

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

"Diseño de un biorreactor para la obtención de esporas de la bacteria
Bacillus Subtilis"

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

Presentado por:

Nicolás Josué Cedeño Donoso

Richard Genaro Cobos Franco

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2018

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi mamá Erika Donoso y mi papá Henry Cedeño, quienes han dado todo de ellos en cada etapa de mi vida. A mi hija Emilia, lo más valioso de mi vida. A mi familia y amigos, quienes son apoyo fundamental para alcanzar mis metas. A mi universidad, por haberme dado las oportunidades para mi formación profesional y devolver a la sociedad con mi trabajo poco a poco el estar en esta universidad.

Nicolás Cedeño

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mis padres, Genaro Cobos y Narcisa Franco, quienes me han dado todo su apoyo moral no solamente durante mi etapa universitaria, sino en toda mi vida, quienes me demostraron que con perseverancia se puede alcanzar grandes cosas y sin ellos no estaría donde me encuentro ahora.

A mi novia, con quien he compartido momentos inolvidables durante mi vida universitaria y ha estado presente cuando la necesito. A mis amigos, con quienes tengo grandes recuerdos en la universidad. A mis profesores, quienes han contribuido a mi aprendizaje con su conocimiento y experiencia.

Richard Cobos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, debido a que sin su apoyo y cariño no me encontraría en esta etapa de mi vida.

Al M.Sc. Raúl Serrano, quien, con su vasta experiencia, ha estado dispuesto a ayudarnos con cualquier problema encontrado en el desarrollo del proyecto.

Al M.Sc. Bernardo Mora, quien aportó con su conocimiento sobre reactores, lo cual, fue invaluable en la culminación del proyecto.

Al Ph.D. César Moreira, quien siempre estuvo dispuesto a ayudarnos en nuestro proyecto con información relevante.

Al Ing. Tyrone Alcívar, al Ing. Camilo Ramírez y a la QF. Maribel Jaramillo, quienes nos facilitaron con materiales y equipos necesarios para llevar a cabo la experimentación.

A la Ing. Priscila Serrano, quien estuvo dispuesta a capacitarnos sobre procedimientos y estándares en microbiología.

A mi compañero de tesis, con quien hice un buen equipo durante el desarrollo de este proyecto.

Richard Cobos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Cristina, madre de mi hija Emilia, por su apoyo y compañía durante la realización de este proyecto.

Al M.Sc. Raúl Serrano, tutor de este proyecto por sus enseñanzas y ejemplo de emprendimiento en el campo de Ingeniería Química en el país.

A la Ing. Priscila Serrano, por sus capacitaciones sobre microbiología.

Al M.Sc. Bernardo Mora, por su acompañamiento y recomendaciones durante la realización de este proyecto.

Al Ph.D. César Moreira, por sus consultorías y por brindarnos facilidades para acceder al Laboratorio de Microbiología de FIMCP.

Al Ph.D. Luis Dominguez, por sus consultorías y darnos acceso al Laboratorio de Medio Ambiente de FCNM.

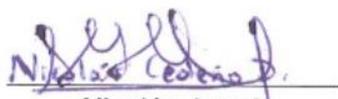
Al Ing. Camilo Ramírez, Ing. Tyrone Alcívar y Q.F. Maribel Jaramillo, por facilitarnos los materiales y equipos de laboratorio para la realización de este proyecto.

A mi compañero de tesis Richard Cobos, por el trabajo en conjunto para cumplir las metas de este proyecto.

Nicolás Cedeño

DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Nicolás Josué Cedeño Donoso* y *Richard Genaro Cobos Franco* 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"


Nicolás Josué
Cedeño Donoso

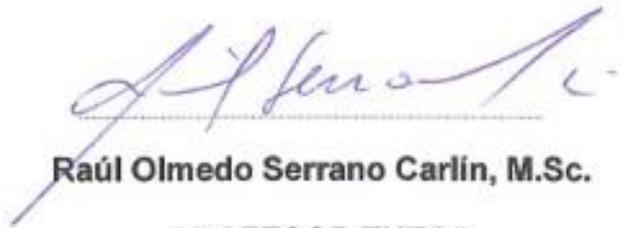

Richard Genaro
Cobos Franco

EVALUADORES



Mirian Maricela Checa Artos, M.Sc.

PROFESOR DE LA MATERIA



Raúl Olmedo Serrano Carlin, M.Sc.

PROFESOR TUTOR



Bernardo Humberto Mora Andrade, M.Sc.

PROFESOR COTUTOR

RESUMEN

El presente proyecto tiene como objetivo el diseño de un biorreactor para la producción de un concentrado de $7 \times 10^{14} UFC$ de esporas de la bacteria *Bacillus Subtilis* por batch. El proyecto se resume en 4 etapas; la primera etapa fue la evaluación de 3 medios de cultivo en donde se determinó mediante experimentación en matraces Erlenmeyer de 1 L el medio de cultivo que mayor concentración de células viables alcanzaba por costo de medio de cultivo; la segunda etapa fue la construcción de la curva de crecimiento del medio de cultivo seleccionado y la evaluación de un medio esporulante conformado por $MnSO_4$ y $MgSO_4$ utilizando matraces Erlenmeyer de 1 L y un reactor batch de 20 L; la tercera etapa fue el dimensionamiento de los componentes del biorreactor y elaboración de planos esquemáticos del mismo; la cuarta etapa fue la evaluación económica de la realización del proyecto. El medio de cultivo óptimo fue el medio conformado por melaza, urea, y fosfato dipotásico, alcanzando una concentración final luego de 12 horas de crecimiento de $1.51 * 10^{11} UFC/mL$ y el porcentaje de esporulación alcanzado fue del 9.13%. El volumen requerido del biorreactor para producir la cantidad requerida de esporas de *Bacillus Subtilis* es de 82L. El tiempo de recuperación de la inversión del proyecto es de 9 meses con una reducción de importaciones del 91% de esporas de *Bacillus Subtilis*.

Palabras Clave: *Bacillus Subtilis*, Biorreactor, Curva de crecimiento bacteriano, Esporulación.

ABSTRACT

The main objective of this project is the design of a bioreactor able to produce 7×10^{14} CFU of *Bacillus Subtilis* spores per batch. The Project is composed of 4 stages. First, the evaluation of 3 different growth media by experimentation using 1 L Erlenmeyer flasks, to determine the one producing the highest viable cells concentration per cost of growth media. Second, a growth curve in the selected media was generated and the evaluation of a sporulating media based on $MnSO_4$ y $MgSO_4$ using 1 L Erlenmeyer flasks and a 20 L batch reactor was done. Third, the dimensioning of the proposed bioreactor components and its schematics were generated. Fourth, the financial study of the project was made. The optimum growth media was the one based in molasses, urea and dipotassium phosphate, reaching a final concentration of $1.51 * 10^{11} \text{ CFU} / \text{mL}$ after 12 hours of growth and the sporulation percentage was 9.13%. The volume of the bioreactor to produce the required quantity of *Bacillus Subtilis* spores is 82 L. The time needed to recover the investment is 9 months and imported *Bacillus Subtilis* spores are reduced by 91%.

Keywords: *Bacillus Subtilis*, Bioreactor, Bacterial growth curve, Sporulation.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	VII
SIMBOLOGÍA	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE PLANOS	XIII
CAPÍTULO 1	1
1. Introducción	1
1.1 Descripción del problema	2
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo General	4
1.3.2 Objetivos Específicos	4
1.4 Marco teórico	4
1.4.1 <i>Bacillus Subtilis</i>	4
1.4.2 Ciclo de crecimiento de las bacterias formadoras de endosporas	6
1.4.3 Medios de Cultivo.....	9
1.4.4 Biorreactor.....	10
1.4.5 Configuraciones de biorreactores.....	11
1.4.6 Principales componentes de un biorreactor	12
CAPÍTULO 2.....	16
2. Metodología	16

2.1	Alternativas de solución al problema	16
2.1.1	Alternativas de medio de cultivo.....	16
2.1.2	Alternativas de medio esporulante	17
2.2	Metodología de diseño.....	18
2.3	Definición de condiciones de experimentación	20
2.3.1	Cepa de bacteria	20
2.3.2	Condiciones en el Biorreactor	20
2.3.3	Condiciones de esterilidad	21
2.3.4	Tiempo de operación del reactor.....	21
2.4	Evaluación de medios de cultivo y selección de medio de cultivo óptimo en matraces de laboratorio de 1 L	21
2.4.1	Medios de cultivo.....	21
2.4.2	Activación de esporas	22
2.4.3	Inoculación de esporas	22
2.4.4	Evaluación de los medios de cultivo.....	23
2.4.5	Selección del medio de cultivo óptimo	23
2.5	Construcción de curva de crecimiento en matraces de laboratorio de 1 L y evaluación de esporulación	24
2.5.1	Recuento de células totales y viables	24
2.5.2	Construcción de Curva de Crecimiento.....	24
2.5.3	Evaluación de la esporulación del microorganismo.....	24
2.5.4	Recuento de esporas	24
2.6	Construcción de curva de crecimiento en reactor batch de 15 L y evaluación de esporulación	25
2.7	Dimensionamiento del Biorreactor y de sus Partes	25
2.7.1	Matriz de decisión	25
2.7.2	Tipo o configuración del biorreactor	26

2.7.3	Tanque o recipiente.....	26
2.7.4	Propiedades físicas del medio de cultivo	27
2.7.5	Sistema de aireación.....	29
2.7.6	Sistema de agitación	30
2.7.7	Sistema de calentamiento	33
2.8	Elaboración de Planos del Biorreactor.....	33
2.9	Análisis económico	33
CAPÍTULO 3.....		35
3.	Resultados y análisis	35
3.1	Selección del medio de cultivo óptimo.....	35
3.2	Curva de Crecimiento de <i>Bacillus Subtilis</i> en Medio de Cultivo Óptimo y Evaluación de la Esporulación en Matraces Erlenmeyer de 1L.....	37
3.2.1	Curva de crecimiento en matraces de 1L.....	37
3.2.2	Evaluación de esporulación en matraces de 1 L.....	38
3.3	Curva de Crecimiento de <i>Bacillus Subtilis</i> en Medio de Cultivo Óptimo y Evaluación de la Esporulación en Reactor Batch de 15 L	40
3.3.1	Curva de crecimiento en reactor de 15 L	40
3.3.2	Evaluación de esporulación en reactor de 15 L	41
3.4	Dimensionamiento del biorreactor	41
3.4.1	Volumen	42
3.4.2	Dimensiones	42
3.4.3	Aireación	43
3.4.4	Agitación	43
3.4.5	Calentamiento e instrumentación	43
3.5	Análisis económico	44
CAPÍTULO 4.....		48
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48

4.1	Conclusiones	48
4.2	Recomendaciones	49

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ANEXO A. P&ID del biorreactor

ANEXO B. Planos esquemáticos

ANEXO C. Flujo de caja

ANEXO D. Cálculos realizados

ANEXO E. Fotos de experimentación

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AISI	American Iron and Steel Institute
ARN	Ácido Ribonucleico
CSTR	Continuous Stirred - Tank Reactor
LB	Luria Bertani
TIR	Tasa Interna de Retorno
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
VAN	Valor Actual Neto

SIMBOLOGÍA

$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
c	Calor específico del medio de cultivo
C	Carbono
Ca	Calcio
CaCl	Cloruro de calcio
C_L	Concentración de oxígeno disuelto
C_L^*	Concentración de oxígeno disuelto en equilibrio
cp	Centipoise
CuSO_4	Sulfato de cúprico
D	Diámetro interno del biorreactor
D_i	Diámetro de los impulsores
e	Espesor del recipiente
F_g	Flujo molar de oxígeno suministrado
Fe	Hierro
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato ferroso heptahidratado
Fl_g	Número de flujo del gas
Fr	Número de Froude
g	Gramo, Gravedad en la superficie de la tierra
G	Gravedad específica del medio de cultivo
GPa	Gigapascal
h	Hora
H	Hidrógeno, Altura efectiva del biorreactor
K	Potasio
K_2HPO_4	Fosfato dipotásico
k_L	Coeficiente de transferencia de oxígeno al medio de cultivo
L	Litro
m	Metro, Masa del medio de cultivo
m_b	Masa de bacterias en el medio de cultivo
m_m	Masa de melaza en el medio de cultivo
m_w	Masa de agua en el medio de cultivo

