

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

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

“Mejora de la obtención de surfactina a partir de un residuo orgánico de
una industria de alimentos utilizando *Bacillus subtilis*”

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero de Alimentos

Presentado por:

Añazco Menéndez Eduardo Andrés

Castillo Marcillo Verónica Elizabeth

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2020

DEDICATORIA

Este proyecto lo dedico con mucho amor
a:

Mi esposo Daniel y mi hijo Nicolás.

Mis padres: Elizabeth y Jesús.

Mis hermanos: Cristina y Rubén.

Verónica Castillo

El presente trabajo se lo dedico a mi mamá Elsa Menéndez porque ella ha sido el motor para alcanzar este logro, por el esfuerzo que ha realizado por muchos años, porque sin ella todo esto no fuera posible de realizar.

Eduardo Añazco

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a mis padres que han sido mi inspiración desde pequeña y me han apoyado mucho.

Gracias a mi querido esposo Daniel, quien me ha dado su apoyo incondicional durante todos estos años y ha estado en primera fila alentándome. A mi maravilloso hijo, Nicolás, por ser el motor más grande de mi vida.

Agradezco muchos a mis amigos con quien compartí estos largos años de universidad y me han regalado momentos de alegría: Keyla, Andrés, Jhonathan, Luigui, Karla y Paola. Y a mi compañero de proyecto, Eduardo, por compartir este trabajo tan importante conmigo.

Mi más sincero agradecimiento a mis profesores de la universidad, quienes me han formado como una gran profesional, de manera especial a mi tutor de proyecto Jonathan Coronel quien ha sido una guía fundamental para llevar a cabo este proyecto.

Verónica Castillo

AGRADECIMIENTO

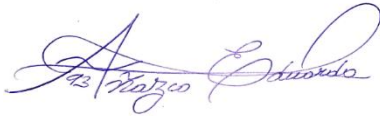
Para mí es importante primeramente agradecer a mi mamá Elsa Menéndez por el esfuerzo y el sacrificio de cada día, por las lecciones de vida y por estar en cada momento; gracias también a mi compañera de vida Katia Borja por la paciencia, por el empuje y por la motivación de seguir hacia adelante por más duro que sea el trayecto. A Verónica Castillo, por ser mi compañera en este trabajo final, a su esfuerzo y a sus conocimientos; además agradezco a mis amigos Jhonathan, Majito, María de los Ángeles, Pedro, Andrea, Lenín, Diego, Henry, que fueron de apoyo en distintos momentos, por los consejos y por ser incondicionales.

Agradecer a los profesores que a lo largo de la carrera compartieron sus conocimientos, sus experiencias, por mantener cada día el interés de la profesión que estamos por ejercer.

Eduardo Añazco

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; (*Añazco Menéndez Eduardo Andrés y Castillo Marcillo Verónica Elizabeth*) y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Añazco Menéndez
Eduardo Andrés



Castillo Marcillo Verónica
Elizabeth

EVALUADORES



Haydee Torres Camba, MSc.

PROFESOR DE LA MATERIA



Jonathan Coronel León, PhD.

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El objetivo de este proyecto es establecer los factores de crecimiento de *Bacillus subtilis* usando la versión gratuita del software *SuperPro Designer*® para simular el proceso de obtención de surfactina con la utilización de residuos orgánicos de la industria de alimentos. Además, proponer el diseño de la planta a escala piloto y establecer los costos de producción para la producción de surfactina. Se determinaron las condiciones iniciales que se requieren ingresar en el software para llevar a cabo la simulación, tales como, ingredientes del medio, flujos de entrada y salida del sistema, temperatura, estequiometría de la reacción. Así se consideró evaluar como fuente de carbono el componente de mayor porcentaje del residuo: melaza (sacarosa), mazorca de maíz (xilosa) y aceite residual de girasol (ácido linoleico). La evaluación del proceso de obtención de surfactina se realizó mediante la simulación de un proceso de fermentación donde se evaluaron diferentes factores: tipo de fuente de carbono, concentración de las fuentes de carbono (12.5, 25 y 50 g/l) y temperaturas de fermentación (30, 32 y 34 °C). Todos los procesos se realizaron en un tiempo de fermentación de 24 horas, donde se logró identificar que los factores más significativos en la producción de surfactina son la fuente de carbono y su concentración, por lo tanto, al utilizar xilosa como fuente de carbono en una concentración de 50 g/l se obtiene una máxima concentración de surfactina. Se diseñó la planta a escala piloto y se obtuvo un costo de producción de \$529.80 por lote.

Palabras Clave: Surfactina, residuo orgánico, biotensioactivos, fermentación.

ABSTRACT

The objective of this project is to establish the growth factors of Bacillus subtilis using the SuperPro Designer software to improve the process of obtaining surfactin with the use of organic waste from the food industry. In addition, to propose the design of the pilot-scale plant and to establish the surfactin's production costs. The initial conditions were determined to start the simulation. The component with the highest percentage of the residue was evaluated as a carbon source: molasses (sucrose), corncob (xylose) and residual sunflower oil (linoleic acid). A fermentation process was simulated to evaluate the surfactin-obtaining process. Different factors were assessed: type of carbon source, concentration of carbon sources (12.5, 25 and 50 g/l) and fermentation temperatures (30, 32 and 34 °C). All the processes were carried out with a fermentation time of 24 hours, where it was possible to identify that the most significant factors in the production of surfactin are the carbon source and its concentration, therefore, when using xylose as a carbon source in a concentration of 50 g/l, a maximum concentration of surfactin is obtained. The pilot scale plant was designed and a production cost per batch of \$ 529.80 was obtained.

Keywords: *Surfactin, organic residue, bio-surfactants, fermentation.*

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación del problema.....	2
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo General.....	2
1.2.2 Objetivos Específicos	3
1.3 Marco teórico	3
1.3.1 Tensioactivos sintéticos	3
1.3.2 Biotensioactivos	5
1.3.3 Características de <i>Bacillus subtilis</i>	7
1.3.4 Aplicaciones de surfactina en la industria de Alimentos	8
1.3.5 SuperPro Designer®	8
CAPÍTULO 2.....	10
2. Metodología	10
2.1 Diseño del medio de cultivo	10
2.2 Determinación de rendimientos en C-mol	11
2.3 Establecimiento de ecuaciones estequiométricas.....	13
2.4 Determinación de coeficientes estequiométricos	13

2.5	Efecto de las condiciones de proceso.....	14
2.5.1	Condiciones de la operación en el simulador	14
2.6	Diseño de una planta productora de surfactina.....	16
2.7	Costos estimados de implementación.....	18
CAPÍTULO 3.....		19
3.	Resultados y análisis	19
3.1	Determinación de los coeficientes estequiométricos.....	19
3.2	Evaluación del proceso de producción de surfactina	19
3.3	Diseño de planta a escala piloto para producción de surfactina	25
3.4	Estimación de costos	28
CAPÍTULO 4.....		30
4.	Conclusiones y recomendaciones	30
4.1	Conclusiones	30
4.2	Recomendaciones	31

BIBLIOGRAFÍA

APÉNDICES

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
MMAyA	Ministerio de Medio Ambiente y Agua
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
TCR	Total Closeness Rating (Índice de Cercanía Total)
TRA	Tabla de Relación de Actividades
FC	Fuente de carbono
FN	Fuente de nitrógeno

SIMBOLOGÍA

Mt	Megatoneladas
mN	MiliNewton
m	Metro
h	Hora
min	Minuto
g	Gramo
kg	Kilogramo
l	Litro
C	Carbono
N	Nitrógeno
O	Oxígeno
H	Hidrógeno
Na	Sodio
P	Fósforo
K	Potasio
Mg	Magnesio
Fe	Hierro
Ca	Calcio
Cl	Cloro
pH	Potencial de hidrógeno
vvm	Volumen de aire por volumen de medio por minuto
sp.	Especie
α	Grado de significancia
Δ	Delta
$Y_{X/S}$	Rendimiento de biomasa
X_f	Concentración final de biomasa
X_o	Concentración inicial de biomasa
S_f	Concentración final de sustrato
S_o	Concentración inicial de sustrato
$Y_{P/S}$	Rendimiento de biomasa
μ_{max}	Velocidad específica máxima
K_s	Constante de saturación

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura de la surfactina.....	6
Figura 2.1 Modelo de caja negra para la estequiometría microbiana	11
Figura 2.2 Corrientes del fermentador. Fuente SuperPro Designer®.....	15
Figura 2.3 Diagrama de proceso para la obtención de surfactina	17
Figura 3.1 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de surfactina	20
Figura 3.2 Influencia de la concentración de la fuente de carbono.....	21
Figura 3.3 Influencia de los factores en la producción de surfactina	23
Figura 3.4 Influencia de la interacción de factores en la producción de surfactina.....	23
Figura 3.5 Curva de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i>	24
Figura 3.6 Diseño propuesto para planta piloto	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Equipos del simulador <i>SuperPro Designer</i> ®	9
Tabla 2.1 Medio de cultivo inicial (Robalino & Cerda, 2020)	10
Tabla 2.2 Residuos orgánicos y componente de mayor porcentaje	10
Tabla 2.3 Rendimientos de biomasa y producto.....	12
Tabla 2.4 Rendimientos de biomasa y producto en C-mol	13
Tabla 2.5 Diseño experimental para la simulación	14
Tabla 2.6 Componentes y concentraciones de las corrientes de entrada	15
Tabla 2.7 Condiciones de operación para la simulación	16
Tabla 2.8 Escala de los valores de proximidad para T.R.A.	18
Tabla 3.1 Coeficientes de las ecuaciones estequiométricas	19
Tabla 3.2 Área requerida por actividad.....	25
Tabla 3.3 Índice de cercanía total.....	26
Tabla 3.4 Costo de producción por lote	28
Tabla 3.5 Comparación del costo de los medios de cultivo	29

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La industria de alimentos debe establecer procesos de limpieza y desinfección que permitan mantener inocuos los alimentos. Para llevar a cabo dichos procedimientos, es primordial utilizar productos químicos que actúen con eficacia. Los surfactantes o tensoactivos son usados en la industria alimentaria debido a sus amplias aplicaciones: detergentes, espumantes, emulsionantes o humectantes (Morales, 2007). El porcentaje anual estimado a nivel mundial de producción de tensoactivos es de 13 millones de toneladas, siendo Europa el mayor consumidor de tensoactivos, seguido de Norteamérica (Ríos, 2014). Solo en Europa en el 2008 hubo un consumo total de 2.98 Mt de surfactantes. Del total estimado, aproximadamente el 40% equivale a las formas aniónicas, que representa el tipo de tensoactivo más utilizado debido a sus excelentes propiedades y altos rendimientos (Jardak et al., 2015).

