

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

**ESCALADO DE PROCESOS FERMENTATIVOS AEROBIOS EN
BIORREACTORES TIPO TANQUE AGITADO**

**ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS CRISTALINAS
CON POTENCIAL INSECTICIDA A PARTIR DE AGUAS
RESIDUALES CON *BACILLUS THURINGIENSIS* SP. *KURSTAKI*.**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PRESENTADO COMO
REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

GUSTAVO ALEXANDER COLLAGUAZO SANGUCHO

gustavo_collaguazo@yahoo.com

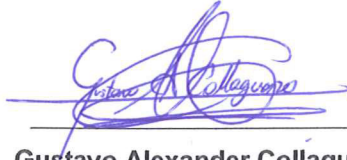
DIRECTOR: ING. MARÍA AUGUSTA PÁEZ LARA MSc.

maria.paez@epn.edu.ec

Quito, agosto 2022

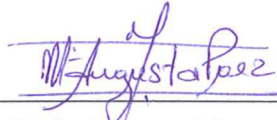
CERTIFICACIONES

Yo, Gustavo Alexander Collaguazo Sangucho declaro que el trabajo de integración curricular aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.



Gustavo Alexander Collaguazo Sangucho

Certifico que el presente trabajo de integración curricular fue desarrollado por Gustavo Alexander Collaguazo Sangucho, bajo mi supervisión.



Ing. María Augusta Páez Lara Msc.

DIRECTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

A través de la presente declaración, afirmamos que el trabajo de integración curricular aquí descrito, así como los productos resultantes del mismo, son públicos y estarán a disposición de la comunidad a través del repositorio institucional de la Escuela Politécnica Nacional; sin embargo, la titularidad de los derechos patrimoniales nos corresponde a los autores que hemos contribuido en el desarrollo del presente trabajo; observando para el efecto las disposiciones establecidas por el órgano competente en propiedad intelectual, la normativa interna y demás normas.

Gustavo Alexander Collaguazo Sangucho

María Augusta Páez Lara Msc.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIONES.....	I
DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	II
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	III
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
1 DESCRIPCIÓN DEL COMPONENTE DESARROLLADO	1
1.1 Objetivo general	1
1.2 Objetivos específicos	1
1.3 Alcance	2
1.4 Marco teórico	2
1.4.1 <i>Bacillus thuringiensis (Bt)</i> y proteínas cristalinas	2
1.4.2 Sustratos empleados en la producción <i>del Bacillus thuringiensis kurstaki (Btk)</i>	5
1.4.3 Escalado de procesos fermentativos	6
1.4.4 Criterios de escalado frecuentes en procesos aerobios.....	9
2 METODOLOGÍA.....	11
2.1 Definición del proceso fermentativo en la escala prototipo	11
2.2 Dimensionamiento de los biorreactores en la escala modelo	12
2.3 Identificación y estimación de los criterios de escalado para el proceso fermentativo	12
2.4 Definición de las condiciones de operación en las escalas modelo laboratorio y piloto.....	13
3 RESULTADOS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	14
3.1 Proceso fermentativo en la escala prototipo	14
3.2 Biorreactores escala modelo laboratorio y piloto.....	16
3.3 Criterios de escalado relevantes para el proceso fermentativo	19
3.3.1 Correlación para estimar el <i>kLa</i>	21
3.3.2 Estimación de la concentración de oxígeno disuelto.....	23
3.4 Condiciones de operación en las escalas modelo, laboratorio y piloto ...	24
3.5 Conclusiones.....	29
3.6 Recomendaciones.....	30
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

5	Anexos.....	37
---	-------------	----

RESUMEN

El presente trabajo presenta el escalado teórico de la producción de proteínas cristalinas con potencial insecticida a partir de aguas residuales con almidón empleando *Bacillus thuringiensis sp. Kurstaki*, desde un biorreactor de 15L hacia dos escalas mayores de 50 y 150 L, mediante la aplicación de dos protocolos de escalado basados en la tasa volumétrica de transferencia de oxígeno (k_La) y la concentración de oxígeno disuelto (DO). Como primer paso, se definió las condiciones del proceso fermentativo en la escala prototipo tales como: sustrato, pH, temperatura, aireación, agitación, tipo de biorreactor y productividad. Luego, se dimensionó los biorreactores de las dos escalas modelo laboratorio y piloto a partir de relaciones de similitud geométrica verificadas en el prototipo. Posteriormente, se identificaron y estimaron los criterios de escalado más relevantes para el proceso fermentativo, donde a partir de dichos valores se desarrollaron los protocolos de escalado para definir las condiciones de operación en las escalas de 50 y 150 L. Se determinó que en un biorreactor STR de 15L, establecido como la escala prototipo, que opera a 350rpm, con 2.5 L/min de aire y 30°C es factible producir un bioinsecticida con una concentración de 1043 (mg/l) de δ -endotoxinas. Se estimó que los valores del k_La y el DO son de 33.96 h⁻¹ y 92 % respectivamente, que al mantener constantes en las escalas modelo asegurarían el mismo nivel de productividad al operar a 198 o 207 rpm y 1 vvm en la escala de 50 L; y 178 o 185 rpm y 1 vvm para la escala de piloto de 150 L.

PALABRAS CLAVE: *Bacillus thuringiensis*, escalado de procesos fermentativos, tasa volumétrica de transferencia de oxígeno, oxígeno disuelto.

ABSTRACT

This paper presents the theoretical scale-up production of the crystalline proteins whit insecticidal potential using starch industry wastewater since used *Bacillus thuringiensis* sp. *Kurstaki*, from a 15L bioreactor towards two larger scales of 50 and 150 L, by applying two scale-up protocols based on the volumetric mass transfer coefficient ($k_L a$) and the dissolved oxygen (DO). Firstly, the operating parameters was defined for fermentative process in the prototype scale, such as: substrate, pH, temperature, aeration, stirring rate, type of bioreactor and productivity. Then, the bioreactors of the two laboratory model and pilot scales were dimensioned from geometric similarity relationships verified in the prototype. Subsequently, the most relevant scale-up criteria for the fermentation process were identified and estimated, where from as of these values the scale-up protocols were developed to define the operating conditions in the 50 and 150 L scales. It was established that in a bioreactor STR of 15L, defined as the prototype scale, operating at 350rpm, with 2.5 L/min of air and 30°C, it is feasible to produce a bioinsecticide with a concentration of 1043 (mg/l) of δ -endotoxins. It was estimated that the values of ($k_L a$) and DO are 33.96 h⁻¹ and 92%, respectively, which, when kept constant in the model scales, would ensure the same level of productivity when operating at 198 or 207 rpm and 1 vvm in the 50 scale. L; and 178 or 185 rpm and 1 vvm for the 150 L pilot scale.

KEYWORDS: *Bacillus thuringiensis*, scale-up fermentative process, volumetric mass transfer coefficient, dissolved oxygen.

1 DESCRIPCIÓN DEL COMPONENTE DESARROLLADO

En la actualidad la agricultura afronta el reto de implementar insecticidas de origen biológico en sustitución de aquellos de naturaleza química que generan impactos ambientales negativos a largo plazo dentro de la cadena de producción primaria. Sin embargo, los bio-insecticidas presentan el inconveniente de los costos de producción relacionados directamente con la materia prima que se emplea como medio nutritivo durante el proceso fermentativo con el microorganismo de interés. En reparo a esta problemática, emplear residuos agroindustriales como sustrato resulta una alternativa más económica, entre ellos las aguas residuales con alto contenido de almidón provenientes de la industria de alimentos han demostrado favorecer la producción de metabolitos con potencial insecticida.

En este contexto, la finalidad de este trabajo es escalar la producción de proteínas cristalinas con potencial insecticida a partir de *Bacillus thuringiensis sp. Kurstaki* empleando como sustrato aguas residuales con alto contenido de almidón. El escalado partirá de un biorreactor prototipo escala laboratorio hacia dos biorreactores modelo escala laboratorio y piloto, donde se contemplarán diversos criterios de similitud cinemática y dinámica relevantes para el proceso fermentativo en cuestión.

1.1 Objetivo general

Escalar la producción de proteínas cristalinas con potencial insecticida a partir de aguas residuales con *Bacillus thuringiensis sp. Kurstaki*.

1.2 Objetivos específicos

- Definir el proceso fermentativo en términos de condiciones de operación y detalles geométricos del biorreactor para el *Bacillus thuringiensis sp. Kurstaki* en la escala prototipo.
- Identificar y estimar los criterios de similitud cinemática y dinámica con mayor influencia en el proceso fermentativo en función de las características reológicas y la transferencia de oxígeno.
- Determinar las condiciones de operación para las escalas modelo laboratorio de 50 litros y piloto de 150 litros mediante un protocolo de escalado.

1.3 Alcance

Para escalar la producción de proteínas cristalinas con potencial insecticida, se definirá el proceso fermentativo con *Bacillus thuringiensis sp. Kurstaki* a partir de aguas residuales en la escala prototipo, esto es: composición del medio de cultivo, condiciones de operación, volumen de operación y tipos de sistema de agitación y aireación. Posteriormente, se dimensionarán los biorreactores modelo de 50 y 150 litros que cumplan los criterios de similitud geométrica previamente verificados en la escala prototipo. Luego, se identificarán los principales criterios de similitud cinemática y dinámica, y se seleccionarán de 2 a 3 que tengan mayor influencia en el proceso fermentativo. Finalmente, se determinarán las condiciones de operación en escalas modelo de 50 y 150 litros mediante el desarrollo de un protocolo de escalado. Se realizará un proceso de escalado teórico sin etapas de validación experimentales.

1.4 Marco teórico

1.4.1 *Bacillus thuringiensis (Bt)* y proteínas cristalinas

Bt es una bacteria gram positiva perteneciente a la familia *Bacillaceae*, ubicada dentro del grupo 1 del género *Bacillus*; mide cerca de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho, presenta un flagelo, es quimioorganótrofo y facultativo (Sauka y Benintende, 2008). Se encuentra presente en distintas fuentes de la naturaleza como: el suelo, plantas, agua, hojas de árboles caducifolios, mamíferos insectívoros, coníferas, etc. (Sanahuja et al., 2011)

La principal característica de este microorganismo es que bajo condiciones aerobias es capaz de formar cuerpos cristalinos proteicos que presentan actividad biocida sobre los insectos, especialmente en sus larvas. Cuando el *Bt* esporula, simultáneamente se sintetizan las proteínas en el interior del esporangio y fuera del exosporio de la spora (Figura 1), constituyendo hasta el 30 % del peso seco de la célula; en algunos casos pueden permanecer unidas a las esporas incluso después de la lisis celular (Sauka y Benintende, 2008).

Estos cristales son denominados δ -endotoxinas y están constituidos por proteínas Cry (Cristal) y Cyt (Citolíticas), las cuales interactúan entre sí a través de puentes disulfuro otorgando una morfología característica al cristal (Ibrahim et al., 2010). Sus estructuras tridimensionales muestran que, a pesar de tener distintos espectros de acción, presentan

una configuración común compuesta por tres dominios. El primero denominado N-terminal es responsable de la formación de los poros en el estómago del insecto y los Dominios II y III se encargan de la unión con el organismo receptor de la toxina (Sanahuja et al., 2011; Ujváry, 2010). Se ha demostrado que el extremo C-terminal no es relevante para la toxicidad de la proteína; sin embargo, desempeña un papel importante en el proceso de formación de los cristales dentro de la bacteria.

