

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

" Diseño, construcción y validación de un biorreactor a escala de laboratorio con sistema de control automático"

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Proyecto Multidisciplinario de Materia Integradora

Previo la obtención del Título de:

INGENIERA EN ALIMENTOS

Presentado por:

Ivette Pamela Sornoza López

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2017

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado con mucho amor a:

Mis padres: Gueymitt Sornoza Espinoza y Ruth López Pérez.

Mis hermanos: Indira y Abraham

Mis abuelitos: Aureliano (†), Giela, Gueymitt y Mary.

Ivette Pamela Sornoza López

AGRADECIMIENTOS

La vida es bella porque está llena de sorpresas y la más hermosa es mi familia, unos padres incondicionales Gueymitt Sornoza Espinoza y Ruth López Pérez, que con su amor incondicional y sus consejos, han formado de mí, una persona con grandes valores, que puede hacer todo lo que hacen los demás, solo que mejor. Un gran agradecimiento a mis hermanos Indira y Abraham que con su amor y sus locuras ayudaron a que la carga del proyecto multidisciplinario de materia integradora haya sido más ligera.

A mi ángel, Aureliano López (†) que aunque no pudiste estar presente físicamente en ésta etapa tan importante, dejaste en mí un gran ejemplo de lucha, esfuerzo y perseverancia por alcanzar cada una de mis metas.

A mis abuelitos Giela, Gueymitt y Mary, que siempre estuvieron apoyándome y dándome una palabra de aliento.

A mis amigas Gaby, Lita y Adri porque gracias a su amistad inigualable y su compañía en esta cuesta arriba, me ayudaron a tener fuerzas y paciencia para culminar esta meta. Y a Ginis, Maité y Diana por acompañarme en esas largas amanecidas durante esta hermosa carrera.

Ivette Pamela Sornoza López

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Ha finalizado una meta más en mi vida, pero sin la ayuda de mi tutor de proyecto multidisciplinario de materia integradora, Ph.D. Jonathan Coronel León, nada de esto hubiera sido posible, porque su compromiso, apoyo, motivación, conocimientos y su confianza en mí desde el principio, hicieron que sea posible alcanzar los objetivos de este proyecto.

A mis compañeros de proyecto, Francisco Saeteros y Juan Arias por todo el tiempo invertido, por sus conocimientos y las largas noches en el laboratorio.

A los profesores encargados del laboratorio de Microbiología de Alimentos y a los profesionales del CIBE por su ayuda y acceso a los laboratorios para las pruebas necesarias.

A ESPOL por el financiamiento económico, el cual ayudó a la viabilidad del proyecto.

Ivette Pamela Sornoza López

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido desarrollado en la presente propuesta de materia integradora corresponde exclusivamente al equipo conformado por:

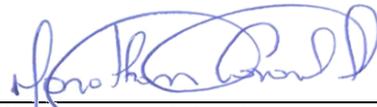
IVETTE PAMELA SORNOZA LÓPEZ

JONATHAN RICARDO CORONEL LEÓN, PH.D.

y el patrimonio intelectual del mismo a la Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción (FIMCP) de la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”



IVETTE SORNOZA L.



JONATHAN CORONEL, PH.D.

RESUMEN

Ante la necesidad de los laboratorios de la carrera de Ingeniería en Alimentos de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción (FIMCP) de adquirir un biorreactor para desarrollar procesos biotecnológicos (cultivo de microorganismos y sustancias activas) de aplicaciones industriales y prácticas de laboratorio, mejorando el control automático del biorreactor diseñado durante el II término 2016-2017 en el proyecto de materia integradora “Diseño de un biorreactor a escala de laboratorio y su sistema de control”.

El presente proyecto se desarrolla como proyecto multidisciplinario, integrando la carrera de Ingeniería en Mecánica para el desarrollo del análisis térmico y estructural de la caja de los componentes de control automático; Ingeniería en Electrónica y Automatización, para realizar el control automático de los procesos; e Ingeniería en Alimentos, para la validación del desempeño del equipo por medio de la producción de compuestos bioactivos.

Por parte de la carrera de Ingeniería en Alimentos se realizó la validación del biorreactor con el desarrollo de un proceso biotecnológico, para este caso con la producción de biotensoactivos (BT) a partir de *Bacillus subtilis* DS03, obteniendo un BT de alta calidad, ya que redujo la tensión superficial de 72 a 36,33mN/m; además también se validó con la producción de cultivos iniciadores a partir de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Palabras clave:

Biorreactor, Biotensoactivo, tensión superficial.

ABSTRACT

In response to the need of the laboratories of the engineering career in Food of the Faculty of Mechanical Engineering and Science of Production (FIMCP) to get a bioreactor to develop biotechnological processes (bacterial cultures and active substances) of industrial applications and laboratory practices, improving the automatic control of the bioreactor designed during the second term 2016-2017 in the integrative project "Design of a laboratory-scale bioreactor and its control system".

This project is developed as a multidisciplinary project, integrating Mechanical Engineering for the development of the thermal and structural analysis of the safety of the components of automatic control; Engineering in Electronics and Automation, to perform the automatic control of the processes; and Food Engineering, for the validation of the team's performance through the production of bioactive compounds.

*The contribution of engineering in food took place in the validation of the bioreactor with the development of a biotechnological process, in this case with the production of biosurfactants (BT) of *Bacillus subtilis* DS03, obtaining a high quality of BT, as it reduces the surface tension of 72 to 36.33 mN/m; in addition the bioreactor with the production of starts cultures from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.*

Keywords:

Bioreactor, Biosurfactants, surface tension.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|------|
| RESUMEN..... | I |
| ABSTRACT | II |
| ÍNDICE GENERAL | III |
| ABREVIATURAS..... | VI |
| SIMBOLOGÍA..... | VII |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VIII |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | IX |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS..... | X |
| CAPÍTULO 1..... | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Descripción del problema | 2 |
| 1.2 Objetivos | 3 |
| 1.2.1 Objetivo General..... | 3 |
| 1.2.2 Objetivos específicos | 3 |
| 1.3 Marco teórico..... | 3 |
| 1.3.1 Biorreactor | 3 |
| 1.3.2 Biorreactores en el mercado..... | 5 |
| 1.3.3 Tendencias 2013 - 2015 | 6 |
| 1.3.4 Características de los biorreactores..... | 7 |
| 1.3.5 Principios de diseño de un biorreactor..... | 7 |
| 1.3.6 Parámetros de control..... | 8 |
| 1.3.7 Tipos de biorreactores | 10 |
| 1.3.8 Productos de interés industrial..... | 12 |
| 1.3.9 Procesos fermentativos | 19 |

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 2..... | 22 |
| 2. METODOLOGÍA DE DISEÑO | 22 |
| 2.1 Producción en laboratorio..... | 22 |
| 2.1.1 Producción de biotensoactivo | 22 |
| 2.1.2 Recuperación del biotensoactivo | 23 |
| 2.1.3 Medición de la tensión superficial | 23 |
| 2.2 Balance de materias primas | 24 |
| 2.3 Biorreactor..... | 24 |
| 2.3.1 Parámetros de control..... | 25 |
| 2.4 Validación del prototipo | 25 |
| 2.4.1 Validación de esterilidad | 25 |
| 2.4.2 Validación del parámetro temperatura | 26 |
| 2.4.3 Validación de los parámetros temperatura y pH | 27 |
| 2.4.4 Validación de los parámetros temperatura, pH y OD | 27 |
| 2.4.5 Validación final del equipo | 28 |
| CAPÍTULO 3..... | 29 |
| 3. RESULTADOS | 29 |
| 3.1 Análisis de la validación de esterilidad | 29 |
| 3.2 Análisis de la validación de temperatura | 29 |
| 3.3 Análisis de la validación de los parámetros temperatura y pH | 38 |
| 3.3.1 Análisis estadístico del parámetro temperatura | 40 |
| 3.3.2 Análisis estadístico del parámetro pH..... | 41 |
| 3.4 Análisis de la validación de temperatura, pH y OD | 42 |
| 3.4.1 Análisis estadístico del parámetro temperatura | 44 |
| 3.4.2 Análisis estadístico del parámetro pH..... | 45 |
| 3.5 Análisis de la validación final..... | 46 |
| 3.5.1 Análisis estadístico del parámetro temperatura | 49 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| 3.5.2 | Análisis estadístico del parámetro pH..... | 50 |
| 3.6 | Análisis de costos..... | 51 |
| CAPÍTULO 4..... | | 55 |
| 4. | DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES..... | 55 |
| 4.1 | Conclusiones..... | 55 |
| 4.2 | Recomendaciones..... | 56 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | | 57 |
| APÉNDICES..... | | 60 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| ESPOL | Escuela Superior Politécnica del Litoral |
| FIMCP | Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción |
| CIBE | Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador |
| STR | Stirred Tank Reactor |
| OCM | Organización Común de los Mercados |
| RTD | Resistencia Dependiente de Temperatura |
| CMC | Concentración Crítica Micelar |
| GRAS | Generally Recognized as Safe |
| FDA | Food and Drug Administration |
| BAL | Bacterias Ácido – Lácticas |

SIMBOLOGÍA

| | |
|------|-------------------------|
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| OD | Oxígeno disuelto |
| BT | Biotensoactivo |
| L | Litros |
| ml | Mililitros |
| g | Gramos |
| °C | Grados Celsius |
| ppm | Partes por millón |
| mg/l | Miligramos por litro |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| Cp | Capacidad del proceso |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Modos de operación de los biorreactores..... | 4 |
| Figura 2. Tendencias 2013 - 2015..... | 6 |
| Figura 3. Secuencia de funcionamiento de una bomba peristáltica..... | 9 |
| Figura 4. Biorreactor tipo air-lift | 11 |
| Figura 5. Biorreactor con agitación mecánica STR | 12 |
| Figura 6. Diversas formas de presentación de cultivos iniciales..... | 17 |
| Figura 7. Curva de crecimiento de un cultivo en batch..... | 19 |
| Figura 8. Tensiómetro manual de fuerza..... | 23 |
| Figura 9. Informe de capacidad del proceso (Temperatura)..... | 40 |
| Figura 10. Informe de capacidad del proceso (pH)..... | 41 |
| Figura 11. Informe de capacidad del proceso (Temperatura)..... | 44 |
| Figura 12. Informe de capacidad del proceso (pH)..... | 45 |
| Figura 13. Informe de capacidad del proceso (Temperatura)..... | 49 |
| Figura 14. Informe de capacidad del proceso (Temperatura)..... | 50 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación de los biotensoactivos | 14 |
| Tabla 2. Composición del medio basal – mineral | 22 |
| Tabla 3. Medio basal – mineral..... | 24 |
| Tabla 4. Parámetros óptimos del <i>Bacillus subtilis</i> | 25 |
| Tabla 5. Medio de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 28 |
| Tabla 6. Datos primera validación temperatura | 29 |
| Tabla 7. Datos segunda validación temperatura | 30 |
| Tabla 8. Datos tercera validación temperatura | 32 |
| Tabla 9. Datos cuarta validación temperatura | 34 |
| Tabla 10. Datos quinta validación temperatura | 35 |
| Tabla 11. Datos validación temperatura y pH..... | 38 |
| Tabla 12. Datos validación temperatura, pH y OD | 42 |
| Tabla 13. Datos validación temperatura, pH y OD | 46 |
| Tabla 14. Costos de estructura del biorreactor..... | 51 |
| Tabla 15. Costos de complementos del biorreactor | 52 |
| Tabla 16. Insumos para pruebas en laboratorios del proceso biotecnológico | 53 |
| Tabla 17. Especificaciones del biorreactor | 61 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1. Primera validación – Curva Temperatura vs. tiempo | 30 |
| Gráfico 2. Segunda validación – Curva Temperatura vs. tiempo..... | 31 |
| Gráfico 3. Tercera validación – Curva Temperatura vs. tiempo..... | 33 |
| Gráfico 4. Cuarta validación – Curva Temperatura vs. tiempo | 35 |
| Gráfico 5. Quinta validación – Curva Temperatura vs. tiempo | 37 |
| Gráfico 6. Curva crecimiento microbiano (Validación T y pH) | 38 |
| Gráfico 7. Curva crecimiento microbiano vs Tensión superficial (Validación T y pH) | 39 |
| Gráfico 8. Curva crecimiento microbiano (Validación T, pH y OD) | 43 |
| Gráfico 9. Curva crecimiento microbiano (Validación T, pH y OD) | 47 |
| Gráfico 10. Curva crecimiento microbiano vs Tensión superficial (Validación T y pH) .. | 47 |

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La carrera de Ingeniería en Alimentos de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) y sus laboratorios requieren de biorreactores para desarrollar estudios e investigaciones en el área biotecnológica.

Actualmente en Ecuador, no se ha encontrado producción nacional de biorreactores, por lo que se ven obligados a importarlos, lo que ocasiona un alto costo de adquisición y en algunos casos, dejar de lado las investigaciones lo cual representa un gran retroceso en el ámbito académico. Según investigaciones los costos de los biorreactores oscilan entre \$50 000 y \$100 000, dependiendo de su capacidad volumétrica y control de parámetros específicos (Trujillo-Roldán, 2009).

Una aplicación muy útil que se le otorga a estos equipos, es la producción de biotensoactivos (BT), que es el producto final de un cultivo microbiano desarrollado en el biorreactor que tiene parámetros específicos de control como pH, temperatura, oxígeno disuelto y velocidad de agitación. Los biotensoactivos son compuestos complejos producidos por vía biológica por diferentes tipos de microorganismos como *Bacillus subtilis*, además están integrados por diversas estructuras como péptidos, glicolípidos, glicopéptidos, ácidos grasos y fosfolípidos, poseen baja toxicidad, son biodegradables y poseen mejor compatibilidad con el medio ambiente (Jiménez, Medina, & Gracida, 2010).

Este proyecto tiene como objetivo diseñar, construir y validar un biorreactor a escala de laboratorio, que controle los parámetros antes mencionados, con la creación de un proceso biotecnológico.

1.1 Descripción del problema

La biotecnología es una ciencia que abarca diversos conocimientos, y está teniendo un rápido crecimiento en los últimos años, actualmente se aplica en diversas áreas como la medicina, agricultura, la industria alimenticia, farmacéutica y el cuidado medio ambiental.

En la actualidad, la biotecnología se encuentra en fase de desarrollo dentro del país y está adquiriendo un gran potencial dentro del ámbito académico, social y económico, pero a pesar del gran interés que está teniendo el país en estos temas, se ven limitados los diversos estudios debido a la falta del equipamiento con tecnología avanzada para el monitoreo y control de dichos equipos.

En Ecuador, los laboratorios que necesitan realizar cultivos de microorganismos, no cuentan con una oferta económicamente accesible de biorreactores con sistema de control automático, por lo cual se ven obligados a importarlos; además ciertas universidades, debido al alto costo adquisitivo, se ven obligados a dejar de lado las investigaciones lo cual representa un gran retroceso en el ámbito académico.

Al presente, no se ha encontrado producción nacional de biorreactores, por lo que se ven obligados a importarlos, lo que ocasiona un alto costo de adquisición y en muchos casos, sin garantía de mantenimiento y reparación. Por este motivo, se considera pertinente desarrollar un biorreactor a escala de laboratorio que satisfaga las necesidades de investigadores, docentes, estudiantes y profesionales de la industria, especialmente de la industria de alimentos, que tenga un costo inicial accesible, y que sea diseñado con alta tecnología, con componentes y materiales disponibles localmente, que permita un rápido, fácil y económico mantenimiento y reparación.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Diseñar, construir y validar un biorreactor de 12 litros de capacidad, a escala de laboratorio con la implementación de un sistema de control automático para la aplicación en el estudio de procesos de fermentación y producción de biotensoactivos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Conocer las condiciones óptimas de crecimiento de la bacteria involucrada para la producción de biotensoactivos.
- Comparar la producción del biotensoactivo en el laboratorio y en el biorreactor.
- Realizar pruebas en el prototipo y en el equipo final.
- Validar el sistema de control del biorreactor, sobre un producto de compuestos bioactivos o alimentos.
- Desarrollar procesos de cultivos de microorganismos, a través del uso del biorreactor.

1.3 Marco teórico

En el marco teórico presente se detallaran conceptos indispensables para el entendimiento del presente proyecto.

1.3.1 Biorreactor

Un biorreactor o fermentador es un sistema que proporciona un ambiente biológicamente activo y controlado que permite el crecimiento eficaz de las células y la formación de un producto; el medio ambiente adecuado tiene niveles óptimos de parámetros específicos como temperatura, pH, sustratos, sales y oxígeno disuelto (Rodríguez & Cabrera, 2003); este proceso puede ser aerobio o anaerobio (Rivera & Suárez, 2010). Este tipo de equipos frecuentemente son de forma cilíndrica, con variaciones de tamaño y fabricados normalmente en acero inoxidable.

La operación de los biorreactores puede ser de tres modos diferentes, dependiendo de los flujos de entrada y salida:

- Batch (lote)

Implica una secuencia de operaciones, desde el desarrollo del inóculo desde un cultivo común hasta la obtención del producto final de la fermentación. Su productividad es la relación entre la concentración final de biomasa y el tiempo completo del lote, que incluye el tiempo de fermentación y el tiempo de retorno (vaciado, limpieza, esterilización y llenado) (Taylor & Francis Group, 2006).

- Continuo

Es un sistema abierto que mantiene las células en un estado de crecimiento equilibrado añadiendo continuamente medio fresco y retirando el medio de cultivo a la misma velocidad; además existen dos modos de operación: quimiostatos y auxostatos; el quimiostato estudia las condiciones ambientales constantes y hace referencia al consumo de sustratos, mientras que los auxostatos hace referencia a la actividad metabólica del microorganismo (Taylor & Francis Group, 2006).

- Fed-batch (lote alimentado)

Es una técnica entre los dos modos de operación anteriores y se suele emplear para conseguir elevadas concentraciones celulares en el biorreactor y evitar la formación de metabolitos secundarios (Taylor & Francis Group, 2006).

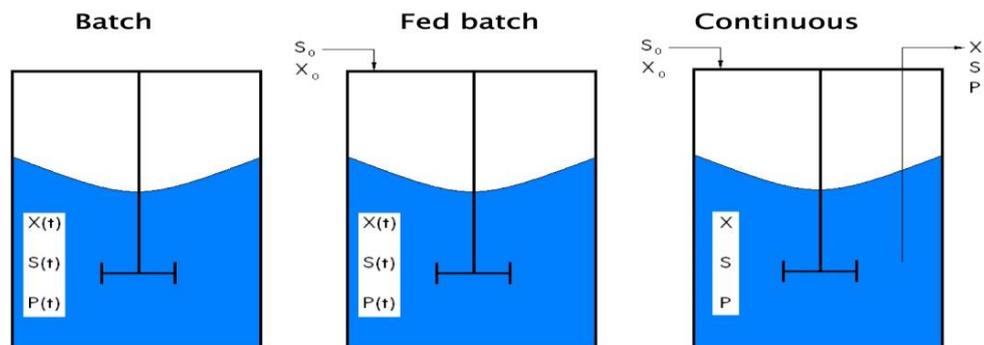


Figura 1. Modos de operación de los biorreactores

Fuente: (Aguilera & Ramírez, 2016)

1.3.2 Biorreactores en el mercado

Teniendo en cuenta la cantidad de tiempo y recursos que una organización invierte en llevar un equipo biológico al mercado, la selección de biorreactores es una de las decisiones cruciales al momento de la adquisición. Los costos de producción juegan un papel vital en la fijación de precios de los productos biológicos, por lo cual cualquier medida de ahorro de costos implementada en la etapa de fabricación de los biorreactores se traduce en ganancias sustanciales (Ladage, 2015).

Los resultados de una encuesta de *Nice Insight* cuantificaron la lenta inducción de biorreactores de un solo uso en el mercado, adicional se preguntó a los encuestados sobre sus preferencias de tecnología de bioreactores y había una preferencia casi igual por dos tipos de reactores: acero inoxidable 68% y reactores desechables de un solo uso 67% (Ladage, 2015). Es necesario conocer los riesgos de citotoxicidad, antes de que los reactores de un solo uso puedan considerarse como una alternativa estándar a los reactores de acero inoxidable; pero, dado el carácter riguroso, metódico y conservador de la industria biofarmacéutica y alimentaria, las técnicas innovadoras tienen que pasar los rigores de las pruebas, las aprobaciones y el tiempo antes de convertirse en un estándar aceptable de funcionamiento (Ladage, 2015).

La selección de biorreactores es un proceso muy personalizado, caso por caso, que depende de múltiples variables; una OCM (Organización Común de los Mercados) puede poseer biorreactores de un solo uso de última generación, pero si se requiere grandes reactores de acero inoxidable de 20.000 L para complementar una instalación similar en la empresa; el estado de la técnica de reactores de un solo uso con capacidad de 250 litros no funcionará; sin embargo, una mezcla de múltiples biorreactores de tanque agitado de uso único de 2000L junto con algunos reactores tradicionales le dará al cliente la confianza en la capacidad de la OCM para cumplir sus metas (Kuehn & Ladage, 2015).

