



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y
MATERIALES

**DISEÑO DE UNA ESTRATEGIA DE ESCALAMIENTO DE UN
BIORREACTOR PARA EL CRECIMIENTO DE CONSORCIOS DE HONGOS
MARINOS FILAMENTOSOS.**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO

FRANCISCO GABRIEL PARDO PÉREZ

PROFESORA GUÍA:

María Elena Lienqueo Contreras

PROFESORA CO GUÍA:

Irene Martínez Basterrechea

COMISIÓN:

Catalina Landeta Salgado

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por:
Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CeBiB, FB0001

SANTIAGO DE CHILE

2023

DISEÑO DE UNA ESTRATEGIA DE ESCALAMIENTO DE UN BIORREACTOR PARA EL CRECIMIENTO DE CONSORCIOS DE HONGOS MARINOS FILAMENTOSOS.

En las últimas décadas, la búsqueda de fuentes alternativas de proteína como fuente de alimento ha incrementado. En particular, se busca reemplazar la tradicionalmente consumida proteína animal por una alternativa cuya producción sea más sustentable. Dentro de las alternativas estudiadas se encuentra la producción de hongos y micoproteína proveniente del cultivo de estos, gracias a sus altos niveles de vitaminas, minerales y proteínas, además de poseer todos los aminoácidos esenciales, estos son calificados como un alimento altamente nutritivo y bajo en grasas, haciéndolos una buena alternativa a la proteína animal.

El cultivo de hongos alimenticios (basidiomicetos) se realiza mediante fermentación en sustrato sólido, tardando entre 10 y 30 días, requiriendo grandes cantidades de terreno y sustrato, además, la cantidad y calidad del producto varía y existen problemas asociados a trazabilidad y riesgos sanitarios. Este proceso puede mejorar a través de la utilización de fermentación sumergida que permite controlar las condiciones de operación para mejorar las deficiencias del proceso y reducir el tiempo de crecimiento a solo días. En esta aplicación se estudió la fermentación sumergida de hongos marinos filamentosos en un biorreactor agitado en búsqueda de la máxima producción posible de biomasa y proteína total.

El objetivo general del trabajo es el diseño de una estrategia de escalamiento desde una escala de laboratorio a una escala piloto e industrial, para esto se reprodujo en el laboratorio, el proceso de fermentación con un consorcio de hongos en dos etapas, usando condiciones de operación óptimas para el crecimiento de la biomasa y producción de proteína total. Se extrajeron muestras a lo largo del proceso para medir y estudiar parámetros del sistema tales como la viscosidad y la densidad que serían utilizados para la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_La) mediante un método teórico en base al uso de correlaciones, el coeficiente obtenido será usado como base para el escalamiento.

Los resultados de la estimación del k_La se validaron al reproducir los resultados de un sistema similar, utilizando el mismo método usado en este trabajo, alcanzando un coeficiente de determinación superior a $R^2 = 0.886$. Además, se determinó el k_La mediante el método del degaseo, este reportó resultados del mismo orden que los previamente obtenidos. Mediante esta validación, se ajustó el método teórico al sistema con tal de disminuir la incertidumbre asociada a la estimación. Finalmente, usando las correlaciones con parámetros ajustados, se determinaron las condiciones de operación que permitirían mantener el k_La deseado a una mayor escala, lo cual permitió finalizar el diseño de la estrategia de escalamiento.

Se proyecta que el uso de la estrategia descrita en la sección Estrategia de escalamiento 4.7, permita obtener una estimación de las condiciones de operación necesarias para mantener el k_La determinado en laboratorio y obtener resultados óptimos de crecimiento de biomasa. Se recomienda que al ajustar las condiciones de operación, se preste atención al aumento de esfuerzos de corte y su posible efecto negativo en el crecimiento de biomasa.

Agradecimientos

Quiero agradecer a las profesoras María Elena Lienqueo e Irene Martínez por su ayuda en el desarrollo de este memoria, por su mentoría en términos académicos, su apoyo en facilitar las gestiones necesarias a lo largo del trabajo y su siempre presente buena disposición.

Al Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CeBiB, por financiar esta investigación y permitirme desarrollar este trabajo.

A Catalina Landeta por guiarme en el trabajo experimental y facilitar todo lo necesario para realizar los experimentos diseñados, además, por ser un apoyo en la discusión de los resultados obtenidos a lo largo del trabajo.

A Valentina y Javiera quienes me enseñaron y ayudaron a llevar a cabo la puesta en marcha de los experimentos. A quienes pertenecen al CeBiB y prestan ayuda para facilitar el trabajo en el laboratorio.

A la profesora María Luisa Cordero del Laboratorio de Física de la Materia Activa del DFI por facilitar y ayudar en la medición de densidad. Al profesor Aldo Tamburrino del departamento de Ingeniería Civil por gestionar y facilitar las mediciones de viscosidad. A Bryan Valenzuela por apoyar y ayudar con las numerosas mediciones de viscosidad.

A mi madre y a mi padre quiénes me formaron y apoyaron toda mi vida, tarea que hicieron con mucho cariño y comprensión, siendo una parte importante de la persona en la me convertí hoy. A mi hermana por su apoyo, camaradería y guía a lo largo de estos años.

A mis amigos de la vida, con quiénes crecimos y compartimos muchas experiencias juntos. A quienes me han acompañado a lo largo de mi vida universitaria y por los buenos momentos compartidos.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Motivación y problemática	1
1.2. Antecedentes Generales	2
1.2.1. Fermentación sumergida como alternativa	2
1.2.2. Configuraciones del biorreactor	3
1.3. Descripción del proyecto	4
1.4. Objetivos	5
2. Marco Teórico	6
2.1. Parámetros relevantes para el crecimiento de microorganismos	6
2.1.1. Temperatura	6
2.1.2. pH	7
2.1.3. Viscosidad	7
2.1.4. Agitación	7
2.1.5. Oxígeno disuelto	8
2.2. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa	8
2.3. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa	11
2.3.1. Método teórico	11
2.3.2. Métodos experimentales	13
2.3.2.1. Métodos químicos	14
2.3.2.2. Métodos físicos	15
2.4. Escalamiento del biorreactor	17
3. Metodología	19
3.1. Reproducción de condiciones de operación en la fermentación a escala laboratorio.	19
3.2. Medición de densidad	23
3.3. Medición de viscosidad	23
3.4. Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa mediante correlaciones empíricas	26
3.5. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa mediante métodos experimentales	27
3.6. Ajuste del método teórico para la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa.	28
3.7. Diseño de la estrategia de escalamiento.	29
4. Resultados y Discusión	30
4.1. Reproducción de condiciones de operación óptimas en escala de laboratorio. .	30

4.2.	Determinación de Densidad y Viscosidad mediante mediciones experimentales	30
4.2.1.	Muestra 1: Medio de cultivo	32
4.2.2.	Muestra 2: Primer inóculo	33
4.2.3.	Muestra 3: Segundo inóculo	34
4.2.4.	Muestra 4: Fermentación finalizada	36
4.3.	Cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia por etapa mediante correlaciones	37
4.4.	Determinación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de masa	38
4.5.	Ajuste del método teórico para la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa	41
4.6.	Validación de la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa mediante correlaciones.	42
4.7.	Estrategia de escalamiento	46
4.8.	Condiciones de operación para escala industrial.	48
4.8.1.	Condiciones de operación para primera etapa del proceso de fermentación (Primer inóculo).	48
4.8.2.	Condiciones de operación para segunda etapa del proceso de fermentación (Segundo inóculo).	49
5.	Conclusiones	50
6.	Recomendaciones y proyecciones futuras	52
	Bibliografía	54
	Anexos	57
A.	Resultados medición de viscosidad	57
A.1.	Muestra 1: Medio de cultivo	57
A.2.	Muestra 2: Primer inóculo	59
A.3.	Muestra 3: Segundo inóculo	61
A.4.	Muestra 4: Fermentación finalizada	63
B.	Memoria de cálculo de la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$	65
C.	Memoria de cálculo condiciones de operación a escala industrial	67

Índice de Tablas

1.1.	Características geométricas relevantes del reactor utilizado a escala laboratorio (Landeta C, 2023).	4
1.2.	Condiciones de operación en distintas etapas del proceso de fermentación (Landeta C, 2023) [15].	5
3.1.	Condiciones de operación en distintas etapas del proceso de fermentación (Landeta C, 2023) [15].	21
4.1.	Indicación de la etapa del proceso de fermentación correspondiente a cada muestra.	31
4.2.	Resultados estimación teórica del coeficiente volumétrico de transferencia de masa k_La para distintas etapas del proceso de fermentación.	37
4.3.	Características geométricas relevantes para la estimación del k_La , del reactor utilizado a escala laboratorio en trabajo de referencia [31].	42
4.4.	Características geométricas del reactor de 100 L LAOBAO relevantes para la determinación de las condiciones de operación [41].	48
4.5.	Condiciones de operación en la primera etapa del proceso de fermentación a escala industrial.	49
4.6.	Condiciones de operación en la primera etapa del proceso de fermentación a escala industrial.	49
B.1.	Características geométricas relevantes del reactor utilizado a escala laboratorio.	65
B.2.	Condiciones de operación en distintas etapas del proceso de fermentación. . . .	65
C.1.	Características geométricas relevantes del reactor utilizado a escala laboratorio.	67
C.2.	Condiciones de operación en distintas etapas del proceso de fermentación. . . .	67
C.3.	Características geométricas del reactor de 100 L LAOBAO relevantes para la determinación de las condiciones de operación.	68

Índice de Ilustraciones

2.1.	Etapas y resistencias a la transferencia de oxígeno desde el gas a la célula. Adaptación de [13]	9
2.2.	Representación esquemática de la interfase gas-líquido, concentraciones y coeficientes de transferencia de masa K_L , k_L y k_G según la teoría de doble capa. Adaptación de [13]	10
2.3.	Descripción esquemática de la técnica dinámica de desorción-absorción de oxígeno. Adaptación de [13]	15
3.1.	Tapa y vaso del reactor desarmada que ya ha pasado por el proceso de limpieza.	19
3.2.	Tapa del reactor armada.	20
3.3.	Reactores utilizados en el laboratorio para el proceso de fermentación.	21
3.4.	Reactor de 5L en funcionamiento.	22
3.5.	Aireación de un reactor con volumen de operación de 1L (1,5 vvm).	22
3.6.	Cilindro concéntrico para medición.	24
3.7.	Intercambiador de calor para el reómetro.	24
3.8.	Reómetro en proceso de ajuste de temperatura.	25
3.9.	Reómetro comenzando la medición.	25
4.1.	Viscosidad en función de la tasa de corte para la Muestra 1: Medio de cultivo (sin hongos) N=2.	32
4.2.	Viscosidad en función de la tasa de corte para la Muestra 2: Primer inóculo. N=2	33
4.3.	Viscosidad en función de la tasa de corte para la muestra 3, con tasa de corte superior a los 200 [1/s] en los casos de muestra homogeneizada y no homogeneizada. N=3	34
4.4.	Viscosidad en función de la tasa de corte para dos de las mediciones realizadas a la Muestra 3 sin homogeneizar: Segundo inóculo.	35
4.5.	Viscosidad en función de la tasa de corte para la Muestra 4 sin homogeneizar: Fermentación finalizada. N=2	36
4.6.	Datos experimentales de porcentaje de oxígeno disuelto (DOT) durante la reairación en el reactor con volumen de operación de 1,5 L, aireación de 1,1 vvm y agitación de 50 RPM. Elaboración propia. N=1	39
4.7.	Logaritmo natural de la fuerza motriz de transferencia de oxígeno y su respectiva linealización en función del tiempo.	40
4.8.	Comparación de $k_L a$ en función de la velocidad de agitación para valores experimentales del trabajo de referencia y valores determinados de forma teórica mediante correlaciones a una aireación de 0.5 vvm.	42
4.9.	Comparación de $k_L a$ en función de la velocidad de agitación para valores experimentales y valores determinados de forma teórica mediante correlaciones a una aireación de 1.0 vvm.	43

4.10.	Comparación de $k_L a$ en función de la velocidad de agitación para valores experimentales y valores determinados de forma teórica mediante correlaciones a una aireación de 1.5 vvm.	43
4.11.	Comparación de $k_L a$ en función de la velocidad de agitación para valores experimentales y valores determinados de forma teórica mediante correlaciones a una aireación de 0.5 vvm en el rango entre 100 y 200 [RPM].	44
4.12.	Comparación de $k_L a$ en función de la velocidad de agitación para valores experimentales y valores determinados de forma teórica mediante correlaciones a una aireación de 1.0 vvm en el rango entre 100 y 200 [RPM].	45
4.13.	Comparación de $k_L a$ en función de la velocidad de agitación para valores experimentales y valores determinados de forma teórica mediante correlaciones a una aireación de 1.5 vvm en el rango entre 100 y 200 [RPM].	45
4.14.	Diagrama estrategia de escalamiento. Elaboración propia.	47
A.1.	Viscosidad en función de la tasa de corte para la muestra 1.	57
A.2.	Viscosidad en función de la tasa de corte para la muestra 1 en un rango de tasa de corte entre 120 y 175 [1/s]	58
A.3.	Totalidad de los datos obtenidos de viscosidad en función de la tasa de corte para la medición realizada a la muestra 2	59
A.4.	Viscosidad en función de la tasa de corte para la medición realizada a la muestra 2 a una tasa de corte superior a los 180 [1/s]	59
A.5.	Viscosidad en función de la tasa de corte para la medición realizada a la muestra 2 en un rango	60
A.6.	Viscosidad en función de la tasa de corte para tres mediciones realizadas a la muestra 3 en los casos de muestra homogeneizada y no homogeneizada.	61
A.7.	Viscosidad en función de la tasa de corte para tres mediciones realizadas a la muestra 3 para tasa de corte superior a los 200 [1/s] en los casos de muestra homogeneizada y no homogeneizada.	61
A.8.	Viscosidad en función de la tasa de corte para tres mediciones realizadas a la muestra 3 para una rango de tasa de corte entre los 370 y 420 [1/s] en los casos de muestra homogeneizada y no homogeneizada.	62
A.9.	Viscosidad en función de la tasa de corte para las mediciones realizadas a la muestra 4.	63
A.10.	Viscosidad en función de la tasa de corte para dos de las mediciones realizadas a la muestra 4.	64
A.11.	Viscosidad en función de la tasa de corte para dos de las mediciones realizadas a la muestra 4.	64

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivación y problemática

En los últimos años, el cultivo de hongos es una industria que ha ganado atención. Los hongos han sido considerados como una fuente de alimento altamente deseada por décadas debido a su valor nutricional y grato sabor. Son ricos en fibras, contienen amino ácidos esenciales tales como la vitamina D_2 , vitaminas del grupo B y su contenido de grasa es bajo [1]. Dadas estas características y su bajo contenido energético, los hace un alimento ideal para dietas de bajas calorías [2] [3]. Bajo esta premisa, se espera que la demanda de proteína de origen fúngico crezca en los próximos años, identificando como problemática base para este trabajo, el desarrollo de métodos para suplir la demanda mencionada.

Reportes señalan que la demanda anual de hongos a nivel global durante el año 2020 fue de 14,35 millones de toneladas, y que se proyecta que durante el período 2021-2028 la demanda crezca de los 15,25 millones de toneladas hasta las 24,05 millones de toneladas. Junto con las características nutricionales previamente mencionadas, parte del crecimiento de la demanda proyectada para este producto recae en el creciente interés del público por dietas basadas en plantas, siendo la proteína de origen fúngico un posible reemplazo a proteínas animales [4].

Otros factores que explican las proyecciones de aumento de la demanda del producto, son su versatilidad en términos gastronómicos, que les han permitido ser incluidos como ingrediente en suplementos alimenticios, la adición a sopas y un gran número productos innovadores, tales como en pastelería y cafetería. Estos antecedentes permiten verificar que en los próximos años la demanda de este producto se mantendrá relevante y en aumento y que la problemática estudiada forma parte de un mercado en crecimiento.

A pesar del gran potencial como alimento nutritivo y bajo en calorías que poseen los hongos, su producción no está exenta de restricciones, esta requiere de un alto nivel de control para mantener el cultivo en óptimas condiciones que permitan obtener un producto consistente y de alta calidad [5]. En particular el cultivo en estado sólido puede tardar varios meses, requiere de grandes cantidades de espacio y sustrato para el crecimiento de estos, es sensible a diversos factores tales como: pH, temperatura, suministro de agua, calidad y heterogeneidad del sustrato, entre otros [6]. La compleja labor de controlar estos factores en las condiciones de cultivo en estado sólido de los hongos que es usualmente realizada sobre los residuos agrícolas de plantaciones de maíz, trigo y otros, provoca variabilidad en el producto obtenido [7]. La inversión en sistemas de control que permitan mantener estos parámetros en óptimas condiciones es costoso por lo que se buscan alternativas a la producción de hongos.

Como respuesta a las problemáticas presentadas para el cultivo en sustrato sólido de hongos, surgen los métodos de cultivo sumergido los cuales permiten el control de parámetros como pH, temperatura y aireación de forma precisa que permite la obtención de un producto más consistente y de mejor calidad [8]. El crecimiento de células fúngicas en equipos de cultivo sumergido es posible gracias al uso de un medio de cultivo que suministra todo el sustrato necesario para la fermentación, junto con la ayuda de sistemas que suministran mezcla y aireación.

1.2. Antecedentes Generales

1.2.1. Fermentación sumergida como alternativa

El proceso de fermentación sumergida como método de cultivo sumergido, es el crecimiento de hongos en un medio acuoso en donde los nutrientes son disueltos en el medio, se suministra oxígeno y se acude a la agitación mecánica para reforzar la difusión de ambos. Este método posee beneficios tales como una mejor transferencia de oxígeno, permite tener condiciones de cultivo homogéneas, habilita el control de factores como la temperatura, suministro de oxígeno, pH, agitación, entre otros, y principalmente, permite reducir el tiempo de cultivo desde posibles meses en cultivos sólidos a solo días en cultivos sumergidos [9].

La fermentación sumergida de hongos ha probado ser efectiva para diversas especies y en distintas condiciones, en lo que respecta a hongos usados para el consumo como alimento, destaca la producción de *Agaricus bisporus*, esta especie representa el 34-45 % de la producción de hongos comestibles a nivel mundial y el cultivo sumergido de esta especie ha demostrado ser eficiente y mejorar la producción de productos secundarios tales como polisacáridos [10].

Esta tecnología también se ha vuelto útil para lidiar con problemáticas técnicas de la producción de hongos en cultivos en estado sólido, tal es el caso para la producción de hongos de la familia *Cordyceps* que es utilizada en China por sus propiedades medicinales. El pequeño tamaño del hongo y las estrictas condiciones necesarias para su correcto cultivo, las cuales limitan la zona geográfica apta para su crecimiento, son condiciones que dificultan su producción en estado sólido. El cultivo sumergido de esta especie surge como una alternativa para masificar su producción, permitiendo asegurar las condiciones de operación necesarias para su crecimiento, y una extracción efectiva a pesar de su pequeño tamaño [11]. La versatilidad del cultivo sumergido de hongos lo hace un método prometedor y que permitirá optimizar y estandarizar la producción de hongos para suplir la demanda creciente de este tipo de productos y sus subproductos.

1.2.2. Configuraciones del biorreactor

El cultivo sumergido de diversos productos de carácter biológico requiere de equipos en los cuales sea posible propiciar condiciones de operación óptimas para su crecimiento, asegure la inocuidad del medio y que sea eficiente en términos de costos tanto de tiempo como económicos. Bajo esta premisa es que se estudian las diversas configuraciones de biorreactores que son capaces de llevar a cabo esta tarea, cumpliendo con los requerimientos previamente explicitados. Estos incluyen reactores de tanque agitado y de tipo airlift.

El propósito de ambas configuraciones es poder suministrar y controlar las condiciones de operación, tales como temperatura, agitación, pH, oxígeno disuelto y sustrato, con el fin de obtener un producto de calidad alta y constante. La principal característica de los tanques agitados es la existencia de un agitador que contribuye a los fenómenos de transferencia de masa y calor, la mezcla del medio y gracias a su aporte en la transferencia de oxígeno, facilita la aireación del medio. En lo que respecta a su aplicación en el cultivo de hongos, la mayor ventaja de esta configuración es que mediante la regulación de la velocidad y configuración del agitador, es posible controlar la forma en que crecen los conglomerados [12], esto puede ser útil cuando se identifica que la producción de biomasa o subproducto de interés es óptima bajo ciertas formaciones. Experimentos han determinado que la producción de biomasa en la especie estudiada es mayor cuando existe una formación de conglomerados de tamaño intermedio, esto indica que de las posibles configuraciones de biorreactores disponibles para el cultivo, el uso de un reactor de tanque agitado es más beneficioso en comparación a un reactor del tipo airlift.

Dada una configuración para el biorreactor en que se realizará el cultivo, es necesario estudiar el efecto de los diversos parámetros que afectan el proceso para determinar su relevancia en los resultados, poder ajustar los experimentos en caso de obtener resultados no deseados y determinar cual de los parámetros es más relevante y que será crucial para la realización del escalamiento. Considerando que este trabajo no considera el estudio de la preparación del medio y el inóculo, y que los parámetros de pH y temperatura óptimos para el proceso de fermentación ya han sido fijados, el análisis solo considerará el estudio de los parámetros de oxígeno disuelto y agitación.

1.3. Descripción del proyecto

En búsqueda de aportar al desarrollo y uso de esta tecnología, se realizará el estudio de un sistema de cultivo sumergido de hongos marinos filamentosos realizado a escala de laboratorio con el fin de reproducir aquellas condiciones operacionales que mediante estudios previos han probado obtener los mejores resultados en términos de producción de biomasa, producción de proteína total y perfil de aminoácidos. La realización de mediciones de viscosidad del sistema en distintos puntos del proceso de fermentación y de la concentración de oxígeno disuelto a lo largo de este, permitirán mediante métodos teóricos y experimentales, la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa k_{La} el cual entrega información sobre la transferencia de oxígeno desde el medio a las células en crecimiento, aspecto relevante en el crecimiento de microorganismos aeróbicos como los presentes en el sistema en estudio [13].