El uso de tensoactivos químicos tiene muchas ventajas a nivel industrial desde el punto de vista económico e higiénico-sanitario, pero al considerarlo desde la perspectiva ambiental, estos compuestos representan un gran problema, debido a que pueden contaminar los medios acuáticos (Ríos, 2014). En la actualidad, el uso de surfactantes en productos químicos de limpieza en la industria de alimentos genera preocupaciones ambientales. Una vez que cumplen su función estos compuestos llegan a plantas de tratamiento de aguas en donde algunos son biodegradados y los que no se degradan permanecen activos llegando a diferentes ecosistemas como lagos, ríos y/o hogares (Ríos, 2014).

Algunos autores concuerdan en que se dan altos niveles en la biodegradación de tensoactivos con la utilización de procesos anaeróbicos, pero también hay experimentaciones donde se indica que se inhibe la biodegradación cuando las concentraciones de estos tensoactivos sobrepasan los 50 mg/l (Ríos, 2014). Entre los principales problemas que se presentan cuando estos compuestos se encuentran en el agua están: efectos tóxicos sobre organismos, disminución de tasa de re-oxigenación y generación de residuos tóxicos para humanos (Ríos, 2014). Por lo

tanto, es necesario buscar alternativas que permitan sustituir los tensoactivos sintéticos en la formulación de detergentes. Los biotensoactivos son compuestos biológicos generados por bacterias, las cuales utilizan sustratos que incluso pueden contener residuos orgánicos. Además, a diferencia de los tensoactivos químicos, los biotensoactivos son biodegradables, obteniendo gran compatibilidad con el medio ambiente (Liu et al., 2015). Dentro de los biotensoactivos se identifica la surfactina producida por *Bacillus subtilis*, la cual presenta una actividad antibacteriana y antifúngica (Jiménez et al., 2010).

1.1 Justificación del problema

La industria de alimentos ofrece gran variedad de productos y de estos se generan una gran cantidad de residuos orgánicos, los mismos que al no ser manejados correctamente ocasionan afectaciones medioambientales y sociales. En el 2014, en Ecuador se generó 4.06 millones de toneladas métricas de residuos. De este total solo el 28% logra ser controlada en los rellenos sanitarios en su proceso inicial, pero por falta de administración y recursos, terminan en botaderos. El otro 72% termina directamente en botaderos a cielo abierto (ríos, terrenos baldíos, entre otros) provocando problemas ambientales y de salud (MMAyA, 2002). Por lo tanto, los planteamientos que surgen sobre el manejo de residuos orgánicos es su aprovechamiento en otras áreas, por ejemplo, ser fuente de nutrientes para un microorganismo con la finalidad de obtener biotensoactivos como la surfactina.

Con este proyecto se espera tener un aprovechamiento adecuado de algunos residuos, al emplearlos como materia prima en el proceso de obtención de surfactina, para que posteriormente, estos tensoactivos biológicos reemplacen a los compuestos sintéticos en la formulación de detergentes.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Establecer los factores de crecimiento de *Bacillus subtilis* utilizando el software SuperPro Designer® para la mejora en la obtención de surfactina.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Seleccionar el residuo orgánico que maximice la producción de surfactina.
2. Analizar los factores de crecimiento más significativos para la obtención de surfactina.
3. Proponer el diseño de planta a escala piloto para la producción de surfactina.
4. Calcular el costo de producción del biotensoactivo microbiano considerando su producción a escala piloto.

1.3 Marco teórico

1.3.1 Tensoactivos sintéticos

Los tensoactivos son compuestos químicos conformados por dos regiones, una hidrófila y otra hidrófoba. Gracias a estas regiones tienen la capacidad de reducir la tensión interfacial entre dos fases inmiscibles (Effendy & Maibach, 2006).

Para los compuestos de limpieza, los tensoactivos tienen la propiedad de facilitar el transporte y sanitización sobre una superficie. Debido a su estructura presentan varias propiedades: ser soluble por lo menos en una de las fases de la solución; y, en un sistema soluto-solvente cuando la concentración de soluto excede su límite son capaces de formar micelas (Marriott & Gravani, 2006).

Tipos de Tensoactivos

Mediante la capacidad de formar iones en presencia de otros compuestos existen cuatro tipos de tensoactivos: aniónicos, catiónicos, anfóteros y no iónicos.

- **Aniónicos**

Los tensoactivos aniónicos más empleados son los que presentan en su estructura moléculas de alquil-carboxilatos, iones sulfato y sulfonatos (Effendy & Maibach, 2006). Estos compuestos poseen la particularidad

de formar iones de carga negativa, otorgándole una excelente acción de detergente, pero baja acción bactericida (Marriott & Gravani, 2006).

- **Catiónicos**

Estos compuestos se caracterizan por tener al menos una sección hidrofóbica enlazada a un átomo de nitrógeno con carga positiva (Ivanković & Hrenović, 2009). Cuando son disueltas en agua ejercen la función de tensoactivos, destacando las sales de amina y de amonio cuaternario. Sin embargo, su utilidad convencional es para el control de microorganismos (Effendy & Maibach, 2006).

- **Anfóteros**

Este tipo de tensoactivos en su estructura presentan un grupo catiónico (carga positiva), y un grupo aniónico (carga negativa), lo cual les concede propiedades de desinfectantes y detergentes (Marriott & Gravani, 2006). La variación del pH en el medio que se emplean les da la capacidad de cambiar su funcionalidad (Ivanković & Hrenović, 2009).

- **No Iónicos**

Los tensoactivos no iónicos presentan un equilibrio entre las regiones hidrófobas e hidrófilas, por lo cual sus propiedades no se ven afectadas por el pH de la solución. Una característica fundamental es que no se disocian en una solución acuosa, comúnmente el agua (Ivanković & Hrenović, 2009).

Usos de los tensoactivos sintéticos

Están constituidos por una gran variedad de estructuras lo que conlleva su utilización en diferentes aplicaciones. En el proceso industrial incluyen la fabricación de productos alimenticios, farmacéuticos, cuidado personal y detergentes (Schramm, Stasiuk, & Marangoni, 2003).

Alteración a causa del uso de tensoactivos

Mediante la descarga de líquidos residuales en aguas superficiales, estos compuestos ingresan al medio ambiente afectándolo negativamente, ya

que son elevadamente tóxicos para los organismos del medio. El lodo de aguas residuales es utilizado como fertilizantes en la agricultura, y se han encontrados en ellos concentraciones elevadas de tensoactivos y otros contaminantes (Ying, 2006).

Las plantas de tratamientos de aguas residuales se encargan de eliminar una proporción de los tensoactivos procedentes de las industrias; sin embargo, como no es posible eliminar su totalidad, estos compuestos terminan alojándose en aguas superficiales o en el suelo. Por esta razón, se realizan monitoreos periódicamente para controlar las concentraciones de tensoactivos aniónicos, no iónicos y catiónicos, siendo los catiónicos uno de los más tóxicos para el medio ambiente y a su vez un eficaz bactericida. Finalmente, los tensoactivos catiónicos afectan directamente a los ecosistemas acuáticos y a la calidad del suelo (Ivanković & Hrenović, 2009).

1.3.2 Biotensoactivos

Representan un grupo heterogéneo de moléculas tensoactivas que son producidas mediante bacterias y poseen propiedades hidrófilas e hidrófobas (Guñida, et al., 2012).

Clasificación de los biotensoactivos

Debido a su naturaleza química y peso molecular, los biotensoactivos se clasifican en lipopéptidos, glicolípidos, aminoácidos modificados y ácidos grasos, los cuales son de bajo peso molecular; y polímeros extracelulares, de alto peso molecular (Raiger & López, 2009). En la actualidad, hay dos tipos de biotensoactivos que son relevantes industrialmente y viables económicamente, los glicolípidos y lipopéptidos (Geys et al., 2014). Entre los biotensoactivos lipopéptidos principales están las surfactinas, iturinas y fengicinas, destacando la surfactina por su gran aplicación industrial (Geys et al., 2014).

- **Surfactina**

Las surfactinas son heptapéptidos como se muestra en la figura 1.1 su estructura química está conformado por un ácido graso β-hidroxilo unido mediante cadenas de 13 a 16 átomos de carbono (Cobo, 2017). Este compuesto, logra reducir la tensión superficial del agua de 72 a 27 mN/m utilizando bajas concentraciones, además es utilizado como antimicrobiano, antiviral y en actividades antitumorales (Chamy & Rosenkranz, 2013). La surfactina es uno de los biotensoactivos más poderosos, provoca la reducción de la tensión superficial del agua usando concentraciones menores del 0.005 % en peso (Jiménez et al., 2010).

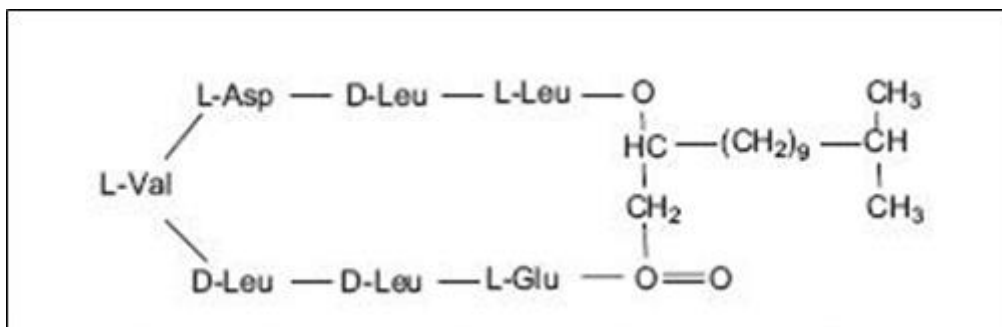


Figura 1.1 Estructura de la surfactina (Jiménez et al., 2010)

- **Iturinas**

Las iturinas, al igual que las surfactinas, son heptapéptidos, pero con ácidos grasos β-amino con 14 a 17 átomos de carbono. Este grupo, presenta propiedades antifúngicas y favorece la inhibición de algunos patógenos en plantas (Cobo, 2017).

- **Fengicinas**

Las fengicinas son decapeptidos que contienen en el interior un anillo de lactosa unida a los péptidos y un ácido graso β-hidroxilo con 14 a 18 átomos de carbono, estos últimos pueden ser saturados o insaturados (Cobo, 2017).