1.3.3 Tendencias 2013 - 2015

Las comparaciones interanuales revelaron que las preferencias de los biorreactores se han fortalecido en los últimos años, particularmente para la tecnología desechable de un solo uso y la tecnología de acero inoxidable más tradicional. En el caso de los reactores desechables de un solo uso, se observó un incremento del 5% en "Strongly Prefer" en los dos años, mientras que la preferencia por la tecnología de acero inoxidable mostró un aumento del 6% en "Strongly Prefer" durante el mismo período (Ladage, 2015), tal como se observa en la **Figura 2**.

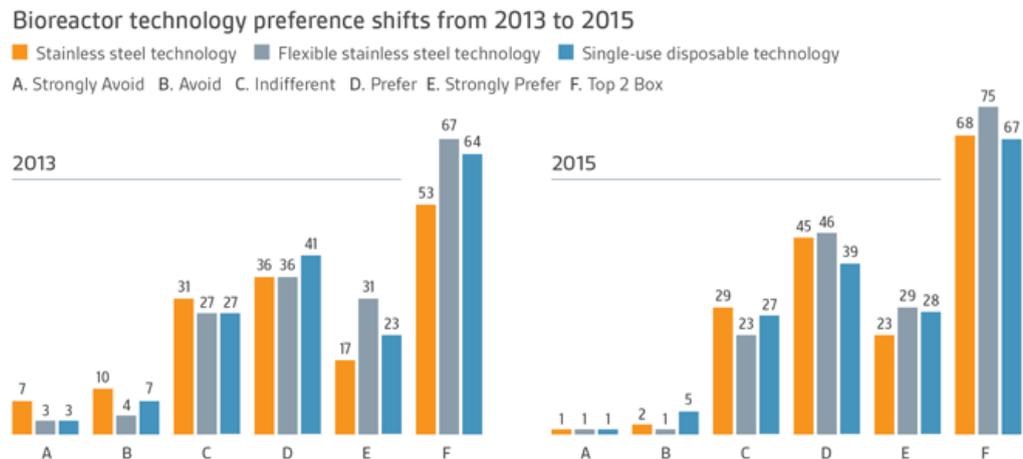


Figura 2. Tendencias 2013 - 2015

Fuente: (Kuehn & Ladage, 2015)

Existen biorreactores en varios tamaños desde la escala de laboratorio de laboratorio 10L a la escala de fabricación comercial de 2000L. Existen biorreactores donde el diseño es similar a un reactor de acero inoxidable tradicional que posee un fermentador de tanque de agitación de un solo uso específicamente para el cultivo microbiano, éste sistema ha estado disponible desde hace algún tiempo y ha demostrado ser exitoso con múltiples líneas de cultivo de células microbianas tales como *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis*.

1.3.4 Características de los biorreactores

Las características básicas del desarrollo de un proceso de fermentación se representan en forma de una curva de crecimiento y medición de los parámetros específicos que caracterizan una biomasa. El crecimiento en un sistema biológico es importante en los procesos de fermentación y se define con el incremento ordenado de todos los componentes químicos. Este crecimiento se puede medir por diversos métodos como peso seco, absorbancia, número de células viables, contador de células, entre otras (Rodríguez & Cabrera, 2003).

Es indispensable que en el diseño y la construcción de un biorreactor se controlen los parámetros antes mencionados. Para el control de temperatura se utilizan comúnmente termocuplas, que son sensores que generan un voltaje muy pequeño del orden de los milivoltios el cual aumenta con la temperatura; por otro lado, se controla el pH mediante el uso de pH-metro que proporciona mediciones exactas (Flores & Velin, 2014).

1.3.5 Principios de diseño de un biorreactor

Los biorreactores son equipos en donde se realizan procesos de cultivo, ya que mantienen un ambiente viable para el crecimiento de los microorganismos. Su diseño debe asegurar la homogeneidad entre los componentes del sistema, las condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado (Ruiz-Leza, Rodríguez-Jasso, Rodríguez-Herrera, Contreras-Esquivel, & Aguilar, 2007). Es importante tomar en consideración los problemas de transferencia de calor y oxígeno sobre el sustrato, ya que dependen de las características de los sustratos que se estén utilizando para la fermentación, siendo este el principal factor que afecta en el diseño y las estrategias de control.

Los criterios más importantes para el diseño de un biorreactor son los siguientes (Ruiz-Leza et al., 2007):

- El tanque debe proporcionar asepsia y hermeticidad el sistema durante los días que dure el proceso, para evitar la aparición de contaminantes durante el mismo.

- Debe proporcionar un adecuado sistema de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.
- Mínimo consumo de energía.
- Poseer entradas para la adición de nutrientes y control de pH y oxígeno.
- Facilitar la transferencia de calor en el medio y mantener estable la temperatura deseada.
- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen del cultivo, por medio de la agitación.
- Suministrar oxígeno a una velocidad que satisfaga el consumo.
- El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente inoculado con el microorganismo.

1.3.6 Parámetros de control

Al tratarse de un biorreactor de tanque agitado, hay diferentes parámetros que requieren lectura, monitoreo, análisis y control.

1.3.6.1 Temperatura

La temperatura es un factor físico muy importante para la mayoría de los cultivos bacterianos y fúngicos, que deben estar entre 25°C y 37°C para que las células puedan crecer satisfactoriamente (Cárdenas, 2013), adicional a esto el biorreactor de tanque agitado diseñado, tiene la ventaja de poder elevar su temperatura por encima de los 100°C lo que permite la esterilización del medio y del equipo.

1.3.6.1.1 Sensor de temperatura pt100

El parámetro temperatura tiene un sensor de estado sólido denominado pt100 o RTD (resistencia dependiente de temperatura), que son elementos semiconductores cuyo valor resistivo cambian en función de la temperatura; entre sus ventajas está una mayor precisión para rangos de temperatura no mayores a 500°C (AlltronicsPeru, 2011).

1.3.6.2 Potencial de Hidrógeno (pH)

Cada microorganismo tiene un pH al que se puede desarrollar de manera óptima, por lo cual se requiere de un sensor de pH que sea capaz de obtener mediciones precisas y confiables (López, 2013).

Pequeñas variaciones de pH afectan el crecimiento celular, lo que lleva al uso de reguladores, que permitan mantener el pH dentro de un rango óptimo para cada tipo de célula. El pH alto inhibe el metabolismo celular y la síntesis de proteínas, lo cual afecta el crecimiento celular. También, cuando la acción reguladora del tampón es afectada por la concentración de sus componentes o por los residuos del metabolismo de las células, el pH del medio disminuye produciendo estrés y afectando el funcionamiento celular.

1.3.6.2.1 Bombas peristálticas

Para evitar las variaciones de pH dentro del biorreactor, es necesario tener reguladores de pH, como bombas peristálticas que proporcionan excelentes medidas de bombeo, especialmente cuando el producto que se bombea tiene características particulares (ácido – base).

Las bombas peristálticas basan su funcionamiento en girar 2 rodillos en un compartimento circular comprimiendo de forma progresiva una manguerita especial flexible, por el cual va avanzando el contenido dentro de la misma, tal como se muestra en la **Figura 3**. Entre los beneficios de las bombas peristálticas está el volumen que envía el sistema hasta equilibrar el medio, además del mantenimiento de las mismas ya que posee mangueritas que pueden esterilizarse fácilmente y evita la contaminación del medio.

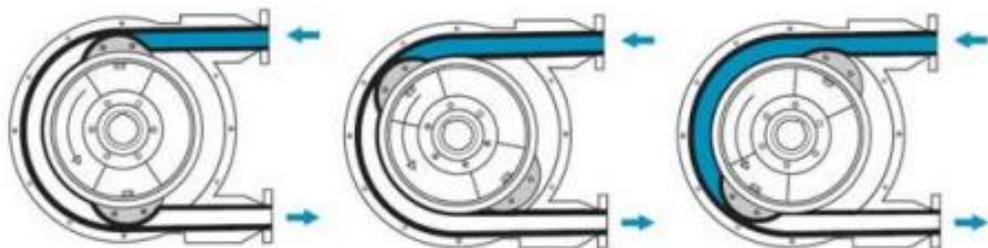


Figura 3. Secuencia de funcionamiento de una bomba peristáltica

Fuente: (López, 2013)

1.3.6.3 Oxígeno disuelto (OD)

El oxígeno disuelto es uno de los sustratos indispensables en el metabolismo de las células. Pruebas “*In vitro*” han demostrado que la concentración de oxígeno en el medio, influye directamente en el crecimiento (Cárdenas, 2013).

En el biorreactor, la transferencia de oxígeno se ve afectada por las propiedades físicas tanto del medio de cultivo como del gas utilizado para aportar el oxígeno, las dimensiones del biorreactor, las condiciones de operación, el tipo de microorganismo cultivado y la tasa de consumo de oxígeno por los microorganismos para el crecimiento, mantenimiento y producción de metabolitos y estructuras celulares (Buitrago, Otálvaro, & Duarte, 2013), por tal motivo, es necesario implementar un sistema de aireación eficiente.

En cuanto a los sistemas de distribución de aire, se ha planteado el uso de bombas de aire para los cultivos de microorganismos, debido a que tiene la ventaja de generar burbujas de menor diámetro, incrementando el área de contacto entre las burbujas y el medio líquido, favoreciendo así la velocidad de transferencia de oxígeno.

1.3.6.4 Agitación

La agitación es la que se encarga de generar estímulos físicos que permitan el acceso a reguladores y nutrientes hacia las células, siendo la velocidad de agitación óptima para el crecimiento bacteriano menor a 120 RPM; además la agitación afecta la homogeneidad del acceso a nutrientes, como la eliminación de los residuos metabólicos celulares y determina la calidad y uniformidad de los productos obtenidos e interviene directamente en la transferencia de masa entre la fase gaseosa y la fase líquida (Cárdenas, 2013).

1.3.7 Tipos de biorreactores

Existe una gama de biorreactores, pero entre estos destacan tres tipos de biorreactores:

- Biorreactor air-lift: es muy similar al biorreactor de columna de burbujeo, requiere la expansión del gas introducido a la misma temperatura que se encuentra el líquido, manteniendo una mezcla homogénea. Este tipo de biorreactor induce la circulación del líquido, tal como se muestra en la **Figura 4** y gases logrando una excelente mezcla, lo cual es ideal para organismos que requieren un alto nivel de transferencia de oxígeno.

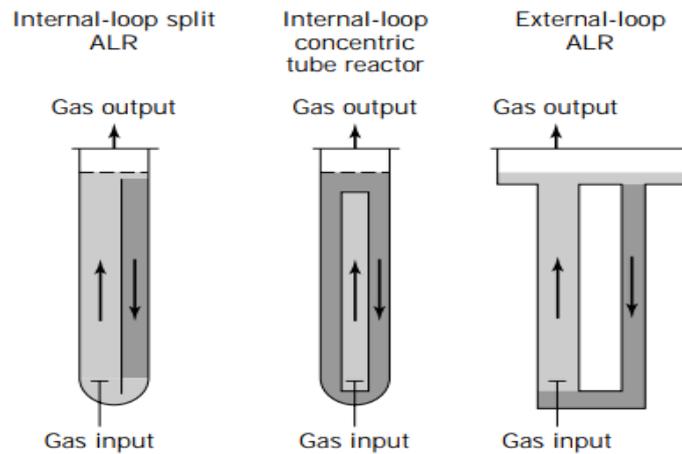


Figura 4. Biorreactor tipo air-lift

Fuente:(Merchuk & Gluz, 2012)

- Biorreactor de torre: aprovecha la presión hidrostática que ejerce la columna de agua y se caracteriza por tener una altura significativa en relación con el diámetro del mismo y son utilizados en cultivos continuos y heterogéneos.
- Biorreactor con agitación mecánica: es el más utilizado debido a su fácil funcionamiento y confiabilidad; constan de un soporte de acero inoxidable, fijado en la tapa o en su base que tiene un sistema de agitación (Flores & Velín, 2014). Los cambios asociados en los diseños de los biorreactores de acero inoxidable se han basado en su interior, es decir, en el diseño de nuevos impulsores, dispersores de aire, deflectores y en la adquisición y control de las variables del proceso tal como se observa en la **Figura 5**.

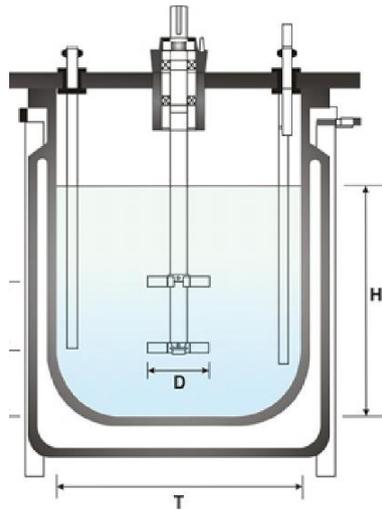


Figura 5. Biorreactor con agitación mecánica STR

Fuente: (Nunez-Ramirez, 2012)

1.3.8 Productos de interés industrial

Existe una gran variedad de productos de interés industrial que pueden desarrollarse en el biorreactor como: emulsionantes, antimicrobianos, encapsulantes, péptidos bioactivos, antihipertensivos, antioxidantes, enzimas, conservantes, vitaminas, biotensoactivos y cultivos estériles (iniciadores), siendo estos dos últimos de gran importancia para la industria de alimentos, los cuales se detallan a continuación.

1.3.8.1 Biotensoactivos

Los tensoactivos o surfactantes son productos químicos de bajo peso molecular que cambian las propiedades del agua y otros fluidos, además son moléculas anfifílicas que reducen la tensión superficial en la interfase del sistema agua-aire o agua-aceite, que pueden llegar a disminuir la tensión superficial del agua de 72 a 35mN/m (Shoeb, Akhlaq, Badar, Akhter, & Imtiaz, 2013), además ayudan a la formación de emulsiones entre diferentes líquidos (Jiménez et al., 2010).

Los tensoactivos son compuestos químicos muy importantes que se utilizan en una variedad de productos con un volumen muy alto debido a sus aplicaciones domésticas e industriales; pero pese a todas sus ventajas, su

liberación al medio ambiente puede ser un peligro potencial, ya que casi todos los tensoactivos sintéticos químicamente son derivados del petróleo, motivo por el cual han sido reemplazados por biotensoactivos.

Los biotensoactivos son tensoactivos de origen biológico que son producidos por bacterias, hongos y levaduras. El enorme potencial comercial y sanitario de los biotensoactivos y la demanda actual del mercado con alternativas competitivas y eco – amigables, ha llevado a diversas investigaciones con el aislamiento y detección de microorganismos productores de biotensoactivos (Shoeb et al., 2013). Por lo tanto, los biotensoactivos son elección natural sobre los tensoactivos sintetizados químicamente y son preferidos sobre los tensoactivos sintéticos para la amplia gama de aplicaciones industriales en biorremediación, salud, cosméticos, petróleo y procesamiento de alimentos

Las principales funciones de los biotensoactivos son:

- Capacidad para emulsificar y solubilizar compuestos insolubles en fases acuosas, como son los hidrocarburos, facilitando la disponibilidad de estos sustratos para el crecimiento y mantenimiento de los microorganismos (Jiménez et al., 2010).
- Adherencia y liberación de células en superficies (Islas et al., 2010).
- Facilitar el transporte de hidrocarburos a nivel de membrana, función atribuida a los biotensoactivos del tipo glicolipídico ligados a membrana celular (Islas et al., 2010).
- Actividad antibiótica, la que ha sido demostrada por varios biotensoactivos, producto del *Bacillus subtilis*, los cuales presentan actividad como antibióticos, lo que les permite solubilizar los principales componentes de las membranas celulares microbianas y les brinda una mayor oportunidad de supervivencia en nichos con una alta competitividad por nutrientes (Jiménez et al., 2010).

1.3.8.1.1 Clasificación y naturaleza química de los biotensoactivos

Los biotensoactivos se pueden clasificar según su estructura química y su origen microbiano, y se clasifican en dos categorías (**Tabla 1**): alto peso molecular (polímeros y partículas surfactantes o tensoactivas) y bajo peso molecular (glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos).

Tabla 1. Clasificación de los biotensoactivos

| Clasificación de los biotensoactivos | | |
|--|-------------------------------|---|
| Biotensoactivos de bajo peso molecular | Glicolípidos | <ul style="list-style-type: none"> • La mayoría son de naturaleza glicolípida. • Son carbohidratos que combinan con ácidos alifáticos de cadena larga que se enlazan con ésteres. • Los glicolípidos más conocidos son ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos. |
| | Lipopéptidos | <ul style="list-style-type: none"> • Consisten en un gran número de lipopéptidos cíclicos unidos a un ácido graso. • Se caracterizan por existir varias bacterias para producir estas moléculas, por ejemplo <i>Bacillus subtilis</i>, que puede reducir la tensión superficial de 72,8 a 27,9 mN/m a una concentración de 0,005%; además es antibacteriano, antiviral y antifúngico. |
| | Fosfolípidos | <ul style="list-style-type: none"> • Producidos por varias bacterias y levaduras durante el crecimiento sobre los alcanos, que produce una sustancia como fosfatidiletanolamina que disminuye la tensión interfacial entre el agua y hexadecano a menos de 1mN/m y una concentración crítica micelar (CMC) de 30 mg/litro. |
| Biotensoactivos de alto peso molecular | Biotensoactivos poliméricos | <ul style="list-style-type: none"> • Se obtienen de varios componentes conocidos como emulsan y liposan. |
| | Partículas de biotensoactivos | <ul style="list-style-type: none"> • Dividen los hidrocarburos para formar una microemulsión que juega un papel muy importante en la captación de alcanos por las células microbianas. |

Fuente: (Shoeb et al., 2013)

1.3.8.1.2 Biotensoactivos en la industria de alimentos

Los biotensoactivos son compuestos biocompatibles, biodegradables y no tóxicos que tienen la combinación de características particulares que presentan una variedad de aplicaciones en la industria alimentaria especialmente como emulsionantes, espumantes, humectantes, solubilizantes y agentes antimicrobianos (Shoeb et al., 2013).

- *Emulsificante de alimentos*

Los biotensoactivos cubren las gotitas de aceite y forman emulsiones muy estables (aceite/agua) que normalmente no se unen, lo cual es muy útil para la industria de alimentos.

- *Estabilizador de alimentos*

Los biotensoactivos actúan como control de la consistencia en las formulaciones de panadería y helados, además se utiliza como estabilizante de grasa y agente antiespumante durante la cocción de aceite y agua.

En elaboración de alimentos, la adición de ramnolípidos mejora la textura y vida útil de los productos que contienen almidón, modifican las propiedades reológicas y la estabilidad del trigo (Fait, Garrote, Clapés, & Morcelle, 2012). Además se utiliza para controlar la aglomeración de los glóbulos de grasa y mejorar la textura de los productos a base de grasa.

- *Actividad anti-adhesiva*

La actividad anti-adhesiva del biotensoactivo se utiliza para inhibir los biofilms formados en la superficie de contacto de los alimentos con las bacterias; estas bacterias son potenciales fuentes de contaminación, lo que conduce al deterioro de los alimentos, es por eso que los biotensoactivos controlan la adherencia de los microorganismos proporcionando así productos más seguros y de calidad para los consumidores.

1.3.8.2 Importancia de los cultivos estárter (iniciadores)

Los cultivos iniciadores han sido desarrollados con el objeto de reducir el tiempo de fermentación y consiste en una especie o combinación de especies microbianas que una vez agregados a un producto, se transforman y dan como resultado un cambio de la textura, color y flavor del producto final, incrementando su poder de conservación y en ocasiones beneficios para la salud del consumidor como los probióticos (Cabeza Herrera, 2006). Los microorganismos empleados como cultivos estárter pueden ser bacterias, levaduras y mohos individualmente o una mezcla de ellos (bacteria-bacteria; bacteria-levadura; bacteria-moho; moho-moho; moho-levadura; levadura-levadura).

1.3.8.2.1 Seguridad, funcionalidad y propiedades tecnológicas

Las bacterias más prometedoras como cultivos iniciadores son aquellas que se aíslan de la microbiota nativa de los productos tradicionales; estos microorganismos se adaptan a las condiciones medioambientales que ofrece el sustrato y son capaces de controlar y sobreponerse a la microbiota alterante de los productos (Cabeza Herrera, 2006).

Para la selección de cepas con potencial actividad como cultivo iniciador, debe reunir un conjunto de características (Cabeza Herrera, 2006).

- Evaluar y disponer de información experimental suficiente sobre su metabolismo y actividades, ya que en algunos casos su efecto sobre los sustratos puede ser limitado, en otros casos solo se manifiesta a muy alta concentración de bacterias, y en algunos el efecto no existe.
- Que estén reconocidos como GRAS.
- Deberá tener una producción viable y a gran escala.
- Durante su uso y almacenamiento deberán ser estables.