Tras la obtención del mencionado parámetro que describe un aspecto fundamental del sistema, este será utilizado como la base para el diseño de una estrategia de escalamiento para el biorreactor. El mencionado diseño buscará establecer un procedimiento que permita llevar sistemas en estudio desde una escala de laboratorio, a una escala piloto y posteriormente a escala industrial, obteniendo las condiciones de operación necesarias para reproducir la óptima producción de los productos de interés a una mayor escala.

Dado el carácter confidencial de parte de la tecnología en desarrollo utilizada en este trabajo, información sobre las especies de hongos utilizadas y la composición del medio de cultivo para su crecimiento, no serán presentadas directamente en este trabajo, pero son similares a aquellos presentados en el trabajo “Mycoprotein and hydrophobin like protein produced from marine fungi *Paradendryphiella salina* in submerged fermentation with green seaweed *Ulva* spp.” de Catalina Landeta et. al [14].

A continuación, se presenta la Tabla 1.1, en esta se encuentran las características geométricas relevantes para el estudio del sistema que se describe y que corresponden al equipo que fue utilizado para realizar el proceso de fermentación a escala de laboratorio:

Tabla 1.1: Características geométricas relevantes del reactor utilizado a escala laboratorio (Landeta C, 2023).

Parámetro	Magnitud	Unidad de medida
Volumen máximo	3	[L]
Diámetro impeller	5,2	[cm]
Diámetro interno	13	[cm]
Número de impellers	2	-
Tipo de impeller	Rushton	-

A continuación se presenta la Tabla 1.2, en esta se exhiben los parámetros de operación que son usados en la escala de laboratorio para la obtención preliminar de la mejor producción de proteína total, estas condiciones cambian a lo largo de las etapas de la fermentación, dividiéndose en dos sets de condiciones, una para la etapa posterior a la adición del primer inóculo, y un set utilizado una vez es añadido el segundo inóculo, cabe destacar que para cada inóculo se usan distintos hongos.

Tabla 1.2: Condiciones de operación en distintas etapas del proceso de fermentación (Landeta C, 2023) [15].

Etapa/Parámetro	Temperatura [°C]	Agitación [RPM]	Aireación [vvm]	Volumen de operación [L]
Primer inóculo	25-27	50	1,1	1,5
Segundo inóculo	25-27	100	1,5	1,7

La estrategia a diseñar en este trabajo, usará las condiciones de operación presentadas y las características geométricas del equipo utilizado para determinar aquellas condiciones de operación que deberán ser utilizadas en equipos de mayor escala.

1.4. Objetivos

Objetivo General: Diseñar una estrategia para el escalamiento de un biorreactor del tipo tanque agitado de cultivo sumergido de un consorcio de hongos marinos filamentosos a un nivel de planta piloto-industrial.

Los objetivos específicos que permitirán cumplir el objetivo general son:

- Reproducir las condiciones de operación en la escala de laboratorio que han sido reportadas como óptimas para el crecimiento de biomasa y obtención de proteína total en el sistema en estudio.
- Determinar la viscosidad del medio de cultivo y estimar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa k_La mediante correlaciones empíricas.
- Determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa mediante métodos experimentales y ajustar el método teórico para la estimación de dicho coeficiente a partir de los datos experimentales obtenidos.
- Validar la metodología utilizada en base a resultados reportados para un sistema similar en literatura.
- Escalar el proceso desde el nivel de laboratorio a nivel de planta piloto e industrial usando criterios ingenieriles en base a mantener el k_La constante en ambas escalas.

Capítulo 2

Marco Teórico

En esta sección se presentarán y discutirán los factores más relevantes a considerar para construir la metodología y llevar a cabo el trabajo planteado.

2.1. Parámetros relevantes para el crecimiento de microorganismos

2.1.1. Temperatura

La temperatura es un parámetro relevante para el crecimiento de todo tipo de microorganismos, a bajas temperaturas se suele observar un crecimiento de biomasa y producción de subproductos reducida, ambas tasas aumentan con la temperatura lo cual es explicado a través de la directa relación que tiene el crecimiento celular con la temperatura mediante la ecuación de Arrhenius [16]. Es necesario destacar que esta relación directa es válida hasta una temperatura máxima en donde el crecimiento celular alcanza un máximo y posteriormente decrece con la temperatura, a este punto se le llama muerte celular y que es indeseado en este tipo de cultivos.

Considerando los efectos negativos de ambos extremos, es posible encontrar una temperatura óptima de operación para el crecimiento de microorganismos propia de cada uno y que puede diferir del objetivo del cultivo, sea la producción de biomasa o la obtención de subproductos, por esto, es usual que estos cultivos trabajen a una temperatura de operación constante. Dicha temperatura ya fue previamente definida para este cultivo y se encuentra dentro del rango de 25°C - 27°C, bajo esta premisa, las pruebas a realizar durante este estudio se ejecutarán bajo estas condiciones, ya que estas han probado maximizar la cantidad de biomasa producida.

2.1.2. pH

El pH es otro parámetro que influye en el crecimiento de microorganismos y que suele tener un rango en donde el crecimiento de células y producción de subproductos es óptima, el control y mantención de esta condición óptima es fundamental en los cultivos en biorreactores, para la mayor parte de los microorganismos que no crecen en condiciones extremas de pH, el rango óptimo para el crecimiento se encuentra entre los 5 y 7 [17] lo cual es válido para hongos. Uno de los efectos importantes del pH en el cultivo de hongos es su influencia en la morfología de las células, estudios han demostrado que algunas especies cambian su morfología con el pH, exhibiendo formaciones de mayor tamaño a mayores valores, mientras que para pH bajo se reporta la formación de pellets [18].

Dada la relevancia que tiene la morfología de las células formadas durante el crecimiento, el trabajar a una condición óptima de pH es fundamental para la obtención de los mejores resultados posibles. De forma similar que para la temperatura, el valor óptimo para este parámetro se encuentra previamente fijado, correspondiendo a un inicial pH de 5,5 que es óptimo para el crecimiento de los microorganismos, el aumento de este parámetro hasta un valor aproximado de pH 7 es un indicador del correcto crecimiento de los microorganismos de interés, pues una disminución de este podría ser indicio de la presencia de contaminación por bacterias en el cultivo.

2.1.3. Viscosidad

Un factor particularmente relevante en el crecimiento de hongos marinos filamentosos es la viscosidad del cultivo, la cual cambia a lo largo del proceso de fermentación debido a diversos motivos, siendo el principal el crecimiento de la biomasa fúngica la cual aumenta la viscosidad del cultivo independiente de la tasa de crecimiento, pues, se asocia a la formación de material sólido. Es por esto que en este tipo de cultivos, el medio de fermentación exhibe típicamente un comportamiento no-Newtoniano, es decir, que la viscosidad de este varía en función del esfuerzo de corte, el cual es función de la la velocidad de agitación del equipo, y no solo eso, también es un factor a considerar la respuesta fisiológica del hongo durante el proceso de fermentación [19]. Estos comportamientos pueden mermar la agitación del medio y limitar la transferencia de oxígeno lo que generaría gradientes de concentración en distintos puntos del biorreactor.

2.1.4. Agitación

La agitación es un factor relevante en el crecimiento de microorganismos en biorreactores pues en reactores del tipo agitado, la agitación es la responsable de los fenómenos de transferencia de masa y calor, además de la mezcla del medio y la creación de un esfuerzo de corte y su efecto en el crecimiento celular. Controlar de forma adecuada la velocidad de agitación puede permitir obtener una transferencia de oxígeno óptima para el crecimiento celular sin perjudicar dicho crecimiento por la influencia del esfuerzo de corte [20].

Como fue previamente mencionado, para el caso del cultivo de hongos, la tarea de controlar la velocidad de agitación es particularmente compleja debido al comportamiento no newtoniano del medio y al cambio de la viscosidad aparente durante el proceso de fermentación, lo cual se traduce en un aumento de la velocidad de agitación para mantener la transferencia de oxígeno pero teniendo efectos negativos en la morfología de las células por los aumentados esfuerzos de corte [21]. Por estas razones, el control de la velocidad de agitación es uno de los factores que mayor relevancia tiene dentro de la óptima producción de biomasa fúngica en biorreactores.

2.1.5. Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto es otro parámetro vital para el crecimiento de células aeróbicas en biorreactores, para poder asegurar una buena transferencia de oxígeno es necesario proveer una tasa de suministro de oxígeno adecuada y asegurar que el cultivo esté bien mezclado. Si el suministro de oxígeno no es adecuado para el crecimiento celular, este factor se vuelve limitante y dominante de la tasa de producción de biomasa y subproductos [17]. Además de los parámetros mencionados, la tasa de transferencia de oxígeno es dependiente del tipo de célula, la composición del medio, la morfología de las células y la hidrodinámica del fluido, esto hace que este parámetro sea uno de los más complejos de controlar debido a los cambios que sufren la hidrodinámica del fluido a lo largo del proceso de fermentación [17].

Considerando que los hongos cultivados son de carácter aeróbico, brindarles una tasa de transferencia de oxígeno adecuada para su crecimiento será vital para la obtención de la mayor producción posible de biomasa y posiblemente limitante por lo que transformaría este parámetro en la base del escalamiento, el objetivo principal de este estudio.

2.2. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa

La tasa de transferencia de oxígeno es proporcional al gradiente de concentración entre el medio y la célula, donde la constante de proporcionalidad corresponde al coeficiente volumétrico de transferencia de masa designado como $k_L a$, esta constante contiene la información del resto de parámetros que afectan la transferencia de masa, además de las propiedades físico-químicas del medio a cada instante. Es de notar que la fuerza motriz de la transferencia de oxígeno correspondiente al gradiente de concentración, es limitada dada la baja solubilidad de gases y en particular del oxígeno en líquidos, por lo que la transferencia de masa estará dominada por la transferencia en la fase líquida según el modelo de doble capa de Whitman [22] ilustrado en la Figura 2.1, el cual describe el flujo de masa que pasa a través de cada capa como:

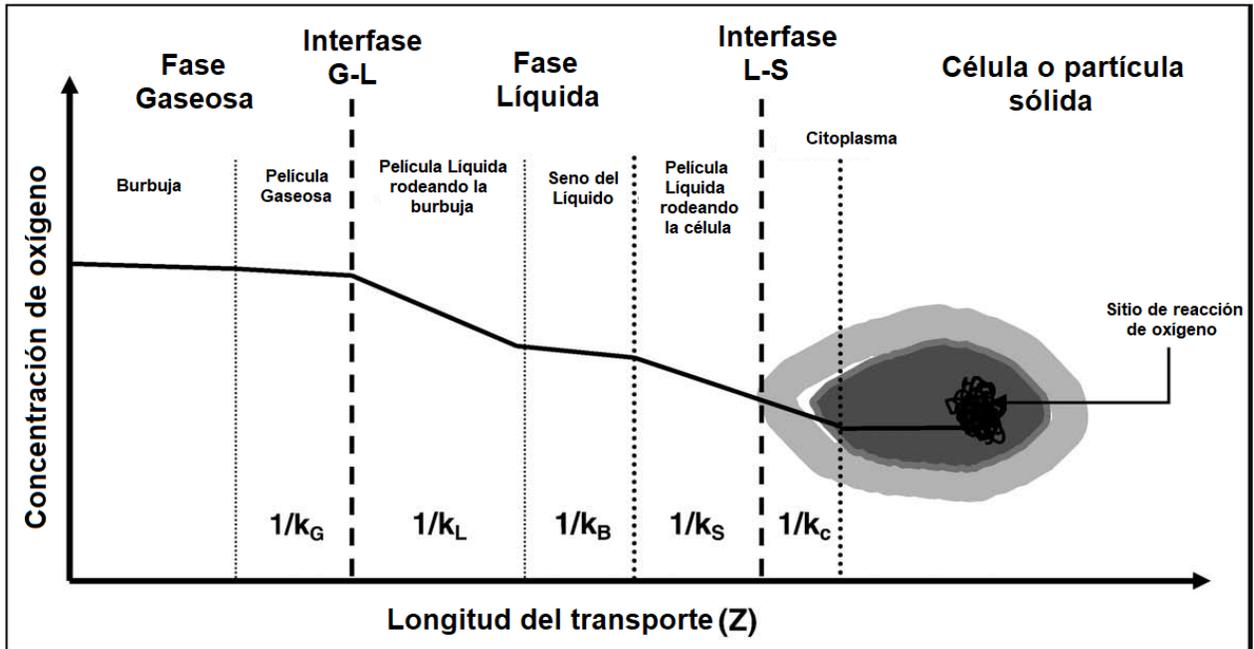


Figura 2.1: Etapas y resistencias a la transferencia de oxígeno desde el gas a la célula. Adaptación de [13]

$$J^0 = k_G \cdot (p_G - p_i) = k_L \cdot (C_i - C_L) \quad (2.1)$$

Donde:

J^0 : Flujo molar de oxígeno [$mol/m^2 \cdot s$]

k_G : Coeficiente de transferencia de masa local en el gas

k_i : Coeficiente de transferencia de masa local en el líquido

p_G : Presión parcial de oxígeno en el gas

p_i : Presión parcial de oxígeno en la interfaz

C_L : Concentración del oxígeno disuelto en el seno del líquido

C_i : Concentración del oxígeno disuelto en la interfaz

Considerando que los parámetros en la interfaz no son medibles, es posible reescribir la expresión para el flux molar de oxígeno como:

$$J^0 = K_G \cdot (p_G - p^*) = K_L \cdot (C^* - C_L) \quad (2.2)$$

Donde:

p^* : Presión parcial de oxígeno en equilibrio con la fase líquida

C^* : Concentración de saturación de oxígeno en el seno del líquido

K_G : Coeficiente global de transferencia de masa para el gas

K_L : Coeficiente global de transferencia de masa para el líquido

Recordando la ley de Henry [23], es posible expresar la presión parcial de oxígeno como:

$$p^* = H \cdot C^* \quad (2.3)$$

Haciendo uso de esta, es posible combinar las ecuaciones 2.1 y 2.2 como:

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{H \cdot k_G} + \frac{1}{k_L} \quad (2.4)$$

Considerando que la solubilidad del oxígeno en agua es extremadamente baja [24], del orden de $1,2 \cdot 10^{-3} [mol/dm^3]$, es posible ignorar la resistencia de la fase gas, luego el coeficiente global de transferencia de masa en el líquido equivaldrá al coeficiente local. Es posible entonces, expresar la tasa de transferencia de oxígeno por unidad de volumen como:

$$N_{O_2} = a \cdot J^0 = k_L a \cdot (C^* - C_L) \quad (2.5)$$

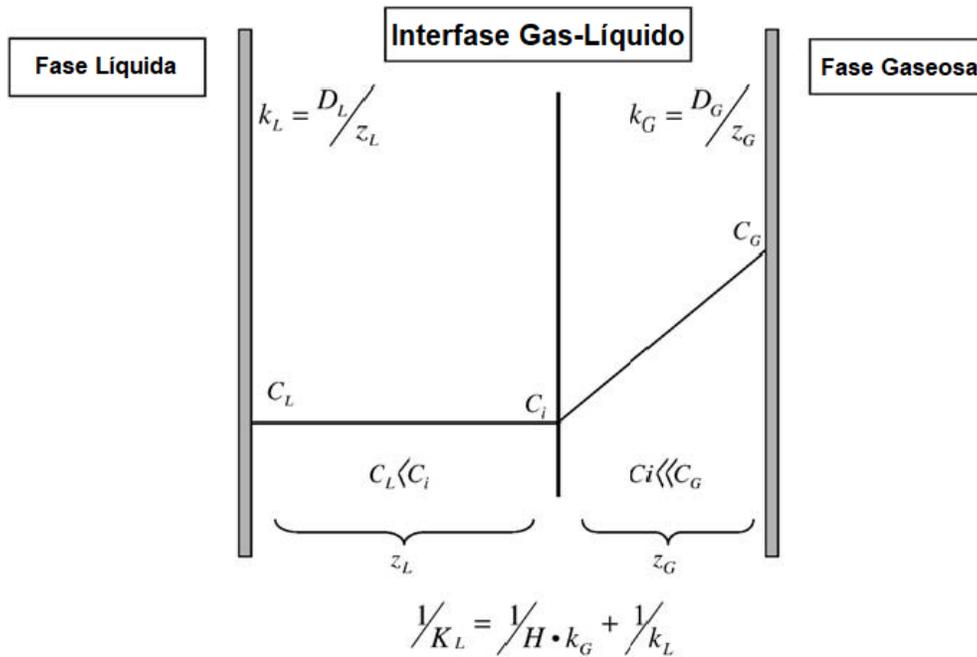


Figura 2.2: Representación esquemática de la interfase gas-líquido, concentraciones y coeficientes de transferencia de masa K_L , k_L y k_G según la teoría de doble capa. Adaptación de [13]

Donde:

N_{O_2} : Tasa de transferencia de masa de oxígeno

a : Unidad de volumen

Dada la dificultad de medir el coeficiente de transferencia de masa local y la unidad de volumen respectiva, es que se unen en la medición de un único parámetro, el coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$, el cual caracteriza la transferencia de masa entre las fases y que como fue mencionado previamente, contiene información sobre las propiedades fisicoquímicas del medio y las condiciones de operación del proceso. Este puede ser estimado de diversas maneras, existiendo dos enfoques principales, uno teórico y otro experimental.

2.3. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa

2.3.1. Método teórico

El enfoque teórico hace uso de correlaciones entre este coeficiente, condiciones de operación, parámetros del sistema y características geométricas del biorreactor, pero es un método que no se encuentra exento de problemas que dificultan la obtención de estimaciones precisas. Estos incluyen el uso de ecuaciones para la estimación del $k_L a$ que son diseñadas para soluciones acuosas en medios que poseen características distintas a las del sistema en estudio, la influencia del tipo y tamaño del reactor que no siempre se adecuan a las correlaciones usadas, el rango de condiciones de operación en las cuales fueron desarrolladas, la influencia de las propiedades fisicoquímicas del medio en la hidrodinámica del fluido, entre otras [25]. A pesar de esto, el uso de correlaciones apropiadas para medios de cultivo similares al estudiado puede resultar en la obtención de estimaciones con porcentajes de error aceptables [26].

En búsqueda de obtener correlaciones que puedan ser útiles para realizar una estimación del $k_L a$ en el cultivo estudiado en este trabajo, es necesario comenzar por determinar el tipo de comportamiento que tiene el fluido dado que la viscosidad y las propiedades reológicas son uno de los factores más importantes en el cultivo de hongos filamentosos. La viscosidad puede ser definida como la resistencia a fluir, es decir la resistencia a los esfuerzos de tensión y de corte. En el caso de los hongos filamentosos, la interacción entre los filamentos de células aumentan el carácter no-Newtoniano del sistema lo cual implica que la viscosidad del medio no es constante y depende del esfuerzo de corte aplicado, este comportamiento puede ser descrito mediante el modelo de Ostwald-de Waele [19].

$$\mu_{app} = \frac{\tau}{\gamma} = \frac{K\gamma^n}{\gamma} \quad (2.6)$$

Donde:

μ_{app} : Viscosidad aparente [$Pa \cdot s$]

τ : Estrés de corte [Pa]

γ : Tasa de corte [s^{-1}]

K : Índice de consistencia de flujo [$Pa \cdot s$]

n : Índice de comportamiento de flujo

Las correlaciones a utilizar para determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa en este medio deben considerar que como fue mencionado previamente, el medio exhibe un comportamiento no-Newtoniano y alta viscosidad, para este tipo de sistemas, la correlación más frecuentemente usada fue descrita por Van'Riet [27].

$$k_L a = C \cdot V_s^a \cdot (P/V)^b \cdot \mu_a^c \quad (2.7)$$

Donde:

C : Constante que depende de los parámetros geométricos del reactor

V_S : Velocidad superficial del gas

P/V : Potencia volumétrica aplicada al sistema mediante agitación

μ_a : Viscosidad del sistema

a , b y c corresponden a constantes

En búsqueda de poder utilizar este método para obtener una primera estimación del $k_L a$, es que fueron seleccionados valores para las constantes de la correlación presentada basado en experimentos que reportaban sistemas de comportamiento no-Newtoniano y alta viscosidad [26], considerando que es posible describir el comportamiento reológico de este tipo de sistemas mediante el modelo de Ostwald-de Waele y teniendo en cuenta la configuración del reactor utilizado, los valores que permitirán el mejor ajuste al sistema estudiado corresponderán a:

$$k_L a = 7,2 \cdot 10^4 \cdot V_s^{2/3} \cdot \left[\frac{P}{V} \right]^{0,6} \cdot \mu^{-2/3} \quad (2.8)$$

Al analizar la ecuación utilizada para la estimación del $k_L a$ 2.8, es posible observar que existen más de una constante que define el valor final, C_2 presente directamente en la ecuación y α y β , provenientes del cálculo de la potencia entregada por el agitador al sistema.

Considerando que no es posible realizar pruebas experimentales que permitan ajustar las constantes relevantes al cálculo de potencia, se procederá a ajustar la constante C_2 , esta contiene información principalmente sobre el efecto del tipo de agitadores utilizados y el valor utilizado para la estimación inicial difiere de la configuración utilizada en este sistema por lo que es apropiado ajustarla para reducir la incertidumbre asociada a dicha problemática.

Para la obtención de una estimación usando esta correlación, es posible identificar la mayor parte de los parámetros a partir de las condiciones de operación del biorreactor en el momento de interés. Para obtener la viscosidad del sistema, será necesario medirla de forma experimental por lo que el enfoque de este método será pseudo-experimental.

2.3.2. Métodos experimentales

Por otra parte, el enfoque completamente experimental para la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa comprende diversos métodos, del tipo físico o químico, además pueden ser separados por métodos que son realizados en ausencia o presencia de microorganismos al momento de realizar la medición. Para determinar el método más adecuado es necesario conocer las condiciones a las cuales se operan y se deben considerar diversos factores [13].

- Sistema de aireación y homogeneización usado.
- Tipo de biorreactor y diseño mecánico (configuración del agitador).
- Composición del medio de cultivo.
- El efecto de la presencia del microorganismo y otros compuestos orgánicos del medio.

De forma general, el balance de masa de oxígeno disuelto en un medio bien mezclado está dado por:

$$\frac{dC}{dt} = OTR - OUR \quad (2.9)$$

Donde $\frac{dC}{dt}$ corresponde a la tasa de acumulación de oxígeno en el sistema, OTR a corresponde a la tasa de transferencia de oxígeno y OUR corresponde a la tasa de consumo de oxígeno de los microorganismos.