1.3.3 Características de *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis de la familia *Bacillaceae* pertenece al género *Bacillus*, es una bacteria Gram positiva, productora de esporas que resiste altas temperaturas (Cuervo, 2010). Morfológicamente presenta forma de bacilo con bordes redondos, esporas esféricas y centrales. Las colonias miden de 2 a 4 mm, son de aspecto liso o rugoso, de bordes ondulados o extendidos en el medio (Realpe et al., 2002). En la producción de los diferentes biotensoactivos y sus microorganismos productores, destaca *Bacillus* sp. presentando gran interés comercial (Chamy & Rosenkranz, 2013).

Compuestos bioactivos

El género *Bacillus* comúnmente es considerado como productor microbiano de moléculas bioactivas, inhibiendo crecimiento de fitopatógenos. La formación de endosporas favorece su uso para el desarrollo de productos antifúngicos. Aproximadamente 5% de los genomas de *Bacillus subtilis* sintetizan antibióticos y producen compuestos antimicrobianos (Ongena & Jacques, 2008).

Producción económica de biotensoactivos

El crecimiento de *Bacillus subtilis* requiere de sustratos que contengan fuentes de carbono y nitrógeno. Cuando se presenta la limitación de dichos nutrientes las bacterias se estresan y esporulan, requiriendo necesariamente fuentes de carbono como la glucosa, sacarosa, harina de maíz y almidón; y como fuentes de nitrógeno, la peptona, levadura y sales minerales (Castañeda & Sánchez, 2016).

Una alternativa rentable para el aprovechamiento de residuos o subproductos de la industria alimentaria es la utilización de estos como sustratos. La utilización de sustratos es aprovechada por la acción de microorganismos, cuya actividad metabólica permite obtener compuestos de interés. Básicamente, el proceso consiste en poner en contacto el microorganismo con el sustrato en un ambiente óptimo.

Tipos residuos usados como sustrato

Suero de leche: Sustancia líquida obtenida al separar el coágulo de la leche cuando se elabora quesos. Entre los principales nutrientes que contiene están la lactosa, proteínas, lípidos y sales minerales. El suero de leche aporta esencialmente con lactosa, la cual es la fuente de carbono que reacciona bioquímicamente con el microorganismo para producir biomasa (Parra, 2009).

Melaza: Según la Norma INEN 261, la melaza es un subproducto obtenido durante el proceso de elaboración de azúcar de caña, en donde el elevado contenido de sacarosa e impurezas ya no permite seguir el proceso de cristalización. El aprovechamiento de melaza puede darse en procesos de fermentación utilizándolo como sustrato para la obtención de metabolitos (Fajardo & Sarmiento, 2007).

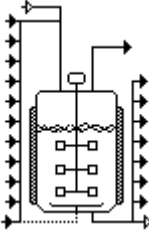
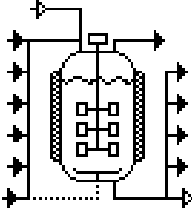
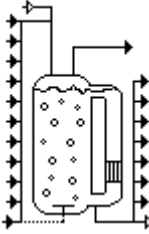
1.3.4 Aplicaciones de surfactina en la industria de Alimentos

Para realizar correctamente un proceso de limpieza se emplean compuestos que faciliten la eliminación de residuos y microorganismos presentes en suelos, equipos, paredes, mesas, utensilios, etc. Los tensoactivos tienen la propiedad de reducir la tensión superficial del agua que, en contacto con una superficie, permite el desprendimiento y la suspensión de la suciedad de los implementos de trabajo (Marriott & Gravani, 2006).

1.3.5 SuperPro Designer®

Es un programa computacional que permite realizar la simulación de procesos en estado estacionario. Esta herramienta tiene incorporado modelos matemáticos que abarcan 17 operaciones unitarias, algunas de estas incluyen: filtración, centrifugación, destilación, reacción estequiométrica, entre otras. Cada operación contiene equipos que están diferenciados esquemáticamente (Intelligen, 2010). En la tabla 1.1 se muestran ejemplos de algunos de los esquemas de los equipos.

Tabla 1.1 Equipos del simulador *SuperPro Designer*®

Nombre del equipo	Ícono
Fermentor	
Seed Fermentor	
Air Lift Fermentor	

El simulador también tiene incorporada una biblioteca con aproximadamente 370 componentes con sus respectivas propiedades, además de que permite ingresar cualquier componente nuevo. Debido a lo anterior, el programa permite efectuar los balances de materia y energía, y por tanto dimensionar los equipos. Los resultados se presentan como reportes que pueden ser exportados a Excel y los diagramas a AutoCad (Intelligen, 2010). La modalidad para trabar con el simulador lleva la siguiente secuencia:

1. Especificación de la modalidad de operación (batch o continua).
2. Construcción de diagrama de flujo.
3. Registro de componentes.
4. Iniciación de procesos.
5. Iniciación de las corrientes de entrada.
6. Resolución de los balances de materia y energía.
7. Generación de reportes.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Diseño del medio de cultivo

El medio de cultivo se diseñó a partir de los componentes presentados en la tabla 2.1. La fuente de carbono de este medio inicial es glucosa y la sustitución de esta se la realizó con el uso de residuos orgánicos como melaza, mazorca de maíz y aceite residual de girasol. En la tabla 2.2 se muestra el componente de mayor porcentaje considerado para cada uno de los residuos. La fuente de nitrógeno se mantuvo constante para el diseño de todos los medios, en donde solo se usó nitrato de sodio.

Tabla 2.1 Medio de cultivo inicial (Robalino & Cerda, 2020)

Componente	Unidad (g/l)
D-Glucosa	20
Extracto de levadura	1
NaNO ₃	8.5
Na ₂ HPO ₄	5.7
KH ₂ PO ₄	4
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.21
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01
CaCl ₂	7x10 ⁻⁶

Tabla 2.2 Residuos orgánicos y componente de mayor porcentaje

Residuo orgánico	Fuente de carbono	Fórmula	Peso molecular (g/mol)
Melaza	Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.3
Mazorca de maíz	Xilosa	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.13
Aceite residual de girasol	Ácido Linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O	280.45
Medio inicial	Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16

En esta primera etapa se realizó la evaluación de los residuos orgánicos descritos anteriormente, como potenciales alternativos a la fuente de carbono convencional. Estos residuos orgánicos pueden ser aprovechados de las

industrias azucareras (melaza), industria molinera (mazorca de maíz) e industria de snacks fritos (aceite de girasol).

La selección de la mejor fuente de carbono se realizó a través del simulador *SuperPro Designer*, para lo cual en el análisis de estequiometría se consideró el modelo de caja negra representado en la figura 2.1.

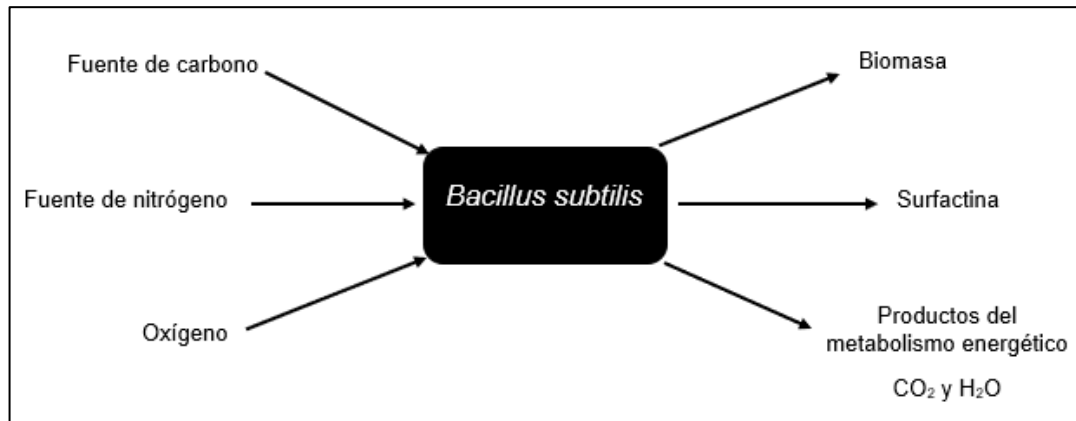
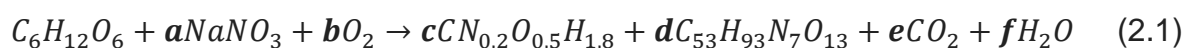


Figura 2.1 Modelo de caja negra para la estequiometría microbiana

2.2 Determinación de rendimientos en C-mol

Tomando como base el modelo de caja negra se estableció la ecuación 2.1, tomando como referencia glucosa como fuente de carbono. Los coeficientes “c” y “d” de la ecuación representan los rendimientos de biomasa y surfactina, respectivamente.

En los reactivos se incluyó la fuente de carbono, nitrógeno y oxígeno, este último elemento debido a que el proceso se da aeróbicamente. En los productos de la reacción se planteó como fórmula de biomasa $CN_{0.2}O_{0.5}H_{1.8}$ representando la composición estándar de un microorganismo (Casteñeda, 2019). Además, como el objeto de estudio es obtener como producto surfactina, $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$ que representa la fórmula de esta, también se incluyó como producto de la reacción.



En base a la ecuación 2.1, fue necesario determinar los rendimientos de la producción de biomasa y surfactina de cada residuo evaluado, los cuales fueron seleccionados a partir de revisión bibliográfica. La selección de estos rendimientos fue realizada considerando información relacionada con la producción de surfactina, donde se utilizó *Bacillus subtilis* y los residuos orgánicos descritos en la tabla 2.2.

En la tabla 2.3 se observan los rendimientos calculados en cada experimentación a partir de las curvas de crecimiento celular, dichos rendimientos están representados en cantidad de biomasa y surfactina producida por cantidad de sustrato consumido.

