najafpour, 2015).

A medida que el microorganismo continúa su crecimiento, éste irá consumiendo los distintos nutrientes presentes en el medio de cultivo, lo cual disminuirá su concentración. Además, la síntesis y excreción de metabolitos y subproductos al entorno puede ocasionar que éstos se acumulen hasta llegar a concentraciones tóxicas para las mismas células (Liu S. , 2013). Cuando alguno de estos fenómenos ocurre, los cultivos entran en fase estacionaria, la cual se caracteriza por presentar nuevamente una concentración de células constante, producto del equilibrio entre las velocidades de crecimiento y de muerte celular. En esta etapa, las condiciones desfavorables en el entorno inducen al organismo a replantear su metabolismo para asegurar la subsistencia, lo cual se traduce en la generación de estructuras como esporas y en la producción de metabolitos con funciones de defensa y diferenciación, como lo son los metabolitos secundarios (Liu S. , 2013). El parámetro más importante de esta etapa es la concentración de células o biomasa, ya que esto representa la máxima concentración posible en el cultivo, así como la cantidad de células disponibles para la síntesis de metabolitos secundarios.

Finalmente, el agotamiento del sustrato o la acumulación de subproductos tóxicos provocará un cese total del crecimiento del organismo, por lo que la tasa de muerte celular dominará la dinámica del sistema. En este punto el cultivo entra en la fase de muerte celular, la cual se

caracteriza por una disminución constante en la concentración de biomasa debido a la lisis (ruptura) de las células. El parámetro que describe esta fase es la tasa específica de muerte celular, la cual se define de forma análoga a la tasa específica de crecimiento. No obstante, este parámetro no suele incorporarse normalmente en el análisis y modelado de la cinética de crecimiento de microorganismos debido a que esta fase no es de importancia a nivel comercial (Quesada-Chanto, 2013).

1.4.4 Variables relevantes en el diseño y operación de biorreactores tipo tanque agitado

Posterior a la optimización de las variables físicas y químicas a nivel de matraz, es necesario determinar las condiciones de operación que se utilizarán en el fermentador de producción. Debido al gran tamaño de los equipos requeridos a escala industrial, la optimización de las condiciones de operación se realiza en biorreactores a escala de laboratorio, los cuales deben ser modelos a escala tan similares a los fermentadores de producción como sea posible (Clarke, 2013). Una vez que se han definido estas condiciones, se realiza un proceso denominado escalamiento, el cual consiste en transportar los valores de los variables en la escala de laboratorio hasta la escala de producción mediante diferentes estrategias, las cuales se describirán en la sección 1.4.5. En el caso de los biorreactores tipo tanque agitado, las variables más importantes en su diseño y operación son la geometría y configuración de los componentes, la agitación y la aireación. A continuación, se describirá cada una con mayor detalle.

1.4.4.1 Geometría y configuración del biorreactor

La distribución y el tamaño de los componentes de un biorreactor tipo tanque agitado se basa en el diseño de un tanque estándar, en el cual todas las dimensiones son múltiplos del diámetro del tanque. En la Figura 1.9 se muestran las dimensiones más relevantes en este tipo de fermentadores.

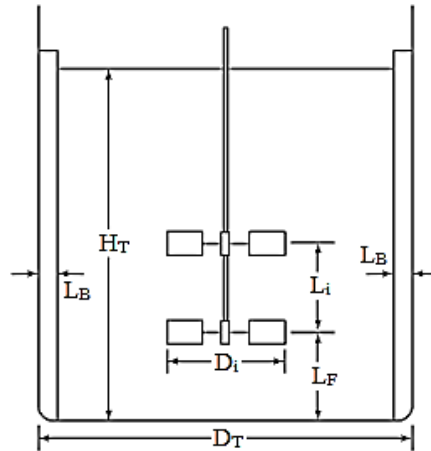


Figura 1.9. Dimensiones relevantes en el diseño de un tanque agitado (McCabe, Smith, & Harriot, 2007).

Las relaciones geométricas entre las dimensiones mostradas en la Figura 1.9 son las siguientes (McCabe, Smith, & Harriot, 2007).

$$\frac{H_T}{D_T} = 1, \quad \frac{D_i}{D_T} = \frac{1}{3}, \quad \frac{L_i}{D_i} = \frac{L_F}{D_i} = 1, \quad \frac{L_D}{D_T} = \frac{1}{12} \quad (1.3)$$

En donde:

H_T : Altura del líquido en el tanque, m.

D_T : Diámetro del tanque, m.

D_i : Diámetro del impulsor, m.

L_i : Espaciamiento entre impulsores, m.

L_F : Distancia desde el fondo del tanque, m.

L_D : Ancho de las mamparas, m.

Otro aspecto geométrico relevante en el diseño y operación de estos fermentadores es la forma del fondo del tanque. Si se utiliza un fondo plano se corre el riesgo de que se generen zonas de estancamiento en donde no existe un mezclado adecuado del contenido, por lo que es común que los biorreactores cuenten con fondos redondeados para evitar estos fenómenos, así como para facilitar el lavado y esterilización (Doran, 2013). En algunos casos, las relaciones geométricas descritas en la ecuación (1.3) pueden verse alteradas debido a la necesidad de cumplir con otras restricciones en el diseño del equipo. Muchos biorreactores que operan a escala industrial presentan una relación H_T/D_T mayor a 1, normalmente entre 2-3. Esto se

debe a la necesidad de proporcionar un área superficial por unidad de volumen mayor, lo cual facilita la remoción del calor generado por el metabolismo del microorganismo. Por otro lado, una relación H_T/D_T mayor a 1 incrementa la presión hidrostática en el fondo del equipo, lo cual aumenta la solubilidad del oxígeno; además, esta configuración hace que el trayecto que debe recorrer una burbuja de aire para salir del volumen del líquido sea mayor, lo cual le confiere un tiempo de residencia más elevado y por tanto una transferencia de oxígeno más alta. Si la relación H_T/D_T es mayor a 1.5, se recomienda el uso de una mayor cantidad de impulsores, espaciados de acuerdo con las proporciones descritas anteriormente (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004).

1.4.4.2 Agitación

La característica principal de este tipo de biorreactores es que el movimiento de la materia dentro del equipo se realiza por medio de agitación mecánica, utilizando uno o varios impulsores colocados sobre un eje central que rota por la acción de un motor. Este movimiento inducido sobre el fluido influye sobre una cantidad importante de fenómenos que ocurren durante el proceso de fermentación, los cuales se explicarán más adelante. Los objetivos de la agitación como operación unitaria son los siguientes (McCabe, Smith, & Harriot, 2007).

1. Promover el contacto entre las diferentes fases (células, medio de cultivo y aire) presentes en el volumen del sistema.
2. Aumentar la velocidad de transferencia de calor y masa dentro del equipo y a través de sus fronteras (paredes).
3. Mantener una distribución espacial homogénea de los diferentes componentes y propiedades del sistema.

Desde el punto de vista operativo, las variables que influyen en el desempeño de un sistema de agitación mecánico son: el tipo, cantidad, posición y diámetro de los impulsores, y la velocidad de rotación del eje, la cual suele ser la variable ajustable en los sistemas de control automático de los biorreactores. La presencia de sistemas de dispersión de gases también puede afectar el desempeño del sistema. Estas variables, en conjunto con la densidad del fluido que se va a agitar, se combinan en un parámetro denominado potencia volumétrica, el

cual suele utilizarse para correlacionar otras variables relevantes con el fin de obtener modelos matemáticos que faciliten el diseño y escalamiento de estos procesos. La potencia volumétrica se define según la ecuación (1.4) (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004).

$$P_V = \frac{n \cdot N_P \cdot \rho_L \cdot N^3 \cdot D_i^5}{V_L} \quad (1.4)$$

En donde:

P_V : Potencia volumétrica por agitación, W/m^3 .

n : Factor de cantidad de impulsores, adim.

N_P : Número de potencia del impulsor, adim.

ρ_L : Densidad del líquido, kg/m^3

N : Velocidad de agitación, s^{-1}

D_i : Diámetro del impulsor, m

V_L : Volumen del líquido en el biorreactor, m^3

1.4.4.2.1 Tipos de impulsores

El impulsor es el elemento que se encarga de transferir el trabajo mecánico de rotación del eje en energía interna de la materia dentro del volumen del fermentador, la cual se manifiesta como un incremento en la energía cinética de los componentes del medio (Doran, 2013). El diseño de los impulsores influye directamente en la demanda de energía del motor, los patrones de flujo del líquido en el biorreactor, la velocidad de transferencia de especies gaseosas, el mezclado del contenido del equipo y el esfuerzo cortante al que están expuestas las células y burbujas de aire. Actualmente existen diversos tipos diferentes de impulsores, muchos de los cuales se utilizan para aplicaciones específicas. En el caso de los procesos de fermentación, la mayoría de los impulsores puede clasificarse en dos tipos de acuerdo con los patrones de flujo que generan: radial o axial.

Los impulsores de flujo radial generan una descarga de fluido desde el centro del eje hacia las paredes del equipo, punto en el cual el líquido se desplaza hacia arriba o hacia abajo. Este diseño genera esfuerzos cortantes más elevados, pero tiene una menor capacidad de bombeo de fluido. Comúnmente son utilizados en sistemas de viscosidad baja a moderada, para la

dispersión de gases y líquidos inmiscibles, sin embargo, su uso en fermentadores con múltiples impulsores puede ocasionar la estratificación del medio. En la Figura 1.10 se muestran algunos ejemplos de este tipo de impulsores (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004).

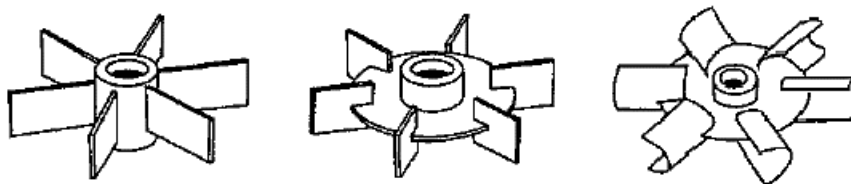


Figura 1.10. Impulsores de flujo radial utilizados en biorreactores tipo tanque agitado. Izquierda: turbina de paletas rectas, centro: turbina de disco de paletas rectas (Rushton), derecha: turbina de disco de paletas cóncavas (Smith) (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004).

Por otra parte, los impulsores de flujo axial generan una descarga de fluido desde el eje hacia el fondo del tanque (flujo descendente), punto en el cual el líquido se desplaza a los lados, o hacia la sección superior del equipo (flujo ascendente). Este tipo de impulsores se emplea también para sistemas de viscosidad moderada y baja, en operaciones de mezclado, suspensión de sólidos o incorporación de componentes que flotan sobre la superficie del líquido. Su diseño les confiere una mayor capacidad de bombeo de líquidos, y generan esfuerzos cortantes más bajos. Algunos ejemplos de estos impulsores se muestran en la Figura 1.11 (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004).

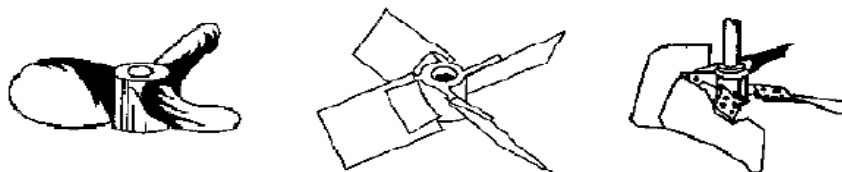


Figura 1.11. Impulsores de flujo axial utilizados en biorreactores tipo tanque agitado. Izquierda: propela marina, centro: turbina de paletas inclinadas (flujo mixto), derecha: impulsor Lightnin A315 (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004).

La selección del tipo, cantidad y posición de los impulsores es un paso importante en el diseño y optimización de procesos de reacción en tanques agitados. Para realizar una selección

adecuada es necesario conocer el objetivo de la operación de agitación (mezclado de componentes, dispersión de fases gaseosas o líquidas inmiscibles, suspensión de sólidos insolubles, incorporación de componentes flotantes), las características de las fases que participan en el proceso (densidad y viscosidad principalmente) (Geankoplis, 1998). En el caso particular de procesos de fermentación, las características principales que se toman en cuenta para la selección de los impulsores son: requerimientos de oxígeno de las células, cambios reológicos durante la fermentación, sedimentación o flotación de cúmulos de biomasa, sensibilidad de las células al esfuerzo cortante y relación altura-diámetro del biorreactor (Doran, 2013).

1.4.4.2.2 Régimen hidrodinámico y número de Reynolds

En las operaciones que involucran el movimiento de fases fluidas (líquidos y gases), la velocidad con la que estas fases fluyen afecta los mecanismos por los cuales se llevan a cabo los fenómenos de transporte de materia, energía y cantidad de movimiento. De acuerdo con dicha velocidad, las propiedades del fluido y la geometría del recipiente que lo contiene, es posible distinguir tres regímenes de flujo: laminar, de transición y turbulento (McCabe, Smith, & Harriot, 2007). En el régimen laminar, los fluidos se desplazan de forma ordenada y predecible, sin presentar un mezclado lateral considerable. Las fuerzas que dominan el flujo del fluido son las de viscosidad, por lo que la transferencia de materia y energía se da por mecanismos de difusión y conducción, respectivamente, los cuales son considerablemente lentos. En contraste, el régimen turbulento se caracteriza por un movimiento caótico e impredecible, en donde es común que se formen remolinos en el seno del fluido. En este régimen las fuerzas que controlan el flujo del fluido son las inerciales, lo cual provoca que los fenómenos de transporte se lleven a cabo por mecanismos de convección forzada (Geankoplis, 1998). A nivel industrial, este segundo régimen es preferible dado que los procesos de transferencia de masa ocurren más rápidamente, lo cual se vuelve particularmente importante en fermentaciones con microorganismos aerobios (Doran, 2013).

La identificación del régimen en el cual se lleva a cabo un proceso se puede realizar mediante el cálculo del número de Reynolds, el cual representa la razón entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas (Coulson, Richardson, Backhurst, & Harker, 1999).

$$Re = \frac{\rho_L \cdot N \cdot D_i^2}{\eta_L} \quad (1.5)$$

En donde:

Re : Número de Reynolds, adim.

η_L : Viscosidad aparente del líquido, Pa s

Los valores límite del número de Reynolds para cada régimen son difíciles de definir con total certeza, sin embargo, normalmente se considera que el régimen laminar contempla valores menores a 10^2 , el régimen de transición se encuentra entre 10^2 y 10^4 , y posterior a 10^4 el sistema se encuentra en régimen turbulento (Coulson, Richardson, Backhurst, & Harker, 1999). En los procesos de fermentación en biorreactores tipo tanque agitado es común que el régimen hidrodinámico se encuentre en la zona turbulenta para la mayoría de medios de cultivo y microorganismos, no obstante, en cultivos con bacterias y hongos filamentosos, así como en sistemas que incluyen materia orgánica compleja (aguas residuales o procesamiento de desechos agroindustriales) es posible que se presenten incrementos importantes en la viscosidad del medio, lo cual puede provocar que el sistema cambie a régimen de transición (Doran, 2013).

1.4.4.2.3 Tiempo de mezclado y homogenización

Tomando en cuenta que uno de los objetivos principales de un sistema de agitación es permitir la mezcla adecuada de los componentes, es decir, obtener una distribución espacial homogénea de estos, es necesario definir un parámetro que permita evaluar el desempeño del sistema (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004). Esta variable se conoce como el tiempo de mezclado e indica el tiempo necesario para lograr un determinado grado de homogeneidad en el contenido del sistema. El tiempo de mezclado está relacionado con otro parámetro denominado tiempo de circulación, el cual se define como el tiempo promedio que requiere un elemento del fluido para completar una trayectoria cerrada, comenzando y terminando en el mismo punto (Doran, 2013). La medición de estos parámetros se puede realizar empleando diferentes técnicas, una de estas comprende la adición de una cantidad determinada de un trazador, el cual es una sustancia que provoca alteraciones en alguna propiedad del sistema

(pH, temperatura, conductividad eléctrica, color), las cuales pueden ser cuantificadas y monitoreadas en el tiempo (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004). En la Figura 1.12 se muestra la variación en el tiempo de la propiedad del sistema utilizada para determinar el tiempo de mezclado y circulación.

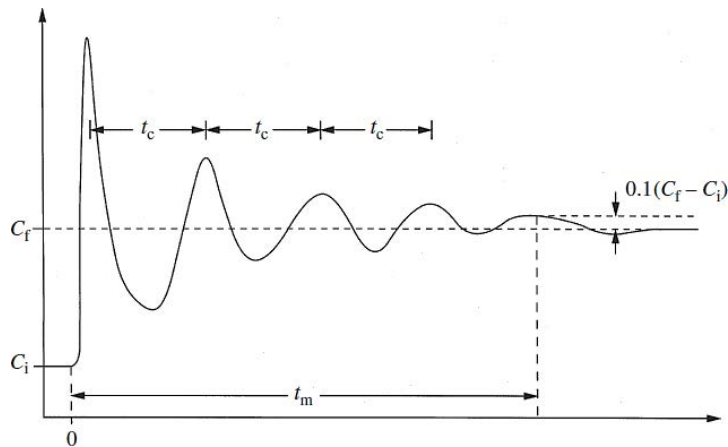


Figura 1.12. Concentración del trazador con respecto al tiempo durante la determinación del tiempo de mezclado de un sistema de agitación (Doran, 2013).

En dicha figura, C_i se refiere a la concentración inicial de la propiedad, C_f se refiere a la concentración final una vez que el sistema se ha estabilizado, t_c corresponde al tiempo de circulación y t_m al tiempo de mezclado definido para un grado de homogeneidad establecido (en este caso 90%). El tiempo de mezclado es una variable que depende de muchos factores propios de cada sistema, como la densidad y viscosidad de la fase líquida, la presencia de fases gaseosas o sólidas, el tipo, cantidad y posición de los impulsores, las relaciones geométricas del biorreactor (altura y diámetro del tanque, diámetro del impulsor), la energía suministrada al equipo por agitación y aireación, y el régimen de flujo en el que opere el fermentador (laminar, transición o turbulento) (Coulson, Richardson, Backhurst, & Harker, 1999). Es importante resaltar que los efectos del flujo de aire sobre el tiempo de mezclado en tanques agitados no se han esclarecido con total certeza, por lo que su estimación mediante el uso de correlaciones debe interpretarse con cautela, y de ser posible, verificarse experimentalmente (Rosseburg, Fitschen, Wutz, Wucherpennig, & Schluter, 2018).

1.4.4.2.4 Esfuerzo cortante y velocidad de corte

Cuando un fluido que está contenido entre superficies sólidas se mueve con respecto a estas, las fuerzas de adhesión entre las fases provocan que las secciones del fluido que están más cercanas a la superficie sólida se muevan con una velocidad menor a las secciones más alejadas. Este fenómeno genera variaciones espaciales en la velocidad de movimiento del fluido, lo que da pie a fuerzas de corte o de cizalla dentro del seno de este. La fuerza de corte por unidad de área es directamente proporcional a la variación espacial de la velocidad del fluido en una dirección determinada, y se relacionan entre sí mediante la ley de viscosidad de Newton (McCabe, Smith, & Harriot, 2007):

$$\tau = \eta_L \cdot \dot{\gamma}, \quad \dot{\gamma} = \frac{dv_z}{dz} \quad (1.6)$$

En donde:

τ : Esfuerzo cortante, Pa.

$\dot{\gamma}$: Velocidad de corte, s^{-1} .

v_z : Velocidad del fluido en la dirección de “z”, m/s.

z : Distancia en una dirección en particular, m.

La presencia de esfuerzos cortantes en procesos de fermentación en biorreactores tipo tanque agitado puede ser positiva, negativa, o ambas dependiendo del proceso en particular. En el cultivo de microorganismos aerobios, el esfuerzo cortante generado por los impulsores es el encargado de provocar la ruptura de las burbujas de aire. Esto genera burbujas más pequeñas con un área superficial específica más alta, lo cual incrementa la velocidad de transferencia de materia entre las fases. Este mismo efecto ocurre cuando el medio de cultivo contiene fases líquidas inmiscibles (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004). Por otra parte, las fuerzas de corte pueden ocasionar deformaciones en las células de los microorganismos, llegando inclusive a ocasionar la ruptura de la membrana y, por tanto, muerte celular. En el caso de organismos más complejos que generan agregados de biomasa (pellets) o estructuras filamentosas (hongos), el esfuerzo cortante puede ocasionar cambios en la morfología que conlleven a la dispersión de la biomasa (Doran, 2013).

La magnitud del esfuerzo cortante depende de las variaciones espaciales en la velocidad del fluido, es decir, de la velocidad de corte. Además, los procesos de fermentación con organismos filamentosos provocan cambios en la reología del medio, convirtiéndolo en un fluido no Newtoniano. Esto quiere decir que la viscosidad del medio no es constante, sino más bien una función de la velocidad de corte (McCabe, Smith, & Harriot, 2007). Debido a la dificultad para medir la velocidad de corte dentro de un fermentador de tipo tanque agitado, se han desarrollado correlaciones para estimar su valor a partir de variables que si se pueden cuantificar. Una correlación que se utiliza comúnmente es la desarrollado por Metzner y Taylor en 1960, la cual tiene la siguiente forma (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004).

$$\dot{\gamma} = K_{\gamma} \cdot N \quad (1.7)$$

En donde:

K_{γ} : Constante de Metzner y Otto para el impulsor, adim.

1.4.4.3 Aireación

En las fermentaciones con microorganismos aerobios, el suministro de oxígeno al sistema es un factor crítico para el desempeño del proceso debido a la baja solubilidad del gas a las condiciones de temperatura y presión que se utilizan normalmente. Para mantener las concentraciones adecuadas de este compuesto es necesario suministrar aire de forma continua, lo cual se lleva a cabo mediante elementos denominados difusores de aire (Doran, 2013). El objetivo principal de los sistemas de dispersión de aire es producir una gran cantidad de pequeñas burbujas de gas que permitan una transferencia de oxígeno más rápida y efectiva (Godoy-Silva, Berdugo, & Chalmers, 2010), sin embargo, las características de estas burbujas también influyen en muchos otros fenómenos relevantes en la operación de fermentadores tipo tanque agitado.

Las variables que afectan la operación de un sistema de dispersión de aire son: el flujo del gas, el tipo, posición, diámetro y cantidad de orificios del difusor, y las propiedades del medio líquido (densidad, viscosidad y tensión superficial). Otros factores que también influyen de forma indirecta son las condiciones de operación (temperatura, presión y composición de las

fases) y el sistema de agitación mecánico (Doran, 2013). Desde el punto de vista operativo, la variable que se manipula para controlar el suministro de aire es el flujo volumétrico del gas, no obstante, el desarrollo de correlaciones y modelos matemáticos se lleva a cabo utilizando un parámetro denominado velocidad superficial, el cual se define como la velocidad lineal que tendría la corriente de gas si fuese la única fase presente en el sistema (Nauha, Visuri, Vermasvuori, & Alopaeus, 2014).

$$u_{sp} = \frac{Q_G}{A_T} \quad (1.8)$$

En donde:

u_{sp} : Velocidad superficial del gas, m/s.

Q_G : Flujo volumétrico del gas, m³/s.

A_T : Área transversal del biorreactor, m².

1.4.4.3.1 Tipos de difusores

El difusor de aire es el elemento que se encarga de introducir una corriente de gas en forma de burbujas (Doran, 2013). El diseño de estos elementos influye directamente en variables como el diámetro y la velocidad de ascenso de las burbujas, la velocidad de transferencia de oxígeno, el consumo de energía del compresor, los patrones de flujo en el biorreactor, la formación de espuma y el daño celular producto de la ruptura de las burbujas. Al igual que para los impulsores, existen diferentes tipos de difusores de aire para aplicaciones específicas. En el caso de los biorreactores, se pueden distinguir tres tipos: boquillas, tubos perforados y difusores porosos. De acuerdo con Godoy-Silva, Berdugo y Chalmers (2010), las características de cada tipo de impulsor son las siguientes:

- Difusores de boquillas: tienen el diseño más sencillo de todos, por lo que su construcción y limpieza es más fácil. Este tipo de difusor permite la inserción de aire a una mayor velocidad con una caída de presión despreciable, y tiende a producir burbujas de mayor tamaño, lo cual reduce el daño celular y la formación de espuma, pero reduce el área superficial disponible para la transferencia de masa.

- Difusores de tubos perforados: son los más utilizados en biorreactores comerciales debido a su diseño sencillo, bajas caídas de presión y versatilidad, ya que pueden acomodarse en forma de anillo, en forma de “L” o en forma de cruz. Estos difusores producen burbujas más pequeñas que los difusores de boquillas, y las velocidades del gas en cada orificio son menores. Si el tubo perforado se coloca en forma de anillo, el diámetro de éste debe ser el 80% del diámetro del impulsor inferior para asegurar la dispersión de las burbujas. Sin embargo, este diseño puede ocasionar problemas si se utiliza un impulsor axial de flujo descendente en la posición inferior.
- Difusores porosos: producen la mayor cantidad de burbujas entre todos los diseños, y estas presentan los diámetros más pequeños. Este tipo de difusor se utiliza para aumentar la velocidad de transferencia de masa del oxígeno al medio líquido sin tener que emplear flujos de aire elevados, por lo que es ideal para células que tienen un alto consumo de oxígeno y una alta sensibilidad al esfuerzo cortante, como las células animales. No obstante, este diseño también puede llegar a producir una gran cantidad de espuma y una baja tasa de remoción de dióxido de carbono del medio de cultivo.

En la Figura 1.13 se muestran esquemas de cada tipo de difusor.

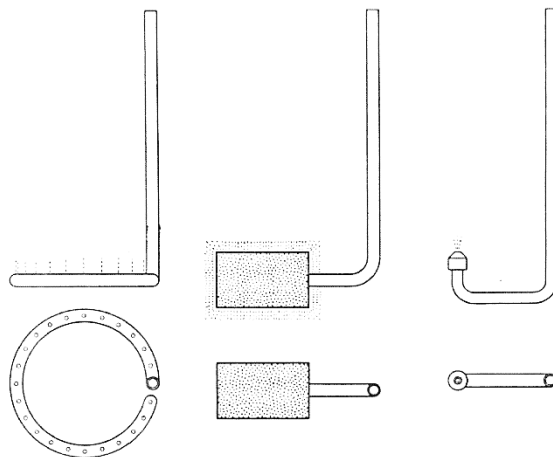


Figura 1.13. Esquema de algunos difusores de aire utilizados en biorreactores tipo tanque agitado. Izquierda: difusor de tubos perforados en anillo, centro: difusor poroso, derecha: difusor de boquilla única (Chain, Paladino, Callow, Ugolini, & van der Sluis, 1952).

1.4.4.3.2 Retención del gas, diámetro de las burbujas y área superficial específica

Además de la velocidad superficial del gas, existen otros dos parámetros que determinan el funcionamiento de los sistemas de dispersión de gases en medios líquidos: la retención del gas y el diámetro promedio de las burbujas (Doran, 2013). Estas variables afectan aspectos como el área superficial específica para la transferencia de masa, los patrones de circulación del líquido dentro del equipo (y por tanto el tiempo de mezclado), la formación de espuma, la posibilidad de daño celular por ruptura violenta de las burbujas y los regímenes de flujo y dispersión del gas. La retención del gas se define como la fracción volumétrica de la fase gaseosa dentro del volumen total del contenido, sin contar el espacio de cabeza (headspace) del equipo (Sieblist & Lubbert, 2010).

$$\phi_G = \frac{V_G}{V_G + V_L} \quad (1.9)$$

En donde:

ϕ_G : Retención del gas, adim.

V_G : Volumen del gas, m³.

V_L : Volumen del líquido, m³.

Teniendo en cuenta que el gas que está presente dentro del volumen del líquido se encuentra en forma de burbujas (sin considerar la pequeña proporción que se encuentra disuelta), la retención del gas es entonces una medida indirecta de la cantidad de burbujas que están presentes en el sistema. En fermentadores tipo tanque agitado, estas burbujas inciden principalmente en dos factores: los patrones de circulación del líquido y la disipación de potencia de los impulsores. Con respecto a los patrones de circulación, estos son influenciados por los cambios de densidad que ocurren en las zonas en donde se concentra una mayor cantidad de burbujas, lo cual da pie a corrientes de convección que pueden alterar los patrones inducidos por los impulsores. Otro fenómeno que modifica las corrientes del líquido es el aumento de tamaño de las burbujas debido a la expansión y coalescencia, lo cual conlleva a que éstas suban más rápidamente a través del volumen del líquido (Sieblist & Lubbert, 2010). En cuanto a la disipación de potencia de los impulsores, las burbujas tienden a acumularse en

las zonas de baja presión que se encuentran detrás de las aspas, lo que conlleva a la formación de cavidades de gas. A medida que estas cavidades crecen, una mayor proporción de la potencia del impulsor será disipada por dicha fase, por lo que la energía entregada al líquido será menor. Estos efectos son más pronunciados en impulsores como las turbinas Rushton, las cuales pueden sufrir una reducción de hasta el 50% en la disipación de potencia mecánica cuando se utilizan flujos de aire elevados (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004).

Además de la cantidad de burbujas, la otra característica relevante es su tamaño. Asumiendo que las burbujas tienen una forma esférica y que no existe un tamaño único, sino una distribución de tamaños, se define un parámetro denominado diámetro promedio de Sauter (Sieblist & Lubbert, 2010).

$$d_{32} = \frac{\sum(n_k \cdot d_k^3)}{\sum(n_k \cdot d_k^2)} \quad (1.10)$$

En donde:

d_{32} : Diámetro promedio de Sauter, m.

n_k : Cantidad de burbujas con un diámetro determinado, adim.

d_k : Diámetro de cada burbuja individual, m.

El diámetro promedio de Sauter incide en otras dos variables en particular, la velocidad terminal de ascenso y el área superficial específica de las burbujas. La velocidad terminal de ascenso es un parámetro complejo que depende de las propiedades de los fluidos involucrados en la dispersión, y se produce cuando se establece un equilibrio entre las fuerzas que actúan sobre las burbujas: inercial, boyante, sustentación, gravedad, viscosas y arrastre. Su relación con el diámetro de las burbujas es compleja, sin embargo, la tendencia que se observa en la mayoría de los casos es que las burbujas de mayor tamaño ascienden más rápidamente, lo cual disminuye el tiempo de residencia disponible para la transferencia de masa (Kulkarni & Joshi, 2005). Por otra parte, el área superficial específica se define como el área superficial de todas las burbujas presentes en el medio, dividida entre el volumen de dichas burbujas. Este parámetro representa el área disponible para la transferencia de oxígeno entre la fase gas y la fase líquida, por lo que afecta directamente la velocidad a la cual ocurre dicho

transporte de materia. La retención del gas, el diámetro promedio de Sauter y el área superficial específica se relaciona a través de la ecuación (1.11) (García-Ochoa & Gómez, 2009):

$$a = \frac{6 \cdot \phi_G}{d_{32}} \quad (1.11)$$

En donde:

a : Área superficial específica, m^{-1} .

1.4.4.3.3 Regímenes de flujo y dispersión del gas

En las operaciones de dispersión de gases en tanques agitados, es necesario considerar dos regímenes hidrodinámicos adicionales, además del régimen de flujo del líquido, los cuales son el régimen de flujo del gas y el de dispersión del gas. Es importante distinguir los límites entre los distintos escenarios posibles para cada régimen ya que estos representan restricciones operativas en los valores de velocidad de agitación y flujo de gas.

En el caso del régimen de flujo del gas, existen dos escenarios posibles: homogéneo y heterogéneo. El régimen homogéneo obtiene su nombre debido a la distribución relativamente uniforme (monomodal) del tamaño de las burbujas. En este escenario, los patrones de flujo inducidos por los impulsores dominan la dinámica de los fluidos, y, por tanto, el tiempo de mezclado y el tamaño de las burbujas (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004). El régimen homogéneo es el que usualmente se presenta en las fermentaciones desarrolladas a nivel de laboratorio y planta piloto, por lo que las correlaciones que se obtienen a esas escalas para parámetros como el coeficiente de transferencia de masa, retención del gas o tiempo de mezclado funcionan para dicho régimen únicamente (Padron, 2016). En contraste, el régimen heterogéneo se caracteriza por presentar una distribución bimodal del tamaño de las burbujas, en donde se presentan también burbujas de gran tamaño que ascienden con una velocidad terminal mucho mayor que las burbujas pequeñas. Este comportamiento influye de forma directa en los patrones de flujo de los fluidos presentes en el equipo, alterando el diámetro promedio de Sauter, el tiempo de mezclado, la retención del gas y otras variables relevantes

del sistema. Bajo este régimen, la dinámica del biorreactor tipo tanque agitado se asemeja a la de una columna de burbujeo (Nauha, Visuri, Vermasvuori, & Alopaeus, 2014).

El aspecto importante que se debe resaltar es que una vez que el fermentador sobrepasa el límite de transición hacia el régimen heterogéneo, la influencia del flujo de aire y la velocidad de agitación sobre los parámetros importantes del proceso cambia considerablemente, por lo que las correlaciones utilizadas para el escalamiento o diseño del proceso pierden validez, y su uso puede llevar a estimaciones incorrectas. La transición entre el régimen homogéneo y el régimen heterogéneo se ha planteado tradicionalmente en términos de la velocidad superficial del gas, y se han encontrado diferentes valores en el orden de 10^{-2} m/s. Para los propósitos de este trabajo, se utilizará un valor crítico de 0.02 m/s (Padron, 2016).

Contrario al caso del régimen de flujo del gas, el régimen de dispersión depende del tipo, diámetro y velocidad del impulsor, así como del flujo volumétrico del gas. Para una turbina Rushton de un diámetro determinado, es posible distinguir entre tres escenarios: dispersión completa, carga e inundación. El régimen de dispersión completa se caracteriza por una distribución uniforme de las burbujas del gas en todo el volumen de influencia del impulsor, además, una cantidad considerable del gas se recircula de vuelta al impulsor. Si el flujo de gas aumenta o la velocidad de agitación disminuye, el sistema pasará a régimen de carga, en el cual el impulsor dispersará el gas únicamente en las regiones que se encuentran por encima del plano de éste. En este escenario comienzan a aparecer las cavidades de gas detrás de las aspas de la turbina. La dinámica de los regímenes de dispersión completa y carga se encuentra controlada por los patrones de flujo inducidos por los impulsores, lo que los hace los regímenes de operación deseables en un fermentador tipo tanque agitado. Si el flujo de gas continúa aumentando, o si la velocidad de agitación disminuye considerablemente, el sistema pasará a régimen de inundación, en el cual los impulsores no son capaces de dispersar el gas a través del volumen del equipo. El régimen de inundación se caracteriza por la formación de cavidades de gran tamaño detrás de las aspas de los impulsores, además, el flujo de gas asciende a través del fermentador como si se tratara de una columna de burbujeo, lo cual disminuye la homogeneidad del contenido, así como la velocidad de transferencia de calor y masa entre las diferentes fases presentes (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004). En la Figura 1.14 se

muestra un esquema de los patrones de dispersión del gas en un biorreactor tipo tanque agitado para cada régimen.

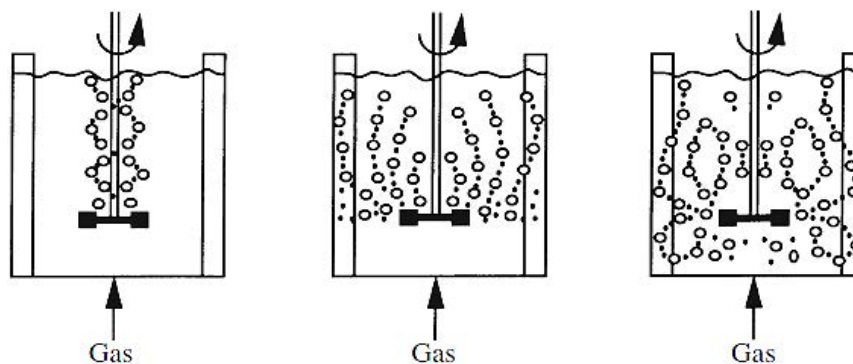


Figura 1.14. Patrones de dispersión del gas para turbinas Rushton en biorreactores tipo tanque agitado según el régimen de dispersión. Izquierda: régimen de inundación, centro: régimen de carga, derecha: régimen de dispersión completa (Doran, 2013).

De forma análoga, para un impulsor de flujo axial descendente (propela marina o turbina de paletas inclinadas) existen principalmente dos regímenes de dispersión: carga directa y carga indirecta, aunque los fenómenos de inundación y dispersión completa también pueden darse. La dispersión de gases por impulsores de flujo axial descendente es mucho más compleja que para las turbinas Rushton, puesto que también influyen factores como el largo y ancho de las aspas, la distancia entre el impulsor y el fondo del tanque, el tamaño y posición del difusor de aire, entre otros. En el régimen de carga directa, el flujo de gas contacta el impulsor directamente desde la parte inferior, sin ser dispersado por las corrientes descendentes de éste. En este escenario, las aspas del impulsor dispersan el gas de forma similar a la de una turbina Rushton en régimen de carga, en donde también se presentan corrientes de recirculación desde la sección superior del fluido hacia el impulsor. Por otro lado, el régimen de carga indirecta ocurre a velocidades de agitación más elevadas, o flujos de gas más bajos, y se caracteriza por que las burbujas son dispersadas siguiendo la dirección del flujo inducido por las aspas, por lo que el gas contacta al impulsor únicamente a través de las corrientes de recirculación. Un aspecto importante que se debe tomar en cuenta al utilizar impulsores de flujo axial descendente en biorreactores tipo tanque agitado con presencia de flujos de gas es que la transición entre los regímenes de carga directa e indirecta es altamente inestable, por

lo que pueden presentarse fluctuaciones rápidas que provoquen problemas mecánicos en el eje y motor (Doran, 2013). En la Figura 1.15 se muestra un esquema de estos patrones de dispersión.

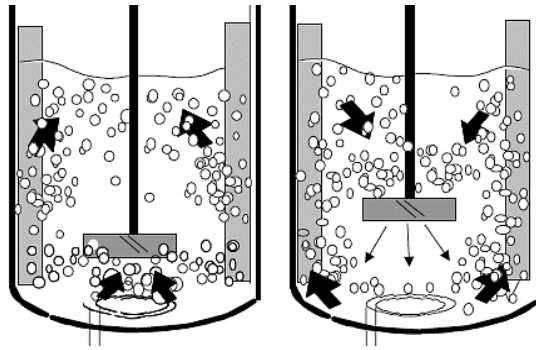


Figura 1.15. Patrones de dispersión del gas para impulsores de flujo axial descendente en biorreactores tipo tanque agitado según el régimen de dispersión. Izquierda: régimen de carga directa, derecha: régimen de carga indirecta (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004).

La transición entre los diferentes regímenes de dispersión de gas se ha planteado en términos de dos números adimensionales, el número de Froude y el número de flujo con gas, cuyos valores críticos (en el punto de transición) se han correlacionado de forma lineal (Rosseburg, Fitschen, Wutz, Wucherpennig, & Schluter, 2018).

$$Fr = \frac{N^2 \cdot D_i}{g}, \quad Fl = \frac{Q_G}{N \cdot D_i^3}, \quad Fl = \delta \cdot Fr + \beta \quad (1.12)$$

En donde:

Fr : Número de Froude, adim.

Fl : Número de flujo con gas, adim.

g : Aceleración de la gravedad, m/s^2

δ, β : Parámetros de ajuste del modelo, adim.

1.4.4.3.4 Coeficiente volumétrico de transferencia de masa

Finalmente, el parámetro más importante para determinar la capacidad de oxigenación de un biorreactor tipo tanque agitado es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa del oxígeno, el cual expresa el flujo de materia por unidad de área que puede generarse a partir

de una fuerza motriz determinada. Para que las moléculas de oxígeno lleguen al sitio de reacción, éstas deben desplazarse desde el interior de las burbujas hasta el interior de las células, siguiendo un trayecto complejo que se muestra en la Figura 1.16.

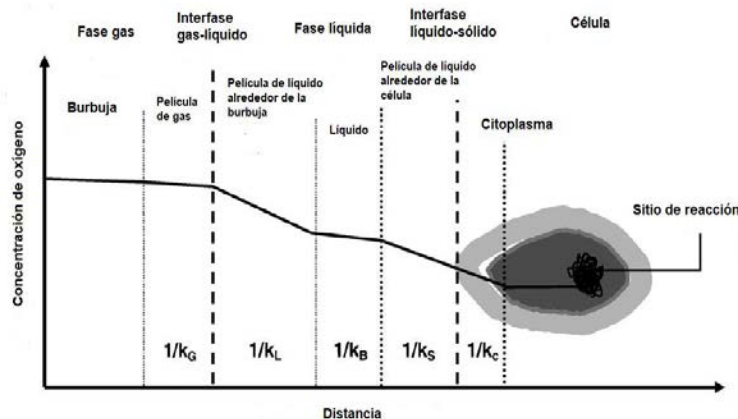


Figura 1.16. Trayectoria promedio de una molécula de oxígeno desde la burbuja de gas hasta el sitio de reacción en la célula (García-Ochoa & Gómez, 2009).