Considerando la dificultad de realizar mediciones en presencia de microorganismos, junto con que estos métodos son los más utilizados, los métodos experimentales que serán analizados y discutidos considerarán la ausencia de estos, esto significará que el término de tasa de consumo de oxígeno por parte de los microorganismos será nula, luego el balance de masa al oxígeno disuelto estará dado por:

$$\frac{dC}{dt} = OTR \quad (2.10)$$

Donde la tasa de transferencia de oxígeno puede ser descrita en función del coeficiente volumétrico de transferencia de masa y el gradiente de concentración de oxígeno según lo descrito por el modelo simple de doble capa de transferencia de masa [22].

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \cdot (C^* - C) \quad (2.11)$$

Donde $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa, C^* es la concentración de saturación de oxígeno disuelto y C es la concentración de oxígeno disuelto a cada instante.

2.3.2.1. Métodos químicos

Los métodos químicos más utilizados son el método de oxidación de sulfito de sodio y la absorción de CO_2 . El método de oxidación de sulfito de sodio se basa en la reacción de sulfito de sodio con el oxígeno disuelto para la producción de sulfato en la presencia de un catalizador [28], según la siguiente reacción:



El procedimiento experimental consta en llenar el reactor con una solución de sulfito de sodio 1 N, que contenga al menos 10^{-3} M de catalizador, para esto, pueden ser usados Co^{2+} o Co^{3+} , encender el suministro de aire, permitir que la reacción de oxidación ocurra por unos minutos, tomar muestra de volúmenes conocidos en intervalos de tiempo regulares y mezclar las muestras con reactivo estándar de yodo y titular con una solución de tiosulfato $Na_2S_2O_3$ [29]. Una vez medida la concentración de sulfito versus tiempo, la tasa de consumo de sulfito habrá sido determinada y el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$ podrá ser determinado en base a la siguiente ecuación:

$$-\frac{dC_{Na_2S_2O_3}}{dt} = 2k_L a C^* \quad (2.13)$$

Este método posee limitaciones ya que la construcción del método fue realizado en soluciones de características fisicoquímicas considerablemente distintas a las presentes en los cultivos de fermentación, teniendo efecto en la hidrodinámica de la solución. Estas diferencias implican que los valores de $k_L a$ obtenidos sean usualmente mayores a los obtenidos mediante otros métodos y poco realistas [26].

El método de absorción de dióxido de carbono consiste en medir la absorción de este gas en una solución alcalina y poder determinar el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de masa asumiendo que la reacción asociada es de pseudo primer orden, a pesar de que en principio este método es controlado de forma más simple que el descrito para el sulfito de sodio, también posee problemas debido a la necesidad de usar altas concentraciones de ion OH^+ lo cual afecta las propiedades fisicoquímicas del medio y no permite obtener un $k_L a$ representativo [13].

De esta forma se concluye que los métodos químicos aunque útiles y aceptados para la medición del coeficiente volumétrico de transferencia de masa en ciertas soluciones, no son aplicables a medios de fermentación pues requieren del uso de sustancias que afectan las propiedades fisicoquímicas de la solución, afectando la hidrodinámica del fluido y finalmente entregando valores de $k_L a$ mayores a los obtenidos mediante otros métodos.

2.3.2.2. Métodos físicos

Los métodos físicos se basan en la respuesta de un sensor de oxígeno al cambio de concentración de oxígeno disuelto en el medio bajo condiciones no estacionarias. El método más comúnmente utilizado es el método dinámico. Esta técnica consiste en retirar el oxígeno en la fase líquida mediante la aireación de nitrógeno hasta que la concentración de oxígeno sea nula. Posteriormente, se reanuda la aireación en el biorreactor y se mide la variación de la concentración de oxígeno en función del tiempo [27], dicha técnica se ilustra en la Figura 2.3

Considerando que para este método tampoco se considera la presencia de microorganismos y que por ende la tasa de consumo celular de oxígeno es nula, el balance de masa del oxígeno disuelto en el equipo se puede expresar como:

$$\ln \frac{C^* - C_2}{C^* - C_1} = -k_L a \cdot (t_2 - t_1) \quad (2.14)$$

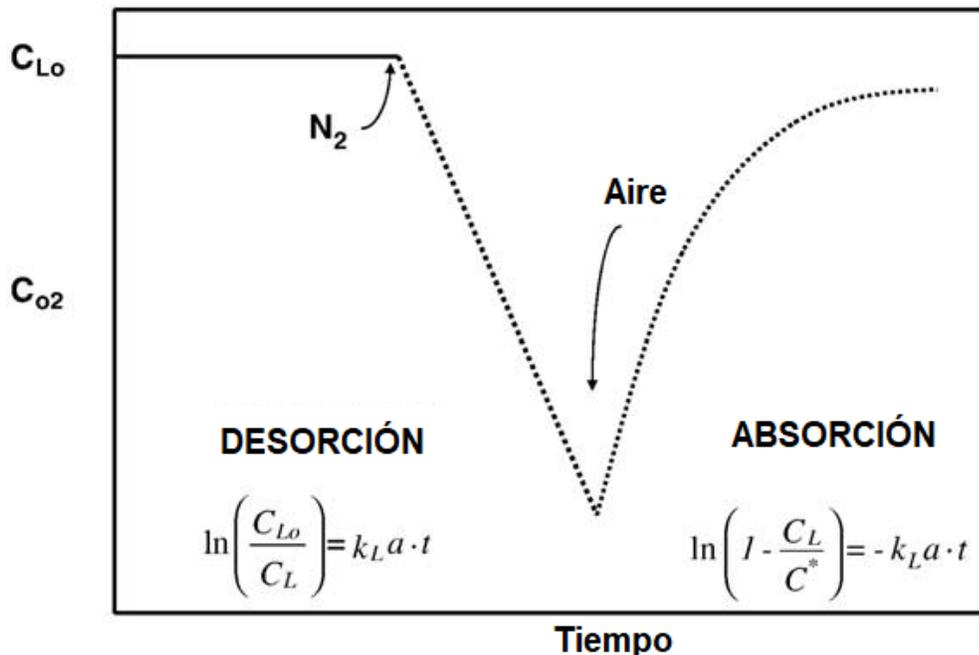


Figura 2.3: Descripción esquemática de la técnica dinámica de desorción-absorción de oxígeno. Adaptación de [13]

Cuando la variación de la concentración de oxígeno en función del tiempo se mide durante el suministro de nitrógeno, es decir mientras la concentración de oxígeno decrece, y con condiciones iniciales $t_1 = 0$ y $C_1 = C_{Lo}$, la ecuación 2.14, puede ser expresada como:

$$\ln\left(\frac{C_{Lo}}{C_L}\right) = k_L a \cdot t \quad (2.15)$$

Mientras que cuando la medición es realizada posterior al reinicio de la aireación, es decir cuando la concentración de oxígeno aumenta, con condiciones iniciales $t_1 = 0$ y $C_1 = 0$, la ecuación 2.14 puede ser expresada como:

$$\ln\left(1 - \frac{C_L}{C^*}\right) = -k_L a \cdot t \quad (2.16)$$

Para ambos casos, $k_L a$ puede ser determinado como la pendiente del gráfico $\ln f(C_L)$ versus tiempo. Para la obtención de un valor más representativo, es necesario considerar el tiempo de respuesta del electrodo τ_r ya que esta respuesta puede afectar la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa si el tiempo característico del transporte de oxígeno $1/k_L a$ es del mismo orden que el tiempo de respuesta del electrodo.

El tiempo de respuesta del electrodo que corresponde al tiempo necesario para alcanzar el 63 % de la lectura final, puede ser determinado al llevar el sensor desde medio de cultivo que ha sido suministrado de nitrógeno, es decir que tiene una concentración nula de oxígeno disuelto, hacia medio de cultivo saturado de aire, es decir con una concentración de oxígeno disuelto del 100 %. Asumiendo que la respuesta del electrodo es de primer orden, es posible calcular la concentración relativa de oxígeno medido por el electrodo C_{me} como:

$$C_{me} = C^* + \frac{C^* - C_0}{1 - \tau_r k_L a} \cdot \left[\tau_r k_L a \exp\left(\frac{-t}{\tau_r}\right) - \exp(-k_L a \cdot t) \right] \quad (2.17)$$

Donde C^* corresponde a la concentración de oxígeno disuelto en el equilibrio, C_0 la concentración de oxígeno disuelto al inicio, τ_r el tiempo de respuesta del electrodo y t el tiempo. A partir de esta ecuación, es posible estimar el valor de $k_L a$ mediante un ajuste no lineal. Este ajuste puede ser ignorado en casos en que $1/k_L a$ sea mayor a $10 \cdot \tau_r$ [30]. Esta técnica de medición del coeficiente volumétrico de transferencia de masa es ampliamente aceptada y usada en la literatura para este tipo de sistemas [26]. Considerando que se obtienen resultados aceptables, su aplicabilidad al sistema en estudio y la accesible metodología, es el método idóneo para la medición de este coeficiente en el estudio a realizar.

En sistemas de condiciones similares al estudiado, se han reportado diversos resultados para la aplicación del método descrito, los valores de $k_L a$ reportados varían entre 0,002 y 0,033 [1/s] para un sistema de crecimiento de hongos filamentosos, y entre 0,001 y 0,04 [1/s] para un sistema de alta viscosidad [31] [26]. A pesar de ser sistemas similares, estos difieren respecto a este trabajo, en las condiciones de operación y principalmente el tamaño y volumen de los equipos utilizados, no se han encontrado reportes para experimentos de sistemas similares que operen al tamaño y volumen trabajado.

2.4. Escalamiento del biorreactor

Para la realización del escalamiento del biorreactor existen diversos métodos que recurren a herramientas teóricas, prácticas y mezclas de estos. Algunos son complejos y hacen uso de simulaciones de la fluido dinámica del biorreactor para estudiar el proceso pero usualmente requieren de simplificaciones que alejan la simulación de lo que ocurre realmente en el proceso, los métodos más usados son aquellos que mantienen un parámetro constante y amplían el resto de forma proporcional.

Las fermentaciones son habitualmente evaluadas en base a parámetros tales como el tiempo de mezcla, esfuerzos de corte, pH, transferencia de masa y de calor. En los casos de la transferencia de calor y el pH, corresponden a características físicas fácilmente reproducibles en diversas escalas gracias al uso de tecnologías cuya aplicación es independiente del resto de parámetros y por ende no son limitantes en el proceso de escalamiento. Las características que tradicionalmente se mantienen constantes en el escalamiento incluyen [32]:

- Geometría del reactor
- Coeficiente volumétrico de transferencia de masa
- Máximo esfuerzo de corte
- Potencia por unidad de volumen
- Flujo volumétrico de gas por unidad de volumen
- Velocidad superficial del gas
- Tiempo de mezcla
- Número de impeller de Reynolds
- Factor de momentum

Para este caso en particular, es importante recordar que para un proceso de fermentación aeróbica, la producción óptima usualmente está limitada por el suministro de oxígeno por lo que para asegurar que la tasa de transferencia de oxígeno sea adecuada en ambas escalas, el criterio más usado en este tipo de fermentaciones es el mantener constante el coeficiente volumétrico de transferencia de masa [13]. También es importante considerar que dado que este proceso comprende el crecimiento de hongos marinos filamentosos, como fue mencionado previamente, los esfuerzos de corte experimentados por el sistema pueden ser limitantes para el crecimiento de la biomasa por lo que un parámetro relevante a considerar durante el escalamiento es la velocidad de punta del impeller [33].

Las tradicionalmente usadas estrategias para el escalamiento de reactores consisten en mantener constantes al menos tres de los parámetros mencionados, es por esto que la comprensión de las características particulares del sistema en estudio facilitan la elección de aquellos que son más relevantes para un adecuado rendimiento del proceso en ambas escalas [32]. En consideración de los antecedentes presentados, los parámetros idóneos para el escalamiento comprenderían el coeficiente volumétrico de transferencia de masa y los esfuerzos de corte o la velocidad de la punta del impeller, además de la tradicional similitud geométrica.

Bajo esta premisa es que se volverá necesario abordar el escalamiento del biorreactor desde un enfoque mixto teórico-experimental, conocido el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de masa obtenido en el biorreactor a escala laboratorio, se calcularán las condiciones de operación que permitirían reproducir dicho coeficiente en una escala mayor. Dado que el método teórico no es capaz de considerar todos los factores que influyen en el proceso, a partir de la primera estimación teórica, se ajustará la velocidad de agitación en el biorreactor a escala industrial hasta lograr reproducir el coeficiente volumétrico de transferencia de masa alcanzado en la escala de laboratorio.

Este método permitirá asegurar que las condiciones de operación en el biorreactor a escala industrial permitan efectivamente reproducir el coeficiente volumétrico de transferencia de masa obtenido en la escala laboratorio. Tal como fue mencionado previamente, es necesario recordar que el crecimiento de hongos marinos filamentosos es sensible a los esfuerzos de corte por lo que se necesitará especial cuidado al momento de aumentar la velocidad de agitación para evitar que en búsqueda de alcanzar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa a reproducir, los esfuerzos de corte alcancen un nivel suficiente para mermar el crecimiento de la biomasa [34].

Capítulo 3

Metodología

En búsqueda de lograr los objetivos generales y específicos estipulados, en esta capítulo se plantea la metodología diseñada para llevar a cabo el trabajo en base al marco teórico previamente presentado.

3.1. Reproducción de condiciones de operación en la fermentación a escala laboratorio.

En esta sección se presentará la metodología utilizada para reproducir las condiciones de operación óptimas en el proceso de fermentación a escala laboratorio. Durante el trabajo realizado, solo se participó de la puesta en marcha de los biorreactores por lo que se omitirá la información atingente a la preparación de los medios e inóculos utilizados.

El proceso para la puesta en marcha comienza por una limpieza profunda del equipo, para esto es necesario desarmarlo, limpiar las piezas por separado utilizando detergente líquido, agua destilada y etanol al 70 %. Algunas de las piezas tales como el aireador, condensador y toma de muestras son además sonicadas en el baño ultrasónico de la marca NINGBO SCIENTZ modelo SB5200 del laboratorio de docencia del CeBiB por 40 - 45 minutos a un nivel de 99 % junto con agua destilada, detergente y CIF limpiador en crema para remover la mayor cantidad de material biológico que se presente en estos.



(a) Tapa del reactor desarmada

(b) Vaso del reactor

Figura 3.1: Tapa y vaso del reactor desarmada que ya ha pasado por el proceso de limpieza.

Posterior a dicha limpieza, el vaso, la tapa y las piezas serán autoclavadas en el autoclave de la marca Labtech modelo LAC 5100 SD del laboratorio de fermentación por 90 minutos, una vez extraídas las piezas éstas deberán enfriarse a temperatura ambiente para continuar con el armado de la tapa.

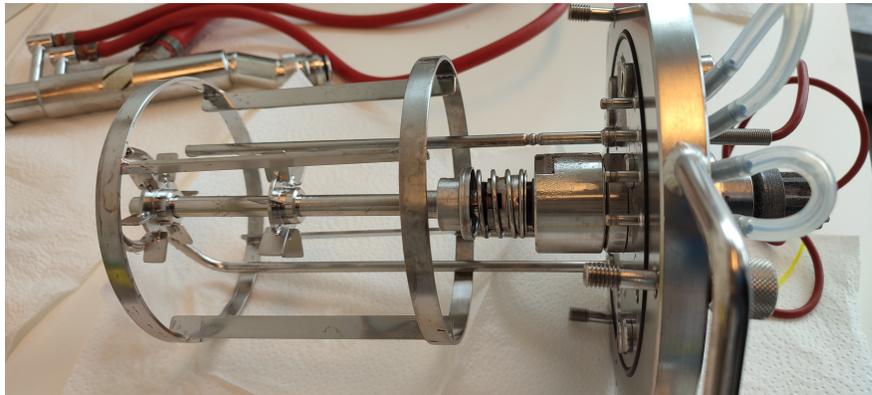
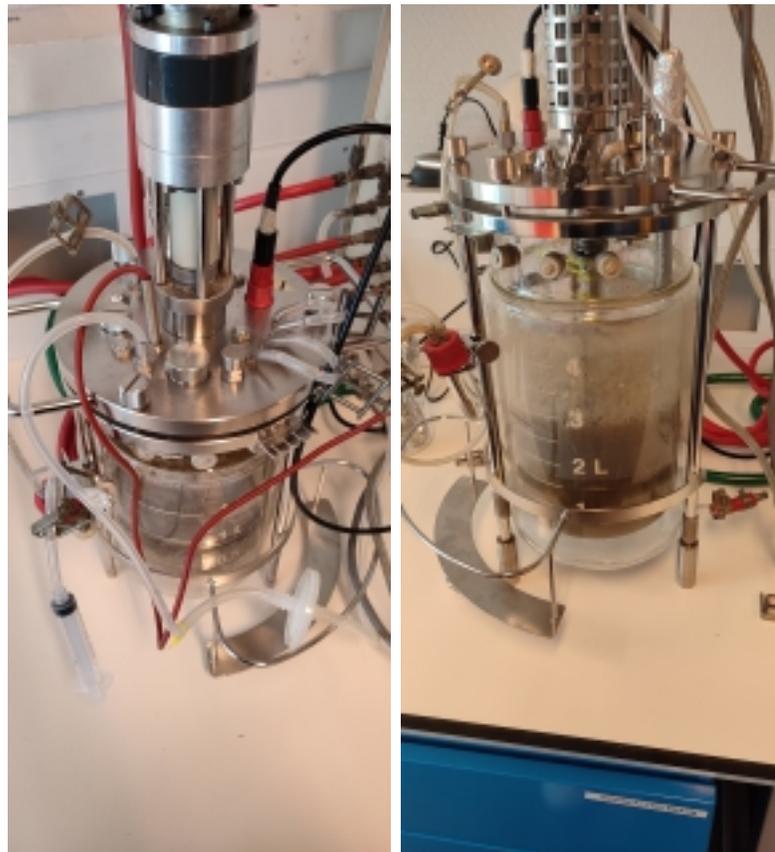


Figura 3.2: Tapa del reactor armada.

Una vez armado el biorreactor de la marca Braun Biotech modelo BIOSTAT B 3L, se procede a añadir el medio de cultivo al vaso y cerrar el reactor con la tapa armada. Esta configuración será nuevamente autoclavada en el autoclave del laboratorio de fermentación por 90 minutos. Una vez retirado y enfriado a temperatura ambiente, es posible conectar el equipo a la consola y comenzar con el proceso de fermentación.



(a)
Reactor
de 3L
armado
en fun-
ciona-
miento.

(b)
Reactor
de 5L
en fun-
ciona-
miento

Figura 3.3: Reactores utilizados en el laboratorio para el proceso de fermentación.

Los biorreactores serán inóculados en dos ocasiones durante el proceso de fermentación y, con distintas cepas de hongo en cada una de estas, además, las condiciones de operación serán modificadas dependiendo de la etapa del proceso para reproducir aquellas estipuladas en la Tabla 1.2.

Tabla 3.1: Condiciones de operación en distintas etapas del proceso de fermentación (Landeta C, 2023) [15].

Etapas/Parámetro	Temperatura [°C]	Agitación [RPM]	Aireación [vvm]	Volumen de operación [L]
Primer inóculo	25-27	50	1,1	1,5
Segundo inóculo	25-27	100	1,5	1,7



(a) Condiciones de operación primera etapa del proceso.

(b) Condiciones de operación segunda etapa del proceso.

Figura 3.4: Reactor de 5L en funcionamiento.



Figura 3.5: Aireación de un reactor con volumen de operación de 1L (1,5 vvm).

Una vez el proceso de fermentación finaliza, los biorreactores se sacan para medir la producción de biomasa obtenida y la limpieza comienza nuevamente para la puesta en marcha del siguiente batch.

3.2. Medición de densidad

Para estimar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa es necesario determinar la densidad del sistema, para esto se extrajo una muestra del medio de cultivo y se procedió a utilizar un Viscosímetro Anton Paar modelo LOVIS 2000ME acoplado a un densímetro DMA 4100M de inyección manual, facilitado por el Laboratorio de Física de la Materia Activa del DFI. El equipo se encuentra a cargo de la profesora María Luisa Cordero de dicho departamento y el metodología para su utilización fue descrita por el alumno Juan Correa, los pasos de esta son:

1. Cargar bolita de acero en capilar LOVIS calibre 1.59 ($\varnothing 1.59$ (24041201))*
2. Instalar el capilar $\varnothing 1.59$ en LOVIS.
3. Una vez instalado el capilar, inyectar muestra (aproximadamente 10 ml.) en la entrada del densímetro lentamente y evitando la formación de burbujas.
4. En el tablero de instrucciones se seleccionó el tipo de medición barrido de temperaturas con capilar de calibre 1.59 y bola de acero. T° inicial 25°C , T° final 30°C y paso de 1°C . De este modo las mediciones de densidad y viscosidad se llevan a cabo a la misma temperatura.
5. Esperar hasta que el equipo realice todas las mediciones correspondientes.
6. Una vez terminado, retirar la muestra e inyectar agua destilada para limpiar el equipo.

Este equipo es capaz de medir viscosidad en un rango entre 0,3 y 10000 [$mPa \cdot s$] y densidad en un rango entre 0 y 3 [g/cm^3], el primer parámetro no fue medido con este equipo pues las mediciones fallan si la muestra presenta partículas sólidas en suspensión ya que obstruyen el paso de las bolitas de acero por los capilares. Este tipo de partículas abundan en las muestras del sistema en estudio por lo que no fue factible la utilización de este equipo para el fin de medir viscosidad pero si fue suficiente para medir la densidad de este.

3.3. Medición de viscosidad

Basado en los métodos teóricos para la obtención del coeficiente volumétrico de transferencia de masa del sistema, además de conocer las condiciones de operación del biorreactor que permiten obtener los mejores resultados, es necesario determinar la viscosidad del sistema en distintos puntos del proceso de fermentación. Para cumplir dicho objetivo se utilizó el reómetro Anton Paar RheoLab QC facilitado por el profesor Aldo Tamburrino del departamento de Ingeniería Civil, el apoyo para realizar las mediciones fue realizado por Bryan Valenzuela.