Tabla 2.3 Rendimientos de biomasa y producto en la producción de surfactina

Residuo orgánico	Rendimientos		Condiciones		Referencia
	Biomasa (g/g)	Surfactina (g/g)	Velocidad (rmp)	Temperatura (°C)	
Melaza	0.138	0.046	200	36	(Rocha, 2017)
Mazorca de Maíz	0.02	0.036	200	37	(Chen, et al., 2017)
Aceite residual de girasol	0.085	0.015	160	30	(Vedaraman & Venkatesh, 2011)
Medio inicial (glucosa)	0.091	0.021	160	30	(Vedaraman & Venkatesh, 2011)

Para calcular el rendimiento de biomasa y surfactina se utilizaron las ecuaciones 2.2 y 2.3, respectivamente.

$$Y_{x/s} = \frac{\text{Biomasa producida}}{\text{FC consumida}} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (2.2)$$

$$Y_{p/s} = \frac{\text{Surfactina producida}}{\text{FC consumida}} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_p}{S_0 - S_f} \quad (2.3)$$

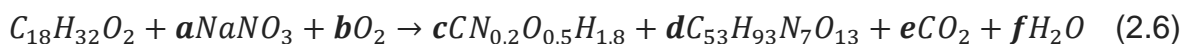
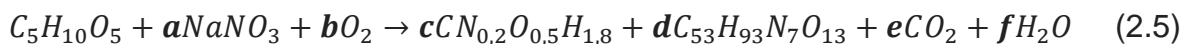
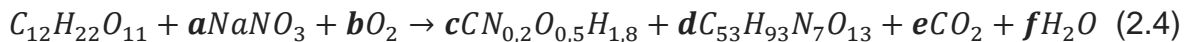
Los rendimientos calculados a partir de las ecuaciones anteriores se las convirtió a C-mol como se presenta en la tabla 2.4.

Tabla 2.4 Rendimientos de biomasa y producto en la producción de surfactina en C-mol

Residuo orgánico	Rendimientos	
	Biomasa (Cmol _b /Cmol _s)	Surfactina (Cmol _p /Cmol _s)
Melaza	0.158	0.065
Mazorca de Maíz	0.024	0.054
Aceite residual de girasol	0.053	0.012
Medio inicial (glucosa)	0.111	0.034

2.3 Establecimiento de ecuaciones estequiométricas

Una vez que se determinaron los rendimientos, se plantearon las ecuaciones para cada uno de los residuos evaluados usando como base la ecuación 2.1. A continuación, se presentan las ecuaciones planteadas para las tres fuentes de carbono de los diferentes residuos orgánicos:



Donde la ecuación 2.4 expresa la reacción de la sacarosa; la ecuación 2.5 la xilosa y la ecuación 2.6 el ácido linoleico.

2.4 Determinación de coeficientes estequiométricos

Los coeficientes detallados en las ecuaciones 2.1, 2.4, 2.5 y 2.6 como a, b, c, d, e, y f representan los rendimientos de cada componente de la reacción. Para calcular estos coeficientes primero se debe representar los elementos a un átomo de carbono en cada compuesto que presente dicho elemento, luego pasar los rendimientos de g a Cmol. Este último procedimiento es necesario, ya que, si los elementos se expresaron en Cmol, el balance solo es válido si

se usan los rendimientos con las mismas unidades (Casteñeda, 2019). Finalmente, se determinaron los coeficientes planteando ecuaciones a partir del balance de C, H, O y N, como ejemplo del balance de carbono se presenta la ecuación 2.7.

$$1 = c + d + e \quad (2.7)$$

2.5 Efecto de las condiciones de procesos en la obtención de surfactina utilizando el software SuperPro Designer®

En esta etapa se evaluó el efecto del tipo de sustrato, concentración de sustrato, temperatura y aireación sobre la producción de surfactina con el programa *SuperPro Designer*, para lo cual se realizó un diseño factorial general. En la tabla 2.5 se observan las temperaturas, tipo de sustrato y concentración de sustrato.

Se realizaron un total de 36 corridas (apéndice A), mediante la combinación de los diferentes factores con sus respectivos niveles.

Tabla 2.5 Diseño experimental para la simulación

Factores	Niveles			
Fuente de carbono (FC)	Sacarosa	Xilosa	Ácido linoleico	Glucosa
Temperatura (°C)	30	32	34	-
Concentración inicial de la FC (g/l)	12.5	25	50	-

2.5.1 Condiciones de la operación en el simulador

El modo de operación con el que se trabajó fue tipo discontinuo. Se seleccionaron los componentes para simular el proceso de fermentación desde la base de datos del programa y aquellos componentes que no existían se los registró con sus propiedades físicas. Posteriormente, se colocó el fermentador con las corrientes de entrada y salida, como se evidencia en la figura 2.2.

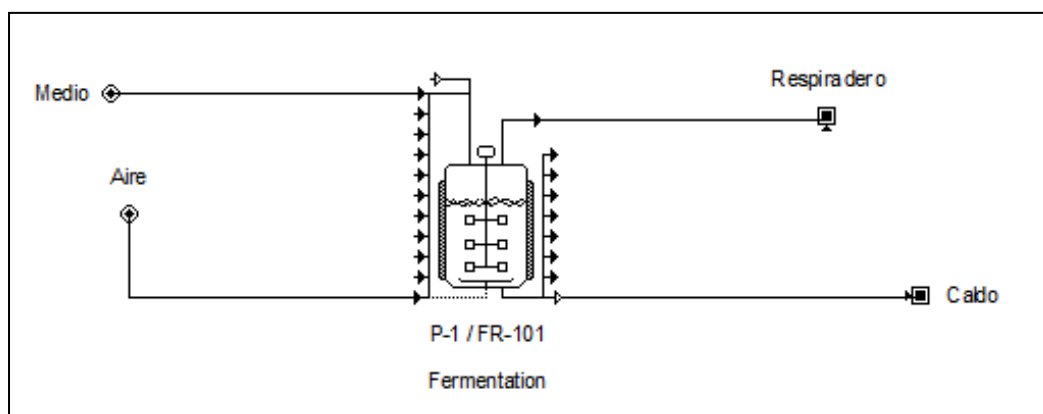


Figura 2.2 Corrientes del fermentador. Fuente SuperPro Designer®

En la tabla 2.6 se observa los componentes que se registraron para las corrientes de entrada, también debido a la configuración del simulador se debe considerar un flujo de aire constante de 0.6 vvm para realizar la debida fermentación, y se detallan las cantidades ingresadas de cada uno. En la corriente del medio se registró que este ingresa al fermentador con una temperatura de 25 °C.

Tabla 2.6 Componentes y concentraciones de las corrientes de entrada

Componentes	Flujo (kg/batch)	
	Corriente del Medio	Corriente de Aire
Fuente de carbono	1.25 / 2.5 / 5 *	-
Nitrato de sodio	0.85	-
Agua	100	-
Biomasa	0.01	-
Aire	-	Autoajuste

* Los tres valores de la fuente de carbono varían dependiendo de la concentración inicial de sustrato

Luego de definirse las corrientes del proceso, se añadió las operaciones necesarias para llevar a cabo el proceso en el fermentador, estas fueron: carga del medio, calentamiento, y fermentación. En la operación de fermentación se establece una duración de 24 horas para todos los casos de estudio, y además en la tabla 2.7 se especifican las condiciones para el resto de las operaciones.

Tabla 2.7 Condiciones de operación para la simulación

Operación	Cantidad	Tiempo configuración	Tiempo de proceso	
			Duración	Basado en velocidad
Carga del medio	102.11 / 103.36 / 105.86 kg *	10 min	-	-
Calentamiento	-	5 min	-	0.5 °C/min
Fermentación	102.11 / 103.36 / 105.86 kg *	-	24 h	-

* Los tres valores de la carga del medio y fermentación varían dependiendo de la concentración inicial de sustrato.

En la operación de fermentación se registró la ecuación estequiométrica con sus respectivos coeficientes y se marcó la fuente de carbono como el sustrato de referencia, además se designó a la biomasa como componente referente de la velocidad de reacción. Dentro de la cinética de la fermentación de esta operación también se especificó que el modelo sigue la cinética de Monod y se especificaron los parámetros cinéticos como la velocidad específica máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) y la constante de saturación (k_s) según la fuente de carbono utilizada (Mageshwaran et al., 2014) y la variación de estos parámetros para las diferentes temperaturas se realizó con el predictor de *ComBase*.

Por otra parte, en esta misma operación se debe especificar los perfiles de salida que se deseaban obtener, en este caso se seleccionó biomasa, fuente de carbono y surfactina. Los resultados se obtuvieron en hojas de Excel y posteriormente se ingresaron en Minitab® para analizar los datos y obtener una gráfica de interacción de los factores estudiados.

2.6 Diseño de una planta productora de surfactina

La propuesta para el diseño de la planta piloto se elaboró a partir de un diagrama de procesos. El diagrama de proceso para la obtención de surfactina se lo dividió en dos etapas, como se muestra en la figura 2.3. La primera etapa se la realizó en referencia a la experimentación (Robalino & Cerda, 2020),

donde solo se consideró el proceso hasta la obtención de biomasa. La segunda etapa para la obtención de surfactina se elaboró considerando el proceso de extracción y purificación descrito en bibliografía (Sousa, 2014).

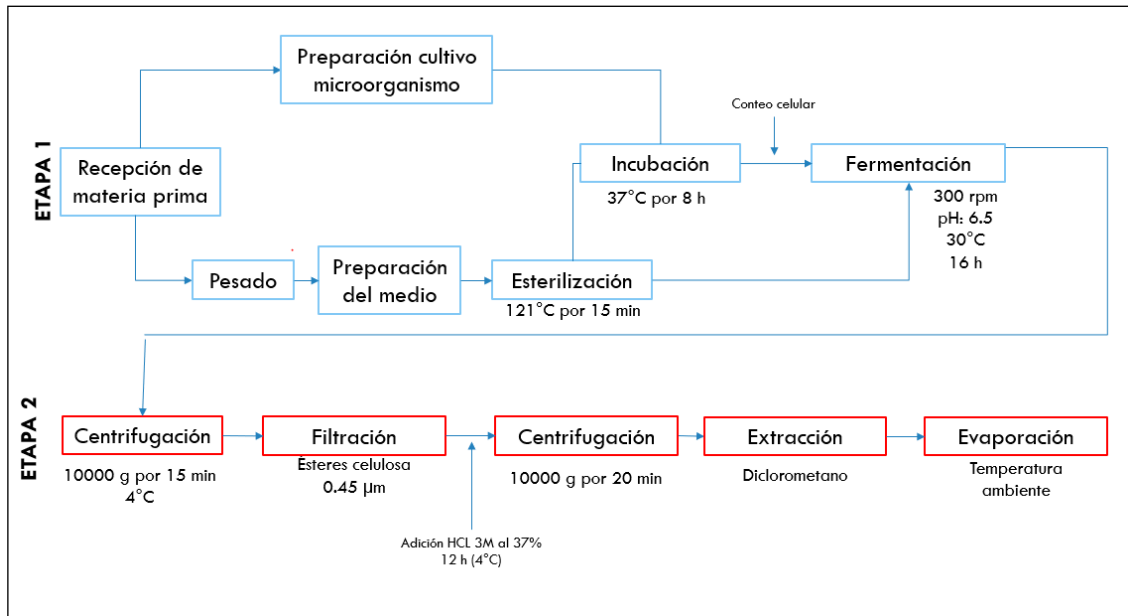


Figura 2.3 Diagrama de proceso para la obtención de surfactina

En base a cada etapa del proceso se determinaron los equipos requeridos y sus dimensiones (ancho X largo), además se incluyen el área administrativa, y el área de higiene personal; para establecer el espacio que se requiere en metros cuadrados (m²), tal como se indica en el Apéndice C. Para la distribución de la planta piloto, se analizan las relaciones existentes entre cada etapa del proceso mediante los diferentes niveles de proximidad tal como se muestra en la Tabla 2.8, obteniendo así se elabora una Tabla de Relación de Actividades (TRA), para lograr un óptimo empleo de los metros cuadrados destinados para la planta piloto (Casp, 2005).