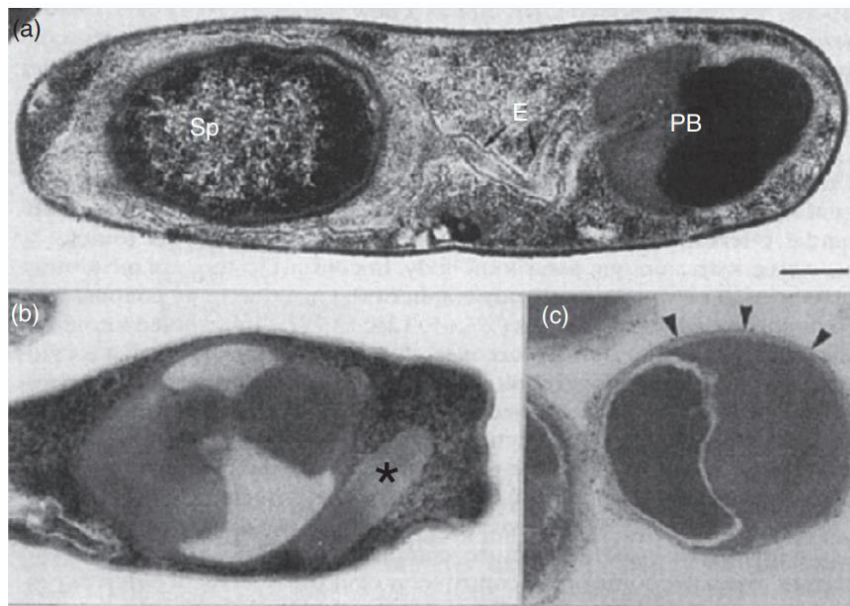


Figura1. Micrografía electrónica del cuerpo paraesporal del Bt. (a) Espora y cristal proteico (b) cuerpo paraesporal (c) liberación de la toxina (Moazami, 2011).

Se han identificado más de 80 variedades de *Bacillus thuringiensis* de acuerdo con el serotipo que presenta, cada uno de las cuales produce proteínas cristalinas selectivas contra muchas plagas de insectos y vectores de enfermedades, por ejemplo: *israelensis* (moscas negras y mosquitos), *morrisoni* (tenebrionis), *aizawa* y *kurstaki* (larvas de lepidópteros) y *japonensis* (escarabajos).

Para nombrar a las proteínas existe un sistema de 4 niveles que categoriza las toxinas en función de sus porcentajes de similitud de aminoácidos. Se utilizan número arábigos para el primer y cuarto nivel, y letras mayúsculas y minúsculas para el segundo y tercer nivel respectivamente. El procedimiento consiste en asignar un nemotécnico de acuerdo con la naturaleza de la proteína generada (Cyt o Cry), luego se analiza el porcentaje de identidad entre aminoácidos. Las proteínas que comparten menos del 45% de similitud se les asigna un rango primario en función del número arábigo (por ejemplo: Cry1, Cry2,

Cry3, etc.); aquellas que comparten menos del 78% se las categoriza en el segundo nivel con una letra mayúscula (Cry1A, Cry2B, Cry3C). Si las proteínas comparten menos del 95% se las ubica en el tercer rango (Cry1Aa, Cry2Bb, Cry3Cc), y finalmente para aquellas que compartan más del 95% se las asigna en un rango cuaternario (Cry1Aa2, Cry2Bb3, Cry3Cc4) (Crickmore et al., 2021; Palma et al., 2014).

El mecanismo de acción de las δ -endotoxinas, como se indica en la Figura 2, comienza cuando son ingeridas por las larvas y entran al organismo, posteriormente se liberan los cristales que promueven un proceso de proteólisis a partir de enzimas y un pH alcalino propio del estómago de los insectos. Luego, las toxinas se unen a receptores específicos sobre la membrana celular desencadenando la formación de poros, esto entorpece el intercambio adecuado de solutos en el epitelio causando finalmente la lisis celular y la septicemia (De Oliveira et al., 2021).

Los insecticidas comerciales a base de *Bt* están constituidos por células, toxinas y una concentración promedio de esporas de 1×10^{12} g/L. Las formulaciones son comercializadas como soluciones líquidas, pellets solubles en agua, suspensiones, polvos humectables o tabletas de liberación lenta, además son aplicados para el control de plagas en diversos cultivos como: maíz, hortalizas, plantas ornamentales y algodón (Ujváry, 2010).

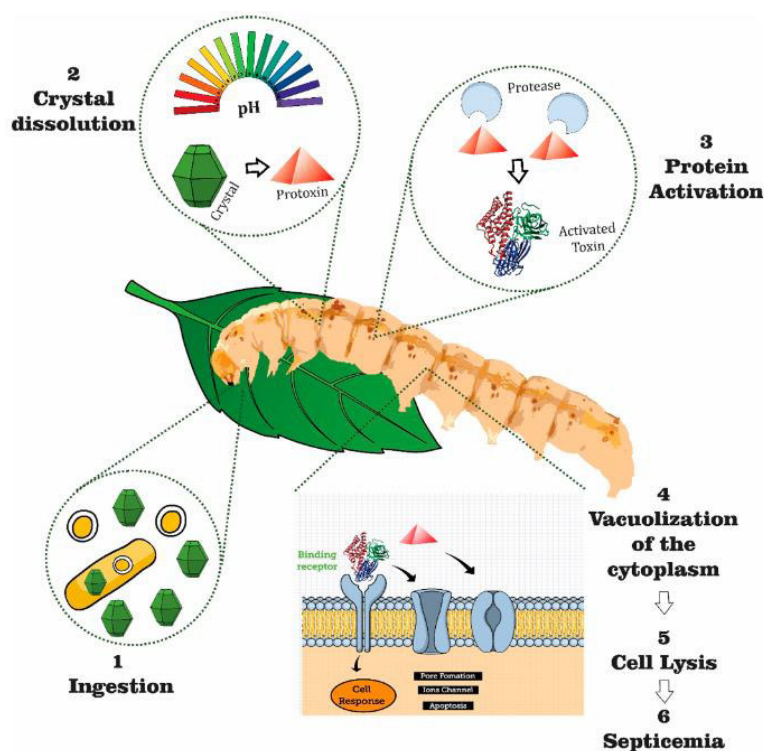


Figura 2. Mecanismo de acción de las toxinas (De Oliveira et al., 2021).

1.4.2 Sustratos empleados en la producción del *Bacillus thuringiensis kurstaki* (*Btk*)

El medio de cultivo es un factor que influye sobre el crecimiento del *Btk*, su esporulación y formación de δ -endotoxinas, ya que este debe incorporar fuente de carbono, nitrógeno y minerales que son los requerimientos nutricionales fundamentales (Duarte Neto et al., 2020; Jallouli et al., 2020).

El nitrógeno interviene en el crecimiento celular, permite una adecuada esporulación y una alta producción de δ -endotoxinas. Además, el *Bt* es capaz de metabolizar fuentes de nitrógeno orgánicas (extracto de levaduras, urea, soya) e inorgánicas (sulfato de amonio o nitrato de amonio) (Duarte Neto et al., 2020; Escobar et al., 2004).

De igual forma, se ha demostrado que el *Bt* puede metabolizar diversas fuentes de carbono que incluyen: fructosa, lactosa, almidón, sacarosa, ribosas y glucosa, que resulta la fuente que genera rendimientos superiores (Jallouli et al., 2020). Sin embargo, algunos estudios han evaluado fuentes de carbono alternativas, más accesibles en distintas escalas de producción y que además son subproductos agroindustriales tales como: suero de leche (250ml), residuos de soya (10L), bagazo de caña (2L), melaza (250ml) y aguas residuales con alto contenido de almidón (15L) (Alves et al., 1997; Ballardo et al., 2016; Brar, et al., 2005b; De Lourdes Tirado Montiel et al., 2001; Escobar et al., 2004; Poopathi et al., 2013).

Respecto a las aguas residuales con alto contenido de almidón existe una amplia línea de estudios que abarcan temas como: escalado, formulaciones, sistemas de lotes o semi lotes, influencia del pH, viabilidad y efecto de la concentración de sólidos, que han verificado su utilidad como sustrato para la producción de toxinas (Brar, et al., 2005b; Dang Vu et al., 2009; Kumar et al., 2019; Ndao et al., 2017; Vu et al., 2009a; Vu, et al., 2008).

Por otra parte, los macro y micronutrientes influyen directamente en la esporulación y en la producción de toxinas, tal es el caso del manganeso esencial para la formación de endosporas para cualquier cepa del *Bt*; el magnesio que juntamente con el fósforo participan en las reacciones de transferencia de energía con el ADP y el calcio que es un constituyente de la pared de la espora otorgándole estabilidad ante el calor y la luz UV (Beltrán et al., 1998; Duarte Neto et al., 2020).

1.4.3 Escalado de procesos fermentativos

Los procesos fermentativos tienen varias aplicaciones a nivel industrial que abarcan la conversión de sustratos, remediación de materiales ambientalmente tóxicos y la generación de productos biológicos en masa. Estos bioprocesos se pueden implementar en distintas escalas tales como: laboratorio, piloto y planta.

La escala de laboratorio (1 a 50 L) se desarrolla con propósitos de investigación para manejar de forma más eficiente el proceso y alcanzar la máxima productividad. Las escalas piloto (50 a 10 000L) y planta (mayor a 10 000L) tienen la finalidad de establecer condiciones operativas óptimas y desarrollar el proceso para producciones comerciales. Cuando una fermentación lograda en investigación resulta factible se aplica un proceso de escalado para permitir una operatividad comercialmente viable para la fabricación (Mahdinia et al., 2019).

Para cumplir con el objetivo del escalado, es necesario emplear un conjunto de procedimientos y técnicas que permiten la adecuada transferencia de datos desde la escala de laboratorio a la escala industrial en función de la teoría de los modelos de la cual se desprenden los conceptos conocidos como escalas modelo y prototipo. El modelo es un medio que está definido para determinar el rendimiento de un prototipo y el prototipo es el sistema que se va a ser modelado de forma completa. No es obligatorio que el prototipo exista materialmente antes que su modelo, sin embargo, es necesario considerar la relación que existe entre las unidades de distintas escalas. Para crear un modelo físico se debe tomar en cuenta la forma y el tipo que tendrá la nueva escala que se desea conseguir, utilizando información fundamentada desde una escala laboratorio o mayor (González, 2000).

Esta última consideración demuestra que el escalado que se realiza desde un nivel industrial hacia uno de laboratorio (scale -down) precede al desarrollo de un proceso desde el nivel de laboratorio al industrial (scale -up), lo que se traduce en que ambos conforman las etapas de un único proceso integral. En este sentido, la aplicación del escalado se enmarca en los principios de similitud geométrica, cinemática o dinámica y en la modelación matemática (González, 2000).

En el caso de los procesos fermentativos interactúan parámetros físicos y químicos en el ambiente en el cual los microorganismos se desarrollan; el primero se relaciona la

dinámica de fluidos y el segundo con variables como el pH, concentración de nutrientes, oxígeno disuelto y temperatura. Ambos parámetros están determinados por el diseño del proceso, tipo de biorreactor, su tamaño y forma (Zhong, 2011).

Un biorreactor proporciona condiciones óptimas para la fisiología y el metabolismo celular de un sistema biológico mediante la regulación de sus condiciones de operación. La selección del biorreactor adecuado está sujeta a la identificación del sistema biológico, su sistema de reacción, metabolismo, la expresión de los metabolitos o el producto de interés y los requerimientos de las células en su entorno. Los biorreactores tipo tanque agitado (STR) son uno de los sistemas más usados en la industria de la fermentación debido a varias ventajas tales como: facilidad de escalado, buena mezcla de fluidos, sistema de agitación y cumplimiento de los requisitos de diseño de las normas GMP (Li et al., 2019; Zhong, 2010).

En los biorreactores STR el sistema de agitación es el componente central, y está constituido por uno o varios impulsores que pueden ser categorizados en agitadores de flujo axial o radial. Esta clasificación se realiza de acuerdo con los patrones de flujo que presenten, los cuales dependerán del diseño del agitador, su tamaño, geometría del biorreactor y la reología del fluido.