Para realizar las mediciones de viscosidad en el equipo mencionado se necesita de al menos 50 [mL] de muestra para el apropiado funcionamiento del equipo, además, se espera que la muestra analizada posea una viscosidad de al menos 7 veces la viscosidad del agua pues para menores valores, la medición es poco precisa [35]. Una vez extraída suficiente muestra y de una magnitud de viscosidad esperada superior al mínimo establecido, la metodología para la medición en el equipo mencionado consta de:

1. Encender el equipo y esperar a la realización del ajuste automático, en dicho ajuste el equipo corrobora que aún no hayan sido instaladas las restantes piezas del equipo.
2. Se inserta el cilindro concéntrico para realizar la medición.



Figura 3.6: Cilindro concéntrico para medición.

3. Se instala y ajusta el intercambiador de calor en el equipo.



Figura 3.7: Intercambiador de calor para el reómetro.

4. Conectar el intercambiador de calor al reómetro y a la energía, encender el intercambiador.
5. Insertar el cilindro de muestra en el equipo (sin muestra).
6. Abrir el software del equipo (RheoQ Plus), abrir un nuevo archivo y seleccionar la primera opción (esfuerzos versus deformación).
7. Ajustar el reómetro a la temperatura de operación y esperar a que el equipo alcance dicha temperatura, en este caso se fija a 25°C.



Figura 3.8: Reómetro en proceso de ajuste de temperatura.

8. Construir el perfil de medición, seleccionando el número de puntos a medir, el tiempo de detención, el rango de esfuerzo a analizar y la forma. En este caso se utilizaron 180 puntos con un tiempo de detención de 2 segundos por punto, un rango de esfuerzo de 0 - 600 [1/s] y una forma de rampa lineal.
9. Colocar los 50 mL de muestra en el cilindro concéntrico para muestra e introducirlo al equipo.
10. Empezar la prueba y guardar el número y nombre de la medición.



Figura 3.9: Reómetro comenzando la medición.

3.4. Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa mediante correlaciones empíricas

Una vez determinadas las condiciones de operación y habiendo sido medida la viscosidad del punto de la fermentación para el cual se quiere estimar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa k_La , se procede a usar el método teórico descrito en la sección 2.3.1.

Al momento de estimar el k_La mediante la ecuación 4.4, es necesario conocer la magnitud de la velocidad superficial del gas, el volumen del medio, la viscosidad y la potencia entregada por el agitador al fluido. La velocidad superficial de gas se puede determinar conociendo el flujo de aire y el área transversal del reactor tal que:

$$V_s = \frac{Q}{S} \quad (3.1)$$

Donde:

- V_s : Velocidad superficial [m/s]
- Q : Flujo de aire [m^3/s]
- S : Área transversal de reactor [m^2]

El volumen de operación es un parámetro conocido y la viscosidad ha sido medida utilizando la metodología previamente descrita por lo que solo resta determinar la potencia que ha sido entregada por el agitador al fluido. En sistemas sin aireación, es posible determinar su magnitud mediante correlaciones que incluyen el número de potencia, condiciones de operación y parámetros característicos del sistema tales como [36]:

$$P_o = N_P \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5 \quad (3.2)$$

Donde:

- P_o : Potencia [W]
- N_P : Número de potencia
- ρ : Densidad [kg/m^3]
- N : Velocidad de agitación [$1/s$]
- D : Diámetro del impeller [m]

Es necesario considerar que para este caso, el sistema presenta aireación y el burbujeo proveniente de este tiene un efecto sobre la potencia real que es entregada al sistema por parte del agitador, es por esto que se vuelve necesario ajustar el cálculo de potencia para considerar este efecto, lo cual es posible mediante una correlación tal como [37]:

$$P = \alpha \cdot \left(\frac{P_o^2 \cdot N \cdot D^3}{Q^{0,56}} \right)^\beta \quad (3.3)$$

Donde:

- P : Potencia [W]
- P_o : Potencia sin aireación [W]
- α y β : Constantes

Habiendo determinado la potencia entregada por la agitación en un sistema sin aireación mediante la ecuación 3.2 y conociendo las condiciones de operación del sistema, solo resta por determinar el valor de las constantes α y β , se ha reportado para sistemas con aireación y agitación con múltiples impellers tal como es el caso del sistema en estudio, que estas poseen magnitudes de $\alpha = 1,224$ y $\beta = 0,432$ [38].

Una vez se han realizado los cálculos requeridos para determinar la potencia entregada por la agitación al sistema mediante las ecuaciones 3.2 y 3.3 es posible estimar el coeficiente volumétrico de transferencia del sistema para cada punto de interés, la memoria de cálculo que sigue la metodología descrita se encuentra en el Anexo B.

3.5. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa mediante métodos experimentales

Para determinar de forma experimental el k_La se procedió a utilizar el método descrito en la sección 2.3.2.2. Este experimento fue llevado a cabo en el biorreactor de la marca Braun Biotech modelo BIOSTAT B 3L del laboratorio de docencia del CeBiB siguiendo los siguientes pasos:

1. Se realizaron las preparaciones y se siguió la metodología descrita en la sección de metodología de reproducción de condiciones de operación en la fermentación a escala laboratorio 3.1. Para este caso el reactor solo operó con medio de cultivo y las condiciones de operación correspondieron a aquellas utilizadas para la primera etapa de la fermentación.
2. Instalar el sensor de oxígeno en el reactor.
3. Conectar la toma de aire del reactor al suministro del balón de nitrógeno y utilizar la mínima presión de este por al menos 10 minutos con tal de desplazar el oxígeno presente en el sistema.
4. Cortar el suministro de nitrógeno y cerrar la salida de aire para evitar la reincorporación de oxígeno al sistema.

5. Conectar el reactor a la consola.
6. Calibrar el punto de ausencia de oxígeno, para esto pulsar el botón Control Loops hasta alcanzar el menú con la opción de aireación y establecer su valor a 0 %.
7. Comenzar a airear el equipo con un flujo de 1,1 [vvm] correspondiente al utilizado en la primera etapa del proceso de fermentación.
8. Luego de 5 minutos calibrar el equipo para el máximo de aireación, para esto pulsar Control Loops hasta alcanzar el menú con la opción de aire y establecer su valor a 100 %.
9. Volver a la observación de parámetros y observar la variación de la concentración de oxígeno disuelto pO_2 .
10. Registrar la variación de dicho parámetro cada un minuto, realizar hasta que el valor se estabilice en un valor constante.
11. Utilizar los datos registrados para construir un curva de concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo.
12. Generar curva de $\ln f(C_L)$ versus tiempo y realizar regresión lineal para encontrar la pendiente de esta, dicho valor corresponderá al coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$

Considerando que la consola requiere de tiempo para ajustar la medición de concentración de oxígeno disuelto, no es posible determinar el tiempo de respuesta del electrodo por lo que se omitió el ajuste del valor obtenido en función de este parámetro.

3.6. Ajuste del método teórico para la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa.

Determinado el coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$ mediante el método experimental previamente descrito, se procede a ajustar el método teórico para la estimación de este en función de los resultados obtenidos. La estimación teórica se describe en la sección 2.3.1 y en esta se discute que la constante más idónea a ajustar dado los antecedentes descritos en bibliografía y el conocimiento sobre el sistema en estudio es la constante C_2 directamente presente en la ecuación 4.4.

Para realizar el ajuste se procede a utilizar la herramienta Solver de Excel donde se utiliza como objetivo que la magnitud del coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$ sea igual a la determinada mediante el método experimental al variar el valor de la constante C_2 , las restricciones solo incluirán que el valor de dicha constante sea positivo.

3.7. Diseño de la estrategia de escalamiento.

La metodología descrita hasta el momento, facilita información necesaria para continuar con el escalamiento del biorreactor y por ende forma parte de la estrategia. En la presente sección se procederá a describir la metodología para utilizar la información obtenida y a partir de esta, escalar el sistema desde la escala de laboratorio a una escala mayor, ya sea del tipo piloto o industrial. El resultado final de esta, será la obtención de las condiciones de operación para el biorreactor a mayor escala.

Ajustada la ecuación 4.4 mostrada más adelante, que estima el coeficiente volumétrico de transferencia de masa del sistema en estudio y conocida la magnitud del $k_L a$ obtenido a escala de laboratorio, se usará como criterio de escalamiento el mantener la magnitud de dicho parámetro constante al aumentar la escala. Mediante la ecuación 4.4, será posible determinar la potencia que el agitador necesita entregar al sistema para cumplir con dicho requerimiento, utilizando las características del sistema de mayor escala.

Para determinar el flujo de aire que se utilizará a gran escala, se utilizarán como referencia trabajos previos que reportan el cambio en el flujo de aireación al aumentar la escala cuando se busca mantener el $k_L a$ constante, en estos se reporta que para un aumento de 10 veces el volumen de operación del reactor, la aireación se reduce a un tercio de la usada a escala de laboratorio [31]. Se asumirá que dicha relación es lineal y se usará para determinar el flujo de aireación a mayor escala. Conocida toda la información requerida, se procede a determinar la potencia entregada por el agitador al sistema como:

$$P = \left(\frac{k_L a \cdot V^{0,6}}{9,4 \cdot V_s^{(2/3)} \cdot \mu^{(-2/3)}} \right)^{(5/3)} \quad (3.4)$$

Determinada la potencia entregada por el agitador al sistema que se requiere para reproducir el coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$ del sistema de escala industrial en la escala mayor, se procede a obtener la velocidad de agitación que permite entregar dicha potencia, parámetro con el cual terminarán de definirse las condiciones de operación a mayor escala.

$$N = \left(\left(\frac{P}{\alpha} \right)^{(1/\beta)} \cdot \left(\frac{Q^{0,56}}{(\rho \cdot D^5 \cdot N_P)^2 \cdot D^3} \right) \right)^{1/7} \quad (3.5)$$

La estrategia diseñada se presenta más adelante en la Figura 4.14.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

En este capítulo se presentarán los resultados de pruebas experimentales, los consecuentes resultados provenientes de cálculos teóricos, además de ser discutida su validez y congruencia dentro de lo esperado. Estos serán la base para el desarrollo de una estrategia de escalamiento.

4.1. Reproducción de condiciones de operación óptimas en escala de laboratorio.

En esta sección se exhibirán registros de parte de los biorreactores que fueron utilizados en el laboratorio del CeBiB para llevar a cabo el proceso de fermentación y la extracción de muestras utilizadas en posteriores análisis de este estudio.

4.2. Determinación de Densidad y Viscosidad mediante mediciones experimentales

En esta sección se presentarán los resultados obtenidos para las mediciones experimentales de densidad y viscosidad. Se comienza por reportar el valor único de densidad obtenido mediante el uso del Viscosímetro Anton Paar modelo LOVIS 2000ME acoplado a un densímetro DMA 4100M de inyección manual facilitado por el Laboratorio de Física de la Materia Activa del DFI, siguiendo la metodología expuesta en la sección 3.2. La densidad obtenida para la muestra de medio de cultivo (sin hongos) correspondió a:

$$\rho = 1010[kg/m^3] \tag{4.1}$$

El resultado proviene de la única medición que fue posible realizar en el equipo dado que la presencia de material particulado en suspensión en las muestras del sistema en estudio, no permitieron continuar con las mediciones en el equipo. A pesar de esto, el resultado obtenido es representativo considerando que es mayor a la densidad reportada para el agua [39].

Se procede a presentar los resultados obtenidos de la utilización del reómetro Anton Paar RheolabQC para la medición de viscosidad en diversas muestras del sistema en estudio a lo largo del proceso de fermentación. Para un sistema que presenta un medio de alta viscosidad con un comportamiento similar al del sistema en estudio, se reportaron valores de viscosidad que varían entre $8[mPa \cdot s]$ y $30[mPa \cdot s]$ [26]. El equipo fue facilitado por el departamento de Ingeniería Civil y fue utilizado siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3, sección 3.3.

A continuación se presentan los resultados para la medición de viscosidad en función de la tasa de corte, dado que el análisis se realiza en un amplio rango de dicha variable, el comportamiento de la viscosidad varía a lo largo de la medición. El muestreo y posterior medición fueron realizados en cuatro momentos distintos a lo largo del proceso de fermentación, la primera se realizó a una muestra del medio que no posee hongos, la segunda fue extraída el primer día del proceso una vez el medio había sido inoculado, la tercera corresponde a una muestra obtenida el cuarto día, cuando el reactor había sido inoculado por segunda ocasión, y la última es una muestra del cultivo una vez finalizado el proceso.

Tabla 4.1: Indicación de la etapa del proceso de fermentación correspondiente a cada muestra.

Muestra	Etapa
1	Medio de cultivo (Sin hongos)
2	Primer inóculo
3	Segundo inóculo
4	Fermentación finalizada

4.2.1. Muestra 1: Medio de cultivo

A continuación se exhiben los resultados obtenidos para la primera muestra analizada.

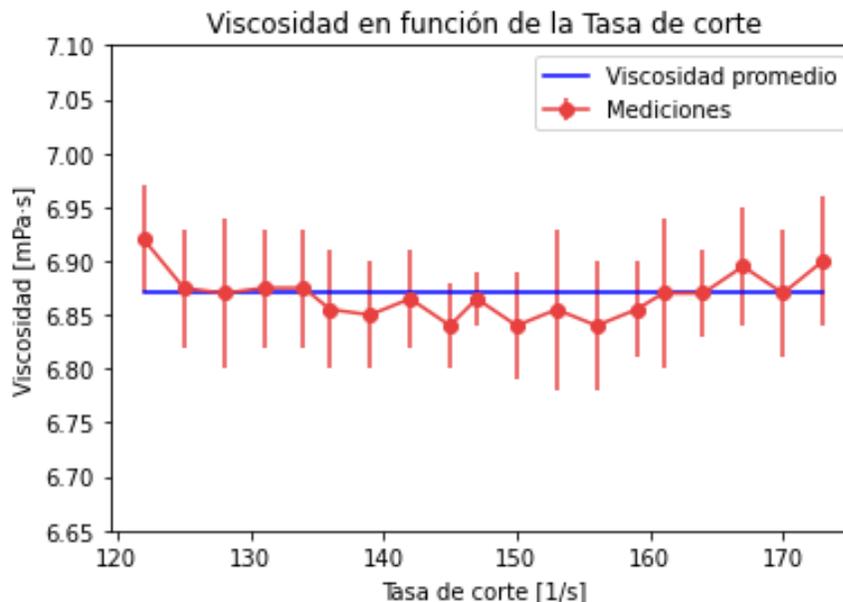


Figura 4.1: Viscosidad en función de la tasa de corte para la Muestra 1: Medio de cultivo (sin hongos) N=2.

La Figura 4.1 muestra la sección de la medición en la que el valor de la viscosidad se estabiliza, a pesar de ocurrir a una magnitud de tasa de corte superior a la alcanzada en el reactor, es la sección con los valores más representativos de la viscosidad real de la muestra pues los valores iniciales poseen una variabilidad muy alta asociada al comienzo de la prueba experimental y la disolución de grumos presentes en la muestra. Esta lógica se reproducirá para el resto de muestras, los resultados completos se exhiben en el Anexo A. A partir de esta sección se extrae el promedio de los datos exhibidos como el valor de la viscosidad que será utilizado para fines de cálculos teóricos presentados más adelante, este valor corresponde a:

$$\mu = 6,87 \pm 0,02[mPa \cdot s]$$

4.2.2. Muestra 2: Primer inóculo

A continuación se exhiben los resultados obtenidos para la segunda muestra del proceso de fermentación, aquella que contiene el primer inóculo y que fue tomada al rededor de 24 horas posterior a la inoculación.

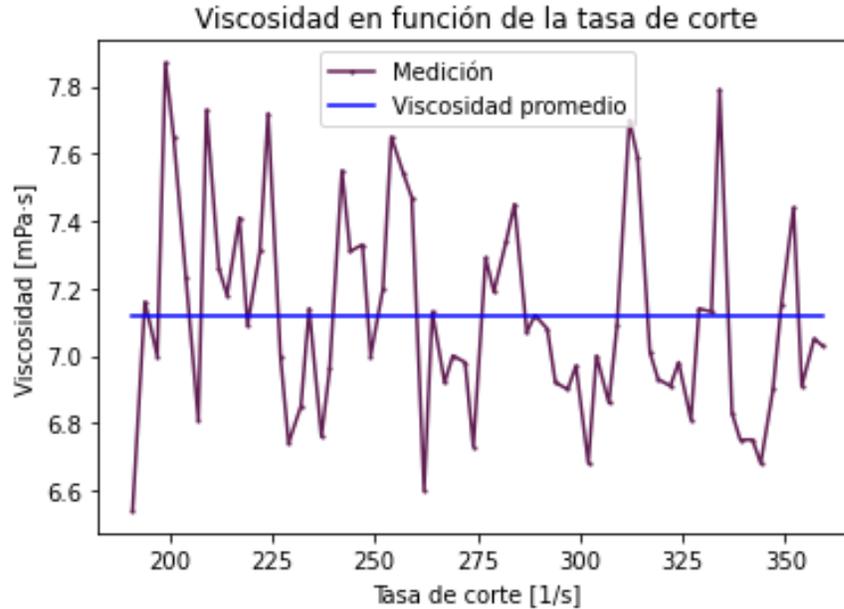


Figura 4.2: Viscosidad en función de la tasa de corte para la Muestra 2: Primer inóculo. N=2

A partir de la sección mostrada en la Figura 4.2, se extrae el valor promedio de la viscosidad que será utilizado para fines de cálculos teóricos presentados más adelante, este valor corresponde a:

$$\mu = 7,12 \pm 0,31 [mPa \cdot s]$$

Es posible observar que para esta muestra no se reporta desviación en los puntos medidos, esto debido a que solo se pudieron realizar dos mediciones a la muestra, la primera de estas reportó valores más altos, no representativos de la viscosidad real de la muestra, además, exhibe un mayor error dado que la magnitud representativa de la muestra fue obtenida a partir de una sola medición, la totalidad de los resultados se puede observar en la sección de anexos A.

4.2.3. Muestra 3: Segundo inóculo

Para el caso de la muestra 3 correspondiente al momento del proceso de fermentación en que se añade el segundo inóculo, se realizaron pruebas con tal de determinar si la medición se veía afectada por la previa homogeneización de la muestra usando el baño ultrasónico, bajo la hipótesis que la presencia de grumos en la muestra pudiese afectar la calidad de la medición de viscosidad.

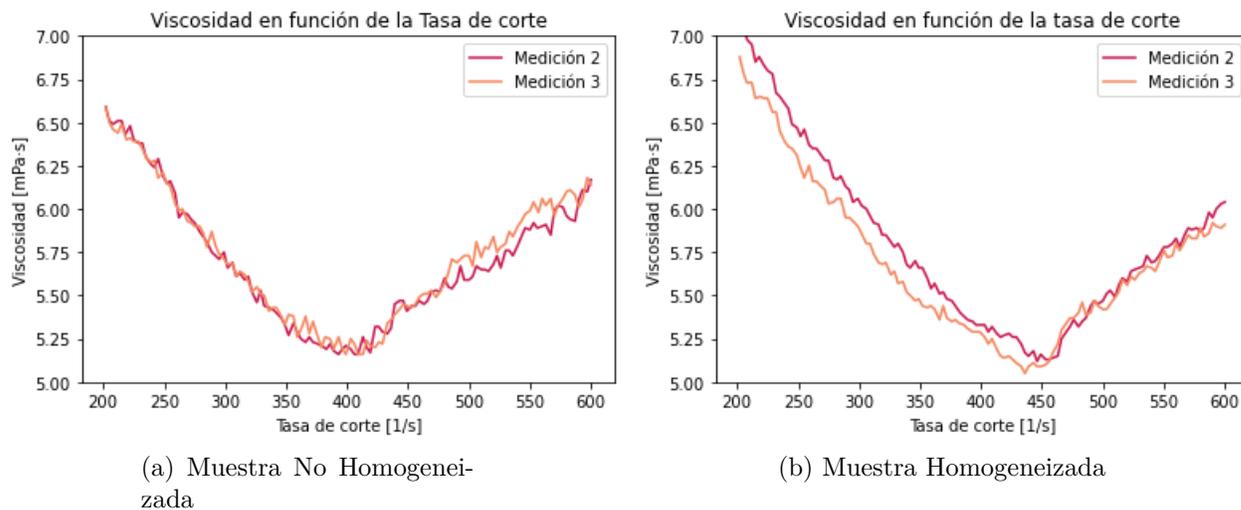


Figura 4.3: Viscosidad en función de la tasa de corte para la muestra 3, con tasa de corte superior a los 200 [1/s] en los casos de muestra homogeneizada y no homogeneizada. N=3

En la Figura 4.3 se puede observar que no existe una diferencia significativa en la medición entre la muestra que fue homogeneizada con anterioridad y aquella que no fue homogeneizada, la muestra no homogeneizada exhibe una mayor variación dada la presencia de grumos pero alcanza la misma magnitud de viscosidad que la muestra homogeneizada. Bajo esta premisa, los resultados exhibidos en esta sección corresponden a aquellos obtenidos para la muestra no homogeneizada con tal de mantener la consistencia respecto al resto de muestras analizadas, las cuales no habían sido previamente homogeneizadas. Cabe destacar que no se exhiben los resultados de la medición 1 pues estos presentan una desviación considerable en comparación al resto de mediciones, lo cual se debe a ser la primera muestra analizada desde el encendido y puesta en marcha del equipo.

A continuación se exhiben los resultados obtenidos para la tercera muestra analizada sin homogeneizar.

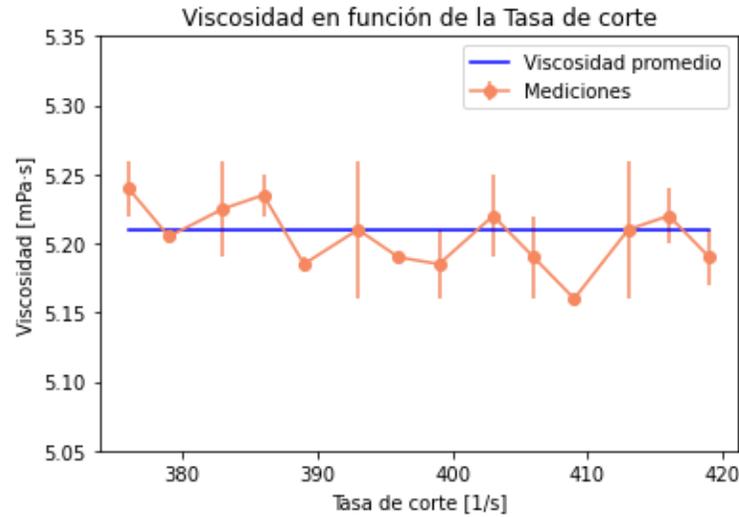


Figura 4.4: Viscosidad en función de la tasa de corte para dos de las mediciones realizadas a la Muestra 3 sin homogeneizar: Segundo inóculo.