En este trayecto, las moléculas de oxígeno deben pasar a través de diferentes fases e interfaces, cada una con una resistencia particular al movimiento del gas. En el análisis de los procesos de transporte de materia, es común asumir que una de esas resistencias es mucho mayor que el resto y que, por tanto, determina la velocidad del proceso. Para el caso de la transferencia de oxígeno en medios líquidos, la resistencia que controla el fenómeno de transporte es la que se encuentra en la película de líquido que rodea a las burbujas. La velocidad a la cual se lleva a cabo este proceso se puede expresar matemáticamente de la siguiente manera (Doran, 2013):

$$N_{O_2} = k_L \cdot a \cdot (C_{O_2}^{L,sat} - C_{O_2}^L) \cdot V_L \quad (1.13)$$

En donde:

N_{O_2} : Velocidad interfacial de transferencia de oxígeno, mol/s.

k_L : Coeficiente de transferencia de materia, m/s.

$C_{O_2}^{L,sat}$: concentración de saturación de oxígeno en la fase líquida, mol/m³.

$C_{O_2}^L$: concentración de oxígeno en la fase líquida, mol/m³.

En este contexto, al producto del coeficiente de transferencia de materia (k_L) y el área superficial específica (a) se le conoce como coeficiente volumétrico de transferencia de masa, k_La . El agrupamiento de dichas variables se debe a la dificultad para medirlas de forma independiente. En lo que concierne a la fuerza motriz, ésta se compone de la concentración de oxígeno presente en cualquier momento en el líquido, y la concentración de oxígeno en el líquido en equilibrio termodinámico con la fase gaseosa. Las concentraciones de equilibrio en una mezcla dependen de las condiciones de temperatura, presión y composición del sistema (Doran, 2013).

El valor del k_La depende de una gran cantidad de variables, como lo son: las condiciones de operación del sistema (temperatura, presión, composición molar), las propiedades fisicoquímicas del medio (difusividad másica, densidad, viscosidad, tensión superficial), la geometría del equipo (volumen total, forma, distribución espacial de los componentes) y las características dinámicas del flujo de los fluidos (velocidad, turbulencia, aceleración de la gravedad). En el caso específico de fermentaciones en biorreactores tipo tanque agitado, otras variables que también influyen en el valor del coeficiente son: pH, flujo de aire, velocidad de agitación, salinidad, presencia de antiespumantes, surfactantes o detergentes, retención del gas, tipo de agitador y de difusor, presencia de deflectores, presencia de múltiples fases no miscibles (oleosas o sólidas) (García-Ochoa & Gómez, 2009).

La determinación del valor del k_La se puede llevar a cabo mediante mediciones directas, o mediante estimaciones a partir de modelos teóricos o semiempíricos. Los modelos teóricos tienen la ventaja de estar fundamentados en teorías sobre la transferencia de materia, sin embargo, no son capaces de incorporar la totalidad de las variables que influyen en el proceso de transporte. En contraste, los modelos semiempíricos incorporan la dependencia del k_La con variables más relevantes desde el punto de vista práctico (como potencia volumétrica o flujo de aire), pero no brindan una explicación del mecanismo por el cual esas variables influyen en el valor del coeficiente (García-Ochoa & Gómez, 2009). Para el caso de fermentaciones sumergidas en biorreactores tipo tanque agitado se suele utilizar una correlación empírica de la siguiente forma:

$$k_L a = c \cdot (P_{G,V})^b \cdot (u_{sp})^d \cdot (\eta_L)^e \quad (1.14)$$

En donde:

c, b, d, e : parámetros de ajuste del modelo, adim.

En lo que concierne a la medición experimental del $k_L a$, ésta puede realizarse de distintas formas. Uno de los métodos más sencillos hace uso de un sensor de oxígeno disuelto para determinar el porcentaje de saturación de oxígeno en el medio líquido. Este método se conoce en ciertos contextos como método estático y consiste en cuantificar la variación del oxígeno disuelto con respecto al tiempo, desde 0% hasta 100%. Para este fin, inicialmente se inyecta nitrógeno puro al medio para desplazar el oxígeno y reducir su concentración hasta 0%; posteriormente, se reintroduce el suministro de aire utilizando el flujo volumétrico y la velocidad de agitación de interés. Una vez que se han recopilado los datos, es posible calcular el valor del $k_L a$ mediante la siguiente expresión matemática (García-Ochoa & Gómez, 2009):

$$-\ln \left(1 - \frac{C_{O_2}^L}{C_{O_2}^{L,sat}} \right) = k_L a \cdot t \quad (1.15)$$

1.4.5 Escalamiento de bioprocesos en biorreactores tipo tanque agitado

Una vez que se han determinado los valores de las variables físicas, químicas y biológicas que maximizan el desempeño del bioproceso a escala de laboratorio, el siguiente paso es trasladar esas condiciones de operación hacia equipos de mayor tamaño con el fin de cumplir con el volumen de producción requerido. A este procedimiento se le conoce con el nombre de escalamiento, y es una práctica común en la ingeniería de bioprocesos (Villadsen, Nielsen, & Lidén, 2011). La dificultad que se presenta durante la etapa de escalamiento de un proceso surge a partir de las interacciones entre la termodinámica, cinética, mecánica de fluidos, transferencia de calor y la transferencia de masa que actúan sobre éste. Los últimos tres fenómenos mencionados se ven particularmente afectados por las características geométricas del equipo, por lo que el tamaño del fermentador tiene una influencia directa sobre la opera-

ción. En el caso del escalamiento de bioprocesos, existe un componente adicional de complejidad: la interacción entre las condiciones de operación y la biología del organismo que se esté utilizando. Existen diferentes estrategias para abordar el problema del escalamiento de un proceso, entre ellas se tienen (Anaya-Durand & Pedroza-Flores, 2008):

- Fenomenológica: basada en principios teóricos sobre mecánica de fluidos, fenómenos de transporte, cinética de reacciones, termodinámica y leyes de conservación. Permite realizar predicciones en rangos de operación no estudiados experimentalmente. Esta estrategia se ha visto reforzada por el avance en las técnicas de simulación computacional de procesos.
- Empírica: basada en la determinación experimental del desempeño del bioproceso y el ajuste de las variables hasta lograr resultados similares a los obtenidos en escala piloto o de laboratorio. Permite tener una mayor certeza en el escalamiento, pero implica la realización de una mayor cantidad de experimentos.
- De similaridad: basada en mantener constantes ciertas razones o proporciones geométricas, mecánicas, térmicas y químicas entre los procesos a diferentes escalas. Puede aplicarse en combinación con las otras dos estrategias.

Las estrategias más utilizadas a nivel comercial suelen ser la empírica, en combinación con la de similaridad, esto debido a que la predicción del comportamiento de un bioproceso a partir de principios fundamentales no es capaz de contemplar todas las interacciones entre los mecanismos físicos, químicos y biológicos que intervienen en el sistema. Para los objetivos de este trabajo, se describirán los principios de similaridad, los criterios de escalamiento y las estrategias de análisis más utilizadas a nivel industrial.

1.4.5.1 Principios de similaridad y criterios de escalamiento

Para poder trasladar las condiciones de operación y el comportamiento del bioproceso hacia una escala mayor, es necesario cumplir con una serie de principios y criterios que se basan en la proporción de diferentes propiedades entre las escalas. Los principios de similaridad

establecen estas proporciones para las características geométricas, mecánicas, térmicas y químicas, mientras que los criterios de escalamiento son parámetros que se seleccionan con el fin de mantener su valor constante entre las escalas (Amanullah, Buckland, & Nienow, 2004). A continuación, se describirán ambos conceptos con mayor profundidad.

1.4.5.1.1 Principios de similaridad

En el escalamiento de procesos y operaciones unitarias existen cuatro principios de similaridad relevantes (Anaya-Durand & Pedroza-Flores, 2008).

- Similaridad geométrica: dos o más cuerpos se consideran geoméricamente similares si para cualquier punto en el primer cuerpo existe un punto correspondiente en el segundo. Otra forma de entender la similaridad geométrica es si las proporciones entre las dimensiones lineales relevantes se mantienen constantes entre las escalas, por ejemplo, si la razón entre el diámetro y la altura de dos biorreactores es igual. El cumplimiento de este principio es necesario para el cumplimiento de todos los otros principios de similaridad.
- Similaridad mecánica: esta se divide en estática, cinemática y dinámica. La similaridad estática ocurre si las deformaciones que sufren ambos cuerpos, ante la aplicación de esfuerzos constantes, son de la misma magnitud, de manera que se mantenga también la similaridad geométrica. Por otro lado, la similaridad cinemática, en cuerpos con similaridad geométrica, se da si elementos correspondientes en cada cuerpo trazan trayectorias correspondientes en intervalos de tiempo correspondientes, es decir, se mueven con velocidades proporcionales. Finalmente, la similaridad dinámica para dos cuerpos en movimiento, geoméricamente similares, ocurre cuando las proporciones entre todas las fuerzas que actúan sobre ambos cuerpos son iguales.
- Similaridad térmica: se dice que dos cuerpos son térmicamente similares si, además de ser geométrica y cinemáticamente similares, la diferencia de temperaturas entre cualquier par de puntos correspondientes en ambos cuerpos es proporcional. Para que este principio se cumpla, la proporción entre los diferentes flujos de calor para ambos cuerpos debe ser idéntica.

- Similaridad química: para que este principio se cumpla, se deben cumplir los principios de similaridad geométrica, cinemática y térmica. Se dice que dos cuerpos son químicamente similares si las diferencias de concentración entre cualquier par de punto correspondientes en ambos cuerpos mantienen una proporción constante. Es importante resaltar que no es estrictamente necesario que la composición química sea idéntica entre ambos cuerpos para que se considere que este criterio se cumple, sin embargo, en la práctica se busca que la composición química de todas las fases presentes en un sistema se mantenga constante a través de las escalas.

1.4.5.1.2 Criterios de escalamiento

Con el fin de determinar las condiciones de operación que permitan cumplir con los principios de similaridad, se han propuesto diferentes criterios de escalamiento que se deben mantener constantes entre las escalas. La selección de las variables que se consideran criterios de escalamiento se basa en el conocimiento de los diferentes fenómenos que afectan la operación de interés, por lo que estos suelen ser particulares para cada sistema de reacción que se utilice. En el caso de los biorreactores tipo tanque agitado, Schmidt (2005) reporta un listado de criterios que se utilizan en el escalamiento de fermentaciones en este tipo de equipos, el cual se muestra en el Cuadro 1.9.

Cuadro 1.9. Parámetros utilizados como criterios de escalamiento en operaciones con biorreactores tipo tanque agitado (Schmidt, 2005).

Parámetro	Fenómeno asociado
Potencia volumétrica	Mezclado, dispersión del gas
Número de potencia	Mezclado, transferencia de masa
Velocidad de punta del impulsor	Mezclado, esfuerzo cortante
Número de Reynolds	Mezclado, régimen de flujo del líquido
Tiempo de mezclado	Mezclado
Flujo de gas por unidad de volumen	Transferencia de oxígeno
Velocidad superficial del gas	Transferencia de oxígeno, régimen de flujo del gas

Cuadro 1.9. (Continuación) Parámetros utilizados como criterios de escalamiento en operaciones con biorreactores tipo tanque agitado (Schmidt, 2005).

Parámetro	Fenómeno asociado
Retención del gas	Transferencia de oxígeno, mezclado, consumo de potencia
Número de flujo con aireación	Régimen de dispersión del gas
Tasa de transferencia de oxígeno	Transferencia de oxígeno
Coefficiente volumétrico de transferencia de masa	Transferencia de oxígeno
Cociente respiratorio	Transferencia de oxígeno, metabolismo
Coefficiente de transferencia de calor	Transferencia de calor

Tomando en consideración que el aumento en la escala de un fermentador conlleva variaciones en sus dimensiones relevantes (altura y diámetro del tanque, diámetro de los impulsores, entre otras), no es posible mantener todos los parámetros constantes entre las escalas, por lo que la escogencia de los criterios de escalamiento que se utilizarán implica un balance entre los efectos para cada variable. En el Cuadro 1.10 se muestra un ejemplo del efecto de algunos criterios de escalamiento sobre diferentes parámetros relevantes en la operación de fermentadores tipo tanque agitado.

Cuadro 1.10. Efecto de los diferentes criterios de escalamiento en las variables de operación de un biorreactor tipo tanque agitado (Amanullah, Buckland, & Nienow, 2004).

Efecto en la proporción entre las variables a diferentes escalas	Criterio de escalamiento que se mantiene constante					
	P_g/V_L	N	v_i	Re	k_{La} y vvm	k_{La} y u_{sp}
$P_M \propto N^3 D_i^5$	1000	10^5	100	0.1	829	1000
$P_{G,V} \propto N^3 D_i^2$	1	100	0.1	10^{-4}	0.8	1
N	0.22	1	0.1	0.01	0.3	0.22
$v_i \propto N D_i$	2.2	10	1	0.1	2.7	2.2
$Re \propto N D_i^2$	22	100	10	1	27.2	22
$Q_G \propto N D_i^3$	220	1000	100	10	272	220
$Fr \propto N^2 D_i$	0.48	10	0.1	10^{-3}	0.5	0.48
$t_{ci} \propto N^{-1}$	4.55	1	10	100	9.4	4.55
k_{La} y vvm	1.59	39.8	0.32	2.5×10^{-5}	1	-
k_{La} y u_{sp}	1	25.1	0.2	1.6×10^{-3}	-	1

En donde

P_M : Potencia mecánica del motor, W.

v_i : velocidad en la punta del impulsor, m/s.

vvm : flujo de aire por unidad de volumen de líquido (volumen por volumen minuto), min^{-1} .

t_{ci} : tiempo de circulación, s.

1.4.5.2 Análisis de regímenes

Una estrategia para analizar y comparar las condiciones de operación predichas a través del uso de diferentes criterios de escalamiento es el análisis de regímenes, el cual consiste en la comparación de los tiempos característicos con los que ocurren los distintos fenómenos en un biorreactor (Sweere, Luyben, & Kossen, 1987). Los fenómenos que se toman en cuenta en el análisis de regímenes son los relacionados al transporte de cantidad de movimiento, calor y masa, a las cinéticas de crecimiento de biomasa y consumo de sustratos, y a los flujos de materia hacia y desde el fermentador. En el Cuadro 1.11 se detallan los tiempos característicos relevantes, así como su definición a partir de otros parámetros.

Cuadro 1.11. Tiempo característico de diferentes fenómenos en la operación de biorreactores tipo tanque agitado (Palomares, Lara, & Ramírez, 2010).

Fenómeno	Tiempo característico (s)	Definición
	Mezclado	t_{95}
Transporte	Circulación *	$t_{ci} = \frac{t_{95}}{4}$
	Transferencia de oxígeno	$\tau_{O_2} = \frac{1}{k_L a}$
	Crecimiento de biomasa	$t_X = \frac{1}{\mu}$
Cinética	Consumo de oxígeno	$t_{O_2} = \frac{C_{O_2}^L}{q_{O_2} \cdot X}$
	Consumo de sustrato	$t_S = \frac{S}{r_S}$
Flujo	Gas	$t_{Q_G} = \frac{V_T}{Q_G}$
	Medio líquido	$t_{Q_L} = \frac{V_T}{Q_L}$

* La definición del tiempo de circulación suele tomarse como un submúltiplo del tiempo de mezclado. Por convención, la constante de proporcionalidad se toma como $1/4$.

En donde:

τ_{O_2} : Tiempo característico de transferencia de oxígeno, s.

t_X : Tiempo característico de crecimiento de biomasa, s.

t_{O_2} : Tiempo característico de consumo de oxígeno, s.

q_{O_2} : Velocidad específica de consumo de oxígeno, g oxígeno/g biomasa s.

X : Concentración de biomasa, kg/m³.

t_S : Tiempo característico de consumo de sustrato, s.

S : Concentración de sustrato, mol/m³.

r_S : velocidad de consumo del sustrato, mol/m³ s.

t_{Q_G} : Tiempo característico de residencia del gas, s.

t_{Q_L} : Tiempo característico de residencia del líquido, s.

Una de las ventajas que permite el análisis de regímenes es la identificación de los mecanismos limitantes en un proceso determinado. Por ejemplo, si el tiempo característico de transferencia de oxígeno es mayor que el tiempo característico de consumo, es probable que existan limitaciones de transferencia de masa en el proceso y que este factor sea el que controle la velocidad de crecimiento del microorganismo y la tasa de producción del metabolito de interés. Por otro lado, si el tiempo de transferencia de oxígeno es menor al tiempo de circulación o al tiempo de mezclado, es probable que se desarrollen gradientes de concentración del gas a través del equipo, lo que puede exponer a las células a entornos cambiantes que alteren su metabolismo. Además, si el tiempo de mezclado es mayor al tiempo característico de crecimiento o de transferencia de oxígeno, no es confiable asumir que la suposición de mezcla perfecta es adecuada para la descripción matemática del sistema (Sweere, Luyben, & Kossen, 1987). Otros tiempos característicos como el tiempo de residencia para la fase líquida se vuelven relevantes de sistemas continuos, ya que aspectos como la cinética de consumo de sustratos depende del tiempo que estos permanezcan en contacto con el sistema de reacción (Fogler, 2008).

1.4.5.3 Consumo de energía en biorreactores tipo tanque agitado

Otro aspecto importante que se debe tomar en cuenta en el escalamiento de biorreactores es el consumo energético, ya que este es uno de los factores más relevantes en los costos de

operación del equipo. Además, las limitaciones mecánicas y económicas para el suministro de potencia un biorreactor establece límites operativos a variables como la velocidad de agitación y el flujo de aire, por lo que son determinantes en la selección de las condiciones de operación a gran escala. Para un fermentador tipo tanque agitado, con presencia de flujo de gas y operado de forma isotérmica en modo discontinuo, los flujos de energía se dan por concepto de agitación mecánica, inyección del gas y remoción de calor (Palomares & Ramírez, 2009). A continuación, se describirá cada uno con mayor profundidad, omitiendo la sección sobre transferencia de calor dado que no fue relevante para el desarrollo de este trabajo.

1.4.5.3.1 Consumo de potencia por agitación mecánica

Como se expuso en secciones anteriores, un aspecto fundamental de los biorreactores tipo tanque agitado es la presencia de un sistema de agitación mecánico constituido por un motor, un eje y uno o varios impulsores montados sobre dicho eje. Los objetivos del sistema de agitación son el mezclado y homogenización del contenido del equipo, y la dispersión del gas en el volumen del líquido. En caso de que haya presencia de fases sólidas o líquidas insolubles, el sistema de agitación también se encarga de lograr la suspensión o incorporación, respectivamente, de dichas fases. El consumo de potencia por agitación depende de factores como la cantidad, tipo, diámetro y velocidad de rotación de los impulsores, además de las características de fluido como la densidad y la viscosidad (esta última en el caso de operación en régimen de transición o laminar). Estos factores se combinan en el parámetro denominado potencia volumétrica, el cual se utiliza para cuantificar la demanda de potencia por concepto de agitación, por unidad de volumen del contenido del biorreactor (Doran, 2013).

Sin embargo, la presencia de flujos de gas para el suministro de oxígeno en fermentaciones aeróbicas influye en la demanda de potencia del sistema de agitación debido a la formación de las cavidades detrás de las aspas de los impulsores. Para tomar en cuenta en fenómeno, se han propuesto distintos modelos matemáticos que correlacionan el consumo de potencia con aireación y sin aireación, lo que algunos autores denominan consumo relativo de potencia o

factor de aireación. Uno de esos modelos es el desarrollado por Hughmark en 1980 (Amanullah, Buckland, & Nienow, 2004), el cual se muestra en la ecuación (1.16).

$$F_{P,G} = 0.1 \cdot \left(\frac{Q_G}{N \cdot V_L} \right)^{-0.25} \cdot \left(\frac{N^2 \cdot D_i^4}{g \cdot w \cdot V_L^{0.67}} \right)^{-0.2} \quad (1.16)$$

En donde:

$F_{P,G}$: Factor de aireación para el consumo de potencia por agitación, adim.

w : Espesor de las aspas de los impulsores, m.

Teniendo en consideración el efecto del flujo de aire sobre el consumo de potencia por agitación, se puede calcular la demanda real de potencia mecánica del equipo, la cual es equivalente al flujo de trabajo de eje que ingresa al sistema, por unidad de volumen del contenido.

$$P_{G,V} = P_V \cdot F_{P,G} \quad (1.17)$$

En donde:

$P_{G,V}$: Potencia volumétrica por agitación con aireación, W/m³.

Finalmente, el consumo de potencia eléctrica del motor se puede calcular de la siguiente manera (Geankoplis, 1998).

$$P_{E,M} = \frac{P_{G,V} \cdot V_L}{\varphi_M} \quad (1.18)$$

En donde:

$P_{E,M}$: Potencia eléctrica del motor, W.

φ_M : Eficiencia eléctrica del motor, adim.

1.4.5.3.2 Consumo de potencia por aireación

El segundo componente que contribuye a la demanda de energía de un biorreactor tipo tanque agitado es la aireación. La introducción de aire en un fermentador tiene como propósito suministrar oxígeno a las células, esto en el caso de las fermentaciones con microorganismos aerobios. Para este fin, es necesario que la corriente de gas tenga un flujo volumétrico y una presión adecuados, lo cual se logra mediante el uso de compresores. Un compresor es un

equipo que aumenta la presión de un gas mediante la reducción de su volumen, aplicando energía en forma de trabajo mecánico (McCabe, Smith, & Harriot, 2007). La cantidad de energía que debe aplicarse al gas para lograr un aumento de presión determinado depende de la trayectoria de compresión que siga el gas, esto es, si la compresión es adiabática, isotérmica o politrópica. Para el cálculo del consumo de potencia del compresor, se asume que la compresión es adiabática, lo que quiere decir que no existe transferencia de calor entre el gas que se comprime y su entorno. En este escenario, la potencia específica del compresor es (Geankoplis, 1998):

$$W_C = \frac{R \cdot T}{MM_G \cdot \gamma^*} \cdot \left[\left(\frac{P_2}{P_1} \right)^{\gamma^*} - 1 \right], \quad \gamma^* = \frac{\gamma - 1}{\gamma} \quad (1.19)$$

En donde:

W_C : Potencia específica del compresor, J/kg.

R : Constante universal de gases ideales, J/mol K.

T : Temperatura absoluta del aire, K.

MM_G : Masa molar del aire, g/mol.

γ^* : Razón de gamma, adim.

γ : Razón de capacidades caloríficas específicas del aire (C_p/C_v), adim.

P_1 : Presión absoluta del aire a la entrada del compresor, Pa.

P_2 : Presión absoluta del aire a la salida del compresor, Pa.

De forma similar a la del consumo de potencia eléctrica por agitación, la potencia eléctrica del compresor se puede calcular de la siguiente manera (Geankoplis, 1998).

$$P_C = \frac{\rho_G \cdot Q_G \cdot W_C}{\varphi_C} \quad (1.20)$$

En donde:

P_C : Potencia eléctrica del compresor, W.

ρ_G : Densidad del aire, kg/m³.

φ_C : Eficiencia eléctrica del compresor, adim.

Una diferencia importante entre el flujo de energía que ingresa al sistema por agitación y el que ingresa por aireación es que la energía entregada por el gas hacia el biorreactor no es

idéntica a la energía entrada al gas por el compresor. Cuando la corriente del gas entra al biorreactor, esta se expande desde la presión de entrada (provocada por el compresor) hasta la presión del headspace del biorreactor, la cual no es exactamente igual a la presión atmosférica. Además, el proceso de expansión sigue una trayectoria isotérmica, en lugar de adiabática, por lo que la ecuación para calcular el trabajo específico realizado por el gas es la que se muestra en la ecuación, en la cual se desprecian los términos correspondientes a la energía cinética y energía potencial del gas (Palomares & Ramírez, 2009).

$$W_E = \frac{R \cdot T}{MM_G} \cdot \ln \frac{P_2}{P_3} \quad (1.21)$$

En donde:

W_E : Potencia específica por expansión del gas, J/kg

P_3 : Presión absoluta del aire en el headspace del biorreactor, Pa.

Finalmente, la potencia entregada por el gas hacia el biorreactor, por unidad de masa del líquido en el equipo, es (Palomares & Ramírez, 2009).

$$\varepsilon_G = \frac{\rho_G \cdot Q_G \cdot W_E}{\rho_L \cdot V_L} \quad (1.22)$$

En donde:

ε_G : Tasa específica de disipación de energía por expansión del gas, W/kg.

Capítulo 2. Metodología experimental, equipo y materiales

El objetivo principal de este trabajo fue establecer las condiciones de crecimiento de *Ganoderma sp.* en medio líquido, que produjeran la mayor concentración de biomasa seca en un biorreactor tipo tanque agitado. Los objetivos específicos de la investigación fueron:

1. Determinar la composición del medio de cultivo a nivel de matraz.
2. Definir la concentración del inóculo a nivel de matraz.
3. Identificar la cinética de crecimiento a nivel de matraz.
4. Establecer la cantidad, tipo y posición de los impulsores en el biorreactor.
5. Determinar el flujo de aire a utilizar en el biorreactor.
6. Proponer las condiciones de agitación y aireación a utilizar en el escalamiento del proceso a biorreactores de 70 L.

El presente proyecto se desarrolló en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, durante el período comprendido entre marzo del año 2017 y noviembre del año 2018. A continuación, se describe la metodología, los materiales y equipos utilizados en la investigación.

2.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La fase experimental de esta investigación se dividió en tres partes: la primera parte consistió en la realización de pruebas en matraz para determinar la composición del medio de cultivo líquido, la concentración del inóculo y la cinética de crecimiento del hongo. En la segunda etapa, se realizaron pruebas en biorreactor para definir la cantidad, tipo y posición de los impulsores, así como el flujo de aire. Finalmente, en la tercera parte se examinaron diferentes escenarios de escalamiento mediante el uso de modelos matemáticos, para proponer los valores de la velocidad de agitación y flujo de aire en biorreactores de 70 L.

2.1.1 Obtención y mantenimiento de la cepa de *Ganoderma sp.*

2.1.1.1 Obtención y reactivación de la cepa

El hongo utilizado en este proyecto fue proporcionado por la micoteca del Centro de Investigación en Innovación Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica, con número de accesión CIIBI-007A, y contó con el permiso de biodiversidad R-CM-ITCR-005-2019-OT de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO). El organismo se reactivó a partir de un cultivo en tubo de ensayo que contenía micelio sumergido en aceite mineral y conservado en frío. Se tomó una muestra de dicho tubo y se colocó sobre placas Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA).

2.1.1.2 Mantenimiento de la cepa

El mantenimiento de la cepa de *Ganoderma sp.* se realizó en placas Petri utilizando PDA como medio de cultivo. El medio de cultivo se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y según la cantidad que se necesitara; los detalles de la preparación del medio se encuentran en la sección de apéndices. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C por 20 minutos. Todos los subcultivos posteriores se realizaron haciendo un corte circular en la superficie del micelio distal (material más alejado del punto de inoculación de la placa) utilizando un sacabocados metálico de 8 mm de diámetro. El disco de biomasa se colocó en el centro de una placa de PDA con una pinza estéril. Las placas se colocaron en una incubadora a 30 °C por 7 días, y se realizaron subcultivos semanalmente.

2.1.2 Pruebas en matraz

2.1.2.1 Determinación de la composición del medio de cultivo

El medio de cultivo base se definió a partir de investigaciones previas realizadas en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) por el tesiaro Valmore Guevara-Manzanares (2015), y a partir de la revisión de literatura (Torres-López, Quintero-Díaz, & Atehortua-Garcés, 2011), y se muestra en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Composición del medio de cultivo base.

Sustancia	Concentración (g/L)	Referencia
Glucosa	30.0	Torres-López <i>et al</i> (2011)
Peptona	5.0	
Extracto de levadura	5.0	
KH ₂ PO ₄	0.5	Guevara-Manzanares (2015)
K ₂ HPO ₄	0.5	
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5	

Asimismo, se estudió el efecto de tres variables en el crecimiento del hongo en medio líquido, utilizando un diseño factorial completo 2³ por triplicado. Los componentes probados en el diseño, así como sus niveles se resumen en Cuadro 2.2.

Cuadro 2.2. Factores y niveles estudiados en la prueba de medios de cultivo.

Factores	Niveles (g/L)		Referencia
	Bajo (-)	Alto (+)	
Aceite de oliva	0.00	3.00	Zárate-Chaves <i>et al</i> (2013)
Sales	CaCl ₂ 2H ₂ O	0.00	Zhong & Xu (2012)
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.00	Tang & Zhu (2009)
Tiamina	0.00	0.05	Jo <i>et al</i> (2009)

La combinación de las sales de calcio y cobre se tomó como un solo factor. Para la prueba de medios de cultivo se prepararon 200 mL de cada medio de cultivo, los cuales se denominaron A, B, C, D, E, F, G y H.

Cuadro 2.3. Distribución de los niveles de las variables en los medios de cultivo probados.

Medio	Variables		
	Aceite de oliva	Sales	Tiamina
A	+	+	+
B	+	+	-
C	+	-	+
D	+	-	-
E	-	+	+
F	-	+	-
G	-	-	+
H	-	-	-

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.5 utilizando HCl 1M y NaOH 1M. En el apéndice D se describe detalladamente la preparación de cada medio de cultivo. Posterior a su preparación, los medios se almacenaron en la refrigeradora a 15 °C.

Se colocaron 50 ml del medio de cultivo correspondiente en matraces de 250 ml previamente esterilizados, y se inocularon con tres discos de biomasa (8 mm) cultivada en PDA por 7 días. Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento. Los matraces se colocaron en un agitador orbital a 100 rpm y temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 14 días. Una vez terminado el tiempo de cultivo, la biomasa se filtró utilizando un colador metálico y se lavó con agua destilada para eliminar restos del medio de cultivo. Seguidamente, la biomasa se colocó en placas Petri previamente pesadas y se secó en una estufa a 65 °C por 48 horas (placa sin tapa). El peso seco se determinó por diferencia en balanza analítica una vez que las placas estuvieran a temperatura ambiente.

Posteriormente, se realizó un ANOVA de un solo factor para comparar la concentración de biomasa obtenida con el medio definido a partir del diseño factorial, contra la obtenida con el mismo medio suplementado con una concentración de aceite de oliva de 9.1 g/L (1% v/v) (Yang, Ke, & Kuo, 2000), y contra la de un cultivo en medio comercial Caldo de Papa Dextrosa (PDB). Se utilizaron los mismos métodos de inoculación, incubación y recuperación de biomasa que en el diseño factorial.

2.1.2.2 Definición de la concentración del inóculo

Una vez determinado el medio de cultivo óptimo se procedió a definir la concentración del inóculo. Para este fin, se probaron tres concentraciones por triplicado, una reportada en la literatura y dos adicionales: 6.6 g/L (Fang, Tang, & Zhong, 2002), 10.0 g/L y 20.0 g/L, en términos de biomasa fresca. La preparación del medio de cultivo y la incubación de las muestras se realizaron siguiendo los procedimientos descritos en la sección 2.1.2.1. La inoculación se realizó utilizando la biomasa proveniente de un cultivo en matraz con 8 días de creci-

miento. Dicha biomasa se filtró con un colador metálico, y se pesó la cantidad correspondiente para cada tratamiento, de forma aséptica, con una balanza semianalítica (ver apéndice D).

La recuperación final de biomasa se realizó mediante filtración al vacío en un embudo Büchner y un Kitasato, utilizando filtros marca BOECO grado 1288 (diámetro de poro de 12 a 15 μm) previamente secados y pesados, y una presión de vacío de 70 kPa. Se realizaron 3 lavados con agua destilada para remover el medio de cultivo restante. Los filtros se secaron a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, posteriormente se pesaron en frío para determinar el peso seco de la muestra por diferencia, en una balanza analítica. Además del peso seco, se determinó el índice de crecimiento como variable de respuesta adicional de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$IC = \frac{X_f - X_0}{X_0} \quad (2.1)$$

En dónde:

IC : Índice de crecimiento, g/g.

X_f : Concentración de biomasa seca al final del ensayo (g/L).

X_0 : Concentración de biomasa del inóculo (g/L).

2.1.2.3 Identificación de la cinética de crecimiento

Después de haber definido el medio de cultivo y la concentración del inóculo, se determinó la cinética de crecimiento de *Ganoderma sp.* en medio líquido a nivel de matraz. Se utilizaron 21 matraces de 250ml con 50 ml de medio de cultivo y se colocaron en un agitador orbital a 100 rpm y temperatura ambiente (25 ± 2 $^{\circ}\text{C}$) durante 14 días. Se retiraron tres matraces cada dos días para la recuperación de la biomasa y la determinación del peso seco, utilizando el mismo procedimiento y condiciones que en la sección 2.1.2.2. Los valores se graficaron contra el tiempo para la determinación de la tasa de crecimiento específica (h^{-1}), la cual se calculó ajustando los datos de la curva a diferentes modelos matemáticos, utilizando regresión no lineal, mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt (tolerancia de 1.0×10^{-8}) en el software CurveExpert Professional versión 2.6.5.

En el Cuadro 2.4 se detallan los modelos utilizados, los cuales se escribieron en la notación que utilizó el software.

Cuadro 2.4. Modelos matemáticos utilizados en la determinación de la tasa específica de crecimiento de *Ganoderma sp.* a nivel de matraz (Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & Van't Riet, 1990).

Modelo	Ecuación
Exponencial	$X = A_1 e^{\mu t}$
Logístico	$X = \frac{A_2}{1 + B_2 e^{-\mu t}}$
Gompertz	$X = A_3 e^{-e^{B_3 - \mu t}}$
Richards	$X = \frac{A_4}{(1 + B_4 e^{-\mu t})^{1/C_4}}$

En donde:

X : Concentración de biomasa seca, g/L.

t : tiempo, h.

μ : tasa específica de crecimiento, h^{-1} .

e : función exponencial.

$A_1, A_2, A_3, A_4, B_2, B_3, B_4, C_4$: parámetros de ajuste de los modelos, adim.

A partir de la curva de crecimiento del organismo se determinó el tiempo de transferencia del cultivo del matraz al biorreactor.

2.1.3 Pruebas en biorreactor

2.1.3.1 Establecimiento de la configuración de los impulsores

Para las pruebas de esta etapa se utilizó un biorreactor marca Applikon Biotechnology de 3 L de volumen total (2 L de volumen de trabajo). Los detalles del equipo se describen en la sección 2.2. Se probaron cuatro configuraciones distintas de impulsores, variando la cantidad, tipo y posición de estos. En el Cuadro 2.5 se muestran las configuraciones examinadas.

Cuadro 2.5. Configuración de impulsores probadas en biorreactor.

Prueba	Configuración*	Impulsor		
		Inferior	Medio	Superior
1	MA – PI	Propela marina	Turbina de paletas inclinadas	-
2	PI – MA – RT	Turbina de paletas inclinadas	Propela marina	Turbina Rushton
3	MA – RT – PI	Propela marina	Turbina Rushton	Turbina de paletas inclinadas
4	MA – PI – RT	Propela marina	Turbina de paletas inclinadas	Rushton

* MA propela marina, PI turbina de 6 aspas inclinadas, RT turbina Rushton.

La evaluación de cada configuración se realizó de forma cualitativa, observando la homogeneidad y el movimiento del contenido del biorreactor en cada sección (inferior, media y superior). Se utilizó el medio de cultivo, edad del inóculo, y método de inoculación descritos en las secciones anteriores. La concentración de inóculo se incrementó a 40 g/L para simular condiciones de alta concentración de biomasa de forma más rápida. Las fermentaciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 30 °C, 100 rpm, 0.1 vvm a 300 kPa, 100% de oxígeno disuelto inicial y 5 días de cultivo. El pH y el oxígeno disuelto se monitorearon, pero no se controlaron durante las pruebas. El aire se suministró a través de un difusor poroso y no se utilizaron mamparas.

2.1.3.2 Determinación del flujo de aire

Utilizando la configuración de impulsores definida en la sección anterior, se procedió a examinar el efecto del flujo de aire. Para este fin, se probaron dos flujos, por duplicado, 0.25 vvm y 1.0 vvm, utilizando aire comprimido a 300 kPa. Las fermentaciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 30 °C, 350 rpm, 100% de oxígeno disuelto inicial y 12 días de crecimiento. El medio de cultivo, edad y concentración del inóculo fueron los establecidos en pruebas anteriores. Al igual que en la prueba anterior, el pH y el oxígeno disuelto se monitorearon, pero no se controlaron. El aire se suministró a través de un difusor poroso (15 μ m) y no se utilizaron mamparas. Se determinó el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_La) para el oxígeno mediante el método dinámico (por cuadruplicado),

antes de la inoculación. Para esto, se recopilaron los valores del porcentaje de oxígeno disuelto cada 10 s, con ayuda de un cronómetro. A partir de estos datos, se determinó el valor del k_La mediante regresión lineal. Los detalles del cálculo se muestran en el apéndice C.

Transcurridos los 12 días, la biomasa se recuperó para la determinación del peso seco. El contenido del biorreactor se separó en dos etapas; inicialmente, éste se filtró a través de un colador metálico para remover los restos de biomasa de mayor tamaño, realizando lavados con agua destilada (sección 2.1.2.1). La suspensión obtenida se separó posteriormente utilizando filtración al vacío (sección 2.1.2.2), realizando lavados de la misma forma. La biomasa recolectada de las dos etapas se colocó en placas Petri previamente pesadas y se secó a 65 °C por 48 horas, posteriormente se pesó en frío para determinar el peso seco por diferencia en una balanza analítica.

2.1.4 Propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L

2.1.4.1 Determinación de la densidad y viscosidad dinámica del medio de cultivo

Para realizar los cálculos de escalamiento fue necesario determinar la densidad y viscosidad del medio de cultivo. La medición de la densidad se realizó utilizando un picnómetro estándar de 10 mL, el cual se pesó, en una balanza analítica, vacío, lleno de agua y lleno de medio de cultivo, cada uno por triplicado. La masa del agua y la masa del medio se calcularon por diferencia. Posteriormente, la densidad del medio se calculó mediante la ecuación 2.2.

$$\rho_L = \rho_w \cdot \frac{m_L}{m_w} \quad (2.2)$$

En dónde:

ρ_w : Densidad del agua, kg/m³.

m_w : Masa del agua, kg.

m_L : Masa del medio de cultivo, kg.

Por otro lado, la medición de la viscosidad cinemática se llevó a cabo en un viscosímetro de Ostwald, en el cual se colocaron 10 mL del medio de cultivo hasta llenar el bulbo del instru-

mento. Posteriormente, se tomó el tiempo que duró el líquido en llegar desde la marca superior del bulbo hasta la marca inferior, con un cronómetro. A este tiempo se le denominó tiempo de vaciado. La viscosidad cinemática en mm^2/s se obtuvo al multiplicar el tiempo de vaciado por la constante específica del viscosímetro. Para obtener la viscosidad dinámica, se multiplicó la viscosidad cinemática por la densidad del medio obtenida anteriormente. Todas las mediciones se llevaron a cabo a $30\text{ }^\circ\text{C}$, y se realizaron en el Laboratorio de Bioprospección del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot).

2.1.4.2 Determinación de la velocidad de agitación y flujo de aire para los biorreactores de 70 L

Una vez establecidas las condiciones de cultivo de *Ganoderma sp.* en el biorreactor de 2 L, se examinaron diferentes escenarios de escalamiento del proceso a biorreactores de 70 L (50 L de volumen de trabajo), mediante el uso de modelos matemáticos. Para este fin, se seleccionaron tres parejas de criterios de escalamiento: k_{LA} y potencia volumétrica con aireación, k_{LA} y velocidad superficial, potencia volumétrica con aireación y velocidad superficial. Las tres parejas de criterios se aplicaron a las dos condiciones probadas en el biorreactor de 2 L: 0.25 vvm (caso A) y 1.0 vvm (caso B), para un total de seis escenarios distintos. Para todos los escenarios se calcularon los parámetros descritos en el Cuadro 2.6.

La nomenclatura de las ecuaciones se especifica en el capítulo 5 para ahorrar espacio. Los cálculos se llevaron a cabo en Microsoft Excel (Office 365, Windows 10), y se utilizó el complemento “Solver” (método GRG Nonlinear, tolerancia de 1.0×10^{-6}) para encontrar los valores de velocidad de agitación y flujo de aire que permitiesen cumplir con los criterios de escalamiento correspondientes a cada escenario. Los detalles para el cálculo de cada parámetro se encuentran en el apéndice C. Posterior al análisis y comparación de escenarios, se realizó una propuesta de condiciones de operación para el cultivo de *Ganoderma sp.* en biorreactores tipo tanque agitado de 70 L (50 L).

Cuadro 2.6. Parámetros de operación calculados para la evaluación de diferentes criterios de escalamiento.