Se debe realizar una correcta selección, conservación y manejo de los cultivos iniciadores, para estandarizar y mantener una calidad uniforme del producto final.

Los cultivos iniciadores se presentan de diversas formas tal como se observa en la **Figura 6** y los principales grupos empleados son (Cabeza Herrera, 2006):

- Bacterias de utilidad en la industria láctea, cárnica, vegetales y cereales: bacterias ácido-lácticas homo y heterofermentativas (BAL) de las familias *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae*; bacterias acéticas de la familia *Acetobacteriaceae*; bacterias reductoras de nitratos como *Micrococcus spp* y *Staphylococcus spp*, entre otras.
- Levaduras de los géneros *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. boulardii*), *Cándida* (*C. utilis*), *Debaryomyces* y *Kluyveromyces* (*K. fragilis*) para cervecería, vinificación, destilería, panificación y elaboración de alimentos orientales a base de cereales (arroz y soja).
- Mohos de los géneros *Penicillium spp*, *Aspergillus spp*, *Rhizopus spp*, *Geotricium spp.*, para elaboración de quesos, productos de repostería y alimentos orientales a base de cereales (arroz y soja).



Figura 6. Diversas formas de presentación de cultivos iniciales

Fuente: (Cabeza Herrera, 2006)

1.3.8.2.2 Aplicaciones

Producción de alcohol para la industria vinícola y cervecera

Las cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de fermentación alta ya que sube a la superficie al final de la fermentación se emplea para la producción de cerveza a una temperatura de 15-32°C. Por otra parte *Saccharomyces uvarum* de fermentación baja, que cae al fondo de la cuba al final de la fermentación se emplea para la obtención de cerveza a temperaturas de 15°C.

Producción de pan ácido

Intervienen levaduras de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Cándida krusei*, *Cándida tropicalis*, *Torulopsis holmii* y bacterias ácido-lácticas.

Producción de derivados lácteos (yogurt y quesos)

Se emplea *Penicillium camemberti* para la elaboración de quesos de pasta blanda como el Camember o Brie. Durante la maduración de estos quesos el *Penicillium* consume el ácido láctico producido por las BAL desacidificando la cuajada, además producen sustancias que modifican el sabor y aroma de los diferentes quesos. *Penicillium roqueforti* es empleado en la producción de los denominados quesos de pasta azul como el queso roquefort, Gorgonzola o Danés. Este moho se suele añadir a la leche antes del cuajado, aunque algunas veces se incorpora a la cuajada en el momento del moldeado.

Producción de embutidos

Se obtiene por la acción de las bacterias ácido-lácticas, pero también se emplean algunas levaduras como *Debaryomyces hansenii*, *Candida deformans*) y mohos (*Penicillium commune*, *Penicillium nalgiovense* o *Scopulariopsis flava* en la elaboración de salchichón y salamis para lograr la capa blanca que recubre la superficie de estos productos. Por otro lado, también aportan modificaciones del sabor y olor en estos productos por actividad de sus enzimas lipolíticos y proteolíticos.

Producción de vegetales fermentados

En este tipo de productos participan activamente las BAL (Bacterias ácido-lácticas) como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus rhamnosus* y *Pediococcus cerevisiae*.

Producción de vinagre

Las bacterias acéticas son importantes para la producción de vinagre, sin embargo para la producción de vinagre es mejor utilizar cepas que no se han obtenido de cultivos puros, ya que la conservación de la capacidad de estas cepas para la fermentación se ve reducida cuando se mantienen en cultivos, por lo que la venta y comercialización de este tipo de cultivo estárter está muy limitada. Las principales bacterias empleadas en esta industria pertenecen a la familia *Acetobacteriaceae*.

1.3.9 Procesos fermentativos

El crecimiento en un sistema biológico es el incremento de todos los componentes químicos. Dicho crecimiento es de suma importancia en los procesos de fermentación, ya que al mantenerse controlado el crecimiento, también se controla la producción del metabolito de interés. Todo cultivo de microorganismo pasa por diversas fases en el proceso de fermentación: la fase de latencia, exponencial, estacionaria y muerte como se muestra en la **Figura 7**.

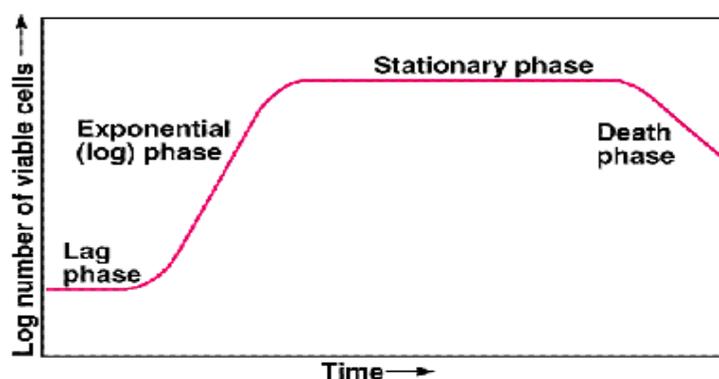


Figura 7. Curva de crecimiento de un cultivo en batch

Fuente: (Rodríguez & Cabrera, 2003)

1.3.9.1 Medición del crecimiento microbiano (biomasa)

Cuando usamos el término biomasa nos referimos a la cantidad de masa de material vivo y se expresa como gramos o calorías por ml o g de muestra. Una de las variables más importantes de los bioprocesos es la determinación de la biomasa, debido a que nos ofrece un panorama más claro de la eficiencia del proceso (Arnáiz, Isac, & Lebrato, 2000), y se puede medir o cuantificar el crecimiento por medio de métodos como: peso seco, absorbancia, número de células viables, contador de células, etc.

1.3.9.1.1 Peso en seco

La medición del peso seco de las células es un método directo de cuantificar la biomasa, consiste en separar las células del medio, filtrándolas con papel filtro con poros en la medida de micrómetros; para luego secar dichos filtros y pesar (Arnáiz et al., 2000). Una de las desventajas de este método es que es largo y no tan preciso como se desearía, es por ello que se requieren balanzas con precisiones de menos de 1 mg. Además de no ser un método selectivo, debido a que determina tanto las células muertas como las viables.

1.3.9.1.2 Turbidimetría (Absorbancia)

La turbidimetría determina la cantidad de luz dispersada por una suspensión de células, se basa en el hecho de que las partículas pequeñas dispersan la luz de manera proporcional a su concentración (Zorreguieta, Pettinari, & Alché, 2016).

Estudios teóricos y experimentales han mostrado que soluciones diluidas de diferentes tipos de bacterias, independientemente del tamaño celular, tienen casi la misma absorbancia por unidad de concentración de peso seco; esto quiere decir que, en soluciones diluidas, la absorbancia es directamente proporcional al peso seco, independientemente del tamaño celular del microorganismo (Arana, Orruño, & Barcina, 2016). Sin embargo, se encuentran absorbancias muy diferentes por partícula o por UFC, cuando los tamaños de las células bacterianas son diferentes. Por esta razón, para estimar el número de microorganismos totales o el número de

microorganismos viables de una suspensión bacteriana debe realizarse una "curva de calibración" con cada tipo de microorganismo, sólo de esta forma es posible relacionar absorbancia con el número de microorganismos totales o con UFC.

1.3.9.1.3 Determinación de ácidos nucleicos

Determina de manera indirecta la masa de una población bacteriana y la cantidad existente de un determinado ácido nucleico DNA y a partir de este dato se estima la masa de la población (Zorreguieta et al., 2016).

1.3.9.1.4 Determinación de nitrógeno

Determina de manera indirecta la masa de una población bacteriana; y hay diferentes maneras para determinar la cantidad de nitrógeno que contiene una muestra con relación al compuesto que se quiera determinar. Puede analizarse el nitrógeno no proteico mediante el NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , el nitrógeno proteico mediante absorción en UV, reacción de Biuret, reacción de Lowry, o el nitrógeno total mediante la digestión de Kjeldahl (Zorreguieta et al., 2016).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA DE DISEÑO

2.1 Producción en laboratorio

La producción del biotensoactivo en el laboratorio se realiza a pequeña escala y es necesario realizarla como un paso previo a la validación del prototipo del biorreactor, para poder calcular cualitativamente el tiempo y la producción (Jiménez et al., 2010).

2.1.1 Producción de biotensoactivo

La producción del biotensoactivo inicia con la preparación del medio basal mineral con un volumen de 600ml, detallado en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Composición del medio basal – mineral

| <i>Volumen total = 600ml</i> | |
|---------------------------------------|------|
| Dextrosa | 1% |
| Extracto de levadura | 0.1% |
| Sales: | |
| • NaNO ₃ | 2% |
| • Na ₂ HPO ₄ | 2% |
| • FeSO ₄ 7H ₂ O | 2% |
| • KH ₂ PO ₄ | 2% |
| • MgSO ₄ 7H ₂ O | 1% |
| • CaCl ₂ | 0.1% |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017

Elaboración propia

La dextrosa y extracto de levadura, se colocaron en fiolas con agua, las sales minerales en frascos separados para ser autoclavados. Además en el autoclave se colocan los materiales, fiolas de agua salina y agar nutritivo. Una vez estériles todos los materiales, dentro de la cámara de flujo se colocan las sales minerales en las fiolas.

Luego se resembró la bacteria y se inoculó el medio basal mineral con el 2% de una suspensión bacteriana a 2 grados en la escala de Mc. Farland, que fue medida en el Densimat. Las fiolas inoculadas se incuban con agitación a 120 RPM por 24 horas a 30°C.

2.1.2 Recuperación del biotensoactivo

El contenido de las fiolas previamente inoculadas e incubadas, se dispensan en tubos Falcon de 50ml, que se centrifugaron a 5000RPM a 4°C por 15 minutos. El sobrenadante libre de microorganismos se coloca en tubos Falcon de 50ml vacíos y se agrega a cada tubo 0.5ml de ácido clorhídrico (HCl) concentrado al 37%, y se conserva a 10°C por 24 horas; mientras que el pellet (bacteria) se desecha.

Pasado este tiempo, los tubos refrigerados se centrifugan a 5000RPM a 4°C por 15 minutos para poder diferenciar dos fases, el sobrenadante se desecha y el pellet se coloca en viales previamente pesados y se dejó secar a 60°C hasta alcanzar peso constante para poder obtener el biotensoactivo en extracto crudo.

2.1.3 Medición de la tensión superficial

El sobrenadante libre de microorganismos se utilizó para medir la tensión superficial, se colocaron 10ml en el recipiente y se mide la característica mencionada en el tensiómetro manual de fuerza (**Figura 8**) por el método del anillo Du Noüy.



Figura 8. Tensiómetro manual de fuerza

Fuente: (Banat, 1997)

2.2 Balance de materias primas

En la **Tabla 3** se presenta detalladamente la cantidad de cada uno de los medios necesarios para la producción de biotensoactivos.

Tabla 3. Medio basal – mineral

| MEDIO BASAL - MINERAL | | | | | |
|-----------------------|---|---------|---------|----------|-----------------|
| Materia prima | | Volumen | | | |
| Detalle | Relaciones | 600 ml | 1000 ml | 12000 ml | |
| Dextrosa | | 10 g/L | 6 g | 10 g | 120 g |
| Extracto de levadura | | 1 g/L | 0,6 g | 1 g | 12 g |
| Sales | 1 (NaNO ₃) 100x | 1% | 6 ml | 10 ml | 120 ml |
| | 2 (KH ₂ PO ₄) 100x | 1% | 6 ml | 10 ml | 120 ml |
| | 3 (Na ₂ HPO ₄) 100x | 1% | 6 ml | 10 ml | 120 ml |
| | 4 (MgSO ₄ .7H ₂ O) 100x | 1% | 6 ml | 10 ml | 120 ml |
| | 5 (CaCl ₂) 1000x | 0,1% | 1 ml | 1 ml | 12 ml |
| | 6 (FeSO ₄ .7H ₂ O) 100x | 1,0% | 6,0 ml | 10 ml | 120 ml |
| | *Total Sales: | | | 30,6 ml | 51 ml |
| Preinóculo | | | | 49 ml | 388 ml |
| Agua | | | 569 ml | 900 ml | 11000 ml |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

2.3 Biorreactor

El biorreactor que se diseñará y construirá es un biorreactor tipo STR (Stirred Tank Bioreactor) ya que se va a realizar un proceso en batch y este tipo de biorreactor ofrece altas tasas de transferencia de oxígeno requeridas para la alta productividad de biomasa, además de que su bajo costo de inversión inicial. El tanque agitado del biorreactor es un cilindro vertical que posee deflectores o baffles para prevenir la formación de vórtices durante la agitación. El eje vertical lleva una o varias hélices en función de la relación altura/diámetro que son de 1:3 a 1:6. Posee una gran versatilidad para ser usado a cualquier escala de producción y para un gran número de procesos sin necesidad de modificar el diseño.

2.3.1 Parámetros de control

El biorreactor diseñado controla 4 parámetros necesarios para el crecimiento microbiano, como temperatura, potencial de hidrógeno (pH), oxígeno disuelto (OD) y agitación. Por otro lado, en la **Tabla 4** se detallan los parámetros óptimos necesarios para el crecimiento microbiano:

Tabla 4. Parámetros óptimos del *Bacillus subtilis*

| Parámetro | Rango | Óptimo |
|-----------------------------|------------------|---------------|
| Temperatura | 35°C – 40°C | 37°C |
| Potencial de Hidrógeno (pH) | 6 - 7 | 6.5 |
| Oxígeno disuelto (OD) | Min: 2ppm (mg/L) | > 2ppm (mg/L) |
| Agitación | 100 – 130 RPM | 120RPM |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

2.4 Validación del prototipo

El presente proyecto se trata de un modelo físico verificable mediante ensayos de laboratorio y experimentación prueba – error, las cuales se pondrán en marcha para poder validar cada uno de los parámetros indispensables para el crecimiento del microorganismo.

2.4.1 Validación de esterilidad

La validación de esterilidad es muy importante para poder descartar posibles contaminaciones durante el trabajo en el biorreactor y la manipulación por parte del operador. La metodología para la validación de esterilización inicia con la carga del biorreactor con 12 litros del medio basal – mineral, y se esterilizó a 100°C por 15 minutos, para luego mantener el medio a 37°C en donde se inoculan las sales 612ml, para poder obtener el medio basal – mineral, todo esto a 120RPM. Seguido de esto se toma una muestra y se mantiene el biorreactor durante 24 horas bajo los siguientes parámetros:

- Agitación: 120RPM

- Temperatura: 37°C
- pH: 6,5
- Oxígeno disuelto > 2ppm (mg/L)

Después de las 24 horas se toma otra muestra para verificar la esterilidad, en primera instancia se analiza si hay o no contaminación con un cambio de turbidez (cambio de coloración).

2.4.2 Validación del parámetro temperatura

Primera validación

Se realizaron pruebas para validar el parámetro temperatura del prototipo, en donde se trabajó con una capacidad volumétrica de 10 litros de agua, con la finalidad de llevar dicho volumen a 30°C.

Segunda validación

Luego de los errores encontrados y corregidos, se continuó con la validación, pero con una variación de la capacidad volumétrica de 10 a 12 litros de agua, en la cual se tomaron datos cada 5 minutos, elevando su temperatura hasta 30°C.

Tercera validación

La presente validación de temperatura se realizó con agua potable, en donde se trabajó con una capacidad volumétrica de 12 litros, para llevar a cabo el proceso de calentamiento, retención y enfriamiento.

Cuarta validación

Se realizó otra validación de temperatura, así también con agua potable, en donde se trabajó con una capacidad volumétrica de 12 litros, para llevar a cabo el proceso de calentamiento, retención y enfriamiento, corrigiendo los errores encontrados en las validaciones anteriores.

Quinta validación

Se realizó otra validación de temperatura, con medio basal mineral en donde se trabajó con una capacidad volumétrica de 12 litros, para llevar a cabo el proceso de calentamiento, retención y enfriamiento.

2.4.3 Validación de los parámetros temperatura y pH

Se realizaron pruebas para validar el parámetro temperatura y pH del prototipo, con la producción de biotensoactivos, a partir de *Bacillus subtilis*, en donde se trabajó con una capacidad volumétrica de 12 litros del medio basal – mineral, en donde se esterilizó el medio, es decir se elevó la temperatura a 100°C por 15 minutos para evitar la contaminación del medio y su descenso de temperatura posterior hasta los 37°C para el crecimiento de *Bacillus subtilis*.

Adicional a esto, se realizaron pruebas estadísticas para analizar la normalidad, cartas de control y capacidad del proceso.

2.4.4 Validación de los parámetros temperatura, pH y OD

Para esta prueba se trabajó con levadura para la producción de cultivos iniciadores, a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, en donde se trabajó con una capacidad volumétrica de 12 litros del medio de cultivo que se detallan en la **Tabla 5**, en donde se esterilizó el medio a 100°C por 15 minutos y para luego descender la temperatura a 30°C para el crecimiento del microorganismo.

Tabla 5. Medio de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*

| LEVADURA (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | | | | | |
|--|---------------|---------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|
| Volumen total del medio (batch) = | | | 12000 ml | | |
| Reactivo | Concentración | Concentración final | Masa Final (12000 ml) | Gramos a pesar en 240 ml | Volumen por batch |
| Sal 1: (NH ₄) ₂ SO ₄ | 100 x | 5.10 g/L | 61.2 g | 122.4 g | 120 mL |
| Sal 2: KH ₂ PO ₄ | 100 x | 4 g/L | 48 g | 96 g | 120 mL |
| Sal 3: MgSO ₄ 7H ₂ O | 100 x | 0.21 g/L | 2.5 g | 5 g | 120 mL |
| <i>Total de Sales:</i> | | | | | 360 mL |
| Sacarosa | | 10 g/L | 120 g/L | | |
| Extracto de levadura | | 1 g/L | 12 g/L | | |
| Agua | | | | | 11640 ml |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

2.4.5 Validación final del equipo

Una vez corregido todos los errores arrojados en las validaciones anteriores, se procedió con la validación final de los parámetros temperatura, pH y OD, con la producción del biotensoactivo a partir de *Bacillus subtilis*, en donde se trabajó con una capacidad volumétrica de 12 litros del medio basal – mineral, en donde se esterilizó el medio, es decir se elevó la temperatura a 100°C por 15 minutos para evitar la contaminación del medio y su descenso de temperatura posterior hasta los 37°C para el crecimiento microbiano.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

3.1 Análisis de la validación de esterilidad

Con los datos recolectados y analizados se denota que la turbidez se mantenía igual para el tiempo cero, 12 y 24 horas, es decir no hubo cambio de coloración, además de los resultados de absorbancia se mantenían iguales (absorbancia= 0,007), lo cual demuestra esterilidad para 24 horas de funcionamiento continuo.

Los resultados garantizan la fiabilidad del biorreactor para su uso en fermentaciones con cultivos puros, sin riesgo potencial de contaminación, siempre y cuando garanticen aspectos claves como la correcta limpieza del equipo, el correcto autoclavado de todos los componentes del sistema y los cuidados generales en la manipulación de los inóculos y toma de muestras. Por otra parte, la hermeticidad del sistema, depende de su correcto ensamblaje, que permite el mantenimiento de una presión positiva en el interior del tanque, requisito indispensable para evitar la entrada de contaminantes.

3.2 Análisis de la validación de temperatura

Primera validación

En la **Tabla 6** se muestran los datos recolectados y en la **Gráfica 1**, se muestra la curva temperatura vs tiempo.

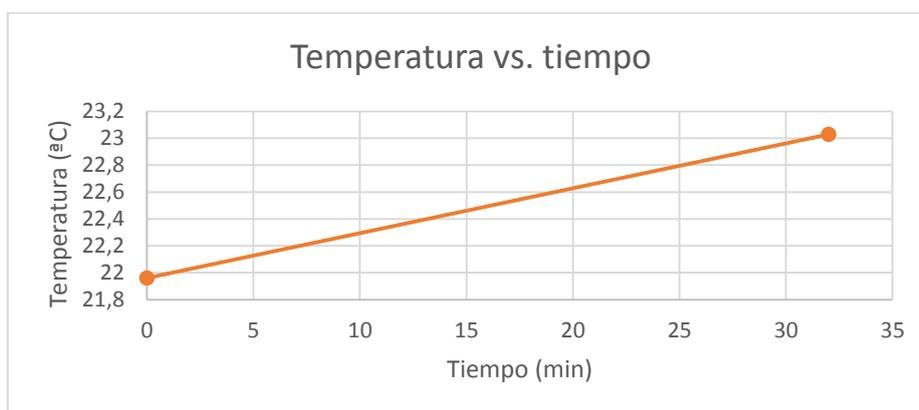
Tabla 6. Datos primera validación temperatura

| <i>Hora</i> | <i>Tiempo (min)</i> | <i>Temperatura (°C)</i> | ΔT |
|-------------|---------------------|-------------------------|------------|
| 17:47 | 0 | 21,96 | 0,00 |
| 18:19 | 32 | 23,03 | 1,07 |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Gráfico 1. Primera validación – Curva Temperatura vs. tiempo



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Con los datos recolectados, es posible notar el incremento temperatura de 1,07°C en 32 minutos, lo cual no es favorable debido al prolongado tiempo de espera; además en la gráfica adjunta se observa la curva temperatura vs tiempo de la primera validación realizada la cual tenía errores, entre ellos la distancia de la resistencia eléctrica térmica y la base del biorreactor era de 1cm, lo que provocaba una lenta transmisión de calor entre estos, al mismo tiempo que no se había encendido el motor de agitación.