A partir de la sección mostrada en la Figura 4.4, se extrae el valor promedio de la viscosidad que será utilizado para fines de cálculos teóricos presentados más adelante, este valor corresponde a:

$$\mu = 5,21 \pm 0,02[mPa \cdot s]$$

Como fue mencionado previamente, la viscosidad es un factor que varía a lo largo del proceso de fermentación, el comportamiento esperado es el aumento de la viscosidad a lo largo del tiempo debido principalmente al crecimiento de biomasa fúngica, entre otros factores [19]. Los resultados mostrados para esta muestra, difieren de dicho comportamiento, exhibiendo una disminución de la viscosidad en comparación a muestras previas, esto se podría explicar pues posteriormente se confirmó que el batch a partir del cual se extrajo la muestra analizada, estaba contaminado, lo cual mermó el crecimiento de la biomasa fúngica.

4.2.4. Muestra 4: Fermentación finalizada

A continuación se exhiben los resultados obtenidos para la última muestra analizada que corresponde a la extraída del reactor una vez la fermentación ha finalizado y se prepara para cosechar los hongos, esta fue extraída al rededor de 48 horas posterior a la inoculación, el reactor del cual se extrajo esta muestra, no presentó problemas por contaminación.

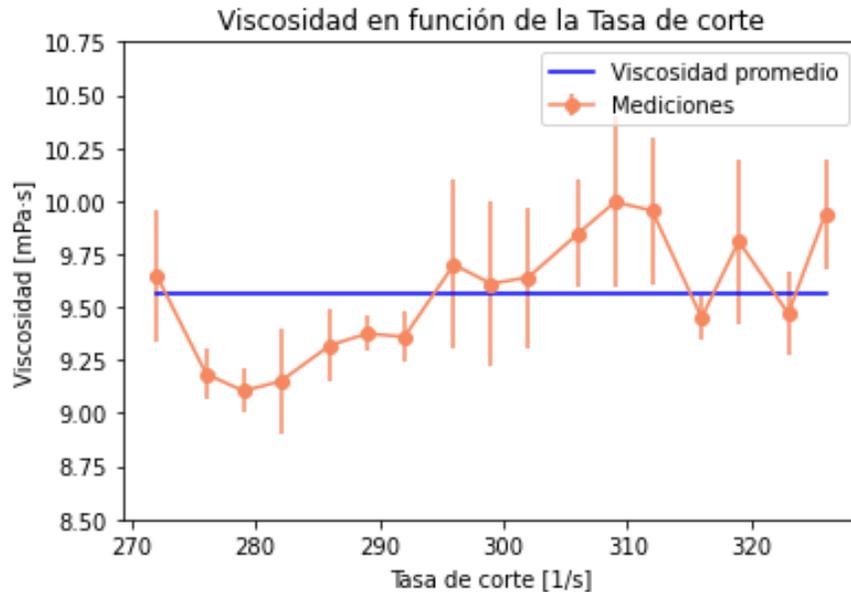


Figura 4.5: Viscosidad en función de la tasa de corte para la Muestra 4 sin homogeneizar: Fermentación finalizada. N=2

A partir de la sección mostrada en la Figura 4.5, se extrae el valor promedio de la viscosidad que será utilizado para fines de cálculos teóricos presentados más adelante, este valor corresponde a:

$$\mu = 9,56 \pm 0,29[mPa \cdot s]$$

De los resultados exhibidos para las mediciones de viscosidad, es posible observar que la viscosidad del sistema aumenta a lo largo del proceso, lo cual es consecuente con las observaciones realizadas durante las pruebas experimentales de fermentación en que se reportaba un incremento en la dificultad de movimiento del sistema. Además, los valores reportados no se encuentran por completo dentro del rango mencionado para este parámetro pero son del mismo orden que estos. Se considera un resultado aceptable ya que el sistema de referencia es solo similar y no idéntico al estudiado en este trabajo.

Cabe destacar el caso de la muestra 3, en que se exhibe el comportamiento opuesto, como fue mencionado, esto puede ser debido a la confirmación de la contaminación del reactor a partir del cuál se extrajo dicha muestra, el resto de muestras analizadas fueron extraídas de batches de reactor que no presentaron contaminación. La medición fue realizada en reiteradas ocasiones para cada una de las muestras con tal de desestimar el efecto de la variabilidad del equipo, además, fue desestimado el posible efecto negativo en la consistencia de las mediciones que podría provocar la presencia de grumos como era habitual a partir de la muestra 2, gracias a la comparación entre resultados obtenidos para muestras homogeneizadas y no homogeneizadas exhibida en la muestra 2.

4.3. Cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia por etapa mediante correlaciones

El cálculo teórico del coeficiente volumétrico de transferencia por etapa es realizado mediante el uso de la ecuación 4.4.

$$k_L a = 7,2 \cdot 10^4 \cdot V_s^{2/3} \cdot \left[\frac{P}{V} \right]^{0,6} \cdot \mu^{-2/3} \quad (4.2)$$

Además, se requiere el cálculo de parámetros que describen el sistema tales como la velocidad superficial del gas V_s , el área interna del reactor S , entre otras. La memoria de cálculo se presenta en el Anexo B.

A continuación, se muestran los resultados de estos cálculos para las distintas etapas del proceso de fermentación, representadas por cada una de las muestras tomadas y analizadas, además se reportarán la viscosidad y el volumen de operación para cada una de las etapas.

Tabla 4.2: Resultados estimación teórica del coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$ para distintas etapas del proceso de fermentación.

Etapas	Viscosidad [$Pa \cdot s$]	Agitación [RPM]	Vol operación [L]	$k_L a$ [1/s]
Medio de cultivo	$6,87 \pm 0,021$	50	1,5	0,00025
Primer inóculo	$7,12 \pm 0,311$	50	1,5	0,00024
Segundo inóculo*	$5,21 \pm 0,022$	100	1,7	0,00103
Fermentación finalizada	$9,56 \pm 0,289$	100	1,7	0,00069

Nota: *Este valor no es considerado como representativo del momento del proceso de fermentación dado que el reactor del cual se extrajo esta muestra se contaminó pero es válido como valor correspondiente a la viscosidad reportada.

Considerando la forma de la ecuación que describe la correlación utilizada para el cálculo teórico del coeficiente volumétrico de transferencia de masa, un aumento de la viscosidad significaría una disminución del $k_L a$ lo cual se reproduce en los resultados al observar la diferencia entre el $k_L a$ obtenido para el medio de cultivo y el primer inóculo. Por otra parte, se puede extraer de los resultados que a partir del segundo inóculo, la influencia del aumento de la velocidad de agitación al doble tiene un gran efecto sobre la magnitud del $k_L a$, lo cual es de esperar considerando que esto aumenta considerablemente la energía que el agitador le entrega al sistema.

Dado que el tamaño del reactor utilizado en el laboratorio es pequeño en comparación con aquellos tradicionalmente usados para realizar pruebas, no ha sido posible encontrar bibliografía que valide los resultados obtenidos, es por esto que dentro del trabajo se buscará corroborar si la correlación utilizada permite reproducir resultados obtenidos para otras escalas reportadas en bibliografía como forma de validar el trabajo realizado.

La baja magnitud de los resultados para el coeficiente volumétrico de transferencia de masa reportados en esta sección se debe al pequeño tamaño del reactor utilizado y el bajo volumen de operación. Las características geométricas y operacionales mencionadas tienen un efecto relevante sobre el valor final obtenido, como se reporta en la memoria de cálculo mostrada en el Anexo B, esta razón valida la obtención de resultados de menor escala para el sistema en estudio, y se buscará corroborar dicha hipótesis mediante la determinación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de masa.

4.4. Determinación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de masa

Dado que los parámetros utilizados para realizar el cálculo teórico del coeficiente volumétrico de transferencia de masa no son particulares del sistema en estudio sino más bien de un sistema de condiciones similares [26], surge la necesidad de ajustar aquellos parámetros con tal de que la estimación de este indicador tenga una mayor precisión y confiabilidad. En búsqueda de este propósito, se realiza la determinación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de masa mediante el método del degaseo descrito en la sección 3.5 usando un medio que no presenta microorganismos. A continuación se muestran los datos experimentales para la concentración de oxígeno disuelta en el reactor posterior a la reactivación de la aireación en el equipo cuyo oxígeno había sido previamente desplazado mediante el suministro de nitrógeno.

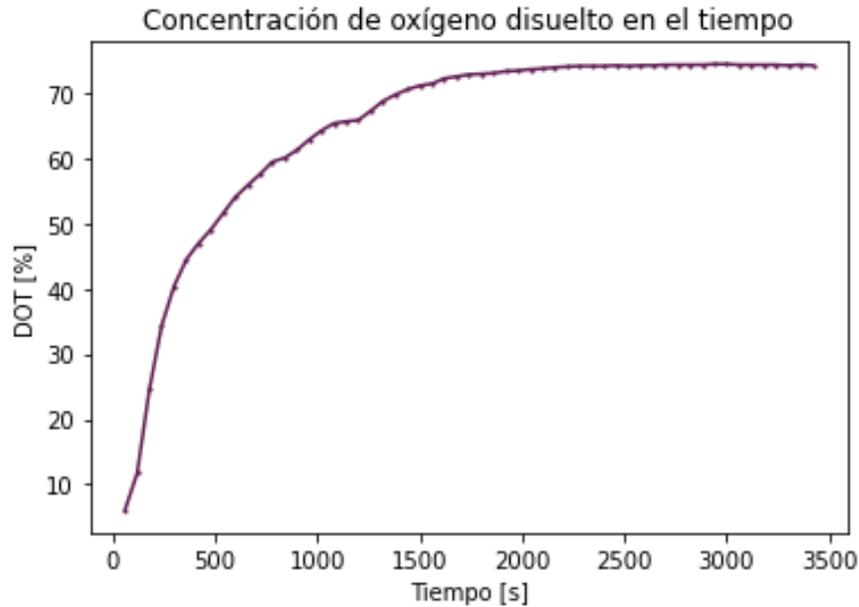


Figura 4.6: Datos experimentales de porcentaje de oxígeno disuelto (DOT) durante la reaireación en el reactor con volumen de operación de 1,5 L, aireación de 1,1 vvm y agitación de 50 RPM . Elaboración propia. N=1

La Figura 4.6 muestra una curva de reaireación típica para este tipo de sistemas [13], alcanzando su saturación alrededor de una concentración de oxígeno disuelto del 74,4% a los aproximadamente 45 minutos.

Para el cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de masa se usarán los datos obtenidos hasta el momento en que se estabiliza la medición indicando la saturación de oxígeno del sistema. A partir de estos se genera la curva del logaritmo natural de la fuerza motriz de la transferencia de oxígeno $\ln\left(1 - \frac{C_L}{C_*}\right)$ en función del tiempo que permite determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa como la pendiente de dicha curva según lo descrito en la metodología 3.5, utilizando la ecuación 2.16.

$$\ln\left(1 - \frac{C_L}{C_*}\right) = -k_L a \cdot t \quad (4.3)$$

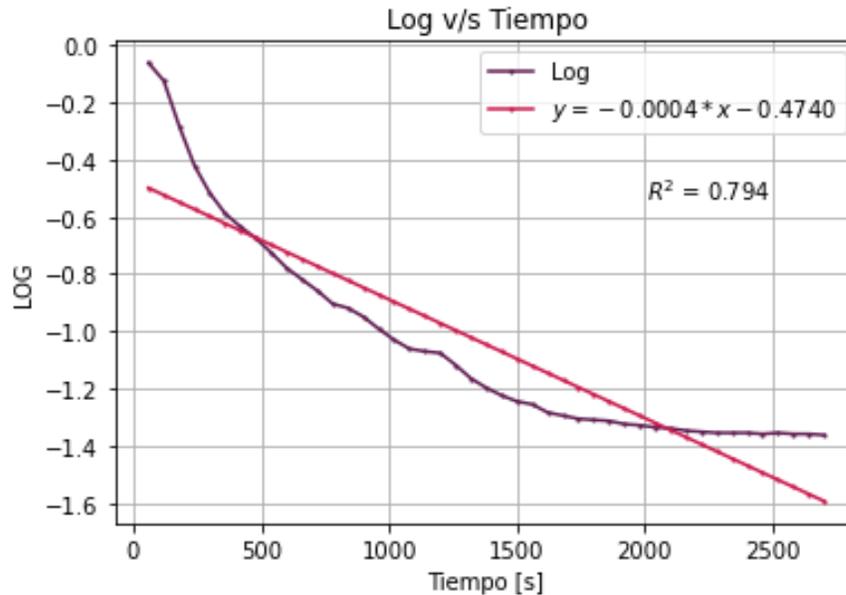


Figura 4.7: Logaritmo natural de la fuerza motriz de transferencia de oxígeno y su respectiva linealización en función del tiempo.

A partir de estos resultados, es posible extraer que el método experimental reporta un coeficiente volumétrico de transferencia de masa equivalente a la pendiente de la regresión de la curva construida equivalente a :

$$k_{La_{exp}} = 0,00042[1/s]$$

Con un aceptable coeficiente de determinación de $R^2 = 0,794$, el valor obtenido para el k_{La} mediante el método experimental es del mismo orden que aquellos obtenidos para las primeras etapas del proceso de fermentación con condiciones de operación similares mediante el método teórico, los cuales están en el rango de $(0,00024 - 0,00025 [1/s])$, e indica que la correlación utilizada aún sin haber sido ajustada al sistema en estudio, logra realizar una buena estimación.

Al igual que fue mencionado para los resultados de la estimación del coeficiente mediante el método teórico, no fue posible encontrar bibliografía que validara el resultado obtenido pues el sistema en estudio es de menor tamaño que los tradicionalmente estudiados. A pesar de esto, dado que el experimento fue realizado en condiciones que reproducen lo ocurrido en la primera etapa del proceso de fermentación, será posible ajustar el método teórico al usar los resultados obtenido con tal de afinar la estimación del coeficiente en cuestión.

4.5. Ajuste del método teórico para la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa

El valor experimental obtenido para el coeficiente volumétrico de transferencia de masa es válido para las condiciones en las que fue realizada la medición y las cuales fueron ajustadas para asimilar aquellas de la primera etapa del proceso de fermentación, equivalentes a la primera muestra medida en el reómetro.

Habiendo obtenido un valor teórico y otro experimental para el coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$ para una misma etapa del proceso, es ahora posible ajustar los parámetros de la ecuación 4.4 utilizada para el cálculo teórico, esto permitirá obtener una ecuación cuyos parámetros se ajusten en mejor medida al sistema en estudio. La ecuación 4.4 originalmente utilizada corresponde a:

$$k_L a = 7,2 \cdot 10^4 \cdot V_s^{2/3} \cdot \left[\frac{P}{V} \right]^{0,6} \cdot \mu^{-2/3} \quad (4.4)$$

Donde en particular el coeficiente $C_2 = 7,2 \cdot 10^4$ se encuentra ajustado a un sistema de referencia distinto al estudiado en este trabajo, es por esto que para la primera etapa del proceso de fermentación, la estimación teórica del coeficiente volumétrico de transferencia de masa dista del valor experimental por al rededor de $k_L a_{exp} - k_L a_{teo} = 0,00015[1/s]$.

Los parámetros obtenidos a partir de este ajuste permitirán estimar con mayor precisión el coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$ para el sistema estudiado en cualquier etapa del proceso de fermentación, la ecuación obtenida corresponde a:

$$k_L a = 12,3 \cdot 10^4 \cdot V_s^{2/3} \cdot \left[\frac{P}{V} \right]^{0,6} \cdot \mu^{-2/3} \quad (4.5)$$

El ajuste fue realizado mediante la herramienta Solver de Excel usando como objetivo la reproducción del valor experimental obtenido para la primera etapa del proceso $k_L a = 0,00042[1/s]$ y permitió modificar el coeficiente C_2 de la ecuación 4.4 a un valor que representara de forma más precisa la influencia de características del sistema en estudio en la estimación realizada. Esta ecuación permitirá estimar de forma más precisa el coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$ para las distintas etapas del proceso de fermentación.

4.6. Validación de la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa mediante correlaciones.

En esta sección se busca determinar la calidad de la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa mediante el método teórico, para esto, se usará como referencia un trabajo en que se reportan valores de este parámetro para un reactor de 5 L en el que crecen hongos filamentosos en particular *Aspergillus terrues*, un sistema similar al estudiado en este trabajo [31]. En la Figura 4.3, se exhiben características relevantes del sistema de referencia.

Tabla 4.3: Características geométricas relevantes para la estimación del k_La , del reactor utilizado a escala laboratorio en trabajo de referencia [31].

Parámetro	Magnitud	Unidad de medida
Volumen máximo	5	L
Volumen operación	3,5	L
Diámetro impeller	8,5	cm
Diámetro interno	16,5	cm
Número de impellers	2	-
Tipo de impeller	Rushton	-

Utilizando la ecuación 4.5 ajustada bajo las condiciones de operación utilizadas para al momento de la determinación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de masa k_La , se determina dicho coeficiente para las distintas condiciones de operación señaladas en el trabajo de referencia y son comparadas con los resultados reportados en este.

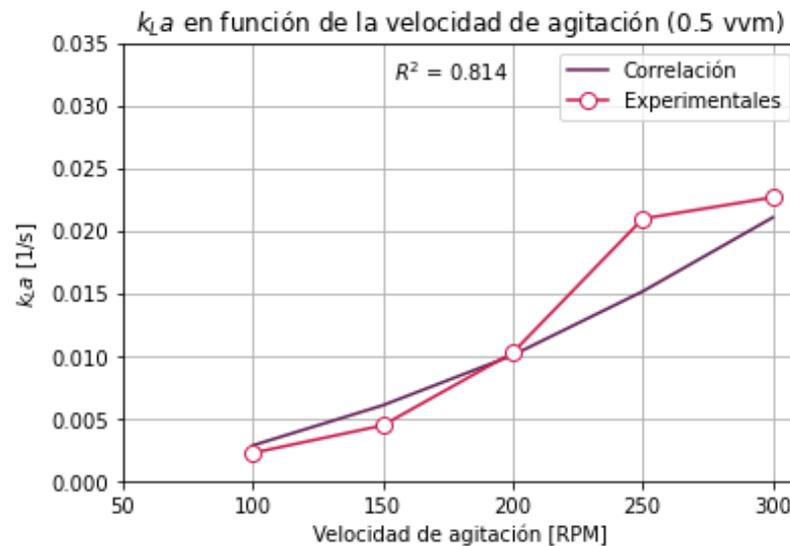


Figura 4.8: Comparación de k_La en función de la velocidad de agitación para valores experimentales del trabajo de referencia y valores determinados de forma teórica mediante correlaciones a una aireación de 0.5 vvm.

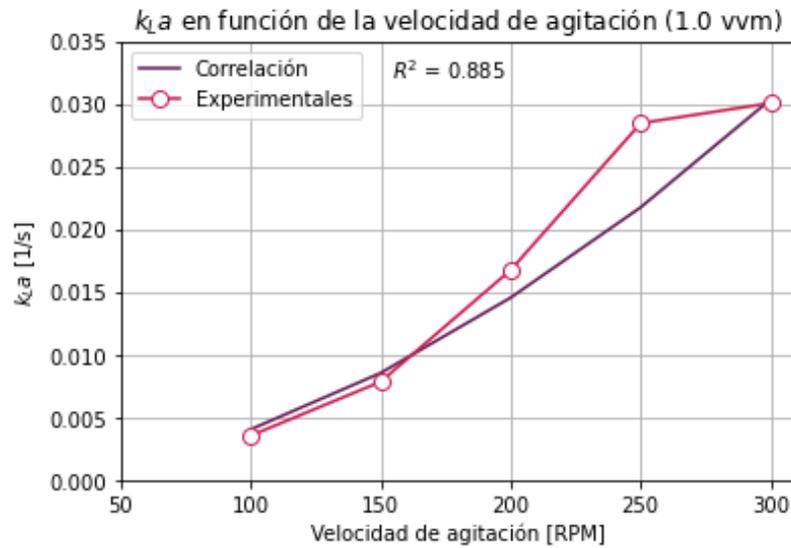


Figura 4.9: Comparación de k_{La} en función de la velocidad de agitación para valores experimentales y valores determinados de forma teórica mediante correlaciones a una aireación de 1.0 vvm.

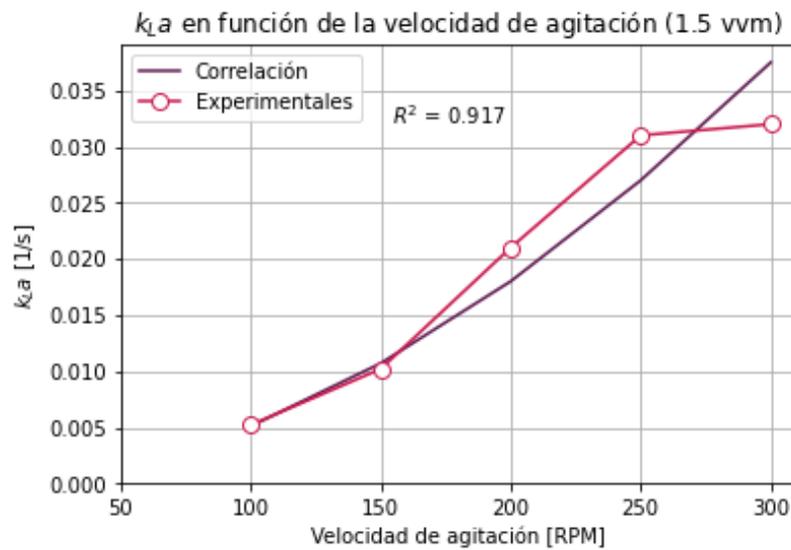


Figura 4.10: Comparación de k_{La} en función de la velocidad de agitación para valores experimentales y valores determinados de forma teórica mediante correlaciones a una aireación de 1.5 vvm.