M	Concentración molar
Mg	Magnesio
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
mmol	Milimol
N_i	Velocidad angular del sistema de agitación
μ	Viscosidad dinámica del medio de cultivo
μ_m	Viscosidad dinámica de la melaza
μ_w	Viscosidad dinámica del agua
mL	Mililitro
Mn	Manganeso
MnSO ₄ H ₂ O	Sulfato de manganeso monohidratado
MPa	Megapascal
N	Nitrógeno
N_{max}	Máxima cantidad de bacterias en la fase de crecimiento
N_p	Número de potencia
$n_{OR_{max}}$	Máximo flujo molar de oxígeno requerido
ρ	Densidad del medio de cultivo
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
O	Oxígeno
P	Fósforo, Potencia de agitación
P_v	Potencia de aireación
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por millón
q_o	Tasa específica de consumo de oxígeno
\dot{Q}	Potencia de la resistencia eléctrica
rpm	Revoluciones por minuto
S	Azufre, Resistencia a la fluencia del acero AISI 316
V	Volumen efectivo del biorreactor
t	Tiempo de calentamiento
T(t)	Temperatura del medio de cultivo en cualquier instante
ZnSO ₄	Sulfato de zinc

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Toneladas métricas de microorganismos importadas entre los años 2000 y 2016 (MAG, 2017)	1
Figura 1.2 Valor FOB de importaciones de microorganismos entre los años 2000 y 2016 (MAG, 2017)	2
Figura 1.3 Micrografía fluorescente de células de <i>Bacillus Subtilis</i> y la presencia de endosporas al interior de la célula (Goldman, 2009).....	5
Figura 1.4 Ciclo de crecimiento de las bacterias formadoras de endosporas (Norris, 1971).....	6
Figura 1.5 Curva típica de un cultivo cerrado de bacterias (Shuler & Kargi, 2002).....	8
Figura 1.6 Biorreactor de tanque agitado (Doran, 2013).....	12
Figura 1.7 Diseños de impulsores utilizados en reactores (Doran, 2013).....	13
Figura 1.8 Sistemas de calentamiento comunes (Doran, 2013)	14
Figura 2.1 Diagrama de metodología de diseño del biorreactor	20
Figura 2.2 Campo de velocidad generado por turbinas Rushton (Schafer, Hofken, & Durst, 1997)	31
Figura 2.3 Correlaciones entre el número de Reynolds y el número de potencia para varios impulsores (Rushton, Costich, & Everett, 1950).....	32
Figura 3.1 Curva de Crecimiento de la bacteria <i>Bacillus Subtilis</i> matraces Erlenmeyer de 1 L.....	37
Figura 3.2 Curva de Crecimiento de la bacteria <i>Bacillus Subtilis</i> en Reactor Batch de 15 L.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Productos industriales por fermentación de la bacteria <i>Bacillus Subtilis</i>	5
Tabla 1.2 Fases de crecimiento microbiano en un cultivo cerrado	7
Tabla 1.3 Macronutrientes y formas de ser suministrados a un medio de cultivo	10
Tabla 1.4 Ventajas y desventajas de los modos de operación de reactores	11
Tabla 2.1 Alternativas de medio de cultivo	16
Tabla 2.2 Alternativas de medios de cultivo en relación a las unidades formadoras de colonia promedio por costo de medio de cultivo	17
Tabla 2.3 Composición del medio esporulante estándar “Medio G”	18
Tabla 2.4 Medio esporulante por litro de medio de cultivo evaluado en este proyecto	18
Tabla 2.5 Condiciones del medio de cultivo.....	20
Tabla 2.6 Medio de Cultivo 1	22
Tabla 2.7 Medio de Cultivo 2	22
Tabla 2.8 Medio de Cultivo Estándar, Luria Bertani.....	22
Tabla 2.9 Agar nutritivo para conteo de células viables.....	23
Tabla 2.10 Matriz de decisión para el tipo de biorreactor	26
Tabla 2.11. Propiedades Mecánicas de los aceros AISI 304 y AISI 316.	27
Tabla 2.12 Propiedades físicas del agua a 37°C	28
Tabla 2.13 Propiedades físicas de la melaza	28
Tabla 3.1 Concentración de <i>Bacillus Subtilis</i> alcanzada en el medio de cultivo 1.	35
Tabla 3.2 Concentración de <i>Bacillus Subtilis</i> alcanzada en el medio de cultivo 2.	35
Tabla 3.3 Concentración de <i>Bacillus Subtilis</i> alcanzada en el medio de cultivo estándar	36
Tabla 3.4 Concentración de <i>Bacillus Subtilis</i> alcanzada por costo de medio de cultivo.	36
Tabla 3.5 Concentración mínima de medio de cultivo 1 en la que existe crecimiento acelerado de la bacteria <i>Bacillus Subtilis</i>	37
Tabla 3.6 Crecimiento de la bacteria <i>Bacillus Subtilis</i> en matraces Erlenmeyer de 1 L	38
Tabla 3.7 Resultados de esporulación en matraces Erlenmeyer de 1 L Prueba 1	39
Tabla 3.8 Resultados de esporulación en matraces Erlenmeyer de 1 L Prueba 2	39

Tabla 3.9 Resultados de esporulación en matraces Erlenmeyer de 1 L Prueba 3	39
Tabla 3.10 Porcentaje de Esporulación Promedio	39
Tabla 3.11 Crecimiento de la bacteria <i>Bacillus Subtilis</i> en Reactor Batch de 15 L	40
Tabla 3.12 Resultados de esporulación en reactor batch de 15 L sólo se hizo una repetición de resistencia al calor.....	41
Tabla 3.13 Volumen de Biorreactor	42
Tabla 3.14 Dimensiones Calculadas.....	42
Tabla 3.15 Dimensiones de Diseño	43
Tabla 3.16 Resultados del sistema de aireación.....	43
Tabla 3.17 Resultados de sistema de agitación	43
Tabla 3.18 Resultados del sistema de calentamiento.....	44
Tabla 3.19 Número de batchs requeridos para cubrir demanda anual de <i>Bacillus Subtilis</i>	44
Tabla 3.20 Número de lotes requeridos para cubrir demanda anual de 3 cepas de bacterias	45
Tabla 3.21 Costos Variables Totales por Batch	45
Tabla 3.22 Reducción de importación de la cepa <i>Bacillus Subtilis</i>	46
Tabla 3.23 Costos de Inversión del proyecto	46
Tabla 3.24 Resumen de Evaluación del Proyecto para la producción de 3 cepas de bacterias <i>Bacillus</i>	47

ÍNDICE DE PLANOS

- PLANO 1 P&ID del biorreactor
- PLANO 2 Biorreactor y soporte
- PLANO 3 Biorreactor
- PLANO 4 Vistas lateral e inferior
- PLANO 5 Vistas superior y frontal
- PLANO 6 Vista de corte, sección A-A
- PLANO 7 Agitador
- PLANO 8 Vistas frontal y de corte del agitador

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El uso de microorganismos en la industria tiene una gran importancia alrededor del mundo en el ámbito económico, medio ambiental y social. Existen dos principales áreas en las cuales los microorganismos se encuentran en la industria; en la obtención de productos como cerveza, vino, pan y queso mediante procesos de fermentación; y en el uso de microorganismos para fines ambientales y control de contaminación, mediante su aplicación para degradar contaminantes en derrames de petróleo y efluentes industriales o domésticos (Waites, 2001).

En Ecuador las importaciones de microorganismos en el año 2016 fueron de 30.33 toneladas métricas con un valor FOB de 1,6 millones de dólares y en la proyección según la tendencia desde el año 2000 al 2016, se estima que se importe 82.26 toneladas métricas con un valor FOB de 4.5 millones de dólares para el año 2030 (MAG, 2017).

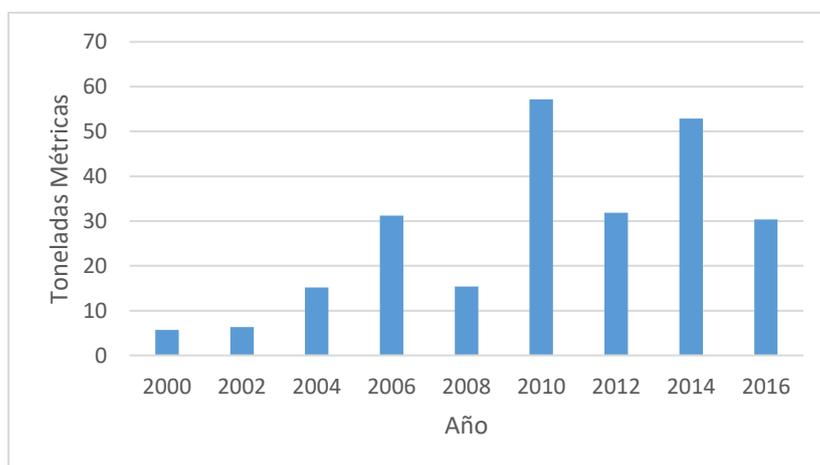


Figura 1.1 Toneladas métricas de microorganismos importadas entre los años 2000 y 2016 (MAG, 2017)

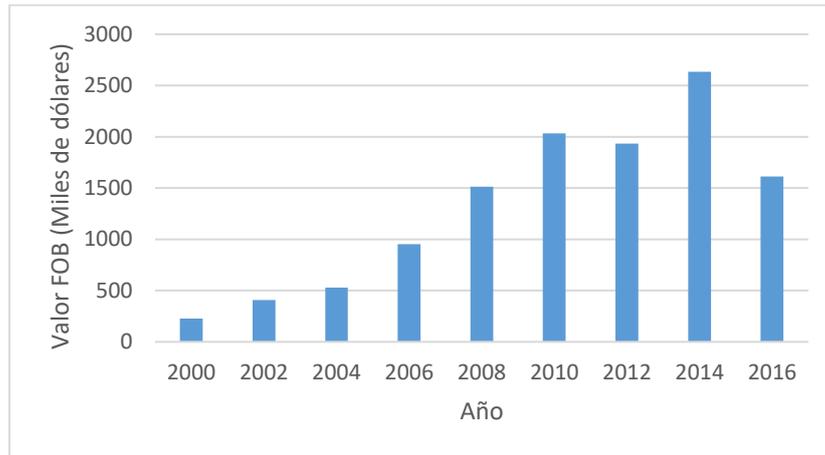


Figura 1.2 Valor FOB de importaciones de microorganismos entre los años 2000 y 2016 (MAG, 2017)

Existen aproximadamente 77 empresas en el país que realizan la importación de microorganismos, 37 empresas en la ciudad de Quito y 40 empresas en la ciudad de Guayaquil, entre ellas, la empresa Quality Corporation S.A. (BCE, 2018).

Quality Corporation S.A es una empresa que se dedica a la elaboración y comercialización de productos que contienen esporas de bacterias, utilizados en el tratamiento de aguas residuales y remediación de suelos contaminados, así como productos de biotecnología para el agro y acuicultura. Para la elaboración de estos productos, la empresa realiza importaciones de diferentes cepas de bacterias. En las importaciones, las cepas de bacterias se comercializan utilizando el término “*Unidad*”. Cada *Unidad* de una cepa de bacteria es un producto concentrado que contiene 10^{14} unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa y su peso varía entre 1Kg a 3 Kg, dependiendo de la cepa (Quality Corporation S.A., 2015).

1.1 Descripción del problema

La importación de cepas de bacterias implica altos costos para Quality Corporation S.A., encareciendo a los productos que las utilizan como materia prima. Además, existe el riesgo de suspensión de importaciones de bacterias por el cambio de matriz productiva en el país, dejando a la compañía sin poder elaborar esta línea de productos. Esta problemática afecta a cualquier empresa que se dedique a la importación de microorganismos, y en el país,

no se cuenta con industrias que produzcan concentrados de bacterias, que permitan sustituir estas importaciones (Aguilera & Ramírez, 2016).

Para la producción industrial de concentrados de bacterias se requiere de biorreactores, los cuales no se producen en el país; importarlos, implicaría altos costos de adquisición y dependencia de importaciones (Sornoza, 2017). También se requiere de medios de cultivo, los cuales permitan un adecuado crecimiento de las bacterias. Los medios de cultivo deben ser de bajo costo, estar disponibles a nivel local, cumplir con uniformidad de sus componentes y su residuo debe ser de fácil disposición final (Okafor, 2007).