El flujo radial es generado por agitadores con paletas y alineados con el eje del agitador, en este patrón el fluido es impulsado de forma radial desde el agitador hacia las paredes del tanque generándose una corriente superior y una inferior. Estas corrientes se mueven a través de las paredes del biorreactor hasta llegar al eje central donde retornan al agitador. Por otra parte, el flujo axial es generado por impulsores con paletas inclinadas hasta con un ángulo de 90° respecto al plano de rotación. Para este patrón de flujo, el líquido sale impulsado del agitador hacia abajo, posteriormente llega el fondo del recipiente y se desvía por las paredes recorriendo todo el biorreactor para finalmente retornar al impulsor a través del eje central. Las trayectorias que obedecen cada patrón de flujo se presentan en la Figura 3. Debido a que ambas configuraciones pueden generar flujos rotacionales creando vórtices, se emplean deflectores que evitan este fenómeno (Doran, 2013).

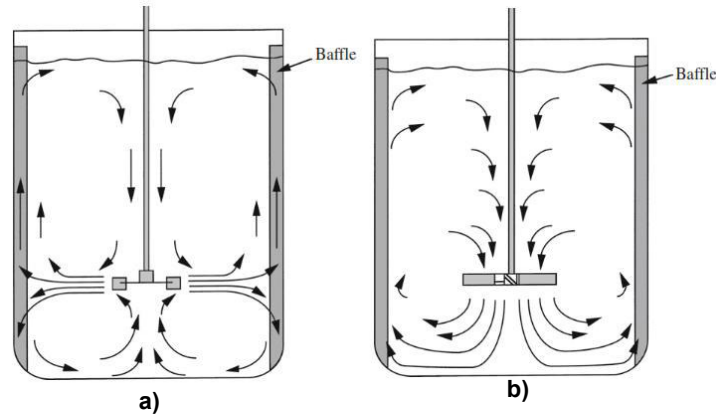


Figura 3. (a) Patrón de flujo radial (b) Patrón de flujo axial (Doran, 2013)

Uno de los agitadores más empleados son las turbinas tipo Rushton, por su efectividad para la dispersión de gases debido a la forma en que su disco captura el gas proveniente de abajo del impulsor y lo dirige hacia regiones de alta turbulencia cerca de las paletas. Estas turbinas pueden manejar caudales relativamente altos de gas sin sufrir una inundación (Doran, 2013).

En biorreactores STR con aireación, las burbujas de aire se distribuyen de diversas formas dependiendo de la tasa de aireación y la velocidad de agitación del impulsor. Por ejemplo, si se cuenta con un alto suministro de aire o una baja velocidad de agitación, el impulsor se rodea de gas y no puede bombear las burbujas de manera efectiva, lo que denota que se ha excedido su capacidad de trabajo. A esta condición se le denomina inundación del impulsor. Cuando ocurre esto el agitador no tiene un contacto adecuado con las burbujas de gas lo que se traduce en una mala mezcla en el biorreactor (Doran, 2013).

Por otra parte, a medida que se aumenta la agitación o se reduce la aireación, el impulsor comienza a distribuir el aire alrededor de las paredes del tanque, condición que se denomina carga del impulsor. En este estado se logra que el gas comience a distribuirse correctamente en todo el sistema, garantizando una mezcla homogénea. Finalmente, cuando se aplica velocidades por sobre las requeridas para que no se inunde el impulsor, se pueden generar tasas de recirculación de las burbujas de aire que atraviesan el biorreactor, ocasionando que la cantidad de aire que regresa a la zona del impulsor sea mayor que la suministrada directamente desde el rociador al comienzo del proceso facilitando su ahogamiento. Este comportamiento cambiará de acuerdo con la capacidad de cada impulsor para manejar caudales de aire sin inundarse, la cual está definida por la relación de solidez que presenten. Los patrones de distribución de aire en un tanque agitado se presentan en la Figura 4.

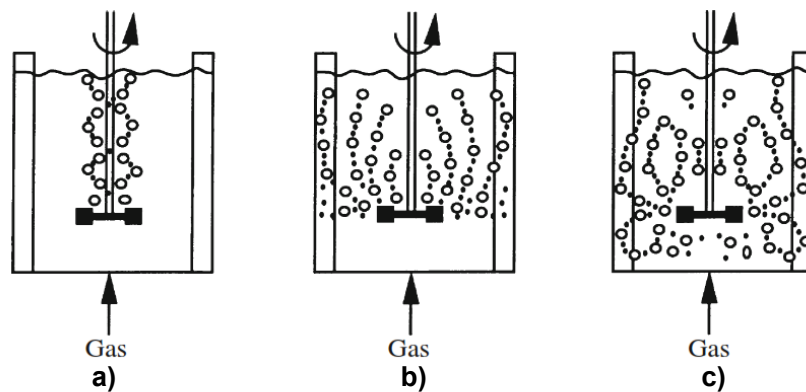


Figura 4. (a) Inundación del impulsor (b) carga del impulsor (c) dispersión completa del gas (Stanbury et al., 2017).

1.4.4 Criterios de escalado frecuentes en procesos aerobios

La potencia por unidad de volumen (P/V), la velocidad punta (ND), la tasa volumétrica de transferencia de oxígeno (k_La) y la concentración de oxígeno disuelto (DO) son criterios comúnmente empleados para el escalado de bioprocesos, siendo los dos primeros relacionados a la agitación y los dos últimos dependientes de la aireación. Los criterios de escalado más empleados son la P/V y el k_La con un 30 %, luego la ND con un 20% y finalmente el DO con un porcentaje similar (García-Ochoa y Gómez, 2009)

El k_La representa la capacidad de suministro de oxígeno en un sistema, descrito por el proceso de difusión molecular de este, así como su transferencia por convección en el medio de cultivo. Matemáticamente este criterio se deriva del producto entre el coeficiente de transferencia de masa en el sistema gas-líquido (k_L) y el área interfacial (a). Estos parámetros se pueden estimar a partir de la teoría de penetración de Higbie's, la cual es ampliamente aceptada para la descripción del proceso de transferencia de masa (García-Ochoa y Gómez, 2004); sin embargo, no es posible estimarlos individualmente de forma experimental. La variabilidad de este criterio depende fuertemente de la reología, la velocidad de agitación, aireación, la potencia por unidad de volumen y las dimensiones del biorreactor. Existen correlaciones asociadas al número de agitadores, la reología, la configuración o al tipo de biorreactor que se emplea (García-Ochoa y Gómez, 2009; Gogate et al., 2000; Puthli et al., 2005). Para medir experimentalmente este parámetro existen métodos físicos y químicos, los más comunes son: reacción de oxidación con sulfito de sodio, absorción de CO_2 y método dinámico basado en la medición del oxígeno disuelto.

La potencia por unidad de volumen (P/V) se define como la cantidad de energía requerida para generar movimiento de un fluido dentro de un tanque en un periodo determinado de tiempo. Su cuantificación dependerá de la naturaleza del sistema de agitación, y en primera instancia se asume un sistema no aireado. Primero se calcula el número de Reynolds para evaluar el tipo de flujo del sistema para luego elegir un número de potencia en función del tipo de agitador y se calcula la energía requerida. Finalmente, se determina la potencia en un sistema aireado en función de una correlación que se adapte a la configuración del sistema (Mahdinia et al., 2019). La potencia consumida en un sistema aireado es menor a un sistema sin aireación, debido a que las burbujas de aire disminuyen la densidad del medio y por ende los requerimientos de energía. El uso de este parámetro como criterio de escalado tiene una influencia directa sobre la velocidad punta, causando su incremento en un 28%, lo que se traduce en una mayor cizalla para el microorganismo (Garcia-Ochoa y Gomez, 2009).

La velocidad punta está ligada fuertemente al cizallamiento que pueden experimentar las células debido a la fuerza cortante. El mecanismo del daño celular se origina en el proceso de dispersión de las burbujas, ya que estas deben romperse para poder ser asimiladas por el microorganismo. En este proceso las células se adhieren a la superficie de la burbuja, luego estas estallan en la superficie de la suspensión, lo que provoca el daño de cizallamiento. Las burbujas pequeñas ocasionan daños más severos que las grandes (Zhong, 2010). Elegir este criterio como opción de escalado permite definir las condiciones adecuadas para evitar el daño celular al contemplar la sensibilidad que tiene un microorganismo ante la cizalla; sin embargo, ocasiona una reducción en el consumo de potencia por unidad de volumen lo cual puede ocasionar un descenso en la transferencia de oxígeno.

El oxígeno disuelto es un criterio que garantiza que las condiciones de respiración para el microorganismo se mantengan durante todo el proceso fermentativo. Su medición se facilita mediante un sensor automatizado que se controla en modo cascada, es decir, que la agitación cambiará en función de la demanda y el suministro de oxígeno.

2 METODOLOGÍA

Para el desarrollo del trabajo se aplicó un enfoque mixto de tipo descriptivo explicativo mediante un análisis documental de artículos científicos empleando ecuaciones empíricas y resultados experimentales para cuantificación.

2.1 Definición del proceso fermentativo en la escala prototipo

Definir el proceso fermentativo en la escala prototipo, que en este caso es la escala menor de laboratorio, consiste en establecer el biorreactor, el sustrato, la cepa, rendimientos de productividad del *Bt* y las condiciones de operación tales como: pH, temperatura, aireación y agitación.

Para ello, se realizó una revisión bibliográfica de trabajos de investigación (artículos científicos y trabajos de titulación) referidos a la fermentación de *Bacillus thuringiensis* a partir de subproductos agroindustriales que cumplan los siguientes requisitos:

- Trabajar con una cepa comercial asociada a un código de colección para disponer de información oficial.
- Desarrollarse en un sistema por lotes.
- Trabajar en un biorreactor tipo tanque agitado del cual se conozca al menos la información comercial, dimensiones, volumen nominal y de trabajo

- Indicar de forma explícita las condiciones de operación referidas a flujo de aireación, temperatura y velocidad de agitación.
- Pertenecer a una línea de investigación con trabajos predecesores e incluso posteriores.

En caso de que un trabajo de investigación tenga información incompleta, los datos específicos faltantes se tomaron de trabajos de apoyo siempre y cuando cumplan las siguientes condiciones:

- Objetivos similares o el tema sea relacionado directamente con el trabajo de investigación base.
- Emplear la misma cepa de microorganismo, sustrato, y tipo de biorreactor

2.2 Dimensionamiento de los biorreactores en la escala modelo

Una vez definido el proceso fermentativo, se verificó que las dimensiones del biorreactor de la escala prototipo cumplan con las relaciones de similitud geométrica estándar. Dichas relaciones se establecieron mediante una revisión bibliográfica de artículos científicos y trabajos de titulación que se desarrollen con un sistema aireado y en un biorreactor STR con múltiples agitadores.

Por otra parte, se estableció el volumen nominal de los biorreactores modelo de las escalas laboratorio y piloto manteniendo un factor de escala constante y además asegurando que se encuentren dentro de los rangos establecidos en bibliografía para dichas escalas, esto es de 1 a 50 L para la escala laboratorio y 50 a 10 000L para la escala piloto.

Luego, se aplicaron las relaciones de similitud geométrica previamente verificadas en la escala prototipo a las dos escalas modelo para finalmente determinar el volumen de trabajo, dimensiones y disposición del sistema de agitación y aireación.

2.3 Identificación y estimación de los criterios de escalado para el proceso fermentativo

Los criterios de escalado para el proceso fermentativo se identificaron mediante un análisis bibliográfico de artículos científicos que evalúen los efectos de la aireación y la agitación sobre la producción del *Bt*. Estos artículos referidos en su mayoría a procesos de escalado o a la evaluación del comportamiento del microorganismo ante diversas condiciones de operación debían cumplir los siguientes requerimientos:

- Emplear sustratos similares y una cepa igual o similar de *Bt* al artículo base para la escala prototipo.
- Presentar datos experimentales tabulados o gráficos que reflejen la influencia de las condiciones de operación en el proceso fermentativo.