Tabla 2.8 Escala de los valores de proximidad para T.R.A.

CODIGO	PROXIMIDAD	COLOR
A	Absolutamente necesario	Rojo
E	Especialmente importante	Amarillo
I	Importante	Verde
O	Ordinario	Azul
U	Sin importancia	Negro
X	Rechazable	Café

Finalmente, se realizó la distribución empleando dos programas: *CoreLap*, con el cual se obtiene un esquema sobre la distribución de los equipos, y *Microsoft Office Visio* donde se elaboró un plano a escala de la planta piloto.

2.7 Costos estimados de implementación

Para estimar los costos de operación se consideró la materia prima, reactivos, consumo de agua, el consumo de energía de los equipos utilizados en el proceso y otros gastos indirectos. Por otra parte, se realizó una comparación del costo de dos procesos de fermentación: el primero utilizando como medio de cultivo el residuo que obtuvo el mejor rendimiento de surfactina, y el segundo en donde se usó un medio de cultivo convencional con glucosa.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Determinación de los coeficientes estequiométricos

Los coeficientes estequiométricos que se calcularon para realizar el balance de masa en el proceso de fermentación y se presentan en la tabla 3.1. Los valores de a, b, c, d, e, y f representan los coeficientes de la fuente de nitrógeno, oxígeno, biomasa, surfactina, dióxido de carbono y agua, respectivamente. Se utilizó los sustratos en su forma de Cmol y se verificó que los coeficientes balanceados sean los correctos, realizando un conteo de cada elemento en los reactivos y productos.

Tabla 3.1 Coeficientes de las ecuaciones estequiométricas

Fuente de carbono	Coeficientes (Cmol/Cmol)					
	a	b	c	d	e	f
Sacarosa	0.038	0.669	0.158	0.065	0.777	0.699
Xilosa	0.010	0.886	0.024	0.054	0.922	0.930
Ácido linoleico	0.012	1.303	0.053	0.012	0.935	0.842
Glucosa	0.026	0.851	0.111	0.034	0.923	0.870

3.2 Evaluación del proceso de producción de surfactina

Una vez finalizada el proceso de simulación de producción de surfactina se obtuvieron los siguientes resultados:

En el análisis de los factores de estudio se obtuvo el diagrama de Pareto presentado en la figura 3.1, en el cual utilizando un nivel de significancia $\alpha=0.05$ se determinan que los factores más significativos estadísticamente son fuente de carbono (A), concentración de FC (B), temperatura(C), interacción AB e interacción AC. Mientras que la interacción BC se descarta como un factor significativo porque no existe la suficiente evidencia estadística que indique que la temperatura en conjunto a la concentración de la fuente de carbono afecte a la producción de surfactina.

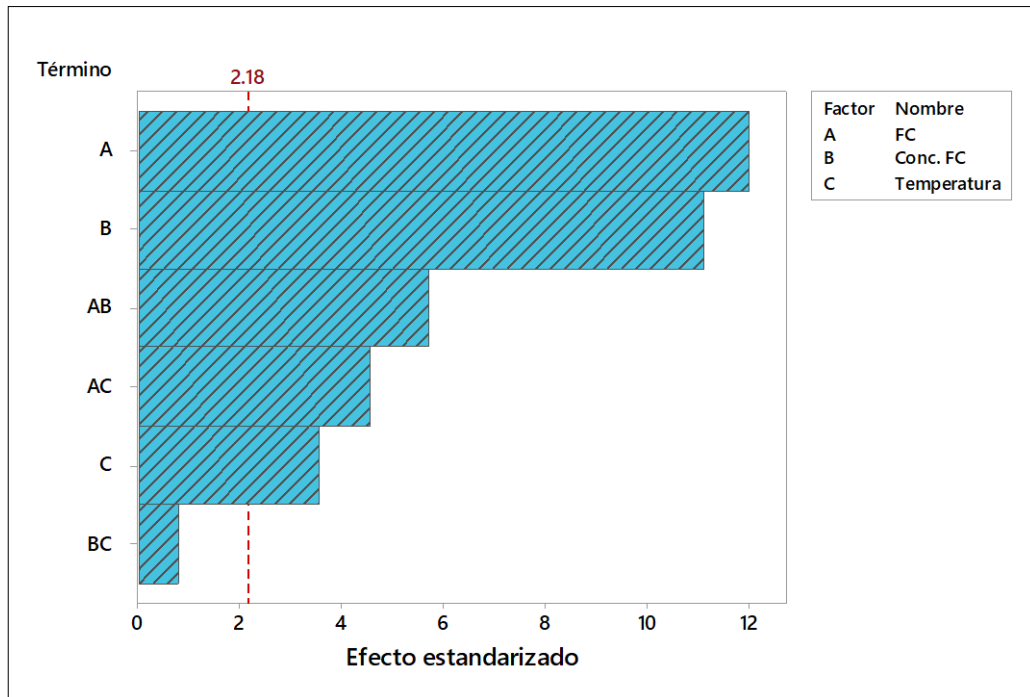


Figura 3.1 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de surfactina, $\alpha=0.05$ (FC: fuente de carbono)

En la figura 3.2 se presenta las cantidades de surfactina y biomasa producidas a diferentes concentraciones de las fuentes de carbono (FC) y a temperaturas de 30, 32 y 34 °C. En la figura 3.2a se presentan los datos a una temperatura de 30°C, como se evidencia no se observan diferencias en la producción de surfactina al utilizar los diferentes niveles de concentración de sacarosa, mientras que para el resto de FC si hay diferencias en la obtención de surfactina, incrementando la producción con el aumento de las concentraciones de FC, siendo el de mayor producción la fuente de xilosa en todas las concentraciones iniciales de sustrato.

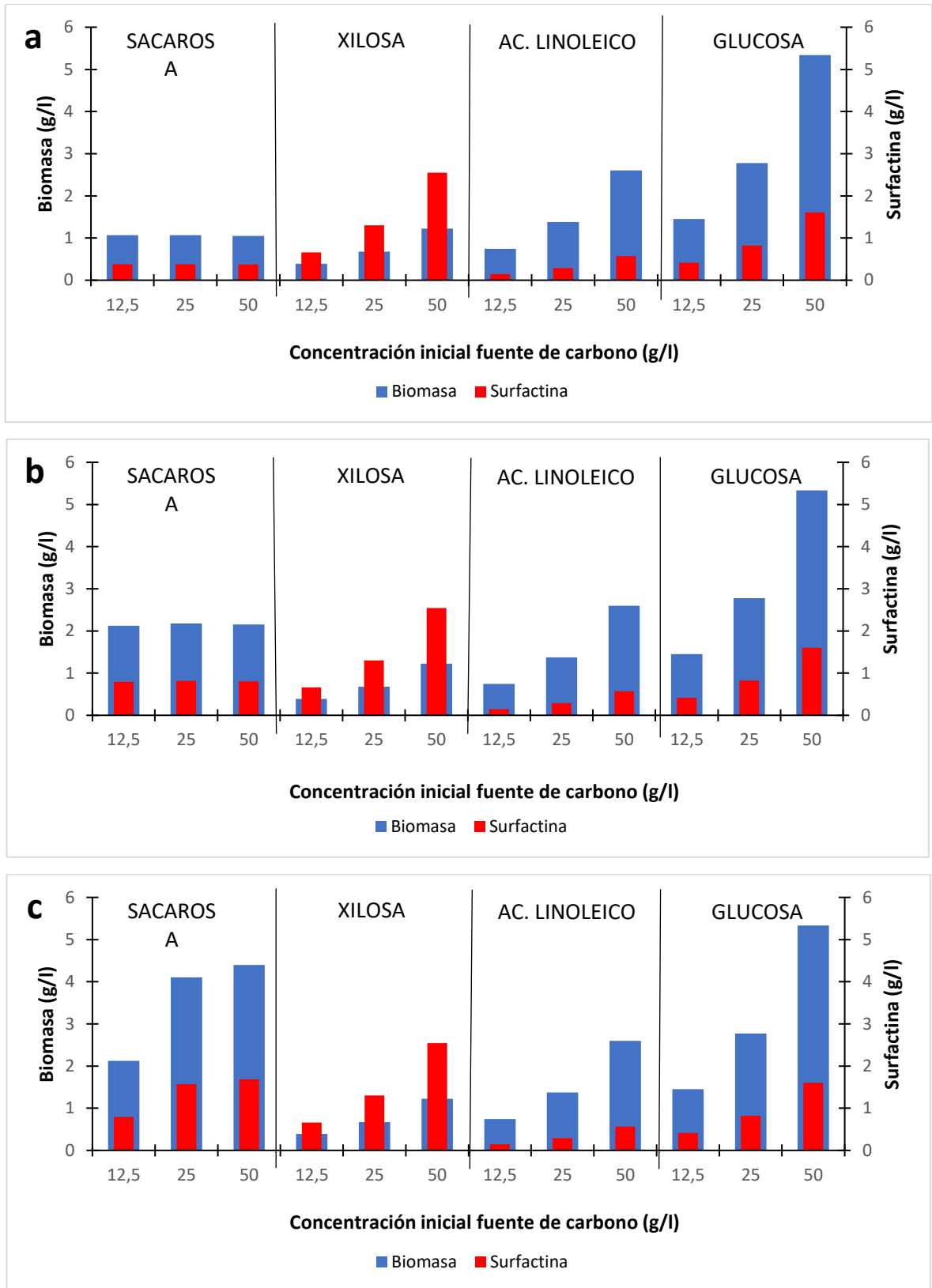


Figura 3.2 Influencia de la concentración de la fuente de carbono en la producción de surfactina (a: 30 °C; b: 32 °C; c: 34 °C).