Segunda validación

En la **Tabla 7** se muestran los datos recolectados y el **Gráfica 2** se muestra la curva temperatura vs tiempo.

Tabla 7. Datos segunda validación temperatura

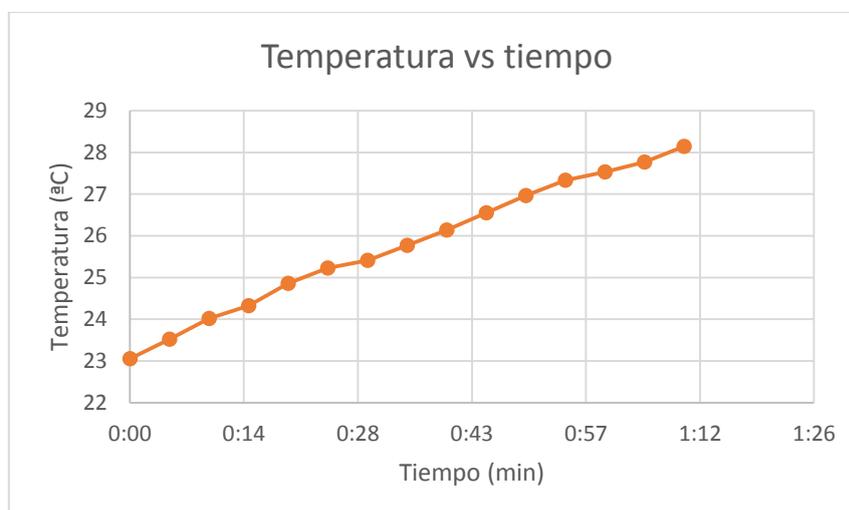
| Tiempo (min) | Temperatura (°C) | ΔT |
|--------------|------------------|------------|
| 0:00 | 23,05 | 0 |
| 0:05 | 23,52 | 0,47 |
| 0:10 | 24,02 | 0,50 |
| 0:15 | 24,32 | 0,30 |
| 0:20 | 24,86 | 0,54 |
| 0:25 | 25,23 | 0,37 |
| 0:30 | 25,41 | 0,18 |
| 0:35 | 25,77 | 0,36 |

| | | |
|------|-------|-------|
| 0:40 | 26,14 | 0,37 |
| 0:45 | 26,55 | 0,41 |
| 0:50 | 26,96 | 0,41 |
| 0:55 | 27,33 | 0,37 |
| 1:00 | 27,53 | 0,20 |
| 1:05 | 27,77 | 0,24 |
| 1:10 | 28,14 | 0,37 |
| 1:15 | FALLA | FALLA |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Gráfico 2. Segunda validación – Curva Temperatura vs. tiempo



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Con los datos recolectados, es posible notar el incremento de temperatura de 5,09°C en 1 hora 10 minutos, pero el proceso tuvo de detenerse debido a fallas en el agitador; además en la gráfica adjunta se observa la curva temperatura vs tiempo de la validación realizada y corregida, una de estas correcciones es la distancia de la resistencia eléctrica térmica y la base del biorreactor, en donde ahora se encontraban en contacto para mejorar la transmisión de calor y con ayuda de la agitación se pudo homogeneizar dicho calor. Por otro lado, es posible notar la existencia de una relación directamente proporcional, ya que incrementa la temperatura de manera casi constante.

Tercera validación

En la **Tabla 8** se muestran los datos recolectados y en la **Gráfica 3**, se muestra la curva temperatura vs tiempo.

Tabla 8. Datos tercera validación temperatura

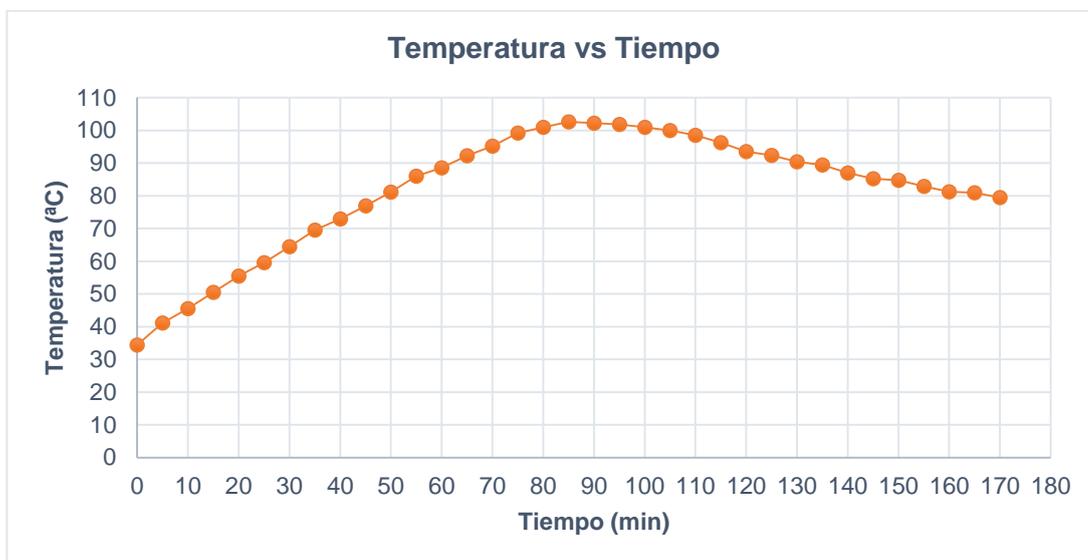
| TIEMPO (min) | TEMPERATURA (°C) | ΔT | OBSERVACIONES |
|--------------|------------------|------------|--|
| 0 | 34,37 | | Calentamiento |
| 5 | 41,1 | 6,73 | |
| 10 | 45,53 | 4,43 | |
| 15 | 50,5 | 4,97 | |
| 20 | 55,5 | 5 | |
| 25 | 59,59 | 4,09 | |
| 30 | 64,49 | 4,9 | |
| 35 | 69,54 | 5,05 | |
| 40 | 72,91 | 3,37 | |
| 45 | 76,98 | 4,07 | |
| 50 | 81,13 | 4,15 | |
| 55 | 86,05 | 4,92 | |
| 60 | 88,58 | 2,53 | |
| 65 | 92,26 | 3,68 | |
| 70 | 95,22 | 2,96 | |
| 75 | 99,25 | 4,03 | |
| 80 | 100,99 | 1,74 | |
| 85 | 102,64 | 1,65 | Mantenimiento / Retención |
| 90 | 102,23 | -0,41 | |
| 95 | 101,82 | -0,41 | |
| 100 | 100,99 | -0,83 | Enfriamiento |
| 105 | 99,98 | -1,01 | |
| 110 | 98,52 | -1,46 | |
| 115 | 96,24 | -2,28 | Se colocaron fundas de hielo (chaqueta) para acelerar el proceso de enfriamiento |
| 120 | 93,57 | -2,67 | Enfriamiento |
| 125 | 92,41 | -1,16 | |
| 130 | 90,42 | -1,99 | |
| 135 | 89,4 | -1,02 | |
| 140 | 86,98 | -2,42 | |
| 145 | 85,28 | -1,7 | |

| | | |
|-----|-------|-------|
| 150 | 84,73 | -0,55 |
| 155 | 82,9 | -1,83 |
| 160 | 81,2 | -1,7 |
| 165 | 80,94 | -0,26 |
| 170 | 79,51 | -1,43 |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Gráfico 3. Tercera validación – Curva Temperatura vs. tiempo



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Con los datos recolectados, es posible observar el incremento de temperatura de 66,62°C en 1 hora 18 minutos, lo cual es notablemente mejor en comparación con la última validación, además de un mantenimiento de temperatura de 100°C por 17 minutos; y para el enfriamiento se colocó una chaqueta de hielo para acelerar el proceso de enfriamiento de 20°C en 1 hora 5 minutos.

Cuarta validación

En la **Tabla 9** se muestran los datos recolectados y en la **Gráfica 4**, se muestra la curva temperatura vs tiempo

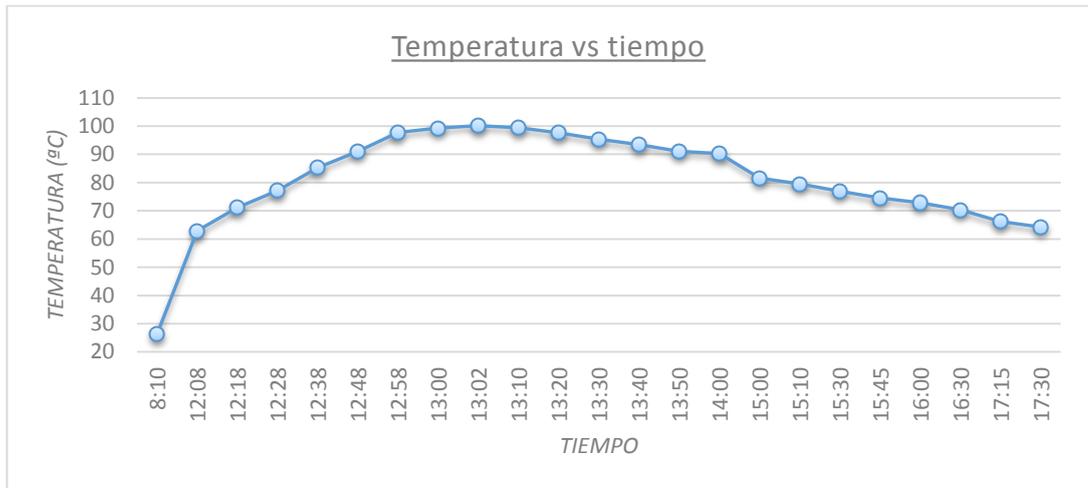
Tabla 9. Datos cuarta validación temperatura

| HORA | TEMPERATURA | ΔT | OBSERVACIONES |
|-------|-------------|------------|--|
| 8:10 | 26,3 | | Se dañó el equipo: desestabilización del pH, agitación dañada, por falta de corriente. |
| 12:08 | 62,92 | 36,62 | Calentamiento |
| 12:18 | 71,19 | 8,27 | |
| 12:28 | 77,18 | 5,99 | |
| 12:38 | 85,28 | 8,1 | |
| 12:48 | 91,05 | 5,77 | |
| 12:58 | 97,77 | 6,72 | |
| 13:00 | 99,35 | 1,58 | |
| 13:02 | 100,15 | 0,8 | |
| 13:10 | 99,44 | -0,71 | |
| 13:20 | 97,67 | -1,77 | Enfriamiento |
| 13:30 | 95,39 | -2,28 | |
| 13:40 | 93,5 | -1,89 | |
| 13:50 | 91,1 | -2,4 | |
| 14:00 | 90,23 | -0,87 | |
| 15:00 | 81,6 | -8,63 | |
| 15:10 | 79,48 | -2,12 | |
| 15:30 | 76,98 | -2,5 | |
| 15:45 | 74,61 | -2,37 | |
| 16:00 | 72,86 | -1,75 | |
| 16:30 | 70,36 | -2,5 | |
| 17:15 | 66,24 | -4,12 | |
| 17:30 | 64,25 | -1,99 | Se para el proceso debido a fallas en el biorreactor, se hicieron cambios en el sensor de Temperatura, y la fuente que alimenta el motor de agitación. |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Gráfico 4. Cuarta validación – Curva Temperatura vs. tiempo



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Con los datos recolectados, es posible observar el incremento de temperatura de 36,43°C en 52 minutos, además de un mantenimiento de temperatura de 100°C por 15 minutos; y para el enfriamiento se colocó una chaqueta de hielo para acelerar el proceso de enfriamiento de 33,4°C en 4 horas 10 minutos, lo cual no es beneficioso para el proceso, y esto es debido a cambios en el sensor de temperatura y la fuente que alimenta el motor de agitación.

Quinta validación

En la **Tabla 10** se muestran los datos recolectados y en la **Gráfica 5**, se muestra la curva temperatura vs tiempo

Tabla 10. Datos quinta validación temperatura

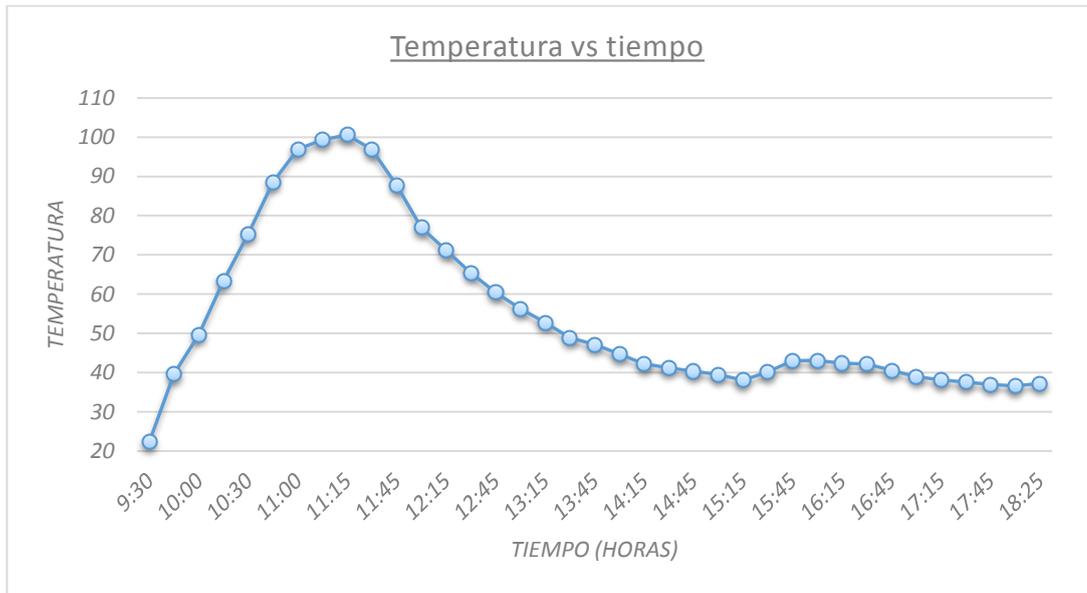
| HORA | TEMPERATURA (°C) | ΔT | OBSERVACIONES |
|-------|------------------|------------|-----------------------------------|
| 9:30 | 22,36 | | Calentamiento |
| 9:45 | 39,73 | 17,37 | |
| 10:00 | 49,72 | 9,99 | |
| 10:15 | 63,42 | 13,7 | |
| 10:30 | 75,36 | 11,94 | |
| 10:45 | 88,58 | 13,22 | |
| 11:00 | 96,94 | 8,36 | |
| 11:04 | 99,35 | 2,41 | Se baja la Temperatura (SP= 37°C) |

| | | | |
|-------|--------|--------|---|
| 11:15 | 100,58 | 1,23 | Mantenimiento / Retención |
| 11:30 | 96,85 | -3,73 | Se colocó un ventilador para acelerar el enfriamiento |
| 11:45 | 87,73 | -9,12 | Enfriamiento |
| 12:00 | 76,98 | -10,75 | |
| 12:15 | 71,21 | -5,77 | |
| 12:30 | 65,39 | -5,82 | |
| 12:45 | 60,44 | -4,95 | |
| 13:00 | 56,29 | -4,15 | |
| 13:15 | 52,8 | -3,49 | |
| 13:30 | 48,9 | -3,9 | |
| 13:45 | 47,17 | -1,73 | |
| 14:00 | 44,7 | -2,47 | |
| 14:15 | 42,25 | -2,45 | |
| 14:30 | 41,2 | -1,05 | |
| 14:45 | 40,34 | -0,86 | |
| 15:00 | 39,55 | -0,79 | |
| 15:15 | 38,08 | -1,47 | Se apaga el ventilador y se incrementa el SP= 45°C para el ingreso de las sales. |
| 15:30 | 40,21 | 2,13 | |
| 15:45 | 43,05 | 2,84 | Se apaga el motor para introducir el pHmetro (pH=-0,00 evidencia la desconexión del sensor) |
| 16:00 | 43,1 | 0,05 | Enfriamiento |
| 16:15 | 42,4 | -0,7 | |
| 16:30 | 42,23 | -0,17 | |
| 16:45 | 40,58 | -1,65 | |
| 17:00 | 38,93 | -1,65 | |
| 17:15 | 38,13 | -0,8 | |
| 17:30 | 37,6 | -0,53 | |
| 17:45 | 37,02 | -0,58 | |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Gráfico 5. Quinta validación – Curva Temperatura vs. tiempo



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Con los datos recolectados, es posible observar el incremento de temperatura de 74,58°C en 1 hora 30 minutos, lo cual es beneficioso en comparación con los procesos anteriores; además de un mantenimiento de temperatura de 100°C por 15 minutos; y para el enfriamiento se colocó un ventilador para acelerar el proceso de enfriamiento de 59,83°C en 6 horas 15 minutos.

3.3 Análisis de la validación de los parámetros temperatura y pH

En la **Tabla 11**, se muestran los datos recolectados y en la **Gráfica 6**, se muestra la curva temperatura vs tiempo.

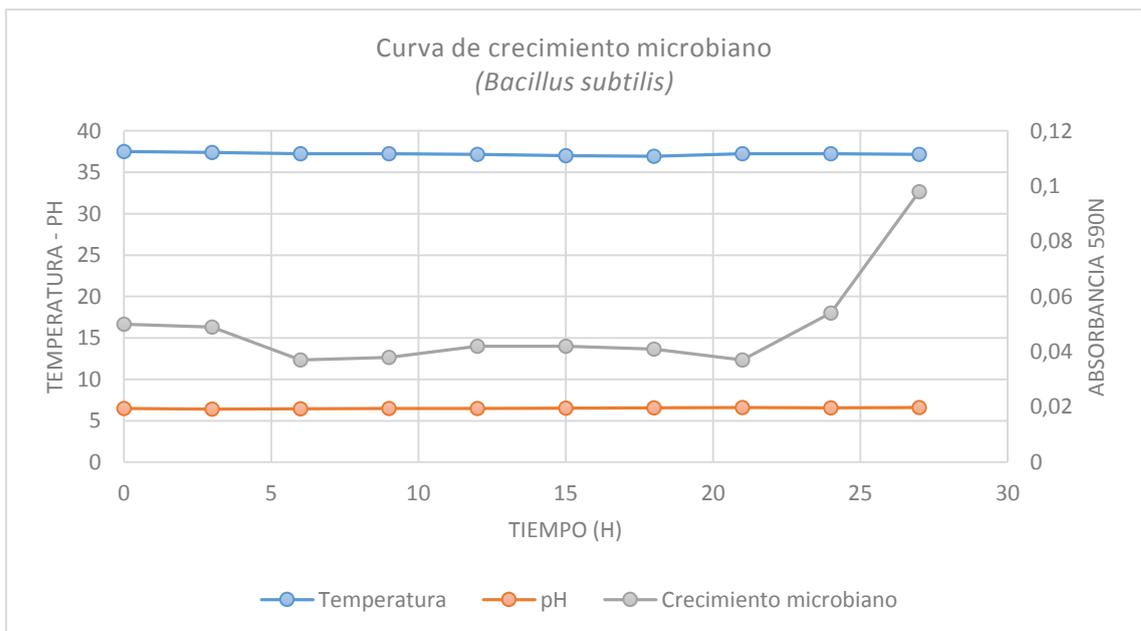
Tabla 11. Datos validación temperatura y pH

| Muestra | Tiempo (h) | Temperatura (°C) | pH | Absorbancia (590nm) | UFC/ml | Std Dev | Tensión superficial |
|---------|------------|------------------|------|---------------------|----------|---------|---------------------|
| A1 | 0 | 37.5 | 6.5 | 0.05 | 3.00E+07 | 0,003 | 71.67 |
| A2 | 3 | 37.4 | 6.41 | 0.049 | 2.94E+07 | 0,005 | - |
| A3 | 6 | 37.25 | 6.43 | 0.037 | 2.22E+07 | 0,004 | - |
| A4 | 9 | 37.25 | 6.47 | 0.038 | 2.28E+07 | 0,002 | - |
| A5 | 12 | 37.18 | 6.49 | 0.042 | 2.52E+07 | 0,003 | 70.22 |
| A6 | 15 | 37.02 | 6.51 | 0.042 | 2.52E+07 | 0,003 | 72.33 |
| A7 | 18 | 36,94 | 6.55 | 0.041 | 2.46E+07 | 0,004 | - |
| A8 | 21 | 37.25 | 6.59 | 0.037 | 2.22E+07 | 0,001 | - |
| A9 | 24 | 37.25 | 6.55 | 0.054 | 3.24E+07 | 0,014 | 72.67 |
| A10 | 27 | 37.18 | 6.6 | 0.098 | 5.88E+07 | 0,071 | 72.33 |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