A partir de las Figuras 4.8, 4.9 y 4.10 es posible observar que el método teórico logra estimar el k_La de forma aceptable para las distintas condiciones de operación reportadas en el trabajo referenciado, en particular para velocidades de agitación bajas entre los 100 y 200 RPM. Posterior al rango mencionado, existe una mayor diferencia entre los valores estimados y los experimentales, esto se puede deber a que el crecimiento de la biomasa se realiza en forma de agregados, los cuales al aumentar la velocidad de agitación se ven dañados o destruidos debido al mayor esfuerzo de corte generado en el sistema, reduciendo de esta manera el k_La exhibido en los datos experimentales. El método teórico no es capaz de incluir este efecto en el modelo representado por la ecuación por lo que su estimación tiene un comportamiento más lineal, representado por las diferencias con los datos experimentales en el rango 250 - 300 RPM.

Este resultado permite corroborar que la correlación utilizada permite realizar una buena estimación del coeficiente de transferencia de masa volumétrico k_La , con coeficientes de determinación superiores a $R^2 = 0.814$ para todas las condiciones analizadas y siendo aún más precisa cuando se utilizan bajas velocidades de agitación, aquellas que son mayormente utilizadas en el sistema en estudio.

Dado que el fin del proyecto es fomentar el crecimiento de biomasa y obtener la mayor cantidad de proteína total, operar en el rango superior a los 200 [RPM] sería contraproducente para este fin, es por esto que se realiza nuevamente el análisis previo, esta vez solo en el rango entre los 100 y 200 [RPM].

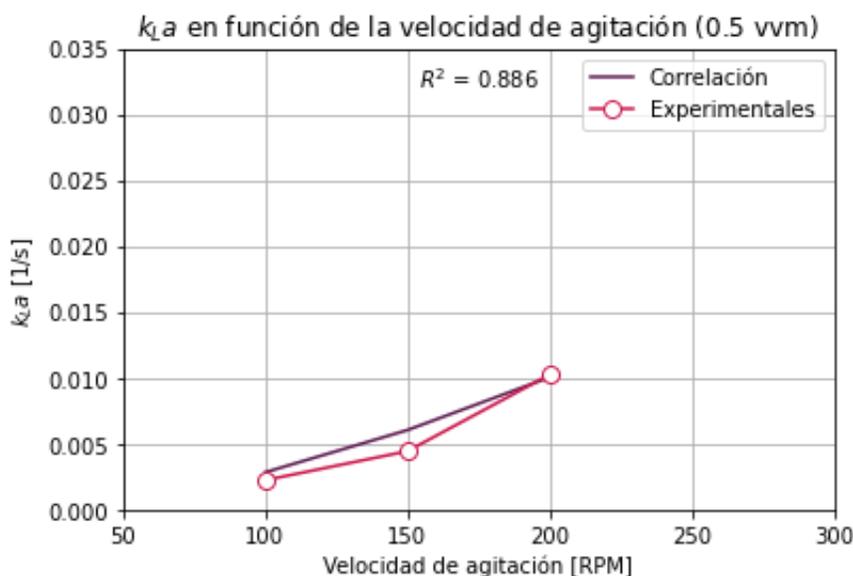


Figura 4.11: Comparación de k_La en función de la velocidad de agitación para valores experimentales y valores determinados de forma teórica mediante correlaciones a una aireación de 0.5 vvm en el rango entre 100 y 200 [RPM].

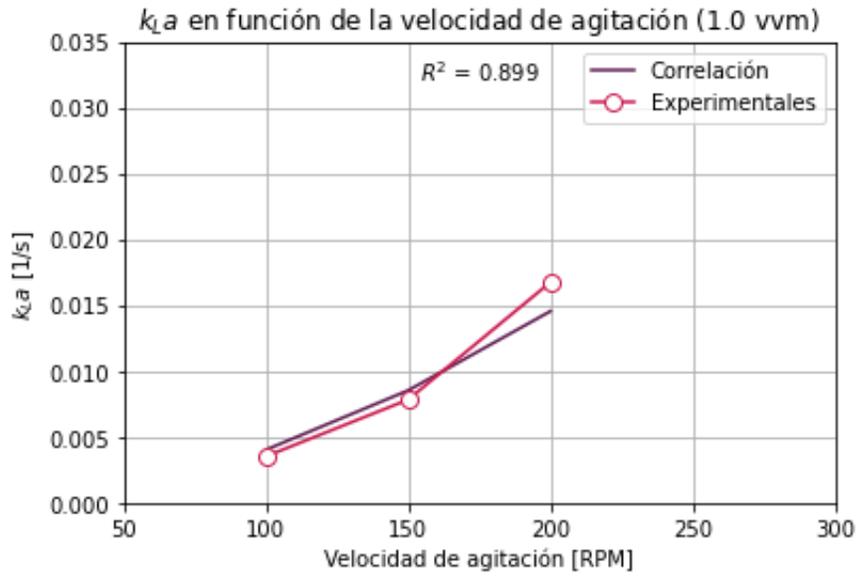


Figura 4.12: Comparación de $k_L a$ en función de la velocidad de agitación para valores experimentales y valores determinados de forma teórica mediante correlaciones a una aireación de 1.0 vvm en el rango entre 100 y 200 [RPM].

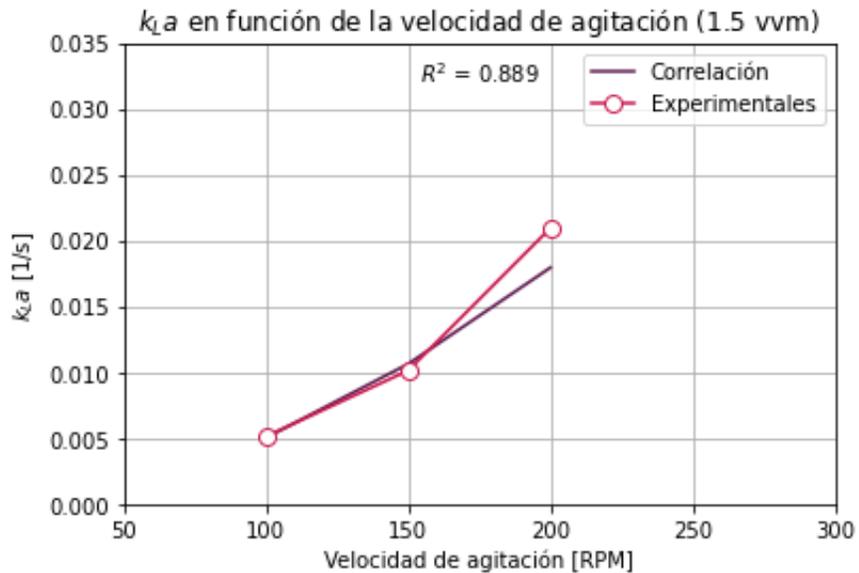


Figura 4.13: Comparación de $k_L a$ en función de la velocidad de agitación para valores experimentales y valores determinados de forma teórica mediante correlaciones a una aireación de 1.5 vvm en el rango entre 100 y 200 [RPM].

A partir de estos, se puede observar que el ajuste de la estimación teórica es aún mejor que para el previo análisis, obteniendo un coeficiente de determinación mínimo de $R^2 = 0.886$, lo que disminuye el grado de incertidumbre asociado a la estimación teórica utilizada.

4.7. Estrategia de escalamiento

Determinada y ajustada la ecuación que permite realizar la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa en el sistema, es ahora posible diseñar una estrategia para el escalamiento de este, utilizando como base el mantener el dicho coeficiente constante en ambas escalas [40]. Para un sistema de características similares, la estrategia de escalamiento constará de los siguientes pasos:

1. Medición experimental de la densidad del sistema y la viscosidad de este en las distintas etapas del proceso.
2. Estimación teórica del coeficiente volumétrico de transferencia de masa a partir de las condiciones de operación del proceso y las mediciones experimentales de viscosidad.
3. De forma paralela, la determinación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de masa mediante el método de degaseo para una etapa inicial del proceso en que no se presenten células vivas.
4. En caso de que los valores de k_La obtenidos no sean idénticos, ajuste de los parámetros de la ecuación utilizada para la estimación teórica del coeficiente volumétrico de transferencia de masa.
5. Nueva estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa para todas las etapas del proceso utilizando la ecuación ajustada.
6. Cálculo de las condiciones de operación requeridas para reproducir el coeficiente volumétrico de transferencia de masa calculado en cada etapa en la escala objetivo del escalamiento.
7. Ajuste de las condiciones de operación calculadas para reproducir el coeficiente volumétrico de transferencia de masa objetivo, en esta etapa es crucial controlar la velocidad de agitación para evitar alcanzar niveles de esfuerzos de corte que puedan afectar negativamente la fisiología del cultivo, mermando el crecimiento de biomasa.

En la Figura 4.14 se exhibe un diagrama de la estrategia de escalamiento diseñada.

Estrategia de Escalamiento

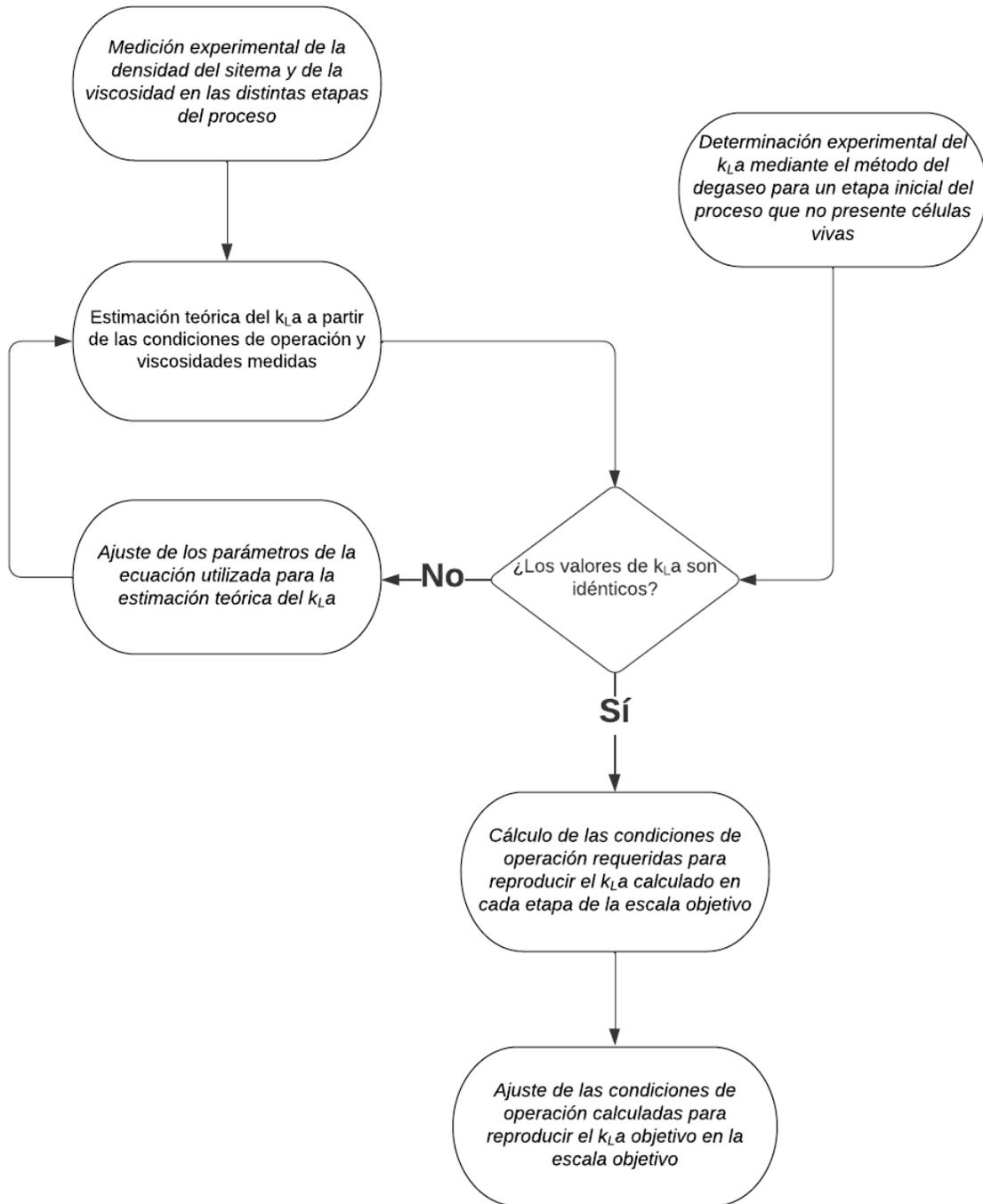


Figura 4.14: Diagrama estrategia de escalamiento. Elaboración propia.

4.8. Condiciones de operación para escala industrial.

En esta sección se presentarán los resultados para las condiciones de operación a las que deberá operar el equipo de tamaño industrial con un volumen de 100 L considerando que se usará un volumen de operación del 70 % del total, este corresponde al equipo "100 L Jacketed Glass Reactor" de la empresa LABOAO [41].

Las características de este se exhiben en la siguiente tabla:

Tabla 4.4: Características geométricas del reactor de 100 L LAOBAO relevantes para la determinación de las condiciones de operación [41].

Dimensión	Magnitud	Unidad
Volumen máximo	100	[L]
Volumen de operación	70	[L]
Altura	239	[cm]
Diámetro interno	46,5	[cm]
Diámetro de Impeller	24	[cm]
Número de Agitadores	2	-
Tipo de Impeller	Rushton	-

4.8.1. Condiciones de operación para primera etapa del proceso de fermentación (Primer inóculo).

A partir de la ecuación ajustada para la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa 4.5, se determina dicho coeficiente para la primera etapa del proceso de fermentación correspondiente a aquella en que es añadido el primer inóculo y el momento en que es tomada la segunda muestra de análisis de viscosidad. Para esto, se usarán los datos de las características geométricas del equipo usado en el laboratorio 1.1, las condiciones de operación utilizadas 1.2 y la viscosidad determinada de forma experimental para esta etapa $\mu = 7,12[Pa \cdot s]$, dicha información junto con la memoria de cálculo se presentan en el Anexo C. El valor obtenido para este parámetro es de:

$$k_L a_{E1} = 0,00041[1/s]$$

Este valor es consecuente con la forma de la ecuación que describe una disminución de la magnitud del coeficiente volumétrico de transferencia de masa al aumentar la viscosidad de la muestra. Como describe la estrategia de escalamiento diseñada, se proceden a realizar los cálculos que permitirían determinar las condiciones de operación necesarias para reproducir el $k_L a$ determinado, en el reactor de escala industrial, dichos cálculos se presentan en el Anexo C. Los resultados obtenidos para las condiciones de operación se presentan a continuación:

Tabla 4.5: Condiciones de operación en la primera etapa del proceso de fermentación a escala industrial.

Parámetro	Temperatura [°C]	Agitación [RPM]	Aireación [vvm]	Volumen de operación [L]
Magnitud	25-27	15	0,08	70

Los resultados obtenidos y observados en la Tabla 4.5 concuerdan con el comportamiento esperado, en sistemas de este tipo, el aumento de la escala se refleja en una considerable disminución tanto de la aireación como de la velocidad de agitación [31], que a pesar de lograr mantener el coeficiente volumétrico de transferencia de masa a mayor escala, evitan aumentar los esfuerzos de corte sufridos por el sistema con tal de no reducir el crecimiento de la biomasa.

4.8.2. Condiciones de operación para segunda etapa del proceso de fermentación (Segundo inóculo).

El procedimiento se repite para la segunda etapa del proceso de fermentación, utilizando las mismas características geométricas, variando las condiciones de operación y utilizando la viscosidad determinada de forma experimental para dicha etapa $\mu = 5,21[Pa \cdot s]$. Al determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa a partir de la ecuación 4.5 para las condiciones de operación correspondientes, se obtiene:

$$k_{LaE2} = 0,0016[1/s]$$

Existen dos factores relevantes en el resultado obtenido para esta etapa del proceso de fermentación, la primera corresponde a la magnitud de la viscosidad, en un caso normal, la viscosidad de esta etapa debiese ser mayor a la previa pero dadas las complicaciones de contaminación observadas en el reactor del cual se extrajo la muestra para esta etapa, se reportó un magnitud de viscosidad menor lo cual influyó en el aumento del coeficiente volumétrico de transferencia de masa. El segundo factor y aún más influyente, corresponde a la velocidad de agitación que aumenta al doble para esta etapa, provocando también un aumento significativo en la magnitud del k_{La} obtenido. A continuación se exhiben las condiciones de operación que fueron calculadas para reproducir este k_{La} en la escala industrial.

Tabla 4.6: Condiciones de operación en la primera etapa del proceso de fermentación a escala industrial.

Parámetro	Temperatura [°C]	Agitación [RPM]	Aireación [vvm]	Volumen de operación [L]
Magnitud	25-27	32	0,09	70

De los resultados exhibidos en la Tabla 4.6, se puede observar que dado el mayor coeficiente volumétrico de transferencia de masa estimado para esta etapa de la fermentación a una escala de laboratorio, es necesario aumentar la velocidad de agitación en la escala industrial, estos resultados también concuerdan con lo esperado al observar escalamientos de sistemas de similares condiciones [31].

Capítulo 5

Conclusiones

Se concluye que el trabajo realizado permitió cumplir el objetivo general establecido, el diseño de una estrategia para el escalamiento de un biorreactor del tipo tanque agitado de cultivo sumergido de un consorcio de hongos marinos filamentosos a un nivel de planta piloto-industrial.

El trabajo realizado en la puesta en marcha de los biorreactores a escala laboratorio, permitió reproducir las condiciones de operación reportadas como óptimas para el crecimiento de biomasa en el sistema en estudio. Además, permitió observar cómo las distintas condiciones de operación afectaban el proceso de fermentación y facilitó la extracción de muestras a lo largo de las distintas etapas del proceso para medición de parámetros relevantes para el cumplimiento del objetivo final del estudio.

Las mediciones experimentales realizadas en el viscosímetro y reómetro utilizados, permitieron determinar la densidad representativa del sistema y la viscosidad de este en cada punto del proceso de fermentación, mostrando que este último parámetro aumenta en magnitud a lo largo del proceso, comenzando en $6,87 [Pa \cdot s]$ y alcanzando los $9,56 [Pa \cdot s]$.

Los resultados de las mediciones experimentales permitieron realizar estimaciones del coeficiente volumétrico de transferencia de masa k_La mediante el uso de correlaciones teóricas entre las condiciones de operación, parámetros del sistema y el coeficiente en cuestión, dichos resultados reportan una magnitud menor a los usualmente reportados en bibliografía, esto se debe principalmente a que el sistema en estudio en este trabajo tiene un menor volumen y por ende utiliza equipos más pequeños que los usados en los trabajos de referencia.

En base a la incertidumbre asociada a la utilización del método teórico para la estimación del k_La , se concluyó que era necesario realizar un ajuste de dicho método, esto se logró a través del ajuste de la ecuación 4.4 utilizada para la estimación del k_La mediante la determinación del mismo coeficiente usando el método experimental del degaseo que reportó valores del mismo orden que aquellos predichos de forma teórica, la estimación teórica reportó valores entre $0,00024 - 0,00069 [1/s]$, mientras que el método teórico reportó un valor de $0,00042 [1/s]$. Validando que la magnitud de los resultados provenientes de la estimación teórica realizada era correcta y se debía al volumen del sistema en estudio.

Con tal de disminuir el grado de incertidumbre asociado a la estimación teórica del k_{La} , se logró validar el uso de la correlación para estimar el k_{La} utilizando condiciones de operación y parámetros referenciales correspondientes a un reactor con un volumen de operación de 3,5 L para el crecimiento de hongos filamentosos *Aspergillus terreus* [31], obteniendo un ajuste con un coeficiente de determinación superior al $R^2 = 0,814$ respecto de los datos experimentales reportados en dicha referencia y con un mejor ajuste cuando el análisis es acotado al rango entre 100 y 200 RPM, obteniendo un coeficiente de determinación igual o mayor a $R^2 = 0.886$.

Se concluye que para completar la estrategia de escalamiento, es necesario utilizar la información obtenida mediante el trabajo realizado para determinar las condiciones de operación a las que debiese operar un sistema de mayor escala. Para esto, a partir del método teórico para la estimación del k_{La} se utilizó dicho parámetro como criterio de escalamiento y con este, determinar las condiciones de operación que debiesen ser reproducidas en un biorreactor de escala industrial con el fin de obtener un nivel de producción similar al logrado en escala laboratorio en términos del crecimiento de biomasa fúngica.

Las condiciones de operación obtenidas correspondientes a una aireación de 0,08 [vvm] y agitación de 15 [RPM] para la primera etapa del proceso de fermentación y una aireación de 0,09 [vvm] y agitación de 32 [RPM] para la segunda etapa del proceso de fermentación, son menores en comparación a aquellas requeridas a escala de laboratorio, este comportamiento es observable en toda referencia que exhibe resultados de este mismo procedimiento y se espera que estas puedan ser validadas de forma experimental.

Mediante la metodología diseñada para llevar a cabo los objetivos del estudio y los procedimientos tanto teóricos como experimentales descritos, se diseñó satisfactoriamente una estrategia que permite escalar un sistema de condiciones similares al estudiado a un nivel piloto, permitiendo conocer las condiciones de operación que permitirían obtener resultados similares a los obtenidos en escala de laboratorio en términos de producción de biomasa.

Se deja propuesto verificar que las condiciones de operación obtenidas mediante la utilización de la estrategia diseñada permitan obtener los resultados deseados a mayor escala.

Capítulo 6

Recomendaciones y proyecciones futuras

Se recomienda reproducir las pruebas descritas en este trabajo utilizando el biorreactor de volumen máximo de 5L disponible en el laboratorio del CeBiB, esto con el fin de poder corroborar que la estimación teórica del coeficiente volumétrico de transferencia de masa k_La reporte resultados dentro del rango de aquellos referenciados para sistemas de un volumen y características geométricas similares.

Para la ejecución de la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa k_La mediante el método experimental, se recomienda el uso de un lector del sensor de oxígeno cuya respuesta sea más rápida que la del biorreactor Braun Biotech modelo BIOSTAT B del laboratorio, esto permitiría conocer el tiempo de respuesta del electrodo, permitiendo ajustar la medición realizada y de esta forma obtener un valor más preciso para el k_La experimental.