Al realizar la fermentación a una temperatura de 32°C (fig. 3.2b) tampoco hubo diferencias en la producción de surfactina para sacarosa en las diferentes concentraciones de FC; sin embargo, se obtuvo mayores cantidades de surfactina en comparación con los resultados obtenidos a temperaturas de 30°C. En cuanto a las otras FC, se observa la misma tendencia que a 30°C, la producción de surfactina aumenta con la concentración de la FC, siendo la de mayor producción la fuente de xilosa. Todas las FC presentaron diferencias notables al utilizar los diferentes niveles de concentración a una temperatura de 34°C (fig. 3.2c) presentando un incremento en producción de surfactina al aumentar la concentración de FC. Para los tres gráficos presentados en la figura 3.2 se obtuvo la máxima concentración de surfactina utilizando xilosa a una concentración inicial de 50 g/l, la cual es de 2.55 g/l. El efecto de la temperatura en la obtención de surfactina solo mostró cambios cuando se usó sacarosa como fuente de carbono, evidenciando un aumento de la cantidad de surfactina con el aumento de la temperatura.

En la Figura 3.3 se pueden observar los efectos individuales del proceso de fermentación, en donde se puede evidenciar cómo los diferentes niveles del factor afectan en la producción de surfactina. En general, el tipo de fuente de carbono y la concentración de esta, son los factores que afectan en mayor proporción la cantidad de surfactina producida. No obstante, en cuanto a la fuente de carbono, los niveles glucosa y sacarosa presentan diferencias mínimas entre ellos. Al usar xilosa como fuente de carbono y utilizando la concentración inicial más alta de esta, se obtiene la máxima producción de surfactina, ratificando lo descrito anteriormente.

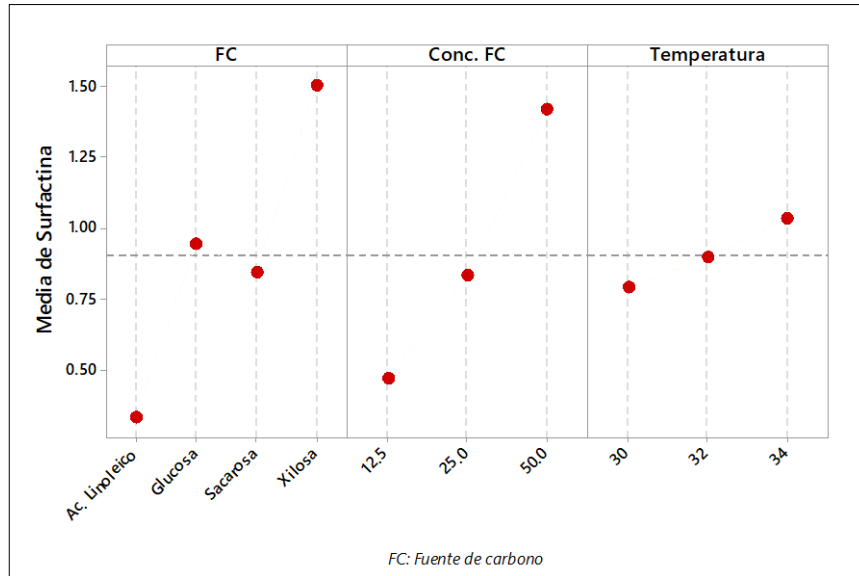


Figura 3.3 Influencia de los factores en la producción de surfactina

La figura 3.4 muestra cómo la combinación de los tres factores estudiados influye en la variable de respuesta, es decir, en la obtención de surfactina. Se puede apreciar que todas las interacciones que incluyan el tipo de fuente de carbono presentan gran variabilidad en la cantidad de surfactina obtenida, evidenciando nuevamente que con xilosa se obtienen mejores resultados, seguido de glucosa, sacarosa y el de menor rendimiento, ácido linoleico.

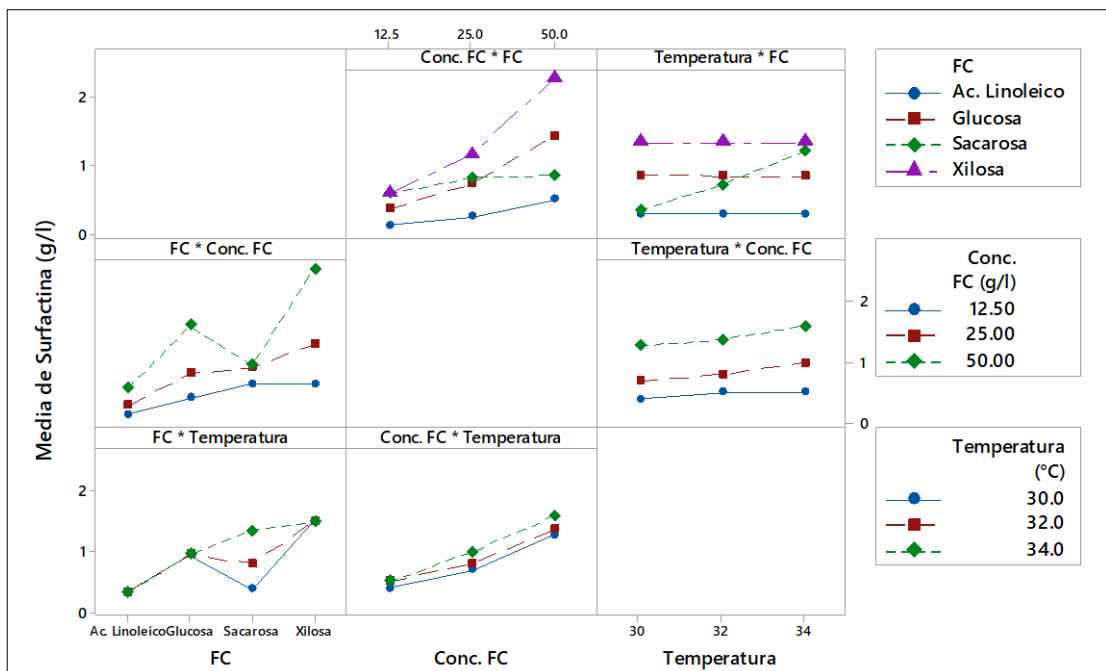


Figura 3.4 Influencia de la interacción de factores en la producción de surfactina

Por otra parte, la interacción de la concentración de FC con la temperatura y el tipo de residuo también obtiene mejores resultados con el aumento dichas concentraciones.

En base a los resultados de las simulaciones realizadas se determina que el crecimiento de la biomasa del *Bacillus subtilis* y la producción de la surfactina depende del tipo de sustrato que se emplea como fuente metabólica, estas pueden ser disacáridos, pentosas y hexosas (Romero García, 2003). Por lo cual, con la figura 3.5 se discute sobre los factores que podrían afectar la tasa de crecimiento, donde se observa que empleando xilosa se obtiene menor biomasa y mayor surfactina, esto ocurre debido a que el microorganismo es capaz de metabolizar dicha fuente de carbono, pero no de transportarla, indicando que se requiere un componente adicional para el desarrollo de la biomasa el cual puede ser la fuente de nitrógeno (Romero García, 2003). Sin embargo, estudios han obtenido diferentes cepas de *Bacillus subtilis* que pueden transportar la xilosa una vez metabolizada. Es importante resaltar que cada fuente de carbono es metabolizada a través de una ruta metabólica en específico, es decir, la xilosa se metaboliza mediante la ruta pentosas fosfato; mientras que la glucosa y la sacarosa mediante la glicólisis (Hernández Bustos, 2003).

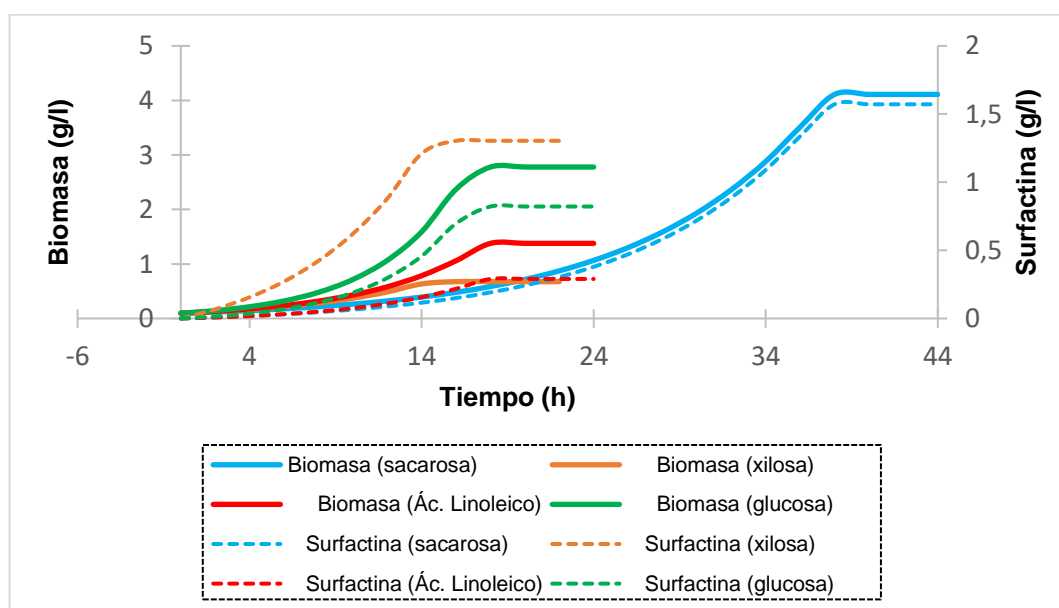


Figura 3.5 Curva de crecimiento de *Bacillus subtilis* a 30 °C y concentración inicial de la fuente de carbono de 25 g/l

3.3 Diseño de planta a escala piloto para producción de surfactina

En base al diagrama de proceso presentado en la Figura 2.3, se realizó la tabla de relación de actividades (Apéndice B) establecidas para la producción de surfactina, los equipos que intervienen (Apéndice C) y utilizando dicha tabla se obtienen las áreas requeridas, las cuales se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Área requerida por actividad

Actividad o sección	Área (m ²)*
Recepción de materia prima	16.56
Almacenamiento de materia prima	3.63
Preparación de cultivo	1.67
Preparación de medios	3.14
Esterilización	1.59
Incubación	1.21
Fermentación	4.80
Centrifugación	10.29
Filtración	2.52
Extracción	2.52
Evaporación	1.34
Almacenamiento de producto final	3.65
Oficinas	13.75
Baños	6.90
Depósito de desechos	9.0

* m²: metros cuadrados

Por lo tanto, el área total requerida para la planta piloto es de 82.57 m².