Parámetro	Ecuación	Referencia
Coefficiente volumétrico de transferencia de masa, h ⁻¹	$k_L a = 7.96 \cdot P_{G,V}^{0.48} \cdot u_{sp}^{0.59} \cdot \eta_L^{-0.68}$	Quirós-Fournier (2014)
Potencia volumétrica del motor sin aireación, W/m ³	$P_V = \frac{n \cdot N_P \cdot \rho_L \cdot N^3 \cdot D_i^5}{V_L}$	
Factor de aireación	$F_{P,G} = E_1 \cdot \left(\frac{Q_G}{N \cdot V_N}\right)^{E_2} \cdot \left(\frac{N^2 \cdot D_i^4}{g \cdot w \cdot V_N^{0.67}}\right)^{E_3}$	Fujasová, Linek, & Moucha (2007)
Potencia volumétrica del motor con aireación, W/m ³	$P_{G,V} = P_V \cdot F_{P,G}$	
Velocidad de punta de los impulsores, m/s	$v_i = N \cdot \pi \cdot D_i$	
Número de Reynolds	$Re = \frac{\rho_L \cdot N \cdot D_i^2}{\eta_L}$	García-Ochoa & Gómez (2009)
Tiempo de mezclado, s	$t_{95} = 2.4 \cdot (\varphi_B \cdot \varepsilon_M + \varepsilon_G)^{-0.33} \cdot H_T^{0.67} \cdot J^{0.33}$	
Eficiencia de bombeo	$\varphi_B = \frac{N_Q^3}{N_P} \cdot \left(\frac{D_i}{D_T}\right)^4$	Magelli, Montante, Pinelli, & Paglianti (2013)
Tasa específica de disipación de energía por agitación, W/kg	$\varepsilon_M = \frac{P_{G,V}}{\rho_L}$	
Tasa específica de disipación de energía por expansión, W/kg	$\varepsilon_G = \frac{\rho_G \cdot Q_G \cdot W_E}{\rho_L \cdot V_L}$	Palomares & Ramírez (2009)
Potencia específica por expansión, J/kg	$W_E = \frac{R \cdot T}{MM_G} \cdot \ln \frac{P_2}{P_3}$	
Razón de mezclado-oxigenación	$\theta_{MO} = \frac{1}{k_L a \cdot t_{95}}$	Este trabajo
Retención del gas	$\phi_G = 0.16 \cdot P_{G,V}^{0.328} \cdot u_{sp}^{0.592} \cdot N_{P,G}^{-0.0916}$	Xie <i>et al</i> (2014)
Número de potencia con aireación	$N_{P,G} = \frac{P_{G,V} \cdot V_L}{\rho_L \cdot N^3 \cdot D_i^5}$	
Velocidad superficial del gas, m/s	$u_{sp} = \frac{Q_G}{A_T}$	
Número de flujo con aireación	$Fl = \frac{Q_G}{N \cdot D_i^3}$	Montante & Paglianti (2015)
Número de Froude	$Fr = \frac{N^2 \cdot D_i}{g}$	
Número de Froude crítico	$Fr_c = 7.6 \cdot Fl + 0.0127$	
Velocidad de corte, s ⁻¹	$\dot{\gamma} = K_i \cdot N_Q \cdot N^{1.5}$	Sánchez-Pérez <i>et al</i> (2006), Wu, Graham, & Mehidi (2006)
Potencia específica del compresor, J/kg	$W_C = \frac{R \cdot T}{MM_G \cdot \gamma^*} \cdot \left[\left(\frac{P_2}{P_1}\right)^{\gamma^*} - 1 \right]$	
Potencia eléctrica del compresor, W	$P_C = \frac{\rho_G \cdot Q_G \cdot W_C}{\varphi_C}$	Geankoplis (1998)
Potencia eléctrica total, W	$P_{tot} = P_C + \frac{P_{G,V} \cdot V_L}{\varphi_M}$	
Eficiencia de mezclado, J ⁻¹	$EM = \frac{1}{P_{tot} \cdot t_{95}}$	Núñez-Ramírez <i>et al</i> (2012)
Eficiencia en la transferencia de oxígeno, J ⁻¹	$ETO = \frac{k_L a}{P_{tot}}$	Buffo <i>et al</i> (2016)

2.1.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los experimentos se realizó en Minitab 19, utilizando el método del cuadrado mínimo del error y un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$). Se verificaron los supuestos de igualdad de varianzas, mediante el estadístico de Levene, y de normalidad de residuos, mediante el estadístico de Anderson-Darling. Cada diseño experimental se analizó de acuerdo con el cumplimiento de los supuestos estadísticos. En el caso de la prueba de medios de cultivo, se realizó un análisis factorial utilizando una distribución F Snedecor. Para la concentración de inóculo, se realizó un ANOVA de un solo factor, con la misma distribución de probabilidad, y se utilizó el método de comparación por parejas de Tukey. En la prueba de flujo de aire, se llevó a cabo un análisis t student de muestras independientes, con su distribución correspondiente, haciendo uso del método de Tukey para la concentración de biomasa y el método de Games-Howell para el k_{La} (ANOVA Welch). En lo que respecta al ajuste de los modelos matemáticos para la estimación de la tasa específica de crecimiento (sección 2.1.2.3), los modelos fueron comparados de acuerdo con el valor del error estándar de la regresión y el criterio corregido de información de Akaike, optando por minimizar ambos parámetros.

2.2 EQUIPO

En esta sección se describirán los equipos e instrumentos más importantes que se utilizaron en esta investigación. Se dará especial énfasis al biorreactor por su relevancia en este trabajo.

2.2.1 Biorreactor de 3 L

Se utilizó un biorreactor tipo tanque agitado fabricado por la empresa holandesa Applikon Biotechnology, modelo Z611000310. El equipo consiste principalmente de cuatro partes: el envase de vidrio, la tapa de acero inoxidable, piezas y sensores, y el conjunto biocontrolador-bioconsola. A continuación, se describirá cada parte con mayor detalle.

2.2.1.1 Envase de vidrio

El recipiente utilizado consiste en un envase de vidrio de borosilicato, con forma cilíndrica y fondo redondeado. Las dimensiones del envase se muestran en el Cuadro 2.7, mientras que el diagrama de este se muestra en la Figura 2.1.

Cuadro 2.7. Dimensiones del envase de vidrio del biorreactor de 3 L (Applikon Biotechnology, 2008).

Parámetro	Valor	Unidades
Volumen nominal	3.0	L
Volumen total	3.2	L
Volumen de trabajo	2.0	L
Diámetro del tanque	13.0	cm
Altura total	24.2	cm
Altura de trabajo	15.8	cm
Razón altura-diámetro total	1.9	adim
Razón altura-diámetro de trabajo	1.2	adim

2.2.1.2 Tapa de acero inoxidable

El equipo cuenta con una tapa de acero inoxidable 316L, a la cual se le dio un acabado electropulido para facilitar su limpieza. Sobre la tapa se coloca el eje y soporte del motor, las piezas y los sensores. La distribución de los accesorios sobre la tapa se resume en la Figura 2.2.

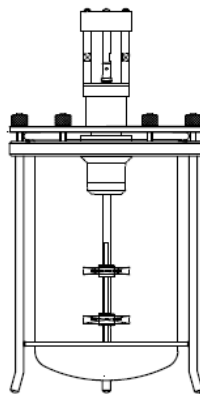


Figura 2.1. Diagrama de equipo del biorreactor de 3 L (Applikon Biotechnology, 2008).

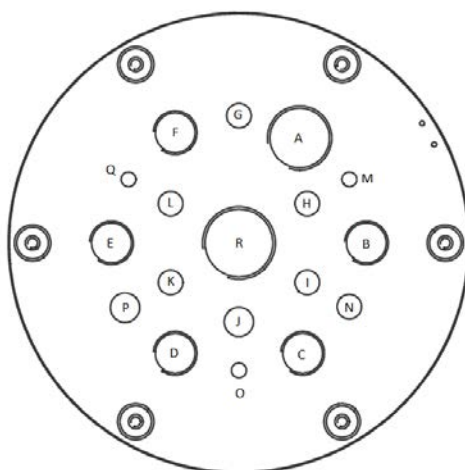


Figura 2.2. Distribución de los accesorios en la tapa del biorreactor de 3 L (Applikon Biotechnology, 2008).

En el Cuadro 2.8 se detalla la distribución de los accesorios en la tapa del biorreactor de 3 L.

Cuadro 2.8. Nomenclatura utilizada en la Figura 2.2 para la distribución de accesorios en la tapa del biorreactor.

Letra	Accesorio	Letra	Accesorio	Letra	Accesorio
A	Sensor de oxígeno	G	Difusor de aire	M	Tornillo ciego
B	Condensador	H	Puerto de adición	N	Puerto de adición
C	Intercambiador de calor	I	Toma de muestra	O	Tornillo ciego
D	Sensor de pH	J	Tornillo ciego	P	Tornillo ciego
E	Puerto septo	K	Toma de muestra	Q	Tornillo ciego
F	Puerto triple	L	Termopozo	R	Eje y soporte del motor

2.2.1.3 Piezas y sensores

El biorreactor cuenta con una serie de piezas y sensores que permiten su funcionamiento correcto. A continuación, se describen los más importantes para la operación del equipo (Applikon Biotechnology, 2008).

Motor, eje y soporte

El sistema de agitación consiste en un motor P100 (Z510000010) diseñado para biorreactores de dos y tres litros, y medios de cultivo de baja viscosidad. El rango de velocidades del motor es de 0 a 1250 rpm, con un torque máximo de 0.2 Nm. El mismo se coloca sobre un soporte de acero inoxidable 316L equipado con un eje con acople magnético (Z81315R003) para asegurar la esterilidad.

Impulsores

El biorreactor cuenta con tres impulsores diferentes: una turbina Rushton, una turbina de seis paletas inclinadas y una propela marina. En el Cuadro 2.9 se describen las características de los impulsores.

Cuadro 2.9. Características de los impulsores utilizados en el biorreactor (Applikon Biotechnology, 2008).

Impulsor	Modelo	Diámetro (cm)	Grosor de aspas (mm)	Patrón de flujo	Número de potencia	Número de flujo
Turbina Rushton	Z81313R602	4.5	1.6	Radial	6.0	0.75
Turbina de 6 paletas inclinadas	Z81313R645	4.5	1.6	Mixto. Axial descendente	1.5	0.73
Propela marina	Z81314RC02	4.5	1.5	Axial descendente	1.5	0.73

Difusor de aire

La inyección de aire al sistema se realiza a través de un difusor poroso (Z811303005), el cual está diseñado para cultivos con células que son sensibles al daño mecánico producido por altas velocidades de flujo de aire. El tamaño de poro del difusor permite la generación de una gran cantidad de burbujas con un diámetro muy pequeño, lo cual aumenta el área interfacial disponible para la transferencia de masa. En el Cuadro 2.10 se muestran las dimensiones relevantes del difusor.

Cuadro 2.10. Dimensiones del difusor poroso utilizado en el biorreactor (Applikon Biotechnology, 2008).

Dimensión	Valor (cm)
Diámetro	0.75
Altura	0.4
Tamaño de poro	0.0015

El difusor, con una forma cilíndrica, se coloca al final de un tubo en forma de “L” de acero inoxidable 316L. El aire se suministró mediante una manguera conectada a la entrada del tubo y se colocó un filtro de PTFE con un tamaño de poro de 0.22 μm para esterilizar el aire.

Condensador y trampa de condensados

Sobre la tapa del biorreactor se coloca un condensador de acero inoxidable 316L (Z81308L002), cuya finalidad es permitir la salida de gases del sistema y condensar el líquido que se hubiese evaporado producto de la aireación y el calentamiento. El dispositivo cuenta con una entrada y una salida de agua para remover el calor del efluente gaseoso. A la salida del condensador se coloca una manguera dirigida hacia un recipiente de vidrio con el fin de recolectar el líquido que no hubiese condensado e impedir la obstrucción de los filtros. A la salida del recipiente de vidrio se coloca una manguera, un acople en forma de “T”, y dos filtros de PTFE de 0.22 μm para asegurar una salida de gases segura e impedir la presurización del equipo.

Puerto septo

La tapa del biorreactor cuenta con un puerto de adición tipo septo (Z81302PD02), el cual permite añadir pequeñas cantidades de líquido de forma estéril mediante la perforación con una jeringa o aguja. El puerto contiene un hule de silicón que sella herméticamente las perforaciones, manteniendo así la esterilidad. Durante esta investigación no se realizó ninguna adición de líquido a través de este puerto.

Puerto triple de adición

Además del puerto septo, el equipo cuenta con un puerto triple de adición (Z81324MT03), el cual consiste en una pieza de acero inoxidable 316L con tres entradas de 1.0 mm de diá-

metro. Este dispositivo se utiliza comúnmente para la adición de ácidos, bases o antiespumantes, sin embargo, en esta investigación, no se añadió ninguna de esas sustancias, por lo que las entradas se cerraron con mangueras y prensas metálicas.

Toma de muestra

Debido al tamaño de los agregados de biomasa, se utilizaron dos puertos de toma de muestra con un diámetro de 0.8 cm. Los puertos consisten en tubos cilíndricos análogos a los fabricados por Applikon Biotechnology (Z81319MB03), pero éstos se elaboraron en el taller del Instituto Tecnológico de Costa Rica, con acero inoxidable. Uno de los puertos de toma de muestra se conectó a una botella estéril a través de un orificio en la tapa, utilizando una manguera. La tapa contó con un segundo orificio al cual se le conectó una manguera con un filtro de PTFE de 0.22 μm . El segundo puerto de toma de muestra se cerró con una manguera y una prensa metálica, ya que se utilizó únicamente para sellar el orificio correspondiente.

Puerto de adición

Al igual que con la toma de muestra, el equipo cuenta con dos puertos de adición de acero inoxidable, de 0.8 cm de diámetro, fabricados en el taller del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Los puertos son análogos a los elaborados por Applikon Biotechnology (Z81324MT02). En uno de los puertos de inoculación se colocó una manguera con un acople macho-hembra para conectar el biorreactor al matraz que contenía el inóculo. El segundo puerto de inoculación se cerró con una manguera y una prensa metálica, ya que se utilizó únicamente para sellar el orificio correspondiente.

Sistema de intercambio de calor (enfriador y manta térmica)

Para regular la temperatura del sistema, el biorreactor cuenta con dos dispositivos independientes: una manta térmica de 110 W (Z311020030) y un intercambiador de calor (Z81317KV03). La manta térmica consiste en un envoltorio de plástico que rodea el envase de vidrio (no cubre toda la superficie) y que se calienta a través de una resistencia eléctrica, mediante una corriente suministrada por el biocontrolador. Por otro lado, el intercambiador de calor consiste en un tubo hueco de acero inoxidable 316L que se atornilla a la tapa del equipo, y cuenta con una entrada y una salida para la circulación de agua.

Termopozo y sensor de temperatura

El sistema de medición de temperatura del equipo se compone de un termopozo (Z81323TP03) y un sensor de temperatura Pt-100 (Z034150010). El termopozo consiste en un tubo hueco de acero inoxidable 316L cuya superficie exterior está en contacto con el medio de cultivo. El interior del tubo se llena con agua destilada y después se introduce el sensor de temperatura. Dicho sensor está conformado por un electrodo de platino que convierte la señal térmica en una señal eléctrica.

Sensor de oxígeno disuelto

El biorreactor cuenta con un sensor de oxígeno disuelto, tipo polarigráfico de baja deriva (Z010023520), para determinar la presión parcial del oxígeno en el medio, relativa a la presión de saturación. El sensor consiste en una celda electroquímica (electrodo de Clark) con un cátodo de platino y un ánodo de plata (electrodo estándar de referencia). El sistema de electrodos está separado del medio por una cubierta metálica hueca, con una membrana de titanio permeable a las moléculas de oxígeno, que contiene una solución electrolítica. El sensor se polarizó durante un día a las condiciones de operación de cada corrida, posterior a la esterilización del equipo, y seguidamente se calibró a las mismas condiciones.

Sensor de pH

El equipo también cuenta con un sensor de pH hecho de vidrio (Z001023551), con un relleno presurizado de gel polimérico de cloruro de potasio. El sensor contiene un electrodo de plata de referencia y un diafragma separador fijo para evitar las contaminaciones cruzadas por difusión de componentes del medio de cultivo al interior del sensor. Una membrana de vidrio ubicada en la punta del sensor permite la difusión controlada de los iones hidronio hacia el electrodo de medición. La calibración se realizó previo a la esterilización, utilizando soluciones estándar de pH 4.0 y pH 7.0.

2.2.1.4 El biocontrolador y la bioconsola

Esta unidad se encarga de operar las diferentes partes del equipo, controlar las variables pertinentes, suministrar la energía al sistema y recopilar los datos de los parámetros de cultivo.

En la Figura 2.3 se muestra un diagrama del biocontrolador y de la bioconsola. A continuación, se describirá cada subunidad con mayor detalle.

Biocontrolador ADI 1010

Este dispositivo contiene una pantalla que permite la visualización y ajuste de las siguientes variables: pH, temperatura, oxígeno disuelto, nivel del líquido y velocidad de agitación. Se encarga de realizar las mediciones de las variables y calcular los parámetros de la salida de los controladores. El biocontrolador también cuenta con una unidad de poder que permite amplificar las señales de los controladores. En esta sección se encuentran las conexiones a los sensores y a las computadoras.

Bioconsola ADI 1025

En esta subunidad se ubican los actuadores que se encargan de ejecutar las acciones definidas por el biocontrolador. El dispositivo cuenta con los siguientes actuadores: rotámetros para el control del flujo de aire, nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono; bombas peristálticas para la dosificación de ácidos, bases y antiespumantes; conexiones para suministro de energía al motor y a la manta de calentamiento, entrada de fluidos como gases y agua para el sistema de intercambio calórico. A lo interno de esta sección se ubica la unidad de poder del biocontrolador. El rotámetro de aire utilizado en este trabajo (Z3RM002030) tuvo un rango de 0 a 10 L/min y se calibró a 21.1 °C y 1 atm.

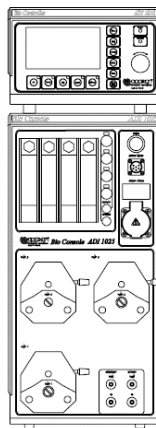


Figura 2.3. Diagrama de equipo del biocontrolador y la bioconsola (Applikon Biotechnology, 2004).

2.2.2 Otros equipos

Además del biorreactor tipo tanque agitado de 3 L, se utilizaron otros equipos a lo largo de esta investigación. En el Cuadro 2.11 se detallan las características del biorreactor de 70 L.

Cuadro 2.11. Características del biorreactor de 70 L utilizado en la propuesta de escalamiento (Applikon Biotechnology, 2009).

Parámetro		Valor	Unidades
Volumen nominal		70.0	L
Volumen total		74.3	L
Volumen de trabajo		50.0	L
Diámetro del tanque		31.3	cm
Área de sección transversal		769.45	cm ²
Altura total		97.0	cm
Altura de trabajo		65.0	cm
Razón altura-diámetro total		3.09	adim
Razón altura-diámetro de trabajo		2.08	adim
Diámetro del impulsor	Turbina Rushton	11.4	cm
	Propela marina	8.9	cm
Grosor del impulsor	Turbina Rushton	2.0	mm
	Propela marina	2.0	mm
Tipo de difusor		Anillo	adim
Diámetro del anillo del difusor		7.94	cm
Número de orificios del difusor		23	adim
Diámetro de orificio del difusor		1.5	mm

En el Cuadro 2.12 se describen otros equipos auxiliares utilizados en esta investigación.

Cuadro 2.12. Otros equipos utilizados en la investigación.

Equipo	Marca	Modelo	Precisión	Placa ITCR
Cámara de flujo laminar	Thermo Scientific	1300 series Az	-	57124
Incubadora	Digisystem	BSI-300D	-	60215
Bactoincinerador	Fisher Healthcare	B-1000	-	84522
Refrigeradora	Hotech	624RHD	-	71708
Autoclave de mesa	Tuttnauer	2540EL	-	55574
Autoclave horizontal	Yang Ta Min Instruments	YTM-	-	-
Balanza analítica	Sartorius	Entris	±0.0001 g	83511

Cuadro 2.12. (Continuación) Otros equipos utilizados en la investigación.

Equipo	Marca	Modelo	Precisión	Placa ITCR
Balanza semianalítica	OHaus	Scout-Pro	±0.01 g	53230
Potenciómetro para pH	OHaus	ST-210	±0.01	-
Agitador orbital	Digisystem	OS-500C	-	85125
Estufa	Digisystem	DSO-300D	-	85126
Bomba de vacío	GAST	DOA-F704-AA	-	52883
Cronómetro	CASIO	HS-30	±0.01 s	-
Plantilla de calentamiento	Cimarec-2	SP46925	-	38097

2.3 MATERIALES

En esta sección se describirán los reactivos químicos y otros compuestos utilizados durante la investigación, así como su pureza o concentración, fabricante e identificadores. En el Cuadro 2.13 se describen los reactivos químicos puros.

Cuadro 2.13. Reactivos químicos puros utilizados en este trabajo.

Reactivo	Fórmula molecular	Pureza o concentración	Fabricante	CAS
D-(+)-Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	≥99.5%	Sigma Aldrich	50-99-7
Dihidrógeno fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	≥99.6%	JT Baker	7778-77-0
Hidrógeno fosfato de potasio	K ₂ HPO ₄	≥99.2%	JT Baker	7758 11 4
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ 7H ₂ O	≥100.3%	JT Baker	10034-99-8
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ 2H ₂ O	≥101.5%	JT Baker	10035-04-8
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ 5H ₂ O	≥99.0%	Sigma Aldrich	7758-99-8
Hidrocloruro de tiamina	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS HCl	≥98%	Sigma Aldrich	67-03-8
Ácido clorhídrico	HCl	1 M	Sigma Aldrich	7647-01-0
Hidróxido de sodio	NaOH	1 M	Merck	1310-73-2
Nitrógeno	N ₂	≥ 99.9995%	Praxair	7727-37-9

Asimismo, se utilizaron otros componentes cuya procedencia hace que no tengan una composición química definida. En el Cuadro 2.14 se describen dichos componentes.

Cuadro 2.14. Componentes complejos utilizados en la elaboración de medios de cultivo.

Reactivo	Fabricante	CAS
Peptona tipo 1	PhytoTechnology Laboratories	73049-73-7
Extracto de levadura	PhytoTechnology Laboratories	8013 01 2
Aceite de oliva extra virgen	La Chinata	8001-25-0
Papa dextrosa agar (PDA)	OXOID	n/a
Caldo de papa dextrosa (PDB)	Alpha Biosciences	n/a

La composición de los medios de cultivo PDA y PDB se describen en el Cuadro 2.15.

Cuadro 2.15. Composición del medio de cultivo PDA y PDB.

Componente	Concentración (g/L)	
	PDA	PDB
Agar	15.0	0.0
Dextrosa	20.0	20.0
Extracto de Papa	4.0	4.0

Finalmente, en el Cuadro 2.16 se describen otras sustancias que también se utilizaron en este trabajo y que no procedieron de algún fabricante en particular.

Cuadro 2.16. Otras sustancias utilizadas en este trabajo.

Reactivo	Descripción
Aire	El aire se tomó directamente del medio ambiente a través de un compresor, el cual contó con un filtro para eliminar impurezas del entorno.
Agua destilada	El agua destilada se preparó a partir del agua del suministro público, mediante un destilador.

Capítulo 3. Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados más importantes obtenidos durante la etapa experimental de este trabajo, así como su respectivo análisis y discusión. Para cada sección, se corroboraron los supuestos estadísticos cuando se utilizaron diseños experimentales, se interpretaron los cuadros y gráficos presentados, se compararon los resultados contra los reportados en la literatura por otros investigadores, se propusieron posibles explicaciones para dichos resultados con base en la teoría, y se justificaron las decisiones en cuanto a la selección de las condiciones de crecimiento.

3.1 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

En el Cuadro 3.1 se muestran los resultados de la verificación del cumplimiento de los supuestos estadísticos de igualdad de varianzas y normalidad de residuos para el diseño factorial utilizado. Sumado a lo anterior, el modelo estadístico generado tuvo un valor de “p” menor a 0.05 (<0.001), lo cual indica que éste explicó de manera significativa la varianza observada en los resultados.

Cuadro 3.1. Verificación de los supuestos estadísticos del diseño factorial 2^3 utilizado en la determinación de la composición del medio de cultivo ($\alpha=0.05$).

Supuesto estadístico	Valor del estadístico de prueba	Valor de p asociado	Decisión	Conclusión
Igualdad de varianzas	0.330	0.928	Se acepta la hipótesis nula	Hay igualdad de varianzas
Normalidad de residuos	0.235	0.768	Se acepta la hipótesis nula	Hay normalidad de residuos

Los resultados de la prueba de optimización del medio de cultivo se recopilan en el Cuadro 3.2. Se puede observar claramente que el tratamiento que produjo una mayor concentración de biomasa fue el “C”, correspondiente a la presencia de aceite de oliva y tiamina en el medio de cultivo. En contraste, el tratamiento “E”, correspondiente a la presencia de las sales y tiamina, produjo la menor concentración de biomasa seca.

Cuadro 3.2. Concentración de biomasa seca para cada tratamiento probado en la optimización del medio de cultivo.

Medio	Variables			Concentración de biomasa seca (g/L)
	Aceite de oliva	Sales	Tiamina	
A	+	+	+	19.87 ± 1.73
B	+	+	-	19.05 ± 1.70
C	+	-	+	23.39 ± 2.44
D	+	-	-	14.24 ± 1.24
E	-	+	+	12.23 ± 1.39
F	-	+	-	14.30 ± 0.98
G	-	-	+	16.04 ± 0.94
H	-	-	-	12.56 ± 2.61

En la Figura 3.1 se muestran los gráficos generados en Minitab 19 para el análisis estadístico de los datos. De acuerdo con el diagrama de Pareto (Figura 3.1, superior), el aceite de oliva y la tiamina, así como la interacción aceite-tiamina y sales-tiamina tuvieron efectos estadísticamente significativos sobre la biomasa. En el diagrama de efectos principales (Figura 3.1, medio) se observa que los medios de cultivo que incluyeron aceite de oliva y tiamina produjeron una mayor concentración de biomasa seca en comparación con aquellos en los que dichos componentes estuvieron ausentes. En el diagrama de interacciones (Figura 3.1, inferior) se observa que los medios de cultivo con aceite de oliva produjeron un mayor crecimiento de biomasa cuando se añadió tiamina al mismo tiempo (cuadrante inferior izquierdo). En contraste, los medios de cultivo con sales (CuSO_4 y CaCl_2) produjeron una menor concentración de biomasa cuando la tiamina estuvo presente en el medio al mismo tiempo (cuadrante inferior derecho).

El efecto positivo del aceite de oliva sobre el crecimiento de *Ganoderma sp.* en medio líquido se ha reportado en la literatura anteriormente. Zárate-Chaves *et al* (2013), así como Chang, Tsai y Houng (2006) encontraron que la adición de aceite de oliva al medio de cultivo, con concentraciones de 3.0 g/L y 4.0 g/L respectivamente, ocasionó un incremento en la concentración final de biomasa. Yang, Ke y Kuo (2000) probaron la adición de algunos aceites de origen vegetal (entre ellos el aceite de oliva), así como la adición directa que ácidos grasos como el ácido oleico, componente principal del aceite de oliva (Yorulmaz, Erinc, & Tekin,

2013), con lo cual obtuvieron incrementos del 65% y 130%, respectivamente, en la concentración de biomasa.

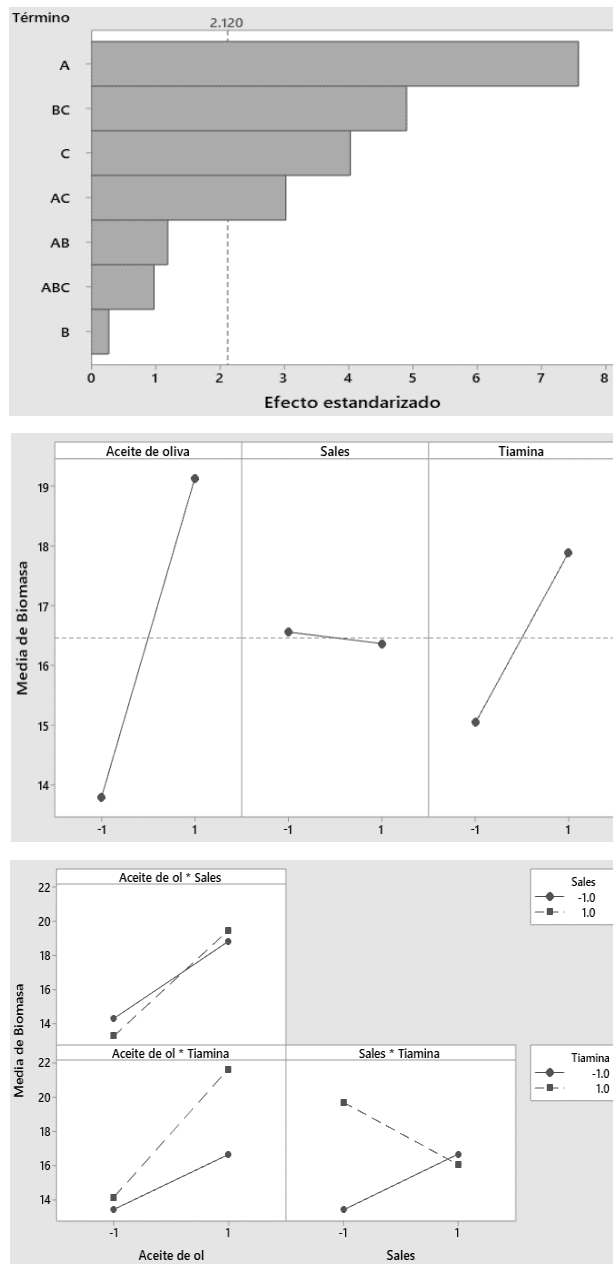


Figura 3.1. Diagrama de Pareto (superior), diagrama de efectos principales (medio) y diagrama de interacciones (inferior), elaborados en Minitab 19, para diseño factorial utilizado en la determinación de la composición del medio de cultivo.

Por otra parte, Lv, Zhao, Duan, Tang y Li (2012) investigaron el contenido de ácidos grasos y esteroides en diferentes especies de *Ganoderma*, con lo que obtuvieron que el ácido oleico, así como el ácido palmítico, ácido linoleico y ácido esteárico, conforman la mayor parte de los ácidos grasos presentes en la biomasa del hongo. Tomando en cuenta este hecho, es posible que el efecto positivo del aceite de oliva sobre el crecimiento de biomasa de *Ganoderma sp.* se deba a que éste proporciona directamente ciertos ácidos grasos, o precursores de estos, requeridos por el organismo.

En cuanto a la tiamina, su importancia como cofactor enzimático en el metabolismo central de muchos hongos se ha establecido anteriormente en la literatura (Kavanagh, 2011), sin embargo, pocos artículos han investigado directamente su efecto sobre el crecimiento de *Ganoderma sp.* La adición de tiamina en los medios de cultivo utilizados en investigaciones sobre el crecimiento de dicho hongo en medio líquido ha sido una práctica común, mas no se ha demostrado su requerimiento como un nutriente esencial. La mayoría de los medios de cultivo reportados en la literatura incluyen fuentes complejas de proteínas, como peptonas, extracto de levadura, extracto de cebada o caseína, los cuales contienen micronutrientes como vitaminas y minerales, además de aminoácidos (Atlas, 2010). Este hecho dificulta la comparación directa entre medios de cultivo suplementados con tiamina y medios no suplementados, puesto que existen otros componentes que podrían estar aportando dicha vitamina al entorno. Jo *et al* (2009) reportó efectos positivos para la tiamina sobre el crecimiento de *G. applanatum* en medio semisólido, utilizando una concentración de 0.1 mg/L, lo cual coincide con los resultados de este trabajo. A pesar de que no se demostró que la tiamina es un nutriente esencial para el crecimiento de *Ganoderma sp.*, si fue posible afirmar que su adición al medio de cultivo mejoró la producción de biomasa en cultivo sumergido.

El efecto de las interacciones entre el aceite de oliva y la tiamina, así como entre las sales inorgánicas y la tiamina, sobre el crecimiento de *Ganoderma sp.* en medio líquido, no se ha reportado anteriormente en la literatura. El Cuadro 3.3 resume los resultados del análisis de comparación de parejas de Tukey para la interacción aceite de oliva – tiamina; las parejas de tratamientos que comparten un número (1, 2 o 3) fueron estadísticamente iguales.

Cuadro 3.3. Concentración de biomasa seca de cada pareja de tratamientos analizada por el método de comparaciones múltiples de Tukey para la interacción aceite de oliva – tiamina.

Promedio de tratamientos	Nivel		Concentración de biomasa seca promedio (g/L)	Agrupamiento	
	Aceite de oliva	Tiamina			
A-C	+	+	21.63 ± 2.70	1	
B-D	+	-	16.64 ± 2.95	2	
E-G	-	+	14.14 ± 2.34	2	3
F-H	-	-	13.43 ± 2.01	3	

Se puede observar claramente que la concentración de biomasa seca obtenida con los tratamientos que incluyeron los niveles altos de aceite de oliva y tiamina, simultáneamente, fue mucho mayor que la de los tratamientos que incluyeron solamente alguno de los 2 factores en nivel alto. Además, en el Cuadro 3.4 se muestran las diferencias en la concentración de biomasa seca (diferencia de medias) entre los grupos de tratamientos que corresponden a los niveles altos y bajos de cada factor principal que se estudió, mientras que en el Cuadro 3.5 se muestran esas mismas diferencias entre las parejas de tratamientos que corresponden a los niveles altos y bajos de las interacciones dobles. Al observar la diferencia de medias para la interacción aceite de oliva – tiamina (8.20 g/L) se puede notar que dicho valor corresponde a la suma de la diferencia de medias para el factor aceite de oliva (5.35 g/L) y para el factor tiamina (2.85 g/L). Esto sugiere que el efecto de la interacción aceite de oliva – tiamina, sobre el crecimiento de biomasa de *Ganoderma sp.* en medio líquido, es un efecto aditivo.

Cuadro 3.4. Diferencia de concentración de biomasa seca de cada grupo de tratamientos analizada por el método de comparaciones múltiples de Tukey para los factores principales.

Tratamientos comparados	Factor	Diferencia de concentración de biomasa seca	Valor p
ABCD vs EFGH	Aceite de oliva	5.35	0.000
ABEF vs CDGH	Sales	-0.19	0.788
ACEG vs BDFH	Tiamina	2.85	0.001

Investigaciones realizadas en *S. cerevisiae* como organismo modelo han establecido que la ruta metabólica para la degradación de ácidos grasos en los hongos es análoga a la ruta utilizada por otros organismos, la β -oxidación, la cual no involucra la acción de la tiamina como

cofactor enzimático (Hiltunen, y otros, 2003), este hecho apoya la hipótesis del efecto aditivo.

Cuadro 3.5. Diferencia de concentración de biomasa seca de cada grupo de tratamientos analizada por el método de comparaciones múltiples de Tukey para las interacciones.

Tratamientos comparados	Interacción	Diferencia de concentración de biomasa seca	Valor p
AC vs FH	Aceite de oliva - Tiamina	8.20	0.000
AB vs GH	Aceite de oliva - Sales	5.16	0.001
AE vs DH	Sales - Tiamina	2.65	0.074

En contraste, la interacción sales – tiamina muestra un comportamiento totalmente diferente. El Cuadro 3.6 muestra los resultados del análisis de comparación de parejas de Tukey para dicha interacción, en la cual se observa que la concentración de biomasa seca obtenida con los tratamientos que incluyeron los niveles altos de sales y tiamina, al mismo tiempo, fue estadísticamente igual a la concentración obtenida con los tratamientos que no incluyeron dichos componentes. Además, se puede notar que en los tratamientos que contaron con el nivel alto del factor sales, la presencia de tiamina no produjo cambios estadísticamente significativos sobre la concentración de biomasa seca.

Cuadro 3.6. Concentración de biomasa seca de cada pareja de tratamientos analizada por el método de comparaciones múltiples de Tukey para la interacción sales – tiamina.

Promedio de tratamientos	Nivel		Concentración de biomasa seca promedio (g/L)	Agrupamiento	
	Sales	Tiamina			
C-G	-	+	19.71 ± 4.35	1	
B-F	+	-	16.67 ± 2.88	2	
A-E	+	+	16.05 ± 4.41	2	3
D-H	-	-	13.40 ± 2.05		3

Al analizar la diferencia de medias para la interacción sales – tiamina (2.65 g/L) se puede notar que dicho valor también corresponde a la suma de la diferencia de medias para el factor sales (-0.19 g/L) y para el factor tiamina (2.85 g/L), hecho que pareciera sugerir que la interacción entre estos factores también es aditiva. Sin embargo, el comportamiento de la prueba de comparaciones múltiples indica que, si existe una interacción directa, antagónica,

entre los factores. En una revisión reciente, Schnellbaecher, Binder, Bellmaine y Zimmer (2019) recopilaron los factores que afectan la estabilidad de las vitaminas en los medios de cultivo más comunes, y reportaron que las sales de cobre tienden a aumentar la velocidad de degradación térmica de la tiamina en solución, particularmente al utilizar buffers de fosfatos. Además, Stepuro, Piletskaya, Stepuro y Maskevich (1997) demostraron que los iones cobre (II) catalizan la oxidación de la tiamina a tiocromo, un compuesto fluorescente, en medios con pH ácidos y neutrales. Tomando esto en consideración, es posible que el efecto negativo de la interacción sales – tiamina se deba a la degradación de la vitamina provocada por el CuSO_4 . Este resultado no coincide con lo reportado por Tang y Zhu (2010), quienes encontraron un incremento de 25% (con respecto al control) en la concentración de biomasa seca al añadir 0.1 mM de CuCl_2 a un medio de cultivo que contenía tiamina, sin embargo, la comparación directa entre los resultados debe ser tomada con precaución debido a las diferencias en las metodologías utilizadas para cultivar el organismo (cepa de *Ganoderma*, medio de cultivo, método de inoculación, temperatura y tiempo de crecimiento). En cuanto a la influencia de las sales de calcio, no se han reportado interacciones directas entre los iones de calcio en soluciones que contienen tiamina, por lo que es probable que el comportamiento observado en este trabajo se deba únicamente a las reacciones entre la tiamina y los iones cobre.

Debido al incremento importante en la concentración de biomasa de *Ganoderma sp.* producto de la adición de aceite de oliva al medio de cultivo, se procedió a examinar el efecto de utilizar una concentración de aceite de 1% v/v (9.1 g/L). En la Figura 3.2 se observa que el crecimiento de biomasa del organismo en el medio suplementado (C2) fue un 32% mayor que en el medio seleccionado en el diseño factorial (C), y un 240% mayor que en el medio comercial (PDB), de acuerdo con el análisis de comparación de parejas de Tukey ($\alpha=0.05$). Estos resultados coinciden con los reportados por Yang, Ke y Kuo (2000) y por Feng *et al* (2017), para concentraciones de aceite de oliva de 1% v/v y 3% v/v, respectivamente. Finalmente, considerando los resultados, el análisis de estos, y la comparación contra la literatura, se seleccionó el medio de cultivo C2 para las pruebas posteriores realizadas en este proyecto.

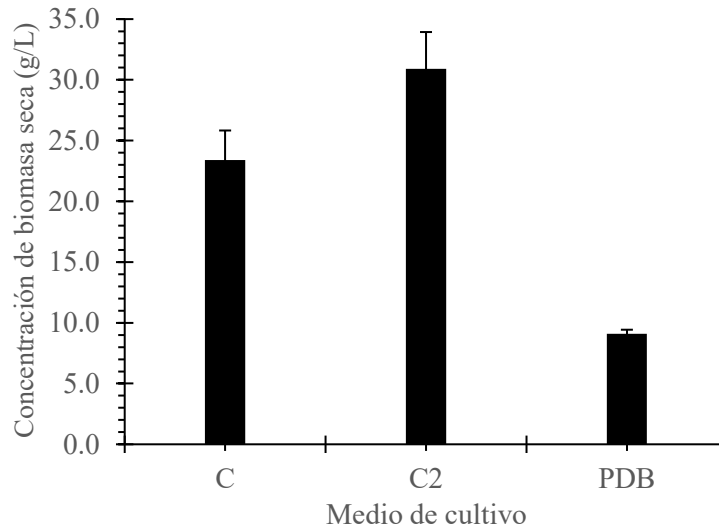


Figura 3.2. Concentración de biomasa seca obtenida a los 14 días con el medio C, C2 y PDB.

3.2 DEFINICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO

La verificación del cumplimiento de los supuestos estadísticos de igualdad de varianzas y normalidad de residuos para el ANOVA de un solo factor se muestran en el Cuadro 3.7.

Cuadro 3.7. Verificación de los supuestos estadísticos del ANOVA de un solo factor utilizado en la determinación de la concentración del inóculo ($\alpha=0.05$).