Para estimar los criterios de escalado seleccionados se realizó una búsqueda bibliográfica de bases de datos, correlaciones teóricas o empíricas que consideren: los procesos de transferencia de oxígeno, el comportamiento hidrodinámico del medio de cultivo, la cepa e incluso la configuración del sistema de agitación.

Las correlaciones se validaron a través de un análisis comparativo con desviación calculada entre los resultados experimentales de varios trabajos de investigación y los cuantificados con las correlaciones. Así, mediante las correlaciones elegidas se cuantificó los criterios en las condiciones del artículo base para la escala prototipo.

2.4 Definición de las condiciones de operación en las escalas modelo laboratorio y piloto

Se desarrolló un protocolo de escalado para cada criterio seleccionado, esto es un procedimiento sistemático que permite calcular las condiciones de operación en las escalas modelo a partir del valor de un criterio de escalado en la escala prototipo.

Las condiciones de operación de las escalas mayores se determinaron mediante la aplicación de cada protocolo de escalado, manteniendo fija la tasa de aireación (vvm) en función de rangos operativos establecidos en bibliografía.

3 RESULTADOS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

3.1 Proceso fermentativo en la escala prototipo

Luego de un análisis comparativo de 13 trabajos de investigación publicados entre los años 1997 a 2017 cuyos detalles se sintetizan en el ANEXO I, se seleccionó como artículo científico base la investigación realizada por Vu, et al., (2008) que evalúa el impacto de diferentes agentes de control de pH en la actividad del *Btk* durante la fermentación con aguas residuales con almidón. De este trabajo se tomaron los datos para el proceso fermentativo referidos a sustrato, cepa, condiciones de operación, rendimientos de biomasa, esporas, y δ -endotoxinas generadas, volumen nominal y de trabajo. Además, se consideraron como artículos de apoyo los trabajos realizados por Brar, et al., (2005a); Brar, et al., (2005b); Brar, et al., (2005c); Ndao et al., (2014 y 2017) que incluyen información acerca de: procesos de escalado con el *Bt*, reología del medio fermentativo, dimensiones y tipo de biorreactor empleado en la escala prototipo.

En este contexto, las proteínas cristalinas con efecto insecticida se obtendrán a partir de aguas residuales con alto contenido de almidón como sustrato cuya composición se muestra en la Tabla 1. Se estudia el proceso fermentativo en un biorreactor de 15 L como escala prototipo con la cepa de *Bacillus thuringiensis kurstaki* (*Btk*) HD-1 (ATCC 33679) bajo las condiciones de operación que se resumen en la Tabla 2.

Tabla 1. Composición del sustrato (Vu, et al., 2008)

Parámetro	Concentración
Sólidos totales (TS)	13.5 ±0.6 g/L
Carbono total (Ct)	502.264 ± 7.547 mg/Kg TS
Nitrógeno total (Nt)	39.018 ± 1.038 mg/Kg TS
Amoniaco N-NH ₃	1.978 ± 11 mg/Kg TS
Fósforo total (Pt)	10.715 ± 228 mg/Kg TS
Sólidos volátiles (VS)	11.2 ±0.4 g/L
Sólidos suspendidos (SS)	4.4 ± 0.2 g/L
Sólidos suspendidos volátiles (VSS)	4.2 ±0.2 g/L
pH	3.4 ± 0.2

Tabla 2. Condiciones de operación en la escala prototipo (Vu, et al., 2008)

Parámetro	Magnitud
Aireación	2.5 L/min
Agitación	350 rpm
Temperatura	30°C
pH	7
Agente de control de pH	Ácido acético 10M
Inóculo	Btk al 2% v/v en fase de crecimiento exponencial

Los rendimientos obtenidos en el proceso fermentativo de la escala prototipo luego de 48 horas son 2.1×10^8 (UFC/ml) de células totales, 1.2×10^8 (UFC/ml) de esporas totales y 1043 (mg/l) de δ -endotoxinas (Vu, et al., 2008). Estos valores se pretenden mantener constantes o muy similares luego del estudio de escalado propuesto en el presente trabajo.

El biorreactor de la escala prototipo es de tipo Bench de la marca Biogenie Inc., y las especificaciones de diseño que se indican en la Tabla 3 se tomaron de artículos de apoyo. (Brar, et al., 2005a; Brar, et al., 2005c; Ndao et al., 2017).

Tabla 3. Especificaciones del biorreactor en la escala prototipo

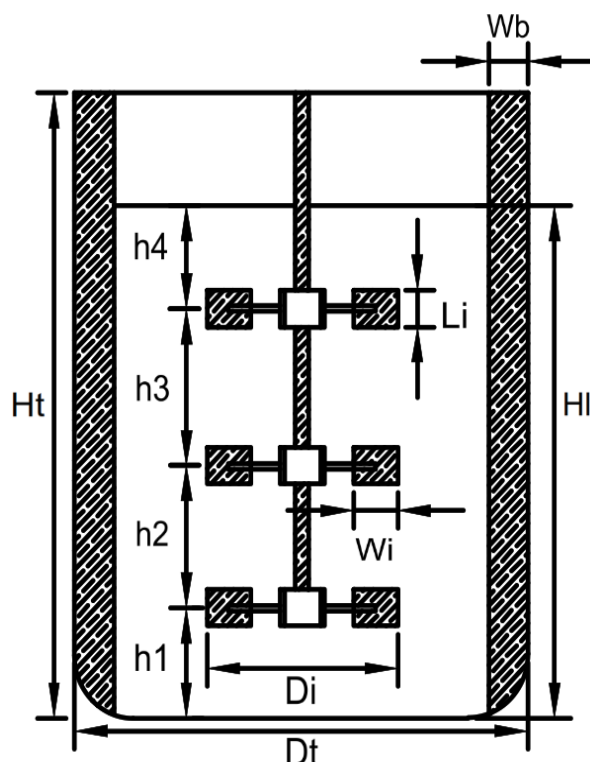
Parámetro	Valor
-----------	-------

Volumen nominal	15 L
Volumen de trabajo	10 L
Tipo de Agitador	3 Rushton de 6 paletas
Fondo	Plano
Diámetro del tanque	200 mm
Diámetro del agitador	100 mm
Altura del líquido	300 mm
Capacidad máxima de agitación	500 rpm
Capacidad máxima de aireación	7 L/min

3.2 Biorreactores escala modelo laboratorio y piloto

Una limitante para llevar a cabo el proceso de escalado en el biorreactor prototipo es que su diseño es de tipo Bench. Estos biorreactores no tienen deflectores en su configuración y siempre operan en pequeñas capacidades, por lo que al incrementar su volumen de operación se generan vórtices en el centro del equipo ocasionando zonas muertas. En contraste, los biorreactores STR son escalables ya que poseen deflectores en su estructura y además sus dimensiones se diseñan y fabrican con similitud geométrica estándar. Este último factor es de gran importancia, ya que al mantener las relaciones geométricas del prototipo hacia los modelos se garantiza que el comportamiento cinemático y dinámico del medio fermentativo sea semejante (González, 2000).

En este sentido y sin información al respecto al espaciamiento entre los agitadores, se diseñó un prototipo equivalente STR a partir de un análisis comparativo cuyos detalles de



sintetizan en el ANEXO II entre las dimensiones proporcionadas por los artículos de apoyo y las relaciones de similitud geométrica presentes en bibliografía para un biorreactor con tres agitadores. El diseño del prototipo equivalente STR y sus relaciones de similitud geométrica se presentan en la Figura 4 y Tabla 4 respectivamente.

Di	Diámetro del agitador
Dt	Diámetro del tanque
Hi	Altura del líquido
Ht	Altura total del tanque
h1	Distancia del primer agitador desde el fondo del tanque
h2	Distancia entre el primer y segundo agitador
h3	Distancia entre el segundo y tercer agitador
h4	Distancia entre el tercer agitador y la superficie del líquido
Wb	Ancho del deflector
Wi	Ancho de la hoja de la paleta
Li	Altura de la hoja de la paleta

Figura 4. Prototipo equivalente STR

Tabla 4. Relaciones de similitud geométrica estándar

Criterio de similitud	Relación
Di/Dt	1/2
Hi/Dt	3/2
$h1/Dt$	1/3
$h2/Di$	1
$h3/Di$	1
Wb/Dt	1/10
Wi/Di	1/4
Li/Di	1/5

De acuerdo con Mahdinia et al., (2019) para que una escala se considere de laboratorio su volumen debe estar entre el rango de 1 a 50 L mientras que para una escala piloto el

rango reportado es de 50 a 10 000L. Entonces, se emplea un factor de escala de 3 de manera que el volumen nominal en la escala modelo de laboratorio es de 50 L y el modelo piloto es de 150 L. En ambas escalas la capacidad de operación corresponde al 66.7 % del volumen nominal tal como está definido en la escala prototipo.

Las dimensiones de las escalas modelo que cumplen con las relaciones de similitud geométrica establecidas en la escala prototipo de 15 L y sus diseños se presentan en la Tabla 5 y Figura 5 respectivamente.

Tabla 5. Dimensiones de las escalas modelo

Parámetro	Escala laboratorio (mm)	Escala piloto (mm)
Dt	300	440
Di	150	220
Hl	450	650
h1	100	150
h2	150	220
h3	150	220
h4	50	70
Wb	30	40
Wi	40	50
Li	30	40

Se evidencia que la relación de la distancia entre agitadores es igual a 1 diámetro del impulsor, lo que de acuerdo con Doran, (2013) asegura una adecuada mezcla en el biorreactor. Esto se debe a que cada agitador genera su propio patrón de flujo, por lo que la distancia entre impulsores influye significativamente en el comportamiento de la circulación. Por lo tanto, si la distancia se encuentra entre 1 a 3 se generan corrientes de descarga radial por cada agitador, y con ello bucles de circulación que son independientes de la escala, garantizando homogeneidad en la mezcla. Por el contrario, si los impulsores se acercan demasiado los bucles entre agitadores interfieren entre sí mejorando la mezcla entre ellos, pero causa zonas muertas en la parte superior o inferior del tanque. Así mismo, si la distancia es mayor, las corrientes de circulación no podrían interactuar entre ellas, lo que resulta en una mezcla heterogénea en el biorreactor.

Las relaciones entre la altura del líquido y diámetro del agitador respecto al diámetro del tanque también influyen en el grado de homogeneidad. Para el primer caso, al asegurar

un valor de 3/2 se genera una presión hidrostática que favorece la solubilidad del oxígeno, de igual forma las burbujas de aire tienen mayor tiempo de contacto con el sustrato líquido facilitando así su mecanismo de transferencia desde la fase gaseosa. Para el segundo criterio, pese que a que las relaciones estándar de bibliografía empleen un valor de 1/3 del diámetro del tanque, mantener el valor de 1/2 garantiza un mejor grado de mezcla y distribución en el sistema (Doran, 2013).