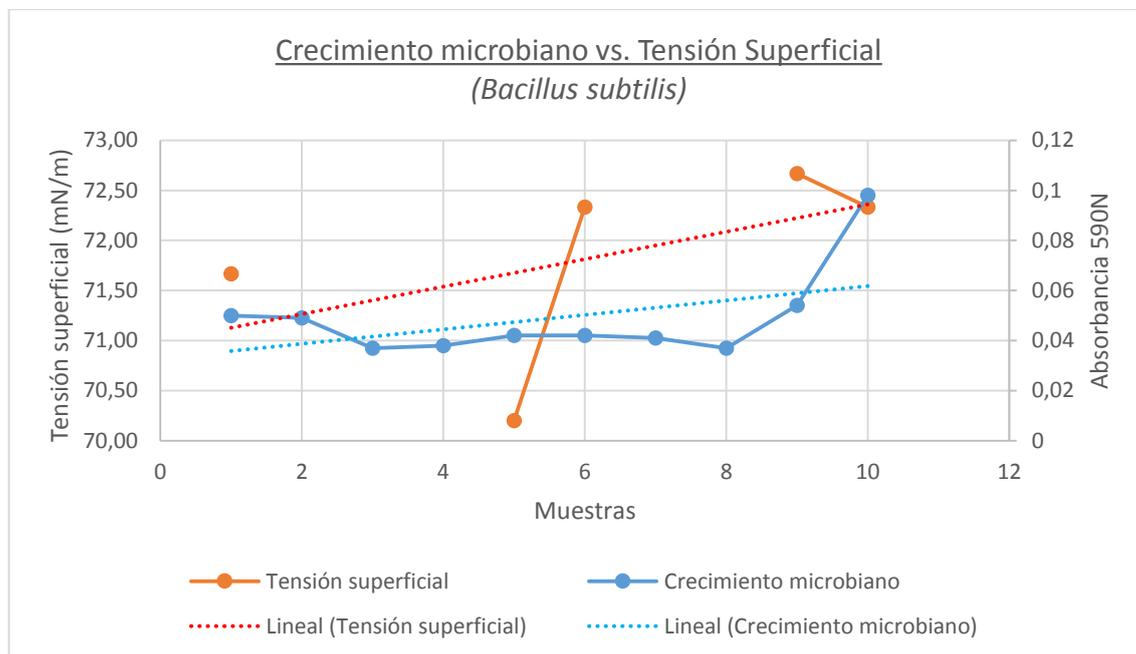
Gráfico 6. Curva crecimiento microbiano (Validación T y pH)



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Gráfico 7. Curva crecimiento microbiano vs Tensión superficial (Validación T y pH)



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Con los datos recolectados, es posible demostrar la estabilidad del parámetro temperatura a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, lo cual es importante para el crecimiento del *Bacillus subtilis*; adicional a eso también observamos la curva del parámetro potencial de hidrógeno (pH) una estabilidad a 6.5; por otro lado durante las 18 horas no se observaba visualmente cambio de turbidez por lo cual se procedió a inocular 20ml de *Bacillus subtilis*, lo que ayudó al crecimiento. También se puede observar el crecimiento microbiano en términos de absorbancia a 590N, a las 21 horas después de la inoculación de *Bacillus subtilis*.

En la **Gráfica 7** se observa la curva crecimiento microbiano vs. tensión superficial, para el cual solo se analizaron 5 muestras representativas (A1, A5, A6, A9, A10), con valores muy cercanos a los del agua 72mN/m, lo que no demuestra efecto del biotensoactivo (BT) y con las líneas de tendencia de las curvas crecimiento microbiano y tensión superficial, se demuestra esto.

3.3.1 Análisis estadístico del parámetro temperatura

Para la validación de la temperatura se realizó un análisis de capacidad del proceso, en donde se establecen las siguientes hipótesis:

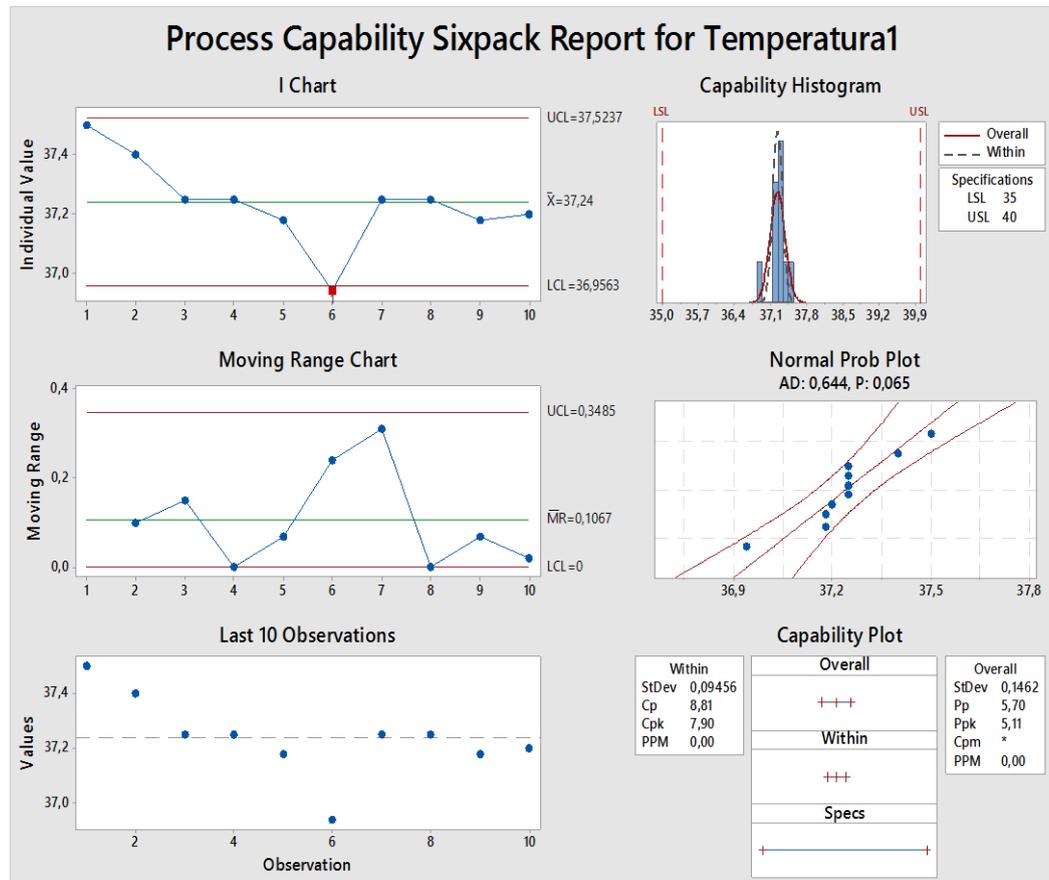
H₀: El parámetro temperatura sigue una distribución normal.

H₁: El parámetro temperatura no sigue una distribución normal.

Con un valor $P=0,065 > 0,05$ se concluye que no existe suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula (H₀).

Además como se demuestra en la **Figura 9**, con las cartas de control de valor individual y de rango móvil, se puede concluir que el proceso está bajo control estadístico y con un $C_p= 8,81$ mayor a 1, se concluye que el proceso a corto plazo es capaz de mantener la temperatura a $37\pm 2^\circ\text{C}$.

Figura 9. Informe de capacidad del proceso (Temperatura)



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

3.3.2 Análisis estadístico del parámetro pH

Para la validación del pH se realizó un análisis de capacidad del proceso, en donde se establecen las siguientes hipótesis:

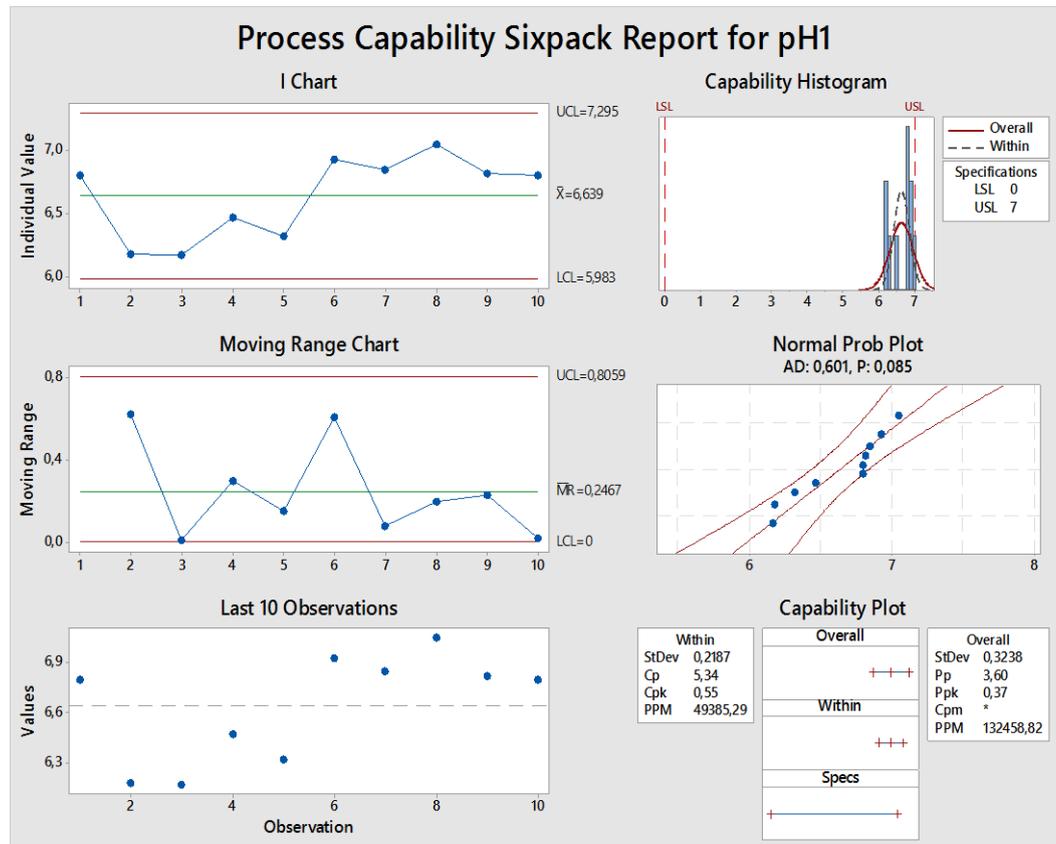
H_0 : El parámetro pH sigue una distribución normal.

H_1 : El parámetro pH no sigue una distribución normal.

Con un valor $P=0,085 > 0,05$ se concluye que no existe suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula (H_0).

Además como se demuestra en la **Figura 10**, con las cartas de control de valor individual y de rango móvil, se puede concluir que el proceso está bajo control estadístico y con un $C_p= 5,34$ mayor a 1, se concluye que el proceso a corto plazo es capaz de mantener el pH menor a 7.

Figura 10. Informe de capacidad del proceso (pH)



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

3.4 Análisis de la validación de temperatura, pH y OD

En la **Tabla 12**, se muestran los datos recolectados y en la **Gráfica 8**, se muestra la curva temperatura vs tiempo.

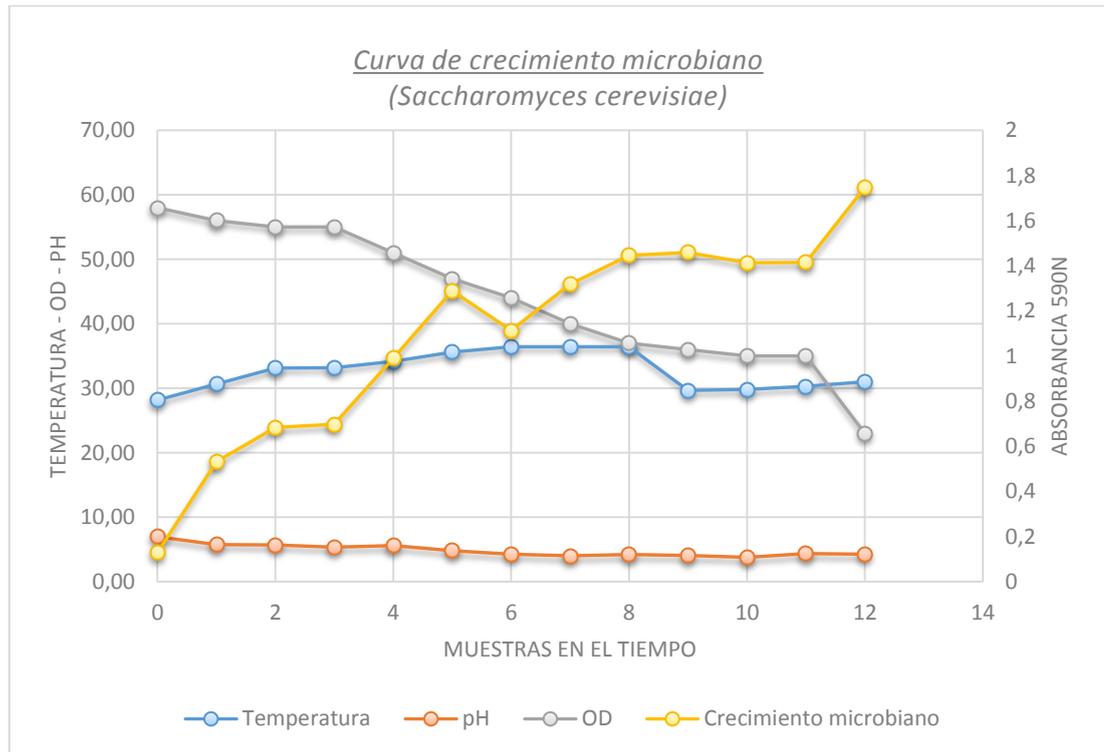
Tabla 12. Datos validación temperatura, pH y OD

| Muestra | Tiempo (h) | Temperatura (°C) | pH | OD (ppm) | Absorbancia (590nm) | UFC/ml | Std Dev |
|---------|------------|------------------|------|----------|---------------------|----------|---------|
| 0 | 0 | 28.16 | 6.96 | 58 | 0.1287 | 7.72E+07 | |
| 1 | 1 | 30.63 | 5.76 | 56 | 0.532 | 3.19E+08 | 0.031 |
| 2 | 2 | 33.11 | 5.67 | 55 | 0.683 | 4.10E+08 | 0.033 |
| 3 | 3 | 33.20 | 5.35 | 55 | 0.697 | 4.18E+08 | 0.033 |
| 4 | 4 | 34.15 | 5.59 | 51 | 0.99 | 5.94E+08 | 0.013 |
| 5 | 5 | 35.61 | 4.78 | 47 | 1.289 | 7.73E+08 | 0.009 |
| 6 | 6 | 36.43 | 4.25 | 44 | 1.113 | 6.68E+08 | 0.028 |
| 7 | 7 | 36.43 | 4.02 | 40 | 1.318 | 7.91E+08 | 0.005 |
| 8 | 8 | 36.43 | 4.21 | 37 | 1.446 | 8.68E+08 | 0.024 |
| 9 | 16 | 29.66 | 4.07 | 36 | 1.458 | 8.75E+08 | 0.024 |
| 10 | 17 | 29.81 | 3.77 | 35 | 1.413 | 8.48E+08 | 0.029 |
| 11 | 18 | 30.32 | 4.34 | 35 | 1.415 | 8.49E+08 | 0.04 |
| 12 | 19 | 31.00 | 4.25 | 23 | 1.747 | 1.05E+09 | 0.015 |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Gráfico 8. Curva crecimiento microbiano (Validación T, pH y OD)



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Con los datos recolectados, es posible demostrar la estabilidad del parámetro temperatura a 30°C lo cual es importante para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, existiendo el mayor pico de temperatura a 36,43°C a las 6, 7 y 8 horas del proceso, debido a fallas con el sensor de temperatura; adicional a eso también observamos la curva del parámetro potencial de hidrógeno (pH) un descenso del mismo debido a la actividad microbiana; por otro lado durante las 19 horas se observó visualmente cambio de turbidez.

3.4.1 Análisis estadístico del parámetro temperatura

Para la validación de la temperatura se realizó un análisis de capacidad del proceso, en donde se establecen las siguientes hipótesis:

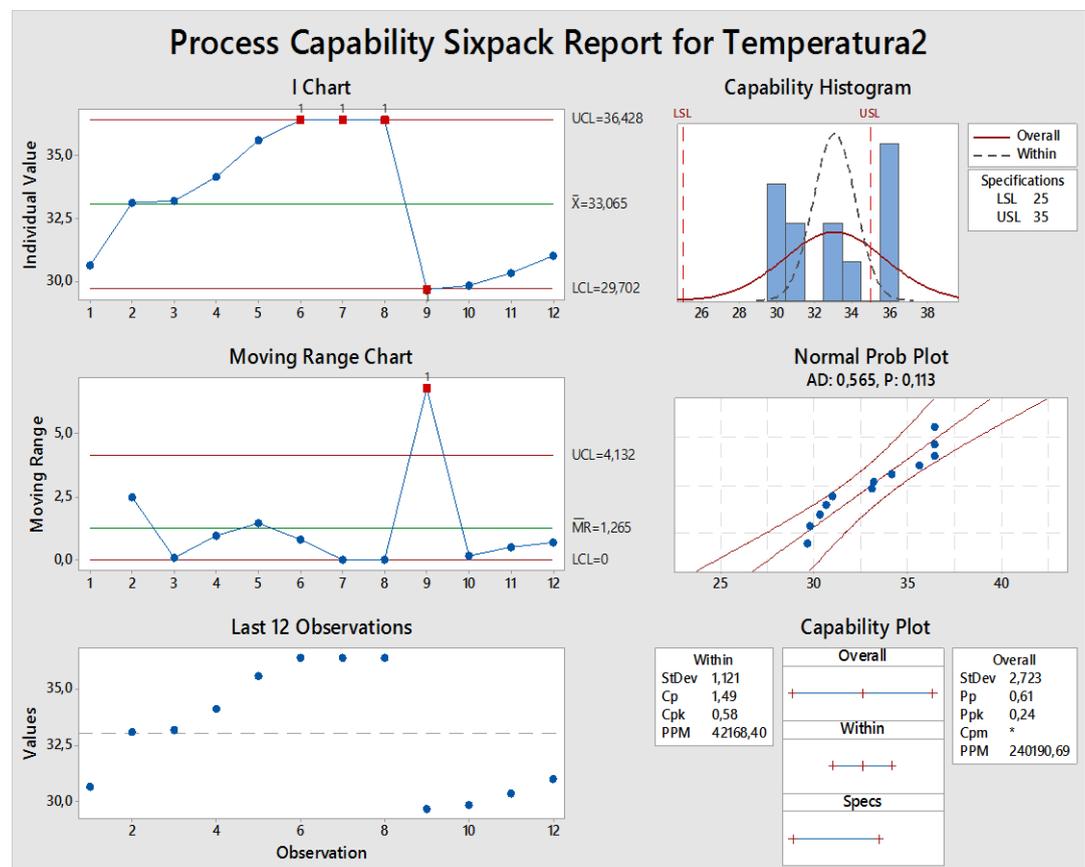
H_0 : El parámetro temperatura sigue una distribución normal.

H_1 : El parámetro temperatura no sigue una distribución normal.

Con un valor $P=0,113 > 0,05$ se concluye que no existe suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula (H_0).

Además como se demuestra en la **Figura 11**, con las cartas de control de valor individual y de rango móvil, se puede concluir que el proceso está bajo control estadístico y con un $C_p= 1,49$ mayor a 1, se concluye que el proceso a corto plazo es capaz de mantener la temperatura a 30°C pese a las fallas en el sensor de temperatura.