Supuesto estadístico	Variable de respuesta	Valor del estadístico de prueba	Valor de p asociado	Decisión	Conclusión
Igualdad de varianzas	Concentración de biomasa seca	1.010	0.418	Se acepta la hipótesis nula	Hay igualdad de varianzas
	Índice de crecimiento	1.300	0.340	Se acepta la hipótesis nula	Hay igualdad de varianzas
Normalidad de residuos	Concentración de biomasa seca	0.271	0.578	Se acepta la hipótesis nula	Hay normalidad de residuos
	Índice de crecimiento	0.296	0.517	Se acepta la hipótesis nula	Hay normalidad de residuos

En la Figura 3.3 se muestran los valores de concentración de biomasa seca y de índice de crecimiento obtenidos para las diferentes concentraciones de inóculo que se estudiaron. En el caso de la concentración de biomasa seca (barras negras), se observó claramente que ésta tendió a incrementar a medida que aumentó la concentración de inóculo. En contraste, el índice de crecimiento (IC, barras texturizadas) mostró una tendencia decreciente cuando incrementó la concentración del inóculo. De acuerdo con el análisis de comparación de parejas de Tukey ($\alpha=0.05$), las concentraciones de biomasa seca obtenidas en los tres tratamientos fueron estadísticamente iguales, mientras que, para el caso del índice de crecimiento únicamente las medias correspondientes a las concentraciones de inóculo de 6.6 g/L y 20.0 g/L fueron estadísticamente diferentes entre sí.

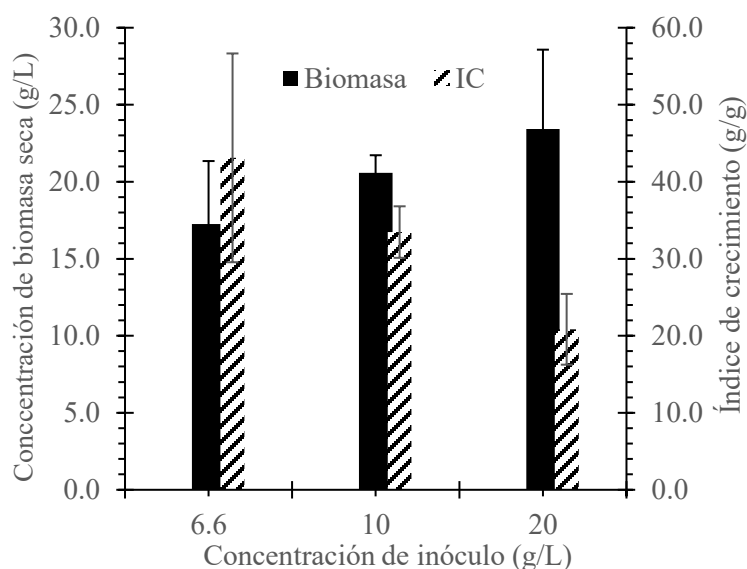


Figura 3.3. Concentración de biomasa seca e índice de crecimiento obtenidos a los 14 días para diferentes concentraciones de inóculo.

Fang, Tang y Zhong (2002) han sido los únicos autores que han reportado la influencia de la concentración del inóculo sobre el crecimiento y morfología de *Ganoderma sp.* en medio líquido, así como su efecto sobre la producción de polisacáridos y ácidos ganodéricos. Un aspecto importante que se debe tomar en cuenta al comparar los resultados contra los de dichos investigadores, es el hecho de que estos reportaron las concentraciones de biomasa seca obtenidas a los ocho días de cultivo, tiempo en el cual se alcanzaron los valores máximos

(el tiempo de cultivo total fue de 14 días). Para realizar una comparación más precisa, se estimaron las concentraciones de biomasa seca obtenidas a los 14 días, las cuales fueron: 9.4 g/L, 10.2 g/L, 8.1 g/L y 8.6 g/L, para concentraciones de inóculo de 1.4 g/L, 3.4 g/L, 6.6 g/L y 13.4 g/L, respectivamente. Cabe resaltar que los autores reportaron las concentraciones inóculo en términos de biomasa seca; las concentraciones en términos de biomasa fresca se estimaron utilizando el porcentaje de agua promedio de las muestras de este trabajo (95% m/m en promedio). Al analizar dichas concentraciones finales, se observa que éstas no generaron una tendencia clara con respecto a las concentraciones de inóculo, lo cual contrasta con el comportamiento creciente encontrado en este experimento. Además, se puede notar que valores obtenidos en el presente trabajo fueron mayores que los reportados por Fang, Tang y Zhong (2002), para todos los casos estudiados. Sin embargo, no es posible sugerir una explicación para este comportamiento debido a que existen múltiples diferencias metodológicas entre ambos estudios.

En lo que respecta al índice de crecimiento, se observó que éste tendió a disminuir a medida que aumentó la concentración del inóculo, tanto en los resultados de este trabajo como en los reportados en la literatura consultada. Utilizando una concentración de inóculo de 6.6 g/L, el índice de crecimiento obtenido fue de 43.10 g/g, mientras que el reportado en la literatura, a los 14 días de cultivo, fue de 23.55 g/g, lo cual indica claramente que el crecimiento obtenido en este trabajo fue mayor, con respecto a la cantidad de biomasa presente al inicio de los cultivos. Es importante mencionar que la interpretación del índice de crecimiento se debe realizar con cuidado, puesto que este parámetro tiende a aumentar mucho cuando se utilizan concentraciones de inóculo muy bajas (menores que 1.0 g/L en términos de biomasa seca). Como se observa en la Figura 3.3, el índice de crecimiento más alto fue de 43.10 g/g con un inóculo de 6.6 g/L (0.33 g/L de biomasa seca), mientras que el obtenido por Fang, Tang y Zhong (2002) fue de 133.29 g/g con un inóculo de 1.4 g/L (0.07 g/L de biomasa seca). Sin embargo, al comparar la concentración de biomasa seca en ambos casos se observan valores de 17.26 g/L y 9.4 g/L, respectivamente. Esto quiere decir que, aunque en términos relativos el crecimiento obtenido en la literatura fue más alto, en términos absolutos se obtuvo una mayor cantidad de biomasa seca en este estudio.

Teniendo en cuenta que la concentración de inóculo no tuvo efectos significativos sobre la concentración final de biomasa seca, y que los efectos sobre el índice de crecimiento se presentaron únicamente para una pareja de muestras (6.6 g/L vs 20.0 g/L), se seleccionó la concentración de inóculo de acuerdo con otros criterios. Debido a que las tendencias discutidas para la concentración de biomasa seca y el índice de crecimiento son opuestas, no es posible seleccionar un tratamiento que maximice ambas variables al mismo tiempo. Tomando esto en consideración, se seleccionó la concentración de inóculo de 10 g/L ya que representó un equilibrio entre concentración final de biomasa seca e índice de crecimiento. Además, dicho tratamiento presentó las desviaciones estándar más pequeñas para ambas variables, lo cual sugiere un mayor grado de confianza en los valores obtenidos.

3.3 IDENTIFICACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MATRAZ

Utilizando una concentración de inóculo de 10 g/L se procedió a determinar la cinética de crecimiento de *Ganoderma sp.* en medio líquido a nivel de matraz. En la Figura 3.4 se muestra la curva de concentración de biomasa seca en función del tiempo, en la cual se observa la ausencia de una fase de adaptación o latencia, sin embargo, si es posible distinguir el inicio de una fase estacionaria alrededor de las 300 h (12 días) de crecimiento.

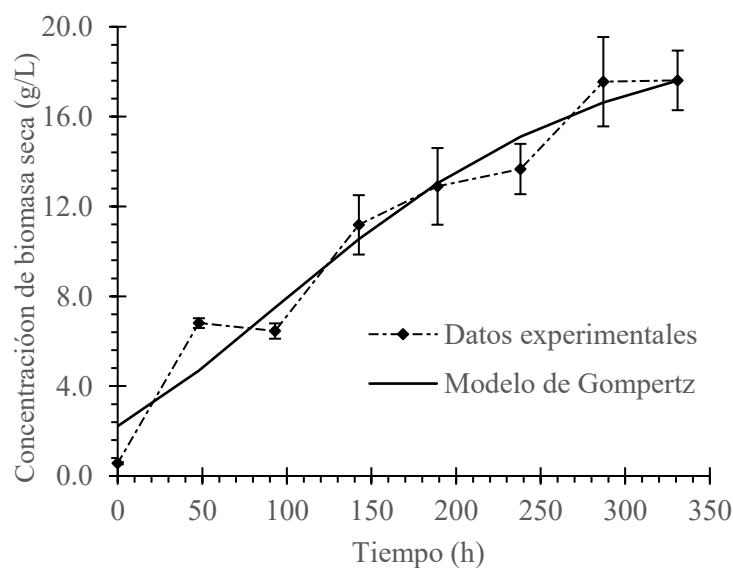


Figura 3.4. Cinética de crecimiento de *Ganoderma sp.* a nivel de matraz.

Con los datos anteriores, se calculó la tasa específica de crecimiento mediante el ajuste de la curva a cuatro modelos matemáticos comúnmente utilizados para describir la variación de la concentración de biomasa con respecto al tiempo: el modelo exponencial, el modelo logístico, el modelo de Gompertz y el modelo de Richards. Los valores de la tasa específica de crecimiento, así como el error estándar de la regresión y el criterio de información de Akaike corregido (AICc), para cada modelo, se muestran en el Cuadro 3.8. En general, los valores predichos por cada modelo tuvieron el mismo orden de magnitud, a excepción del modelo logístico, el cual generó un valor de un orden de magnitud mayor. El modelo matemático se seleccionó tomando en cuenta los valores del error estándar de la regresión y del criterio de información de Akaike corregido, en donde se buscó minimizar ambos valores. El uso de dichos criterios para el análisis de la bondad de ajuste de los modelos por sobre el uso del coeficiente de determinación (r^2), para regresiones no lineales, se ha establecido en la literatura anteriormente (Spiess & Neumeyer, 2010). Teniendo esto en consideración, se seleccionó el modelo de Gompertz para describir matemáticamente la curva de crecimiento de *Ganoderma sp.* en medio líquido, obteniendo una tasa específica de crecimiento de $0.0087 \pm 0.0019 \text{ h}^{-1}$.

Cuadro 3.8. Tasa específica de crecimiento de *Ganoderma sp.* en cultivo sumergido, obtenida a partir de diferentes modelos de crecimiento.

Modelo	Tasa específica de crecimiento (h^{-1}) *	Error estándar de la regresión (g/L)	AICc
Exponencial	0.0041 ± 0.0005	2.42	42.54
Logístico	0.0139 ± 0.0026	1.76	28.54
Gompertz	0.0087 ± 0.0019	1.67	25.93
Richards	0.0087 ± 0.0108	1.71	28.56

* Valor de la incertidumbre corresponde al error estándar de la estimación del parámetro.

Un hecho importante que se puede notar al comparar la curva de crecimiento obtenida en este trabajo contra las curvas obtenidas por Fang, Tang y Zhong (2002) para diferentes concentraciones de inóculo, es la ausencia de una fase de muerte celular, la cual se presenta en el artículo de referencia después de los 8 días de cultivo, independientemente de la concentración de inóculo utilizada. Aunque los autores no reportaron la cinética de consumo de sustrato, si mencionaron que la glucosa residual se consumió a los 8 días de cultivo, hecho

que pudiese explicar la disminución en la concentración de biomasa después de ese punto. Es posible entonces que la razón por la cual no se haya observado una fase de muerte celular en este trabajo haya sido la presencia de glucosa en el medio de cultivo posterior a los 12 días, sin embargo, no es posible afirmar esto con certeza puesto que no se realizaron mediciones de la concentración de sustrato en el medio.

En cuanto a la determinación de la tasa específica de crecimiento, existen pocos artículos en la literatura que han reportado su valor para el cultivo de *Ganoderma sp.* en medio líquido a nivel de matraz. Fei, Li, Zhang y Xu (2019) encontraron una tasa específica de crecimiento de 0.019 h^{-1} para una cepa salvaje, en condiciones de cultivo similares a las de este trabajo, utilizando el modelo logístico para describir la variación en la concentración de biomasa con respecto al tiempo. El valor obtenido por los autores es mayor que el obtenido en esta investigación con el modelo de Gompertz (0.0087 h^{-1}), pero si se asemeja al estimado a partir del modelo logístico (0.0139 h^{-1}). Es importante mencionar que, de acuerdo con la comparación entre los modelos probados, el modelo logístico tiende a estimar una tasa específica de crecimiento más alta que el resto. Otros investigadores realizaron el modelado dinámico de los perfiles de concentración de biomasa, sustrato y productos para la estimación de los parámetros de crecimiento. Para ello, hicieron uso del modelo exponencial (Tang & Zhong, 2004), el modelo logístico (Feng J. , y otros, 2014) (Zhang, Chen, & He, 2007), o el modelo de raíz cúbica (Narkprasom, Guo, Huang, & Guu, 2012) para describir el crecimiento de biomasa con respecto al tiempo. Algunos de estos autores utilizaron el modelo de Monod (Tang & Zhong, 2004) o modelos con inhibición por sustrato (Feng J. , y otros, 2014) para describir la dependencia de la tasa específica de crecimiento con la concentración de sustrato; además de usar los modelos de Luedeking-Piret para describir las cinéticas de consumo de sustrato y generación de productos.

Esta forma de modelar la curva de crecimiento de *Ganoderma sp.* en medio líquido permite generar información valiosa sobre el desempeño del sistema de cultivo, sin embargo, la interpretación fisiológica de los parámetros de crecimiento obtenidos a partir de modelos no-estructurados y no-segregados se debe realizar con cautela. La mayoría de estos modelos se han planteado para cultivos de bacterias o levaduras, por lo que están fundamentados en los

mecanismos de crecimiento de dichos microorganismos (Lejeune & Baron, 1998). No obstante, los mecanismos de crecimiento de hongos filamentosos en medio líquido son muy distintos a los de organismos unicelulares, por lo que los supuestos sobre los cuales se basan muchos de los modelos mencionados no son satisfechos de forma adecuada al aplicarse a los cultivos de hongos (Nielsen, 1992). Por esta razón se vuelve particularmente importante la evaluación estadística de diversos modelos matemáticos para la descripción y predicción del crecimiento de biomasa de hongos filamentosos en medio líquido.

Una vez determinada la curva de crecimiento de *Ganoderma sp.* en medio líquido a nivel de matraz, se estableció el tiempo de traslado del cultivo al biorreactor tipo tanque agitado, el cual es un parámetro relevante para el desarrollo del bioproceso (Posch, Herwig, & Spadiut, 2013). Teniendo en consideración que el objetivo del sistema de cultivo fue producir la mayor concentración de biomasa de manera rápida y eficiente, se definió que el organismo debía transferirse al biorreactor mientras estuviese en la fase de crecimiento exponencial, que es la etapa de crecimiento más rápida del proceso. Por esta razón, se fijó el tiempo de transferencia hacia el biorreactor cerca de las 200 horas (8 días), ya que en dicho punto aún se observaba un crecimiento importante, y se encontraba a una distancia prudente del inicio de la fase estacionaria.

3.4 ESTABLECIMIENTO DE LA CONFIGURACIÓN DE LOS IMPULSORES EN EL BIORREACTOR DE 3 L

En esta sección se realizaron pruebas de tipo exploratorio para examinar el efecto de la configuración de los impulsores sobre la distribución de biomasa dentro del volumen de reacción, por lo que no se utilizaron diseños estadísticos. En el Cuadro 3.9 se muestran los resultados cualitativos de la distribución y movimiento de biomasa en el equipo. En cuanto a la distribución de biomasa, se pudo observar que tanto la configuración MA – PI (1) como la MA – RT – PI (3) generaron una segregación de la materia en dos regiones, A y B, tal y como se puede apreciar en la Figura 3.5.

Cuadro 3.9. Distribución de biomasa en el volumen del biorreactor para las diferentes configuraciones de impulsores utilizadas.

Prueba	Configuración	Distribución de biomasa	Movimiento de la biomasa según región		
			Inferior	Media	Superior
1	MA – PI	Segregada	Alta	Baja	Nula
2	PI – MA – RT	Homogénea	Baja	Alta	Alta
3	MA – RT – PI	Segregada	Alta	Alta	Nula
4	MA – PI – RT	Homogénea	Alta	Baja	Alta

* MA: propela marina. PI: turbina de paletas inclinadas. RT: turbina Rushton.

En la región A, ubicada en la sección superior del biorreactor, el movimiento de la biomasa fue prácticamente nulo, lo cual ocasionó que ésta se aglomerara en una estructura más compacta. Inclusive, fue posible observar que dicha región presentó una morfología distinta, con pellets de mayor tamaño, y una coloración más clara. Esta distribución de materia fue claramente indeseable puesto que dificultó la salida de gases del sistema y expuso a la biomasa a condiciones de cultivo diferentes.

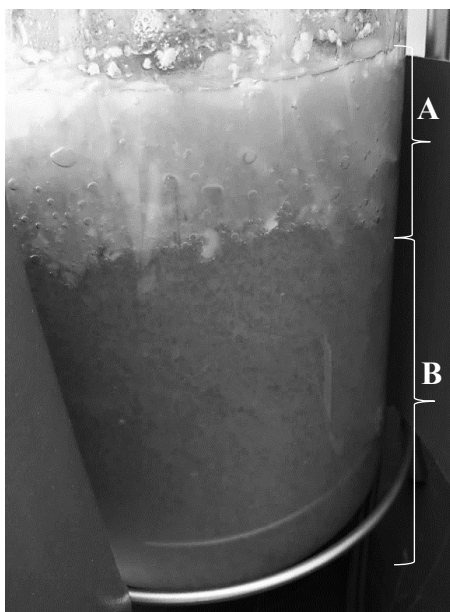


Figura 3.5. Distribución de biomasa en el biorreactor para la configuración MA – PI a los 5 días de cultivo.

De acuerdo con Gibbs, Seviour y Schmid (2000), la falta de homogeneidad es uno de los retos más importantes en el establecimiento de sistemas de cultivo sumergido para hongos

filamentosos en biorreactores tipo tanque agitado, y representa un problema en el escalamiento de la operación a volúmenes de interés para la producción industrial.

Un aspecto que se debe resaltar es el hecho de que la segregación de la biomasa en dos regiones se presentó tanto para la configuración con dos impulsores (MA – PI) como la configuración con la turbina de paletas inclinadas en la posición superior (MA – RT – PI). Esto parece sugerir que dicho impulsor no fue capaz de generar suficiente turbulencia en su zona de acción para las condiciones utilizadas durante las pruebas exploratorias. En contraste, la región B, que comprende las secciones inferior y media del biorreactor, tuvo una distribución más uniforme, la cual se caracterizó por presentar filamentos más alargados y pequeños, sin aglomeraciones visibles. Esta última región si mostró un movimiento apreciable de la materia dentro del volumen comprendido. Por otra parte, las configuraciones PI – MA – RT (2) y MA – PI – RT (4) produjeron una distribución de biomasa homogénea en todo el volumen del biorreactor, como se observa en la Figura 3.6. En este caso, el aspecto importante que se debe mencionar es la presencia de la turbina Rushton en la sección superior del eje del biorreactor, la cual fue capaz de evitar la formación de aglomeraciones como las observadas en la región A (Figura 3.5).

En lo que respecta al movimiento de la biomasa en las diferentes regiones del equipo, es claro que las configuraciones 1 y 3 (Cuadro 3.9) no generaron ningún movimiento apreciable en la sección superior del biorreactor. En contraste, las configuraciones 2 y 4 si produjeron movimiento en todas las secciones del equipo, sin embargo, la sección agitada por la turbina de paletas inclinadas presentó una circulación mucho menor que las secciones agitadas por los otros impulsores. En la Figura 3.6 se puede observar que, aunque la morfología del hongo es uniforme en todo el volumen, es posible distinguir las diferentes zonas de acción de cada impulsor. Para el caso de la configuración MA – PI – RT, las regiones C (turbina Rushton) y E (propela marina) mostraron una circulación importante cerca de los bordes del recipiente de vidrio, mientras que la región D (turbina de paletas inclinadas) tuvo un movimiento muy lento en los bordes, inclusive siendo arrastrado por la circulación de las otras regiones. Tomando en cuenta que en la sección inferior del biorreactor (E, Figura 3.6) fue en donde se

ubicó el difusor de aire y el impulsor inferior, y por tanto fue la responsable de la dispersión de las burbujas de aire, se consideró que ésta debía contar con una agitación elevada, por lo que se decidió descartar la configuración PI – MA – RT.

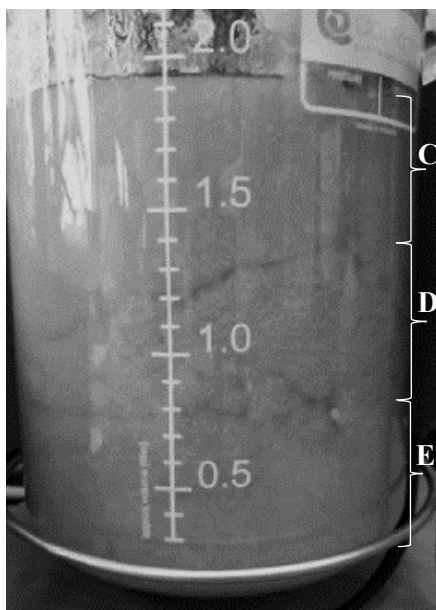


Figura 3.6. Distribución de biomasa en el biorreactor para la configuración MA – PI – RT a los 5 días de cultivo.

El efecto de la configuración de los impulsores sobre las fermentaciones de *Ganoderma sp.*, en biorreactores tipo tanque agitado, no se ha reportado en la literatura anteriormente. Además, no todos los estudios realizados en biorreactor mencionan el arreglo de impulsores utilizado, y aquellos que si lo mencionan, han hecho uso de turbinas Rushton en su mayoría (ver Cuadro 3.12, sección 3.5) y no se han enfocado en el efecto de los impulsores sobre la homogeneidad o circulación de la biomasa en el equipo. Este hecho dificulta la comparación directa de los resultados de esta sección contra la literatura existente sobre *Ganoderma sp.*, sin embargo, si es posible discutir sobre otros estudios realizados con respecto al efecto de la configuración de impulsores en tanques agitados con aireación simultánea.

Por un lado, Buffo *et al* (2016) estudiaron el efecto de siete configuraciones diferentes en un biorreactor con dos impulsores, sobre variables como el k_La , potencia consumida, eficiencia

en la transferencia de oxígeno, velocidad de corte y la microescala de turbulencia de Kolmogorov, en sistemas Newtonianos y no-Newtonianos. Utilizando una configuración RT – MA (superior - inferior), similar a la de este trabajo, obtuvieron los valores más altos de k_{La} de todas las configuraciones probadas, siendo estos un 31% mayores a los obtenidos con dos turbinas Rushton (a 800 rpm y 0.8 vvm). Sumado a lo anterior, la eficiencia en la transferencia de oxígeno, definida como la razón entre el valor del k_{La} y la potencia consumida por agitación, fue un 45% mayor a las mismas condiciones. Por otro lado, Núñez-Ramírez *et al* (2012) examinaron la influencia de dos configuraciones (MA – RT y RT – MA, superior - inferior) sobre la concentración de biomasa seca, viscosidad aparente, número de Reynolds, tiempo de mezclado, potencia volumétrica y eficiencia de mezclado en cultivos del hongo filamentoso *Beauveria bassiana* y en otros sistemas Newtonianos y no-Newtonianos. En el caso de las pruebas con el hongo (300 rpm, 1 vvm), el uso del arreglo RT – MA produjo una mayor cantidad de biomasa de forma más rápida, llegando a los 24 g/L a las 96 horas, en comparación con los 20 g/L obtenidos a las 108 horas para la configuración MA – RT. Además, el tiempo de mezclado fue, en promedio, un 25% menor al utilizar un arreglo similar al de este trabajo, tanto para las fermentaciones como los sistemas no Newtonianos producidos a partir de soluciones de carboximetilcelulosa y fibra de celulosa.

De forma similar, Druzinec, Salzig, Kraume y Czermak (2015) investigaron la cantidad y distribución de tamaño de las microburbujas producidas por un difusor poroso (igual al utilizado en este trabajo), así como el k_{La} y la retención del gas, para tres impulsores diferentes en un medio de cultivo para células de insectos suplementado con un surfactante no iónico. Al utilizar una propela marina de flujo descendente (MA), se obtuvo un incremento en el valor del k_{La} en comparación con el obtenido al utilizar una turbina Rushton. El aspecto más relevante que reportaron los autores fue el hecho de que, al utilizar un difusor poroso de aire, el desempeño de la propela marina en términos de transferencia de oxígeno fue mucho mejor que el de la turbina Rushton, lo cual contrasta con lo que usualmente se argumenta en la literatura para operaciones unitarias de dispersión de gases en medios líquidos (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004). Los autores mencionan que las microburbujas producidas por los

difusores porosos no experimentan los mismos procesos de ruptura que las burbujas generadas por otros difusores comúnmente utilizados, por lo que el efecto de la turbina Rushton en términos de aumento del área superficial específica de las burbujas se vuelve menos importante. En contraste, los patrones de flujo producidos por impulsores de flujo axial descendente contrarrestan el flujo ascendente de las microburbujas, lo cual incrementa el tiempo de residencia de éstas en el volumen del biorreactor, y, por tanto, la retención del gas. Tomando en cuenta los resultados de esta sección, así como los de otros investigadores, se seleccionó la configuración MA – PI – RT para las pruebas posteriores en biorreactor.

3.5 DETERMINACIÓN DEL FLUJO DE AIRE EN EL BIORREACTOR DE 3 L

En los diseños estadísticos utilizados en esta sección, el supuesto de igualdad de varianzas se cumplió para el caso de la concentración de biomasa seca. En el caso del coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{LA}), el supuesto no se cumplió, por lo que el diseño estadístico se analizó mediante un ANOVA Welch, utilizando la prueba de comparación por parejas de Games-Howell. La normalidad de los residuos si se cumplió para ambas variables de respuesta, como se puede observar en el Cuadro 3.10.

Cuadro 3.10. Verificación de los supuestos estadísticos del ANOVA de un solo factor utilizado en la determinación del flujo de aire ($\alpha=0.05$).

Supuesto estadístico	Variable de respuesta	Valor del estadístico de prueba	Valor de p asociado	Decisión	Conclusión
Igualdad de varianzas	Concentración de biomasa seca	1.810	0.250	Se acepta la hipótesis nula	Hay igualdad de varianzas
	Coficiente de transferencia de masa	49.73	0.000	Se rechaza la hipótesis nula	No hay igualdad de varianzas
Normalidad de residuos	Concentración de biomasa seca	0.235	0.649	Se acepta la hipótesis nula	Hay normalidad de residuos
	Coficiente de transferencia de masa	0.152	0.931	Se acepta la hipótesis nula	Hay normalidad de residuos

La Figura 3.7 muestra los valores de concentración de biomasa seca y k_{La} para las pruebas de flujo de aire realizadas en el biorreactor tipo tanque agitado de 2.0 L, equipado con un difusor poroso de aire y tres impulsores (propela marina, paletas inclinadas y Rushton, de abajo hacia arriba). En el caso de la concentración de biomasa seca (barras negras) se observó que ambos tratamientos produjeron valores prácticamente iguales, mientras que, para el k_{La} se observó un ligero incremento al utilizar el flujo de aire más alto. Al realizar los análisis de comparación de parejas correspondientes ($\alpha=0.05$) se obtuvo que las diferencias entre las medias de ambos tratamientos, para las dos variables de respuesta estudiadas, no fueron estadísticamente significativas, lo cual sugiere que los valores de flujo de aire probados no afectaron el crecimiento del organismo ni la capacidad de oxigenación del sistema de cultivo.

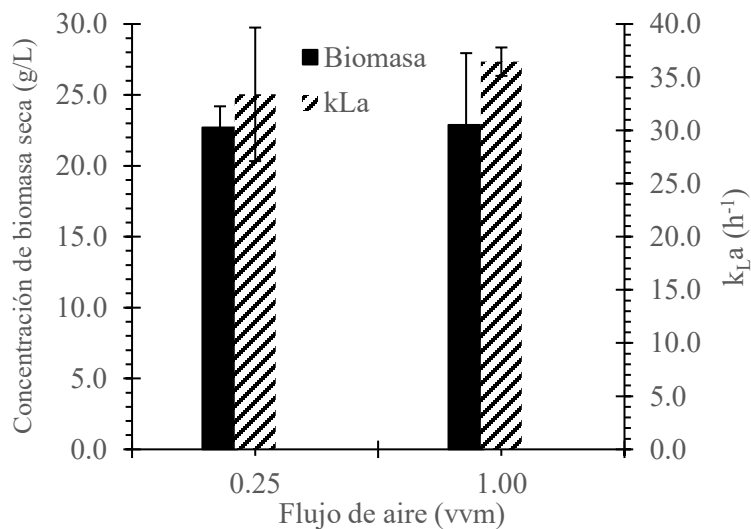


Figura 3.7. Concentración de biomasa seca obtenida a los 12 días, y coeficiente volumétrico de transferencia de masa del oxígeno (k_{La}) previo a inoculación, para los dos flujos de aire estudiados en el biorreactor tipo tanque agitado.

El efecto del flujo de aire sobre el crecimiento de biomasa de *Ganoderma sp.* en biorreactores tipo tanque agitado se ha estudiado previamente en la literatura. Tang y Zhong (2003) examinaron el efecto del k_{La} sobre la producción de biomasa, ácidos ganodéricos y polisacáridos en biorreactores de 3.5 L (volumen de trabajo), utilizando diferentes flujos de aire, con una velocidad de agitación constante (200 rpm, dos turbinas Rushton). La máxima concentración de biomasa seca obtenida por los autores fue de 15.62 g/L a los 8 días de cultivo, con un k_{La}

de 78.2 h^{-1} (0.5 vvm), sin embargo, dicho valor tendió a disminuir en los días posteriores hasta llegar a un valor de 11.3 g/L a los 15 días. Además, utilizando un flujo de aire de 1.0 vvm (96.0 h^{-1}) la producción de biomasa se mantuvo constante desde los 10 días aproximadamente, y tuvo un valor de 13.5 g/L . En comparación con lo reportado por los autores, la concentración de biomasa seca obtenida en este trabajo fue un 70% mayor, para el mismo flujo de aire (relativo al volumen de trabajo, vvm), a pesar de presentar un k_{La} casi 3 veces menor (96.0 h^{-1} vs 36.5 h^{-1}). Nuevamente, las múltiples diferencias en las condiciones de cultivo entre ambos trabajos dificultan la identificación de las razones que podrían explicar los comportamientos observados, sin embargo, los resultados parecieran sugerir que las diferencias encontradas no se debieron al suministro de oxígeno al sistema.

Por otro lado, Agudelo-Escobar, Gutiérrez-López y Urrego-Restrepo (2017) estudiaron el efecto de la velocidad de agitación, flujo de aire y pH sobre la concentración de biomasa seca y la concentración de exopolisacáridos en biorreactores de 4.0 L (volumen de trabajo) mediante un diseño estadístico de Box-Behnken. Los autores reportaron que tanto el pH como la velocidad de agitación tuvieron efectos estadísticamente significativos sobre la producción de biomasa de *Ganoderma sp.* en medio líquido, no así para el flujo de aire. La máxima concentración de biomasa seca se obtuvo utilizando un flujo de aire de 1.0 vvm , una velocidad de agitación de 200 rpm y un pH de 4.5 , sin embargo, su valor no se reportó explícitamente en el artículo. En su lugar, los autores reportaron la concentración de biomasa seca que se obtendría al utilizar las condiciones predichas a través de la optimización estadística del modelo de superficie de respuesta, la cual tendría un valor de 6.73 g/L . En comparación con dicho valor, los resultados de este trabajo fueron un 240% mayores. Los valores obtenidos en el artículo de referencia son inusualmente bajos para las condiciones de crecimiento utilizadas, es posible que esto se deba a la forma en la que los autores prepararon el medio de cultivo, la cual consistió en la disolución de todos los componentes en una sola mezcla, dentro del biorreactor, y su posterior esterilización. Un comportamiento similar se observó durante las primeras etapas de este proyecto, de ahí se procedió a esterilizar cada componente por aparte para luego mezclarlos de forma aséptica.

Sumado a lo anterior, Kim *et al* (2006) investigaron los efectos individuales de la velocidad de agitación y flujo de aire sobre el crecimiento de *G. resinaceum* y la producción de exopolisacáridos en cultivo sumergido empleando biorreactores de 3.0 L (volumen de trabajo) y una única turbina Rushton. En este caso la concentración de biomasa seca obtenida a los 15 días de cultivo, utilizando un flujo de aire de 0.5 vvm, fue mayor a la obtenida con un flujo de 1.0 vvm (18.5 g/L vs 17.9 g/L), aunque no se reportaron detalles sobre la significancia estadística de dichas diferencias. Comparando la concentración de biomasa seca obtenida por los autores a los 12 días de crecimiento y con un flujo de aire de 1.0 vvm (15.9 g/L) contra la obtenida en este trabajo, se observó una mejora de 44% con respecto al artículo de referencia. Una posible explicación de este resultado podría encontrarse en la composición del medio de cultivo, ya que es en esa variable en donde se presentaron las mayores diferencias entre los experimentos. El medio utilizado en el artículo careció de ciertas sales importantes como KH_2PO_4 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, así como de la presencia de tiamina, componentes comúnmente utilizados en la literatura consultada y que son necesarios para el crecimiento adecuado de los hongos (Kavanagh, 2011). Este hecho pudo haber afectado negativamente el crecimiento del hongo, aunque no es posible afirmarlo con total certeza ya que existen otras variantes entre ambos trabajos.

En contraste con los estudios revisados anteriormente, el incremento en el flujo de aire no ocasionó cambios en la concentración final de biomasa seca ni en el coeficiente de transferencia de masa del oxígeno en este trabajo. Con base en estos resultados, es lógico sugerir que el comportamiento de la concentración de biomasa podría explicarse a partir del comportamiento del k_{LA} ; al no presentarse una mejora en la capacidad de suministro de oxígeno del sistema, es esperable que no ocurrieran cambios en el crecimiento de un organismo estrictamente aeróbico. Este hecho pareciera ser inusual tomando en cuenta la utilización de un difusor poroso de aire. Después de probar múltiples combinaciones de impulsores y difusores, Rocha-Valadez, Galindo y Serrano-Carreón (2000) concluyeron que la combinación de un difusor poroso con un sistema híbrido de impulsores (turbina Rushton, inferior, y propela marina, superior) produjo el valor más alto de k_{LA} en cultivos de *T. harzianum* de cuatro fases (aire-medio acuoso-aceite-micelio sólido), empleando un biorreactor de 1.0 L a 29 °C, 200

rpm y 1.0 vvm . Por otra parte, Liu *et al* (2019) encontraron un k_{La} de 32.3 h^{-1} aproximadamente (valor obtenido mediante interpolación a partir de los datos reportados) a 350 rpm y 0.2 vvm utilizando un difusor poroso y dos turbinas Rushton, para un sistema agua-aire a 37°C y 1 atm en un biorreactor de 3.0 L. Dicho valor para el coeficiente de transferencia de masa se asemeja mucho al obtenido en este trabajo para condiciones similares.

Una posible explicación para el comportamiento del k_{La} ante el aumento del flujo de aire podría encontrarse en la configuración de impulsores utilizada. En comparación con impulsores como la turbina Rushton, ciertos impulsores de flujo axial presentan una menor capacidad para el manejo y dispersión de flujos de gas (Paul, Atiemo-Obeng, & Kresta, 2004). Posterior a una determinada velocidad superficial del gas, para una velocidad de agitación específica, se presentará una condición (régimen hidrodinámico) llamada *inundación*, la cual se caracteriza por un ascenso constante de las burbujas sin ser dispersadas por el impulsor (Paglianti, 2002). En la literatura se han reportado métodos para determinar el comienzo del fenómeno de inundación para diferentes configuraciones de impulsores; en particular, el trabajo de Montante y Paglianti (2015) es útil para verificar la presencia de inundación del impulsor inferior en esta investigación. Utilizando la correlación propuesta por los autores para un impulsor Lightnin A310 de flujo descendente, con un difusor poroso en un sistema agua-aire a temperatura ambiente, se obtuvieron los resultados mostrados en el Cuadro 3.11.

Cuadro 3.11. Número de flujo, número de Froude y número de Froude crítico de la propela marina (MA) para los flujos de aire probados en las fermentaciones en biorreactor.

Flujo de aire (vvm)	Número de flujo	Número de Froude	Número de Froude crítico	Condición de inundación
0.25	0.016	0.156	0.132	No
1.00	0.063	0.156	0.489	Si

En el cuadro anterior se reporta el número de Froude crítico, que tiene que ver con la velocidad de agitación mínima que se requiere para superar la condición de inundación en el sistema. Claramente se puede observar que para un flujo de aire de 1.0 vvm, el número de Froude crítico está muy por encima del número de Froude disponible en el sistema, lo cual implica que en dicho tratamiento se presentó el fenómeno de inundación del impulsor inferior

(propela marina). Además, a partir de la misma correlación fue posible calcular el flujo de aire máximo que se podría usar antes de que el impulsor se inundase para las condiciones de agitación utilizadas, el cual tuvo un valor de 0.30 vvm. Con base en lo anterior, se podría afirmar que el k_{LA} no se incrementó al utilizar un flujo de aire mayor (1.0 vvm) debido a que el flujo máximo (0.30 vvm) estuvo muy cerca del valor mínimo utilizado (0.25 vvm).

De la misma forma, otro aspecto importante que se debe mencionar fue la obstrucción del difusor de aire producto del crecimiento de biomasa sobre la superficie de este. Al culminar las fermentaciones, se observó un cúmulo de biomasa del organismo alrededor del difusor, cuya consistencia fue bastante compacta y difícil de remover. No fue posible determinar con certeza el momento en el cual se formó dicho cúmulo de biomasa, sin embargo, teniendo en cuenta que la concentración de oxígeno cayó a 0% antes de los cuatro días para todas las fermentaciones, es probable que éste creciera hasta un tamaño crítico durante los primeros días del cultivo. Además, es importante resaltar que la distribución de biomasa durante los últimos días del cultivo tendió a estar concentrada sobre el eje del motor y sobre las paredes del biorreactor, lo cual impidió la homogenización del medio a través de la agitación. Este comportamiento se ha reportado en la literatura anteriormente para cultivos sumergidos de hongos filamentosos, y constituye un problema que influye en la cuantificación de biomasa mediante muestreo, así como en el rendimiento de la fermentación (Papagianni, 2004).

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *Ganoderma sp.* en biorreactor al utilizar diferentes flujos de aire, la concentración de biomasa seca obtenida en este trabajo es similar a otros resultados reportados en la literatura para fermentaciones en modo batch, e inclusive en modo fed-batch. En el Cuadro 3.12 se muestran los valores de concentración de biomasa seca de diferentes artículos publicados recientemente, así como las condiciones utilizadas.

Cuadro 3.12. Concentración de biomasa seca de *Ganoderma sp.* obtenida en biorreactores tipo tanque agitado a escala de laboratorio.

Medio de cultivo (g/L) ^a	Condiciones de operación ^b	Configuración del biorreactor ^c	Modo de operación	Concentración de biomasa seca (g/L) ^d	Referencia
Glc 30, Pep 5, YE 5, KH ₂ PO ₄ 0.5, K ₂ HPO ₄ 0.5, MgSO ₄ 7H ₂ O 0.5, B1 0.05, OO 9.1	30 °C, pH 5.5, 0.5 g/L, 12 d	2 L, 350 rpm, 0.25 vvm, MA-PI6-RT, PS	Batch	22.6 (12 d)	Este trabajo
Glc 16, Pep 2.93, CF 20.93, SBP 6.44, KH ₂ PO ₄ 1.5, MgSO ₄ 7H ₂ O 1	30 °C, 2.0 g/L, 6 d	35 L, 125 rpm, 0.6 vvm	Batch	21.5 (5 d)	Xu, Ding, Qian, Zhao, & Zhang, (2008)
Glc 55, YE 14.3, KH ₂ PO ₄ 1, MgSO ₄ 7H ₂ O 0.26, Fe ₂ (SO ₄) ₃ 0.34, B1 0.05	30 °C, pH 5.5, 0.5 g/L, 12 d	7 L, 300 rpm, 1.0 vvm, RT-RT, RS	Batch	25.7 (12 d)	Wei <i>et al</i> , 2014
WB 200, YE 80	30 °C, pH 6.0, 14.7 g/L, 8 d	4 L, 200 rpm, 1.0 vvm, RT	Batch	28.2 (8 d) ^e	Salmon <i>et al</i> , 2016
Lac 35, Pep 5, YE 5, KH ₂ PO ₄ 1, MgSO ₄ 7H ₂ O 0.5, B1 0.05	30 °C, pH 5.5, pO ₂ 20-35%, 0.6 g/L, 22 d	2 L, 100-180 rpm, 0.25-0.5 vvm, RT-RT, RS	Fed batch	21.9 (12 d)	Tang & Zhong, 2002
Glc 35, Pep 5, YE 5, KH ₂ PO ₄ 1, MgSO ₄ 7H ₂ O 0.5	30 °C, pH 4.0, pO ₂ 20%, 0.5 g/L, 10 d	10 L, 300 rpm, 2.0 vvm (max)	Fed batch	26.6 (10 d)	Fazenda, Harvey, & McNeil (2010)
Lac 35, Pep 5, YE 5, KH ₂ PO ₄ 1, MgSO ₄ 7H ₂ O 0.5, B1 0.05	30 °C, pH 3.0-4.5, pO ₂ 25%-10%, 0.6 g/L, 18 d	5.5 L, 50-400 rpm, 0.1-0.7 vvm, RT-RT-PI4, RS	Fed batch	22.6 (12 d)	Tang, Zhang, Liu, Zhu & Zhong, 2011
Glc 25, Suc 20, YE 14, KH ₂ PO ₄ 1, MgSO ₄ 7H ₂ O 0.26, B1 0.05	30 °C, pH 5.5, 0.5 g/L, 10 d	7 L, 300 rpm, 1.0 vvm	Fed batch	29.7 (9 d)	Wei <i>et al</i> (2016)

^a Glc glucosa, Pep peptona, YE extracto de levadura, B1 tiamina, OO aceite de oliva, CF harina de maíz, SBP soya molida, WB salvado de trigo, Lac lactosa, Suc sacarosa.