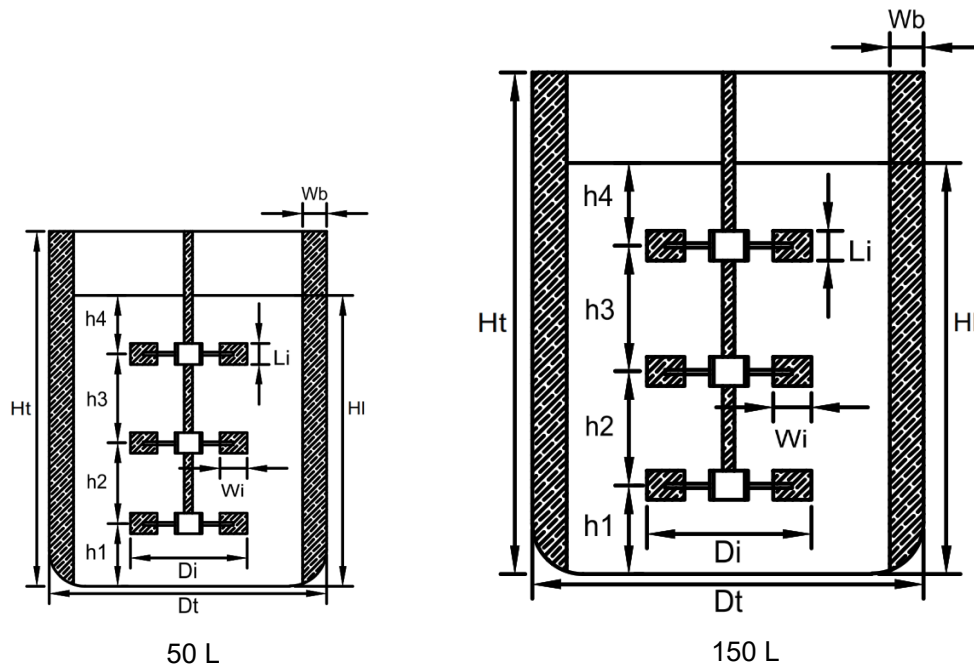


Figura 5. Biorreactores de las escalas modelo laboratorio y piloto.

3.3 Criterios de escalado relevantes para el proceso fermentativo

Los criterios de escalado se categorizan en dos grupos: aquellos relacionados con la aireación ($k_L a$, DO) y otros con la agitación (P/V, ND). Al evaluar el efecto de la aireación, se ha determinado que para que el *Bt* sintetice las proteínas cristalinas con potencial insecticida en su fase de esporulación, es necesario llevar a cabo su fermentación en condiciones estrictamente aerobias (Da Silva et al., 2021; Mounsef et al., 2015; Yezza et al., 2004). Por otra parte, en el caso de la agitación varios estudios han reportado que este factor no ocasiona daños por cizallamiento sobre el microorganismo, más bien influyen directamente en el grado de dispersión del oxígeno en el medio de cultivo lo que denota nuevamente la importancia de la aireación (Boniolo et al., 2012; Wu et al., 2002). En este contexto, los criterios de escalado elegidos para el *Bt* están relacionados directamente con la transferencia de oxígeno.

El k_La es un criterio de gran relevancia para el proceso fermentativo con *Btk* ya que se relaciona directamente con su productividad, además de ser uno de los criterios más empleados en el escalado de bioprocesos por su buena reproducibilidad. (Da Silva et al., 2021) determinó que conforme se incrementa el valor del k_La mayor resulta el número de células, esporas y toxicidad de las proteínas cristalinas. De igual manera, Mounsef et al., (2015) identificó que a valores de k_La bajos el nivel de esporulación no era suficiente y la cantidad de proteínas era muy baja, pero conforme crecía su valor, mejoraban los rendimientos de forma proporcional. Flores et al., (1997) demostró la efectividad de emplear este parámetro como criterio de escalado en un sistema cuyo salto de escala fue de 1:100, obteniendo una reducción en el tiempo de fermentación y un mismo rendimiento de biomasa y eficiencia en la esporulación.

Por su parte, el oxígeno disuelto (DO) es un criterio que repercute sobre la esporulación y la formación de las toxinas durante el proceso fermentativo. Para el caso del *Btk* variedad HD-1 el valor mínimo oscila entre el 20 y el 30 % que resulta la concentración crítica, ya que debajo de esta no existe esporulación ni formación de δ -endotoxinas (Ndao et al., 2017; Vu, et al., 2008; Yezza et al., 2004). Existen discrepancias acerca del valor adecuado de DO ya que dependerá de la cepa y la fase de crecimiento en la que se encuentre. En un estudio realizado por Boniolo et al., (2012) para la cepa (*Bti* IPS-82) al mantener las concentraciones de DO al 5, 20 y 50% durante todo el proceso fermentativo, no encontró diferencias significativas respecto a la concentración de biomasa, la velocidad de crecimiento o en los tiempos de fermentación; sin embargo, encontró que a bajas concentraciones de DO la toxicidad de las proteínas es menor, es decir, la eficiencia de las δ -endotoxinas es proporcional al DO. Ghribi, et al., (2007a) y Ghribi, et al., (2007b) evaluaron la influencia del DO para la cepa (*Btk* BNS3) en dos etapas, en la primera mantuvieron la concentración entre el 60 y 70% durante las primeras 6 horas, para posteriormente reducir al 40% hasta el final de la fermentación, lo que resultó en una menor cantidad de esporas, pero una alta producción de δ -endotoxinas. Estos resultados concuerdan con Jallouli et al., (2020) que concluye que para tener buenos rendimientos se debe garantizar en la etapa de esporulación al menos el 40 % de DO hasta el final de la fermentación, independientemente de la fuente de carbono que se utilice. Por otra parte, Da Silva et al., (2021) explica que emplear concentraciones de DO cercanas a la saturación no impacta considerablemente en la producción de las toxinas, por lo que sugiere que para mejorar la eficiencia del proceso únicamente se requiere controlar la cantidad de oxígeno disuelto.

Después del análisis bibliográfico se estableció que los criterios de escalado más representativos para el proceso fermentativo con *Btk* HD-1 es la tasa volumétrica de transferencia de oxígeno ($k_L a$) y el oxígeno disuelto (DO).

3.3.1 Correlación para estimar el $k_L a$

En la Tabla 6 se presenta el resumen de las correlaciones establecidas mediante la revisión bibliográfica:

Tabla 6. Correlaciones teóricas y empíricas para estimar el $k_L a$

ID	Correlación*	Observaciones	Referencia
1	$k_L a$ $= 2.6 \times 10^{-2} \left(\frac{P}{Vr}\right)^{0.4} V_s^{0.5}$	Válida para capacidades menores a 3000L y una potencia por unidad de volumen entre 0.5-10 kW	Najafpour, 2015
2	$k_L a$ $= 2 \times 10^{-3} \left(\frac{P}{Vr}\right)^{0.7} V_s^{0.2}$	Válida para capacidades menores a 5000L	Najafpour, 2015
3	$k_L a$ $= 1.9 \times 10^{-4} \left(\frac{P}{Vr}\right)^{0.67} V_s^{0.53}$	Válida para un biorreactor con tres agitadores	Puthli et al., 2005
4	$k_L a$ $= 0.00024917 N^{2.49} V^{0.80}$	Obtenida para la cepa <i>Btk</i> HD-73 en un volumen de trabajo de 7L	Flores et al., 1997
5	$k_L a$ $= 0.000118817 N^{1.88} V^{0.98}$	Obtenida para la cepa <i>Btk</i> HD-73 para un volumen de trabajo de 700L	Flores et al., 1997

*P potencia en un sistema aireado de 3 agitadores (W); V Volumen de operación (m³); N velocidad de agitación (rps); Vs Velocidad superficial del aire (m/s).

Los resultados cuantificados con cada correlación para las condiciones de operación de 5 artículos de investigación relacionados con la producción de *Btk* donde se reportan valores experimentales de $k_L a$ se resumen en la Tabla 7. Dichos artículos evalúan distintos aspectos del proceso fermentativo, como: productividad en sistemas por lotes y semi lotes, escalado, tipos de formulaciones a base de aguas residuales con contenido de almidón y mejoramiento de la entomotoxicidad a partir de quitinasa.

Tabla 7. Comparación entre valores de $k_L a$ en h⁻¹ estimados y experimentales

Referencia	Brar, et al., 2005b	Ndao et al., 2017	Dang Vu et al., 2009	Vu et al., 2009a	Vu et al., 2009b

$k_L a$ promedio experimental	62.5	45	55	55	45
1	99.0±36.5	83.6±38.6	83.6±28.6	83.6±28.6	91.6±46.6
2	553.7±491.2	517.7±472.7	517.7±462.7	517.7±462.7	536.9±491.9
3	5.2±57.3	4.3±40.7	4.3±50.7	4.3±50.7	4.8±40.2
4	62.0±0.5	34.0±11	47.4±7.3	47.4±7.3	39.3±5.7
5	67.4±4.9	37.7±7.3	48.5±6.5	48.5±6.5	45.1±0.1

Las correlaciones 1 y 2 sobreestiman significativamente los valores experimentales, con errores absolutos promedio de 35.78 y 476.27 h⁻¹ respectivamente, lo que permite deducir que una generalización a partir de un rango de las capacidades nominales no es un criterio adecuado para predecir el comportamiento de la tasa volumétrica de transferencia de oxígeno. Por el contrario, la correlación 3 pese a que es propia de un sistema con 3 agitadores, produce valores de menor magnitud a los experimentales. Para el caso de las correlaciones 4 y 5 los errores absolutos son bajos, debido a que fueron determinadas específicamente para el *Btk*, además ambas se validaron con un coeficiente de aproximación del 95 % lo que les otorga alto grado de confiabilidad para predecir el $k_L a$. Aunque el autor no especifica el grado de desviación que se tendría al usar estas correlaciones en un volumen de operación distinto al que fueron diseñadas, se optó por la correlación 4 para la estimación del $k_L a$ en la escala prototipo ya que se validó para un volumen de operación de 7 L muy cercano a la escala prototipo de 10L.

Esta correlación se fundamenta únicamente en la velocidad de agitación y la velocidad superficial del aire como se describe a continuación:

$$k_L a = 84.3(N)^{2.49}V_s^{0.80}$$

Ecuación 6. Tasa volumétrica de transferencia de oxígeno

Donde la tasa volumétrica de transferencia de oxígeno ($k_L a$) está en h⁻¹, la velocidad de agitación (N) en rps y la velocidad superficial del aire (V_s) en m/s.

Se estimó un valor de $k_L a$ de 33.96 h⁻¹ para la escala prototipo que es aproximado con el valor de 45 h⁻¹ reportado por (Ndao et al., 2017) con un error de ±11.04.

3.3.2 Estimación de la concentración de oxígeno disuelto

Debido a que en el trabajo de Vu, et al., (2008) no existen datos suficientes para calcular la concentración de oxígeno disuelto en la escala prototipo se optó por considerar los datos experimentales reportados por Ndao et al., (2014). Este estudio es, un artículo de apoyo que emplea el mismo microorganismo, sustrato, tipo de biorreactor y condiciones de operación. En este sentido, se tiene la certeza de que, al calcular la concentración de oxígeno disuelto mediante este grupo de datos, el resultado será el mismo para las condiciones del artículo base. Los datos experimentales utilizados para la estimación se detallan en el ANEXO III.

La concentración de oxígeno disuelto se calculó a partir de la concentración de saturación de oxígeno a la temperatura de operación, la tasa de consumo de oxígeno y la tasa volumétrica de transferencia de oxígeno, mediante la ecuación que se presenta a continuación:

$$C_L = C^* - \frac{\left(\frac{d[O_2]}{dt} + OUR\right)}{k_L a}$$

Ecuación 7. Concentración de oxígeno disuelto

Donde: la concentración de oxígeno disuelto (C_L) está en mmol/L, la concentración de oxígeno disuelto en la saturación a 30°C (C^*) con un valor de 0.19 mmol/L, la variación de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo $\left(\frac{d[O_2]}{dt}\right)$ en (mmol/ L*h), la tasa de consumo de oxígeno (OUR) en (mmol/ L*h) y la tasa volumétrica de transferencia de oxígeno ($k_L a$) en h^{-1} .