1.2 Justificación del problema

Una de las bacterias que requiere Quality Corporation S.A. para la elaboración de sus productos, es la bacteria *Bacillus Subtilis*. Para reducir los problemas mencionados anteriormente, la empresa busca internalizar la producción de esta cepa bacteriana; para ello, se requiere de un biorreactor, un medio de cultivo adecuado e información experimental sobre el crecimiento y esporulación de la bacteria, siendo la esporulación un requerimiento para poder almacenar las bacterias y ser comercializadas en sus productos.

Los medios de cultivo estándares para la producción a escala industrial requieren ser importados, y sus costos, pueden ser reducidos al sustituir estos medios por otros preparados con materias primas de menor costo y mayor disponibilidad a nivel local (Basmma & Kulkarni, 2017). Sin medios de cultivo elaborados más económicos y que proporcionen resultados similares al de los estándares, la empresa no podrá reducir costos de producción por materia prima para alcanzar mayor rentabilidad en sus productos.

Con la realización de este proyecto, se busca presentar el diseño de un biorreactor para la empresa Quality Corporation que permita la producción, por requerimiento de la empresa, de al menos 7 Unidades ($7 \times 10^{14} UFC$) de esporas de la cepa *Bacillus Subtilis* por batch. Además, se evaluarán medios de cultivo alternativos a los estándares, de menor costo y con materias primas

disponibles en la empresa para la producción de estas bacterias. Las condiciones de crecimiento óptimas serán definidas y se evaluará la esporulación de estas bacterias.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Diseñar un biorreactor para la obtención de $7 \times 10^{14} UFC$ de esporas de *Bacillus Subtilis* por batch.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar el medio de cultivo óptimo mediante la relación entre unidades formadoras de colonia alcanzadas al final del crecimiento y costo de los componentes de 3 medios de cultivo.
- Construir una curva de crecimiento utilizando el medio de cultivo óptimo.
- Evaluar el uso de un medio esporulante mediante el porcentaje de esporulación.
- Elaborar las bases de diseño del biorreactor en base a la experimentación realizada.
- Evaluar la viabilidad de la implementación de la propuesta mediante un análisis económico del proyecto.

1.4 Marco teórico

1.4.1 *Bacillus Subtilis*

La bacteria *Bacillus Subtilis* pertenece al género *Bacillus*, quienes tienen en común la habilidad de producir aeróbicamente esporas al interior de su célula, también llamadas endosporas, en estado de latencia cuando se encuentran en condiciones adversas de crecimiento.

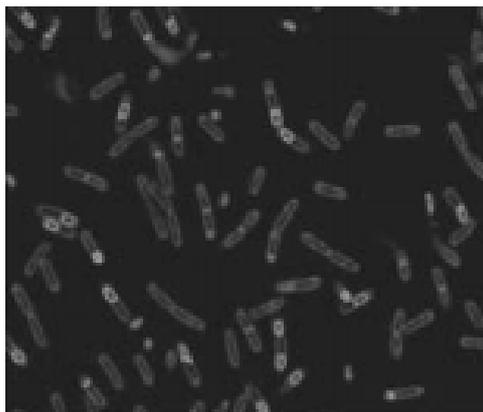


Figura 1.3 Micrografía fluorescente de células de *Bacillus Subtilis* y la presencia de endosporas al interior de la célula (Goldman, 2009)

La bacteria *Bacillus Subtilis* es una bacteria Gram positiva, móvil, facultativa y con forma de bastón. Es ubicua, es decir, presente naturalmente en el ambiente y puede ser aislada de muestras de aire, agua y tierra en casi cualquier parte del mundo (Goldman, 2009).

En la agricultura, es utilizada como bioagente, aplicándola a las semillas y suelo para generar biopesticidas y controlar enfermedades de plantas (Basamma, 2017). En la medicina y farmacia es utilizada para la obtención de biosurfactantes para evitar la adhesión microbiana a superficie sólidas de microorganismos (Coronel, 2015). Otra aplicación industrial es la obtención de productos de fermentación, descritos en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Productos industriales por fermentación de la bacteria *Bacillus Subtilis*

Productos	Aplicación Industrial
Productos Químicos Finos	
D-ribosa	Alimentos, Cosmetología y Farmacia
Riboflavina	Alimentos y Farmacia
Enzimas	
α -Amilasa	Alimentos, Almidón, Papel, Textil, Elaboración de cerveza
Glutaminasa	Comida, Sabor
Proteasa	Detergente, Comida

Fuente: (Goldman, 2009)

1.4.2 Ciclo de crecimiento de las bacterias formadoras de endosporas

El ciclo de crecimiento de las bacterias formadoras de endosporas puede resumirse en 3 principales fases: Formación de nueva célula vegetativa, crecimiento y esporulación. La Figura 1.4 representa de manera ilustrativa este ciclo de crecimiento.

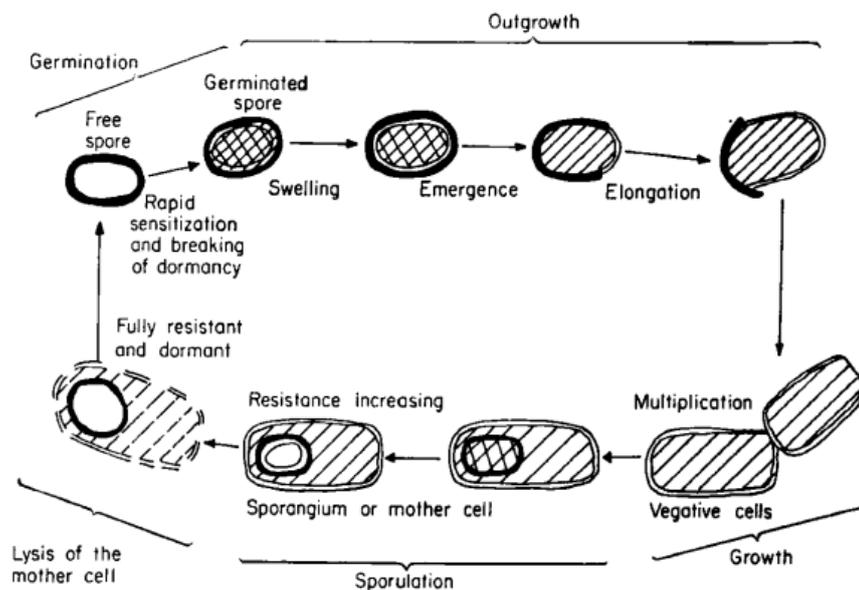


Figura 1.4 Ciclo de crecimiento de las bacterias formadoras de endosporas (Norris, 1971)

1.4.2.1 Formación de nueva célula vegetativa

La formación de una nueva célula vegetativa a partir de una endospora ocurre en 3 pasos: activación, germinación y emergencia.

A nivel de laboratorio, la activación de la endospora se realiza por su calentamiento en un medio líquido a una temperatura elevada, pero subletal, durante varios minutos. Durante la activación, las endoesporas salen de su estado de latencia quedando acondicionadas para la germinación en presencia de nutrientes adecuados. La activación permite acelerar el inicio de crecimiento. La germinación es un proceso en donde las endosporas pierden su refractabilidad, aumentando su

capacidad de tinción y perdiendo la resistencia al calor. La endospora se hincha por el incremento de su humedad y por la síntesis de proteínas, ADN y ARN. Finalmente, toma lugar la emergencia, en donde la nueva célula emerge rompiendo la cubierta de la endospora y se divide de ella. Todo este proceso ocurre en el orden de minutos (Madigan, 2003).

1.4.2.2 Crecimiento

El crecimiento se define como el aumento en el número de células. Una célula vegetativa se divide en dos células por un proceso llamado fisión binaria. Durante este proceso, los constituyentes de la célula aumentan y se reparten para las dos nuevas células. El tiempo de generación o tiempo para completar un ciclo de crecimiento depende de factores nutricionales y genéticos de la bacteria. Puede durar 20 minutos como en el caso de la bacteria *Escherichia coli*, hasta horas (Michael T. Madigan, 2004). El tiempo máximo de generación reportado para la *Bacillus Subtilis* en un medio complejo a 40°C es 0.43 horas (Stainer, 1987). Las fases de crecimiento en un sistema de cultivo cerrado se describen en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Fases de crecimiento microbiano en un cultivo cerrado

Fase de Crecimiento	Descripción
Latencia	Adaptación al medio y síntesis de componentes para crecimiento.
Exponencial Acelerado	Multiplicación de células por fisión, no hay esporulación.
Exponencial Desacelerado	Limitada presencia de sustrato. Inicio de esporulación.
Estacionario	Substrato limita crecimiento. Funciones Vegetativas, no hay crecimiento
Muerte	Lisis de célula

Fuente: (Madigan, 2003)

El crecimiento microbiano típico puede ser representado en una curva de células totales versus tiempo según la Figura 1.5.

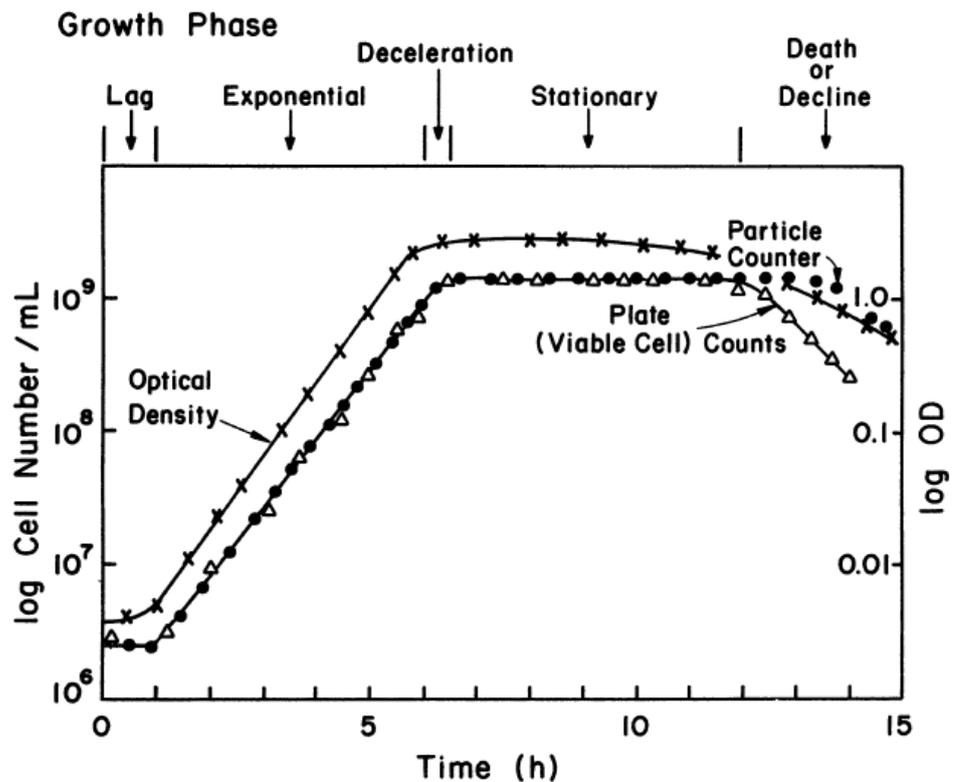


Figura 1.5 Curva típica de un cultivo cerrado de bacterias (Shuler & Kargi, 2002)

1.4.2.3 Esporulación

Durante el crecimiento exponencial no existe esporulación bacteriana. La esporulación inicia cuando cesa el crecimiento por la limitada disponibilidad de un nutriente esencial. La esporulación de la *Bacillus Subtilis* ha sido extensamente estudiada y el proceso completo dura 8 horas. Durante este proceso, cesan reacciones de síntesis de proteínas funcionales en la célula e inician síntesis de proteínas para la formación de la endoespora. La esporulación termina con la lisis de la célula madre y liberación de la endoespora (Madigan, 2003).

1.4.2.4 Endoespora

Al final de la esporulación, se obtiene una nueva estructura metabólicamente inerte, deshidratada, muy resistente al calor y a agentes químicos llamada endoespora. Una endoespora puede

permanecer durante muchos años en estado de latencia hasta que las condiciones sean aptas para iniciar el ciclo de crecimiento. Un factor que puede limitar la viabilidad de una endoespora es la radiación cósmica durante muchos años, debido a mutaciones en el ADN de la endoespora (Madigan, 2003).