Para el desarrollo del diseño de la planta piloto se aplicó el software *CoreLap*. Se obtuvo los índices de cercanía entre las actividades y secciones, lo cual se detalla en la tabla 3.3, reiterando que para dichos resultados se utiliza la tabla de relación de actividades (Apéndice B).

Tabla 3.3 Índice de cercanía total

Actividad o sección	TCR*
Preparación cultivo	46
Centrifugación	41
Preparación medio	41
Evaporación	41
Fermentación	40
Filtración	40
Extracción	39
Esterilización	39
Incubación	39
Almacenamiento de materia prima	38
Recepción de materia prima	33
Almacenamiento de producto final	29
Oficina	26
Depósito de desechos	24
Baño	24

* TCR: Total Closeness Rating (Índice de Cercanía Total)

Con los resultados de sobre el índice de cercanía y la superficie requerida para cada actividad del proceso, mediante el software se obtiene el diseño más adecuado (Apéndice D), el cual se utiliza como una guía para la elaboración esquemática de la planta piloto. Posterior al diseño de *CoreLap*, mediante la herramienta *Microsoft Office Visio* se rediseñó un esquema a detalle de la planta piloto (Figura 3.6).

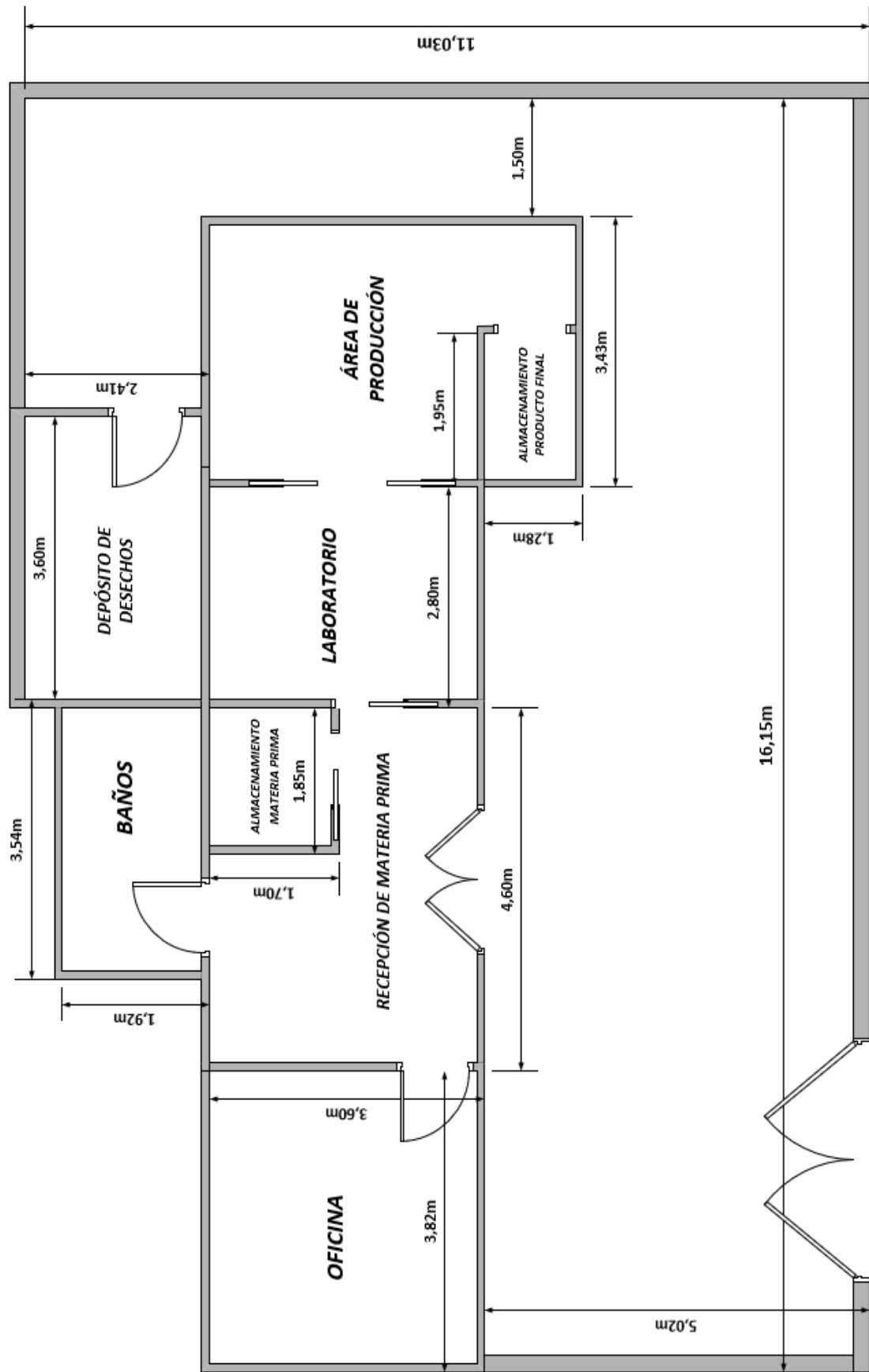


Figura 3.6 Diseño propuesto para planta piloto

3.4 Estimación de costos

En la tabla 3.4 se presenta el costo de producción por lote para la producción de surfactina. Se considera que, según el proceso con una carga inicial de 100 litros, se tomaría un total de 3 días en obtener un lote; donde un lote de producción equivale a obtener 254.7 g de surfactina. Por tanto, el valor de todos los ítems presentados equivale al costo en dicho tiempo. El costo mensual de producción sería de \$ 5,298 y el costo anual de \$63,576.

Tabla 3.4 Costo de producción por lote

Ítems	Materiales directos	Mano de Obra	Costos indirectos	Costo de producción
Ácido clorhídrico	\$ 0.72			\$ 0.72
Diclorometano	\$ 0.003			\$ 0.003
Residuo	\$ 0.00			\$ 0.00
Nitrato de Sodio	\$ 165.77			\$ 165.77
Caldo nutritivo	\$ 0.60			\$ 0.60
Glicerol	\$ 0.23			\$ 0.23
Mano de obra		\$320		\$ 320
Energía			\$ 32.00	\$ 32.00
Agua			\$ 0.48	\$ 0.48
Otros			\$ 10	\$ 10
Total	\$ 167.32	\$320	\$ 42.48	\$529.8

Como resultado del presente trabajo se determinó como fuente de carbono xilosa, que se encuentra en una proporción del 30% en el residuo de mazorca de maíz (Casalombo, 2015). Es importante recalcar que dentro de los costos de producción no se está considerando que en el proceso de extracción y purificación se generan residuos o disolventes orgánicos, y su depuración provocaría una elevación en los costos de producción. Según (Wasem et al., 2019), solo el proceso de purificación representa aproximadamente el 60% de los costos de producción.

En la implementación de mejoras de surfactina se realiza el aprovechamiento de residuos de la industria de alimentos, los costos totales para la preparación del medio de cultivo con mazorca de maíz serían de \$ 165.77, lo que reduciría los costos en aproximadamente un 50 % en comparación con los cálculos del costo del medio inicial, evidenciados en la tabla 3.5.

Tabla 3.5 Comparación del costo de los medios de cultivo

Componentes	\$/kilo	Medio inicial		Medio con mazorca de maíz	
		g/lote	\$/lote	g/lote	\$/lote
D-Glucosa	53.70	2000	107.4	-	-
Residuo	-	-	-	8300	0.00
Extracto de levadura	106.66	100	10.67	-	-
NaNO ₃	195.02	850	165.77	850	165.77
Na ₂ HPO ₄	59.93	570	34.16	-	-
KH ₂ PO ₄	63.95	400	25.58	-	-
MgSO ₄ 7H ₂ O	40.00	21	0.84	-	-
FeSO ₄ 7H ₂ O	73.60	1	0.07	-	-
CaCl ₂	84.62	0.0007	0.01	-	-
Total			\$ 344.5		\$165.77

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se utilizó como mejora para la producción de surfactina el aprovechamiento teórico de residuos orgánicos como melaza, mazorca de maíz y aceite residual de girasol provenientes de las diferentes industrias de alimentos. Se evidenció que a las 16 horas del proceso de fermentación la xilosa (fuente de carbono) a una concentración de 50 g/l con una temperatura de 30 °C presenta la máxima producción de surfactina, obteniendo una cantidad de 2.547 g/l de surfactina.
- Los factores más significativos para la obtención de surfactina son la fuente de carbono y su concentración, además se evidencia que estos factores afectan al desarrollo de la biomasa. Los diferentes niveles de temperatura no presentaron diferencias significativas en la variable de respuesta, sin embargo, cabe indicar que la temperatura influye sobre los parámetros cinéticos del *Bacillus subtilis*, principalmente en la tasa específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) ya que al incrementar la temperatura se acelera el crecimiento de la biomasa.
- En el aspecto ambiental se favorece a la reducción en la acumulación de desechos en los vertederos de basura porque se está aprovechando un residuo orgánico como fuente principal para la obtención de cualquier producto, en nuestro caso, la surfactina. Además, la surfactina al ser un metabolito proveniente de un microorganismo presenta una propiedad antimicrobiana y se convierte en un sustituto de los tensoactivos sintéticos los cuales contaminan el suelo y agua. También es importante resaltar que económicamente el uso de un residuo representa la reducción en los costos de elaborar el medio de cultivo para el proceso de fermentación, esta reducción está representada aproximadamente en un 50%.