En búsqueda de verificar que la viscosidad del sistema aumenta con el tiempo para toda etapa del proceso de fermentación, se recomienda medir nuevamente una muestra de la segunda etapa del proceso (segundo inóculo), utilizando esta vez una muestra extraída de un biorreactor que no presente problemas de contaminación.

Al momento de llevar a cabo la estrategia de escalamiento diseñada en este trabajo, se recomienda hacer especial énfasis en la observación del efecto de los esfuerzos de corte sobre la fisiología del sistema y sus efectos en el crecimiento de la biomasa en la escala piloto, esto para evitar que la búsqueda de la reproducción del coeficiente volumétrico de transferencia de masa como criterio de escalamiento mediante el aumento de la velocidad de agitación del equipo, tenga un efecto negativo sobre el objetivo final del proceso, el crecimiento de la biomasa fúngica y la producción de proteína total.

Se proyecta que la ejecución de la estrategia de escalamiento diseñada en este trabajo, permita la obtención de condiciones de operación que resulten en una buena primera estimación de aquellas requeridas para reproducir el coeficiente volumétrico de transferencia de masa en la escala piloto pero como es mencionado en la misma, se requerirá de un ajuste experimental dado que la estrategia diseñada no logra incluir todos los factores que pueden afectar el proceso.

Se espera que la reproducción del k_La obtenido a escala laboratorio en la escala piloto sea un criterio satisfactorio para obtener resultados similares para el proceso de fermentación en términos del crecimiento de biomasa y la producción de proteína total. El futuro acceso a tecnología, en particular a lectores para el sensor de oxígeno con una mayor precisión y en tiempo real durante el transcurso del proceso de fermentación podrían permitir la utilización de otros criterios para el escalamiento tal como la tasa de transferencia de oxígeno. Con dicho trabajo sería posible comparar y evaluar la calidad del uso del k_La como base para el escalamiento.

Bibliografía

- [1] Ahlborn, J., Stephan, A., Meckel, T., Maheshwari, G., Rühl, M., y Zorn, H., “Upcycling of food industry side streams by basidiomycetes for production of a vegan protein source,” *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, vol. 8, pp. 447–455, 2019, [doi:10.1007/s40093-019-00317-4](https://doi.org/10.1007/s40093-019-00317-4).
- [2] Lau, B. F. y Abdullah, N., “Bioprospecting of *lentinus squarrosulus* mont., an underutilized wild edible mushroom, as a potential source of functional ingredients: A review,” 2017, [doi:10.1016/j.tifs.2016.11.017](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.017).
- [3] Öztürk, M., Tel-Çayan, G., Muhammad, A., Terziolu, P., y Duru, M. E., “Mushrooms: A source of exciting bioactive compounds,” 2015, [doi:10.1016/B978-0-444-63473-3.00010-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63473-3.00010-1).
- [4] Insights, F. B., “Mushroom market size, share covid-19 impact analysis, by type, by form, and regional forecast (2021-2028),” 2020, <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/mushroom-market-100197>.
- [5] Pérez-Chávez, A. M., Mayer, L., y Albertó, E., “Mushroom cultivation and biogas production: A sustainable reuse of organic resources,” 2019, [doi:10.1016/j.esd.2019.03.002](https://doi.org/10.1016/j.esd.2019.03.002).
- [6] Bakratsas, G., Polydera, A., Katapodis, P., y Stamatis, H., “Recent trends in submerged cultivation of mushrooms and their application as a source of nutraceuticals and food additives,” 2021, [doi:10.1016/j.fufo.2021.100086](https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100086).
- [7] Letti, L. A. J., Vítola, F. M. D., de Melo Pereira, G. V., Karp, S. G., Medeiros, A. B. P., da Costa, E. S. F., Bissoqui, L., y Soccol, C. R., “Solid-state fermentation for the production of mushrooms,” 2018, [doi:10.1016/b978-0-444-63990-5.00014-1](https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00014-1).
- [8] Corrêa, R. C. G., Brugnari, T., Bracht, A., Peralta, R. M., y Ferreira, I. C., “Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *pleurotus* spp. (oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings,” 2016, [doi:10.1016/j.tifs.2016.01.012](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.012).
- [9] Fazenda, M. L., Seviour, R., McNeil, B., y Harvey, L. M., “Submerged culture fermentation of "higher fungi": The macrofungi,” 2008, [doi:10.1016/S0065-2164\(07\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)00002-0).
- [10] de Andrade, M. C. N., Zied, D. C., de Almeida Minhoni, M. T., y Filho, J. K., “Yield of four *Agaricus bisporus* strains in three compost formulations and chemical composition analyses of the mushrooms,” *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 39, pp. 593–598, 2008.
- [11] Singaraj, A., Awasthi, D., Professor, A., India, U. P., Bhoi, T., Professor, A., y Sharma, S. K., “Chief editor editor editorial advisors bioprospection of *cordyceps tuberculata* for production of bioactive polysaccharides under submerged culture conditions,” 2016, www.eprajournals.com.

- [12] Petre, M. y Petre, V., “Biotechnology of mushroom growth through submerged cultivation,” 2015, [doi:10.1016/B978-0-12-802794-3.00001-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802794-3.00001-1).
- [13] Garcia-Ochoa, F. y Gomez, E., “Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview,” 2009, [doi:10.1016/j.biotechadv.2008.10.006](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006).
- [14] Landeta-Salgado, C., Cicatiello, P., y Lienqueo, M. E., “Mycoprotein and hydrophobin like protein produced from marine fungi *paradendryphiella salina* in submerged fermentation with green seaweed *ulva* spp.,” *Algal Research*, vol. 56, 2021, [doi:10.1016/j.algal.2021.102314](https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102314).
- [15] Landeta, C., “Comunicación personal,” 2023.
- [16] Dewey, W. C., “Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic,” *International Journal of Hyperthermia*, vol. 25, pp. 3–20, 2009, [doi:10.1080/02656730902747919](https://doi.org/10.1080/02656730902747919).
- [17] Wang, S.-J. y Zhong, J.-J., “Chapter 6. bioreactor engineering,” 2007.
- [18] Liu, Y. S. y Wu, J. Y., “Effects of tween 80 and ph on mycelial pellets and exopolysaccharide production in liquid culture of a medicinal fungus,” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 39, pp. 623–628, 2012, [doi:10.1007/s10295-011-1066-9](https://doi.org/10.1007/s10295-011-1066-9).
- [19] Gomes, D. G., Coelho, E., Silva, R., Domingues, L., y Teixeira, J. A., “Bioreactors and engineering of filamentous fungi cultivation,” 2023, [doi:10.1016/b978-0-323-91872-5.00018-1](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91872-5.00018-1).
- [20] Elisashvili, V., “Submerged cultivation of medicinal mushrooms: Bioprocesses and products (review),” 2012, www.begellhouse.com.
- [21] Richmond, A. y Hu, Q., *Handbook of microalgal culture : applied phycology and biotechnology*.
- [22] Whitman, W. G., “The two-film theory of gas absorption it seems to explain satisfactorily the well-recognized differences of asotion rate for vaing concentrations.”
- [23] Sander, R., “Compilation of henry’s law constants (version 4.0) for water as solvent,” *Atmospheric Chemistry and Physics*, vol. 15, pp. 4399–4981, 2015, [doi:10.5194/acp-15-4399-2015](https://doi.org/10.5194/acp-15-4399-2015).
- [24] Battino, R., Rettich, T. R., y Tominaga, T., “The solubility of oxygen and ozone in liquids,” *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 12, pp. 163–178, 1983, [doi:10.1063/1.555680](https://doi.org/10.1063/1.555680).
- [25] Gogate, P. R., Beenackers, A. A. C. M., y Pandit, A. B., “Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review,” 2000.
- [26] Garcia-Ochoa, F. y Gomez, E., “Biochemical engineering journal mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions,” 1998.
- [27] Riet, K. V., “Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels introduction stirred vessels are frequently employed to achieve a,” 1979, <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [28] C.M. Cooper., A. Fernstrom., y S. A. M., “Performance of agitated gas-liquid contactors,” 1944.
- [29] Linek, V. y Vacek, V., “Chemical engineering use of catalyzed sulfite oxidation kinetics for the determination of mass transfer characteristics of gas-liquid contactors.”

- [30] Padilla-Córdova, C., Mongili, B., Contreras, P., Fino, D., Tommasi, T., y Díaz-Barrera, A., “Productivity and scale-up of poly(3-hydroxybutyrate) production under different oxygen transfer conditions in cultures of *azotobacter vinelandii*,” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 95, pp. 3034–3040, 2020, [doi:10.1002/jctb.6465](https://doi.org/10.1002/jctb.6465).
- [31] Shin, W. S., Lee, D., Kim, S., Jeong, Y. S., y Chun, G. T., “Application of scale-up criterion of constant oxygen mass transfer coefficient (k_{la}) for production of itaconic acid in a 50 l pilot-scale fermentor by fungal cells of *aspergillus terreus*,” *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, pp. 1445–1453, 2013, [doi:10.4014/jmb.1307.07084](https://doi.org/10.4014/jmb.1307.07084).
- [32] Ju, L.-K. y Chase, G. G., “Improved scale-up strategies of bioreactors,” 1992.
- [33] Meyer, H.-P. y Schmidhalter, D. R., “Summary box: Characteristics of production system production systems, cells and products.”
- [34] Bandaipheth, C. y Prasertsan, P., “Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, k_{la} in exopolysaccharide production from *enterobacter cloacae* wd7,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 66, pp. 216–228, 2006, [doi:10.1016/j.carbpol.2006.03.004](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.004).
- [35] Paar, A., “Instruction manual and safety information rheolabqc rotational rheometer instrument firmware version: 1.33 (original instruction),” 2022.
- [36] Albaek, M. O., Gernaey, K. V., y Stocks, S. M., “Gassed and ungassed power draw in a pilot scale 550 litre fermentor retrofitted with up-pumping hydrofoil b2 impellers in media of different viscosity and with very high power draw,” *Chemical Engineering Science*, vol. 63, pp. 5813–5820, 2008, [doi:10.1016/j.ces.2008.08.024](https://doi.org/10.1016/j.ces.2008.08.024).
- [37] Michel, B. J. y Miller, S. A., “Power requirements of gas-liquid agitated systems.”
- [38] V. Abrardi, G. Rover, S. S. G. B. R. C., “Sparged vessels agitated by multiple turbines, *proc. eur. conf. mix.* 6 (1988) 329–336.”.
- [39] School, W. S., “Water density,” 2023, <https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/water-density>.
- [40] Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., y Santos, V. E., “Fluid dynamic conditions and oxygen availability effects on microbial cultures in stbr: An overview,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 164, 2020, [doi:10.1016/j.bej.2020.107803](https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107803).
- [41] LaoBao, “100l jacketed glass reactor,” 2023, <https://www.laboao.com/products/jacketed-glass-reactor/100l-jacketed-glass-reactor>.
- [42] Doran M, P., *Bioprocess Engineering Principles*. 1995.

Anexos

Anexo A. Resultados medición de viscosidad

A.1. Muestra 1: Medio de cultivo

A continuación se exhiben los resultados completos obtenidos para la primera muestra analizada.

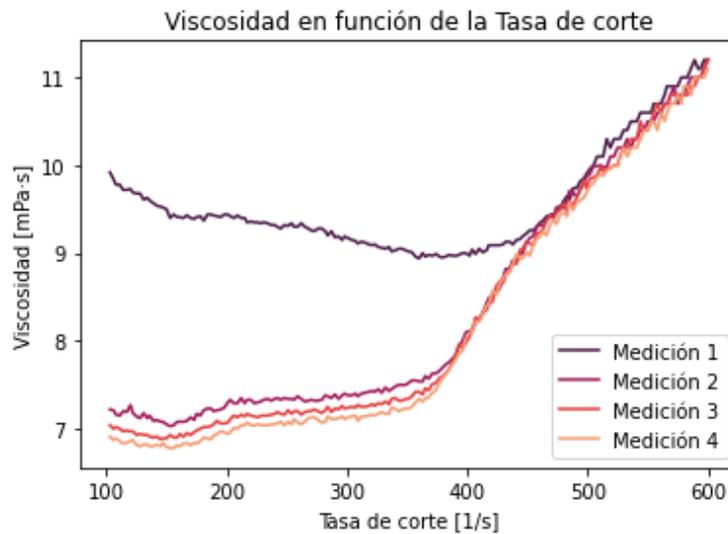


Figura A.1: Viscosidad en función de la tasa de corte para la muestra 1.

De la Figura A.1, es posible observar que la medición 1 reporta magnitudes de viscosidad considerablemente mayores al resto de las mediciones pero se comporta de forma similar a estas. A partir de la segunda medición, la magnitud de la viscosidad reportada es relativamente similar pero para la medición 2 sigue siendo ligeramente superior al resto de mediciones realizadas. Las mediciones 3 y 4 exhiben un comportamiento similar donde se puede observar un rango de tasa de corte entre aproximadamente 100 y 200 [1/s] donde se estabiliza la magnitud de la viscosidad, dicho rango será analizado con profundidad para determinar la magnitud de viscosidad representativa de la muestra.

Es importante mencionar que para todas las mediciones realizadas, posterior a una tasa de corte de 180 [1/s], existe un aumento de la viscosidad, el cual se puede notar de forma pronunciada una vez se alcanza una tasa de corte de 350 [1/s], este comportamiento indica que a altas magnitud de este parámetro, el material cambia su comportamiento pero dado que estas magnitudes nunca serán alcanzadas en el proceso en estudio, son descartas para determinar la magnitud de viscosidad representativa de la muestra.

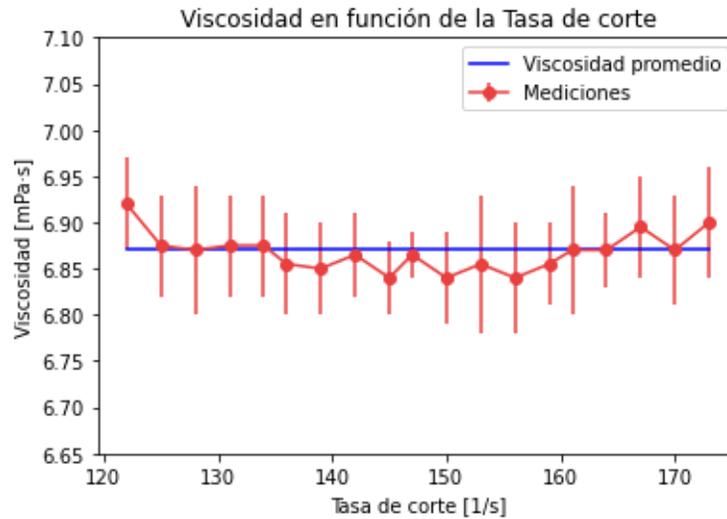


Figura A.2: Viscosidad en función de la tasa de corte para la muestra 1 en un rango de tasa de corte entre 120 y 175 [1/s]

A partir de la Figura A.2, se puede observar un rango de tasa de corte donde la magnitud de la viscosidad es relativamente constante para ambas mediciones exhibidas y esta alcanza un mínimo, el promedio de estas mediciones a lo largo del rango analizado será utilizada como la viscosidad representativa de la muestra.

A.2. Muestra 2: Primer inóculo

A continuación se exhiben los resultados completos obtenidos para la segunda muestra analizada.

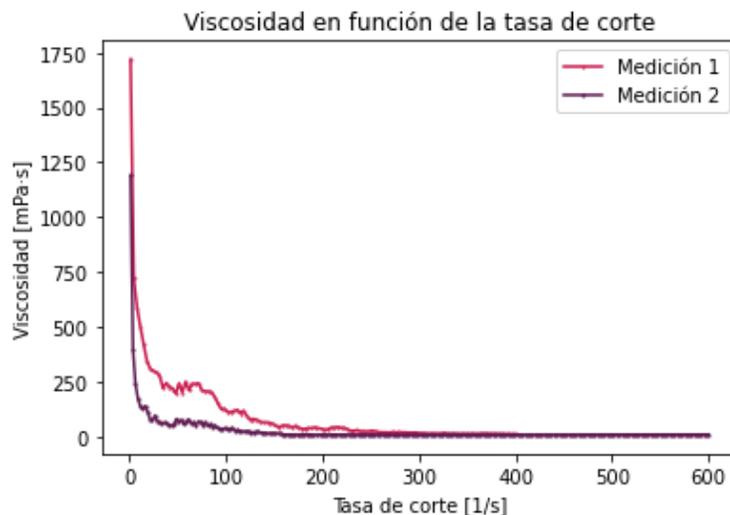


Figura A.3: Totalidad de los datos obtenidos de viscosidad en función de la tasa de corte para la medición realizada a la muestra 2

En la Figura A.3 se puede observar que en un inicio se registran altos valores de viscosidad lo que está asociado al comienzo del funcionamiento del equipo, estos valores disminuyen rápidamente para estabilizarse una vez alcanzado una tasa de corte de 180 [1/s], la variabilidad de las mediciones observada entre el rango de 0-180 [1/s] se asocia a la presencia de grumos en la muestra. Se procede a analizar con mayor precisión el rango de tasa de corte superior a los 180 [1/s] con tal de identificar la real magnitud de la viscosidad de la muestra

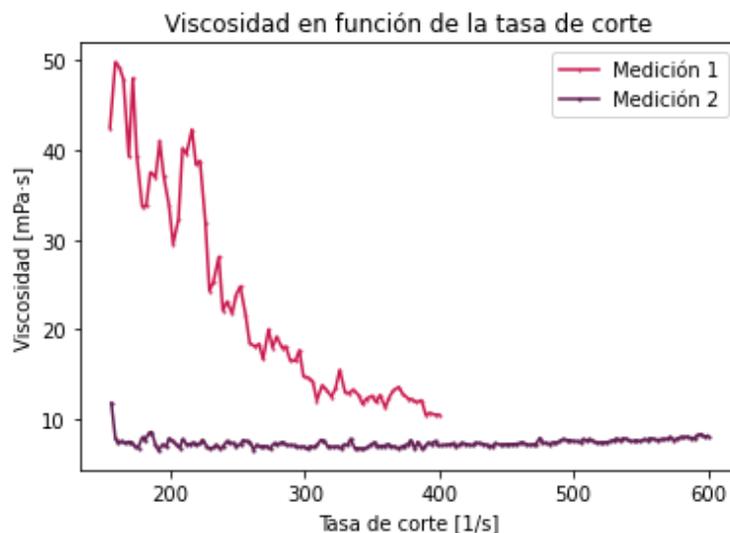


Figura A.4: Viscosidad en función de la tasa de corte para la medición realizada a la muestra 2 a una tasa de corte superior a los 180 [1/s]

A partir de la Figura A.4 se puede observar que la magnitud de la viscosidad se estabiliza al rededor de los $7,2 \text{ [mPa} \cdot \text{s]}$ en un rango de tasa de corte entre los $180 - 360 \text{ [1/s]}$. Superado el rango mencionado, se observa un aumento en la magnitud de la viscosidad, dicho comportamiento podría explicarse por un cambio en el comportamiento del material desde pseudo-plástico a dilatante por la alta magnitud de esfuerzo de corte aplicada, considerando que en las condiciones de operación del proceso, nunca se alcanzará una magnitud de esfuerzo de corte similar, se descarta su influencia en la viscosidad representativa de la muestra para este estudio.

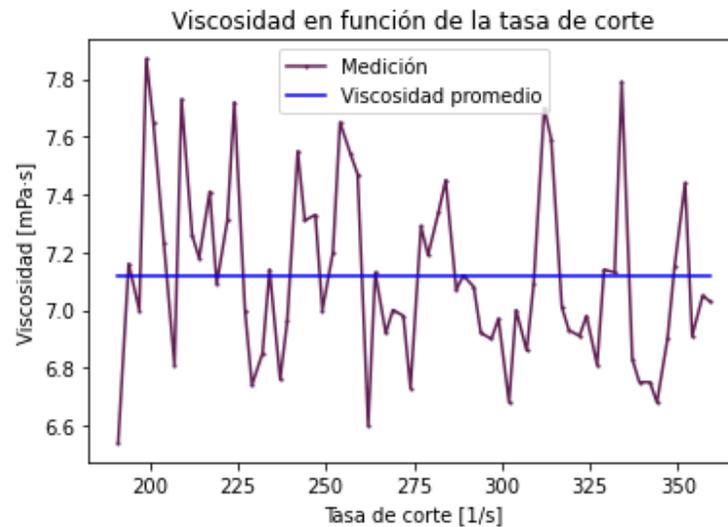
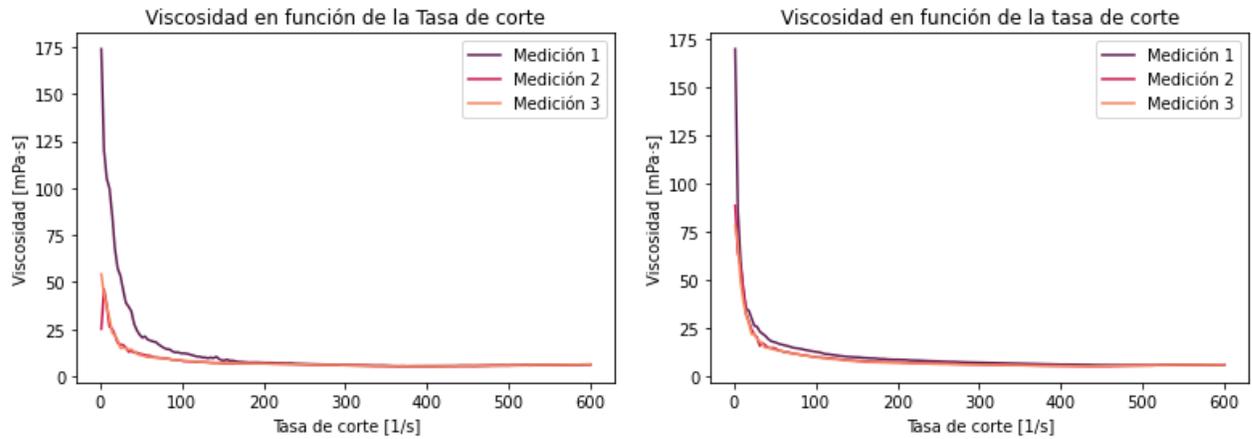


Figura A.5: Viscosidad en función de la tasa de corte para la medición realizada a la muestra 2 en un rango

Finalmente, se exhibe la Figura A.5 presentada en la sección de resultados en que se observa el rango de esfuerzo de corte de interés en donde la magnitud de la viscosidad es más estable y es a partir de este que se determina el valor promedio y representativo de la muestra para su uso en posteriores cálculos.