1.4.3 Medios de Cultivo

Los medios de cultivo son mezclas de compuestos químicos que sirven como fuente de energía y nutrición para el crecimiento de los microorganismos. Están compuestos por macronutrientes (elementos químicos requeridos en mayor cantidad), y micronutrientes (elementos químicos requeridos en menor cantidad). Estos últimos no suelen añadirse a los medios de cultivo debido a que se requieren en muy pequeñas cantidades y suelen venir como trazas de los macronutrientes. Se suelen añadir solamente en casos de investigaciones de macronutrientes de muy alta pureza (Madigan, 2003).

Los medios de cultivo pueden clasificarse en definidos (cuando se usan fórmulas específicas de compuestos químicos), y complejos, (cuando no tienen una fórmula química exacta). En la Tabla 1.3 se muestran algunos macronutrientes, la forma de administrarse en un medio de cultivo y su función en las células del microorganismo.

Tabla 1.3 Macronutrientes y formas de ser suministrados a un medio de cultivo

Elemento	Composición aproximada en peso en un microorganismo (%)	Forma Suministrada a Medios de Cultivo	Función
C	50	Glucosa Acetato Extracto de Levadura Peptona	Material celular, Lípidos
O	20	Agua Oxígeno Gaseoso	Constituyentes celulares, Proteínas, Ácidos Nucleicos
N	14	Cloruro de Amonio Sulfato de Amonio Aminoácidos	Constituyentes celulares, Proteínas, Ácidos Nucleicos
H	8	Agua	Constituyentes celulares
P	3	Fosfato de Dipotásico Fosfato de Disodio	Ácidos Nucleicos, Lípidos
S	1	Sulfato de Sodio	Aminoácidos
K	1	Fosfato de Dipotásico Cloruro de Potasio	Enzimas para síntesis de proteínas
Ca	0.5	Cloruro de Calcio	Estabilizador de Pared Celular, Termoresistencia endoesporas
Mg	0.5	Cloruro de Magnesio Sulfato de Magnesio	Estabilizador de Ribosomas, Enzimas
Fe	0.2	Cloruro de Hierro Sulfato de Hierro	Respiración Celular, Transporte de Electrones

Fuente: (Madigan, 2003)

1.4.4 Biorreactor

Un biorreactor es un equipo que posee un ambiente biológicamente activo (IUPAC, 2006). También se lo puede definir como un recipiente en donde se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Otra manera de

definir a un biorreactor es, como un sistema diseñado para el crecimiento de células o tejidos.

1.4.5 Configuraciones de biorreactores

Existen varias configuraciones de biorreactores: reactor de tanque agitado, reactor de columna de burbujas, reactor de lecho empacado, reactor airlift, reactor de lecho fluidizado, entre otros (Liu, 2017). La mayoría de estas configuraciones pueden operarse en los tres modos de operación más comunes: batch, semi-batch y CSTR; las ventajas y desventajas de cada modo de operación se encuentran resumidas en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4 Ventajas y desventajas de los modos de operación de reactores

Criterio	Batch	CSTR	Semi-batch
Sustrato	Concentración disminuye en el tiempo.	Concentración constante.	Concentración constante.
Producto deseado	Concentración aumenta en el tiempo.	Se puede mejorar la selectividad controlando la concentración del sustrato.	Concentración aumenta en el tiempo.
Flexibilidad	Fácil de cambiar condiciones de operación.	Difícil de cambiar condiciones de operación.	Fácil de cambiar condiciones de operación.
Aplicaciones	Producción a pequeña escala, sustrato o producto de alto valor.	Producción a grande escala, suministro de sustrato y demanda de producto consistente.	Producción a grande escala y requerimiento de flexibilidad.

Fuente: (Liu, 2017)

1.4.5.1 Reactor de tanque agitado

En un reactor de tanque agitado la mezcla del medio y la dispersión del aire se logra mediante agitación mecánica; esto requiere una cantidad considerable de energía por unidad de volumen. Se utilizan baffles en estos reactores para reducir la vorticidad. Existe una gran variedad de

tamaño y formas de sistemas de agitación para producir diferentes patrones de flujo en el recipiente; si el reactor es alto, la instalación de múltiples impulsores mejora el mezclado (Liu, 2017). La Figura 1.6 muestra un esquema típico de este tipo de reactor.

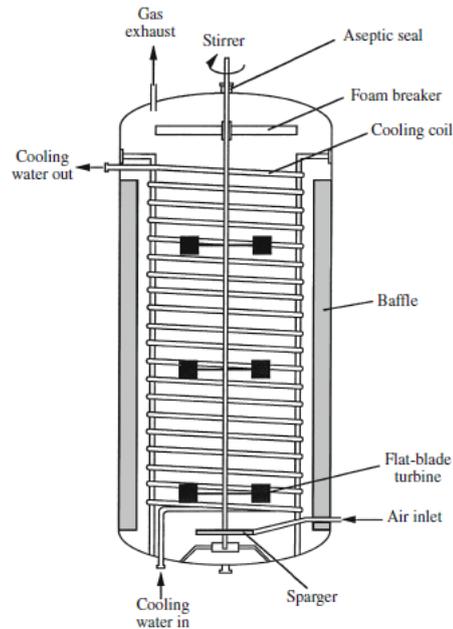


Figura 1.6 Biorreactor de tanque agitado (Doran, 2013)

1.4.6 Principales componentes de un biorreactor

1.4.6.1 Tanque o recipiente

El recipiente o tanque es el lugar donde se encuentra el medio de la reacción. El material que se utiliza para los biorreactores usualmente es acero inoxidable, o vidrio si el reactor tiene una capacidad menor a 30 litros y se desea observar el interior del reactor (Tramper, 1991). Usualmente son de forma cilíndrica con un cascarón semiesférico en la parte inferior para facilitar la purga o evacuación del medio.

1.4.6.2 Sistema de agitación

Este componente solamente está presente en los reactores de tanque agitado. El sistema comprende un motor, un eje de transmisión e impulsores. El motor se encarga de dar la energía mecánica que

requiere el sistema de agitación. El eje transmite dicha energía a los impulsores, los cuales se encuentran acoplados al eje. La energía requerida depende de varias propiedades físicas del fluido, así como la geometría de los impulsores.

Un correcto mezclado es imprescindible en un biorreactor por diversas razones (Doran, 2013):

- Mezclar componentes solubles del medio, tales como el sustrato de las células.
- Dispersar gases en el líquido en forma de burbujas, tales como el aire, para suministrar oxígeno a las células.
- Mantener la suspensión de células y agregados de células.
- Dispersar líquidos inmiscibles para formar emulsiones, si es necesario.
- Mejorar la transferencia de calor en el medio.

Todas estas funciones son de suma importancia en un biorreactor, tanto para justificar las asunciones realizadas en el modelo matemático, así como para el correcto funcionamiento del mismo. La Figura 1.7 muestra diferentes tipos de impulsores utilizados en reactores.

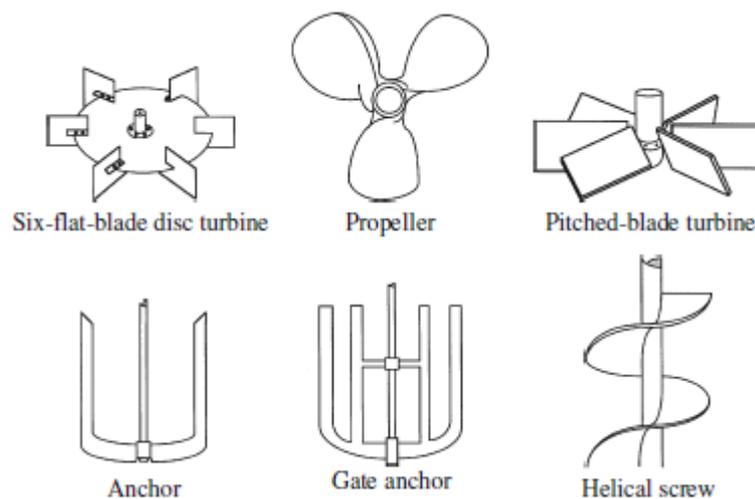


Figura 1.7 Diseños de impulsores utilizados en reactores (Doran, 2013)

1.4.6.3 Sistema de calentamiento

Las células tienen un rango de temperatura óptimo para su crecimiento, por lo cual el cultivo de éstas se realiza en un biorreactor isotérmico a una temperatura usualmente mayor a la temperatura ambiente, por consiguiente, debe existir un sistema que suministre calor al biorreactor manteniéndolo a la temperatura indicada.

Existen varias configuraciones de sistemas de transferencia de calor para reactores utilizadas en la industria (Coulson, Richardson, Backhurst, & Harker, 1999):

- Enchaquetado
- Serpentín externo
- Serpentín interno
- Intercambiador de calor externo

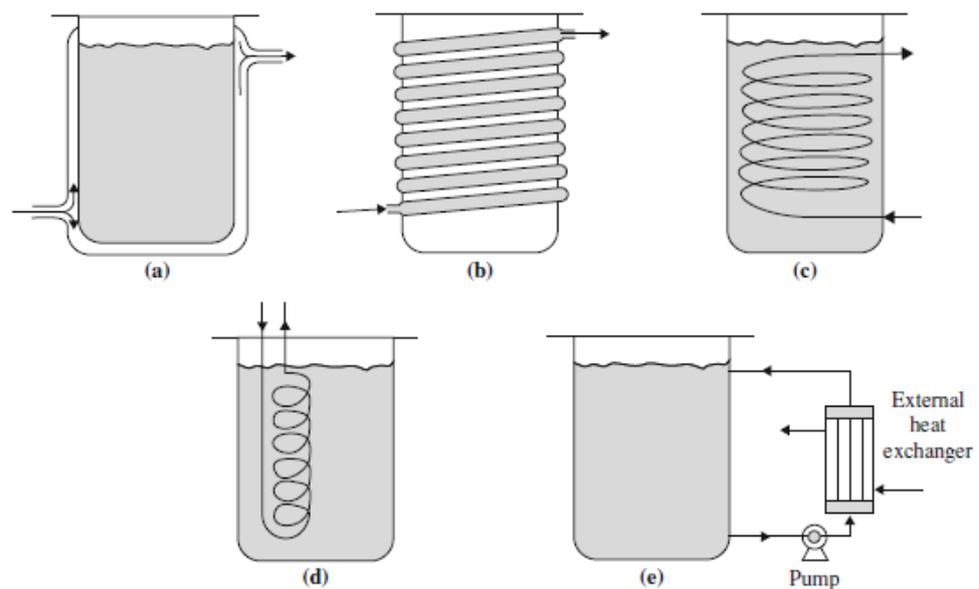


Figura 1.8 Sistemas de calentamiento comunes (Doran, 2013)

El fluido que se utiliza para el intercambio de calor es usualmente agua, ya sea en forma líquida o vapor, de acuerdo con la demanda energética requerida por el biorreactor.

1.4.6.4 Instrumentación

Para que exista un óptimo crecimiento en el biorreactor; parámetros tales como temperatura, pH y concentración de oxígeno disuelto deben ser monitoreados y controlados durante la operación del reactor. Un proceso por naturaleza es dinámico y cualquier perturbación puede causar que el sistema pierda su equilibrio (Smith & Corripio, 1997). Con la adecuada instrumentación se puede monitorear estos parámetros clave para su respectivo control, ya sea manual o automático.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Alternativas de solución al problema

2.1.1 Alternativas de medio de cultivo

Para reproducir la cepa de bacteria *Bacillus Subtilis*, la empresa Quality Corporation S.A. solicitó evaluar como fuente de macronutrientes el uso de melaza como fuente de carbono, urea como fuente de nitrógeno y fosfato dipotásico como fuente de potasio y fósforo.