Figura 11. Informe de capacidad del proceso (Temperatura)



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

3.4.2 Análisis estadístico del parámetro pH

Para la validación del pH se realizó un análisis de capacidad del proceso, en donde se establecen las siguientes hipótesis:

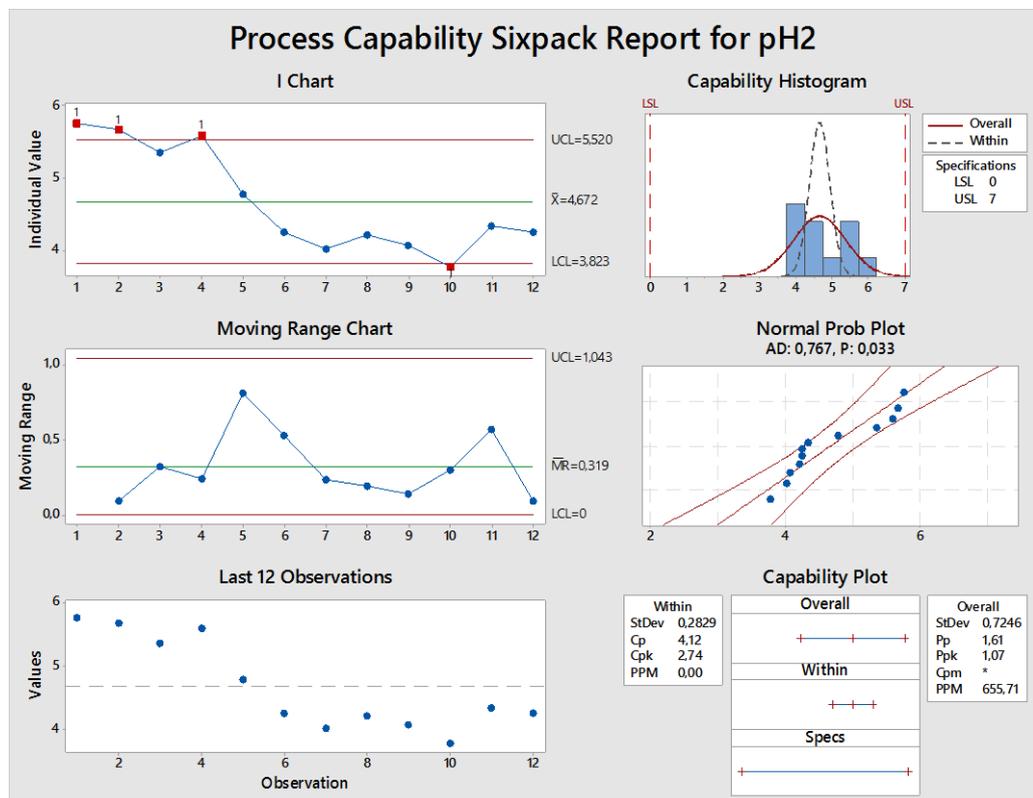
H_0 : El parámetro pH sigue una distribución normal.

H_1 : El parámetro pH no sigue una distribución normal.

Con un valor $P=0,033 < 0,05$ se concluye que existe suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula (H_0), lo cual denota que no sigue una distribución normal, pero igual se puede analizar las cartas de control y la capacidad del proceso (C_p).

Además como se demuestra en la **Figura 12**, con las cartas de control de valor individual y de rango móvil, se puede concluir que el proceso está bajo control estadístico y con un $C_p= 4,12$ mayor a 1, se concluye que el proceso a corto plazo es capaz de mantener el pH menor a 7.

Figura 12. Informe de capacidad del proceso (pH)



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

3.5 Análisis de la validación final

En la **Tabla 13**, se muestran los datos recolectados y en la **Gráfica 9**, se muestra la curva temperatura vs tiempo.

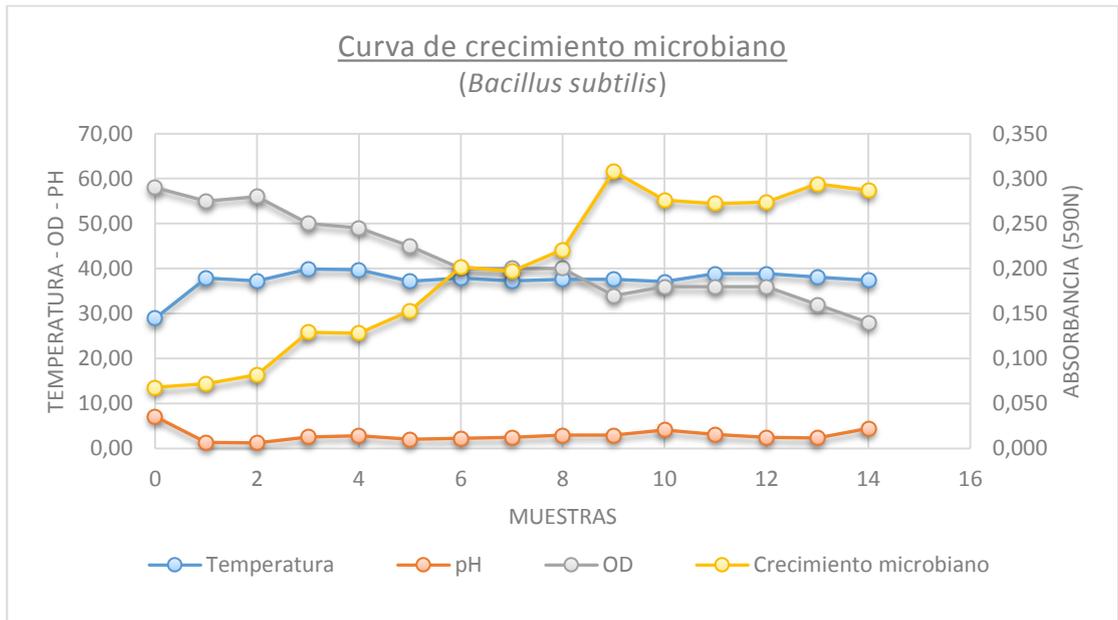
Tabla 13. Datos validación temperatura, pH y OD

| Muestras | Tiempo (h) | Temperatura (°C) | pH | OD (ppm) | Absorbancia (590nm) | UFC/ml | Tensión Superficial |
|----------|------------|------------------|------|----------|---------------------|----------|---------------------|
| 0 | 0.00 | 28.94 | 7.10 | 58 | 0.068 | 4.08E+07 | 71.33 |
| 1 | 0.17 | 37.91 | 1.34 | 55 | 0.072 | 4.32E+07 | 68.33 |
| 2 | 0.27 | 37.28 | 1.25 | 56 | 0.082 | 4.92E+07 | 45.33 |
| 3 | 0.41 | 39.90 | 2.57 | 50 | 0.129 | 7.74E+07 | 40.67 |
| 4 | 0.51 | 39.70 | 2.83 | 49 | 0.128 | 7.68E+07 | 40.33 |
| 5 | 11.51 | 37.21 | 2.03 | 45 | 0.153 | 9.18E+07 | 39.33 |
| 6 | 11.64 | 37.90 | 2.27 | 40 | 0.202 | 1.21E+08 | 38.67 |
| 7 | 11.74 | 37.28 | 2.48 | 40 | 0.197 | 1.18E+08 | 37.67 |
| 8 | 11.84 | 37.62 | 3.00 | 40 | 0.221 | 1.33E+08 | 37.67 |
| 9 | 11.88 | 37.62 | 2.98 | 34 | 0.308 | 1.85E+08 | 36.33 |
| 10 | 31.88 | 37.08 | 4.09 | 36 | 0.276 | 1.66E+08 | 37.67 |
| 11 | 31.96 | 38.90 | 3.10 | 36 | 0.272 | 1.63E+08 | 36.67 |
| 12 | 32.01 | 38.90 | 2.46 | 36 | 0.274 | 1.64E+08 | 36.67 |
| 13 | 32.10 | 38.08 | 2.30 | 32 | 0.294 | 1.76E+08 | 34.33 |
| 14 | 32.22 | 37.38 | 4.48 | 28 | 0.287 | 1.72E+08 | 36.67 |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

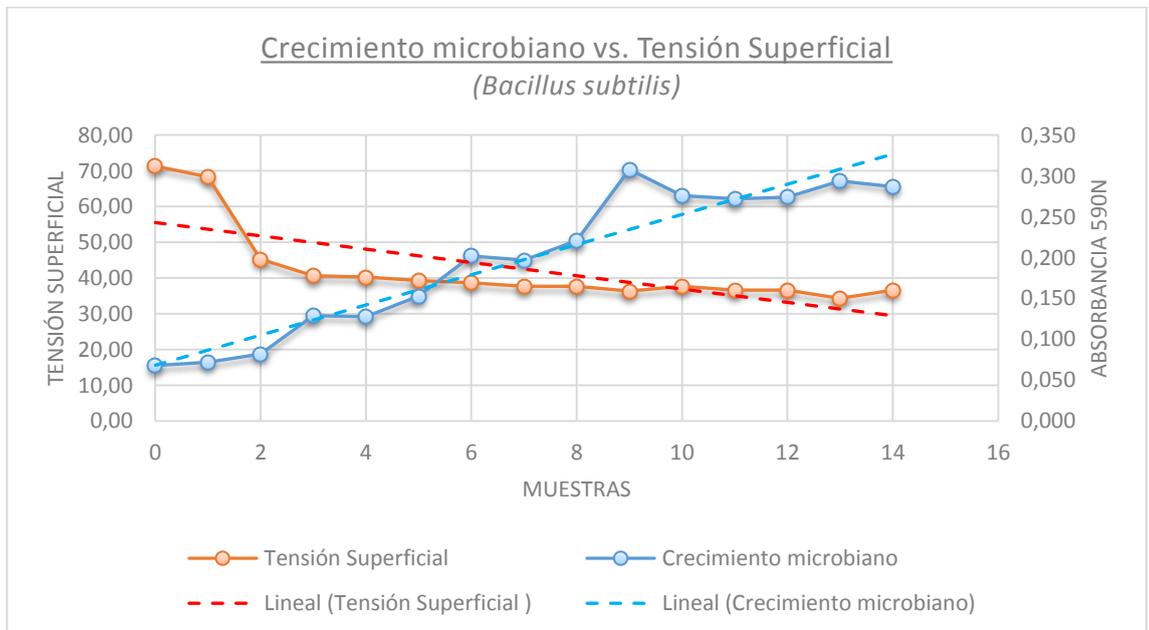
Gráfico 9. Curva crecimiento microbiano (Validación T, pH y OD)



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Gráfico 10. Curva crecimiento microbiano vs Tensión superficial (Validación T y pH)



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

Con los datos recolectados en el **Gráfico 9**, es posible demostrar la estabilidad del parámetro temperatura a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 32 horas, lo cual es importante para el crecimiento del *Bacillus subtilis*; adicional a eso también observamos en la curva del potencial de hidrógeno (pH) y oxígeno disuelto (OD) un descenso de estos debido a la actividad microbiana.

En el **Gráfico 10** se observa la curva crecimiento microbiano vs. tensión superficial, para el cual se demuestra el crecimiento microbiano en términos de absorbancia a 590N y disminución de la tensión superficial de 72 a 36,33mN/m, lo cual demuestra el efecto del biotensoactivo (BT) y que según bibliografía es una característica de un buen biotensoactivo.

3.5.1 Análisis estadístico del parámetro temperatura

Para la validación de la temperatura se realizó un análisis de capacidad del proceso, en donde se establecen las siguientes hipótesis:

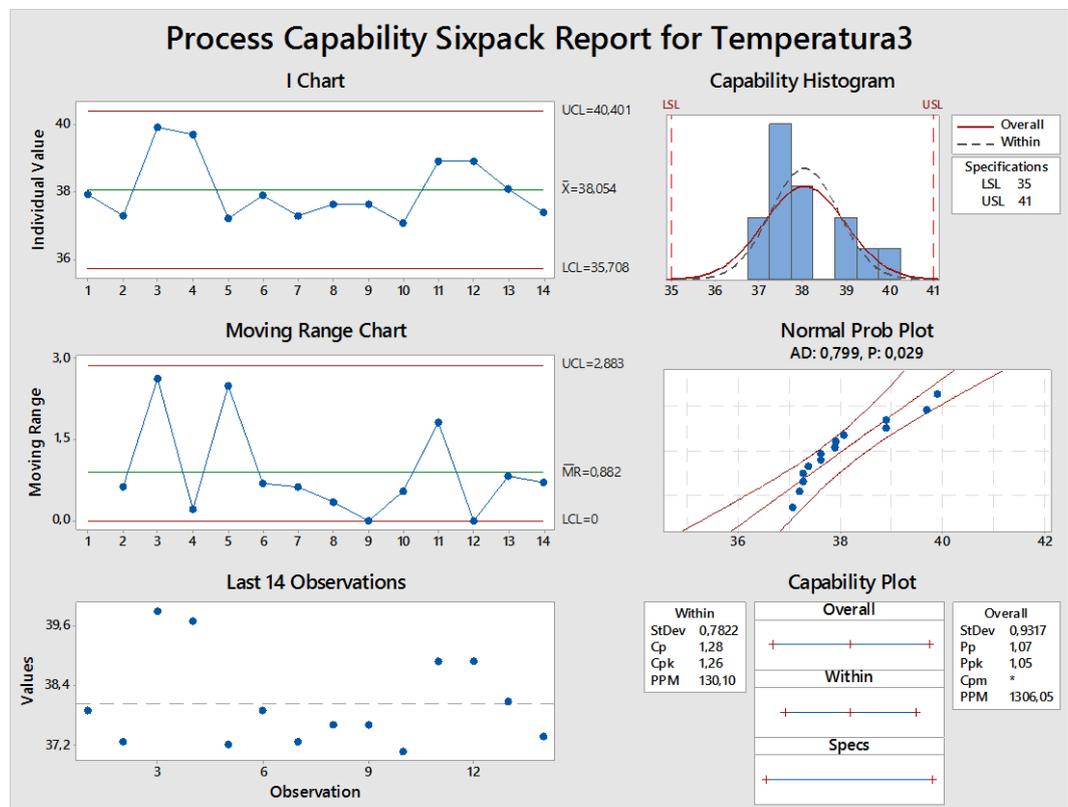
H_0 : El parámetro temperatura sigue una distribución normal.

H_1 : El parámetro temperatura no sigue una distribución normal.

Con un valor $P=0,029 < 0,05$ se concluye que existe suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula (H_0), lo cual denota que no sigue una distribución normal, pero igual se puede analizar las cartas de control y la capacidad del proceso (C_p).

Además como se demuestra en la **Figura 13**, con las cartas de control de valor individual y de rango móvil, se puede concluir que el proceso está bajo control estadístico y con un $C_p= 1,28$ mayor a 1, se concluye que el proceso a corto plazo es capaz de mantener la temperatura a $37\pm 2^\circ\text{C}$.

Figura 13. Informe de capacidad del proceso (Temperatura)



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

3.5.2 Análisis estadístico del parámetro pH

Para la validación del pH se realizó un análisis de capacidad del proceso, en donde se establecen las siguientes hipótesis:

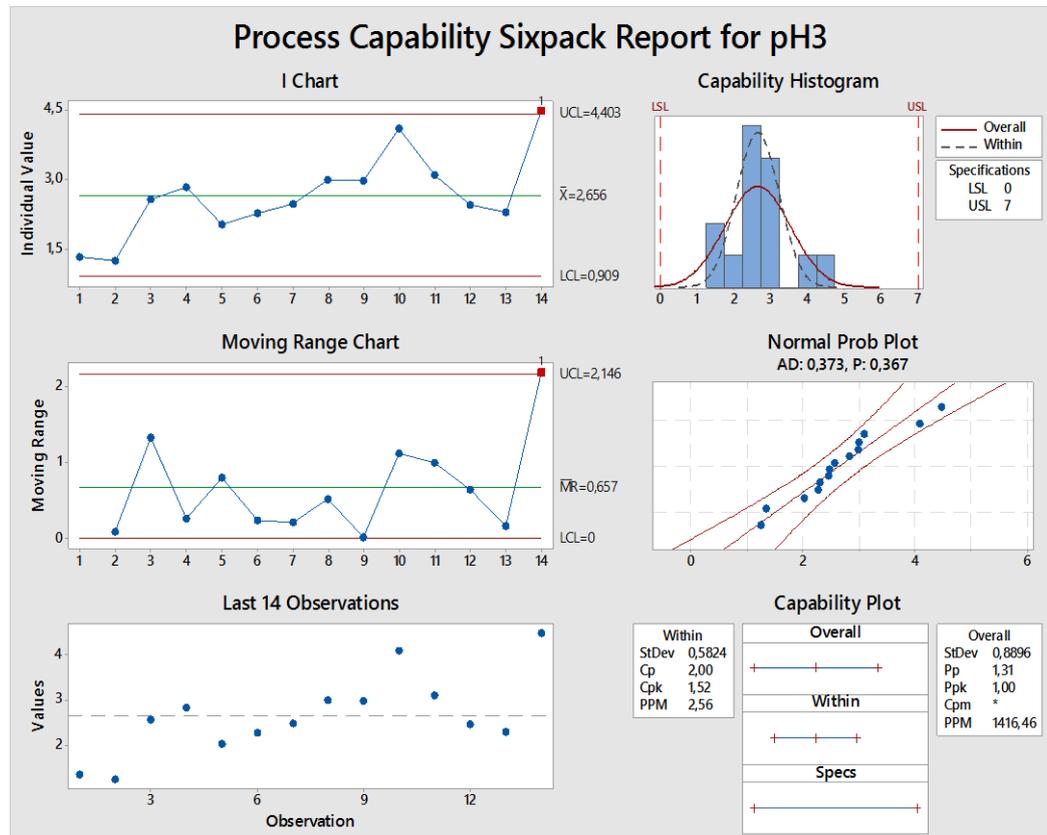
H₀: El parámetro pH sigue una distribución normal.

H₁: El parámetro pH no sigue una distribución normal.

Con un valor $P=0,367 > 0,05$ se concluye que no existe suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula (H₀).

Además como se demuestra en la **Figura 14**, con las cartas de control de valor individual y de rango móvil, se puede concluir que el proceso está bajo control estadístico y con un $C_p= 2$ mayor a 1, se concluye que el proceso a corto plazo es capaz de mantener el pH menor a 7.

Figura 14. Informe de capacidad del proceso (Temperatura)



Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

3.6 Análisis de costos

Para el análisis de los costos implicados en el rediseño del biorreactor, se toman los costos ya analizados en el documento de tesis denominado “Diseño de un biorreactor a escala de laboratorio y su sistema de control”, y del cual, el presente proyecto es la continuación para la mejora de la parte de control.

En la **Tabla 14** se detallan los costos implicados en la estructura del equipo.

Tabla 14. Costos de estructura del biorreactor

| Item | Cantidad | Descripción | Precio Unitario | Subtotal |
|--------------|----------|--|-----------------|--------------------|
| 1 | 1 | Tanque SAE 304 – 0.28 m x 0.26 m | \$ 120.00 | \$ 120.00 |
| 2 | 1 | Eje de transmisión SAE 304 - \varnothing 16 mm x 360 mm | \$ 30.00 | \$ 30.00 |
| 3 | 1 | Impulsor SAE 304 - \varnothing 112 mm x 25 mm | \$ 150.00 | \$ 150.00 |
| 4 | 4 | Baffles SAE 304 - 28 mm x 215 mm | \$ 100.00 | \$ 400.00 |
| 5 | 1 | Base del tanque SAE 304 - 520 mm x 8 mm x 400 mm | \$ 180.00 | \$ 180.00 |
| 6 | 1 | Base del motor SAE 304 - 520 mm x 8 mm x 60 mm | \$ 100.00 | \$ 100.00 |
| 7 | 4 | Ejes de la estructura SAE 304 - \varnothing 13 mm x 382 mm | \$ 70.00 | \$ 280.00 |
| 8 | 1 | Cañería de aireación SAE 304 - \varnothing 55 mm | \$ 15.00 | \$ 15.00 |
| 9 | 4 | Soportes de duralón (estándar) | \$ 50.00 | \$ 200.00 |
| 10 | 1 | Pintura epóxica (1 litro) | \$ 60.00 | \$ 60.00 |
| 11 | ---- | Elementos de ajuste y otros | \$ 30.00 | \$ 30.00 |
| TOTAL | | | | \$ 1 565.00 |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

En la **Tabla 15** se detallan los costos que requieren el biorreactor para su funcionamiento y mejor desempeño.

Tabla 15. Costos de complementos del biorreactor

| Item | Cantidad | Descripción | Precio Unitario | Subtotal |
|--------------|----------|---|-----------------|--------------------|
| 1 | 1 | Motor DC (44 - 1991 W) | \$ 500.00 | \$ 500.00 |
| 2 | 2 | Bombas peristálticas (0 - 100 ml/min) | \$ 35.00 | \$ 70.00 |
| 3 | 1 | Sensor de Temperatura (-20°C - 420 °C) | \$ 20.00 | \$ 20.00 |
| 4 | 1 | Transmisor de señal Pt100 | \$ 60.00 | \$ 60.00 |
| 5 | 1 | Sensor de pH - Atlas Scientific (0.001 – 14.000) | \$ 250.00 | \$ 250.00 |
| 6 | 1 | Arduino Mega | \$ 35.00 | \$ 35.00 |
| 7 | 1 | Bomba de aire (6 l/min) | \$ 11.00 | \$ 11.00 |
| 8 | 1 | Piedra difusora | \$ 2.00 | \$ 2.00 |
| 9 | 3 | Diseño e impresión de circuitos eléctricos | \$ 40.00 | \$ 120.00 |
| 10 | 1 | SIMATIC S7 1200 1212C AC/DC/RELÉ | \$ 500.00 | \$ 500.00 |
| 11 | 1 | SIMATIC HMI KTP600 BASIC COLOR DP | \$ 800.00 | \$ 800.00 |
| 12 | 1 | RELE ESTADO SOLIDO CRYDOM D2450 3-32VDC 50A | \$ 100.00 | \$ 100.00 |
| 13 | 1 | Componentes electrónicos varios | \$ 200.00 | \$ 200.00 |
| 14 | 1 | CSM1277 Switch Industrial Ethernet | \$ 240.00 | \$ 240.00 |
| 15 | 2 | CONVERSION UART A RJ45 | \$ 20.00 | \$ 40.00 |
| 16 | 1 | EZO™ Dissolved Oxygen Circuit + Dissolved Oxygen Probe + 125ml (4oz) 0 Dissolved Oxygen calibration solution + Pre-Assembled Female BNC connector | \$ 297.00 | \$ 297.00 |
| 17 | 1 | Componentes mecánicos varios | \$ 200.00 | \$ 200.00 |
| TOTAL | | | | \$ 3 445.00 |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

En la **Tabla 16** se detallan los insumos adquiridos para la validación del funcionamiento del Biorreactor. Estos elementos son requeridos para las pruebas que se realicen en el equipo.