A partir de los 9 grupos de datos experimentales proporcionados por Ndao et al., (2014) se tomaron los valores del OUR , el $k_L a$ y la concentración de oxígeno en la saturación durante todo el proceso fermentativo del Btk. Se determinó la variación de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo a través de la diferencia entre la tasa de transferencia de oxígeno (OTR) y la tasa de consumo (OUR). Al analizar los resultados para cada grupo de datos, se evidencia que al llegar al estado estacionario el OUR representa alrededor del 9% de la variación de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo.

Por lo tanto, al aplicar la ecuación 7 y el criterio del 9% con los datos correspondientes a la escala prototipo se cuantificó una concentración de oxígeno disuelto igual al 92% de la

saturación en el estado estacionario para la producción del *Btk* a partir de aguas residuales con contenido de almidón.

El DO cuantificado se encuentra muy cerca de la saturación, lo que garantiza que el proceso fermentativo en la escala prototipo es completamente aerobio, superando el rango de oxígeno disuelto mínimo (20 al 30%) que requiere el *Btk* HD-1 para la producción de las proteínas cristalinas.

3.4 Condiciones de operación en las escalas modelo, laboratorio y piloto

Luego de establecer la forma de cálculo del k_La y la concentración de oxígeno disuelto como criterios de escalado relevantes para la producción del *Btk*, se desarrollaron los protocolos que se indican en las Figuras 6 y 7 que permiten determinar las condiciones de operación en las escalas modelo.

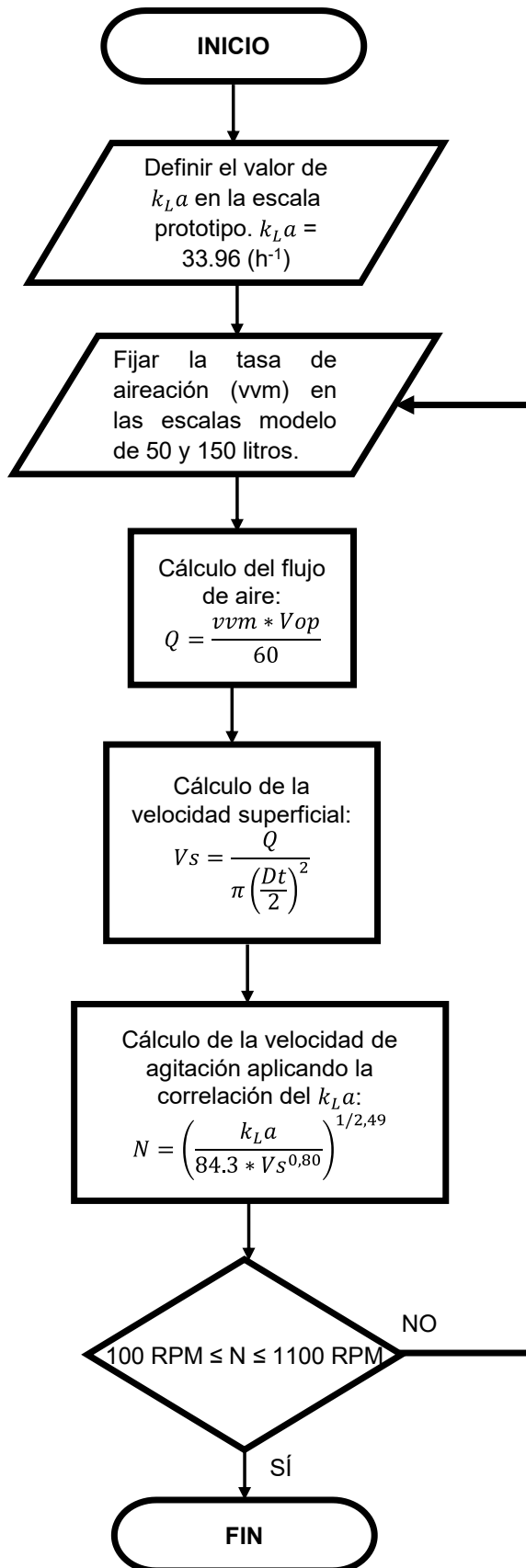


Figura 6. Protocolo de escalado para el cálculo de las condiciones de operación de las escalas mayores en función del $k_L a$ constante.

El protocolo de la Figura 6 mantiene constante el valor del k_La de la escala prototipo para determinar la velocidad de agitación en las escalas modelos de 50 y 150 L. Para ello, se selecciona una tasa de aireación en función de un rango definido que va de 0.2 a 2 vvm. Posteriormente, se calcula flujo de aire, la velocidad superficial y la velocidad de agitación mediante la correlación empírica del k_La . Finalmente, se compara el valor obtenido con el rango de operación para la velocidad de agitación; si está dentro de dicho rango entonces ese valor es válido para la escala mayor, caso contrario, se selecciona una nueva tasa de aireación.

Los rangos establecidos para la tasa de aireación y la velocidad de agitación se determinaron a partir de un análisis comparativo entre las condiciones de operación de varios artículos científicos para el *Bacillus thuringiensis*, como se presentan en el ANEXO IV.

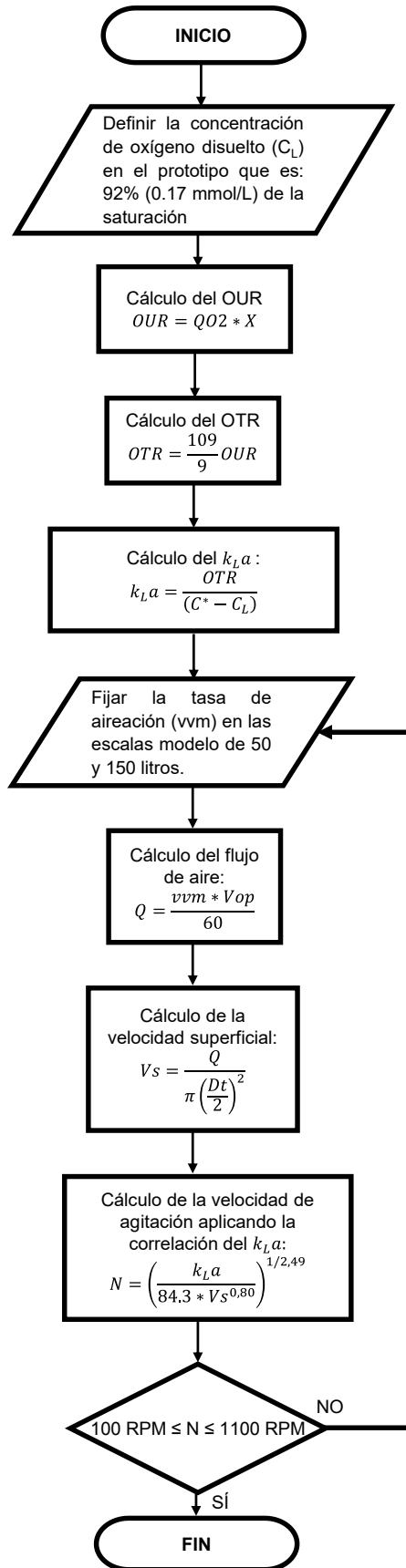


Figura 7. Protocolo de escalado para el cálculo de las condiciones de operación de las escalas mayores en función del DO constante.

El protocolo de la Figura 7 mantiene constante el oxígeno disuelto de la escala prototipo para determinar la velocidad de agitación en las escalas modelos de 50 y 150 L. Para ello, se calcula el OUR en función de la tasa de consumo específico de oxígeno (QO_2) para el Btk y la concentración de biomasa (X). Se calcula la tasa de transferencia de oxígeno (OTR) y el k_La a partir su ecuación base. Luego, se selecciona una tasa de aireación dentro del rango de 0.2 a 2 vvm. Para calcular el flujo de aire, la velocidad superficial y la velocidad de agitación mediante la correlación empírica del k_La . Finalmente, se compara el valor obtenido con el rango de operación para la velocidad de agitación; si está dentro de dicho rango entonces ese valor es válido para la escala mayor, caso contrario, se selecciona una nueva tasa de aireación.

En la Tabla 8 se presentan las condiciones de operación de las escalas mayores luego de aplicar los protocolos de escalado:

Tabla 8. Condiciones de operación de las escalas mayores de 50 y 150 L

Escala	Tasa de aireación	k_La constante 33.96 h ⁻¹	DO constante 92%
50 L	1 vvm	198 rpm	207 rpm
150 L	1 vvm	178 rpm	185 rpm

No se aprecia una diferencia significativa entre los resultados de ambos protocolos, al mantener la misma tasa de aireación para ambas escalas se obtuvo que las velocidades de agitación están cerca del límite inferior del rango establecido, presentando una diferencia de 9 y 7 unidades para las escalas de 50 y 150 L respectivamente.

La influencia de mantener un criterio de escalado constante sobre otros tales como: velocidad punta (NDi), potencia por unidad de volumen (P/V) y número de bombeo (N_Q), se presenta en la Tabla 9 conocida como la matriz de evaluación del proceso de escalado.

Tabla 9. Variación de los parámetros de operación en las escalas mayores respecto a la escala prototipo

		k_La	P/V	NDi	N _Q	DO
50L	k_La	1	0.42	0.85	3.32	0.98
	DO	1.1	0.48	0.89	3.18	1
150 L	k_La	1	0.69	1.12	3.56	0.98
	DO	1.1	0.78	1.16	3.41	1

Al evaluar el comportamiento de la escala de 50 L, cuando se mantiene el k_La constante se reduce el consumo de energía por unidad de volumen en un 58%, tendencia que se repite para la velocidad punta, pero con una reducción del 15%. Respecto al número de bombeo, que refleja la capacidad del impulsor para bombear un fluido, existe un incremento de más del triple respecto a la escala prototipo, esto como consecuencia del aumento de las dimensiones del agitador en la nueva escala. Además, se evidencia que la concentración de oxígeno disuelto no se ve afectado de forma considerable ya que solo presenta una reducción del 2 %, lo que permite garantizar la productividad del *Btk*.

Para la misma escala, pero manteniendo el DO constante se observa un comportamiento similar para la potencia por unidad de volumen, la velocidad punta y el número de bombeo. Sin embargo, para el k_La exhibe un leve incremento del 10 % lo que se traduce en una transferencia de oxígeno más eficiente.

En el caso de la escala modelo piloto de 150 L al aplicar el protocolo de escalado cuando se mantiene el k_La constante, se observa una reducción del gasto de energía del 31 %, un aumento del 12 % para la velocidad punta debido al incremento del diámetro del agitador lo que se traduce en una mayor cizalla y un cambio de casi 4 veces más para el número de bombeo. La concentración de oxígeno disuelto no cambia en forma considerable con una reducción de apenas 2 %.

Al aplicar el protocolo de DO para la misma escala el comportamiento fue similar al protocolo del k_La , con la única diferencia de que la tasa volumétrica de transferencia de oxígeno tuvo un aumento del 10% al igual que en la escala de 50L.

Estos resultados denotan que al ejecutar un proceso de escalado fundamentado en la similitud geométrica, se conserva el comportamiento cinemático y dinámico el medio fermentativo lo que asegura que tanto el k_La como el DO se mantengan constantes. Por otra parte, para los criterios relacionados con la agitación (NDi , P/V , N_Q) si hay diferencias entre las escalas modelos y prototipo, ya que estos si dependen del volumen de operación, las dimensiones del agitador y su velocidad.

3.5 Conclusiones

Es viable obtener proteínas cristalinas a partir de aguas residuales con contenido de almidón mediante el *Bacillus thuringiensis sp. Kurstaki* HD-1 en un biorreactor STR de 15 L, operando a 2.5 L/min, 350 rpm y 30°C

Se determinó que los criterios de escalado más relevantes para la producción de *Btk* son la tasa de volumétrica de transferencia de oxígeno k_La y la concentración de oxígeno disuelto DO con valores de 33.96 h^{-1} y 92 % respectivamente.