Para definir las cantidades de cada macronutriente, se utilizaron estudios en donde se evaluó el crecimiento de la bacteria *Bacillus Subtilis* empleando melaza y urea como medio de cultivo a 30°C durante 48 horas con los resultados representados en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Alternativas de medio de cultivo

Alternativa	Medio de Cultivo	Concentración (g/L)	Concentración final (10^8 UFC/mL)	Costo del Medio de Cultivo (\$/L)
1	Caldo de Cultivo LB (Cultivo estándar)	13	100.44	1.041
2	Sacarosa + Extracto de Levadura	10+5	67.67	0.6075
3	Sacarosa + Extracto de Levadura	15+8	88.73	0.7833
4	Melaza + Extracto de Levadura	20+10	98.6	0.747
5	Melaza + Extracto de Levadura	12+12	62.33	0.8328
6	Melaza + Urea	20+2	71.67	0.471
7	Melaza + Urea	25+5	80.07	0.72

Fuente: (Basamma, 2017)

Con los datos de la Tabla 2.1, se evaluó la relación de unidades formadoras de colonia totales y costo de medio de cultivo, presentada en la Tabla 2.2. Se seleccionaron las mejores alternativas en base a la concentración de unidades formadoras de colonia alcanzadas al final del cultivo por costo por litro de medio de cultivo.

Tabla 2.2 Alternativas de medios de cultivo en relación a las unidades formadoras de colonia promedio por costo de medio de cultivo

Alternativa	Medio de Cultivo	Relación Unidades Formadoras de Colonia por Costo de Medio de Cultivo ($10^{11} UFC/\\$)
1	Caldo de Cultivo (Mezcla estándar)	96
2	Sacarosa + Extracto de Levadura	111
3	Sacarosa + Extracto de Levadura	113
4	Melaza + Extracto de Levadura	132
5	Melaza + Extracto de Levadura	75
6	Melaza + Urea	152
7	Melaza + Urea	111

De acuerdo a la Tabla 2.2, las mejores alternativas son las alternativas 4 y 6, las cuales se seleccionaron para evaluar en este proyecto, y la alternativa 1, se utiliza como medio de cultivo estándar para comparar los resultados de las alternativas 4 y 6 a nivel de matraz de laboratorio.

2.1.2 Alternativas de medio esporulante

El uso de un medio de cultivo estandarizado es importante en los estudios de esporulación ya que el medio de esporulación determina parcialmente la resistencia, activación y germinación de las esporas. Muchas especies de bacilos se esporulan satisfactoriamente en el medio estándar llamado

“Medio G”, descrito en la Tabla 2.3, y también en muchos medios ordinarios de laboratorio donde la concentración de glucosa no supere el 0.5% en peso y tenga una adecuada presencia de Mn^{+2} (Norris, 1971).

Tabla 2.3 Composición del medio esporulante estándar “Medio G”

Compuestos	Concentración (g/L)
Glucosa	4
K_2HPO_4	1
$(NH_4)_2SO_4$	6
Extracto de levadura	2
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.1
$MgSO_4$	0.8
$ZnSO_4$	0.01
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01
$CaCl_2$	0.01
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001

Fuente: (Norris, 1971)

Para el medio esporulante en la experimentación de este proyecto se utilizaron las cantidades recomendadas de $MnSO_4 \cdot H_2O$ y $MgSO_4$ por litro de medio de cultivo, cuyas cantidades se especifican en la Tabla 2.4. En este proyecto se añade estas sales al final de la fase de crecimiento, marcando el inicio de la fase de esporulación.

Tabla 2.4 Medio esporulante por litro de medio de cultivo evaluado en este proyecto

Compuestos	Concentración (g/L)
$MgSO_4$	0.8
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.1

2.2 Metodología de diseño

El diseño de un biorreactor industrial debe seguir las siguientes fases:

1. Matraz de laboratorio: Se realizan experimentos usando materiales de laboratorio, donde el biorreactor será del tamaño de un matraz. En esta fase se obtienen las primeras indicaciones sobre la factibilidad del proceso industrial.
2. Biorreactor de pequeña escala: Se realizan experimentos usando biorreactores a pequeña escala del tamaño de 1 a 20 L de volumen. En esta fase se puede evaluar las variaciones en el medio, temperatura, pH y oxígeno disuelto sin incurrir en altos costos en reactivos para el medio de cultivo y operación del equipo.
3. Biorreactor de planta piloto: Se evalúa el proceso como con las condiciones que se pretende evaluar en la planta comercial. El tamaño de los equipos en esta etapa puede ser de 100 a 3000 L de capacidad.
4. Biorreactor comercial: Se ejecuta el proceso para cubrir la demanda u oferta planificado. Se toman los resultados e indicadores de la planta piloto para su operación. (Michael T. Madigan, 2004)

Para el diseño del biorreactor en este proyecto, que permita alcanzar el objetivo de al menos 7×10^{14} unidades formadoras de colonia, y considerando las fases de escalamiento para la construcción de un biorreactor industrial, se estableció la siguiente metodología de diseño representada en la Figura 2.1.

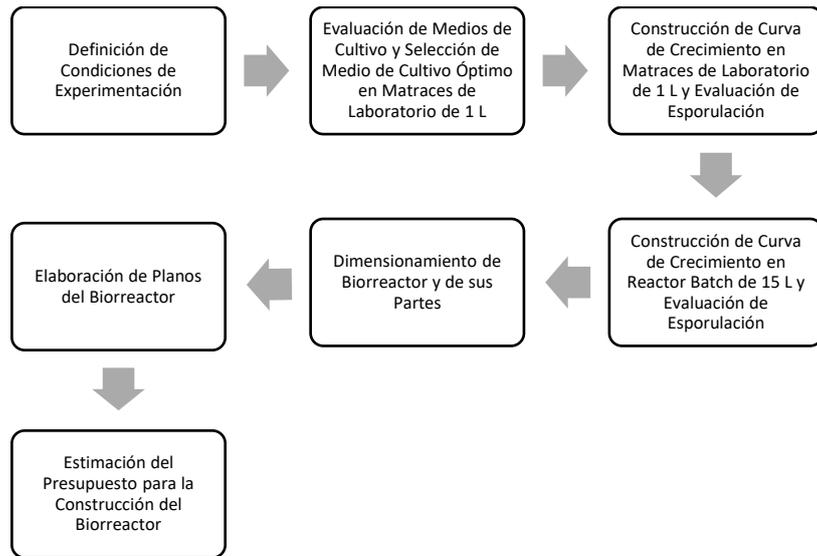


Figura 2.1 Diagrama de metodología de diseño del biorreactor

2.3 Definición de condiciones de experimentación

2.3.1 Cepa de bacteria

La cepa de bacteria *Bacillus Subtilis* fue proporcionada por la empresa Quality Corporation. La presentación de la muestra proporcionada de la cepa es en polvo y de color café claro. Cada 200 gramos de producto contienen $10^{14}UFC$ de esporas de *Bacillus Subtilis* o una *Unidad*. Para este proyecto, se evaluó el uso de 2g de producto por cada litro de medio de cultivo, equivalentes a $1 \times 10^{12}UFC$ por litro de medio de cultivo.

2.3.2 Condiciones en el Biorreactor

Las condiciones óptimas de pH, temperatura, oxígeno disuelto y agitación se describen en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5 Condiciones del medio de cultivo

Condición del medio	Especificación
pH	6-8
Temperatura	30-37°C
Oxígeno disuelto	>2ppm
Agitación	500-600 rpm

Fuente: (Liu, 2017)

Las condiciones de pH son controladas con soluciones de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio 0.1M. La temperatura del medio de cultivo es controlada por una plancha de calentamiento que mantiene la temperatura del medio constante. El oxígeno disuelto es controlado con una bomba de aireación y la agitación del medio.

2.3.3 Condiciones de esterilidad

Todos los materiales en contacto con el medio son esterilizados previo a su uso. El control de contaminación del medio de cultivo se realiza mediante observación por microscopio y cultivo en caja Petri, verificando que sólo la especie inoculada se encuentre en el medio. Los medios de cultivo son autoclavados a 121 °C durante 15 minutos.

2.3.4 Tiempo de operación del reactor

Para reducir el desgaste de los componentes del biorreactor y por conveniencia de la producción de la empresa, se estableció que el tiempo de operación del reactor sea de hasta 24 h. El tiempo de operación del biorreactor depende del tiempo de cultivo o crecimiento y del tiempo de esporulación. El tiempo de esporulación se estableció de 12 horas considerando que el tiempo mínimo de esporulación que requiere una bacteria de *Bacillus Subtilis* es de 8 horas. En consecuencia, el tiempo de crecimiento de la bacteria evaluado en este proyecto es de 12 horas.

2.4 Evaluación de medios de cultivo y selección de medio de cultivo óptimo en matraces de laboratorio de 1 L

2.4.1 Medios de cultivo

En base a las mejores alternativas según la Tabla 2.2, proveyendo de los macronutrientes fósforo y potasio mediante fosfato dipotásico (Norris, 1971), se evalúan los siguientes medios de cultivo descritos en la Tabla 2.6 y en la Tabla 2.7.

Tabla 2.6 Medio de Cultivo 1

Compuestos	Concentración (g/L)
Melaza	20
Urea	2
K_2HPO_4	1

Tabla 2.7 Medio de Cultivo 2

Compuestos	Concentración (g/L)
Melaza	20
Extracto de levadura	10
K_2HPO_4	1

Para comparar los resultados de los medios alternativos, se utiliza el medio de cultivo estándar LB o Luria Bertani. El caldo LB es el medio de crecimiento de bacterias más utilizado para cultivo de microorganismos y tiene la composición descrita en la Tabla 2.8.

Tabla 2.8 Medio de Cultivo Estándar, Luria Bertani

Compuesto	Concentración (g/L)
Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	5

Fuente: (Scientific, 2017)

2.4.2 Activación de esporas

Previo a la inoculación de las esporas en el medio, las esporas son activadas en agua destilada a 70°C durante 30 minutos (Norris, 1971).

2.4.3 Inoculación de esporas

Una vez listo el biorreactor, con su respectivo medio de cultivo y condiciones según la Tabla 2.5, se inoculan las bacterias en el medio.

2.4.4 Evaluación de los medios de cultivo

Luego de inocular las bacterias en el medio, se las cultiva durante 12 horas y se realiza el recuento de células viables alcanzadas.

2.4.4.1 Recuento de células viables

El recuento de células viables se realiza por el método de conteo en placa. Se toma una alícuota de suspensión de cada cultivo y se realiza diluciones sucesivas que permitan contar unidades formadoras de colonia en un rango de 30 y 300. Una alícuota de 0.5 mL de la última dilución de cada cultivo es inoculada en cajas Petri con agar nutritivo descrito en la Tabla 2.9. Las placas inoculadas son incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h. Luego se realiza el conteo de unidades formadoras de colonia para cada cultivo y se calcula el número de unidades formadoras de colonias por mililitro.

Tabla 2.9 Agar nutritivo para conteo de células viables

Compuestos	Concentración (g/L)
Triptona	5
Dextrosa	1
Extracto de levadura	2.5
Agar	12

Fuente: (Madigan, 2003)

2.4.5 Selección del medio de cultivo óptimo

El número de células viables alcanzado al final de las 12 horas en cada medio de cultivo es dividido para el costo por litro de cada medio. El resultado más alto es seleccionado como medio de cultivo óptimo y con este medio se continúa a las siguientes fases de la metodología de diseño.

2.5 Construcción de curva de crecimiento en matraces de laboratorio de 1 L y evaluación de esporulación

Se repiten los pasos mencionados en los apartados 2.4.2 y 2.4.3, y se cultiva las bacterias durante 12 horas. Esta fase es denominada como fase de crecimiento.

2.5.1 Recuento de células totales y viables

El recuento de células totales se realiza utilizando la cámara de Petroff-Hausser (Madigan, 2003). Se realiza el conteo de células totales cada hora durante las 12 horas de la fase de crecimiento. El recuento de células viables se realiza al final de las 12 horas de crecimiento según el apartado 2.4.4.1.

2.5.2 Construcción de Curva de Crecimiento

Se elabora una gráfica de células totales versus tiempo con los datos obtenidos en el apartado 2.5.1.

2.5.3 Evaluación de la esporulación del microorganismo

Luego de las 12 horas de crecimiento, el medio de cultivo es dividido en dos volúmenes iguales. En uno se añade el medio esporulante descrito en la Tabla 2.4 mientras que en el otro no se añade este medio. El proceso de esporulación se evalúa después de 12 horas añadidas las sales.