A.3. Muestra 3: Segundo inóculo

Para el caso de la muestra 3, se realizaron pruebas con tal de determinar si la medición se veía afectada por la previa homogeneización de la muestra.

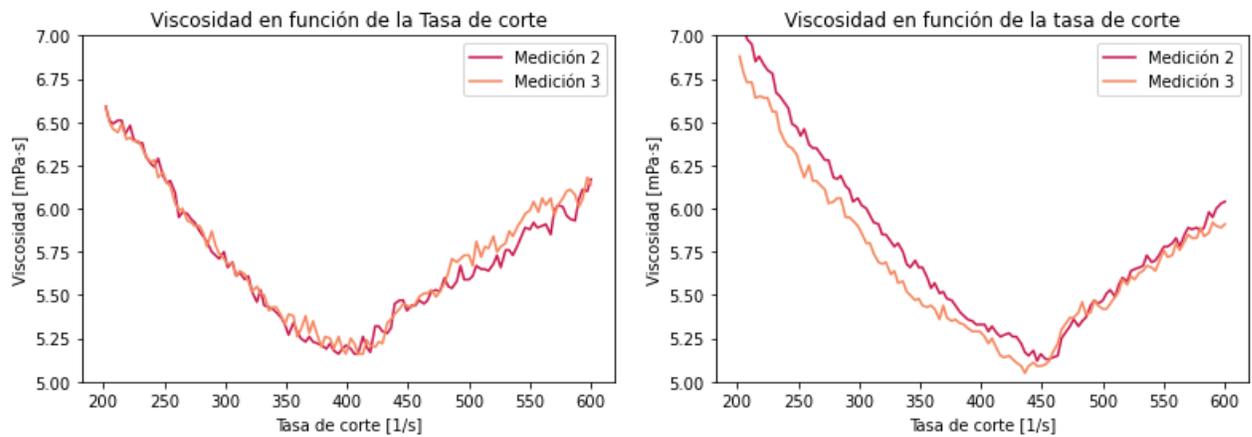


(a) Muestra No Homogeneizada

(b) Muestra Homogeneizada

Figura A.6: Viscosidad en función de la tasa de corte para tres mediciones realizadas a la muestra 3 en los casos de muestra homogeneizada y no homogeneizada.

A partir de la Figura A.6 se puede observar tanto para la muestra homogeneizada como no homogeneizada, que la medición 1 muestra magnitudes superiores de viscosidad en un inicio, acercándose a los valores reportados en el resto de mediciones una vez la tasa de corte supera los 150 [1/s].



(a) Muestra No Homogeneizada

(b) Muestra Homogeneizada

Figura A.7: Viscosidad en función de la tasa de corte para tres mediciones realizadas a la muestra 3 para tasa de corte superior a los 200 [1/s] en los casos de muestra homogeneizada y no homogeneizada.

En la Figura A.7 se puede para una tasa de corte superior a los 200 [1/s] que la medición 1 continúa exhibiendo valores mayores a los reportados por las otras mediciones lo que se puede deber a la presencia de grumos o a la puesta en marcha del equipo, dado este comportamiento, los datos obtenidos de la primera medición serán descartados para la determinación de la viscosidad representativa de la muestra. Cabe destacar que estos resultados son observables tanto para la muestra homogeneizada como no homogeneizada. También es posible extraer de esta figura, que existe un rango acotado en que la magnitud de la viscosidad es relativamente constante, aproximadamente en un tasa de corte entre 370 y 420 [1/s].

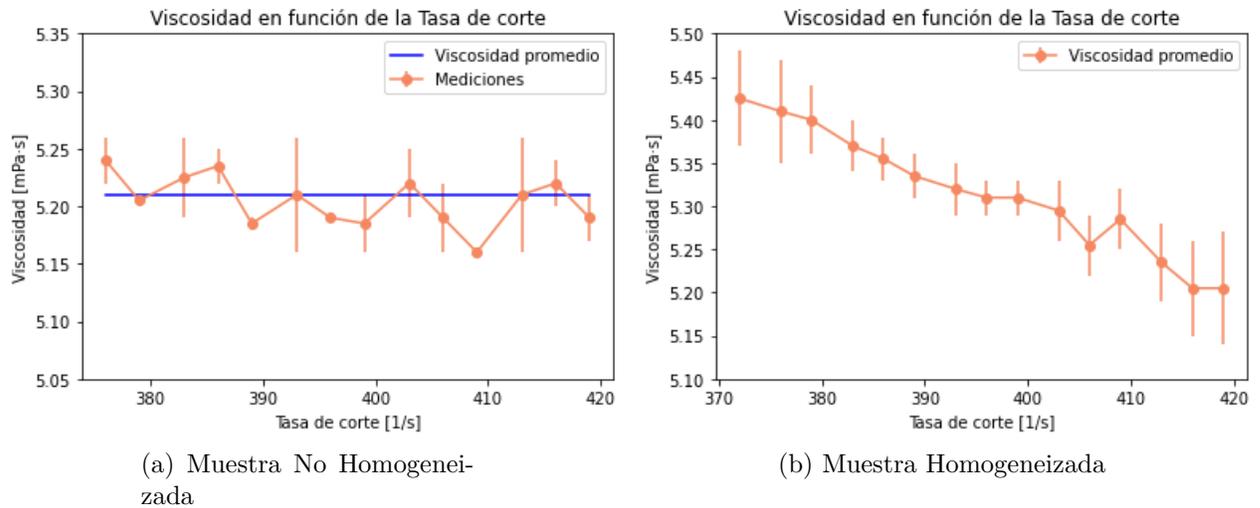


Figura A.8: Viscosidad en función de la tasa de corte para tres mediciones realizadas a la muestra 3 para una rango de tasa de corte entre los 370 y 420 [1/s] en los casos de muestra homogeneizada y no homogeneizada.

Finalmente, en la Figura A.8 se exhiben los resultados para las mediciones 2 y 3, tanto de la muestra homogeneizada como no homogeneizada en un rango de tasa de corte entre los 370 y 420 [1/s]. En esta figura es posible observa que a pesar de diferir en centésimas, los valores aproximados de la viscosidad representativa de la muestra es similar. Dado que no existe una ventaja notoria en realizar una previa homogeneización a la muestra, se concluyó en realizar el resto de las mediciones sin la previa homogeneización de las muestras y además, la magnitud de la viscosidad utilizada para esta muestra será extraído de la muestra no homogeneizada.

A.4. Muestra 4: Fermentación finalizada

A continuación se exhiben los resultados obtenidos para la última muestra analizada que corresponde a la extraída del reactor una vez la fermentación ha finalizado y se prepara para cosechar los hongos.

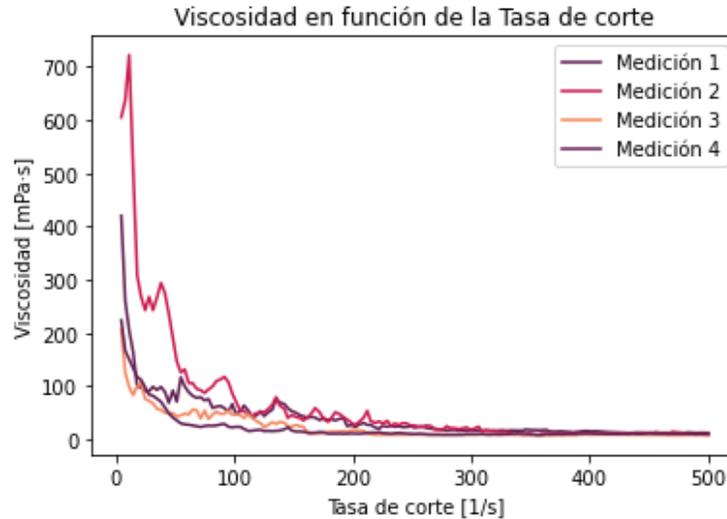


Figura A.9: Viscosidad en función de la tasa de corte para las mediciones realizadas a la muestra 4.

Para esta muestra se puede observar a partir de la Figura A.9 que las primeras dos mediciones realizadas exhiben en un inicio, magnitudes de viscosidad superiores al resto de mediciones realizadas además de estabilizarse a una mayor tasa de corte de corte en comparación. Este comportamiento podría ser explicado por la presencia de sólidos en la muestra que se vieron homogeneizados con el pasar de las mediciones.

A pesar de esto, es posible ver que para cualquier de las mediciones realizadas, el valor de la viscosidad se estabiliza posterior a una tasa de corte de 200 [1/s], es por esto que procede a analizar dicho rango.

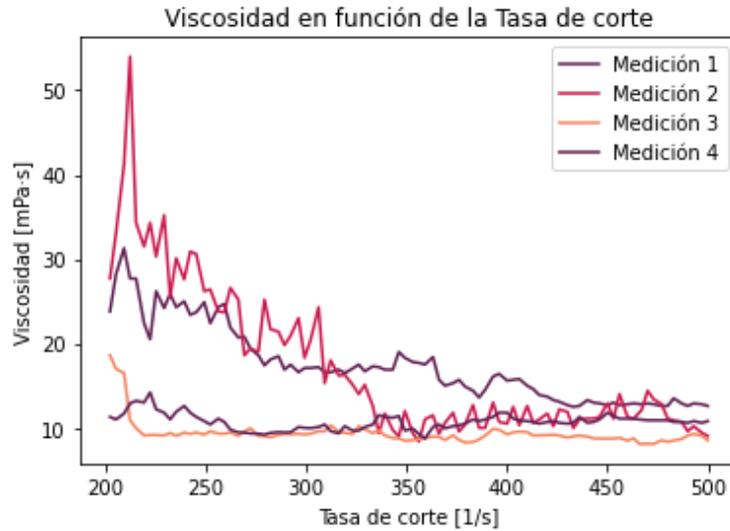


Figura A.10: Viscosidad en función de la tasa de corte para dos de las mediciones realizadas a la muestra 4.

En la Figura A.10 se puede observar que las mediciones 1 y 2 continúan mostrando una alta variabilidad, por esto es que serán descartadas para posteriores análisis. Por otra parte, las mediciones 3 y 4 muestran resultados más homogéneos, exhibiendo una viscosidad relativamente constante en el rango de tasa de corte entre los 250 y 330 [1/s], además se puede observar una tendencia al alza en la magnitud de la viscosidad para tasas de corte superiores a dicho rango lo que nuevamente podría ser explicado por un cambio en el comportamiento del material desde pseudo-plástico a dilatante.

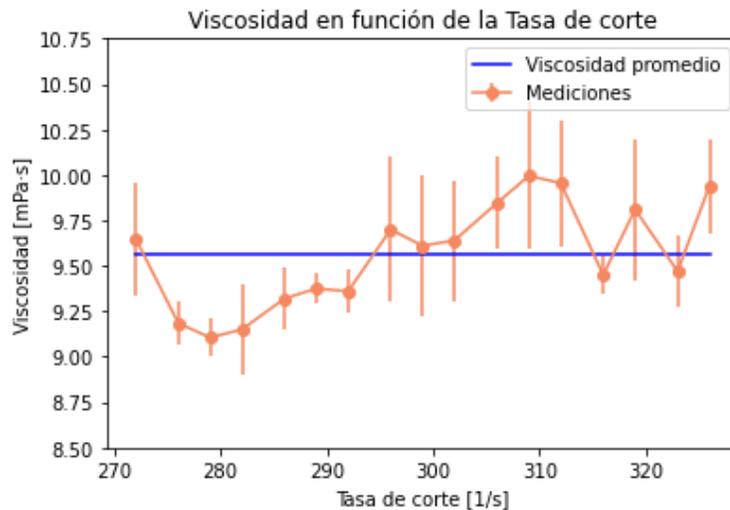


Figura A.11: Viscosidad en función de la tasa de corte para dos de las mediciones realizadas a la muestra 4.

Finalmente, se exhiben los resultados de las mediciones 3 y 4 en el rango de interés, a partir de estos valores se determinará la viscosidad representativa de la muestra y que será utilizada para posteriores cálculos.

Anexo B. Memoria de cálculo de la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$

En este anexo se presentará la memoria de cálculo para estimar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa a partir de la medición de viscosidad realizada a la muestra 1 A.1 para la primera etapa del proceso de fermentación, esta memoria de cálculo se basará en la metodología descrita en la sección 3.4.

En las tablas 1.1 y 1.2 se presentan los datos que serán utilizados para esta memoria de cálculo, además, se utilizarán los resultados para la medición de viscosidad de la muestra 1 presentados en la sección de resultados 4.2.1.

Tabla B.1: Características geométricas relevantes del reactor utilizado a escala laboratorio.

Parámetro	Magnitud	Unidad de medida
Volumen máximo	3	[L]
Diámetro impeller	5,2	[cm]
Diámetro interno	13	[cm]
Número de impellers	2	-
Tipo de impeller	Rushton	-

Tabla B.2: Condiciones de operación en distintas etapas del proceso de fermentación.

Etapas/Parámetro	Temperatura [°C]	Agitación [RPM]	Aireación [vvm]	Volumen de operación [L]
Primer inóculo	25-27	50	1,1	1,5
Segundo inóculo	25-27	100	1,5	1,7

Siguiendo la metodología previamente referenciada, se debe comenzar por determinar la velocidad superficial del gas V_s , para esto se deberá conocer el área transversal del reactor y el flujo de aire que pasa a través de esta.

Conocido el diámetro interno del reactor, el área transversal de este corresponderá a:

$$S = \pi \cdot (D/2)^2 = \pi \cdot (0,065[m])^2 = 0,01327[m^2] \quad (\text{B.1})$$

Para obtener el flujo de aire, se utilizará la aireación y el volumen de operación:

$$Q = \frac{\text{Aireación} \cdot \text{Volumen de operación}}{60} = 1,1[\text{vvm}] \cdot 0,0015[m^3] = 0,00003[m^3/s] \quad (\text{B.2})$$

De esta forma, la velocidad superficial del gas estará dada por:

$$V_s = \frac{Q}{S} = \frac{0,00003[m^3/s]}{0,01327[m^2]} = 0,00207[m/s] \quad (B.3)$$

Conocida la velocidad superficial, resta determinar la potencia entregada por el agitador al sistema, para esto se utiliza la ecuación 3.2 que describe dicho parámetro para sistemas sin aireación, para su cálculo será necesario conocer la densidad del sistema y el número de potencia. La densidad fue previamente obtenida de forma experimental, reportando un valor de $\rho = 1010[kg/m^3]$ y el número de potencia es conocido a partir de bibliografía como $N_P = 5,5$ [42]. De esta forma se tiene:

$$P_o = N_P \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5 = 5,5 \cdot 1010[kg/m^3] \cdot (0,83[1/s])^3 \cdot (0,052[m])^5 = 0,0012[W] \quad (B.4)$$

Conocida la potencia entregada por el agitador al sistema, es ahora necesario tomar en consideración que el sistema en estudio presenta aireación dado que las burbujas provenientes del aireador tienen un efecto sobre la potencia entregada al sistema. Es posible entonces conocer la potencia real recibida por el sistema en función de la ecuación 3.3 como:

$$P = \alpha \cdot \left(\frac{P_o^2 \cdot N \cdot D^3}{Q^{0,56}} \right)^\beta \quad (B.5)$$

Recordando de la sección 3.4 que los valores de las constantes provenientes de bibliografía son $\alpha = 1,224$ y $\beta = 0,432$, se reemplazan los valores conocidos en la ecuación obteniendo:

$$P = 1,224 \cdot \left(\frac{0,0012^2 \cdot 0,83[1/s] \cdot 0,052[m]^3}{0,00003[m^3/s]^{0,56}} \right)^{0,432} = 0,00095[W] \quad (B.6)$$

Finalmente, solo resta utilizar la ecuación 4.4 para determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa en función de los parámetros previamente calculados, información obtenida de forma experimental y las condiciones de operación.

$$k_L a = 7,2 \cdot 10^4 \cdot V_s^{2/3} \cdot \left[\frac{P}{V} \right]^{0,6} \cdot \mu^{-2/3} \quad (B.7)$$

Reemplazando se tiene:

$$k_L a = 7,2 \cdot 10^4 \cdot 0,00207[m/s]^{2/3} \cdot \left[\frac{0,000095[W]}{0,0015[m^3]} \right]^{0,6} \cdot 6,87[Pa \cdot s]^{-2/3} = 0,00025[1/s] \quad (B.8)$$

Reportando el valor presentado en la Tabla 4.2 de la sección de resultados.

Anexo C. Memoria de cálculo condiciones de operación a escala industrial

Para comenzar, se presentan las características geométricas del equipo utilizado y las condiciones de operación de la primera etapa de fermentación provenientes de las Tablas 1.1 y 1.2.

Tabla C.1: Características geométricas relevantes del reactor utilizado a escala laboratorio.

Parámetro	Magnitud	Unidad de medida
Volumen máximo	3	[L]
Diámetro impeller	5,2	[cm]
Diámetro interno	13	[cm]
Número de impellers	2	-
Tipo de impeller	Rushton	-

Tabla C.2: Condiciones de operación en distintas etapas del proceso de fermentación.

Etapas/Parámetro	Temperatura [°C]	Agitación [RPM]	Aireación [vvm]	Volumen de operación [L]
Primer inóculo	25-27	50	1,1	1,5
Segundo inóculo	25-27	100	1,5	1,7

A excepción del uso de la viscosidad correspondiente a la etapa del proceso de fermentación en estudio (primer inóculo) y el uso de la ecuación ajustado para la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa 4.5, el procedimiento para determinar el k_La es idéntico al previamente descrito en el Anexo B, de esta forma, este coeficiente estará dado por:

$$k_La = 12,3 \cdot 10^4 \cdot V_s^{2/3} \cdot \left[\frac{P}{V} \right]^{0,6} \cdot \mu^{-2/3} \quad (C.1)$$

Reemplazando los datos expuestos y la viscosidad de la etapa $\mu = 7,12[Pa \cdot s]$, se tiene:

$$k_La = 12,3 \cdot 10^4 \cdot 0,00207[m/s]^{2/3} \cdot \left[\frac{0,000095[W]}{0,0015[m^3]} \right]^{0,6} \cdot 7,12[Pa \cdot s]^{-2/3} = 0,00041[1/s] \quad (C.2)$$

El criterio para realizar el escalamiento es mantener la magnitud del k_La calculada en la escala superior, para esto, se procederá a determinar la velocidad de agitación que se requerirá utilizar en la escala superior. Se proceden a presentar las características geométricas del biorreactor a mayor escala provenientes de la Tabla 4.4, relevantes para el proceso.

Tabla C.3: Características geométricas del reactor de 100 L LAOBAO relevantes para la determinación de las condiciones de operación.

Dimensión	Magnitud	Unidad
Volumen máximo	100	[L]
Volumen de operación	70	[L]
Diámetro interno	46,5	[cm]
Diámetro de Impeller	24	[cm]
Número de Agitadores	2	-
Tipo de Impeller	Rushton	-

La densidad a utilizar es la misma que la determinada de forma experimental para el sistema a nivel de laboratorio pues no es un parámetro que varíe con la escala de la fermentación. Por otra parte, el único parámetro que resta determinar para obtener la velocidad de agitación requerida, es la aireación a nivel de escala superior. Para este propósito se usará como referencia los resultados de trabajos de escalamiento experimentales ?? que indican una relación entre el aumento en la escala del biorreactor y la disminución de la aireación.

Para una sistema cuyo volumen de operación aumenta 10 veces, se reporta una disminución de 3 veces la aireación utilizada. Asumiendo que dicha relación es lineal, se procederá a determinar la aireación en la escala superior teniendo en consideración los volúmenes de operación estudiados en este trabajo.

$$Aireación_{Ind} = 1,1[vvm] / \frac{70 \cdot 3}{1,5 \cdot 10} = 0,08[vvm] \quad (C.3)$$

Conocido este parámetro, se procede a calcular el área transversal del equipo.

$$S = \pi \cdot (D/2)^2 = \pi \cdot (0,465[m]/2)^2 = 0,1698[m^2] \quad (C.4)$$

Se determina también, el flujo de aire en el sistema ya que se conoce el volumen de operación.

$$Q = Aireación \cdot Vol \text{ operación} = 0,08[vvm] \cdot 0,07[m^3]/60[seg/min] = 0,00009[m^3/s] \quad (C.5)$$

Finalmente, se procede a determinar la velocidad superficial del gas en el sistema como:

$$V_s = \frac{Q}{S} = \frac{0,00009[m^3/s]}{0,1698[m^2]} = 0,00055[m^3/s] \quad (C.6)$$

Conocida la velocidad superficial del gas en el sistema, es ahora posible determinar la potencia que deberá entregar el agitador para reproducir el coeficiente volumétrico de transferencia requerido.

$$P = \left(\frac{k_L a \cdot V^{0,6}}{12,3 \cdot V_s^{(2/3)} \cdot \mu^{(-2/3)}} \right)^{(5/3)} \quad (C.7)$$

Reemplazando se tiene:

$$P = \left(\frac{0,00041[1/s] \cdot 0,07[m^3]^{0,6}}{12,3 \cdot 0,00055[m/s]^{(2/3)} \cdot 12^{(-2/3)}} \right)^{(5/3)} = 0,193[W/m^3] \quad (C.8)$$

Finalmente, se procede a determinar la velocidad de agitación que permite al agitador entregar la potencia requerida al sistema para alcanzar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa a reproducir.

$$N = \left(\left(\frac{P}{\alpha} \right)^{(1/\beta)} \cdot \left(\frac{Q^{0,56}}{(\rho \cdot D^5 \cdot N_P)^2 \cdot D^3} \right) \right)^{1/7} \quad (C.9)$$

Reemplazando los valores previamente calculados y las características del sistema, se tiene:

$$N = \left(\left(\frac{0,193[W/m^3]}{1,224} \right)^{(1/0,432)} \cdot \left(\frac{0,00009[m^3/s]^{0,56}}{(1010[kg/m^3] \cdot 0,24[m]^5 \cdot 5,5)^2 \cdot 0,24[m]^3} \right) \right)^{1/7} = 15,2[RPM] \quad (C.10)$$

El mismo cálculo es realizado para las condiciones de operación y viscosidad de la segunda etapa del proceso de fermentación (segundo inóculo), los resultados se encuentran en la sección 4.8.2.