Los protocolos de escalado obtenidos permiten escalar adecuadamente el proceso fermentativo del *Btk* para producir 1043 (mg/l) de δ -endotoxinas en todas las escalas. Al aplicar el protocolo en función del k_La se cuantificaron velocidades de agitación de 198 y 178 rpm para las escalas de 50 y 150 L respectivamente. Por otra parte, con el protocolo que opera en función del oxígeno disuelto se calcularon valores de 207 y 185 rpm respectivamente. Ambas capacidades con una tasa de aireación de 1 vvm.

3.6 Recomendaciones

Es necesario determinar de forma experimental correlaciones de k_La propias para el *Bacillus thuringiensis* sp. Kurstaki HD-1 (ATCC 33679) para realizar un estudio más acertado acerca del comportamiento del microorganismo ante varias condiciones de operación.

4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Alves, L. F. A., Alves, S. B., Pereira, R. M., y Capalbo, D. M. F. (1997). Production of *Bacillus thuringiensis* berliner var. kurstaki Grown in alternative media. *Biocontrol Science and Technology*, 7(3), 377–384. <https://doi.org/10.1080/09583159730785>
- [2] Ballardo, C., Abraham, J., Barrena, R., Artola, A., Gea, T., y Sánchez, A. (2016). Valorization of soy waste through SSF for the production of compost enriched with *Bacillus thuringiensis* with biopesticide properties. *Journal of Environmental Management*, 169, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.12.029>
- [3] Beltrán, L., Díaz, S., Berdugo, C., Zamora, A., Buitrago, G., y Moreno, N. (1998). Estrategia para el diseño de un medio de cultivo para la fermentación con *Bacillus Thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1(1), 28–34. Obtenido de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/29981> (agosto,2022)
- [4] Boniolo, F. S., Rodrigues, R. C., Prata, A. M. R., López, M. L., Jacinto, T., da Silveira, M. M., y Berbert-Molina, M. A. (2012). Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: Bringing new insights on their impact on sporulation and δ -endotoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(3), 625–636. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3746-9>
- [5] Brar, S. K., Verma, M., Barnabé, S., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., y Surampalli, R. (2005a). Impact of Tween 80 during *Bacillus thuringiensis* fermentation of wastewater sludges. *Process Biochemistry*, 40(8), 2695–2705. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.003>
- [6] Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valero, J. R., y Surampalli, R. Y. (2005b). Starch Industry Wastewater-Based Stable *Bacillus thuringiensis* Liquid Formulations. *Journal of Economic Entomology*, 98(6), 1890–1898. <https://doi.org/10.1093/jee/98.6.1890>
- [7] Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., y Surampalli, R. Y. (2005c). Sludge based *Bacillus thuringiensis* biopesticides: Viscosity impacts. *Water Research*, 39(13), 3001–3011. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.072>
- [8] Crickmore, N., Berry, C., Panneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T. R., y Bonning, B. C. (2021). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186, 107438. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>

- [9] Da Silva, T. A. F., de Freitas, L. S., da Silva, L. V. J. B., Duarte Neto, J. M. W., da Silva, G. R., Maranhão, L. M. de A. C., de Lacerda, C. A., Oliveira, J. D. P., Bezerra, R. P., y Porto, A. L. F. (2021). Effect of the volumetric oxygen mass transfer coefficient on producing δ -endotoxins by *Bacillus thuringiensis* in culture medium based on forage palm. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, 101960. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101960>
- [10] Dang Vu, K., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Valero, J. R., y Surampalli, R. Y. (2009). Starch industry wastewater for production of biopesticides - Ramifications of solids concentrations. *Environmental Technology*, 30(4), 393–405. <https://doi.org/10.1080/09593330902753495>
- [11] De Lourdes Tirado Montiel, M., Tyagi, R. D., y Valero, J. R. (2001). Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus Thuringiensis* based biopesticides. *Water Research*, 35(16), 3807–3816. [https://doi.org/doi:10.1016/s0043-1354\(01\)00103-8](https://doi.org/doi:10.1016/s0043-1354(01)00103-8)
- [12] De Oliveira, J. L., Fraceto, L. F., Bravo, A., y Polanczyk, R. A. (2021). Encapsulation Strategies for *Bacillus thuringiensis*: From Now to the Future. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(16), 4564–4577. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07118>
- [13] Doran, P. M. (2013). *Bioprocess Engineering Principles* (2.^a ed.) Londres, Reino Unido: Academic Press.
- [14] Duarte Neto, J. M. W., Wanderley, M. C. de A., da Silva, T. A. F., Marques, D. A. V., da Silva, G. R., Gurgel, J. F., Oliveira, J. D. P., y Porto, A. L. F. (2020). *Bacillus thuringiensis* endotoxin production: a systematic review of the past 10 years. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36(9). <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02904-4>
- [15] Escobar, Jenny M., Pardo, E. Milena., Buitrago, Gustavo., y López, Luis A. (2004). Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6(2), 43–53. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77660207> (agosto,2022)
- [16] Fitschen, J., Maly, M., Rosseburg, A., Wutz, J., Wucherpfennig, T., y Schlüter, M. (2019). Influence of Spacing of Multiple Impellers on Power Input in an Industrial-Scale Aerated Stirred Tank Reactor. *Chemie Ingenieur Technik*, 91(12), 1794–1801. <https://doi.org/10.1002/cite.201900121>

- [17] Flores, E. R., Pérez, F., y de la Torre, M. (1997). Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(6), 561–564. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)81137-3](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)81137-3)
- [18] Fújasová, M., Linek, V., y Moucha, T. (2007). Mass transfer correlations for multiple-impeller gas-liquid contactors. Analysis of the effect of axial dispersion in gas and liquid phases on “local”*k*_La values measured by the dynamic pressure method in individual stages of the vessel. *Chemical Engineering Science*, 62(6), 1650–1669. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.12.003>
- [19] Garcia-Ochoa, F., y Gomez, E. (2004). Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, 59(12), 2489–2501. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.02.009>
- [20] Garcia-Ochoa, F., y Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153–176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
- [21] Ghribi, D., Zouari, N., Trabelsi, H., y Jaoua, S. (2007a). Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 614–622. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.05.015>
- [22] Ghribi, D., Zouari, N., Trigui, W., y Jaoua, S. (2007b). Use of sea water as salts source in starch- and soya bean-based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. *Process Biochemistry*, 42(3), 374–378. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.09.006>
- [23] Gogate, P. R., Beenackers, A. A. C. M., y Pandit, A. B. (2000). Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. *Biochemical Engineering Journal*, 6(2), 109–144. [https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(00\)00081-4](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(00)00081-4)
- [24] González, R., (2000). *Principios básicos de escalado*. La Habana, Cuba: Editorial Universitaria.
- [25] Hristov, H. V., Mann, R., Lossev, V., y Vlaev, S. D. (2004). A simplified CFD for three-dimensional analysis of fluid mixing, mass transfer and bioreaction in a fermenter equipped with triple novel geometry impellers. *Food and Bioproducts Processing*, 82(1), 21–34. <https://doi.org/10.1205/096030804322985281>

- [26] Ibrahim, M.A., Griko, N., Junker, M., y Bulla, L.A. (2010). Bacillus thuringiensis. A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31–50. <https://doi.org/doi:10.4161/bbug.1.1.10519>
- [27] Jallouli, W., Driss, F., Fillaudeau, L., y Rouis, S. (2020). Review on biopesticide production by Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki since 1990: Focus on bioprocess parameters. *Process Biochemistry*, 98, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.023>
- [28] Kumar, L. R., Ndao, A., Valéro, J., y Tyagi, R. D. (2019). Production of Bacillus thuringiensis based biopesticide formulation using starch industry wastewater (SIW) as substrate: A techno-economic evaluation. *Bioresource Technology*, 294, 122144. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122144>
- [29] Li, Q., Reeve, C., Martinez, L., y Wright, S. (2019). Scale-up in biotechnology. *Comprehensive Biotechnology*, 919–932. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00141-5>
- [30] Liu, W.M., y Bajpai, K. (1995). A Modified Growth Medium for Bacillus thuringiensis. *Biotechnology Progress*, 11(5), 589–591. <https://doi.org/doi:10.1021/bp00035a014>
- [31] Mahdinia, E., Cekmecelioglu, D., y Demirci, A. (2019). Bioreactor Scale-Up. *Essentials in Fermentation Technology*, 213–236. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6_7
- [32] Moazami, N. (2011). Biological Control. *Comprehensive Biotechnology*, 731–739. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00235-X>
- [33] Mounsef, J. R., Salameh, D., Louka, N., Brandam, C., y Lteif, R. (2015). The effect of aeration conditions, characterized by the volumetric mass transfer coefficient K_La , on the fermentation kinetics of Bacillus thuringiensis kurstaki. *Journal of Biotechnology*, 210, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.387>
- [34] Najafpour, G. D. (2015). *Biochemical Engineering and Biotechnology*. (2.^a ed.) Babol, Iran: Elsevier
- [35] Ndao, A., Mercier, G., Tyagi, D., y Trudel, R. (2014). *Mise Á L'échelle de la production du biopesticide bacillus thuringiensis var. kurstaki avec comme substrat des eaux usées d'amidon*. (Tesis presentada para la obtención del grado de maestría en ciencias, Msc. en Agua y Ciencias ambientales) Université du Québec, Québec, Canadá.

- [36] Ndao, A., Sellamuthu, B., Gnepe, J. R., Tyagi, R. D., y Valero, J. R. (2017). Pilot-scale biopesticide production by bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki using starch industry wastewater as raw material. *Journal of Environmental Science and Health, Part B, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 52(9), 623–630. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1330071>
- [37] Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., y Caballero, P. (2014). Bacillus thuringiensis toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>
- [38] Poopathi, S., Chinnasamy, M., y Rajeswari, G. (2013). Potential of sugarcane bagasse (agro-industrial waste) for the production of Bacillus thuringiensis israelensis. *Tropical Biomedicine*, 30, 504–515. Obtenido de: <https://www.researchgate.net/publication/258281580> (agosto,2022)
- [39] Puthli, M. S., Rathod, V. K., y Pandit, A. B. (2005). Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 23(1), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.10.006>
- [40] Rowe, G. E., Margaritis, A., y Wei, N. (2003). Specific Oxygen Uptake Rate Variations during Batch Fermentation of Bacillus thuringiensis Subspecies kurstaki HD-1. *Biotechnology Progress*, 19(5), 1439–1443. <https://doi.org/10.1021/bp030018o>
- [41] Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., y Christou, P. (2011). Bacillus thuringiensis: A century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), 283–300. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x>
- [42] Sauka, D. H., y Benintende, G. B. (2008). Bacillus thuringiensis: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(2), 124–140. Obtenido de: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412008000200013&lng=es&tying=es.(agosto,2022)
- [43] Stanbury, P. F., Whitaker, A., y Hall, S. J. (2017). *Principles of Fermentation Technology*. (3^{ra}. ed.) Londres, Reino Unido: Butterworth-Heinemann Elsevier.
- [44] Ujváry, I. (2010). Pest Control Agents from Natural Products. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, 119–229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00003-3>
- [45] Vu, K. D., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., y Surampalli, R. Y. (2008). Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of Bacillus thuringiensis during the fermentation

of starch industry wastewater. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(4), 511–519. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0271-z>

[46] Vu, K. D., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., y Surampalli, R. Y. (2009a). Batch and fed-batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* using starch industry wastewater as fermentation substrate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(6), 691–700. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0391-0>

[47] Vu, K. D., Yan, S., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., y Surampalli, R. Y. (2009b). Induced production of chitinase to enhance entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* employing starch industry wastewater as a substrate. *Bioresource Technology*, 100(21), 5260–5269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.084>

[48] Wu, Y. -L., Hsu, Y.-F., Ko, L.-L., Yao, W.-T. (2002). Effect of shear stress on cultivation of *Bacillus thuringiensis* for thuringiensin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(2), 175–177. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0827-1>

[49] Yezza, A., Tyagi, R. D., Valèro, J. R., Surampalli, R. Y., y Smith, J. (2004). Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 545–552. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0176-z>

[50] You, S. T., Raman, A. A. A., Shah, R. S. S. R. E., y Mohamad Nor, M.I. (2014). Multiple impeller stirred vessel studies. *Reviews in Chemical Engineering* 30(3), 323–336. <https://doi.org/10.1515/revce-2013-0028>

[51] Zhang, J., Gao, Z., Cai, Y., Cai, Z., Yang, J., y Bao, Y. (2016). Mass transfer in gas–liquid stirred reactor with various triple-impeller combinations. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 24(6), 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2015.12.008>

[52] Zhong, J. J. (2010). Recent advances in bioreactor engineering. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 27(4), 1035–1041. <https://doi.org/10.1007/s11814-010-0277-5>

[53] Zhong, J. J. (2011). Bioreactor Engineering. *Comprehensive Biotechnology*, 165–177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00097-0>

5 ANEXOS

ANEXO I. Selección de los artículos de investigación base y de apoyo.