Tabla 16. Insumos para pruebas en laboratorios del proceso biotecnológico

| Item | Cantidad | REACTIVOS | Precio unitario | Subtotal |
|------|----------|--|-----------------|----------|
| 1 | 2 | GLUCOSA ANHIDRO ACS 1KG, FISHER | \$ 80.00 | \$ 160 |
| 2 | 1 | HIERRO II SULFATO HEPTAHIDRATADO (sulfato ferroso) 500 gr FISHER | \$ 36.80 | \$ 36.8 |
| 3 | 1 | MAGNESIO SULFATO HEPTAHIDRATADO ACS 500GR, FISHER | \$ 45.78 | \$ 45.78 |
| 4 | 1 | POTASIO CLORURO ACS 1 KG, FISHER | \$ 45.12 | \$ 45.12 |
| 5 | 1 | POTASIO HIDROXIDO ACS 500 GR, FISHER | \$ 31.80 | \$ 31.8 |
| 6 | 2 | AMONIO SULFATO ACS 500 GR. FISHER | \$ 38.29 | \$ 76.58 |
| 7 | 2 | Fosfato dibásico de Potasio (KH_2PO_4) (500 gr) | \$ 125.00 | \$ 250 |
| 8 | 2 | Fosfato monobásico de potasio (K_2HPO_4) (500 gr) | \$ 125.00 | \$ 250 |
| 9 | 4 | MATRAZ ERLENMEYER 100ML BOCA ESTRECHA, OBEROI | \$ 2.95 | \$ 11.8 |
| 10 | 4 | MATRAZ ERLENMEYER 250ML DURAN SCHOTT | \$ 4.10 | \$ 16.4 |
| 11 | 6 | FRASCO AUTOCLAVABLE GRAD. T/ROSC/AZUL 500ML, DURAN SCHOTT | \$ 8.65 | \$ 51.9 |
| 12 | 6 | FRASCO AUTOCLAVABLE GRAD. T/ROSC/AZUL 250ML, DURAN SCHOTT | \$ 6.35 | \$ 38.1 |
| 13 | 4 | MATRAZ ERLENMEYER 250ML DURAN SCHOTT | \$ 4.10 | \$ 16.4 |
| 14 | 4 | MATRAZ ERLENMEYER 500ML BOCA ANCHA, OBEROI | \$ 5.60 | \$ 22.4 |

| | | | | |
|---------------|---|---|----------|-------------------|
| 15 | 4 | MATRAZ ERLLENMEYER 1000ML, DURAN SCHOTT | \$ 8.25 | \$ 33 |
| 16 | 4 | FRASCO AUTOCLAVABLE GRAD. T/ROSC/AZUL 500ML, DURAN SCHOTT | \$ 8.65 | \$ 34.6 |
| 17 | 2 | Microplacas estériles | \$ 56.00 | \$ 112 |
| 18 | 2 | Puntas no estériles (1000, 200 y 10 ul) | \$ 85.50 | \$ 171 |
| 19 | 2 | Cajas Petri | \$ 45.50 | \$ 91 |
| 20 | 2 | Puntas no estériles (10 ml) | \$ 62.70 | \$ 125.4 |
| TOTAL: | | | | \$ 1620.08 |

Fuente: Ivette Sornoza, 2017.

Elaboración propia

El costo final de fabricación del biorreactor comprende los costos de materiales, complementos y validación del Biorreactor, es aproximadamente **\$ 6 630.08**, pero hay que tomar en consideración para la venta, los costos de mano de obra y utilidades.

CAPÍTULO 4

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El diseño del biorreactor de este proyecto cumple con las necesidades requeridas por los laboratorios de la carrera de Ingeniería en Alimentos, lo cual es el primer paso para el desarrollo y la fabricación de estos equipos a nivel nacional, proporcionando confianza al usuario y calidad en sus procesos a los diferentes laboratorios del país. Este equipo está en capacidad de competir con los equipos diseñados en el extranjero debido a su alta fiabilidad y bajos costos de fabricación y mantenimiento. Una fortaleza muy importante de este equipo es la interacción equipo – usuario, debido a la interfaz gráfica que ofrece mediante la pantalla táctil para el control y monitoreo de los parámetros de control. Al mismo tiempo, informando al usuario por medio de un sistema de alarma si se encuentra fuera de los parámetros de control.

4.1 Conclusiones

En validación de los parámetros de temperatura, potencial de hidrógeno (pH) y oxígeno disuelto (OD), se lograron mantener los rangos de estos parámetros y los puntos óptimos de cada uno de ellos, demostrados en los resultados de las estadísticas de capacidad del proceso; y se validó el biorreactor con la producción de biotensoactivos a partir de *Bacillus subtilis* cepa DS03 y con la producción de cultivos estándar a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, obteniendo excelentes resultados para ambos casos.

En la curva de crecimiento del *Bacillus subtilis* cepa DS03, se distingue con claridad la fase de adaptación del microorganismo durante los primeros 27 minutos. En el periodo comprendido entre los 27 minutos y 12 horas el microorganismo se encuentra en fase exponencial, en donde se produce un incremento en la biomasa. Por último la fase estacionaria empieza a las 12 horas y se mantiene hasta las 32 horas. Es importante destacar que a medida que el microorganismo crece, incrementa la biomasa y la producción del biotensoactivo, generando el descenso de la tensión superficial, lo cual indica la relación entre el crecimiento microbiano y la producción del biotensoactivo.

La validación del biorreactor con la producción de biotensoactivos (BT) a partir de *Bacillus subtilis* cepa DS03, dio como resultado un BT de alta calidad según bibliografía, ya que logró reducir la tensión superficial de 72mN/m a 36,33mN/m.

A partir de los 15 litros de medio basal – mineral, se logró producir 15g de biotensoactivo (BT) durante 32 horas de proceso.

Finalmente se logró diseñar el biorreactor con los requerimientos establecidos inicialmente y a un costo de fabricación de \$6 630,08 el cual es bastante accesible al usuario o comprador, en comparación con los biorreactores del extranjero, tomando en cuenta su capacidad volumétrica de 15 litros.

4.2 Recomendaciones

La limpieza del equipo resulta difícil de realizar debido a que los elementos de la estructura de soporte del biorreactor son relativamente pesados y el sistema de sujeción del eje para el proceso de mezcla con el motor no da la facilidad de un acople y desacople rápido. Esto implica a dos operadores para el proceso de limpieza del equipo, proceso de mucha importancia por las condiciones que requiere cada proceso de cultivo.

Se recomienda un cambio periódico de las mangueras de las bombas peristálticas debido a que las sustancias ácidas y básicas pueden deteriorar con mayor rapidez las mangueras.

Si se cuenta con los recursos económicos, es recomendable fabricar una chaqueta para acelerar el enfriamiento del sistema, o considerar la opción de las celdas de Peltier ya que es más accesible económicamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, M., & Ramírez, D. (2016). *Diseño de un biorreactor a escala de laboratorio y su sistema de control*.
- AlltronicsPeru. (2011). Fundamentos básicos del control de temperatura. Retrieved from <http://www.alltronicsperu.com/catalog/manuales/fund-bas-control-temp.pdf>
- Arana, I., Orruño, M., & Barcina, I. (2016). *Cálculos de Biomasa*. Retrieved from https://ocw.ehu.eus/file.php/48/Tema_3._calculo_de_biomasa.pdf
- Arnáiz, C., Isac, L., & Lebrato, J. (2000). *Determinación de la biomasa en procesos biológicos*. Sevilla. Retrieved from http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/tvolke/00_Determin-BM.pdf
- Banat, I. M. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential, *61*(1), 47–64.
- Buitrago, G., Otálvaro, Á., & Duarte, P. (2013). Evaluación de la transferencia de oxígeno en un biorreactor convencional con aireador externo. *Revista Colombiana Biotecnología*, *XV*(2), 106–114.
- Cabeza Herrera, E. A. (2006). Cultivos Estárter: Seguridad, funcionalidad y propiedades tecnológicas. *Simposio Regional de Microbiología*, 1–8. Retrieved from https://www.academia.edu/992790/Cultivos_Estárter_Seguridad_funcionalidad_y_propiedades_tecnológicas
- Cárdenas, N. (2013). *Cultivo en biorreactores de células eucariotas superiores (humanas)*. Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co:8443/bitstream/handle/10554/11818/CardenasBieltranNathaly2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Fait, E., Garrote, G., Clapés, P., & Morcelle, S. (2012). Producción de un agente antimicrobiano con potencial actividad tensioactiva mediante el empleo de tecnologías amigables con el medio ambiente.
- Flores, F., & Velín, J. (2014). *Diseño y construcción de un biorreactor anaerobio en fase líquida para tratar aguas residuales de curtiembre*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3500#sthash.cGJVNX8r.dpuf>
- Islas, D. J., Medina, S. A., Noel, J., Rodríguez, G., Biotecnología, D. De, P, U. P. D. P. C., ... Sahagún, C. (2010). Propiedades, Aplicaciones y Producción de

- Biotensoactivos, 26(1), 65–84.
- Jiménez, D., Medina, S., & Gracida, J. (2010). *Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos*. México.
- Kuehn, S., & Ladage, T. (2015). Excellent Clinical Logistics. *Pharmaceutical Manufacturing*, 14(1). Retrieved from http://www.niceinsight.com/Userfiles/Articles/PDFs/0115_PM_Article.pdf
- Ladage, T. (2015). Preferencias de la selección de un biorreactor. Retrieved from <http://www.niceinsight.com/articles.aspx?post=1416&title=bioreactor+preference>
- López, E. (2013). “AUTOMATIZACIÓN DE UN BIORREACTOR PILOTO .” Retrieved from http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/11686.pdf
- Merchuk, J., & Gluz, M. (2012). *Bioreactors, air-lift reactors*. Sheva, Israel. Retrieved from http://www.bioreactorsciences.com/uploads/1/8/5/9/18594674/bioreactors_air-lift_reactors_merchuk_gluz.pdf
- Nunez-Ramirez, D. M. (2012). Study of the Rheological Properties of a Fermentation Broth of the Fungus *Beauveria bassiana* in a Bioreactor Under Different Hydrodynamic Conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(11), 1494–1500. <https://doi.org/10.4014/jmb.1204.04029>
- Rodríguez, A., & Cabrera, A. (2003). Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 24(1), 55–70.
- Ruiz-Leza, H. a, Rodriguez-Jasso, R. M., Rodriguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 6(1), 33–40. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Cristobal_Aguilar/publication/228068576_Bioreactors_desing_for_solid_state_fermentation/links/54a856620cf257a6360bdf0a/Bioreactors-desing-for-solid-state-fermentation.pdf
- Shoeb, E., Akhlaq, F., Badar, U., Akhter, J., & Imtiaz, S. (2013). Classification and Industrial Applications of Biosurfactants. *Part-I: Natural and Applied Sciences ISSN-L*, 4(3), 243–252. Retrieved from [http://www.savap.org.pk/journals/ARInt./Vol.4\(3\)/2013\(4.3-27\).pdf](http://www.savap.org.pk/journals/ARInt./Vol.4(3)/2013(4.3-27).pdf)
- Taylor & Francis Group. (2006). *Fermentation Process*, (101), 48–57.
- Trujillo-Roldán, M. (2009). Uso de biorreactores desechables en la industria biofarmacèutica y sus implicaciones en la ingeniería. *Red de Revistas Científicas de*

América Latina, El Caribe, España Y Portugal., 76(158), 275–283. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/496/49612069027.pdf>

Zorreguieta, A., Pettinari, J., & Alché, L. (2016). Medida del crecimiento microbiano. Retrieved from <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioRecuento.htm>

APÉNDICES

APÉNDICE A

Especificaciones técnicas del equipo

Tabla 17. Especificaciones del biorreactor

| Especificaciones técnicas de sensor Pt100 | |
|---|--------------------------------|
| Rango de Temperatura | -20 °C – 420 °C |
| Contactos terminales | 3EA (3 hilos: A, B, b) |
| Tipo de vaina | Probeta sin cabeza |
| Material del tubo de protección (probeta) | Acero Inoxidable |
| Material de la rosca de fijación | Acero inoxidable |
| Material de aislamiento del cable teflón | Con resguardo electromagnético |
| Longitud de la probeta | 100 mm (3,93 ft) |
| Diámetro de la probeta | 5 mm (0,197 ft) |
| Longitud del cable | 2000 mm (6,5 ft) |
| Diámetro de rosca de fijación | PT (1/4 ') |
| Especificaciones técnicas de transmisor de señal Pt100 | |
| Rango | 0 – 500 °C |
| Tipo de sensor | Pt 100 |
| Precisión | 0,15 % |
| Alimentación | 20 – 30 VDC |
| Salida | 4 – 20 mA (2 hilos) |
| Ajuste | Cero y Span |
| Código | P102194 |
| Especificaciones técnicas del sensor de pH | |
| Rango | 0.001 – 14.000 |
| Tasa máxima | Una lectura por segundo |
| Sondas compatibles | Cualquier tipo y marca |
| Calibración | 1, 2, 3 puntos |
| Compensación temporal | Sí |
| Protocolo de datos | UART & I ² C |
| Dirección predeterminada de I ² C | (0 x 63) |
| Voltaje de operación | 3,3 V – 5 V |
| Formato de datos (comunicación) | ASCII |

| Especificaciones técnicas del sensor de oxígeno disuelto | |
|---|-----------------------------------|
| Rango | 0.01 – 35,99 mg/l |
| Tasa máxima | Una lectura por segundo |
| Sondas compatibles | Cualquier tipo de sonda galvánica |
| Calibración | 1 o 2 puntos |
| Compensación de temperatura, salinidad y presión | Sí |
| Protocolo de datos | UART & I ² C |
| Dirección predeterminada de I ² C | (0 x 61) |
| Voltaje de operación | 3,3 V – 5 V |
| Formato de datos (comunicación) | ASCII |
| Especificaciones técnicas de las bombas peristálticas | |
| Voltaje | DC 12 V |
| Condiciones de trabajo | 0 – 40 °C |
| Humedad relativa | < 80 % |
| Razón de flujo | 0 – 100 ml/min |
| Velocidad de rotación | 0,1 – 100 rpm |
| Tamaño del conductor | ∅: 27,6 mm x h: 37,9 mm |
| Cabezal | ∅: 31,7 mm x h: 37,9 mm |
| Tubos de bomba (ID x OD) | ∅: 2,5 mm x h: 37,9 mm |
| Peso | 250 g |
| Especificaciones del tanque | |
| Capacidad total | 14 litros |
| Capacidad nominal | 10 litros |
| Diámetro | 280 mm |
| Altura del cuerpo | 260 mm |
| Material | Acero AISI SAE 304 |
| Espesor | 1 mm |
| Especificaciones del sistema de agitación | |
| Tipo de impulsor | Turbina “vertical blade” |
| Número de aspas | 6 |
| Diámetro del agitador | 112 mm |
| Potencia del impulsor | 0,5 HP |
| Tasa de circulación interna | 0,012 m ³ /s |
| Velocidad lineal superficial | 0,19 m/s |

| | |
|--|--------------------------|
| Número de baffles | 4 |
| Diámetro del eje | 16 mm |
| Material del eje e impulsor | Acero AISI SAE 304 |
| Especificaciones del sistema de calentamiento | |
| Método de calentamiento | Resistencia externa |
| Flujo de calor | 14,76 W |
| Área de transferencia de calor | 0,062 m ² |
| Tiempo de calentamiento | 2,46 s |
| Coeficiente global de transferencia de calor | 625 W/m ² * K |

Fuente: Ivette Sornoza - Francisco Saeteros - Juan Arias, 2017

Elaboración propia

APÉNDICE B
Manual de usuario

Biorreactor DR-MA – biorreactor de Laboratorio

MANUAL DE OPERACIONES



Biorreactor DR-MA
ESPOL

Guayaquil, Ecuador Teléfono:
+593 995 230 799

Email: ipsornoz@espol.edu.ec saetero@espol.edu.ec jarias@espol.edu.ec

1. CHEQUEO DE LA ENTREGA E INSPECCIÓN

Después de recibir el equipo e inspeccionar cuidadosamente todas las partes del biorreactor para verificar posee algún daño.

En caso de visualizar daños en el equipo, informarlo inmediatamente por medio de una carta de reclamo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Concepto del diseño de *Biorreactor DR-MA*

Biorreactor DR-MA está diseñado para mantener un sistema biológicamente viable para el crecimiento microbiano; posee una capacidad volumétrica máxima de 15L, además de está conectado directamente al ordenador para examinar los parámetros de control del sistema.



Entre las innovaciones que posee *Biorreactor DR-MA*, es el mantenimiento de la esterilidad perfecta, y la curva de temperatura, potencial redox y oxígeno disuelto, además de poseer deflectores móviles que evitan la formación de vórtices y permiten una mejor limpieza del equipo.

2.1.1. Especificaciones

| <u>Características <i>Biorreactor DR-MA</i></u> | |
|--|--|
| Escala del biorreactor | Laboratorio |
| Diseño | Tanque agitado |
| Modo de operación | Batch |
| Control de parámetros | Temperatura, pH, oxígeno disuelto. |
| Agitación | Min: 0 RPM Max: 150 RPM Potencia: 0.5 HP |
| Temperatura | Controlador automático con pt100 Min: Temperatura ambiente Max: 400°C |
| pH | Lector automático con sensor pH-metro Controlador automático con bombas peristálticas (adición de ácido y base) Recipientes para las soluciones ácido y base Tuberías de bombas peristálticas |
| Oxígeno disuelto (OD) | Controlador automático de OD Min: 2 ppm |
| Alertas | Para valores altos y bajos de cada parámetro |
| Dispositivo de muestreo | Válvula en la parte frontal del tanque agitado |
| Dispositivo de enfriamiento | Ventilador |
| Programa para ordenador | Tía Portal - PLC |

2.1.2. Unidad principal de control de Biorreactor DR-MA

La mayoría de los parámetros deben ser controlados, debido a la complejidad de los procesos biológicos, para lo cual existen unidades de control y regulación de pH, temperatura y oxígeno disuelto.

2.1.3. Parámetro agitación

Biorreactor DR-MA utiliza un sistema de agitación de corriente continua, que se compone de un eje y un agitador tipo turbina de 6 paletas, que giran a 120 RPM.

2.1.4. Parámetro temperatura

Para la medición y control de temperatura se utiliza una pt100, la cual se usa para:

- Corrección automática de la temperatura (PID)
- Medición de la temperatura del medio de fermentación

2.1.5. Parámetro pH

Para la medición del pH se utiliza un electrodo de pH o pH-metro, y para su control se utilizan bombas peristálticas, tuberías y vasos de almacenamiento de ácido y base; estas bombas se activan si los niveles de ácido o base se encuentran fuera de los rangos establecidos.

Para el control automático del pH, el programa compara el valor de pH real con el preestablecido. De acuerdo a las diferencias de estos valores, ácido o base serán adicionados al medio.

2.1.6. Parámetro Oxígeno disuelto

Mediante la adición de aire estéril por medio de una bomba con filtro de aire, se controlan los intervalos de 10ml/min para usar como control automático de OD.

2.1.7. Sistema de muestreo

Para disminuir el riesgo de contaminación durante el muestreo, se ha instalado una válvula NPT en la parte frontal del tanque; dicha válvula posee un tapón hermético que evita la contaminación.

2.2. Medidas de seguridad

2.2.1. Precauciones para la manipulación

Seguir las medidas de seguridad y precauciones mientras manipula el *Biorreactor DR-MA* para su seguridad y la del equipo.

- ✚ No calentar el biorreactor vacío.
- ✚ Durante la esterilización, nunca llene más del volumen establecido.



2.2.2. Precauciones para la esterilización

- ✚ Ingrese 12 litros de agua al tanque y programe la temperatura a 100°C. Durante el proceso evite tocar la superficie del tanque para evitar quemaduras.