^b La concentración corresponde al inóculo (biomasa seca). d días.

^c MA propela marina, PI6 turbina de 6 aspas inclinadas, RT turbina Rushton, PI4 turbina de 4 aspas inclinadas. PS difusor poroso, RS difusor de anillo.

^d Los números entre paréntesis corresponden al día en el cual se alcanzó la concentración de biomasa seca.

^e Valor estimado a partir del gráfico presentado por los autores.

En comparación con los valores obtenidos por Wei *et al* (2014) y Salmon *et al* (2016), el crecimiento encontrado en este trabajo fue menor, sin embargo, esto puede ser fácilmente explicado por la cantidad de sustrato utilizado por ambos grupos de investigación, la cual fue considerablemente mayor en ambos casos que la utilizada en este trabajo. En contraste, los resultados de esta investigación se asemejan mucho a los obtenidos por Tang y Zhong (2002), así como por Tang, Zhang, Liu, Zhu y Zhong (2011), quienes utilizaron un modo de operación fed-batch.

Tomando en consideración los resultados obtenidos en esta sección, así como su análisis y discusión correspondientes, se consideró que el flujo de aire de 0.25 vvm fue más adecuado para la producción de biomasa de *Ganoderma sp.* en biorreactores tipo tanque agitado. Esto debido a que, para dicho tratamiento, el régimen de dispersión de gas no estuvo en la región de inundación, por lo que la distribución del gas en el volumen del equipo fue más eficiente. Además, el uso de un flujo de aire más pequeño representaría un ahorro en los costos de compresión del aire ante un eventual escalamiento de la operación.

3.6 PROPUESTA DE ESCALAMIENTO A BIORREACTORES DE 70 L

Una vez definidas las condiciones de cultivo en biorreactor a escala de laboratorio (3 L), se procedió a examinar el efecto de diferentes criterios de escalamiento sobre múltiples parámetros relevantes en el proceso de fermentación de *Ganoderma sp.* en biorreactores a escala piloto (70 L, 50 L volumen de trabajo). Debido a limitaciones prácticas, el valor de los parámetros se estimó a partir de modelos matemáticos previamente reportados en la literatura. Esto quiere decir que, aunque las conclusiones deberán utilizarse con cautela, el análisis presentado en esta sección permitirá acotar las condiciones que deberán verificarse experimentalmente. En primera instancia, se calcularon los parámetros de interés para los casos A

y B, correspondientes a los flujos de aire de 0.25 vvm y 1.0 vvm, en el biorreactor de 3 L utilizado en la sección anterior. A pesar de que ya se había descartado el uso de un flujo de aire de 1.00 vvm, al no existir diferencias estadísticamente significativas en el efecto de esa variable, se consideró razonable probar ambos casos. Los resultados para el biorreactor de 3 L se muestran en el Cuadro 3.13.

Cuadro 3.13. Parámetros de operación para los casos A y B en el biorreactor de 3 L.

Parámetro	Unidades	Valor	
		Caso A	Caso B
Flujo de aire	L/min	0.50	2.00
Flujo específico de aire	vvm	0.25	1.00
Velocidad de agitación	rpm	350	350
Coefficiente de transferencia de masa	h^{-1}	33.39	36.46
Potencia volumétrica del motor con aireación	W/m^3	66.64	45.62
Velocidad de punta del impulsor	m/s	0.83	0.83
Número de Reynolds ($\times 10^{-4}$)	adim	1.48	1.48
Velocidad de corte	MA/PI	71.99	71.99
	RT	147.93	147.93
Tiempo de mezclado	s	5.39	3.42
Razón de mezclado-oxigenación	adim	20.01	28.91
Velocidad superficial del gas ($\times 10^4$)	m/s	6.28	25.11
Retención del gas ($\times 10^3$)	adim	7.17	14.90
Condición de inundación	adim	No	Si
Potencia eléctrica del motor	W	0.27	0.19
Potencia eléctrica del compresor	W	5.03	20.10
Potencia eléctrica total	W	5.30	20.29
Eficiencia de mezclado ($\times 10^3$)	J^{-1}	35.03	14.43
Eficiencia en la transferencia de oxígeno ($\times 10^4$)	J^{-1}	17.51	4.99

Al comparar los casos A y B en términos de potencia total consumida, eficiencia en el mezclado y eficiencia en la transferencia de oxígeno, se puede observar que el primero tuvo un menor consumo energético, y por tanto fue más eficiente en el uso de dicha energía para suministrar el oxígeno al sistema y para lograr una homogenización de los componentes en

el volumen del biorreactor. Otros parámetros importantes que deben analizarse son: el número de Reynolds y la razón de mezclado-oxigenación. Con respecto al número de Reynolds, se puede ver que para ambos casos su valor se encontró en el orden de 10^4 , lo cual quiere decir que el sistema operó en régimen turbulento. Este hecho es importante, puesto que las correlaciones utilizadas en esta sección son válidas para dicho régimen.

Por otra parte, la interpretación de la razón de mezclado-oxigenación se puede realizar de forma análoga a la del número de Damköhler, el cual tiene su aplicación en la ingeniería de las reacciones químicas. Este número adimensional expresa la razón entre la velocidad, o tiempo característico, de distintos fenómenos. En el caso de las reacciones químicas, suele expresar la razón de la velocidad de reacción con respecto a la velocidad de flujo de los reactivos, o con respecto a la velocidad de transferencia de masa hacia o desde otras fases (Fogler, 2008). De forma similar, la razón de mezclado-oxigenación expresa la relación entre el tiempo característico del transporte de oxígeno con respecto al tiempo de mezclado del sistema, y permite determinar si el suministro de oxígeno a las células estará controlado por la transferencia de masa o por las características hidrodinámicas del biorreactor (Pollard, y otros, 2007). Además, al comparar dichos tiempos, es posible verificar si la suposición de mezcla perfecta es válida para la descripción del proceso de transferencia de oxígeno. Para los casos probados en el biorreactor de 3 L, la razón de mezclado-oxigenación fue mayor a 1, lo cual indica que el tiempo característico para el transporte de oxígeno fue mayor al tiempo de mezclado, por lo que el suministro de oxígeno a las células del hongo estuvo controlado por el valor del $k_L a$. Sumado a esto, la suposición de mezcla perfecta fue válida para ambos casos, por lo que es posible asumir que la concentración de oxígeno fue homogénea en todo el sistema durante la determinación del valor del $k_L a$.

Los parámetros como potencia total consumida, así como las eficiencias de mezclado y transferencia de oxígeno, concuerdan con el análisis de la sección anterior, y representan otro aspecto a favor del caso A (0.25 vvm) para el escalamiento de la operación. Sin embargo,

debido a que los criterios de escalamiento afectan de forma diferente a cada una de las variables de interés, se realizó la comparación de escenarios para los dos casos. En el Cuadro 3.14 se puede observar el valor de cada parámetro para los diferentes escenarios examinados.

Cuadro 3.14. Parámetros de operación para cada escenario de escalamiento en el biorreactor de 50 L.

Parámetro		Valor para cada pareja de criterios de escalamiento					
		Caso A			Caso B		
		k_{LA} y $P_{G,V}$	k_{LA} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}	k_{LA} y $P_{G,V}$	k_{LA} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}
Flujo de aire		1.00	2.90	2.90	1.12	11.59	11.59
Flujo específico de aire		0.02	0.06	0.06	0.02	0.23	0.23
Velocidad de agitación		195	137	218	173	79	221
Coefficiente de transferencia de masa		45.33	45.33	85.05	40.54	40.54	160.65
Potencia volumétrica del motor con aireación		66.64	17.97	66.64	45.62	2.59	45.62
Velocidad de punta del impulsor	MA	0.91	0.64	1.02	0.81	0.37	1.03
	RT	1.17	0.82	1.30	1.03	0.47	1.32
Número de Reynolds ($\times 10^{-4}$)	MA	2.63	1.84	2.94	2.33	1.07	2.97
	RT	4.32	3.02	4.83	3.82	1.75	4.88
Velocidad de corte	MA	30.00	17.59	35.50	24.96	7.75	36.04
	RT	61.65	36.14	72.94	51.28	15.93	74.06
Tiempo de mezclado		17.37	12.32	12.28	16.78	7.77	7.76
Razón de mezclado-oxigenación		4.57	6.45	3.45	5.29	11.43	2.89
Velocidad superficial del gas ($\times 10^4$)		2.16	6.28	6.28	2.43	25.11	25.11
Retención del gas ($\times 10^3$)		3.51	4.39	6.81	3.33	5.43	14.19
Condición de inundación		No	Si	Si	Si	Si	Si
Potencia eléctrica del motor		4.76	1.28	4.76	3.26	0.19	3.26
Potencia eléctrica del compresor		10.03	29.13	29.13	11.30	116.53	116.53
Potencia eléctrica total		14.79	30.42	33.89	14.55	116.71	119.79
Eficiencia de mezclado ($\times 10^3$)		3.89	2.67	2.42	4.09	1.10	1.08
Eficiencia en la transferencia de oxígeno ($\times 10^4$)		8.51	4.14	6.97	7.74	0.97	3.73

En lo que respecta a la selección de los criterios de escalamiento, se tomaron en cuenta múltiples aspectos. En primer lugar, al considerar la relación entre la morfología, reología y crecimiento de *Ganoderma sp.* en medio líquido, se puede inferir que a medida que la fermentación progresa, el aumento en la viscosidad del sistema provocará limitaciones en la capacidad de oxigenación del equipo, y al tratarse de un organismo estrictamente aerobio, es muy probable que este factor sea el que controle la tasa de crecimiento y productividad del cultivo. Además, debido a las diferencias geométricas entre los biorreactores, así como en la cantidad de impulsores y tipo de difusor de aire, fue necesario que los criterios de escalamiento tomaran en cuenta dichos factores para poder estimar el comportamiento del biorreactor de 70 L de forma más certera. Por estas razones, se seleccionó el k_La como criterio de escalamiento principal. Sumado a este parámetro, fue necesario definir criterios adicionales puesto que el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de masa depende de más de un factor, y teniendo en cuenta que se debía definir el valor de dos variables (N y Q_G), se requería de al menos dos condiciones (criterios) independientes. Al observar el Cuadro 2.6, se puede notar que el modelo matemático utilizado para calcular el valor del k_La indica que éste es función de la potencia volumétrica por agitación, y de la velocidad superficial del gas. Por lo tanto, al fijar alguno de esos parámetros, además del k_La , sería posible contar con los criterios suficientes para definir los valores de la velocidad de agitación y el flujo de aire. Con el fin de explorar la mayor cantidad de escenarios posibles, se escogieron las tres posibles parejas de variables para calcular los parámetros mostrados en el Cuadro 3.14, esto tomando en cuenta que la mayoría de dichos parámetros dependen tanto de la velocidad de agitación como del flujo de aire.

Una forma conveniente de analizar los valores de los parámetros calculados es comparándolos contra los valores respectivos para el biorreactor de 3 L. Para facilitar la comparación, se calculó la razón del valor de cada parámetro en el Cuadro 3.14 con respecto al valor correspondiente en el Cuadro 3.13. En el Cuadro 3.15 se muestran los resultados para cada proporción.

Cuadro 3.15. Parámetros de operación para cada escenario de escalamiento en el biorreactor de 50 L, con respecto a los valores correspondientes en el biorreactor de 2 L.

Parámetro		Proporción entre los valores de cada parámetro a escala de 50 L con respecto a los valores a escala de 2 L					
		Caso A			Caso B		
		k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}	k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}
Flujo de aire		2.00	5.80	5.80	0.56	5.80	5.80
Flujo específico de aire		0.08	0.23	0.23	0.02	0.23	0.23
Velocidad de agitación		0.56	0.39	0.62	0.49	0.23	0.63
Coefficiente de transferencia de masa		1.36 ^a	1.36 ^a	2.55	1.11 ^a	1.11 ^a	4.41
Potencia volumétrica del motor con aireación		1.00	0.27	1.00	1.00	0.06	1.00
Velocidad de punta del impulsor	MA	1.10	0.77	1.23	0.98	0.45	1.25
	RT	1.41	0.99	1.58	1.25	0.57	1.60
Número de Reynolds ($\times 10^{-4}$)	MA	1.78	1.25	1.99	1.58	0.72	2.01
	RT	2.92	2.05	3.27	2.58	1.19	3.30
Velocidad de corte	MA	0.42	0.24	0.49	0.35	0.11	0.50
	RT	0.42	0.24	0.49	0.35	0.11	0.50
Tiempo de mezclado		3.22	2.29	2.26	4.91	2.28	2.27
Razón de mezclado-oxigenación		0.23	0.32	0.17	0.18	0.40	0.10
Velocidad superficial del gas ($\times 10^4$)		0.34	1.00	1.00	0.10	1.00	1.00
Retención del gas ($\times 10^3$)		0.49	0.61	0.95	0.22	0.36	0.95
Condición de inundación ^b		1	-1	-1	1	1	1
Potencia eléctrica del motor		25.00	6.74	25.00	25.00	1.42	25.00
Potencia eléctrica del compresor		2.00	5.80	5.80	0.56	5.80	5.80
Potencia eléctrica total		2.79	5.74	6.40	0.72	5.75	5.90
Eficiencia de mezclado ($\times 10^3$)		0.11	0.08	0.07	0.28	0.08	0.07
Eficiencia en la transferencia de oxígeno ($\times 10^4$)		0.49	0.24	0.40	1.55	0.19	0.75

^a Los parámetros señalados no tienen un valor de 1 debido a que se utilizó un factor de seguridad para el cálculo del k_{La} . En la sección de apéndices se detalla este procedimiento.

^b 1, la condición de inundación permaneció igual entre las escalas. -1, el sistema pasó de no estar en condición de inundación a si estarlo.

En primer lugar, es relevante mencionar los incrementos en las dimensiones del biorreactor y de los impulsores debido al escalamiento de la operación. El volumen de trabajo del equipo

tuvo un incremento de 25 veces, el cual se produjo por un aumento de 2.41 veces en el diámetro del tanque, y de 4.11 veces en la altura de este. Para los impulsores, el incremento en el diámetro de la propela marina fue de 1.98 veces, mientras que el de la turbina Rushton fue de 2.53 veces. Estos valores dejan claro que los criterios de similaridad geométrica no se mantuvieron constantes entre las escalas.

En lo que respecta al flujo de aire, se puede observar que en la mayoría de los escenarios éste tendió a incrementarse (exceptuando el primer escenario del caso B), mientras que la velocidad de agitación disminuyó para todos los escenarios. Este comportamiento es esperable debido al incremento en el diámetro del tanque y diámetro de los impulsores.

En el caso del número de Reynolds, prácticamente todos los escenarios condujeron a un incremento en este parámetro, sin embargo, el aspecto importante que se debe resaltar es que el sistema permanecería en régimen turbulento en cualquiera de los casos planteados. En cuanto al k_{LA} , en los escenarios en los cuales ese parámetro no se mantuvo constante, su valor se incrementó considerablemente. Esto parece sugerir que la potencia volumétrica y la velocidad superficial afectan de forma diferente a ambos biorreactores, lo cual podría tener su explicación en las diferencias geométricas, en la cantidad de impulsores y en el tipo de difusor. Por otra parte, la retención del gas tendió a disminuir para todos los escenarios, aunque aquellos en los cuales se utilizó la potencia volumétrica y la velocidad superficial como criterios de escalamiento, la reducción fue de apenas un 5%. En dichos escenarios, la explicación de esa disminución puede estar en el cálculo del número de potencia con aireación ($N_{P,G}$, Cuadro 2.6), el cual toma en cuenta el consumo de potencia por agitación en presencia del flujo de aire, para todo el conjunto de impulsores (Xie, y otros, 2014).

Para la potencia volumétrica y la velocidad superficial, en los escenarios en los cuales no se mantuvo constante alguno de esos criterios, estos tendieron a disminuir su valor con respecto al biorreactor de 2 L. Estos resultados son esperables al observar los cambios en la velocidad de agitación y flujo de aire para los escenarios respectivos, en donde se puede notar que para los casos en los que disminuyó la potencia volumétrica, también se registró un incremento

en el flujo de aire y una disminución en la velocidad de agitación. Por otro lado, en los escenarios en los que disminuyó la velocidad superficial, se registró una disminución en el flujo de aire en el primer escenario del caso B, mas no así en el primer escenario del caso A, en donde el flujo de aire aumentó. Esta excepción se puede justificar al considerar que el incremento en el flujo de aire no fue suficiente para compensar el aumento en el área transversal del biorreactor. Es importante resaltar que, en todos los escenarios probados la velocidad superficial se mantuvo por debajo del valor de transición hacia el régimen heterogéneo, el cual se encuentra en el orden de 10^{-2} m/s (Nauha, Visuri, Vermasvuori, & Alopaeus, 2014). Esto permite tener la certeza de que las correlaciones utilizadas permiten estimar de forma adecuada los valores de los parámetros de interés (Padron, 2016).

En lo que concierne a la velocidad de punta de los impulsores, el efecto de los criterios de escalamiento fue ligeramente distinto para ambos debido a la diferencia entre sus diámetros, sin embargo, en la mayoría de los casos la velocidad de punta tendió a incrementar moderadamente. Las excepciones para esta tendencia se dieron en los escenarios en los que se mantuvo constante el k_La y la velocidad superficial, especialmente para el caso B, en el cual la velocidad de punta se redujo cerca de un 50%. En la literatura, algunos autores han sugerido utilizar este parámetro como criterio de escalamiento para fermentaciones con microorganismos sensibles a fuerzas mecánicas, debido a que está relacionado con la velocidad y esfuerzo cortantes que experimentan las células sobre la superficie de los impulsores (Bohm, Hohl, Bliatsiou, & Kraume, 2019). Otro parámetro que ayuda a estimar el daño mecánico que podrían experimentar las células, es la velocidad de corte en la corriente de salida de los impulsores; en todos los escenarios generados, ésta se redujo de forma importante. La disminución más pronunciada se dio, de igual manera, para el segundo escenario del caso B, en donde la velocidad de corte en el biorreactor de 50 L fue un 11% del valor obtenido a escala de laboratorio. Este comportamiento opuesto, entre la velocidad de punta y la velocidad de corte, coincide con lo reportado por Wu, Graham, y Mehidi (2006) para diferentes impulsores radiales y axiales.

En cuanto al tiempo de mezclado, todos los escenarios presentaron incrementos considerables con respecto a los valores a escala de laboratorio. Estos resultados concuerdan con el

comportamiento que se ha reportado en la literatura, y precisamente constituye uno de los retos más importantes en los procesos de escalamiento. El aumento en el tiempo de mezclado ocasiona variaciones espaciales en los parámetros del sistema (concentración de oxígeno, sustrato, ácidos o bases, temperatura), lo cual conduce a la exposición de las células a entornos heterogéneos, alterando así su metabolismo (Takors, 2011). Sumado a esto, utilizar el tiempo de mezclado como criterio de escalamiento no es práctico a nivel industrial, debido a que el incremento en el consumo de potencia por agitación es excesivo (Xia, y otros, 2015). Un aspecto importante que se puede notar en el Cuadro 3.15 es que los aumentos más pronunciados en el tiempo de mezclado ocurrieron al utilizar el k_{La} y la potencia volumétrica como criterios de escalamiento, escenarios que coinciden con el consumo total de potencia más bajo. Este resultado es esperable de acuerdo con el modelo utilizado para calcular el tiempo de mezclado, el cual contiene un término asociado al suministro de energía por agitación y por aireación.

Con respecto a la razón de mezclado-oxigenación, esta tendió a disminuir para todas las combinaciones de criterios de escalamiento estudiadas, lo cual tiene su explicación en el aumento en el tiempo de mezclado para todos los escenarios. Esto quiere decir que a medida que se incrementa el volumen del biorreactor, los tiempos característicos de transferencia de oxígeno y de homogenización se vuelven más similares. Tomando en consideración que la viscosidad de los cultivos de hongos filamentosos en medio líquido tiende a aumentar con el tiempo, sería esperable que el sistema cambiase de régimen turbulento a régimen de transición (Núñez-Ramírez, y otros, 2012), lo que conllevaría a reducciones importantes en el k_{La} junto con aumentos en el tiempo de mezclado. Todos estos fenómenos conducirían eventualmente a la aparición de zonas anóxicas (sin oxígeno) dentro del volumen del líquido, especialmente en las regiones más alejadas del difusor de aire (Pollard, y otros, 2007), lo cual es particularmente perjudicial para organismos estrictamente aerobios, como lo es *Ganoderma sp.*

En lo que concierne a la inundación del impulsor inferior, en el Cuadro 3.14 se puede notar que únicamente el primer escenario del caso A no presentó esta condición; más aún, el se-

gundo y tercer escenario del caso A pasaron de estar en régimen de carga, a escala de laboratorio, a estar en régimen de inundación a escala piloto (-1, Cuadro 3.15). En términos generales, este comportamiento es esperado tomando en cuenta que en la mayoría de los escenarios se dieron aumentos en el flujo de aire y disminuciones en la velocidad de agitación. Inclusive, para el primer escenario del caso B, en donde se presentó una reducción en el flujo de aire, el régimen de inundación se mantuvo debido a que el efecto de la disminución en la velocidad de agitación fue más importante. Es importante resaltar que la escogencia de la propela marina como impulsor inferior del biorreactor contribuye a las limitaciones en las condiciones de operación accesibles para el bioproceso a escala piloto, esto debido a que dicho impulsor tiene una menor capacidad para dispersar gases en comparación con otros impulsores radiales o de flujo ascendente (Montante & Paglianti, 2015).

En cuanto a la potencia total consumida, cinco de los seis escenarios examinados presentaron incrementos importantes, excepto en el primero del caso B, en donde la potencia total fue solo el 72% de la consumida a escala de laboratorio. En términos de la potencia del motor, aquellos escenarios en los que se utilizó la potencia volumétrica como criterio de escalamiento se observó un aumento de 25 veces en el consumo energético por agitación, el cual coincidió con el incremento en el volumen del biorreactor. En los restantes, el aumento en la potencia por agitación fue mucho menor, llegando a ser de solo 42% en el segundo escenario del caso B; esto es esperable si se considera que para mantener el k_{La} y la velocidad superficial constantes, se debe reducir la potencia volumétrica. Por otra parte, al comparar los incrementos en la potencia del compresor contra aquellos para el flujo de aire, se observó que dichos aumentos fueron de la misma magnitud, de lo cual se puede inferir que los cambios observados en la potencia del compresor se debieron a los cambios en la cantidad de aire suministrado al sistema. Este hecho también explica la reducción en el consumo de potencia del compresor para el primer escenario del caso B. En términos absolutos (Cuadro 3.14), la mayor demanda de potencia del proceso se debió a la compresión del aire, la cual representó, en promedio, un 87% de la potencia total consumida. Lo anterior coincide con el hecho de que los escenarios que presentaron un menor consumo total de potencia fueron aquellos que

tuvieron los flujos de aire más bajos, aquellos obtenidos utilizando el k_{LA} y la potencia volumétrica como criterios de escalamiento.

Para evaluar el consumo energético de manera más completa, se debe analizar la eficiencia en la utilización de la energía suministrada al sistema. Las entradas de energía en un biorreactor tipo tanque agitado se dan en forma del trabajo de eje (agitación) y el trabajo por expansión del gas (aireación), y tienen como objetivo la homogenización del contenido del equipo y el suministro de oxígeno a las células (Alves & Vasconcelos, 1996). Por lo tanto, las eficiencias que se deben analizar son las de mezclado y transferencia de oxígeno. En el caso de la eficiencia de mezclado, en todos los escenarios se observó una reducción significativa de la misma, la cual tiene su explicación en los aumentos en el consumo de potencia y en el tiempo de mezclado. La disminución más baja se dio para el primer escenario del caso B, esto debido a que la potencia total fue menor a la consumida en el biorreactor de 2 L. De forma análoga, la eficiencia en la transferencia de oxígeno se vio disminuida con respecto a los valores obtenidos a escala de laboratorio, lo cual es esperable tomando en cuenta nuevamente los incrementos en la demanda de potencia. Sin embargo, el primer escenario del caso B sí mostró una mejora en la eficiencia de oxigenación, lo cual se debió al comportamiento particular de ese escenario en términos de consumo de energía. En términos absolutos, los escenarios generados al utilizar el k_{LA} y la potencia volumétrica como criterios de escalamiento mostraron las eficiencias más elevadas para el mezclado y el suministro de oxígeno. Tomando en cuenta que, para los dos casos probados, los escenarios mencionados anteriormente presentaron los tiempos de mezclado más altos y los valores de k_{LA} más bajos, las eficiencias obtenidas se justifican, nuevamente, por los bajos consumos de potencia total.

Después de haber analizado y comparado los parámetros calculados para cada escenario, es necesario seleccionar al menos dos condiciones de operación que deberán verificarse experimentalmente. La velocidad de agitación y el flujo de aire serán redondeados a sus valores enteros más próximos, esto tomando en consideración la precisión permitida por los instrumentos de control del equipo. En primera instancia, se propone verificar el primer escenario del caso A, el cual se denotará como A1. Este escenario mostró el segundo consumo de potencia total más bajo, además de ser el segundo más eficiente en cuanto al mezclado y el más

eficiente en cuanto a la transferencia de oxígeno. El k_{La} obtenido fue el tercero más elevado, y el sistema no se encontró en régimen de inundación; no obstante, este escenario presentó el tiempo de mezclado más alto y la segunda retención del gas más baja. La única modificación realizada a las condiciones de operación fue el aumento en la velocidad de agitación de 195 a 200 rpm. En segunda instancia, se sugiere probar el tercer escenario del caso A (A3), ajustado para evitar el régimen de inundación. Para este fin, se incrementó la velocidad de agitación de 218 a 250 rpm, redondeando el flujo de aire a 3.0 L/min. Bajo estas condiciones, se obtuvo la segunda retención del gas y k_{La} de mayor magnitud, así como el tercer tiempo de mezclado más bajo. Sin embargo, la razón de mezclado-oxigenación para este escenario fue la más baja de todas, por lo que es esperables que los gradientes de concentración de oxígeno aparezcan más pronto, en comparación con el caso A1. En cuanto al consumo de potencia y la eficiencia en su uso, este escenario presentó la tercera demanda de energía más elevada junto con la tercera eficiencia de mezclado más baja; no obstante, la eficiencia en la transferencia de oxígeno fue la segunda más elevada. Finalmente, en el Cuadro 3.16 se muestran las condiciones de operación para los dos escenarios propuestos, junto con los valores esperados para cada uno de los parámetros de interés.

Cuadro 3.16. Condiciones de operación y valores esperados para cada parámetro el biorreactor de 50 L.

Parámetro	Unidades	Valor para cada escenario	
		A1	A3
Flujo de aire	L/min	1.00	3.00
Flujo específico de aire	vvm	0.02	0.06
Velocidad de agitación	rpm	200	250
Coefficiente de transferencia de masa	h^{-1}	46.86	103.54
Potencia volumétrica del motor con aireación	W/m^3	71.20	96.25
Velocidad de punta del impulsor	MA	0.93	1.17
	RT	1.19	1.49
Número de Reynolds ($\times 10^{-4}$)	MA	2.69	3.37
	RT	4.42	5.52
Velocidad de corte	MA	31.10	43.46
	RT	63.90	89.30

Cuadro 3.16. (Continuación) Condiciones de operación y valores esperados para cada parámetro el biorreactor de 50 L.

Parámetro	Unidades	Valor para cada escenario	
		A1	A3
Tiempo de mezclado	s	17.34	12.11
Razón de mezclado-oxigenación	adim	4.43	2.87
Velocidad superficial del gas ($\times 10^4$)	m/s	2.17	6.50
Retención del gas ($\times 10^3$)	adim	3.57	7.58
Condición de inundación	adim	No	No
Potencia eléctrica del motor	W	5.09	6.88
Potencia eléctrica del compresor	W	10.05	30.15
Potencia eléctrica total	W	15.14	37.03
Eficiencia de mezclado ($\times 10^3$)	J ⁻¹	3.81	2.23
Eficiencia en la transferencia de oxígeno ($\times 10^4$)	J ⁻¹	8.60	7.77

Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones

1. El aceite de oliva y la tiamina tienen efectos positivos sobre la concentración final de biomasa seca de *Ganoderma sp.* en cultivos en medio líquido a nivel de matraz, produciendo, en conjunto, un incremento del 240% con respecto al medio comercial; en contraste, la combinación de cloruro de calcio y sulfato de cobre no tiene efectos significativos sobre esta variable ($\alpha = 0.05$).
2. La concentración del inóculo no presenta un efecto significativo sobre la concentración final de biomasa seca ni sobre el índice de crecimiento de *Ganoderma sp.* en cultivo sumergido a nivel de matraz ($\alpha = 0.05$).
3. La cinética de crecimiento de *Ganoderma sp.* en medio líquido a nivel de matraz no presenta una fase de adaptación observable, sin embargo, si es posible distinguir el inicio de la fase estacionaria a los 12 días de crecimiento. Además, la tasa específica de crecimiento del organismo es de $0.0087 \pm 0.0019 \text{ h}^{-1}$.
4. La configuración de impulsores MA-PI-RT (inferior-medio-superior) permite la distribución más homogénea de la biomasa de *Ganoderma sp.* en el biorreactor tipo tanque agitado de 3 L (2 L volumen de trabajo). Además, esta configuración facilita el movimiento de la materia en las zonas más importantes del equipo.
5. El flujo de aire no tiene efectos significativos sobre la concentración final de biomasa seca de *Ganoderma sp.* ni sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de masa del oxígeno (k_{La}) en el biorreactor tipo tanque agitado de 3 L (2 L volumen de trabajo) bajo la configuración y condiciones utilizadas.
6. El escalamiento del cultivo de *Ganoderma sp.* hacia biorreactores tipo tanque agitado de 70 L (50 L volumen de trabajo) se debe realizar utilizando el coeficiente volumétrico de transferencia de masa y la potencia volumétrica como criterios de escalamiento. Bajo estas condiciones, la velocidad de agitación debe ser 200 rpm y el flujo de aire de ser 1.0 L/min.
7. Para el cultivo de *Ganoderma sp.* en el biorreactor tipo tanque agitado de 3 L (2 L volumen de trabajo) se recomienda utilizar las siguientes condiciones de operación: medio de

cultivo C2, inóculo de 10 g/L de biomasa fresca con 8 días de crecimiento en matraz, una configuración de impulsores MA-PI-RT (inferior-medio-superior), una velocidad de agitación de 350 rpm y un flujo de aire de 0.25 vvm a 300 kPa. Otras condiciones de operación importantes son: 30 °C, pH inicial de 5.5, 100% oxígeno disuelto inicial y 12 días de cultivo.

8. Se recomienda verificar experimentalmente el desempeño de las condiciones de operación propuestas mediante los cálculos de escalamiento. Además, se recomienda probar también la combinación de 250 rpm y 3.0 L/min., manteniendo todas las otras condiciones de operación iguales a las del biorreactor de 3 L (2 L volumen de trabajo).
9. Para investigaciones posteriores, se recomienda estudiar el efecto de otros componentes del medio de cultivo que alteren factores como el pH, osmolaridad y tensión superficial.
10. De forma similar, se recomienda también estudiar el efecto de otras variables físicas como la temperatura y la exposición a la luz.
11. Se recomienda determinar las curvas de crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y producción de los metabolitos secundarios de interés para el cultivo sumergido de *Ganoderma sp.* en biorreactores tipo tanque agitado.
12. Para futuras investigaciones se recomienda probar otras configuraciones de impulsores y difusores de aire, como, por ejemplo: RT-MA-MA, RT-MA-RT o MA (ascendente)-RT-MA, todas utilizando un difusor de aire de anillo.
13. Asimismo, se recomienda estudiar con mayor profundidad el efecto de la velocidad de agitación y el flujo de aire sobre el crecimiento de *Ganoderma sp.* en biorreactores tipo tanque agitado, realizando más repeticiones para cada tratamiento.
14. Para propósitos de escalamiento, se recomienda determinar la relación entre la concentración de biomasa de *Ganoderma sp.* y la viscosidad del medio de cultivo, para las diferentes etapas de crecimiento del organismo.

Capítulo 5. Nomenclatura

Símbolo	Descripción	Unidades
a	Área superficial específica de las burbujas	m^{-1}
b, c, d, e	Parámetros de ajuste de los modelos para el k_{La} .	adimensional
$A_1, A_2, A_3, A_4,$ B_2, B_3, B_4, C_4	Parámetros de ajuste de los modelos para la cinética de crecimiento.	adimensional
$adim$	Adimensional.	adimensional
A_T	Área transversal del biorreactor.	m^2
C_j	Concentración del componente j.	mol/m^3
C_{O_2}	Concentración de oxígeno disuelto.	mol/m^3
$C_{O_2}^{sat}$	Concentración de oxígeno disuelto de saturación.	mol/m^3
d_{32}	Diámetro promedio de Sauter	m
D_i	Diámetro del impulsor.	m
d_k	Diámetro de la k-ésima burbuja.	m
D_T	Diámetro del biorreactor.	m
E_1, E_2, E_3	Parámetros de ajuste de los modelos para el factor de aireación.	adimensional
EM	Eficiencia de mezclado.	J^{-1}
ETO	Eficiencia en la transferencia de oxígeno.	J^{-1}
Fl	Número de flujo con aireación.	adimensional
$F_{P,G}$	Factor de aireación.	adimensional
Fr	Número de Froude.	adimensional
g	Aceleración de la gravedad.	m/s^2
H_T	Altura del líquido en el biorreactor.	m
IC	Índice de crecimiento.	adimensional
J	Cantidad de impulsores.	adimensional
K_i	Constante de cada impulsor para el modelo de la velocidad de corte.	adimensional
k_L	Coeficiente de transferencia de masa del oxígeno.	m/s
k_{La}	Coeficiente volumétrico de transferencia de masa del oxígeno.	h^{-1}
K_γ	Constante de Metzner y Otto para el impulsor.	adimensional
L_D	Ancho de las mamparas.	m
L_F	Distancia desde el fondo del tanque.	m
L_i	Espaciamiento entre impulsores.	m
m_L	Masa del líquido	g

m_w	Masa del agua	g
MM_G	Masa molar del gas (aire).	g/mol
N	Velocidad de agitación.	rpm
n	Factor de cantidad de cada impulsor para el modelo de la potencia del motor sin aireación.	adimensional
n_k	Cantidad de burbujas con un diámetro determinado.	adimensional
N_{O_2}	Velocidad interfacial de transferencia de oxígeno.	mol/s
N_p	Número de potencia de cada impulsor.	adimensional
$N_{P,G}$	Número de potencia con aireación para el sistema de impulsores.	adimensional
N_Q	Número de flujo de cada impulsor.	adimensional
P_1, P_2, P_3	Presión absoluta.	Pa
P_C	Potencia eléctrica del compresor.	W
$P_{E,M}$	Potencia eléctrica del motor con aireación.	W
$P_{G,V}$	Potencia volumétrica del motor con aireación.	W
P_M	Potencia mecánica del motor sin aireación.	W
P_V	Potencia volumétrica del motor sin aireación.	W
P_{tot}	Potencia eléctrica total.	W
q_{O_2}	Velocidad específica de consumo de oxígeno	g/g s
Q_G	Flujo del gas (aire).	m ³ /s
Q_L	Flujo del líquido.	m ³ /s
r_j	Velocidad de reacción del componente j.	mol/m ³ s
r_S	Velocidad de consumo del sustrato.	mol/m ³ s
R	Constante de gases ideales.	J/mol K
Re	Número de Reynolds.	adimensional
S	Concentración de sustrato.	mol/m ³
t	Tiempo.	s
T	Temperatura absoluta.	K
t_{95}	Tiempo de mezclado para una homogenización del 95%.	s
t_{ci}	Tiempo de circulación.	s
t_{O_2}	Tiempo característico de consumo de oxígeno.	s
t_{QG}	Tiempo característico de residencia del gas.	s
t_{GL}	Tiempo característico de residencia del líquido.	s
t_S	Tiempo característico de consumo del sustrato.	s
t_X	Tiempo característico de crecimiento de biomasa.	s

u_{sp}	Velocidad superficial del gas (aire).	m/s
V_G	Volumen del gas en el biorreactor.	m ³
V_L	Volumen del líquido en el biorreactor.	m ³
V_N	Volumen del líquido en el biorreactor dividido entre la cantidad de impulsores.	m ³
v_i	Velocidad de punta de los impulsores.	m/s
v_z	Velocidad del fluido en la dirección de "z".	m/s
vvm	Flujo específico del gas (aire), "volumen por volumen minuto".	min ⁻¹
w	Espesor de las aspas de los impulsores.	m
W_E	Potencia específica por expansión isotérmica del gas (aire).	J/kg
W_C	Potencia específica del compresor por compresión adiabática del gas (aire).	J/kg
X	Concentración de biomasa seca.	g/L
X_0	Concentración inicial de biomasa seca.	g/L
X_f	Concentración final de biomasa seca.	g/L
z	Distancia en una dirección en particular.	m

Letras griegas

β	Parámetro de ajuste para el modelo de inundación del impulsor.	adimensional
δ	Parámetro de ajuste para el modelo de inundación del impulsor.	adimensional
γ	Razón de capacidades caloríficas específicas para un gas ideal.	adimensional
γ^*	Razón de gamma.	adimensional
$\dot{\gamma}$	Velocidad de corte.	s ⁻¹
ε_G	Tasa específica de disipación de energía por expansión del gas (aire).	W/kg
ε_M	Tasa específica de disipación de energía por agitación.	W/kg
φ_C	Eficiencia del compresor.	adimensional
η_L	Viscosidad del líquido.	Pa s
φ_M	Eficiencia del motor.	adimensional
θ_{MO}	Razón de mezclado-oxigenación.	adimensional
μ	Tasa específica de crecimiento.	h ⁻¹
ρ_G	Densidad del gas (aire).	kg/m ³
ρ_L	Densidad del líquido.	kg/m ³
ρ_w	Densidad del agua	kg/m ³

τ	Esfuerzo cortante.	Pa
τ_{O_2}	Tiempo característico de transferencia de oxígeno.	s
φ_B	Eficiencia de bombeo.	adimensional
ϕ_G	Retención del gas (aire).	adimensional
Ψ_w	Potencial del agua.	MPa
Ψ_π	Potencial osmótico.	MPa
Ψ_m	Potencial de matriz.	MPa
Ψ_P	Potencial hidrostático.	MPa
Ψ_g	Potencial gravitacional.	MPa

Subíndices

0	Se refiere a la condición inicial, en el tiempo 0.
1	Se refiere a la condición atmosférica.
2	Se refiere a la condición de entrada del aire al biorreactor.
3	Se refiere a la condición del aire en el espacio del biorreactor que no contiene líquido.
32	Se refiere al diámetro promedio de Sauter.
95	Indica que el tiempo corresponde al necesario para lograr el 95% de la homogenización del contenido.
B	Se refiere al bombeo de fluido por parte de los impulsores.
C	Se refiere al compresor.
C_i	Se refiere al tiempo de circulación.
D	Se refiere a las mamparas.
E	Se refiere a la energía suministrada por la expansión del gas.
E,M	Se refiere a la potencia eléctrica del motor con aireación.
f	Se refiere a la condición final.
F	Se refiere al fondo del tanque.
g	Se refiere a gravitacional.
G	Se refiere a la fase gas.
G,V	Se refiere a la potencia volumétrica con aireación.
i	Se refiere a los impulsores.
j	Se refiere al componente j.
k	Se refiere a la k-ésima burbuja.
L	Se refiere a la fase líquida.
m	Se refiere a matriz.
M	Se refiere al motor (agitador).
MO	Indica mezclado-oxigenación.

<i>N</i>	Indica que el volumen de líquido por etapa, esto es, dividido entre la cantidad de impulsores.
<i>O₂</i>	Se refiere al oxígeno.
<i>P</i>	Se refiere a hidrostático.
<i>P,G</i>	Se refiere al factor de aireación.
<i>Q_G</i>	Se refiere al flujo del gas.
<i>Q_L</i>	Se refiere al flujo del líquido.
<i>S</i>	Se refiere al sustrato.
<i>sp</i>	Indica una propiedad superficial.
<i>T</i>	Se refiere al tanque del biorreactor.
<i>tot</i>	Indica el total.
<i>V</i>	Indica que la propiedad es por unidad de volumen.
<i>w</i>	Se refiere al agua.
<i>X</i>	Se refiere a la biomasa.
<i>z</i>	Se refiere a la dirección de “z”.
<i>γ</i>	Se refiere al esfuerzo cortante.
<i>π</i>	Se refiere a osmótico.

Superíndices

*	Se refiere a la razón gamma reducida.
·	Indica el gradiente de velocidad, o velocidad de corte.
<i>sat</i>	Se refiere al estado de saturación o equilibrio termodinámico.