4.2 Recomendaciones

- *Bacillus subtilis* puede crecer bajo condiciones termofílicas y mesofílicas, a 45 y 30 °C, respectivamente. Por lo tanto, se recomienda ampliar el rango de temperaturas evaluadas para observar si hay cambios significativos en la producción de surfactina.
- Hacer comparaciones utilizando diferentes fuentes bibliográficas donde utilicen residuos del mismo tipo, para relacionar los rendimientos con los componentes del medio de cultivo y ver como estos influyen en la obtención de surfactina.
- Realizar la validación experimental de la cinética metabólica del *Bacillus subtilis* empleando diferentes fuentes de carbono, para determinar la estequiometría general, la composición elemental del microorganismo, y los rendimientos de la reacción; ya que son necesarios en la simulación y desarrollo del proceso de obtención de la surfactina.
- Realizar la validación experimental con los residuos evaluados en este proyecto, debido a que en el proceso de simulación solo se está evaluando el componente de mayor porcentaje en la composición del residuo.
- Determinar el consumo de energía (kW/m³) por agitación y su relación con la producción de surfactina, considerando parámetros como densidad y viscosidad del medio de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Casalombo, I. (2015). Obtención de xilosa a partir de zuro de maíz mediante hidrólisis ácida. Obtenido de Repositorio Universidad de Guayaquil: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/8949/1/BCIEQ-T-0117%20Casalombo%20Velesaca%20Ingrid%20Melissa.pdf>
- Casp, A. (2005). *Diseño de industrias agroalimentarias*. Barcelona: Ediciones Mundi-Prensa.
- Castañeda, E., & Sánchez, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 53-65.
- Casteñeda, M. (2019). *Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano*. Obtenido de Repositorio Institucional de la UNLP : http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/89651/Apunte_de_c%C3%A1tedra.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Chamy, R., & Rosenkranz, F. (2013). *Biodegradation - Life of Science*. Rijeka: InTech.
- Chen, C., Lin, J., Wang, W., Huang, H., & Li, S. (2017). Cost-Effective Production of Surfactin from Xylose-Rich Corn cob Hydrolysate Using *Bacillus subtilis* BS-37. *Waste and Biomass Valorization*, 1-7.
- Cobo, C. (15 de Mayo de 2017). *Evaluación de medios de cultivo líquidos para la multiplicación de la bacteria Bacillus subtilis*. Obtenido de Universidad San Francisco de Quito: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6598/1/131031.pdf>
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus ssp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfato en dos muestras de biofertilizantes comerciales*. Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana Colombia: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis404.pdf>
- Effendy, I., & Maibach, H. I. (2006). Detergents. En *Irritant Dermatitis* (págs. 249-254). Springer.
- Geys, R., Soetaert, W., & Van, B. (2014). Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*. *Current Opinion in Biotechnology*, 66-72.
- Guñida, E., Pereira, J., Rodrigues, L., Coutinho, J., & Teixeira, J. (2012). Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56-64.

- Hernández Bustos, C. I. (2003). Crecimiento y Formación de productos en cultivos aeróbicos y anaeróbicos de *Bacillus subtilis* con glucosa, xilosa y celobiosa. Obtenido de <http://www.ibt.unam.mx/alfredo/ClaudiaIbethHernandez.pdf>
- Intelligen. (2010). *SuperPro Designer Product Features*. Obtenido de Intelligen, Inc.: https://www.intelligen.com/superpro_features.html#
- Ivanković, T., & Hrenović, J. (2009). Surfactants in the Environment. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 95-111.
- Jardak, k., Droguí, P., & Dagherir, R. (2015). Surfactants in aquatic and terrestrial environment: occurrence, behavior, and treatment processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 3195-3216.
- Liu, Q., Lin, J., Wang, W., Huang H., & Li, S. (2015). Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 31-37.
- Marriott, N. G., & Gravani, R. B. (2006). Cleaning Compounds. En *Principles of Food Sanitation* (págs. 141-163). New York: Springer Science+Business Media.
- MMAyA. (2002). *Programa Nacional para la Gestión Integral de Desechos Sólidos PIGIDS*. Obtenido de Ministerio del Ambiente y Agua: <https://www.ambiente.gob.ec/programa-pngids-ecuador/>
- Morales, L. (Abril de 2007). *Estudio del proceso de transferencia de calor convectivo en nanofluidos*. Obtenido de Repositorio Institucional Universidad del Norte: <http://manglar.uninorte.edu.co/bitstream/handle/10584/113/7919687.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 115-125.
- Raiger, L., & López, N. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química Viva*, 146-161.
- Realpe, E., Hernández, C., & Agudelo, C. (2002). *Especies del género Bacillus: morfología macroscópica y microscópica*. Obtenido de Revista Biomédica: [file:///C:/Users/ADM/Downloads/1148-Texto%20del%20manuscrito%20completo%20\(cuadros%20y%20figuras%20insertos\)-4769-1-10-20120923.pdf](file:///C:/Users/ADM/Downloads/1148-Texto%20del%20manuscrito%20completo%20(cuadros%20y%20figuras%20insertos)-4769-1-10-20120923.pdf)
- Ríos, F. (2014). *Comportamiento ambiental de tensioactivos comerciales: biodegradabilidad, toxicidad y ozonización*. Obtenido de Universidad de Granada: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/42048/24452968.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Robalino, D., & Cerda, L. (Enero de 2020). *“Determinación de la velocidad máxima de transferencia de oxígeno y la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno en cultivos por lote de la bacteria Bacillus subtilis DS23 en un biorreactor*. Obtenido de Repositorio Universidad de Amabato: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30841/1/BQ%20227.pdf>

- Rocha, P. (9 de Febrero de 2017). *Produção de surfactina por Bacillus subtilis UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato*. Obtenido de Repositorio institucional UFRN : https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/23394/1/PatriciaMariaRocha_DISSERT.pdf
- Romero García, A. S. (2003). Desarrollo de una cepa etanológica a partir de Bacillus subtilis. Obtenido de <http://www.ibt.unam.mx/alfredo/SusanaAidaRomero.pdf>
- Schramm, L., Stasiuk, E., & Marangoni, D. (2003). Surfactants and their applications. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem.*, 3-48.
- Sousa, M. (2014). Performance of a biosurfactant produced by Bacillus subtilis LAMI005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 613-623.
- Vedaraman, N., & Venkatesh, N. (2011). Producción de surfactina por bacillus subtilis mtcc 2423 a partir de aceites residuales para freír. *Revista Brasileña de Ingeniería Química*, 175-180.
- Ying, G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. . *Environment International*, 417-431.

APÉNDICES

APÉNDICE A

Resultados de la simulación

Temperatura (°C)	Residuo	Concentración (g/l)	Biomasa (g/l)	Surfactina (g/l)
30	Sacarosa	12.5	1.0693	0.3804
	Sacarosa	25	1.0662	0.3794
	Sacarosa	50	1.0516	0.3743
	Xilosa	12.5	0.3908	0.6595
	Xilosa	25	0.6759	1.3035
	Xilosa	50	1.2264	2.5471
	Ac. Linoleico	12.5	0.7456	0.1467
	Ac. Linoleico	25	1.3781	0.2901
	Ac. Linoleico	50	2.6025	0.5678
	Glucosa	12.5	1.454	0.4154
	Glucosa	25	2.7782	0.8214
	Glucosa	50	5.3384	1.6063
32	Sacarosa	12.5	2.1251	0.7939
	Sacarosa	25	2.1808	0.816
	Sacarosa	50	2.1535	0.8059
	Xilosa	12.5	0.3905	0.659
	Xilosa	25	0.6754	1.3025
	Xilosa	50	1.2255	2.5452
	Ac. Linoleico	12.5	0.7451	0.1466
	Ac. Linoleico	25	1.3771	0.2899
	Ac. Linoleico	50	2.6006	0.5674
	Glucosa	12.5	1.4529	0.4151
	Glucosa	25	2.7762	0.8208
	Glucosa	50	5.3345	1.6051
34	Sacarosa	12.5	2.1236	0.7933
	Sacarosa	25	4.104	1.5692
	Sacarosa	50	4.3994	1.6855
	Xilosa	12.5	0.3902	0.6585
	Xilosa	25	0.6749	1.3016
	Xilosa	50	1.2246	2.5433
	Ac. Linoleico	12.5	0.7445	0.1465
	Ac. Linoleico	25	1.3761	0.2897
	Ac. Linoleico	50	2.5987	0.567
	Glucosa	12.5	1.4518	0.4148
	Glucosa	25	2.7742	0.8202
	Glucosa	50	5.3306	1.6039

APÉNDICE C

Requerimiento de espacio

Actividad o Sección	Equipo	Largo (m)	Ancho (m)	Ss (ESTÁTICA)		Sg (GRAVITACIÓN)		Se (EVOLUCIÓN)		Área total por actividad m ²
				Área m ²	# Lados usados	Área m ²	Coeficiente K	Área m ²	Stotal Ss+Sg+Se	
Recepción de materia prima	-	4,60	3,60	16,56	0	0	0	0	16,56	16,56
Almacenamiento de materia prima	Refrigeradora	0,68	0,79	0,54	1	0,54	0,50	0,54	1,61	3,63
	Ultracongelador	0,81	0,83	0,67	1	0,67	0,50	0,67	2,02	
Preparación de cultivo	Balanza analítica	0,35	0,22	0,08	3	0,23	0,05	0,02	0,32	1,67
	Mesa de trabajo	0,80	0,80	0,64	1	0,64	0,05	0,06	1,34	
Preparación de medios	Cabina de flujo laminar	0,629	1,34	0,84	1	0,84	0,50	0,84	2,53	3,14
	Balanza	0,32	0,32	0,10	3	0,31	0,50	0,20	0,61	
Esterilización	Autoclave	0,54	0,56	0,30	4	1,21	0,05	0,08	1,59	1,59
	Incubadora	0,51	0,62	0,32	1	0,32	0,50	0,32	0,95	
Incubación	Espectrofotómetro	0,43	0,29	0,12	1	0,12	0,05	0,01	0,26	1,21
	Biorreactor	0,80	0,80	0,64	4	2,56	0,50	1,60	4,80	
Centrifugación	Centrifugadora	1,40	1,40	1,96	4	7,84	0,05	0,49	10,29	10,29
	Mesa de trabajo	1,50	0,80	1,20	1	1,20	0,05	0,12	2,52	
Extracción	Mesa de trabajo	1,50	0,80	1,20	1	1,20	0,05	0,12	2,52	2,52
	Mesa de trabajo	0,80	0,80	0,64	1	0,64	0,05	0,06	1,34	
Almacenamiento producto terminado	Refrigeradora	0,68	0,79	0,54	1	0,54	0,05	0,05	1,13	1,13
	Repisa o armario	1,50	0,80	1,20	1	1,20	0,05	0,12	2,52	
Oficinas	-	3,82	3,60	13,75	0	0	0	0	13,75	13,75
Baños	-	2,00	3,45	6,90	0	0	0	0	6,90	6,90
Depósito desechos	-	3,60	2,50	9,00	0	0	0	0	9,00	9,00

APÉNDICE D

Diseño de planta piloto propuesto por CoreLap

	13	14	Posición en el Diseño	Actividad
			1	Preparación de Cultivo
15	6	5	2	Preparación de Medios
			3	Esterilización
			4	Incubación
	1	2	5	Almacenamiento de Materia Prima
			6	Recepción de Materia Prima
			7	Fermentación
	4	3	8	Centrifugación
			9	Filtración
			10	Extracción
11	7	8	11	Evaporación
			12	Almacenamiento Producto Final
			13	Oficinas
12	10	9	14	Baños
			15	Depósito de Desechos