2.5.4 Recuento de esporas

Al final de las 12 horas de esporulación se toma una muestra del medio y se calienta en baño maría a 70°C por 30 minutos. Luego se hace el recuento de células viables de la muestra sometida a calentamiento, según el apartado 2.4.4.1; este número representa las esporas en el medio (Norris, 1971). El porcentaje de esporulación se calcula usando la ecuación 2.1.

$$\% \text{Esporulación} = \frac{\text{UFC de esporas al final de la esporulación}}{\text{UFC al final de las 12 horas de crecimiento}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.6 Construcción de curva de crecimiento en reactor batch de 15 L y evaluación de esporulación

Se repiten los pasos de la sección 2.5 en el reactor batch de 20 L ubicado en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, utilizando en esta experimentación 15 L de medio de cultivo. Los datos obtenidos en este paso se utilizan para el diseño del biorreactor que permita obtener $7 \times 10^{14} \text{ UFC} / \text{batch}$.

2.7 Dimensionamiento del Biorreactor y de sus Partes

2.7.1 Matriz de decisión

Existen varias configuraciones para cada componente del biorreactor, por lo cual es recomendable utilizar una matriz de decisión en la cual se tiene los criterios relevantes con su respectiva ponderación, la cual está ligada a su importancia. A cada opción se le da una calificación relativa para cada criterio, la cual es multiplicada por la ponderación respectiva; finalmente se suma las calificaciones ponderadas de cada criterio para obtener la calificación final de cada opción, seleccionando la opción con mayor calificación.

En el presente trabajo se realiza una ponderación de 0 a 1, donde 0 corresponde a poco importante y 1 corresponde a muy importante. Los criterios que se utilizan son los siguientes (Yang, 1994):

- Inversión: mientras más costosa sea la opción, menor es su calificación.
- Instalación: mientras más dificultosa sea la instalación, menor es su calificación.
- Operación: mientras más dificultosa sea la operación, menor es su calificación.

- Versatilidad: mientras más dificultoso sea realizar un cambio en su operación, menor es su calificación.

2.7.2 Tipo o configuración del biorreactor

Se procede a generar la matriz de decisión, presentada en la Tabla 2.10, con 5 opciones de biorreactores utilizados en la industria.

Tabla 2.10 Matriz de decisión para el tipo de biorreactor

Criterio	Ponderación	STR	Columna de burbujas	Airlift	Lecho empacado	Lecho fluidizado
Inversión	0.5	4	4	4	4	4
Instalación	0.3	5	3	1	5	2
Operación	1	4	2	5	4	3
Versatilidad	0.8	5	2	3	3	1
Total		11.5	6.5	9.7	9.9	6.4

2.7.3 Tanque o recipiente

2.7.3.1 Selección del material de construcción

Debido a que no existe una norma específica para la construcción de biorreactores, existe libertad para la selección del material de construcción; sin embargo, los aceros inoxidables recomendados para biorreactores son (Aguilera & Ramírez, 2016):

- Acero AISI 304
- Acero AISI 316

Las propiedades mecánicas de estos dos tipos de acero se presentan en la Tabla 2.11.

Tabla 2.11. Propiedades Mecánicas de los aceros AISI 304 y AISI 316.

Propiedades	AISI 304	AISI 316
Dureza Rockwell B	70	79
Resistencia máxima (MPa)	505	580
Resistencia a la fluencia (MPa)	215	290
Elongación (%)	70	50
Módulo de elasticidad (GPa)	193	193

Fuente: (Boyer & Gall, 1985)

Debido a que ambos aceros poseen propiedades mecánicas similares, y el acero AISI 316 es más resistente a la corrosión por cloruros (Liu, 2017), se selecciona el acero AISI 316 para todas las partes que se encuentran en contacto con el medio (recipiente y sistema de agitación), y el acero AISI 304 para las demás partes del reactor (soporte y conexiones).

2.7.3.2 Espesor

Las normas aplicables para la determinación de espesor de tanques son dependientes de la presión de operación y la presión hidrostática que ejerce el medio en el reactor; estas presiones dependen del volumen del biorreactor. La Ecuación 2.2 permite estimar el espesor de tanques de almacenamiento de líquidos (American Petroleum Institute, 2007).

$$e = \frac{gD\rho H}{2S} \quad (2.2)$$

Donde e es el espesor requerido, g es la aceleración de la gravedad, D es el diámetro del recipiente, ρ es la densidad del líquido, H es la altura del líquido y S es la resistencia a la fluencia del material del recipiente.

2.7.4 Propiedades físicas del medio de cultivo

El componente que causa mayor desviación en las propiedades físicas del medio (densidad y viscosidad) con respecto a las del agua, es la melaza,

debido a que es el macronutriente con mayor concentración en el medio. Las Tablas 2.12 y 2.13 contienen información referencial de las propiedades físicas del agua y de la melaza.

Tabla 2.12 Propiedades físicas del agua a 37°C

Densidad (g/L)	993.3
Viscosidad dinámica (cp)	0.6913

Fuente: (IAPWS, 2018)

Tabla 2.13 Propiedades físicas de la melaza

Densidad (g/L)	1400
Viscosidad dinámica (cp)	5000
Masa molar (g/mol)	201.2

Fuente: (Premier Molasses, 2013)

2.7.4.1 Densidad

Para estimar la densidad del medio se puede suponer volúmenes aditivos, como se observa en la Ecuación 2.3.

$$\rho = \frac{m_w + m_m + m_b}{V} \quad (2.3)$$

Donde ρ es la densidad del medio de cultivo, m_w es la masa de agua en el medio, m_m es la masa de melaza en el medio, m_b es la masa de bacterias en el medio y V es el volumen del medio de cultivo.

2.7.4.2 Viscosidad dinámica

Para estimar la viscosidad de una mezcla se puede emplear la Ecuación 2.4 (Grunberg & Nissan, 1949).

$$\mu = \mu_m^x \mu_w^{1-x} \quad (2.4)$$

Donde μ es la viscosidad del medio de cultivo, μ_m es la viscosidad dinámica de la melaza, x es la fracción molar de la melaza en el medio y μ_w es la viscosidad dinámica del agua a la temperatura de operación.

2.7.5 Sistema de aireación

La reproducción de las bacterias se hará en un medio aeróbico y la tasa de consumo de una bacteria *Bacillus Subtilis* es de $1.5 * 10^{-10} \text{ mmol/h}$ (Doran, 2013). Se debe suministrar el oxígeno necesario para que el crecimiento bacteriano no sea inhibido por la falta de oxígeno y para asegurar la disponibilidad de oxígeno a lo largo de la altura del biorreactor.

2.7.5.1 Oxígeno requerido

La cantidad de oxígeno requerida es máxima cuando se llegue al estado estacionario, debido a que en ese momento se alcanza la máxima concentración de bacterias y el requerimiento de oxígeno es proporcional a la cantidad de bacterias en el medio. Para garantizar que el oxígeno disuelto en el medio sea suficiente, se debe cumplir la Ecuación 2.5 (Shuler & Kargi, 2002).

$$n_{OS} = n_{OR_{max}} = q_O N_{max} \quad (2.5)$$

Donde n_{OS} es la tasa de oxígeno suministrado, $n_{OR_{max}}$ es el máximo oxígeno requerido por unidad de tiempo, q_O es la tasa de consumo de oxígeno específica y N_{max} es la máxima cantidad de bacterias en el medio. También se tiene la relación de transferencia de masa en la Ecuación 2.6.

$$n_{OS} = k_L (C_L^* - C_L) \quad (2.6)$$

Donde k_L es el coeficiente de transferencia de oxígeno en el medio de cultivo, C_L^* es la concentración de oxígeno en el medio en equilibrio con

la fase gaseosa y C_L es la concentración de oxígeno en un instante determinado. k_L es un parámetro que debe medirse experimentalmente, debido a que depende fuertemente de la composición del medio, la tasa de aireación, temperatura e intensidad de agitación.

2.7.5.2 Potencia de aireación

La potencia requerida por el compresor para suministrar el aire necesario está dada por la Ecuación 2.7 (Doran, 2013).

$$P_v = \rho g F_g H \quad (2.7)$$

Donde P_v es la potencia requerida por el compresor, ρ es la densidad del líquido, g es la gravedad en la superficie de la tierra, F_g es el flujo volumétrico de aire suministrado y H es la altura del líquido en el biorreactor.

2.7.6 Sistema de agitación

Para garantizar una mezcla eficaz en el biorreactor, se debe diseñar correctamente su sistema de agitación, esto comprende la selección de los impulsores, la velocidad angular del sistema y la potencia requerida por el motor para llevar a cabo la agitación en el medio de cultivo empleado.

En el presente proyecto se utilizarán turbinas Rushton, ya que, al ser el tipo de impulsor más utilizado, es el más estudiado y caracterizado; además, provee gran dispersión de gas (Doran, 2013), a pesar de que su agitación es mayormente radial. Este problema es solucionado por el sistema de aireación, el cual ayuda a mezclar el líquido axialmente. En la Figura 2.2 se observa el patrón de flujo creado por este tipo de impulsores:

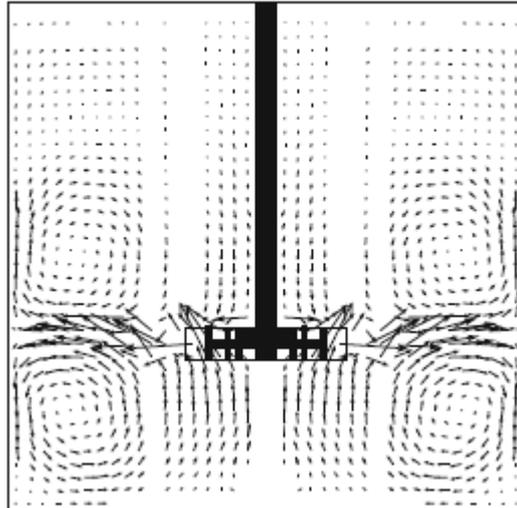


Figura 2.2 Campo de velocidad generado por turbinas Rushton (Schafer, Hofken, & Durst, 1997)

2.7.6.1 Velocidad angular

La velocidad angular requerida puede ser estimada por la Ecuación 2.8, la cual relaciona la capacidad del agitador y la dispersión de gases suministrados al biorreactor (Doran, 2013).

$$5Fl_g = \sqrt{Fr \frac{D_i}{D}} \quad (2.8)$$

Donde D_i es el diámetro del impulsor y D es el diámetro interno del biorreactor; además, Fl_g (Número de flujo de gas) y Fr (Número de Froude) son números adimensionales definidos por las Ecuaciones 2.9 y 2.10 (Doran, 2013).

$$Fl_g = \frac{F_g}{N_i D_i^3} \quad (2.9)$$

$$Fr = \frac{N_i^2 D_i}{g} \quad (2.10)$$

Donde N_i es la velocidad angular del sistema de agitación. Velocidades angulares mayores o iguales a la que cumple con la Ecuación 2.8 garantizan una dispersión total del aire en el biorreactor.

2.7.6.2 Potencia de agitación

La potencia requerida por el motor del sistema de agitación puede ser estimada mediante la Ecuación 2.11.

$$P = N_p \rho N_i^3 D_i^5 \quad (2.11)$$

Donde N_p es el número de potencia. Existen correlaciones gráficas entre el número de potencia y el número de Reynolds, como en la Figura 2.3.