Capítulo 6. Referencias

- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology*, 191-199.
- Agudelo-Escobar, L. M., & Gutiérrez-López, Y. U.-R. (2017). Effects of aeration, agitation and pH on the production of mycelial biomass and exopolysaccharide from the filamentous fungus *Ganoderma lucidum*. *DYNA*, 72-79.
- Alvarenga-Ventuolo, S., Salazar-Aguilar, T., Rosales-López, C., & Canessa-Amador, E. (2014). *Optimización del cultivo in vitro del hongo Ganoderma Lucidum (Curtis) P. Karst y determinación del efecto citotóxico sobre varias líneas de cáncer de importancia en Costa Rica*. Cartago: Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Alves, S., & Vasconcelos, J. (1996). Optimisation of agitation and aeration in fermenters. *Bioprocess Engineering*, 119-123.
- Amanullah, A., Buckland, B. C., & Nienow, A. W. (2004). Mixing in the Fermentation and Cell Culture Industries. En E. L. Paul, V. A. Atiemo-Obeng, & S. M. Kresta, *Handbook of Industrial Mixing. Science and Practice* (págs. 1071-1170). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Anastassiadis, S., Aivasidis, A., & Wandrey, C. (2002). Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81-87.
- Anaya-Durand, A., & Pedroza-Flores, H. (2008). Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 31-39.
- Applikon Biotechnology. (2004). *Bio Bundles 1-15 L (US Version) for Microbial Applications. Hardware & Installation Manual*. Schiedam: Applikon Biotechnology B.V.
- Applikon Biotechnology. (2008). *Hardware Manual: ez-Control for Autoclavable Bioreactor Systems 1-20 L*. Schiedam: Applikon Biotechnology B.V.
- Applikon Biotechnology. (2009). *Hardware Manual: ez-Control for In Situ Sterilizable Bioreactors*. Schiedam: Applikon Biotechnology B.V.
- Arenas, R. (2014). *Micología Médica Ilustrada*. México D.F.: McGraw-Hill Education.

- Asnaghi, M. A., Smith, T., Martin, I., & Wendt, D. (2015). Bioreactors: Enabling Technologies for Research and Manufacturing. En C. A. van Blitterswijk, & J. de Boer, *Tissue Engineering* (págs. 393-425). San Diego: Academic Press.
- Atlas, R. (2010). *Handbook of Microbiological Media*. Boca Raton: CRC Press.
- Avtonomova, A. V., Krasnopol'skaya, L. M., & Maksimov, V. N. (2006). Optimization of Nutrient Medium for Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. *Microbiology*, 148-153.
- Berovic, M., & Podgornik, B. B. (2019). Engineering Aspects of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) Biomass Submerged Cultivation in Bioreactors: A Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 253-265.
- Berovic, M., Habijanac, J., Zore, I., Wraber, B., Hodzar, D., Boh, B., & Pohleven, F. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, 77-86.
- Berovic, M., Habijanac, J., Zore, I., Wraber, B., Hodzar, D., Boh, B., & Pohleven, F. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma Lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, 77-86.
- Bohm, L., Hohl, L., Bliatsiou, C., & Kraume, M. (2019). Multiphase Stirred Tank Bioreactors – New Geometrical Concepts and Scale-up Approaches. *Chemie Ingenieur Technik*, 1724-1746.
- Buffo, M., Correa, L., Esperanca, M., Cruz, A., Farinas, C., & Badino, A. (2016). Influence of dual-impeller type and configuration on oxygen transfer, power consumption, and shear rate in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 130-139.
- Campos-Muñiz, C., Cuadra-Zelaya, T. E., Rodríguez-Esquivel, G., & Fernández, F. J. (2007). Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 88-98.
- Chain, E. B., Paladino, S., Callow, D. S., Ugolini, F., & van der Sluis, J. (1952). Studies on aeration - I. *Bulletin of the World Health Organization*, 73-97.
- Chang, M. Y., Tsai, G. J., & Houg, J. Y. (2006). Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme and Microbial Technology*, 407-414.
- Clarke, K. G. (2013). *Bioprocess Engineering. An introductory engineering and life science approach*. Reino Unido: Woodhead Publishing.

- Coulson, J. M., Richardson, J. F., Backhurst, J. R., & Harker, J. H. (1999). *Coulson & Richardson's Chemical Engineering. Fluid Flow, Heat Transfer and Mass Transfer*. Gran Bretaña: Butterworth-Heinemann.
- Cui, Y.-H., & Zhang, K.-C. (2011). Effect of metal ions on the growth and metabolites production of *Ganoderma lucidum* in submerged culture. *African Journal of Biotechnology*, 11983-11989.
- Curtis, H., Barnes, N. S., Schnek, A., & Massarini, A. (2008). *Biología*. Santiago de Chile: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Deacon, J. (2006). *Fungal Biology*. Malden: Blackwell Publishing.
- Demain, A., & Sánchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, 5-16.
- Doran, P. (2013). *Bioprocess Engineering Principles*. Londres: Academic Press Limited.
- Druzinec, D., Salzig, D., Kraume, M., & Czermak, P. (2015). Micro-bubble aeration inturbulent stirred bioreactors: Coalescence behavior in Pluronic F68 containing cell culture media. *Chemical Engineering Science*, 160-168.
- El-Enshasy, H. A. (2007). Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. En S.-T. Yang, *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. New Technologies and Applications* (págs. 225-261). Elsevier.
- Fang, Q.-H., & Zhong, J.-J. (2002). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 769-774.
- Fang, Q.-H., & Zhong, J.-J. (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, 61-65.
- Fang, Q.-H., Tang, Y.-J., & Zhong, J.-J. (2002). Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 1375-1379.
- Fazenda, M. L., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2010). Effects of Dissolved Oxygen on Fungal Morphology and Process Rheology During Fed-Batch Processing of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 844-851.
- Fei, Y., Li, N., Zhang, D.-H., & Xu, J.-W. (2019). Increased production of ganoderic acids by overexpression of homologous farnesyl diphosphate synthase and kinetic

- modeling of ganoderic acid production in *Ganoderma lucidum*. *Microbial Cell Factories*, 1-9.
- Feng, J., Feng, N., Zhang, J.-S., Yang, Y., Jia, W., & Lin, C.-C. (2016). A New Temperature Control Shifting Strategy for Enhanced Triterpene Production by *Ganoderma lucidum* G0119 Based on Submerged Liquid Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Feng, J., Zhang, J.-S., Jia, W., Yang, Y., Liu, F., & Lin, C.-C. (2014). An Unstructured Kinetic Model for the Improvement of Triterpenes Production by *Ganoderma lucidum* G0119 Based on Nitrogen Source Effect. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 727-732.
- Feng, J., Zhang, J.-Z., Feng, N., Yan, M.-Q., Yang, Y., Jia, W., & Lin, C.-C. (2017). A novel *Ganoderma lucidum* G0119 fermentation strategy for enhanced triterpenes production by statistical process optimization and addition of oleic acid. *Engineering in Life Sciences*, 430-439.
- Fogler, H. S. (2008). *Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas*. México: Pearson Education.
- Fujasová, M., Linek, V., & Moucha, T. (2007). Mass transfer correlations for multiple-impeller gas–liquid contactors. Analysis of the effect of axial dispersion in gas and liquid phases on “local” $k_L a$ values measured by the dynamic pressure method in individual stages of the vessel. *Chemical Engineering Science*, 1650-1669.
- García-Ochoa, F., & Gómez, E. (2009). Bioreactor scale up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 153-176.
- Geankoplis, C. J. (1998). *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. México: Compañía editorial continental .
- Gibbs, P., Seviour, R. J., & Schmid, F. (2000). Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17-48.
- Godia-Casablancas, F., López-Santín, J., Casas-Alvero, C., González-Anadón, G., Lafuente-Sancho, F., Montesinos-Seguí, J. L., . . . Roca-Bordello, E. (2005). *Ingeniería Bioquímica*. España: Editorial Síntesis.
- Godoy-Silva, R., Berdugo, C., & Chalmers, J. J. (2010). Aeration, Mixing and Hydrodynamics, Animal Cell Bioreactors. En M. C. Flickinger, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology* (págs. 1-27). John Wiley & Sons.

- Griffin, D. H. (1994). *Fungal Physiology*. Nueva York: Wiley-Liss.
- Guevara, V. (2015). *Producción de ácidos ganodéricos y beta-(1-3)-(1-6)-D-glucanos en el cultivo líquido sumergido de Ganoderma sp de interés medicinal en la industria alimenticia de Costa Rica*. Cartago: Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Hiltunen, J. K., Mursula, A. M., Rottensteiner, H., Wierenga, R. K., Kastaniotis, A. J., & Gurvitz, A. (2003). The biochemistry of peroxisomal L-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 35-64.
- Index Fungorum Partnership. (15 de Mayo de 2020). *Index Fungorum*. Obtenido de <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>
- Jayasinghe, C., Imtiaj, A., Hur, H., Lee, G. W., Lee, T. S., & Lee, U. Y. (2008). Favorable Culture Conditions for Mycelial Growth of Korean Wild Strains in *Ganoderma lucidum*. *Mycobiology*, 28-33.
- Ji, H.-F., Li, X.-J., & Zhang, H.-Y. (2009). Natural products and drug discovery. *EMBO reports*, 194-200.
- Jo, W.-S., Cho, Y.-J., Cho, D.-H., Park, S.-D., Yoo, Y.-B., & Seok, S.-J. (2009). Culture Conditions for the Mycelial Growth of *Ganoderma applanatum*. *The Korean Society of Mycology*, 94-102.
- Junker, B. H., Hesse, M., Burgess, B., Masurekar, P., Connors, N., & Seeley, A. (2004). Early Phase Process Scale-Up Challenges for Fungal and Filamentous Bacterial Cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 241-277.
- Kapoor, P., & Sharma, B. M. (2014). Studies on different growth parameters of *Ganoderma Lucidum*. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 1515-1524.
- Katoh, S., Horiuchi, J.-i., & Yoshida, F. (2015). *Biochemical Engineering. A Textbook for Engineers, Chemists and Biologists*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Kavanagh, K. (2011). *Fungi. Biology and Applications*. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 937-947.
- Kim, H. M., Kim, S. W., Hwang, H. J., Park, M. K., Mahmoud, Y. A.-G., Choi, J. W., & Yun, J. W. (2006). Influence of Agitation Intensity and Aeration Rate on Production of Antioxidative Exopolysaccharides from Submerged Mycelial Culture of *Ganoderma resinaceum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1240-1247.

- Kim, H. M., Park, M. K., & Yun, J. W. (2005). Culture pH Affects Exopolysaccharide Production in Submerged Mycelial Culture of *Ganoderma lucidum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 249-261.
- Kulkarni, A. A., & Joshi, J. B. (2005). Bubble Formation and Bubble Rise Velocity in Gas-Liquid Systems: A Review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 5873-5931.
- Ledesma-Amaro, R., Santos, M. A., Jiménez, A., & Revuelta, J. L. (2013). Microbial production of vitamins. En B. McNeil, D. Archer, I. Giavasis, & L. Harvey, *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals* (págs. 571-594). Woodhead Publishing.
- Lee Ventola, C. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 277-283.
- Lejeune, R., & Baron, G. V. (1998). Modeling the Exponential Growth of Filamentous Fungi During Batch Cultivation. *Biotechnology and Bioengineering*, 169-179.
- Liang, C., Tian, D., Liu, Y., Li, H., Zhu, J., Li, M., . . . Xia, J. (2019). Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 130-141.
- Lindskog, E. K. (2018). Upstream Bioprocessing: Basic Concepts. En G. Jagschies, E. Lindskog, K. Lacki, & P. Galliher, *Biopharmaceutical Processing. Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes* (págs. 97-110). Amsterdam: Elsevier.
- Liu, K., Phillips, J. R., Sun, X., Mohammad, S., Huhnke, R. L., & Atiyeh, H. K. (2019). Investigation and Modeling of Gas-Liquid Mass Transfer in a Sparged and Non-Sparged Continuous Stirred Tank Reactor with Potential Application in Syngas Fermentation. *Fermentation*, 1-19.
- Liu, S. (2013). *Bioprocess Engineering. Kinetics, Biosystems, Sustainability and Reactor Design*. España: Elsevier.
- Lloyd, A. L., Barnes, C. W., Held, B. W., Schink, M. J., Smith, M. E., Smith, J. A., & Blanchette, R. A. (2018). Elucidating "lucidum": Distinguishing the diverse laccate *Ganoderma* species of the United States. *PLoS ONE*, 1-31.
- Lu, J., He, R., Sun, P., Zhang, F., Linhardt, R. J., & Zhang, A. (2020). Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1-29.

- Lv, G.-p., Zhao, J., Duan, J.-a., Tang, Y.-p., & Li, S.-p. (2012). Comparison of sterols and fatty acids in two species of *Ganoderma*. *Chemistry Central Journal*, 1-8.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2012). *Brock. Biology of Microorganisms*. San Francisco: Pearson.
- Magelli, F., Montante, G., Pinelli, D., & Paglianti, A. (2013). Mixing time in high aspect ratio vessels stirred with multiple impellers. *Chemical Engineering Science*, 712-720.
- Mandenijs, C.-F., & Brundin, A. (2008). Review: Biocatalysts and Bioreactor Design. *Biotechnology Progress*, 1191-1203.
- McCabe, W. L., Smith, J. C., & Harriot, P. (2007). *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química*. México: McGraw Hill.
- Montante, G., & Paglianti, A. (2015). Gas Hold-up Distribution and Mixing Time in Gas-Liquid Stirred Tanks. *Chemical Engineering Journal*, 648-658.
- Muntha, P. (2016). Drug Discovery & Development - A Review. *Research and Reviews: Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 135-142.
- Najafpour, G. D. (2015). *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier.
- Naranjo-Montoya, J. D. (2014). *Caracterización morfológica y molecular del género Ganoderma en zonas protegidas y ciudades del Valle del Cauca*. Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
- Narkpransom, N., Guo, J.-H., Huang, T.-C., & Guu, Y.-K. (2012). The kinetic models for biomass and extracellular polysaccharide of *Ganoderma tsugae*. *Procedia APCBEE*, 7-11.
- Nauha, E. K., Visuri, O., Vermasvuori, R., & Alopaeus, V. (2014). A new simple approach for the scale-up of aerated stirred tanks. *Chemical Engineering Research and Design*, 1-42.
- Nie, S., Zhang, H., Li, W., & Xie, M. (2013). Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities. *Bioactive Carbohydrate and Dietary Fibre*, 10-20.
- Nielsen, J. (1992). Modelling the growth of filamentous fungi. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 187-223.
- Núñez-Ramírez, D. M., Valencia-López, J. J., Calderas, F., Solís-Soto, A., López-Miranda, J., Medrano-Roldán, H., & Medina-Torres, L. (2012). Mixing Analysis for a

- Fermentation Broth of the Fungus *Beauveria bassiana* under Different Hydrodynamic Conditions in a Bioreactor. *Chemical Engineering and Technology*, 1-9.
- Okonkowski, J., Kizer-Bentley, L., Listner, K., Robinson, D., & Chartrain, M. (2005). Development of a Robust, Versatile, and Scalable Inoculum Train for the Production of a DNA Vaccine. *Biotechnology Progress*, 1038-1047.
- Padron, G. A. (2016). *Heterogeneous Regime Transition in Gas-Liquid Mixing in a Stirred Tank*. Quebec: BHR Group.
- Paglianti, A. (2002). Simple Model to Evaluate Loading/Flooding Transition in Aerated Vessels Stirred by Rushton Disc Turbines. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 1-5.
- Paliya, B. S., Chaudhary, H. S., Verma, S., & Prasad, S. (2014). Optimization of fermentation media composition of *ganoderma lucidum* for improved production of antioxidant and antimicrobial compounds. *Pharmacognosy Communications*, 35-41.
- Palomares, L. A., & Ramírez, O. T. (2009). Bioreactor Scale Up. En M. C. Flickinger, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology* (págs. 1-20). John Wiley & Sons, Inc.
- Palomares, L. A., Lara, Á. R., & Ramírez, O. (2010). Bioreactor Scale Down. En M. Flickinger, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology* (págs. 1-12). John Wiley & Sons.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 189-259.
- Papinutti, L. (2010). Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *Bioresource Technology*, 1941-1946.
- Passioura, J. B. (1980). The Meaning of Matric Potential. *Journal of Experimental Botany*, 1161-1169.
- Paterson, R. R. (2006). *Ganoderma - A therapeutic fungal biofactory*. *Phytochemistry*, 1985-2001.
- Paul, E. L., Atiemo-Obeng, V. A., & Kresta, S. M. (2004). *Handbook of Industrial Mixing. Science and Practice*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. .
- Pereira, C. J., & Leib, T. M. (2008). Reactors. En D. W. Green, & R. H. Perry, *Perry's Chemical Engineers' Handbook* (págs. 2077-2137). New York: McGraw-Hill.

- Pieracci, J. P., Armando, J. W., Westoby, M., & Thommes, J. (2018). Industry Review of Cell Separation and Product Harvesting Methods. En G. Jagschies, E. Lindskog, K. Lacki, & P. Galliher, *Biopharmaceutical Processing. Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes* (págs. 165-206). Amsterdam: Elsevier.
- Pollard, D., Kirschner, T., Hunt, G., Tong, I.-T., Stieber, R., & Salmon, P. (2007). Scale Up of a Viscous Fungal Fermentation: Application of Scale-Up Criteria With Regime Analysis and Operating Boundary Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 307-317.
- Posch, A. E., Herwig, C., & Spadiut, O. (2013). Science-based bioprocess design for filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, 37-44.
- Quesada-Chanto, A. (2013). *Principios de Biotecnología Microbiana*. San José: Editorial UCR.
- Quirós-Fournier, J. P. (2014). *Determinación de modelos para la predicción de los coeficientes volumétricos de transferencia de masa (kLa) oxígeno-medio de cultivo en biorreactores tipo tanque agitado*. San José: Universidad de Costa Rica.
- Rocha-Valadez, J. A., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2000). Effect of the impeller-sparger configuration over *Trichoderma harzianum* growth in four-phases cultures under constant dissolved oxygen. *Bioprocess Engineering*, 403-410.
- Rodrigues, M. L. (2018). The Multifunctional Fungal Ergosterol. *American Society for Microbiology*, 1-5.
- Rosseburg, A., Fitschen, J., Wutz, J., Wucherpfennig, T., & Schluter, M. (2018). Hydrodynamic inhomogeneities in large scale stirred tanks - Influence on mixing time. *Chemical Engineering Science*, 1-25.
- Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., . . . Kirk, P. M. (2015). A Higher Level Classification of All Living Organisms. *PLOS ONE*, 1-60.
- Ruiz-Boyer, A., & Rodríguez-González, A. (2020). Lista preliminar de hongos (Ascomycota y Basidiomycota) y mixomicetos (Myxomycota) de la Isla del Coco, Puntarenas, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 33-56.
- Ruiz-Herrera, J., & Ortiz-Castellanos, L. (2019). Cell wall glucans of fungi. A review. *The Cell Surface*, 1-14.

- Salmon, D. N., Fendrich, R. C., Cruz, M. A., Weingartner-Montibeller, V., Vandenberghe, L. P., Soccol, C. R., & Rigon-Spier, M. (2016). Bioprocess for phytase production by *Ganoderma* sp. MR-56 in different types of bioreactors through submerged cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 288-297.
- Sánchez-Pérez, J., Rodríguez-Porcel, E., Casas-López, J., Fernández-Sevilla, J., & Chisti, Y. (2006). Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 1-5.
- Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Baghel, R. K., Prasad, G. B., & Bisen, P. S. (2009). *Ganoderma lucidum*: A Potent Pharmacological Macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 717-742.
- Schmidt, F. R. (2005). Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 425-435.
- Schnellbaecher, A., Binder, D., Bellmaine, S., & Zimmer, A. (2019). Vitamins in cell culture media: Stability and stabilization strategies. *Biotechnology and Bioengineering*, 1-19.
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering. Basic Concepts*. New Jersey: Prentice-Hall Inc.
- Sieblist, C., & Lubbert, A. (2010). Gas Holdup in Bioreactors. En M. C. Flickinger, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology* (págs. 1-8). John Wiley & Sons.
- Simonic, J., Stajic, M., Glamoclija, J., Vukojevic, J., Duletic-Lausevic, S., & Brceski, I. (2008). Optimization of Submerged Cultivation Conditions for Extra - and Intracellular Polysaccharide Production by Medicinal Ling Zhi or Reishi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllorphomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 351-360.
- Spadiut, O., Herwig, C., & Posch, A. (2013). Science-based bioprocess design for filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, 37-44.
- Spieß, A.-N., & Neumeyer, N. (2010). An evaluation of R2 as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach. *BMC Pharmacology*, 1-11.
- Stepuro, I. I., Piletskaya, T. P., Stepuro, V. I., & Maskevich, S. A. (1997). Thiamine oxidative transformations catalyzed by copper ions and ascorbic acid. *Biochemistry (Moscow)*, 1409-1414.

- Sweere, A. P., Luyben, K. C., & Kossen, N. W. (1987). Regime analysis and scale-down: tools to investigate the performance of bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 386-398.
- Takors, R. (2011). Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions. *Journal of Biotechnology*, 3-9.
- Tang, Y.-J., & Zhong, J.-J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 20-28.
- Tang, Y.-J., & Zhong, J.-J. (2003). Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 478-484.
- Tang, Y.-J., & Zhong, J.-J. (2004). Modeling the kinetics of cell growth and ganoderic acid production in liquid static cultures of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal*, 259-264.
- Tang, Y.-J., & Zhu, L.-W. (2010). Improvement of Ganoderic Acid and *Ganoderma* Polysaccharide Biosynthesis by *Ganoderma lucidum* Fermentation Under the Inducement of Cu^{2+} . *Biotechnology Progress*, 417-423.
- Tang, Y.-J., Zhang, W., Liu, R.-S., Zhu, L.-W., & Zhong, J.-J. (2011). Scale-up study on the fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for the hyperproduction of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides. *Process Biochemistry*, 404-408.
- Tisch, D., & Schmoll, M. (2010). Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1259-1277.
- Torres-López, A. M., Quintero-Díaz, J. C., & Atehortua-Garcés, L. (2011). Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 103-109.
- Vederas, J., & Li, J. (2009). Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*, 161-165.
- Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G. (2011). *Bioreaction Engineering Principles*. New York: Springer Science+Business Media.
- von Stockar, U. (2013). *Biothermodynamics. The Role of Thermodynamics in Biochemical Engineering*. Lausanne: EPFL Press.

- Wagner, R., Mitchell, D. A., Lanzi-Sasaki, Guilherme, & Lopes de Almeida-Amazonas, M. A. (2004). Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. *Journal of Biotechnology*, 153-164.
- Wang, S.-J., & Zhong, J.-J. (2007). Chapter 6. Bioreactor Engineering. En S.-T. Yang, *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (págs. 131-161). Elsevier.
- Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to Fungi*. New York: Cambridge University Press.
- Wei, Z.-h., Duan, Y.-y., Qian, Y.-q., Guo, X.-f., Li, Y.-j., Jin, S.-h., . . . Zhong, J.-J. (2014). Screening of *Ganoderma* strains with high polysaccharides and ganoderic acid contents and optimization of the fermentation medium by statistical methods. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1789-1797.
- Wei, Z.-h., Liu, L.-l., Guo, X.-f., Li, Y.-j., Hou, B.-c., Fan, Q.-l., . . . Zhong, J.-J. (2016). Sucrose fed-batch strategy enhanced biomass, polysaccharide, and ganoderic acids production in fermentation of *Ganoderma lucidum* 5.26. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37-44.
- Wu, J., Graham, L. J., & Mehidi, N. N. (2006). Estimation of agitator flow shear rate. *AIChE Journal*, 2323-2332.
- Xia, J., Wang, G., Lin, J., Wang, Y., Chu, J., Zhuang, Y., & Zhang, S. (2015). Advances and Practices of Bioprocess Scale-Up. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*.
- Xie, M., Xia, J., Zhou, Z., Chu, J., Zhuang, Y., & Zhang, S. (2014). Flow Pattern, Mixing, Gas Hold-Up and Mass Transfer Coefficient of Triple-Impeller Configurations in Stirred Tank Bioreactors. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 5941-5953.
- Xu, J.-W., Zhao, W., & Zhong, J.-J. (2010). Biotechnological production and application of ganoderic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 457-466.
- Xu, P., Ding, Z.-Y., Qian, Z., Zhao, C.-X., & Zhang, K.-C. (2008). Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme and Microbial Technology*, 325-331.
- Xu, Y.-N., & Zhong, J.-J. (2012). Impacts of calcium signal transduction on the fermentation production of antitumor ganoderic acids by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology Advances*, 1301-1308.

- Xu, Y.-N., Xia, X.-X., & Zhong, J.-J. (2014). Induction of ganoderic acid biosynthesis by Mn²⁺ in static liquid cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1-16.
- Yang, F.-C., & Liao, C.-B. (1998). The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry*, 547-553.
- Yang, F.-C., Ke, Y.-F., & Kuo, S.-S. (2000). Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 295-301.
- Yorulmaz, A., Erinc, H., & Tekin, A. (2013). Changes in Olive and Olive Oil Characteristics During Maturation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 647-658.
- Zapata, P. A., Rojas, D. F., Ramírez, D. A., Fernández, C., & Atehortúa, L. (2009). Effect of Different Light-Emitting Diodes on Mycelial Biomass Production of Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 93-99.
- Zárate-Cháves, C., Romero-Rodríguez, C., Niño-Arias, F., Robles-Camargo, J., Linares-Linares, M., Rodríguez-Bocanegra, X., & Gutiérrez-Rojas, I. (2013). Optimizing a culture medium for biomass and phenolic compounds production using *Ganoderma Lucidum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 215-223.
- Zhang, J.-G., Chen, X.-M., & He, X.-S. (2007). A Study on the Synthetic Characteristics of the Extracellular Polysaccharide (EPS) of *Ganoderma lucidum* Cultured in Batch Fermentation Using a Kinetic Model. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1065-1070.
- Zhang, W., & Tang, Y.-J. (2008). A Novel Three-Stage Light Irradiation Strategy in the Submerged Fermentation of Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* for the Efficient Production of Ganoderic Acid and *Ganoderma* Polysaccharides. *Biotechnology Progress*, 1249-1261.
- Zhang, W.-X., Tang, Y.-J., & Zhong, J.-J. (2010). Impact of oxygen level in gaseous phase on gene transcription and ganoderic acid biosynthesis in liquid static cultures of *Ganoderma lucidum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 683-690.
- Zhou, L.-W., Cao, Y., Wu, S.-H., Vlasák, J., Li, D.-W., Li, M.-J., & Dai, Y.-C. (2014). Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. *Phytochemistry*, 1-9.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 1875-1881.

Capítulo 7. Apéndice A. Datos Experimentales

Cuadro 7.1. Masa de la placa vacía, placa con muestra húmeda y placa con muestra seca, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de medios de cultivo.

Tratamiento	Muestra	Placa vacía (g)	Placa con muestra (g)	
			Húmeda	Seca
A	1	69.670	94.981	70.740
	2	73.554	99.798	74.565
	3	79.581	103.919	80.481
B	1	79.792	102.143	80.680
	2	69.454	97.680	70.503
	3	71.982	98.413	72.902
C	1	72.091	106.392	73.311
	2	80.852	117.676	82.110
	3	70.867	106.052	71.897
D	1	82.856	99.541	83.630
	2	68.147	84.100	68.859
	3	68.889	83.833	69.539
E	1	69.708	84.272	70.397
	2	82.347	93.930	82.938
	3	69.593	80.206	70.148
F	1	71.836	89.166	72.600
	2	72.756	88.819	73.471
	3	71.945	89.261	72.611
G	1	70.304	86.031	71.059
	2	73.268	90.685	74.117
	3	87.002	106.231	87.804
H	1	68.721	79.461	69.214
	2	79.788	95.712	80.542
	3	72.426	86.644	73.063

Cuadro 7.2. Masa de la placa vacía, placa con muestra húmeda y placa con muestra seca, a los 14 días, para las pruebas realizados con medio C suplementado y medio comercial PDB.

Tratamiento	Muestra	Placa vacía (g)	Placa con muestra (g)	
			Húmeda	Seca
C2	1	35.254	82.436	36.974
	2	47.246	93.358	48.711
	3	35.837	78.466	37.288
PDB	1	69.658	86.693	70.132
	2	85.562	100.566	86.004
	3	73.871	88.224	74.318

Cuadro 7.3. Masa de la placa vacía, placa con muestra húmeda y placa con muestra seca, del inóculo, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo (B.H. biomasa húmeda).

Concentración del inóculo (g B.H./L)	Muestra	Placa vacía (g)	Placa con muestra (g)	
			Húmeda	Seca
6.6	1	70.758	71.080	70.778
	2	81.609	81.959	81.630
	3	69.287	69.594	69.305
10.0	1	80.309	80.826	80.339
	2	69.833	70.382	69.861
	3	90.687	91.192	90.719
20.0	1	67.251	68.280	67.305
	2	73.829	74.858	73.881
	3	80.158	81.198	80.212

Cuadro 7.4. Masa del filtro vacío, filtro con muestra húmeda y filtro con muestra seca, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo.

Concentración del inóculo (g B.H./L)	Muestra	Filtro vacío (g)	Filtro con muestra (g)	
			Húmeda	Seca
6.6	1	0.584	8.061	1.428
	2	0.641	6.518	1.310
	3	0.597	21.582	1.673

Cuadro 7.4. (Continuación) Masa del filtro vacío, filtro con muestra húmeda y filtro con muestra seca, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo.

Concentración del inóculo (g B.H./L)	Muestra	Filtro vacío (g)	Filtro con muestra (g)	
			Húmeda	Seca
10.0	1	0.599	9.980	1.682
	2	0.605	10.153	1.640
	3	0.615	11.490	1.585
20.0	1	0.605	15.090	2.053
	2	0.601	10.100	1.728
	3	0.608	9.053	1.547

Cuadro 7.5. Masa de la placa o filtro vacío, con muestra húmeda y con muestra seca, con respecto al tiempo, para la cinética de crecimiento en matraz.

Tiempo (h)	Muestra	Placa/filtro vacío (g)	Placa/filtro con muestra (g)	
			Húmeda	Seca
0.0	1	69.312	69.815	69.343
	2	71.452	71.984	71.480
	3	71.325	71.818	71.351
48.0	1	0.657	2.860	1.005
	2	0.653	2.708	0.998
	3	0.622	2.524	0.950
93.0	1	0.638	2.832	0.941
	2	0.634	2.812	0.967
	3	0.674	2.848	1.006
142.5	1	0.629	4.104	1.124
	2	0.631	4.218	1.258
	3	0.615	4.271	1.170
189.0	1	0.657	6.731	1.375
	2	0.648	4.956	1.313
	3	0.625	4.204	1.176
238.0	1	0.639	8.531	1.378
	2	0.683	5.539	1.310
	3	0.624	11.210	1.308

Cuadro 7.5. (Continuación) Masa de la placa o filtro vacío, con muestra húmeda y con muestra seca, con respecto al tiempo, para la cinética de crecimiento en matraz.

Tiempo (h)	Muestra	Placa/filtro vacío (g)	Placa/filtro con muestra (g)	
			Húmeda	Seca
287.0	1	0.638	11.148	1.475
	2	0.665	17.025	1.470
	3	0.654	22.158	1.645
331.0	1	0.675	21.860	1.595
	2	0.676	20.612	1.594
	3	0.659	16.488	1.463

Cuadro 7.6. Masa de la placa vacía, con muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la primera réplica con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Placa/filtro vacío (g)	Placa/filtro con muestra (g)	
		Húmeda	Seca
1	74.137	92.067	75.622
2	70.027	126.410	73.936
3	70.393	118.346	73.545
4	69.514	126.585	73.119
5	70.750	138.214	74.315
6	70.191	135.182	73.238
7	70.093	131.993	72.476
8	69.351	134.565	72.466
9	72.148	143.398	75.792
10	72.953	137.317	76.020
11	82.867	155.022	86.311
12	70.309	137.203	73.461
13	82.476	147.746	85.979
14	71.004	101.719	72.519
15	68.216	76.371	69.306
16	72.515	105.388	74.428
17	70.009	133.084	72.268
18	70.511	110.544	71.845
19	73.928	93.467	74.471
20	70.181	79.767	71.428

Cuadro 7.7. Masa de la placa o filtro vacío, con muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Placa/filtro vacío (g)	Placa/filtro con muestra (g)	
		Húmeda	Seca
1	79.984	133.065	83.371
2	81.608	139.600	84.966
3	70.168	119.947	72.931
4	69.434	133.990	72.297
5	80.987	148.597	84.609
6	73.155	140.538	76.781
7	73.092	146.607	76.889
8	70.162	134.229	73.354
9	70.032	128.532	72.971
10	79.863	142.684	83.286
11	71.656	132.535	74.912
12	80.986	117.029	82.713
13	70.501	109.638	72.433
14	0.647	1.781	0.793
15	0.613	2.037	0.898
16	0.643	4.937	1.052
17	0.649	3.228	1.018
18	0.652	3.474	0.969
19	0.604	2.534	0.901
20	0.626	1.871	0.758
21	0.608	4.115	1.076
22	0.622	3.117	0.765
23	0.65	2.293	0.794
24	0.671	2.203	0.888
25	0.67	1.615	0.797
26	0.686	2.093	0.829
27	0.69	1.694	0.739

Cuadro 7.8. Masa de la placa vacía, con muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la primera réplica con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Placa/filtro vacío (g)	Placa/filtro con muestra (g)	
		Húmeda	Seca
1	69.558	128.651	73.723
2	70.512	133.488	74.715
3	70.032	125.089	74.027
4	84.998	148.458	89.844
5	74.825	139.689	79.664
6	70.460	91.952	71.888
7	80.855	144.730	84.228
8	70.695	130.909	73.552
9	77.975	146.206	81.738
10	69.861	116.871	72.806
11	69.558	71.689	69.984
12	70.355	71.900	70.479
13	73.111	75.548	73.602
14	69.293	70.745	69.588
15	70.944	72.350	71.133
16	84.797	86.304	84.923
17	82.182	82.911	82.246

Cuadro 7.9. Masa de la placa o filtro vacío, con muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Placa/filtro vacío (g)	Placa/filtro con muestra (g)	
		Húmeda	Seca
1	69.917	134.664	72.923
2	70.842	134.336	74.015
3	82.345	144.648	85.364
4	71.647	139.662	75.069
5	81.375	140.108	84.353
6	82.901	151.285	86.381
7	73.361	130.796	76.466
8	84.915	145.763	88.164

Cuadro 7.9. (Continuación) Masa de la placa o filtro vacío, con muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Placa/filtro vacío (g)	Placa/filtro con muestra (g)	
		Húmeda	Seca
9	82.660	145.483	86.036
10	68.970	128.466	72.174
11	71.766	134.659	75.298
12	70.354	139.325	74.156
13	73.111	140.060	76.868
14	69.293	133.473	72.866
15	71.588	131.232	75.004
16	84.795	105.072	85.967
17	82.179	107.011	83.149
18	0.683	1.680	0.734
19	0.658	1.728	0.743
20	0.661	1.633	0.790
21	0.667	1.608	0.702
22	0.685	1.86	0.786

Cuadro 7.10. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la primera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm.

Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)
0	0.0	80	71.9	200	85.8
10	5.5	90	79.2	210	89.7
20	16.6	100	79.8	220	92.0
30	47.8	150	81.9	260	92.7
40	53.6	170	82.5	270	94.2
50	71.0	180	84.0	280	94.2
60	71.6	190	85.1	290	94.0

Cuadro 7.11. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm.

Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)
0	0.0	110	73.5	200	87.6
10	4.9	120	71.6	210	94.2

Cuadro 7.11. (Continuación) Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm.

Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)
30	25.2	130	73.6	220	96.5
40	28.2	140	77.3	230	95.7
50	40.1	150	79.8	240	92.9
60	48.3	160	80.9	250	94.2
70	53.7	170	84.3	260	93.1
80	64.6	180	88.0	270	92.7
90	71.5	190	88.3	280	92.6

Cuadro 7.12. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm.

Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)
0	0.0	100	72.8	200	88.6
10	4.7	110	73.9	210	90.0
20	19.0	120	75.7	220	90.0
30	29.1	150	82.0	230	90.4
40	36.0	160	85.1	240	93.0
50	40.4	170	84.8	250	93.7
60	55.4	180	87.4	260	93.4
80	62.7	190	90.0	270	93.4

Cuadro 7.13. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la cuarta repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm.

Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)
0	0.0	120	71.0	210	84.1
10	7.1	130	73.8	220	85.2
20	12.7	140	74.5	230	86.2
30	19.9	150	75.0	240	86.7
40	30.1	160	77.7	250	87.2
50	45.1	170	79.5	260	89.2
90	64.7	180	81.0	270	89.7
100	66.9	190	83.5	280	93.2
110	71.1	200	84.0		

Cuadro 7.14. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la primera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)
0	0.0	100	62.3	210	88.8
10	6.8	110	65.8	220	90.1
20	18.9	120	73.6	230	90.2
30	29.5	130	78.0	240	91.1
40	35.3	140	81.1	250	92.1
50	47.6	170	81.4	260	93.4
60	51.0	180	82.5	270	94.7
70	57.3	190	84.0	280	95.7
90	58.2	200	86.1		

Cuadro 7.15. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)
0	0.0	100	63.8	200	87.9
10	54.3	110	68.0	210	88.5
20	34.6	120	70.9	220	89.2
30	30.9	130	71.8	230	91.5
40	45.8	140	73.9	240	92.1
50	49.1	150	75.9	250	94.1
60	50.3	160	80.1	260	93.8
70	52.4	170	83.9	270	94.1
80	57.1	180	86.7	280	94.7
90	60.6	190	87.3	290	96.5

Cuadro 7.16. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)
0	0.0	100	66.5	200	86.3
10	8.2	110	72.5	210	87.1
20	14.1	120	74.1	220	88.4
30	18.9	130	76.1	230	90.1
40	25.3	140	77.7	240	93.0
50	34.3	150	81.4	250	93.3

Cuadro 7.16. (Continuación) Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)
60	41.7	160	79.7	260	95.0
70	48.7	170	80.4	270	94.3
80	56.4	180	82.7		
90	61.3	190	86.6		

Cuadro 7.17. Porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo para la cuarta repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)	Tiempo (s)	pO ₂ (%)
0	0.0	80	49.1	210	87.5
10	1.7	90	53.6	220	87.2
20	5.3	100	57.3	230	87.7
30	12.1	110	61.2	240	88.6
40	28.8	120	65.4	250	89.7
50	32.5	130	73.6	260	91.5
60	36.7	140	76.1	270	94.4
70	42.9	150	77.8	280	94.6

Cuadro 7.18. Masa del picnómetro vacío, con agua y con medio de cultivo para las tres réplicas realizadas en la medición de la densidad del medio de cultivo.

Repetición	Masa del picnómetro (g)		
	Vacío	Con agua	Con medio de cultivo
1	27.6886	37.4942	37.6475
2	28.8004	38.5932	38.7456
3	28.8007	38.5926	38.7493

Cuadro 7.19. Tiempo de vaciado del bulbo del viscosímetro de Ostwald para las cuatro repeticiones realizadas en la medición de la viscosidad del medio de cultivo.

Repetición	Tiempo de vaciado (s)
1	109.68
2	106.47
3	110.30
4	116.01

Capítulo 8. Apéndice B. Resultados intermedios

Cuadro 8.1. Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de medios de cultivo.

Tratamiento	Muestra	Masa de la muestra (g)		Concentración de biomasa seca (g/L)	
		Húmeda	Seca	Muestra	Promedio
A	1	25.311	1.070	21.400	19.873
	2	26.244	1.011	20.220	
	3	24.338	0.900	18.000	
B	1	22.351	0.888	17.756	19.047
	2	28.226	1.049	20.985	
	3	26.431	0.920	18.400	
C	1	34.301	1.220	24.400	23.387
	2	36.824	1.258	25.160	
	3	35.185	1.030	20.600	
D	1	16.685	0.774	15.480	14.240
	2	15.953	0.712	14.240	
	3	14.944	0.650	13.000	
E	1	14.564	0.689	13.780	12.233
	2	11.583	0.591	11.820	
	3	10.613	0.555	11.100	
F	1	17.330	0.764	15.280	14.300
	2	16.063	0.715	14.300	
	3	17.316	0.666	13.320	
G	1	15.727	0.755	15.100	16.040
	2	17.417	0.849	16.980	
	3	19.229	0.802	16.040	
H	1	10.740	0.493	9.860	12.560
	2	15.924	0.754	15.080	
	3	14.218	0.637	12.740	

Cuadro 8.2. Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, a los 14 días, para para las pruebas realizados con medio C suplementado y medio comercial PDB.

Tratamiento	Muestra	Masa de la muestra (g)		Concentración de biomasa seca (g/L)	
		Húmeda	Seca	Muestra	Promedio
C2	1	47.182	1.720	34.400	30.907
	2	46.112	1.465	29.300	
	3	42.629	1.451	29.020	
PDB	1	17.035	0.474	9.480	9.087
	2	15.004	0.442	8.840	
	3	14.353	0.447	8.940	

Cuadro 8.3. Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, del inóculo, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo.