2.2.3. Precauciones para reactivos y microorganismos peligrosos

- ✚ Mientras manipule reactivos corrosivos y otros reactivos peligrosos utilice mandil, cofia, guantes y siga las instrucciones de seguridad del laboratorio.
- ✚ Durante la manipulación de patógenos y microorganismos peligrosos aplique las medidas de precaución necesarias de acuerdo con las reglas del laboratorio.
- ✚ Mientras que su proceso permita el empleo de otros ácidos tales como H_3PO_4 o H_2SO_4 , no utilice HCl como ácido para la fermentación.



3. INSTALACIONES



El proceso de instalación inicia con la conexión de todos los cables a la unidad principal de control. La unidad de control incluye conectores para los electrodos de pH, OD y temperatura, resistencia de calentamiento y otros microprocesadores que controlan todos los parámetros que necesitan ser medidos y procesados.

3.1. Paso a paso



3.2. Paso a paso (gráficos)

1. Lavar los baffles, el tanque y su tapa



2. Colocar el tanque previamente lavado en la estructura.



3. Colocar la tapa con la base superior



4. Verificar que coincidan todos los agujeros



5. Colocar la resistencia eléctrica



6. Conectar los sensores y los cables de poder



7. Esterilizar los sensores antes de ingresarlos al equipo



8. Equipo armado



3.3. Fuente de energía principal

El cable de la fuente de la energía principal de *Biorreactor DR-MA* tiene que ser conectado a la entrada de energía ubicada en la parte posterior de la unidad principal de control y el sistema es encendido desde la parte de adentro con un breaker rojo que se encuentra en la parte interna superior del mismo.

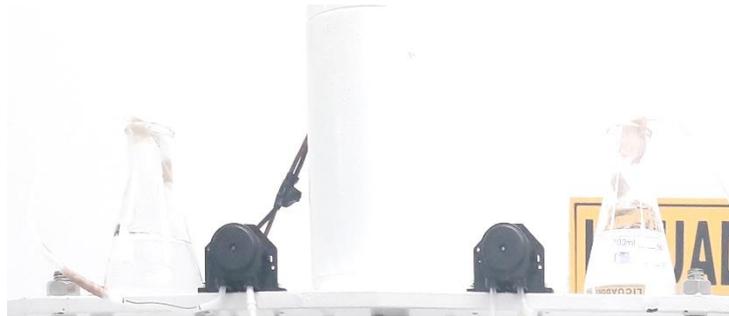
Una vez terminado de conectar completamente las otras conexiones, proceda a enchufar en la fuente de energía.

Verifique los siguientes ítems antes de encender *Biorreactor DR-MA*:

- Entrada de aire
- Bombas peristálticas
- Sensor de pH
- Sensor de OD
- Conexión de los sensores al tablero
- Conexión de la bomba de oxígeno

3.4. Instalaciones de las bombas peristálticas

Las bombas para la adición del ácido y la base empleadas para el control del pH debe ser conectada en la parte lateral del tablero de control.



4. CALIBRACIONES

4.1. Agitador

El parámetro agitación no requiere de calibración, sino de una regulación de las revoluciones por minuto que necesite el proceso.

4.2. Temperatura

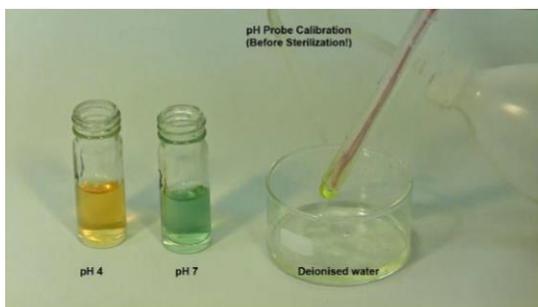
El electrodo de temperatura no puede ser calibrado, ya que los valores reales están validados.

4.3. pH

Para el parámetro potencial de Hidrógeno (pH) se tiene un sistema de calibración de tres puntos con tres soluciones estándares (ácido, base y neutro). La calibración del electrodo de pH, debe realizarse previo a la esterilización.

Seleccione las soluciones de acuerdo al intervalo de pH de trabajo. Para procedimientos con un rango de pH entre 6.0 y 7.0, se recomienda elegir la solución de pH 7, 10 y 4 para la calibración. Para la manipulación de estas sustancias, utilice la protección adecuada.

1. Prepare las soluciones necesarias y lave el electrodo con agua destilada. Seque el electrodo con papel secante



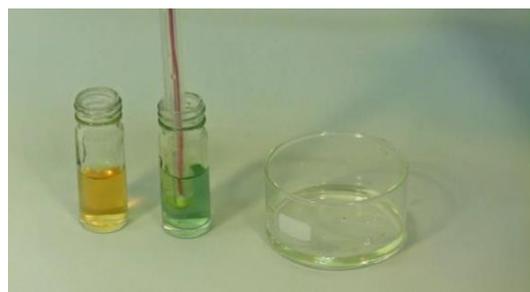
2. Sumerja el electrodo en la solución de calibración y agítelo suavemente. Y el sistema automáticamente guardará el valor.



3. Lave el electrodo con agua destilada y seque con papel secante



4. Sumerja el electrodo en la solución de calibración y agítelo suavemente. Y el sistema automáticamente guardará el valor.



4.4. Oxígeno disuelto

La cantidad de oxígeno disuelto en agua pura cambia con los parámetros: temperatura, la presión del aire y la concentración de sustancias disueltas en el medio.

La variación de la temperatura es regulada automáticamente. La calibración se realiza por lo general después de la esterilización con la agitación adecuada.

La calibración y la medición no pueden hacerse sin agitación. En caso de que la calibración se haga en un recipiente externo, asegúrese de que las burbujas de gas se mezclen bien en la solución.

La calibración del sensor de oxígeno disuelto (OD) tiene que realizarse ANTES y DESPUÉS de la ESTERILIZACIÓN.



5. SISTEMA DE LIMPIEZA

5.1. Procedimiento de preparación

Antes de realizar el procedimiento para desensamblar, limpiar y desinfectar el equipo de manera correcta es importante que primero se deje enfriar el tanque y posteriormente se deben seguir los siguientes pasos:

1. Desconectar de la corriente eléctrica el equipo (resistencia, sistema de enfriamiento, sistema de aireación, agitador)
2. Desenroscar las 4 tuercas de seguridad ubicadas en la parte superior de la tapa del soporte del Biorreactor
3. Desmontar la base superior del equipo
4. Retirar el sensor de temperatura
5. Retirar el tanque
6. Retirar los baffles
7. Retirar el cultivo restante mediante la válvula toma muestra

Una vez desensamblado el equipo en su totalidad se procede a realizar la limpieza del tanque, cabe recalcar que este tipo de limpieza es COP (Clean Out of Place).

5.2. Procedimiento de limpieza del tanque

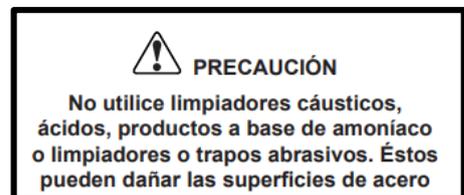
Prelavado

En esta etapa se busca la eliminación de partículas en el tanque antes de aplicar la solución de limpieza. Esto se puede lograr al hacer pasar agua fría o caliente a presión moderada.

Lavado

Se realiza la aplicación de componentes de lavado alcalino debido a que en el tanque habrá un medio ligeramente ácido. El componente de limpieza será un detergente en forma de espuma:

- Nombre producto Químico: Arofoam
- Tipo de producto: alcalino
- Concentración de uso: Disolución de 5%
- Temperatura: Agua a 50 °C
- Presión: 50 – 100 bar
- Tiempo: 5 - 10 minutos



Enjuague

Se realiza un enjuague con abundante agua potable para eliminar todos los rastros de la solución de limpieza. Luego se debe secar el tanque con toallas de papel desechables

Desinfección

Consiste en la aplicación de desinfectante:

- Nombre producto Químico: Peracid
- Tipo de producto: Ácido peracético
- Concentración de uso: 0,5 - 2%
- Temperatura: Ambiente o desde 30 °C
- Tiempo de actuación: 10-30 minutos

5.3. Procedimiento de limpieza del electrodo de pH

Para la limpieza del electrodo de pH será necesario tener agua destilada. Con ayuda de una pipeta, enjuagar el electrodo y luego séquelo con papel toalla antes de su almacenamiento.

5.4. Procedimiento de limpieza del sensor de temperatura

Prelavado

En esta etapa se busca la eliminación de partículas adheridas al sensor antes de aplicar la solución de limpieza. Esto se puede lograr al hacer pasar agua fría o caliente a presión moderada.

Lavado

Su limpieza se realizará por inmersión y se aplicará un componente de lavado alcalino debido a que el sensor va a estar en contacto con un medio ligeramente ácido. El componente de limpieza será un detergente en forma de espuma:

- Nombre producto Químico: Arofoam
- Tipo de producto: alcalino
- Concentración de uso: Disolución de 5%
- Temperatura: 50 °C
- Tiempo: 5 - 10 minutos

Enjuague

Se realiza un enjuague con abundante agua potable para eliminar todos los rastros de la solución de limpieza, luego se debe secar el sensor con toallas de papel desechables.

Desinfección

Consiste en la aplicación de desinfectante:

- Nombre producto Químico: Peracid
- Tipo de producto: Ácido peracético
- Concentración: 0,5 - 2%
- Temperatura: 30 °C (ambiente)
- Tiempo: 10-30 minutos

5.5. Procedimiento de limpieza del agitador

Prelavado

En esta etapa se busca la eliminación de partículas en el agitador antes de aplicar la solución de limpieza. Esto se puede lograr al hacer pasar agua fría o caliente a presión moderada.

Lavado

Este proceso se realizará por inmersión y se aplicará un componente de lavado alcalino debido a que en el agitador va a estar en contacto con un medio ligeramente ácido. El componente de limpieza será un detergente en forma de espuma:

- Nombre producto Químico: Arofoam
- Tipo de producto: alcalino
- Concentración: Disolución de 5%
- Temperatura: 50 °C
- Tiempo: 5 - 10 minutos

Enjuague

Se realiza un enjuague con abundante agua potable para eliminar todos los rastros de la solución de limpieza. Luego se debe secar el tanque con toallas de papel desechables

Desinfección

Consiste en la aplicación de desinfectante:

- Nombre producto Químico: Peracid
- Tipo de producto: Ácido peracético
- Concentración de uso: 0,5 - 2%
- Temperatura: Ambiente o desde 30 °C
- Tiempo de actuación: 10-30 minutos

5.6. Procedimiento de limpieza de la tubería de alimentación

Prelavado

En esta etapa se busca la eliminación de partículas adheridas en la tubería de alimentación antes de aplicar la solución de limpieza.

Lavado

Este proceso se llevará a cabo haciendo pasar por la tubería el componente de lavado alcalino debido a que la tubería estará en contacto con vapores de un medio ligeramente ácido.

El componente de limpieza será un detergente en forma de espuma:

- Nombre producto Químico: Arofoam
- Tipo de producto: alcalino
- Concentración: Disolución de 5%
- Temperatura: 50 °C
- Tiempo: 5 - 10 minutos

Enjuague

Se realiza un enjuague, haciendo pasar abundante agua potable para eliminar todos los rastros de la solución de limpieza.

Desinfección

Consiste en hacer pasar por la tubería el desinfectante:

- Nombre producto Químico: Peracid
- Tipo de producto: Ácido peracético
- Concentración de uso: 0,5 - 2%
- Temperatura: Ambiente o desde 30 °C
- Tiempo de actuación: 10-30 minutos

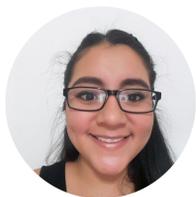
Manual / Guía de usuario de Biorreactor DR-MA

ESPOL

Guayaquil, Ecuador Teléfono:

+593 959 230 799

Email: ipsornoz@espol.edu.ec fsaetero@espol.edu.ec jarias@espol.edu.ec



Ivette Sornoza
ipsornoz@espol.edu.ec
FIMCP



Francisco Saeteros
fsaetero@espol.edu.ec
FIMCP



Juan Arias
jarias@espol.edu.ec
FIEC

DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y VALIDACIÓN DE UN BIORREACTOR A ESCALA DE LABORATORIO CON SISTEMA DE CONTROL AUTOMÁTICO.

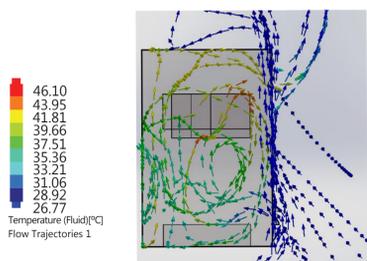
Los biorreactores son sistemas que proporcionan un medio ambiente adecuado y controlado que permite el crecimiento eficaz de las células y la formación de un producto; con el control automatizado de parámetros específicos como agitación, temperatura, potencial de hidrógeno (pH) y oxígeno disuelto.



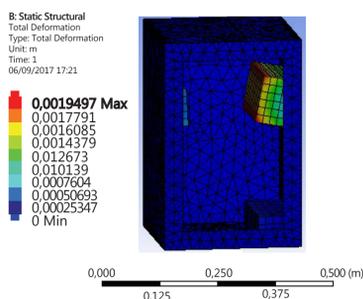
En el Ecuador los laboratorios que necesitan realizar cultivos bacterianos no cuentan con una oferta económicamente accesible de biorreactores con sistema de control automático. Para este proyecto se propuso rediseñar, construir y validar un biorreactor a escala para uso de laboratorio, esto para satisfacer la necesidad que tiene el CIBE y los laboratorios de Ing. en Alimentos para desarrollar procesos biotecnológicos.

PASO 01

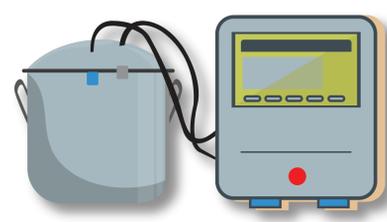
DISEÑO DE TABLERO DE CONTROL



Análisis Térmico



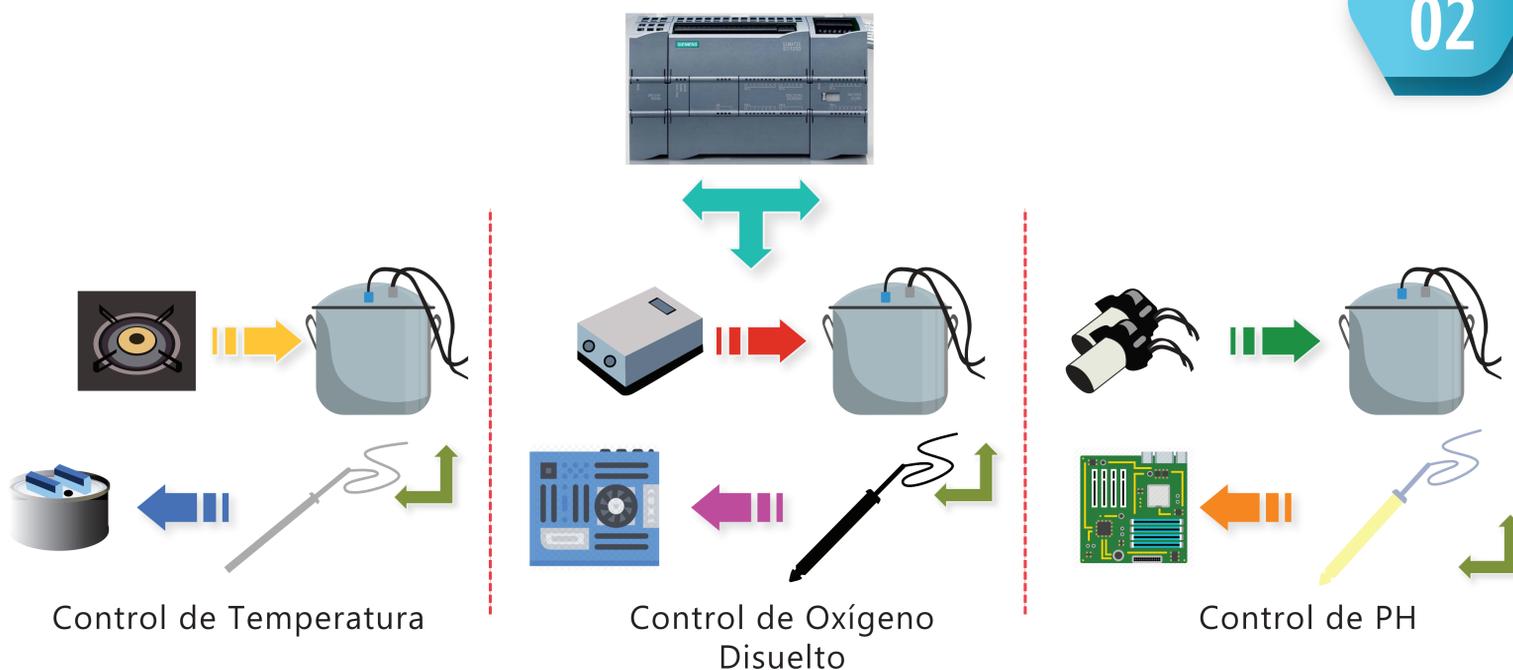
Análisis de Impacto



Biorreactor

CIRCUITO DE SISTEMA DE CONTROL

PASO 02



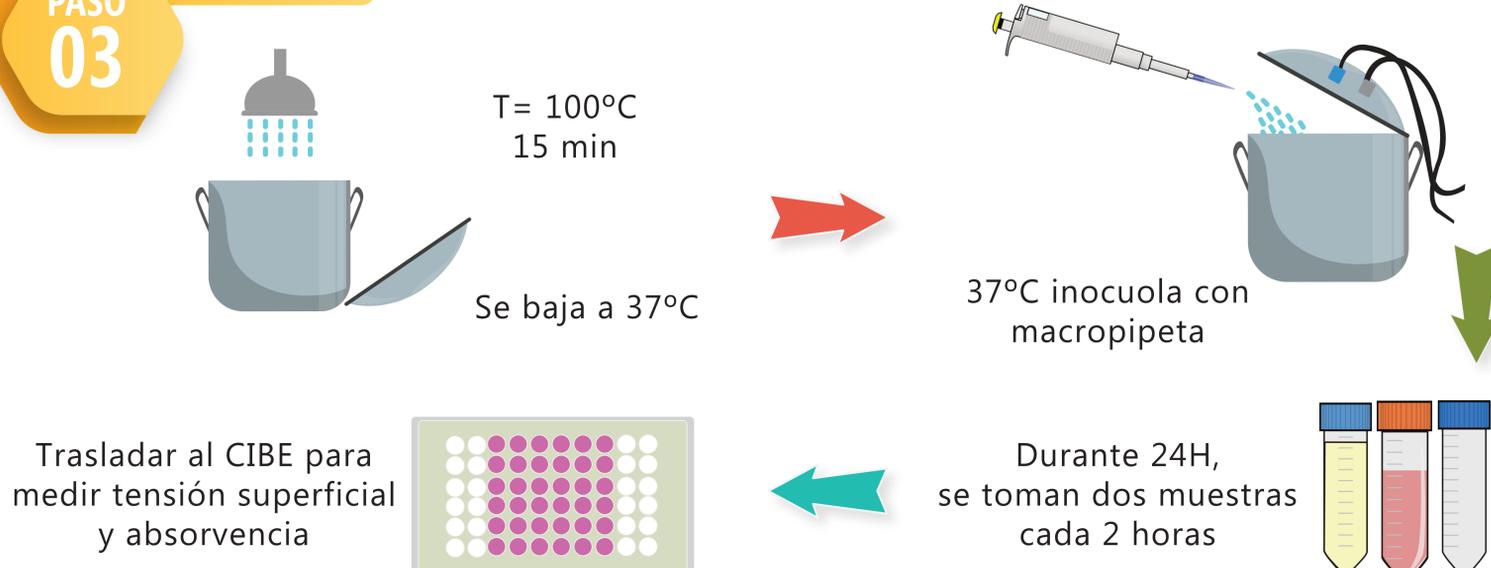
Control de Temperatura

Control de Oxígeno Disuelto

Control de PH

PASO 03

VALIDACIÓN



T= 100°C
15 min

Se baja a 37°C

37°C inocula con macropipeta

Durante 24H, se toman dos muestras cada 2 horas

Trasladar al CIBE para medir tensión superficial y absorbancia

CONCLUSIONES

Se logró diseñar, construir y validar el biorreactor de tanque agitado con sistema de control automático, con la producción de biotensoactivos (*Bacillus subtilis*) y cultivos estándar (*Saccharomyces cerevisiae*), obteniendo resultados favorables para dicha producción.

BIBLIOGRAFÍA

- Jiménez, D., Medina, S., & Gracida, J. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. México.
- Mariam, F. A. I. (2010). Thermal management of outside plant telecommunication cabinets: Design and CFD modeling methodology. The University of Texas at Arlington.