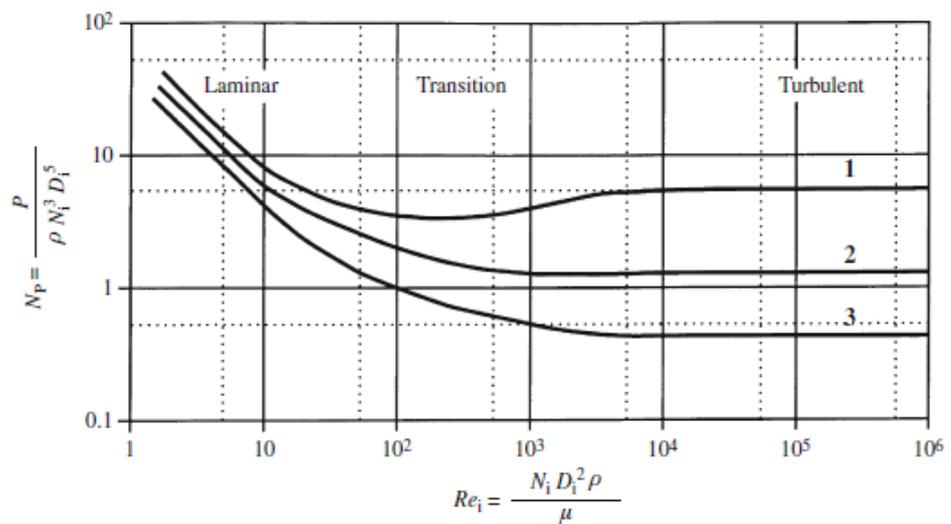


Figura 2.3 Correlaciones entre el número de Reynolds y el número de potencia para varios impulsores (Rushton, Costich, & Everett, 1950)

Donde μ es la viscosidad dinámica del medio de cultivo. De acuerdo a la Figura 2.3, donde la curva 1 representa a las turbinas Rushton, la curva 2 representa a las turbinas de cuchilla inclinada y la curva 3 representa a propulsores marinos convencionales; el número de potencia para las turbinas Rushton en régimen turbulento es alrededor de 5.

2.7.7 Sistema de calentamiento

El sistema de calentamiento constará de una chaqueta en el biorreactor, la cual proveerá de calor al biorreactor mediante una resistencia eléctrica hasta que el líquido contenido en el biorreactor alcance la temperatura óptima de 37°C. Una vez alcanzada esta temperatura, la resistencia se apagará hasta que la temperatura se encuentre nuevamente por debajo de lo especificado.

La Ecuación 2.12 es un balance de energía en el biorreactor, con esta ecuación se puede estimar la potencia requerida por la resistencia para proveer el calor necesario al biorreactor para que el líquido dentro de él alcance la temperatura de operación en un tiempo determinado.

$$mc \frac{dT(t)}{dt} = \dot{Q} \quad (2.12)$$

Donde m es la masa de líquido en el biorreactor, c es el calor específico del medio de cultivo, t es el tiempo, \dot{Q} es el calor por unidad de tiempo suministrado por la resistencia eléctrica, y T es la temperatura del reactor.

2.8 Elaboración de Planos del Biorreactor

Se presenta un plano con las dimensiones de las partes del biorreactor elaborado en Inventor 2019 versión estudiantil y un P&ID del biorreactor elaborado en Autocad Plant 2018 versión estudiantil.

2.9 Análisis económico

La empresa Quality Corporation realiza la importación en iguales cantidades de 3 cepas del género *Bacillus*, entre ellas *Bacillus Subtilis*. Para el análisis económico, se elige un escenario positivo, en el que se considera que estas 3 cepas tendrán un comportamiento similar con las mismas condiciones evaluadas para la bacteria *Bacillus Subtilis*. El análisis económico incluye, los

costos de importación, los costos de producción en el biorreactor y el ahorro anual considerando las 3 cepas de *Bacillus*. También incluye la inversión requerida en este proyecto, la TIR, el VAN, el tiempo de recuperación de la inversión y el porcentaje de disminución de importaciones.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Selección del medio de cultivo óptimo

Luego de evaluar los 3 medios de cultivo seleccionados en la sección 2.4.1, se obtuvieron los resultados presentados en las Tablas 3.1, 3.2 y 3.3.

Tabla 3.1 Concentración de *Bacillus Subtilis* alcanzada en el medio de cultivo 1.

Prueba	Tiempo de cultivo (h)	Concentración inicial (10^8 UFC/mL)	Concentración final (10^{12} UFC/mL)
1	12	2.9	1.62
2	12	2.9	1.36
3	12	2.9	1.40
Promedio			1.46

Tabla 3.2 Concentración de *Bacillus Subtilis* alcanzada en el medio de cultivo 2.

Prueba	Tiempo de cultivo (h)	Concentración inicial (10^8 UFC/mL)	Concentración final (10^{12} UFC/mL)
1	12	2.9	6.80
2	12	2.9	8.12
3	12	2.9	7.02
Promedio			7.31

Tabla 3.3 Concentración de *Bacillus Subtilis* alcanzada en el medio de cultivo estándar

Prueba	Tiempo de cultivo (h)	Concentración inicial (10^8 UFC/mL)	Concentración final (10^{12} UFC/mL)
1	12	2.9	21.3
2	12	2.9	22.5
3	12	2.9	25.0
Promedio			22.9

Evaluando la relación entre concentración promedio alcanzada y el costo por litro de los medios de cultivo, se obtuvieron los resultados de la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Concentración de *Bacillus Subtilis* alcanzada por costo de medio de cultivo.

Alternativas	Costo de medio de cultivo (\$/L)	Concentración final (10^{12} UFC/mL)	Relación entre Concentración final y costo (10^{15} UFC/\$)
Medio de cultivo 1	0.01	1.46	188
Medio de cultivo 2	1.91	7.31	3.83
Medio de cultivo estándar	5.36	22.9	4.27

La concentración más alta por costo de medio de cultivo corresponde al medio de cultivo 1. Esto quiere decir que se puede conseguir una mayor concentración de *Bacillus Subtilis* por dólar invertido en medio de cultivo. Por lo tanto, el medio de cultivo 1 resulta ser el óptimo en esta evaluación, y se utiliza este medio para las siguientes fases de la experimentación. Relacionando el costo del medio de cultivo 1 con el costo del medio de cultivo estándar de la Tabla 3.4, se obtiene que el medio de cultivo estándar el 536 veces más caro que el medio de cultivo 1.

3.2 Curva de Crecimiento de *Bacillus Subtilis* en Medio de Cultivo Óptimo y Evaluación de la Esporulación en Matracas Erlenmeyer de 1L

3.2.1 Curva de crecimiento en matraces de 1L

Para optimizar la cantidad del medio de cultivo 1 a utilizar y reducir el exceso de sustrato, se redujo la concentración del medio de cultivo 1 hasta encontrar la concentración mínima en la que la bacteria presenta crecimiento acelerado. Esta concentración se presenta en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Concentración mínima de medio de cultivo 1 en la que existe crecimiento acelerado de la bacteria *Bacillus Subtilis*.

Compuestos	Concentración (g/L)
Melaza	5
Urea	0.5
K ₂ HPO ₄	0.25

Luego de 12 horas de crecimiento, la concentración de células totales en función del tiempo se presenta en la Figura 3.1, generada con información de la Tabla 3.6. En la Tabla 3.6 se incluye la concentración final de células viables por mililitro.

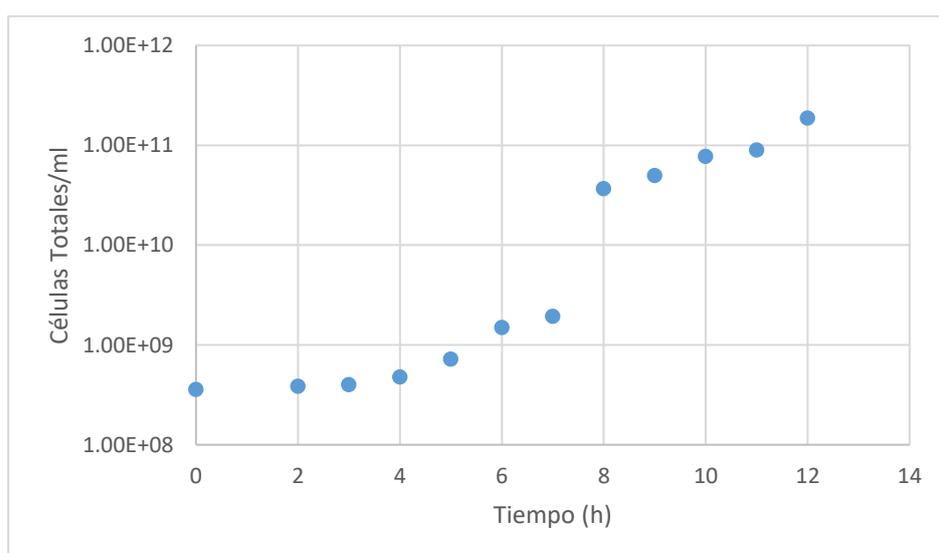


Figura 3.1 Curva de Crecimiento de la bacteria *Bacillus Subtilis* matraces Erlenmeyer de 1 L

Tabla 3.6 Crecimiento de la bacteria *Bacillus Subtilis* en matraces Erlenmeyer de 1 L

Tiempo (h)	Prueba 1 (10 ⁸ Células Totales/ml)	Prueba 2 (10 ⁸ Células Totales/ml)	Prueba 3 (10 ⁸ Células Totales/ ml)	Promedio (10 ⁸ Células Totales /ml)	Fase de Crecimiento
0	3.20	4.18	3.42	3.60	Adaptación
2	3.45	4.50	3.69	3.88	Adaptación
3	3.56	4.64	3.80	4.00	Adaptación
4	4.27	5.57	4.56	4.80	Adaptación
5	6.45	8.41	6.89	7.25	Crecimiento acelerado
6	13.4	17.4	14.3	15.0	Crecimiento acelerado
7	17.3	22.5	18.4	19.4	Crecimiento acelerado
8	328	428	351	369	Crecimiento acelerado
9	445	580	475	500	Crecimiento desacelerado
10	690	899	736	775	Crecimiento desacelerado
11	801	1040	855	900	Crecimiento desacelerado
12	1670	2180	1780	1880	Crecimiento desacelerado
10⁸ UFC Final/ml	1480	2140	1730	1790	

De la Tabla 3.6, se observa que la fase de adaptación tiene una duración de 4 horas, fase de crecimiento acelerado tiene una duración de 4 horas y que luego de 12 horas de crecimiento no se alcanzó la fase estacionaria.

3.2.2 Evaluación de esporulación en matraces de 1 L

Los resultados de la evaluación de esporulación se presentan en las Tablas 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10.

Tabla 3.7 Resultados de esporulación en matraces Erlenmeyer de 1 L**Prueba 1**

	Concentración inicial (10^8 UFC/mL)	Concentración después de prueba de calor (10^8 UFC/mL)
Sin medio esporulante	1790	1.45
Con medio esporulante	1790	197

Tabla 3.8 Resultados de esporulación en matraces Erlenmeyer de 1 L**Prueba 2**

	Concentración inicial (10^8 UFC/mL)	Concentración después de prueba de calor (10^8 UFC/mL)
Sin medio esporulante	1790	1.28
Con medio esporulante	1790	186

Tabla 3.9 Resultados de esporulación en matraces Erlenmeyer de 1 L**Prueba 3**

	Concentración inicial (10^8 UFC/mL)	Concentración después de prueba de calor (10^8 UFC/mL)
Sin medio esporulante	1790	1.19
Con medio esporulante	1790	175

Tabla 3.10 Porcentaje de Esporulación Promedio

	Concentración inicial (10^8 UFC/mL)	Concentración después de prueba de calor (10^8 UFC/mL)	Porcentaje de Bacterias Esporuladas resistentes al calor (%)
Sin medio esporulante	1790	1.30	0.073
Con medio esporulante	1790	186	10.40

De la Tabla 3.10 se evidencia, que el uso del medio esporulante provoca un mayor porcentaje de esporulación de las bacterias.

3.3 Curva de Crecimiento de *Bacillus Subtilis* en Medio de Cultivo Óptimo y Evaluación de la Esporulación en Reactor Batch de 15 L

3.3.1 Curva de crecimiento en reactor de 15 L

Los resultados de crecimiento obtenido en el reactor Batch de 15 L se presentan en la Tabla 3.11 y su respectiva curva de crecimiento en la Figura 3.2. En la Tabla 3.11 se incluye la concentración de células viables alcanzadas.