Concentración del inóculo (g B.H./L)	Muestra	Masa de la muestra (g)		Concentración de biomasa seca (g/L)	
		Húmeda	Seca	Muestra	Promedio
6.6	1	0.322	0.020	0.410	0.397
	2	0.350	0.021	0.415	
	3	0.307	0.018	0.365	
10.0	1	0.517	0.030	0.600	0.599
	2	0.549	0.028	0.565	
	3	0.505	0.032	0.634	
20.0	1	1.029	0.054	1.088	1.072
	2	1.029	0.052	1.050	
	3	1.040	0.054	1.077	

Cuadro 8.4. Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo.

Concentración del inóculo (g B.H./L)	Muestra	Masa de la muestra (g)		Concentración de biomasa seca (g/L)	
		Húmeda	Seca	Muestra	Promedio
6.6	1	7.477	0.844	16.880	17.260
	2	5.877	0.669	13.380	
	3	20.985	1.076	21.520	

Cuadro 8.4. (Continuación) Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo.

Concentración del inóculo (g B.H./L)	Muestra	Masa de la muestra (g)		Concentración de biomasa seca (g/L)	
		Húmeda	Seca	Muestra	Promedio
10.0	1	9.381	1.083	21.660	20.587
	2	9.548	1.035	20.700	
	3	10.875	0.970	19.400	
20.0	1	14.485	1.448	28.960	23.427
	2	9.499	1.127	22.540	
	3	8.445	0.939	18.780	

Cuadro 8.5. Índice de crecimiento de cada réplica, y promedio, a los 14 días, para cada tratamiento realizado en la prueba de concentración de inóculo.

Concentración del inóculo (g B.H./L)	Muestra	Índice de crecimiento	
		Muestra	Promedio
6.6	1	40.177	43.104
	2	31.252	
	3	57.883	
10.0	1	35.123	33.466
	2	35.659	
	3	29.616	
20.0	1	25.607	20.840
	2	20.476	
	3	16.439	

Cuadro 8.6. Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, con respecto al tiempo, para la cinética de crecimiento en matraz.

Tiempo (h)	Muestra	Masa de la muestra (g)		Concentración de biomasa seca (g/L)	
		Húmeda	Seca	Muestra	Promedio
0.0	1	0.503	0.031	0.620	0.567
	2	0.532	0.028	0.560	
	3	0.493	0.026	0.520	

Cuadro 8.6. (Continuación) Masa de la muestra húmeda, muestra seca, concentración de biomasa seca de la muestra, y promedio, con respecto al tiempo, para la cinética de crecimiento en matraz.

Tiempo (h)	Muestra	Masa de la muestra (g)		Concentración de biomasa seca (g/L)	
		Húmeda	Seca	Muestra	Promedio
48.0	1	2.203	0.348	6.960	6.807
	2	2.055	0.345	6.900	
	3	1.902	0.328	6.560	
93.0	1	2.194	0.303	6.060	6.453
	2	2.178	0.333	6.660	
	3	2.174	0.332	6.640	
142.5	1	3.475	0.495	9.900	11.180
	2	3.587	0.627	12.540	
	3	3.656	0.555	11.100	
189.0	1	6.074	0.718	14.360	12.893
	2	4.308	0.665	13.300	
	3	3.579	0.551	11.020	
238.0	1	7.892	0.739	14.780	13.667
	2	4.856	0.627	12.540	
	3	10.586	0.684	13.680	
287.0	1	10.510	0.837	16.740	17.553
	2	16.360	0.805	16.100	
	3	21.504	0.991	19.820	
331.0	1	21.185	0.920	18.400	17.613
	2	19.936	0.918	18.360	
	3	15.829	0.804	16.080	

Cuadro 8.7. Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la primera réplica de la corrida con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Masa de la muestra (g)	
	Húmeda	Seca
1	17.930	1.485
2	56.383	3.909
3	47.953	3.152
4	57.071	3.605
5	67.464	3.565

Cuadro 8.7. (Continuación) Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la primera réplica de la corrida con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Masa de la muestra (g)	
	Húmeda	Seca
6	64.991	3.047
7	61.900	2.383
8	65.214	3.115
9	71.250	3.644
10	64.364	3.067
11	72.155	3.444
12	66.894	3.152
13	65.270	3.503
14	30.715	1.515
15	8.155	1.090
16	32.873	1.913
17	63.075	2.259
18	40.033	1.334
19	19.539	0.543
20	9.586	1.247
Total	982.815	50.972

Cuadro 8.8. Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica de la corrida con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Masa de la muestra (g)	
	Húmeda	Seca
1	53.081	3.387
2	57.992	3.358
3	49.779	2.763
4	64.556	2.863
5	67.610	3.622
6	67.383	3.626
7	73.515	3.797
8	64.067	3.192
9	58.500	2.939
10	62.821	3.423

Cuadro 8.8. (Continuación) Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica de la corrida con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Masa de la muestra (g)	
	Húmeda	Seca
11	60.879	3.256
12	36.043	1.727
13	39.137	1.932
14	1.134	0.146
15	1.424	0.285
16	4.294	0.409
17	2.579	0.369
18	2.822	0.317
19	1.930	0.297
20	1.245	0.132
21	3.507	0.468
22	2.495	0.143
23	1.643	0.144
24	1.532	0.217
25	0.945	0.127
26	1.407	0.143
27	1.004	0.049
Total	783.324	43.131

Cuadro 8.9. Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la primera réplica de la corrida con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Masa de la muestra (g)	
	Húmeda	Seca
1	59.093	4.165
2	62.976	4.203
3	55.057	3.995
4	63.460	4.846
5	64.864	4.839
6	21.492	1.428
7	63.875	3.373

Cuadro 8.9. (Continuación) Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la primera réplica de la corrida con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Masa de la muestra (g)	
	Húmeda	Seca
8	60.214	2.857
9	68.231	3.763
10	47.010	2.945
11	2.131	0.426
12	1.545	0.124
13	2.437	0.491
14	1.452	0.295
15	1.406	0.189
16	1.507	0.126
17	0.729	0.064
Total	577.479	38.129

Cuadro 8.10. Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica de la corrida con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Masa de la muestra (g)	
	Húmeda	Seca
1	64.747	3.006
2	63.494	3.173
3	62.303	3.019
4	68.015	3.422
5	58.733	2.978
6	68.384	3.480
7	57.435	3.105
8	60.848	3.249
9	62.823	3.376
10	59.496	3.204
11	62.893	3.532
12	68.971	3.802
13	66.949	3.757
14	64.180	3.573

Cuadro 8.10. (Continuación) Masa de la muestra húmeda y muestra seca, a los 12 días, para la segunda réplica de la corrida con un flujo de aire de 1.00 vvm en el biorreactor de 3 L.

Placa/filtro N°	Masa de la muestra (g)	
	Húmeda	Seca
15	59.644	3.416
16	20.277	1.172
17	24.832	0.970
18	0.997	0.051
19	1.070	0.085
20	0.972	0.129
21	0.941	0.035
22	1.175	0.101
Total	999.179	52.635

Cuadro 8.11. Biomasa seca neta, volumen neto y concentración de biomasa seca, a los 12 días, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.

Parámetro		Flujo de aire (vvm)			
		0.25		1.00	
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
Masa (g)	Biomasa seca total	50.972	43.131	38.129	52.635
	Filtros secos	3.605	0.000	0.000	0.000
	Biomasa seca neta	47.367	43.131	38.129	52.635
Volumen (L)	Inicial	2.000	2.000	2.000	2.000
	Pérdidas por muestreo o evaporación	0.006	0.005	0.025	0.011
	Volumen final neto	1.994	1.995	1.975	1.989
Concentración de biomasa seca (g/L)	Réplica	23.755	21.620	19.306	26.463
	Promedio	22.687		22.884	

Cuadro 8.12. $-\ln(1-OD)^*$ con respecto al tiempo para la primera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm ($OD = pO_2/100$).

Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$
0.0000	0.0000	0.0222	1.2694	0.0556	1.9519
0.0028	0.0566	0.0250	1.5702	0.0583	2.2730
0.0056	0.1815	0.0278	1.5995	0.0611	2.5257
0.0083	0.6501	0.0417	1.7093	0.0722	2.6173
0.0111	0.7679	0.0472	1.7430	0.0750	2.8473
0.0139	1.2379	0.0500	1.8326	0.0778	2.8473
0.0167	1.2588	0.0528	1.9038	0.0806	2.8134

Cuadro 8.13. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm.

Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$
0.0000	0.0000	0.0306	1.3280	0.0556	2.0875
0.0028	0.0502	0.0333	1.2588	0.0583	2.8473
0.0083	0.2904	0.0361	1.3318	0.0611	3.3524
0.0111	0.3313	0.0389	1.4828	0.0639	3.1466
0.0139	0.5125	0.0417	1.5995	0.0667	2.6451
0.0167	0.6597	0.0444	1.6555	0.0694	2.8473
0.0194	0.7700	0.0472	1.8515	0.0722	2.6736
0.0222	1.0385	0.0500	2.1203	0.0750	2.6173
0.0250	1.2553	0.0528	2.1456	0.0778	2.6037

Cuadro 8.14. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm.

Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$
0.0000	0.0000	0.0278	1.3020	0.0556	2.1716
0.0028	0.0481	0.0306	1.3432	0.0583	2.3026
0.0056	0.2107	0.0333	1.4147	0.0611	2.3026
0.0083	0.3439	0.0417	1.7148	0.0639	2.3434
0.0111	0.4463	0.0444	1.9038	0.0667	2.6593
0.0139	0.5175	0.0472	1.8839	0.0694	2.7646
0.0167	0.8074	0.0500	2.0715	0.0722	2.7181
0.0222	0.9862	0.0528	2.3026	0.0750	2.7181

Cuadro 8.15. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la cuarta repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 0.25 vvm.

Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$
0.0000	0.0000	0.0333	1.2379	0.0583	1.8389
0.0028	0.0736	0.0361	1.3394	0.0611	1.9105
0.0056	0.1358	0.0389	1.3665	0.0639	1.9805
0.0083	0.2219	0.0417	1.3863	0.0667	2.0174
0.0111	0.3581	0.0444	1.5006	0.0694	2.0557
0.0139	0.5997	0.0472	1.5847	0.0722	2.2256
0.0250	1.0413	0.0500	1.6607	0.0750	2.2730
0.0278	1.1056	0.0528	1.8018	0.0778	2.6882
0.0306	1.2413	0.0556	1.8326		

Cuadro 8.16. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la primera repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$
0.0000	0.0000	0.0278	0.9755	0.0583	2.1893
0.0028	0.0704	0.0306	1.0729	0.0611	2.3126
0.0056	0.2095	0.0333	1.3318	0.0639	2.3228
0.0083	0.3496	0.0361	1.5141	0.0667	2.4191
0.0111	0.4354	0.0389	1.6660	0.0694	2.5383
0.0139	0.6463	0.0472	1.6820	0.0722	2.7181
0.0167	0.7133	0.0500	1.7430	0.0750	2.9375
0.0194	0.8510	0.0528	1.8326	0.0778	3.1466
0.0250	0.8723	0.0556	1.9733		

Cuadro 8.17. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$
0.0000	0.0000	0.0278	1.0161	0.0556	2.1120
0.0028	0.7831	0.0306	1.1394	0.0583	2.1628
0.0056	0.4246	0.0333	1.2344	0.0611	2.2256
0.0083	0.3696	0.0361	1.2658	0.0639	2.4651
0.0111	0.6125	0.0389	1.3432	0.0667	2.5383
0.0139	0.6753	0.0417	1.4230	0.0694	2.8302
0.0167	0.6992	0.0444	1.6145	0.0722	2.7806

Cuadro 8.17. (Continuación) $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$
0.0194	0.7423	0.0472	1.8264	0.0750	2.8302
0.0222	0.8463	0.0500	2.0174	0.0778	2.9375
0.0250	0.9314	0.0528	2.0636	0.0806	3.3524

Cuadro 8.18. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$
0.0000	0.0000	0.0278	1.0936	0.0556	1.9878
0.0028	0.0856	0.0306	1.2910	0.0583	2.0479
0.0056	0.1520	0.0333	1.3509	0.0611	2.1542
0.0083	0.2095	0.0361	1.4313	0.0639	2.3126
0.0111	0.2917	0.0389	1.5006	0.0667	2.6593
0.0139	0.4201	0.0417	1.6820	0.0694	2.7031
0.0167	0.5396	0.0444	1.5945	0.0722	2.9957
0.0194	0.6675	0.0472	1.6296	0.0750	2.8647
0.0222	0.8301	0.0500	1.7545		
0.0250	0.9493	0.0528	2.0099		

Cuadro 8.19. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la cuarta repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$	Tiempo (h)	$-\ln(1-OD)$
0.0000	0.0000	0.0222	0.6753	0.0583	2.0794
0.0028	0.0171	0.0250	0.7679	0.0611	2.0557
0.0056	0.0545	0.0278	0.8510	0.0639	2.0956
0.0083	0.1290	0.0306	0.9467	0.0667	2.1716
0.0111	0.3397	0.0333	1.0613	0.0694	2.2730
0.0139	0.3930	0.0361	1.3318	0.0722	2.4651
0.0167	0.4573	0.0389	1.4313	0.0750	2.8824
0.0194	0.5604	0.0417	1.5051	0.0778	2.9188

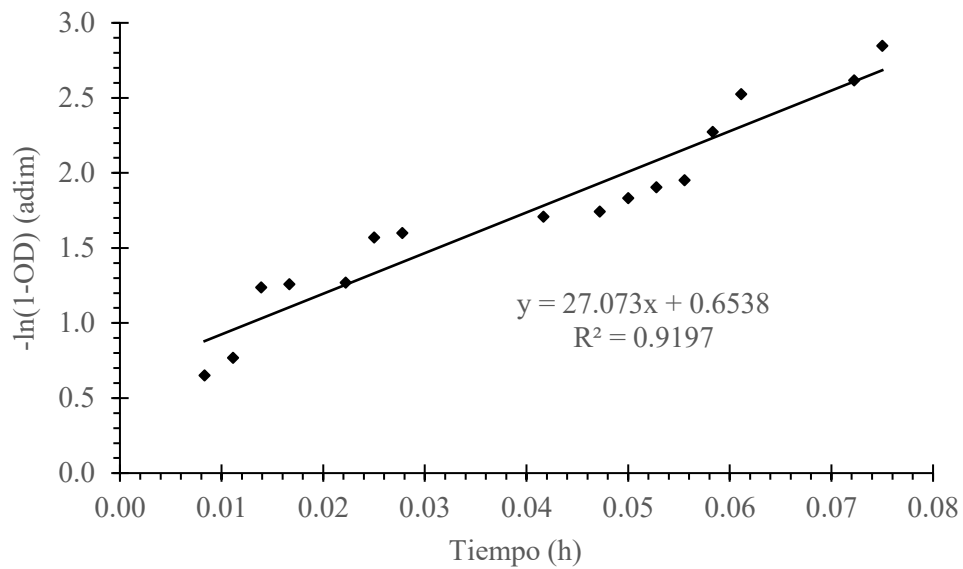


Figura 8.1. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la primera repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 0.25 vvm.

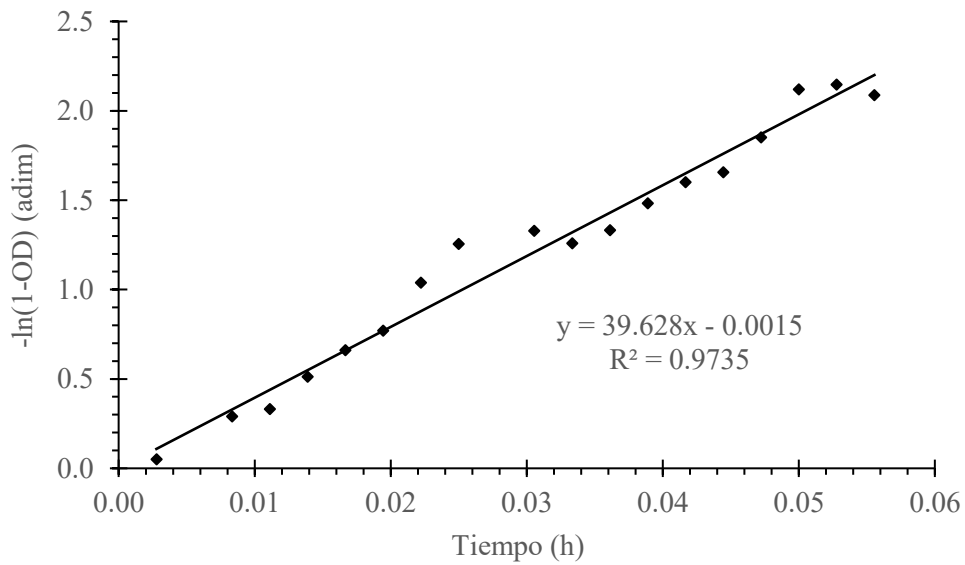


Figura 8.2. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 0.25 vvm.

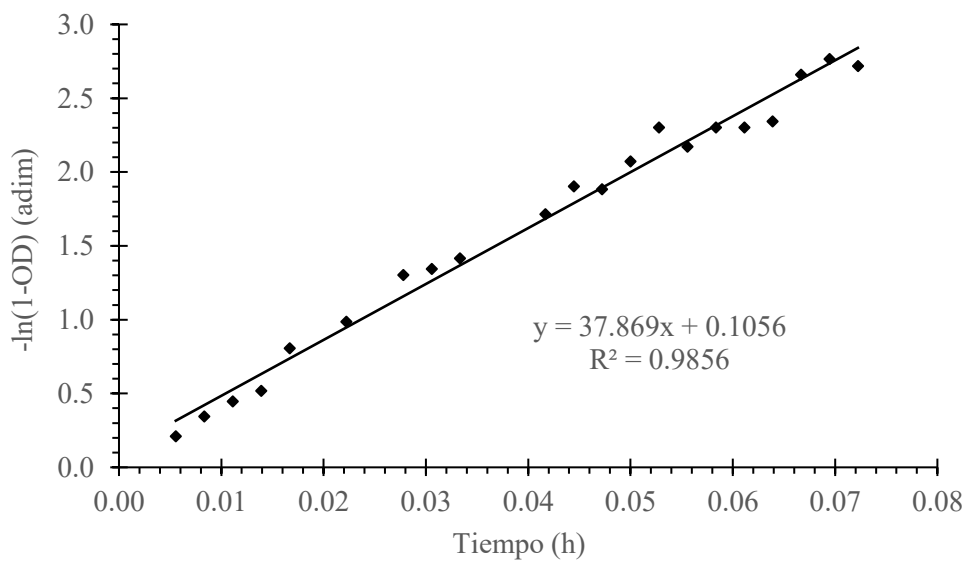


Figura 8.3. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm.

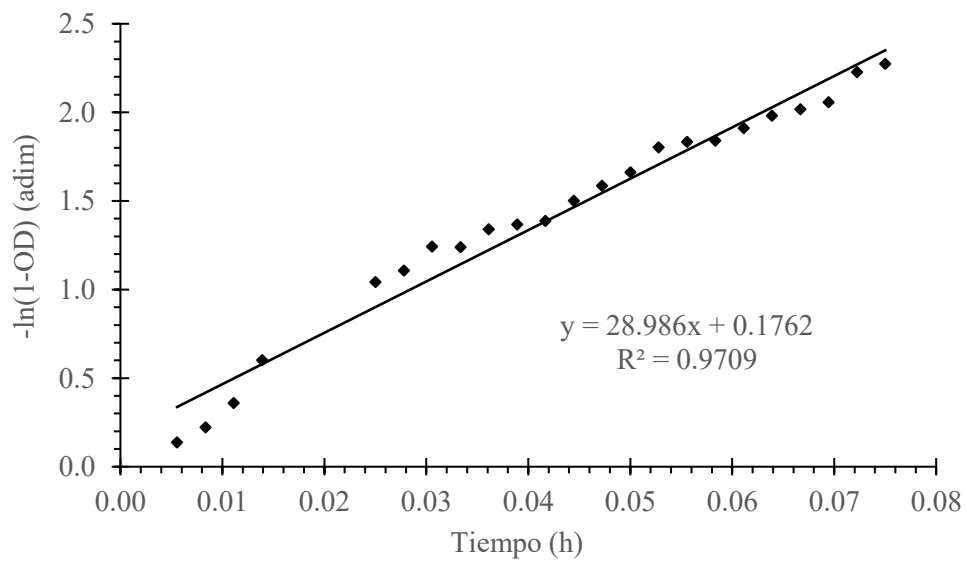


Figura 8.4. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la cuarta repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 0.25 vvm.

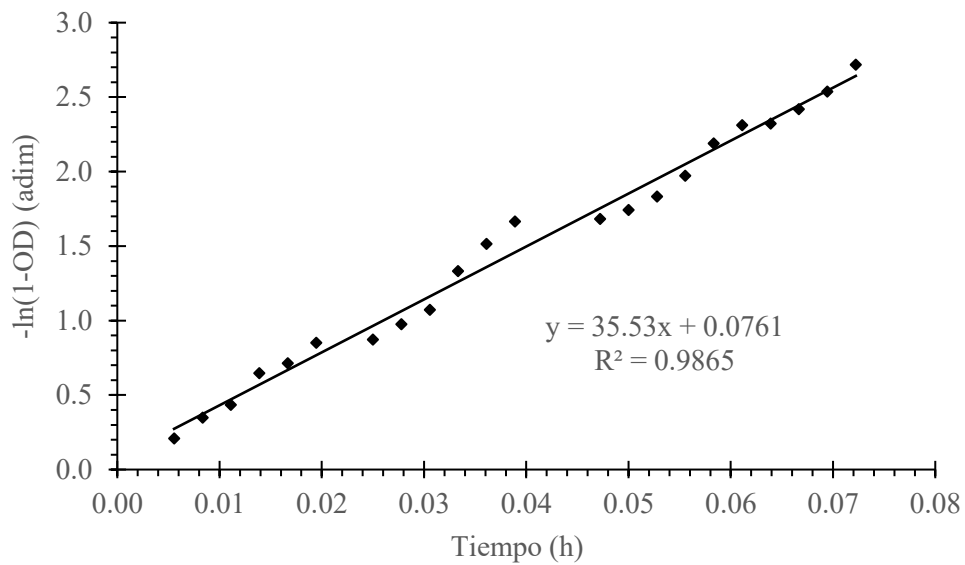


Figura 8.5. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la primera repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

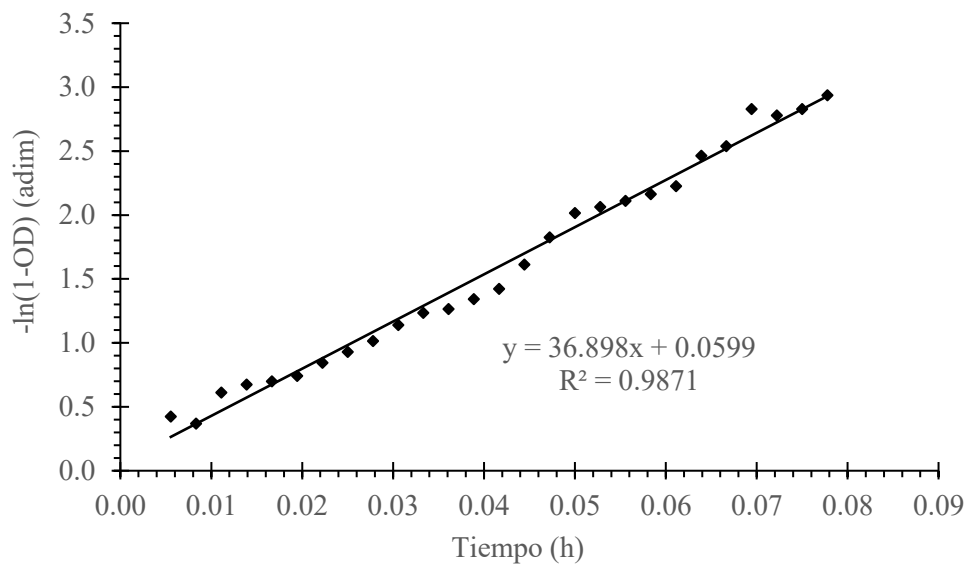


Figura 8.6. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la segunda repetición de la medición del k_{La} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

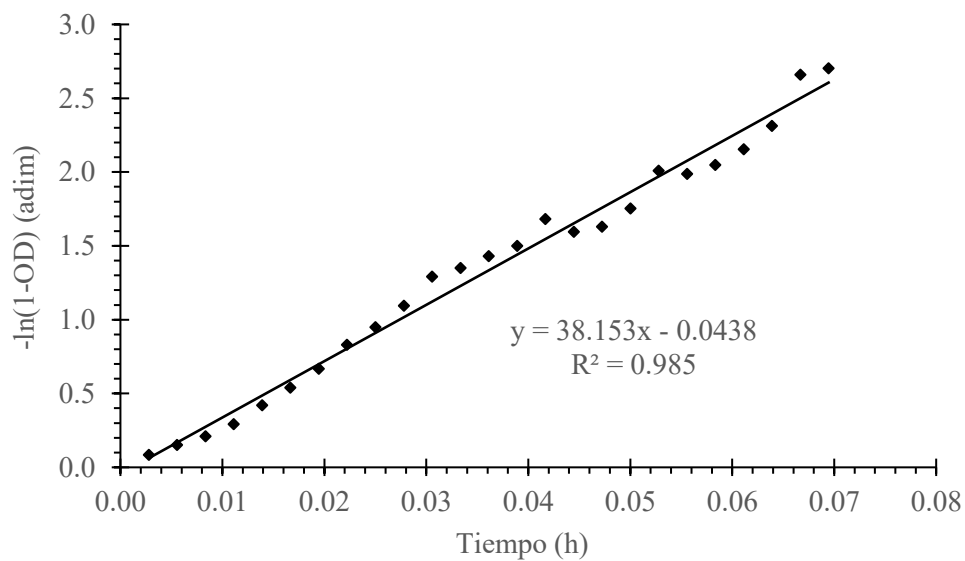


Figura 8.7. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la tercera repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

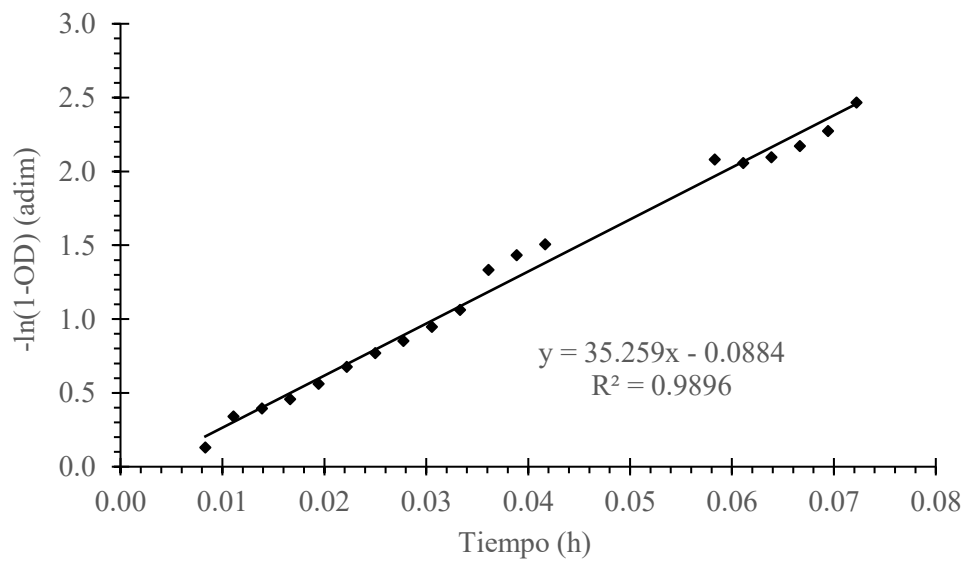


Figura 8.8. $-\ln(1-OD)$ con respecto al tiempo para la cuarta repetición de la medición del k_{LA} con un flujo de aire de 1.00 vvm.

Cuadro 8.20. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa del oxígeno de cada réplica, y promedio, para cada tratamiento realizado en la prueba de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.

Réplica	<i>k_{LA}</i> para cada flujo de aire probado en el biorreactor de 3 L (h ⁻¹)	
	0.25	1.00
1	27.073	35.530
2	39.628	36.898
3	37.869	38.153
4	28.986	35.259
Promedio	33.389	36.460

Cuadro 8.21. Masa y densidad, del agua y del medio de cultivo, para las tres réplicas realizadas en la medición de la densidad del medio de cultivo.

Repetición	Masa (g)		Densidad (kg/m ³)	
	Agua	Medio de cultivo	Agua	Medio de cultivo
1	9.8056	9.9589	995.60	1011.2
2	9.7928	9.9452	995.60	1011.1
3	9.7919	9.9486	995.60	1011.5
Promedio				1011.3

Cuadro 8.22. Viscosidad cinemática y dinámica para las cuatro repeticiones realizadas en la medición de la viscosidad del medio de cultivo.

Repetición	Viscosidad	
	Cinemática (x10 ⁴ m ² /s)	Dinámica (x10 ⁴ Pa s)
1	8.358	8.452
2	8.113	8.204
3	8.405	8.500
4	8.840	8.940
Promedio	8.429	8.524

Cuadro 8.23. Potencia volumétrica sin aireación, factor de aireación y potencia volumétrica con aireación, de cada impulsor, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.

Impulsor	Parámetro	Flujo de aire en el biorreactor de 3 L (vvm)	
		0.25	1.00
Turbina Rushton	Potencia volumétrica sin aireación (W/m ³)	98.896	98.896

Cuadro 8.23. (Continuación) Potencia volumétrica sin aireación, factor de aireación y potencia volumétrica con aireación, de cada impulsor, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.

Impulsor	Parámetro	Flujo de aire en el biorreactor de 3 L (vvm)	
		0.25	1.00
Turbina Rushton	Factor de aireación (adim)	0.398	0.268
	Potencia volumétrica con aireación (W/m ³)	39.351	26.470
Turbina de paletas inclinadas	Potencia volumétrica sin aireación (W/m ³)	24.724	24.724
	Factor de aireación (adim)	0.563	0.442
	Potencia volumétrica con aireación (W/m ³)	13.921	10.922
Propela marina	Potencia volumétrica sin aireación (W/m ³)	27.471	27.471
	Factor de aireación (adim)	0.487	0.300
	Potencia volumétrica con aireación (W/m ³)	13.367	8.228

Cuadro 8.24. Potencia volumétrica total con aireación, velocidad superficial del gas y coeficiente volumétrico de transferencia de masa, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.

Parámetro	Flujo de aire en el biorreactor de 3 L (vvm)	
	0.25	1.00
Potencia volumétrica total con aireación (W/m ³)	66.638	45.620
Velocidad superficial del gas (x10 ⁴ m/s)	6.278	25.11
Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (h ⁻¹)	33.389	36.46

Cuadro 8.25. Número de Reynolds, velocidad de punta y velocidad de corte, de cada impulsor, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.

Impulsor	Número de Reynolds (x10 ⁻⁴ adim)	Velocidad de punta (m/s)	Velocidad de corte (s ⁻¹)
Turbina Rushton	1.477	0.825	147.93
Turbina de paletas inclinadas	1.477	0.825	71.99
Propela marina	1.477	0.825	71.99

Cuadro 8.26. Eficiencia de bombeo, tasa específica de disipación de energía por agitación y tasa específica efectiva de disipación de energía por agitación, de cada impulsor, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.

Impulsor	Parámetro	Flujo de aire en el biorreactor de 3 L (vvm)	
		0.25	1.00
Turbina Rushton	Eficiencia de bombeo ($\times 10^3$ adim)	1.010	1.010
	Tasa específica de disipación de energía por agitación ($\times 10^2$ W/kg)	3.891	2.618
	Tasa específica efectiva de disipación de energía por agitación ($\times 10^5$ W/kg)	3.928	2.642
Turbina de paletas inclinadas	Eficiencia de bombeo ($\times 10^3$ adim)	3.724	3.724
	Tasa específica de disipación de energía por agitación ($\times 10^2$ W/kg)	1.377	1.080
	Tasa específica efectiva de disipación de energía por agitación ($\times 10^5$ W/kg)	5.126	4.021
Propela marina	Eficiencia de bombeo ($\times 10^3$ adim)	3.724	3.724
	Tasa específica de disipación de energía por agitación ($\times 10^2$ W/kg)	1.322	8.137
	Tasa específica efectiva de disipación de energía por agitación ($\times 10^5$ W/kg)	4.922	3.030

Cuadro 8.27. Potencia específica por expansión isotérmica del gas, tasa específica de disipación de energía por expansión del gas y tasa específica de disipación de energía total, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.

Parámetro	Flujo de aire en el biorreactor de 3 L (vvm)	
	0.25	1.00
Potencia específica por expansión isotérmica del gas (J/kg)	453.12	453.12
Tasa específica de disipación de energía por expansión del gas ($\times 10^3$ W/kg)	6.475	25.90
Tasa específica de disipación de energía total ($\times 10^3$ W/kg)	6.615	26.00

Cuadro 8.28. Tiempo de mezclado y razón de mezclado-oxigenación, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.

Parámetro	Flujo de aire en el biorreactor de 3 L (vvm)	
	0.25	1.00
Tiempo de mezclado (s)	5.389	3.415
Razón de mezclado-oxigenación (adim)	20.01	28.91

Cuadro 8.29. Número de flujo con aireación, número de Froude disponible y crítico, número de potencia con aireación y retención del gas, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.

Parámetro	Flujo de aire en el biorreactor de 3 L (vvm)	
	0.25	1.00
Número de flujo con aireación (adim)	0.0157	0.0627
Número de Froude (adim)	0.1561	0.1561
Número de Froude crítico (adim)	0.1318	0.4893
Número de potencia con aireación (adim)	3.598	2.463
Retención del gas ($\times 10^3$ adim)	7.173	14.901

Cuadro 8.30. Potencia eléctrica del motor con aireación, potencia específica del compresor por compresión adiabática del gas, potencia eléctrica del compresor y potencia eléctrica total, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.

Parámetro	Flujo de aire en el biorreactor de 3 L (vvm)	
	0.25	1.00
Potencia eléctrica del motor con aireación (W)	0.2720	0.1862
Potencia específica del compresor por compresión adiabática del gas ($\times 10^{-5}$ J/kg)	1.7387	1.7387
Potencia eléctrica del compresor (W)	5.025	20.102
Potencia eléctrica total (W)	5.297	20.288

Cuadro 8.31. Eficiencia de mezclado y de transferencia de oxígeno, para cada tratamiento realizado en las pruebas de flujo de aire en el biorreactor de 3 L.

Parámetro	Flujo de aire en el biorreactor de 3 L (vvm)	
	0.25	1.00
Eficiencia de mezclado ($\times 10^3$ J ⁻¹)	35.03	14.43
Eficiencia en la transferencia de oxígeno ($\times 10^4$ J ⁻¹)	17.51	4.99

Cuadro 8.32. Potencia volumétrica sin aireación, factor de aireación y potencia volumétrica con aireación, de cada impulsor, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.

Impulsor	Parámetro	Criterios de escalamiento					
		Caso A			Caso B		
		k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}	k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}
Turbina Rushton	Potencia volumétrica sin aireación (W/m^3)	72.498	24.914	101.48	50.154	4.840	104.61
	Factor de aireación (adim)	0.796	0.630	0.574	0.788	0.472	0.385
	Potencia volumétrica con aireación (W/m^3)	57.709	15.687	58.237	39.538	2.284	40.301
Propela marina	Potencia volumétrica sin aireación (W/m^3)	5.840	2.007	8.175	4.040	0.390	8.427
	Factor de aireación (adim)	1.529	1.136	1.028	1.505	0.786	0.631
	Potencia volumétrica con aireación (W/m^3)	8.928	2.280	8.401	6.083	0.306	5.319

Cuadro 8.33. Potencia volumétrica total con aireación, velocidad superficial del gas, flujo específico de aire y coeficiente volumétrico de transferencia de masa, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.

Parámetro	Criterios de escalamiento					
	Caso A			Caso B		
	k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}	k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}
Potencia volumétrica total con aireación (W/m^3)	66.638	17.967	66.638	45.620	2.590	45.620
Velocidad superficial del gas ($\times 10^4$ m/s)	2.161	6.278	6.278	2.434	25.113	25.113
Flujo específico de aire (vvm)	0.020	0.058	0.058	0.022	0.232	0.232
Coficiente volumétrico de transferencia de masa (h^{-1})	45.332	45.332	85.046	40.541	40.541	160.649

Cuadro 8.34. Número de Reynolds, velocidad de punta y velocidad de corte, de cada impulsor, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.

Impulsor	Parámetro	Criterios de escalamiento					
		Caso A			Caso B		
		k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}	k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}
Turbina Rushton	Número de Reynolds ($\times 10^{-4}$ adim)	4.316	3.023	4.828	3.817	1.751	4.877
	Velocidad de punta (m/s)	1.166	0.816	1.304	1.031	0.473	1.317
	Velocidad de corte (s^{-1})	61.652	36.142	72.940	51.278	15.929	74.056
Propela marina	Número de Reynolds ($\times 10^{-4}$ adim)	2.630	1.842	2.942	2.326	1.067	2.972
	Velocidad de punta (m/s)	0.910	0.637	1.018	0.805	0.369	1.028
	Velocidad de corte (s^{-1})	30.004	17.589	35.498	24.956	7.752	36.040

Cuadro 8.35. Eficiencia de bombeo, tasa específica de disipación de energía por agitación y tasa específica efectiva de disipación de energía por agitación, de cada impulsor, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.

Impulsor	Parámetro	Criterios de escalamiento					
		Caso A			Caso B		
		k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}	k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}
Turbina Rushton	Eficiencia de bombeo ($\times 10^3$ adim)	1.237	1.237	1.237	1.237	1.237	1.237
	Tasa específica de disipación de energía por agitación ($\times 10^2$ W/kg)	5.707	1.551	5.759	3.910	0.226	3.985
	Tasa específica efectiva de disipación de energía por agitación ($\times 10^5$ W/kg)	7.061	1.919	7.125	4.838	0.280	4.931
Propela marina	Eficiencia de bombeo ($\times 10^3$ adim)	1.695	1.695	1.695	1.695	1.695	1.695
	Tasa específica de disipación de energía por agitación ($\times 10^3$ W/kg)	8.829	2.254	8.307	6.015	0.303	5.260
	Tasa específica efectiva de disipación de energía por agitación ($\times 10^6$ W/kg)	14.97	3.822	14.08	10.20	0.514	8.917

Cuadro 8.36. Potencia específica por expansión isotérmica del gas, tasa específica de disipación de energía por expansión del gas y tasa específica de disipación de energía total, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.

Parámetro	Criterios de escalamiento					
	Caso A			Caso B		
	k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}	k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}
Potencia específica por expansión isotérmica del gas (J/kg)	1879.66	1879.66	1879.66	1879.66	1879.66	1879.66
Tasa específica de disipación de energía por expansión del gas ($\times 10^3$ W/kg)	2.144	6.229	6.229	2.415	24.91	24.91
Tasa específica de disipación de energía total ($\times 10^3$ W/kg)	2.230	6.252	6.314	2.474	24.92	24.97

Cuadro 8.37. Tiempo de mezclado y razón de mezclado-oxigenación, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.

Parámetro	Criterios de escalamiento					
	Caso A			Caso B		
	k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}	k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}
Tiempo de mezclado (s)	17.368	12.317	12.276	16.777	7.768	7.763
Razón de mezclado-oxigenación (adim)	4.572	6.448	3.448	5.293	11.431	2.887

Cuadro 8.38. Número de flujo con aireación, número de Froude disponible y crítico, número de potencia con aireación y retención del gas, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.

Parámetro	Criterios de escalamiento					
	Caso A			Caso B		
	k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}	k_{La} y $P_{G,V}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,V}$ y u_{sp}
Número de flujo con aireación (adim)	0.0072	0.0301	0.0188	0.0092	0.2076	0.0745
Número de Froude (adim)	0.0961	0.0471	0.1203	0.0752	0.0158	0.1227
Número de Froude crítico (adim)	0.0678	0.2411	0.1557	0.0829	1.5905	0.5791
Número de potencia con aireación (adim)	8.909	6.927	6.376	8.735	5.209	4.190
Retención del gas ($\times 10^3$ adim)	3.511	4.395	6.806	3.333	5.430	14.193

Cuadro 8.39. Potencia eléctrica del motor con aireación, potencia específica del compresor por compresión adiabática del gas, potencia eléctrica del compresor y potencia eléctrica total, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.

Parámetro	Criterios de escalamiento					
	Caso A			Caso B		
	k_{La} y $P_{G,v}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,v}$ y u_{sp}	k_{La} y $P_{G,v}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,v}$ y u_{sp}
Potencia eléctrica del motor con aireación (W)	4.760	1.283	4.760	3.259	0.185	3.259
Potencia específica del compresor por compresión adiabática del gas ($\times 10^{-5}$ J/kg)	1.7387	1.7387	1.7387	1.7387	1.7387	1.7387
Potencia eléctrica del compresor (W)	10.029	29.132	29.132	11.296	116.529	116.529
Potencia eléctrica total (W)	14.789	30.415	33.892	14.554	116.714	119.787

Cuadro 8.40. Eficiencia de mezclado y de transferencia de oxígeno, para cada escenario calculado en la propuesta de escalamiento a biorreactores de 70 L.