La Tabla A1 contiene 6 filas cuyos títulos son los requisitos que deben cumplir los artículos de investigación. Cada requerimiento tiene la misma ponderación y la metodología de calificación es “Sí” si los artículos cumplen con el requerimiento de cada una, caso contrario se coloca “No”. La última fila representa la cantidad de respuestas afirmativas respecto al total de requisitos, aquellos artículos que presenten una puntuación de 6/6 o 5/6 serán seleccionados como artículos base o de apoyo respectivamente de acuerdo con su orden de aparición.

Tabla A1. Tabla comparativa para el determinar los artículos base y de apoyo.

ID	1	2	3	4
Referencia	Alves et al., 1997	De Lourdes Tirado Montiel et al., 2001	Ballardo et al., 2016	Poopathi et al., 2013
Subproducto Agroindustrial como sustrato	Sí	No	Sí	Sí
Cepa comercial con código de colección	No	Sí	Sí	No
Sistema por lotes	Sí	Sí	No	Sí
Biorreactor	No	Sí	No	No
Aireación, agitación, temperatura	No	Sí	No	No
Tiene una línea de varios estudios	No	Sí	No	No
Total	2/6	3/6	2/6	2/6

5	6	7	8	9	10	11	12	13
(Escobar et al., 2004)	Vu, et al., 2008	Ndao et al., 2017	Brar, et al., 2005b	Brar, et al., 2005c	Brar, et al., 2005a	Ndao et al., 2014	Mounsef et al., 2015	Boniolo et al., 2012
Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	No	No
No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No
3/6	6/6	6/6	6/6	5/6	5/6	6/6	4/6	4/6

Al observar los resultados de la Tabla A1, se concluyó que el artículo de la columna 6 será el artículo base bajo el cual se definirán las condiciones de operación en la escala prototipo. Los artículos de las columnas 7 a 11 serán los de apoyo, estos proporcionarán información complementaria que no se presenta en el artículo base como: configuración y diseño del biorreactor, propiedades reológicas, etc.

ANEXO II. Relaciones de similitud geométrica para un biorreactor con 3 agitadores

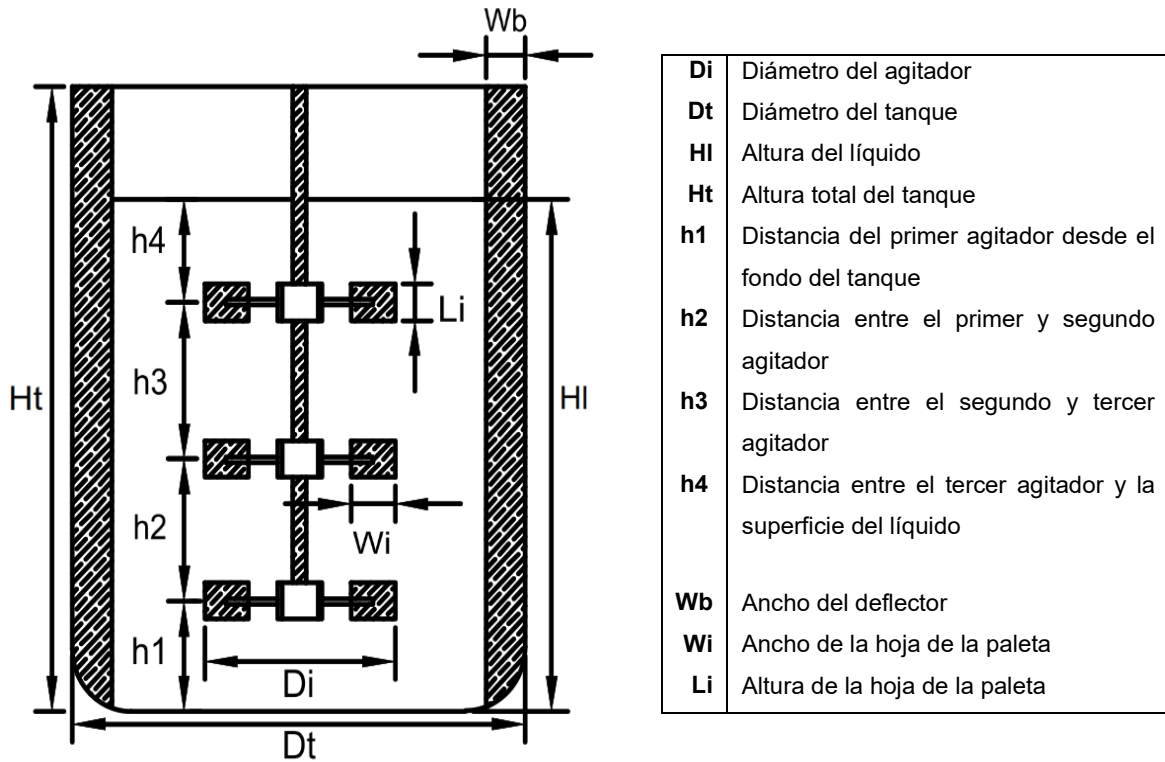


Tabla A2. Tabla comparativa para determinar las relaciones de similitud geométrica en la escala prototipo

Referencia	You et al., 2014	Fitschen et al., 2019
Di	(0.3 - 0.5) Dt	(0.3 - 0.5) Dt
h1	ND	1 Di
h2	(0.5 - 2) Di	(1 - 2) Di
h3	(0.5 - 2) Di	(1 - 2) Di
Hl	>1 Dt	ND
Wb	(0.08 - 0.1) Dt	0.1 Dt
Wi	ND	ND
Li	ND	ND

*ND: Valor no definido en bibliografía

Stanbury et al., 2017			Hristov et al., 2004	Zhang et al., 2016	Fujasová et al., 2007	Rangos definidos de similitud geométrica	Prototipo Bench	Prototipo equivalente STR
0.5 Dt	0.24 Dt	0.37 Dt	0.4Dt	0.4 Dt	0.33Dt	(0.24 - 0.5) Dt	0.5 Dt	1/2 Dt
ND	0.1 Dt	0.37Dt	0.33Dt	0.4Dt	0.33Dt	(0.1 - 0.4) Dt	ND	1/3 Dt
(1 - 2) Di	1.17 Di	1.2 Di	1 Di	1.2 Di	1Dt	(1 -2) Di	ND	1 Di
(1 - 2) Di	1.17 Di	1.2 Di	1 Di	1.2 Di	1Dt	(1 -2) Di	ND	1 Di
ND	ND	1.7 Dt	1.73 Dt	1.8Dt	(1-3) Dt	(1-3) Dt	1.5 Dt	3/2 Dt
(0.08 - 0.1) Dt	0.095 Dt	0.098 Dt	0.1 Dt	0.1 Dt	0.1 Dt	(0.08 - 0.1) Dt	ND	1/10 Dt
ND	ND	ND	ND	ND	0.25 Di	0.25 Di	ND	1/4 Di
ND	ND	ND	ND	ND	0.2 Di	0.2 Di	ND	1/5 Di

ANEXO III. Base de datos experimentales. Ejemplo de cálculo de la concentración de oxígeno disuelto (%DO) y la relación porcentual entre el OUR y la variación de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo

Tabla A3. Base de datos experimentales para la escala prototipo de 15 L (Ndao et al., 2014)

Tiempo	$k_L a$	OTR	OUR	$d[O_2]/dt$	C_L	%DO	% OUR/($d[O_2]/dt$) *
0	48.143	0.392	0.099	0.293	0.182	95.711	17.388
6	67.193	1.060	0.129	0.931	0.174	91.695	15.582
12	55.373	0.619	0.050	0.569	0.179	94.116	9.777
18	56.247	1.015	0.086	0.928	0.172	90.505	11.305
24	53.327	0.663	0.050	0.613	0.178	93.456	8.936
30	44.093	0.650	0.043	0.607	0.175	92.241	8.570
36	45.427	0.663	0.046	0.617	0.175	92.315	10.048
42	45.420	0.661	0.040	0.621	0.175	92.337	7.794
48	47.990	0.394	0.102	0.292	0.182	95.683	17.750

*A excepción de los datos anteriores, únicamente las relaciones porcentuales son un promedio de 18 grupos de datos reportados por el autor en escalas de 15, 150 y 2000 L.

El estado estacionario se delimita desde la hora 24 hasta la 42.

Cálculo de la variación de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = OTR - OUR$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = 0.663 - 0.050$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = 0.613$$

Cálculo la concentración de oxígeno disuelto:

$$C_L = C^* - \frac{\left(\frac{d[O_2]}{dt} + OUR\right)}{k_L a}$$

$$C_L = 0.19 - \frac{(0.613 + 0.050)}{53.327}$$

$$C_L = 0.178$$

Cálculo del porcentaje de saturación de oxígeno disuelto (%DO):

$$\%DO = \frac{C_L}{C^*} * 100$$

$$\%DO = \frac{0.178}{0.19} * 100$$

$$\%DO = 93.456$$

Cálculo del oxígeno disuelto promedio en el estado estacionario:

$$\bar{x} = \frac{93.456 + 92.241 + 92.315 + 92.337}{4}$$

$$\bar{x} = 92.5 \approx 92\%$$

Cálculo de la relación porcentual en el estado estacionario entre el OUR y la variación de concentración de oxígeno disuelto con el tiempo:

$$\bar{x} = \frac{8.936 + 8.57 + 10.048 + 7.794}{4}$$

$$\bar{x} = 8.837 \approx 9\%$$

ANEXO IV. Rango de velocidades de agitación y aireación para el *Bacillus thuringiensis*

Tabla A4. Tasa de aireación y velocidad de agitación para el *Bt*

Referencia	Escala	Cepa	Velocidad de agitación	Tasa de aireación (vvm)
Boniolo et al., 2012	1.5 L	<i>Bti</i> (IPS-82)	200 – 1100	0.66 - 2
Da Silva et al., 2021	5	<i>Btb</i> 370	300 - 400	1.4
Flores et al., 1997	7 y 700 L	<i>Btk</i> HD-73	100 - 800	0.2 – 1
Liu y Bajpai, 1995	1 L	<i>Btk</i> HD-1	900	2
Mounsef et al., 2015	1.5 L	<i>Btk</i> LC50	340 - 500	0.33-1
Ndao et al., 2014	10 L	<i>Btk</i> HD-1	300 - 350	0.25
Rowe et al., 2003	1 L	<i>Btk</i> HD-1	750	1.4
Vu, et al., 2009b	10 L	<i>Btk</i> HD-1	300 - 350	0.2 – 0.3
Rango definido	NA	NA	100 - 1100	0.2 - 2

NA: No aplica