Parámetro	Criterios de escalamiento					
	Caso A			Caso B		
	k_{La} y $P_{G,v}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,v}$ y u_{sp}	k_{La} y $P_{G,v}$	k_{La} y u_{sp}	$P_{G,v}$ y u_{sp}
Eficiencia de mezclado ($\times 10^3$ J ⁻¹)	3.893	2.669	2.403	4.095	1.103	1.075
Eficiencia en la transferencia de oxígeno ($\times 10^4$ J ⁻¹)	8.515	4.140	6.970	7.738	0.965	3.725

Capítulo 9. Apéndice C. Muestra de cálculo

A continuación, se presentan ejemplos del procedimiento para realizar los cálculos más relevantes de este trabajo. Otros cálculos como promedios, cantidades totales, desviaciones estándar o conversión de unidades se consideran elementales y se omiten por motivos de espacio. Aunque los valores de algunas variables se reporten en los cuadros en unidades fuera del SI, todos los cálculos presentados en esta sección se llevan a cabo utilizando los valores de las variables en unidades SI.

- **Cálculo de la masa de la muestra húmeda**

Para el cálculo de la masa de la muestra húmeda se utilizó la siguiente ecuación:

$$m_{BH} = m_{R+BH} - m_R \quad (9.1)$$

En donde m_{BH} se refiere a la masa de la muestra húmeda (g), m_{R+BH} se refiere a la masa del recipiente (placa o filtro) más la muestra húmeda (g) y m_R se refiere a la masa del recipiente (g). Utilizando los datos del Cuadro 7.1, fila 1, columnas 3 y 4:

$$94.981 - 69.670 = 25.311 \text{ g}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.1, fila 1, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la masa de la muestra húmeda cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la masa de la muestra seca**

Para el cálculo de la masa de la muestra seca se utilizó la siguiente ecuación:

$$m_{BS} = m_{R+BS} - m_R \quad (9.2)$$

En donde m_{BS} se refiere a la masa de la muestra seca (g), m_{R+BS} se refiere a la masa del recipiente (placa o filtro) más la muestra seca (g) y m_R se refiere a la masa del recipiente (g). Utilizando los datos del Cuadro 7.1, fila 1, columnas 3 y 5:

$$70.740 - 69.670 = 1.070 \text{ g}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.1, fila 1, columna 4. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la masa de la muestra seca cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la concentración de biomasa seca de la muestra**

Para el cálculo de la concentración de biomasa seca de la muestra se utilizó la siguiente ecuación:

$$X_m = \frac{m_{BS}}{V_L} \quad (9.3)$$

En donde X_m se refiere a la concentración de biomasa seca de la muestra (g/L), m_{BS} se refiere a la masa de la muestra seca (g) y V_L se refiere a la masa del recipiente (L). Utilizando los datos del Cuadro 8.1, fila 1, columnas 4 y considerando el volumen del medio de cultivo en las pruebas realizadas en matraz:

$$\frac{1.070}{0.05} = 21.400 \text{ g/L}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.1, fila 1, columna 5. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la concentración de biomasa seca de las muestras cada vez que fue necesario.

- **Cálculo del índice de crecimiento de la muestra**

Para el cálculo del índice de crecimiento de cada muestra se utilizó la siguiente ecuación:

$$IC_m = \frac{X_f - X_0}{X_0} \quad (9.4)$$

En donde IC_m se refiere al índice de crecimiento de cada muestra (adim), X_0 se refiere a la concentración de biomasa seca inicial (g/L) y X_f se refiere a la concentración de biomasa seca final (g/L). Utilizando los datos del Cuadro 8.3, fila 1, columna 5 y Cuadro 8.4, fila 1, columna 5:

$$\frac{16.880 - 0.410}{0.410} = 40.177$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.5, fila 1, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular el índice de crecimiento de las muestras cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la tasa específica de crecimiento**

El cálculo de la tasa específica de crecimiento del organismo se llevó a cabo en el software CurveExpert Professional versión 2.6.5. Para esto, se realizó una regresión no lineal, con el algoritmo de Levenberg-Marquardt (tolerancia de 1.0×10^{-8}), ajustando los datos de concentración de biomasa seca, para cada punto en el tiempo, a diferentes modelos matemáticos.

- **Cálculo de la masa neta de la muestra seca para las pruebas en el biorreactor de 3 L**

Para el cálculo de la masa neta de la muestra seca se utilizó la siguiente ecuación:

$$m_{NS} = m_{BS} - m_{fil} \quad (9.5)$$

En donde m_{NS} se refiere a la masa neta de la muestra seca (g), m_{BS} se refiere a la masa de la muestra seca (g) y m_{fil} se refiere a la masa de los filtros secos (g). Utilizando los datos del Cuadro 8.11, filas 1 y 2, columna 3:

$$50.972 - 3.605 = 47.367 \text{ g}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.11, fila 3, columna 3. Este procedimiento se utilizó únicamente para la primera corrida con un flujo de aire de 0.25 vvm en el biorreactor de 3 L debido a que en algunas muestras se midió el peso de la placa junto con el filtro y la muestra secos, mientras que otras placas solo incluyeron la masa de la muestra seca. Para las corridas posteriores se corrigió este detalle, por lo que la masa de los filtros para las otras corridas se tomó con cero.

- **Cálculo del volumen final neto del medio para las pruebas en el biorreactor de 3 L**

Para el cálculo del volumen final neto del medio se utilizó la siguiente ecuación:

$$V_{FN} = V_0 - V_{per} \quad (9.6)$$

En donde V_{FN} se refiere al volumen final neto del medio (L), V_0 se refiere al volumen inicial del medio (L) y V_{per} se refiere al volumen perdido por evaporación del medio o por extracción de muestras (L). Utilizando los datos del Cuadro 8.11, filas 4 y 5, columna 3:

$$2.000 - 0.006 = 1.994 \text{ L}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.11, fila 6, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular el volumen final neto del medio cada vez que fue necesario.

- **Cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de masa del oxígeno (k_La)**

Para el cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de masa del oxígeno se utilizó la siguiente ecuación:

$$-\ln\left(1 - \frac{pO_2}{100}\right) = k_La \cdot t \quad (9.7)$$

En donde pO_2 se refiere al porcentaje de oxígeno disuelto en el medio con respecto a su valor de saturación. Esta ecuación es equivalente a la ecuación (1.15 descrita en el marco conceptual. En los cuadros del apéndice B se utilizó el término DO , el cuál es igual a $pO_2/100$, para ahorrar espacio. En primer lugar, se calculó el valor de la función logarítmica del lado izquierdo de la ecuación. Utilizando los datos del Cuadro 7.10, fila 2, columna 2:

$$-\ln\left(1 - \frac{5.5}{100}\right) = 0.0566$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.12, fila 2, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular el valor de la función logarítmica cada vez que fue necesario. Posteriormente, se graficaron los valores de la función logarítmica con respecto al tiempo (en horas) en Microsoft Excel (Office 365, Windows 10), y se realizó una regresión lineal a los datos. El valor de la pendiente en la ecuación de la recta resultante se utilizó como el valor del k_La .

- **Cálculo de la masa del agua para la determinación de la densidad del medio**

Para el cálculo de la masa del agua se utilizó la siguiente ecuación:

$$m_w = m_{pic+w} - m_{pic} \quad (9.8)$$

En donde m_w se refiere a la masa del agua (g), m_{pic+w} se refiere a la masa del picnómetro más el agua (g) y m_{pic} se refiere a la masa del picnómetro (g). Utilizando los datos del Cuadro 7.18, fila 1, columnas 2 y 3:

$$37.4942 - 27.6886 = 9.8056 \text{ g}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.21, fila 1, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la masa del agua cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la masa del medio de cultivo para la determinación de la densidad del medio**

Para el cálculo de la masa del medio de cultivo se utilizó la siguiente ecuación:

$$m_L = m_{pic+L} - m_{pic} \quad (9.9)$$

En donde m_L se refiere a la masa del medio de cultivo (g), m_{pic+L} se refiere a la masa del picnómetro más el medio (g) y m_{pic} se refiere a la masa del picnómetro (g). Utilizando los datos del Cuadro 7.18, fila 1, columnas 2 y 4:

$$37.6475 - 27.6886 = 9.9589 \text{ g}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.21, fila 1, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la masa del medio de cultivo cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la densidad del medio de cultivo**

Para el cálculo de la densidad del medio de cultivo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\rho_L = \rho_w \cdot \frac{m_L}{m_w} \quad (9.10)$$

En donde ρ_L se refiere a la densidad del medio de cultivo (kg/m^3) y ρ_w se refiere a la densidad del agua (kg/m^3). Tomando el valor de la densidad del agua a 30 °C como 995.6 kg/m^3 (McCabe, Smith, & Harriot, 2007) y utilizando los datos del Cuadro 8.21, fila 1, columnas 2, 3 y 4:

$$995.6 \cdot \frac{9.9589}{9.8056} = 1011.2 \text{ kg/m}^3$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.21, fila 1, columna 5. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la densidad del medio de cultivo cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la viscosidad cinemática del medio de cultivo**

Para el cálculo de la viscosidad cinemática del medio de cultivo se utilizó la siguiente ecuación:

$$v_L = \frac{0.00762 \cdot t_{vac}}{1000} \quad (9.11)$$

En donde v_L se refiere a la viscosidad cinemática del medio de cultivo (m^2/s) y t_{vac} se refiere al tiempo de vaciado del bulbo del viscosímetro (s). Utilizando los datos del Cuadro 7.19, fila 1, columna 2:

$$\frac{0.00762 \cdot 109.68}{1000} = 8.358 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.22, fila 1, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la viscosidad cinemática del medio de cultivo cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la viscosidad dinámica del medio de cultivo**

Para el cálculo de la viscosidad dinámica del medio de cultivo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\eta_L = \frac{\rho_L \cdot v_L}{1000} \quad (9.12)$$

En donde η_L se refiere a la viscosidad dinámica del medio de cultivo (Pa s). Utilizando los datos del Cuadro 8.21, fila 4, columna 5 y Cuadro 8.22, fila 1, columna 2:

$$\frac{1011.3 \cdot 8.358 \times 10^{-4}}{1000} = 8.452 \times 10^{-4} \text{ Pa s}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.22, fila 1, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la viscosidad dinámica del medio de cultivo cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la velocidad de agitación y el flujo de aire en el biorreactor de 70 L**

El cálculo de la velocidad de agitación y en flujo de aire para los diferentes escenarios generados en la propuesta de escalamiento se llevó a cabo en Microsoft Excel (Office 365, Windows 10) por medio del complemento “Solver”, utilizando el método de resolución GRG Nonlinear con una tolerancia de 1.0×10^{-6} . En todos los casos, se utilizó como celda objetivo la que contenía el valor del k_{La} calculado a partir de la correlación correspondiente (se explicará más adelante), mientras que las celdas variables fueron las que contenían los valores de la velocidad de agitación (s^{-1}) y el flujo de aire (m^3/s). Las restricciones se plantearon de acuerdo con los criterios de escalamiento escogidos. Por ejemplo, en el caso del primer escenario del caso A, las restricciones se plantearon de forma que la potencia volumétrica y el k_{La} del biorreactor de 70 L, calculados a partir de sus respectivas ecuaciones, tuvieran el mismo valor que las calculadas para el biorreactor de 3 L. De esta forma, el programa se encargó de probar diferentes combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aire hasta encontrar valores que permitiesen cumplir con las restricciones planteadas.

- **Cálculo de la potencia volumétrica de cada impulsor, sin aireación, en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la potencia volumétrica de cada impulsor, sin aireación, se utilizó la siguiente ecuación:

$$P_V = \frac{n \cdot N_P \cdot \rho_L \cdot N^3 \cdot D_i^5}{V_L} \quad (9.13)$$

Para la turbina Rushton en el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 2.9, fila 1, columna 6, Cuadro 2.11, filas 3 y 10, columna 2, Cuadro 8.21, fila 4, columna 5, Cuadro 3.14, fila 3, columna 2, tomando el valor de n como 0.9 (debido a que se considera como el segundo impulsor (Applikon Biotechnology, 2008)) y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{0.9 \cdot 6.0 \cdot 1011.3 \cdot (3.255)^3 \cdot (0.114)^5}{0.05} = 72.498 \text{ W/m}^3$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.32, fila 1, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la potencia volumétrica de cada impulsor, sin aireación, cada vez que fue necesario.

- **Cálculo del factor de aireación de cada impulsor en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo del factor de aireación de cada impulsor se utilizó la siguiente ecuación:

$$F_{P,G} = E_1 \cdot \left(\frac{Q_G}{N \cdot V_N} \right)^{E_2} \cdot \left(\frac{N^2 \cdot D_i^4}{g \cdot w \cdot V_N^{0.67}} \right)^{E_3} \quad (9.14)$$

Para la turbina Rushton en el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 2.11, filas 9 y 11, columna 2, Cuadro 3.14, filas 1 y 3, columna 2, tomando el valor de V_N como 0.025 m^3 (volumen del biorreactor dividido entre la cantidad de impulsores), empleando los valores de E_1 , E_2 y E_3 apropiados (Fujasová, Linek, & Moucha, 2007) y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$0.0712 \cdot \left(\frac{1.663 \times 10^{-5}}{3.255 \cdot 0.025} \right)^{-0.286} \cdot \left(\frac{(3.255)^2 \cdot (0.114)^4}{9.81 \cdot 0.002 \cdot (0.025)^{0.67}} \right)^{-0.242} = 0.796$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.32, fila 2, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular el factor de aireación de cada impulsor cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la potencia volumétrica de cada impulsor, con aireación, en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la potencia volumétrica de cada impulsor, con aireación, se utilizó la siguiente ecuación:

$$P_{G,V} = P_V \cdot F_{P,G} \quad (9.15)$$

Para la turbina Rushton en el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 8.32, filas 1 y 2, columna 3, y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$72.498 \cdot 0.796 = 57.709 \text{ W/m}^3$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.32, fila 3, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la potencia volumétrica de cada impulsor, con aireación, cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la velocidad superficial y flujo específico del gas en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la velocidad superficial del gas se utilizó la siguiente ecuación:

$$u_{sp} = \frac{Q_G}{A_T} \quad (9.16)$$

Para el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 3.14, fila 1, columna 2, Cuadro 2.11, fila 5, columna 2, y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{1.663 \times 10^{-5}}{7.694 \times 10^{-2}} = 2.161 \times 10^{-4} \text{ m/s}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.33, fila 2, columna 2. Por otro lado, para el cálculo del flujo específico del gas se utilizó la siguiente ecuación:

$$q_G = \frac{Q_G}{V_L} \quad (9.17)$$

Para el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 3.14, fila 1, columna 2, Cuadro 2.11, fila 3, columna 2, y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{1.663 \times 10^{-5}}{0.05} \cdot 60 = 0.02 \text{ min}^{-1}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 3.14, fila 2, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la velocidad superficial y el flujo específico del gas cada vez que fue necesario.

- **Cálculo del k_{La} objetivo y la viscosidad dinámica de diseño en el biorreactor de 70 L**

Los valores del k_{La} objetivo y de la viscosidad dinámica utilizados en los cálculos de la sección de escalamiento incluyeron dos factores de seguridad para compensar la variabilidad mostrada en la medición de ambas variables. En el caso de la viscosidad dinámica, uno de los factores de seguridad fue el intervalo de confianza generado a partir de las mediciones de la variable, mientras que el otro factor se tomó como 1.1:

$$\eta_{L,dis} = 1.1 \cdot \left(\eta_L + t_{\alpha/2} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right) \quad (9.18)$$

En donde s representa la desviación estándar de la muestra y n representa la cantidad de muestras. Utilizando un α de 0.05 y 3 grados de libertad, y los datos del Cuadro 8.22, fila 5, columna 3:

$$1.1 \cdot \left(8.524 \times 10^{-4} + 3.1824 \cdot \frac{3.058 \times 10^{-5}}{\sqrt{4}} \right) = 9.911 \times 10^{-4} \text{ Pa s}$$

En el caso del k_{La} , los dos factores de seguridad fueron los intervalos de confianza generados a partir de las mediciones realizadas en el biorreactor de 3 L y a partir de la correlación obtenida por Quirós-Fournier (2014):

$$k_{La,obj} = k_{La} + \left(t_{\alpha/2} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right)_{med} + \left(t_{\alpha/2} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right)_{cor} \quad (9.19)$$

En donde el subíndice *med* se refiere a las mediciones y el subíndice *cor* se refiere a la correlación. Utilizando un α de 0.05, 3 grados de libertad para 4 muestras en el caso de las mediciones, 8 grados de libertad para 12 muestras en el caso de la correlación, y los datos del Cuadro 8.20, fila 5, columna 2:

$$33.389 + \left(3.1824 \cdot \frac{6.279}{\sqrt{4}}\right) + \left(2.306 \cdot \frac{2.935}{\sqrt{12}}\right) = 45.332 \text{ h}^{-1}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.33, fila 4, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular el $k_L a$ objetivo para el caso B.

- **Cálculo del $k_L a$ en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo del $k_L a$ se utilizó la siguiente ecuación:

$$k_L a = 7.96 \cdot P_{G,V}^{0.48} \cdot u_{sp}^{0.59} \cdot \eta_L^{-0.68} \quad (9.20)$$

Para el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 8.33, filas 1 y 2, columna 2, la viscosidad dinámica de diseño, y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$7.96 \cdot (66.638)^{0.48} \cdot (2.161 \times 10^{-4})^{0.59} \cdot (9.911 \times 10^{-4})^{-0.68} = 45.332 \text{ h}^{-1}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.33, fila 4, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular el $k_L a$ cada vez que fue necesario.

- **Cálculo del número de Reynolds de cada impulsor en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo del número de Reynolds se utilizó la siguiente ecuación:

$$Re = \frac{\rho_L \cdot N \cdot D_i^2}{\eta_L} \quad (9.21)$$

Para la turbina Rushton en el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 2.11, fila 10, columna 2, Cuadro 8.21, fila 4, columna 5, Cuadro 3.14, fila 3, columna 2, la viscosidad dinámica de diseño, y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{1011.3 \cdot 3.255 \cdot (0.114)^2}{9.911 \times 10^{-4}} = 4.316 \times 10^4$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.34, fila 1, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular el número de Reynolds de cada impulsor, cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la velocidad de punta de cada impulsor en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la velocidad de punta se utilizó la siguiente ecuación:

$$v_i = N \cdot \pi \cdot D_i \quad (9.22)$$

Para la turbina Rushton en el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 2.11, fila 10, columna 2, Cuadro 3.14, fila 3, columna 2, y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$3.255 \cdot 3.1416 \cdot 0.114 = 1.166 \text{ m/s}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.34, fila 2, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la velocidad de punta de cada impulsor, cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la velocidad de corte de cada impulsor en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la velocidad de corte se utilizó la siguiente ecuación:

$$\dot{\gamma} = K_i \cdot N_Q \cdot N^{1.5} \quad (9.23)$$

Para la turbina Rushton en el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 3.14, fila 3, columna 2, Cuadro 2.9, fila 1, columna 7, tomando el valor de K_i para impulsores radiales (Wu, Graham, & Mehidi, 2006) y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$14 \cdot 0.75 \cdot (3.255)^{1.5} = 61.652 \text{ s}^{-1}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.34, fila 3, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la velocidad de corte de cada impulsor, cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la eficiencia de bombeo de cada impulsor en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la eficiencia de bombeo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\varphi_B = \frac{N_Q^3}{N_P} \cdot \left(\frac{D_i}{D_T}\right)^4 \quad (9.24)$$

Para la turbina Rushton en el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 2.9, fila 1, columnas 6 y 7, Cuadro 2.11, filas 4 y 10, columna 2 y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{(0.75)^3}{6.0} \cdot \left(\frac{0.114}{0.313}\right)^4 = 1.237 \times 10^{-3}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.35, fila 1, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la eficiencia de bombeo de cada impulsor, cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la tasa específica de disipación de energía de cada impulsor en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la tasa específica de disipación de energía de cada impulsor se utilizó la siguiente ecuación:

$$\varepsilon_M = \frac{P_{G,V}}{\rho_L} \quad (9.25)$$

Para la turbina Rushton en el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 8.32, fila 3, columna 3, Cuadro 8.21, fila 4, columna 5 y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{57.709}{1011.3} = 5.707 \times 10^{-2} \text{ W/kg}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.35, fila 2, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la tasa específica de disipación de energía de cada impulsor, cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la tasa específica efectiva de disipación de energía de cada impulsor en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la tasa específica efectiva de disipación de energía de cada impulsor se utilizó la siguiente ecuación:

$$\varepsilon_{M,ef} = \varphi_B \cdot \varepsilon_M \quad (9.26)$$

Para la turbina Rushton en el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 8.35, filas 1 y 2, columna 3 y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$1.237 \times 10^{-3} \cdot 5.707 \times 10^{-2} = 7.061 \times 10^{-5} \text{ W/kg}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.35, fila 3, columna 3. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la tasa específica efectiva de disipación de energía de cada impulsor, cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la potencia específica por la expansión isotérmica del gas en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la potencia específica por la expansión isotérmica del gas se utilizó la siguiente ecuación:

$$W_E = \frac{R \cdot T}{MM_G} \cdot \ln \frac{P_2}{P_3} \quad (9.27)$$

La temperatura del gas se tomó como 25 °C, considerando que el tiempo de contacto entre el gas y el medio en el biorreactor no fue suficiente para provocar cambios en la temperatura, además, la masa molar del gas (aire) se tomó como 28.965 g/mol (McCabe, Smith, & Harriot, 2007). En cuanto a la presión absoluta, su valor a la entrada del biorreactor se calculó a partir de la presión atmosférica (90 kPa) y la presión manométrica (30 psi):

$$P_2 = 90000 + 206842 = 296842 \text{ Pa}$$

Por otro lado, la presión en el espacio de cabeza del biorreactor (headspace) se tomó como la presión de entrada menos la presión hidrostática ejercida por el líquido en el equipo:

$$P_3 = P_2 - \rho_L \cdot g \cdot H_T \quad (9.28)$$

$$P_3 = 296842 - 1011.3 \cdot 9.81 \cdot 0.65 = 290394 \text{ Pa}$$

Por lo tanto, la potencia específica por expansión isotérmica del gas, usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{8.3145 \cdot 298.15 \cdot 1000}{28.965} \cdot \ln \frac{296842}{290394} = 1879.66 \text{ J/kg}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.36, fila 1, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la potencia específica por la expansión isotérmica del gas en el biorreactor de 3 L.

- **Cálculo de la tasa específica de disipación de energía por expansión isotérmica del gas en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la tasa específica de disipación de energía por expansión isotérmica del gas se utilizó la siguiente ecuación:

$$\varepsilon_G = \frac{\rho_G \cdot Q_G \cdot W_E}{\rho_L \cdot V_L} \quad (9.29)$$

La densidad del gas (aire) se calculó a partir de la ecuación del gas ideal utilizando las condiciones de temperatura y presión a la entrada del biorreactor:

$$\rho_G = \frac{P_2 \cdot MM_G}{R \cdot T} \quad (9.30)$$

$$\frac{296842 \cdot 28.965}{8.3145 \cdot 298.15 \cdot 1000} = 3.468 \text{ kg/m}^3$$

Para el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 3.14, fila 1, columna 2, Cuadro 8.21, fila 4, columna 5, Cuadro 2.11, fila 3, columna 2, Cuadro 8.36, fila 1, columna 2, empleando la densidad del aire calculada anteriormente y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{3.468 \cdot 1.663 \times 10^{-5} \cdot 1879.66}{1011.3 \cdot 0.05} = 2.144 \times 10^{-3} \text{ W/kg}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.36, fila 2, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la tasa específica de disipación de energía por expansión isotérmica del gas cada vez que fue necesario.

- **Cálculo del tiempo de mezclado en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo del tiempo de mezclado se utilizó la siguiente ecuación:

$$t_{95} = 2.4 \cdot (\varphi_B \cdot \varepsilon_M + \varepsilon_G)^{-0.33} \cdot H_T^{0.67} \cdot J^{0.33} \quad (9.31)$$

Para el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 8.36, fila 3, columna 2, Cuadro 2.11, fila 7, columna 2, tomando en cuenta que el biorreactor de 70 L cuenta con 2 impulsores y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$2.4 \cdot (2.230 \times 10^{-3})^{-0.33} \cdot (0.65)^{0.67} \cdot 2^{0.33} = 17.368 \text{ s}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.37, fila 1, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular el tiempo de mezclado cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la razón de mezclado-oxigenación en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la razón de mezclado-oxigenación se utilizó la siguiente ecuación:

$$\theta_{MO} = \frac{1}{k_L a \cdot t_{95}} \quad (9.32)$$

Para el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 8.33, fila 4, columna 2, Cuadro 8.37, fila 1, columna 2, y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{1}{1.259 \times 10^{-2} \cdot 17.368} = 4.572$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.37, fila 2, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la razón de mezclado-oxigenación cada vez que fue necesario.

- **Cálculo del número de potencia con aireación para el sistema de impulsores en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo del número de potencia con aireación para el sistema de impulsores se utilizó la siguiente ecuación:

$$N_{P,G} = \frac{P_{G,V} \cdot V_L}{\rho_L \cdot N^3 \cdot D_i^5} \quad (9.33)$$

Para el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 8.33, fila 1, columna 2, Cuadro 8.21, fila 4, columna 5, Cuadro 3.14, fila 3, columna 2, Cuadro 2.11, filas 3, 10 y 11, columna 2, empleando el promedio en el diámetro de los impulsores y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{66.638 \cdot 0.05}{1011.3 \cdot (3.255)^3 \cdot (0.1015)^5} = 8.909$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.38, fila 4, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular el número de potencia con aireación para el sistema de impulsores cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la retención del gas en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la retención del gas se utilizó la siguiente ecuación:

$$\phi_G = 0.16 \cdot P_{G,V}^{0.328} \cdot u_{sp}^{0.592} \cdot N_{P,G}^{-0.0916} \quad (9.34)$$

Para el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 8.33, filas 1 y 2, columna 2, Cuadro 8.38, fila 4, columna 2 y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$0.16 \cdot (66.638)^{0.328} \cdot (2.161 \times 10^{-4})^{0.592} \cdot (8.909)^{-0.0916} = 3.511 \times 10^{-3}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.38, fila 5, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la retención del gas cada vez que fue necesario.

- **Cálculo del número de flujo del impulsor inferior en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo del número de flujo del impulsor inferior se utilizó la siguiente ecuación:

$$Fl = \frac{Q_G}{N \cdot D_i^3} \quad (9.35)$$

Para la propela marina en el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 3.14, filas 1 y 3, columna 2, Cuadro 2.11, fila 11, columna 2 y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{1.663 \times 10^{-5}}{3.255 \cdot (0.089)^3} = 0.0072$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.38, fila 1, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular el número de flujo del impulsor inferior cada vez que fue necesario.

- **Cálculo del número de Froude del impulsor inferior en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo del número de Froude del impulsor inferior se utilizó la siguiente ecuación:

$$Fr = \frac{N^2 \cdot D_i}{g} \quad (9.36)$$

Para la propela marina en el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 3.14, fila 3, columna 2, Cuadro 2.11, fila 11, columna 2 y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{(3.255)^2 \cdot 0.089}{9.81} = 0.0961$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.38, fila 2, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular el número de Froude del impulsor inferior cada vez que fue necesario.

- **Cálculo del número de Froude crítico del impulsor inferior en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo del número de Froude crítico del impulsor inferior se utilizó la siguiente ecuación:

$$Fr_c = 7.6 \cdot Fl + 0.0127 \quad (9.37)$$

Para la propela marina en el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 8.38, fila 1, columna 2 y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$7.6 \cdot 0.0072 + 0.0127 = 0.0678$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.38, fila 3, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular el número de Froude crítico del impulsor inferior cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la potencia eléctrica del motor en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la potencia eléctrica del motor se utilizó la siguiente ecuación:

$$P_{E,M} = \frac{P_{G,V} \cdot V_L}{\varphi_M} \quad (9.38)$$

Para el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 8.33, fila 1, columna 2, Cuadro 2.11, fila 3, columna 2, tomando la eficiencia del motor como 0.7 y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{66.638 \cdot 0.05}{0.7} = 4.760 \text{ W}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.39, fila 1, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la potencia eléctrica del motor cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la potencia específica del compresor por la compresión adiabática del gas en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la potencia específica del compresor por la compresión adiabática del gas se utilizó la siguiente ecuación:

$$W_C = \frac{R \cdot T}{MM_G \cdot \gamma^*} \cdot \left[\left(\frac{P_2}{P_1} \right)^{\gamma^*} - 1 \right] \quad (9.39)$$

La temperatura del gas se tomó como 25 °C, considerando etapas de enfriamiento dentro del compresor que permitiesen mantener la misma temperatura en la entrada y salida, además, la masa molar del gas (aire) se tomó como 28.965 g/mol y la razón de capacidades caloríficas específicas se tomó como 1.4 (McCabe, Smith, & Harriot, 2007). El cálculo de la razón de Gamma:

$$\gamma^* = \frac{\gamma - 1}{\gamma} \quad (9.40)$$

$$\gamma^* = \frac{1.4 - 1}{1.4} = 0.2857$$

Considerando la presión de entrada como 90 kPa y la presión de salida como 296.842 kPa, la potencia específica del compresor por la compresión adiabática del gas, usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{8.3145 \cdot 298.15 \cdot 1000}{28.965 \cdot 0.2857} \cdot \left[\left(\frac{296842}{90000} \right)^{0.2857} - 1 \right] = 1.739 \times 10^5 \text{ J/kg}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.39, fila 2, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la potencia específica del compresor por la compresión adiabática del gas en el biorreactor de 3 L.

- **Cálculo de la potencia eléctrica del compresor en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la potencia eléctrica del compresor se utilizó la siguiente ecuación:

$$P_C = \frac{\rho_G \cdot Q_G \cdot W_C}{\varphi_C} \quad (9.41)$$

Para el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 3.14, fila 1, columna 2, Cuadro 8.39, fila 2, columna 2, empleando la densidad del gas calculada anteriormente, tomando la eficiencia del compresor como 0.7 y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{3.468 \cdot 1.663 \times 10^{-5} \cdot 1.739 \times 10^5}{0.7} = 10.029 \text{ W}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.39, fila 3, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la potencia eléctrica del compresor cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la eficiencia de mezclado en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la eficiencia de mezclado se utilizó la siguiente ecuación:

$$EM = \frac{1}{P_{tot} \cdot t_{95}} \quad (9.42)$$

Para el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 8.39, fila 4, columna 2, Cuadro 8.37, fila 1, columna 2, y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{1}{14.789 \cdot 17.368} = 3.893 \times 10^{-3} \text{ J}^{-1}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.40, fila 1, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la eficiencia de mezclado cada vez que fue necesario.

- **Cálculo de la eficiencia en la transferencia de oxígeno en el biorreactor de 70 L**

Para el cálculo de la eficiencia en la transferencia de oxígeno se utilizó la siguiente ecuación:

$$ETO = \frac{k_L a}{P_{tot}} \quad (9.43)$$

Para el primer escenario del caso A, utilizando los datos del Cuadro 8.39, fila 4, columna 2, Cuadro 8.33, fila 4, columna 2, y usando los valores de las variables en unidades del SI:

$$\frac{1.259 \times 10^{-2}}{14.789} = 8.515 \times 10^{-4} \text{ J}^{-1}$$

Resultado que se encuentra en el Cuadro 8.40, fila 2, columna 2. El mismo procedimiento se utilizó para calcular la eficiencia en la transferencia de oxígeno cada vez que fue necesario.

Capítulo 10. Apéndice D. Procedimiento experimental

En esta sección se presenta el procedimiento que se utilizó para llevar a cabo algunas actividades a nivel de laboratorio. Se incluyen únicamente los procedimientos que se consideran particulares o de especial importancia para la obtención de los resultados. No se incluye la descripción de procedimientos rutinarios. Para más información sobre la operación del bio-reactor se recomienda referirse al manual de operación (Applikon Biotechnology, 2008).

10.1 PREPARACIÓN DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Debido a las interacciones entre algunos componentes de los medios de cultivo, éstos se prepararon a partir de soluciones individuales con uno o varios componentes (que no presentaran interacciones), las cuales se esterilizaron por aparte y se mezclaron de forma estéril. A continuación, se describe cada solución.

- **Solución GK:** Se pesaron 6.0 g de glucosa, 0.1 g de KH_2PO_4 y 0.1 g de K_2HPO_4 en una balanza analítica y se disolvieron en agua destilada (volumen según el medio de cultivo). La solución se colocó en una botella de vidrio Pyrex de 500 mL y se ajustó el pH a 5.5 con HCl 1M antes de esterilizarse. La solución se autoclavó a 121 °C durante 20 min.
- **Solución P:** Se pesó 1.0 g de Peptona y 1.0 g de Extracto de Levadura en una balanza analítica y se disolvieron en 50 mL de agua destilada (medidos con un balón aforado). Se colocó la solución en una botella de vidrio Pyrex de 250 mL y se ajustó el pH a 5.5 con HCl 1M antes de esterilizarse. La solución se autoclavó a 121 °C durante 20 min.
- **Solución Mg:** Se pesó 0.1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en una balanza analítica y se disolvió en 10 mL de agua destilada (medidos con balón aforado). La solución se colocó en un vial de vidrio y se autoclavó a 121 °C durante 20 min.

- **Solución Ca:** Se pesaron 0.29 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en una balanza analítica y se disolvieron en 10 mL de agua destilada (medidos con balón aforado). La solución se colocó en un vial de vidrio y se autoclavó a 121 °C durante 20 min.
- **Solución Cu:** Se pesaron 0.05 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en una balanza analítica y se disolvieron en 10 mL de agua destilada (medidos con balón aforado). La solución se colocó en un vial de vidrio y se esterilizó utilizando un filtro de 0.22 μm una vez que se añadió a la mezcla.
- **Solución B1:** Se pesó 0.01 g de tiamina (vitamina B1) en una balanza analítica y se disolvió en 10 mL de agua destilada (medidos con balón aforado). La solución se colocó en un vial de vidrio y se esterilizó utilizando un filtro de 0.22 μm una vez que se añadió a la mezcla.
- **Solución A:** Se midieron 10 mL de aceite de oliva con una probeta y se colocaron en un vial de vidrio. El vial se autoclavó a 121 °C durante 20 min. Para añadir la cantidad requerida a la mezcla correspondiente se utilizó una micropipeta con puntas estériles.

Posterior a la esterilización, las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente y se mezclaron dentro de la cámara de bioseguridad, utilizando la solución GK como base. La mezcla de las soluciones se realizó de acuerdo con la composición del medio de cultivo correspondiente, como se puede ver en el cuadro.

Cuadro 10.1. Volumen de las disoluciones utilizadas en la preparación de los diferentes medios de cultivo.

Medio de Cultivo	Volumen de disolución (mL)							Total
	GK	P	Mg	Ca	Cu*	B1*	A**	
A	110.0	50.0	10.0	10.0	10.0	10.0	2.0	200.0
B	120.0	50.0	10.0	10.0	10.0	-	2.0	200.0
C	130.0	50.0	10.0	-	-	10.0	2.0	200.0
D	140.0	50.0	10.0	-	-	-	2.0	200.0
E	110.0	50.0	10.0	10.0	10.0	10.0	-	200.0
F	120.0	50.0	10.0	10.0	10.0	-	-	200.0
G	130.0	50.0	10.0	-	-	10.0	-	200.0
H	140.0	50.0	10.0	-	-	-	-	200.0

*Adicionados al medio utilizando filtro de 0.22 μm .

**No se toma en cuenta para el cálculo del volumen.

10.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

La biomasa que se utilizó como inóculo para las pruebas de concentración de inóculo, cinética de crecimiento, selección de impulsores y flujo de aire, se preparó de la siguiente manera.

1. Se preparó uno o varios cultivos del organismo colocando 50 mL del medio C2 en matraces de 250 mL e inoculando con tres discos de biomasa cultivada en PDA por 7 días. La cantidad de matraces dependió de la cantidad de biomasa requerida para cada prueba. El cultivo se colocó en un agitador orbital a 100 rpm y temperatura ambiente para su crecimiento por 8 días.
2. Después de los 8 días, el contenido de los matraces se combinó en uno solo, se agitó cuidadosamente por un minuto para homogenizar, y se filtró a través de un colador metálico estéril, dentro de la cámara de flujo laminar.
3. El contenido del colador se trasvasó a una placa Petri estéril para mayor facilidad de manipulación.
4. Para el caso de las pruebas de concentración de inóculo y cinética de crecimiento, los matraces de cada tratamiento se llenaron con 50 mL de medio C2, se colocaron sobre una balanza semianalítica y se marcó el cero.
5. Con una espátula estéril, se colocó la cantidad de biomasa requerida en cada matraz hasta alcanzar el peso correspondiente según el tratamiento. Posteriormente el matraz se tapó y se sacó de la cámara.
6. Para el caso de las pruebas en biorreactor, el pesado de la cantidad de biomasa correspondiente se llevó a cabo en un beaker estéril en lugar de hacerlo directamente sobre un matraz. El procedimiento para inocular el biorreactor se describe en la siguiente sección.

10.3 PREPARACIÓN DEL BIORREACTOR DE 3 L

La preparación del biorreactor consistió en el lavado, sanitización, armado, esterilización, llenado e inoculación del equipo. A continuación, se describe estos pasos con mayor detalle.

10.3.1 Esterilización, calibración del sensor de pH y llenado del biorreactor

Posterior al armado del equipo, se llevaron a cabo los siguientes pasos.

1. Se calibró el sensor de pH entre 4.0 y 7.0 siguiendo el procedimiento descrito en el manual de operación del equipo.
2. Se esterilizó el equipo, vacío, en la autoclave a 121 °C por 25 min.
3. Se cambió la tapa de la botella que contenía el medio de cultivo por una tapa con una manguera interna que llegaba hasta el fondo de la botella. El medio de cultivo se colocó afuera del refrigerador para que alcanzara temperatura ambiente.
4. Una vez que se enfrió el biorreactor, éste se acopló a la botella que contenía el medio a través de mangueras con conexiones estériles tipo macho-hembra.
5. La botella se colocó sobre una plantilla de agitación magnética para homogenizar el contenido (esto por la presencia de una fase oleosa inmisible).
6. El medio de cultivo se bombeó hacia el biorreactor con una bomba peristáltica. Una vez que se trasvasó todo el contenido, se cerró la manguera con una prensa metálica.
7. Se conectaron los sensores, el motor, la manguera del flujo de aire, la manta térmica y el flujo de agua del condensador. Se encendieron los controladores del equipo para estabilizar los valores de las variables controladas en su “set point” y se dejó operando por 24 horas.

10.3.2 Calibración del sensor de oxígeno disuelto, medición del k_{La} e inoculación del biorreactor

Transcurrido el tiempo de acondicionamiento del biorreactor cargado, se siguieron los siguientes pasos.

1. Se verificó que el medio de cultivo no estuviese contaminado, lo cual se realizó observando el color del medio de cultivo y el olor del gas de salida. En caso de que hubiera sospechas de contaminación, se tomó una muestra del medio y se realizó una tinción de Gram, posterior a la cual se observó la muestra al microscopio para verificar la presencia o ausencia de bacterias o levaduras.

2. En caso de que no se detectará contaminación, el siguiente paso fue calibrar el sensor de oxígeno mediante el establecimiento del valor correspondiente al 100% de saturación del medio.
3. Se realizó la determinación del k_La por medio del método dinámico. Para esto, se apagó el flujo de aire y se introdujo nitrógeno hasta que el porcentaje de oxígeno disuelto bajara a cero. Posteriormente, se reinició el flujo de aire (usando el flujo particular para la corrida correspondiente) y se recopiló la variación en el porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al tiempo por medio de una grabación de video hasta que éste llegase nuevamente al 100%. El tiempo se midió con un cronómetro.
4. Para inocular el biorreactor, el primer paso fue extraer aproximadamente 400 mL de medio de cultivo hacia una botella estéril de 1 L, a través de la manguera de toma de muestra.
5. Posteriormente, la biomasa pesada en el punto 6 de la sección 10.2 se resuspendió en poco del medio antes de trasvasarse hacia un matraz estéril de 500 mL. El matraz contó con una salida lateral en la sección inferior sobre la cual se conectó una manguera con una conexión macho-hembra. La boca del matraz se cerró con un tapón de hule que contó con una entrada de aire sobre la que se colocó un filtro de 0.22 μm . Después de trasvasar la biomasa, se vertió el resto del medio de cultivo dentro del matraz.
6. Seguidamente, se acopló el matraz al biorreactor a través del puerto de inoculación y se vertió su contenido hacia el biorreactor, por gravedad. Durante el trasvase se apagó el flujo de aire y la agitación. Una vez trasvasado, se desacopló el matraz y se cerró la manguera con una prensa metálica.
7. Finalmente, todos los controladores se reactivaron y se inició la recopilación de los valores de temperatura, pH, oxígeno disuelto y agitación en el software particular del biorreactor.