Tabla 3.11 Crecimiento de la bacteria *Bacillus Subtilis* en Reactor Batch de 15 L

Tiempo	Concentración (10^8 Células Totales /ml)	Fase de Crecimiento
0	3.24	Adaptación
2	3.37	Adaptación
4	4.36	Adaptación
5	4.69	Adaptación
6	5.02	Adaptación
7	5.58	Adaptación
8	14.3	Crecimiento Acelerado
9	19.1	Crecimiento Acelerado
10	438	Crecimiento Acelerado
11	788	Crecimiento Desacelerado
12	1670	Crecimiento Desacelerado
10^8 UFC Final/ml	1510	

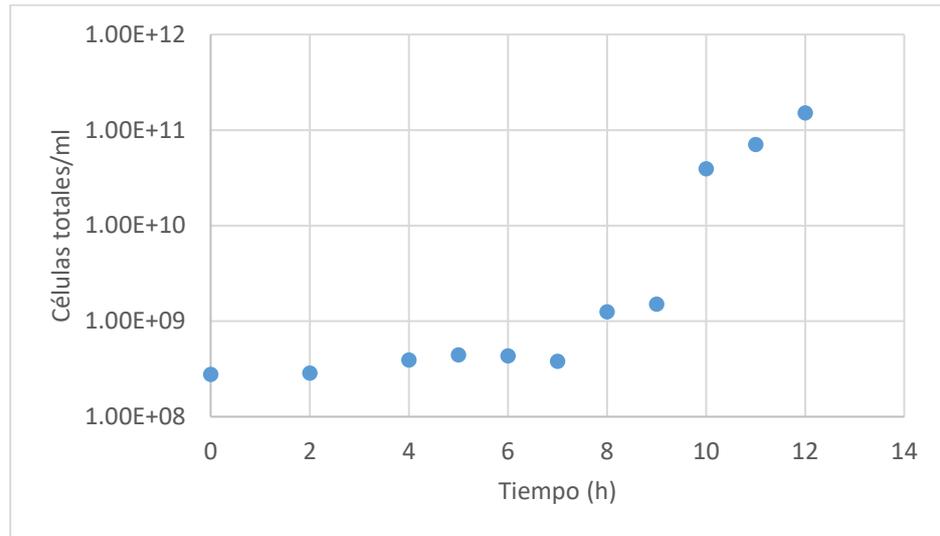


Figura 3.2 Curva de Crecimiento de la bacteria *Bacillus Subtilis* en Reactor Batch de 15 L

3.3.2 Evaluación de esporulación en reactor de 15 L

Los resultados de esporulación obtenidos se presentan en la Tabla 3.12

Tabla 3.12 Resultados de esporulación en reactor batch de 15 L sólo se hizo una repetición de resistencia al calor

	Concentración inicial ($10^8 UFC/mL$)	Concentración después de prueba de calor ($10^8 UFC/mL$)	Porcentaje de Bacterias Esporuladas resistentes al calor (%)
Sin medio esporulante	1510	2.85	0.19%
Con medio esporulante	1510	138	9.13%

En la Tabla 3.12, se puede observar que la máxima concentración de esporas alcanzadas se obtuvo con el medio esporulante, y fue de $138 \times 10^8 UFC/mL$, lo cual equivale a un total de 2.07×10^{14} esporas en los 15 L del reactor.

3.4 Dimensionamiento del biorreactor

Los cálculos detallados se encuentran en el anexo D.

3.4.1 Volumen

Para obtener el volumen del reactor se utiliza la concentración final de esporas alcanzadas y la cantidad de esporas requeridas; además se utiliza un factor de seguridad de 1.3 por escalamiento y un contenido de líquido del 80% del reactor. En la Tabla 3.13 se detalla los resultados.

Tabla 3.13 Volumen de Biorreactor

Cantidad requerida de esporas (UFC)	7×10^{14}
Cantidad alcanzada de esporas (UFC)	2.07×10^{14}
Volumen efectivo del reactor (L)	66
Volumen del biorreactor (L)	82

El volumen efectivo es el espacio que ocupará el medio de cultivo en el biorreactor.

3.4.2 Dimensiones

Utilizando una relación altura – diámetro de 2.5 para calcular el diámetro y altura del biorreactor, y se calcula el espesor empleando la Ecuación 2.2 y el esfuerzo de fluencia del acero AISI 316, dicho valor se encuentra en la Tabla 2.11. Los resultados se muestran en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14 Dimensiones Calculadas

Diámetro (cm)	34.8
Altura (cm)	86.0
Espesor (mm)	0.003

Para diámetros menores a 3.6m el espesor de diseño debe ser el máximo entre el espesor calculado y 5mm (American Petroleum Institute, 2007). Los planos esquemáticos del biorreactor se encuentran en el anexo B. La Tabla 3.15 muestra las dimensiones de diseño.

Tabla 3.15 Dimensiones de Diseño

Diámetro (cm)	35
Altura (cm)	85
Espesor (mm)	5

3.4.3 Aireación

Para determinar el requerimiento de oxígeno se utiliza la Ecuación 2.5 y para determinar la potencia requerida por el compresor de aire se emplea la Ecuación 2.7. Los resultados se muestran en la Tabla 3.16.

Tabla 3.16 Resultados del sistema de aireación

Aire suministrado (m³/h)	25.8
Potencia de compresor (W)	50

3.4.4 Agitación

Se emplean turbinas Rushton como impulsores para el sistema de agitación y se emplean las Ecuaciones 2.8 a 2.11 para calcular la velocidad angular de diseño y la potencia requerida por el motor para generar esa velocidad angular en el sistema de agitación. Los resultados se muestran en la Tabla 3.17.

Tabla 3.17 Resultados de sistema de agitación

Diámetro de impulsores (cm)	15
Velocidad angular de diseño (rpm)	800
Potencia del motor (KW)	2

3.4.5 Calentamiento e instrumentación

Acorde a la Ecuación 2.2 se selecciona la potencia requerida por la resistencia eléctrica en la chaqueta del biorreactor, para que éste alcance la temperatura de operación en 15 minutos.

Tabla 3.18 Resultados del sistema de calentamiento

Tiempo de calentamiento (min)	15
Potencia de resistencia eléctrica (KW)	3

El biorreactor contará con sensores de presión, temperatura, oxígeno disuelto y pH; la presión y temperatura serán controladas por una válvula de escape de gases y un interruptor en la resistencia de la chaqueta del biorreactor respectivamente. El P&ID en el anexo A muestra más detalladamente los indicadores y controladores empleados.

3.5 Análisis económico

La demanda anual de Quality Corporation de la cepa *Bacillus Subtilis* es de aproximadamente 38 *Unidades* al año a un costo de \$300 cada *unidad*. La capacidad del reactor es de 7 unidades ($7 \times 10^{14} UFC$) por batch, por lo tanto, se requieren 6 batchs al año para cubrir esta demanda. Esta información se resume en la Tabla 3.19.

Tabla 3.19 Número de batchs requeridos para cubrir demanda anual de *Bacillus Subtilis*

Costo de importación de cada <i>Unidad</i> de cepa	Cepas	Número de <i>Unidades</i> importadas	Costo de importación anual de <i>Unidades</i>	Capacidad de <i>Unidades</i> del reactor por batch	Número de batchs teóricos al año	Número de batchs al año
\$300	1	38	\$11,428.57	7	5.44	6

Considerando un escenario positivo, en el que dos cepas más de *Bacillus* importadas por Quality Corporation tienen un comportamiento similar a los obtenidos en este proyecto, se presenta en la Tabla 3.20 el número de lotes necesarios para cubrir la demanda de estas 3 cepas.

Tabla 3.20 Número de lotes requeridos para cubrir demanda anual de 3 cepas de bacterias

Costo de importación de cada <i>Unidad</i> de cepa	Cepas	Número de <i>Unidades</i> importadas	Costo de importación anual de <i>Unidades</i>	Capacidad de <i>Unidades</i> del reactor por lote	Número de batchs teóricos al año	Número de batchs al año
\$300	3	114	\$34,285.71	7	16.33	17

Los costos de producción de este proyecto están constituidos sólo por costos variables. Los costos variables totales se estiman en \$192.52 por batch y en la Tabla 3.21 se muestra el detalle.

Tabla 3.21 Costos Variables Totales por Batch

	Costos unitarios	Cantidad requerida por batch	Costos variables por batch (\$)
Cepa de bacteria inicial importada	1.5000 \$/g	120 g	180
Medio de cultivo	0.0019 \$/L	66 L	0.13
Agua	0.3220 \$/m ³	0.3m ³	0.10
Medio esporulante	0.0045 \$/L	66 L	0.3
Consumo de Electricidad de equipos	0.5000 \$/h	24 h	12.00
Costos variables totales por batch (\$)			192.52

De la Tabla 3.21, se observa que se requieren 120 g de cepa de bacteria inicial equivalentes a 0.6 unidades por batch, según la relación másica por unidad descrita en el apartado 2.3.1. Para la producción de *Bacillus Subtilis*, en la Tabla 3.19 se observa que se requieren 6 batchs al año, lo que equivalen a 3.6 unidades al año de cepa importada para la producción. Esto significa una reducción del 91% de las 38 unidades importadas anualmente. Este análisis se resume en la Tabla 3.22.

Tabla 3.22 Reducción de importación de la cepa Bacillus Subtilis

Masa de cepa de bacteria inicial importada requerida por batch (g)	Masa por unidad de cepa	Unidades requeridas por batch	Unidades requeridas anualmente para la producción	Unidades importadas anualmente sin el proyecto	% de reducción de importación de la cepa Bacillus Subtilis
120	200	0.6	3.6	38.10	91%

Los costos de inversión para el proceso de producción de esporas de bacterias bajo los requerimientos de la empresa se estiman en \$22,400 se muestra el detalle en la Tabla 3.23.

Tabla 3.23 Costos de Inversión del proyecto

Equipos	Especificación	Valor de compra
Refrigerador	500 L	\$ 600.00
Autoclave pequeño	15L, 121-150°C	\$ 400.00
Estufa	30-220°C, 32L	\$ 1000.00
Incubadora	25 L, 30-100°C	\$ 600.00
Contador de colonias	Estándar	\$ 400.00
Centrífuga	120 Kg de Carga Máxima, Fuerza Centrífuga 1880xG	\$ 8,500.00
Caldero pequeño	50HP, 15PSI	\$ 1,200.00
Compresor de aire con filtro microbiológico	0.02 KW	\$ 1,200.00
Bioerractor con instrumentación	80 L	\$ 8,500.00
	Inversion total	\$ 22,400.00

Mediante la construcción del flujo de caja del proyecto, el cual se encuentra en el Anexo C, se presenta la evaluación económica realizada en la Tabla 3.24. La tasa mínima atractiva de retorno recomendada para este tipo de proyecto considerando el tipo de industria y el riesgo país es de 14.89% (Damodaran, 2018).

Tabla 3.24 Resumen de Evaluación del Proyecto para la producción de 3 cepas de bacterias *Bacillus*

Costo de importación anual	\$ 34,285.71
Costo de producción anual	\$ 3,272.88
Ahorro anual	\$ 31,012.84
Inversión	\$ 22,400
Años de evaluación del proyecto	10
Tiempo de recuperación de inversión	9 meses
Tasa mínima atractiva de retorno	14.89%
TIR	168%
VAN	\$149,287.13

Según la Tabla 3.24, el tiempo de recuperación de la inversión en este proyecto es de 9 meses. La TIR es mayor a la tasa mínima atractiva de retorno y el VAN es positivo, por lo tanto, la ejecución del proyecto es recomendada.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

El medio de cultivo 1, desarrollado localmente en base a melaza, urea y fosfato dipotásico, permitió el crecimiento de la bacteria *Bacillus Subtilis* desde una concentración inicial de 3.24×10^8 hasta una concentración 1510×10^8 de células totales por mililitro en un intervalo de 12 horas.

El costo del medio de cultivo estándar es 535 veces mayor que el costo del medio de cultivo 1.

El medio de cultivo 1 es un medio de cultivo competitivo por permitir el crecimiento de la bacteria *Bacillus Subtilis* a bajo costo, con disponibilidad a nivel local y sin requerir costos de transportación ya que la empresa cuenta con sus componentes en las instalaciones.

La curva crecimiento de la bacteria *Bacillus Subtilis* en el medio de cultivo 1 presentó una fase de adaptación de 4 horas, una fase de crecimiento acelerado de 4 horas, una fase de crecimiento desacelerado de 4 horas y no se alcanzó la fase estacionaria durante las 12 horas de cultivo.

El medio esporulante conformado por MnSO_4 y MgSO_4 permitió alcanzar el 9.13% de esporulación en un intervalo de 12 horas.

El dimensionamiento del biorreactor permitió estimar que el volumen requerido para la producción de 7×10^{14} UFC de esporas de *Bacillus Subtilis* es de 82 L, con una capacidad operativa de 66 L.

La demanda anual de 3 cepas de bacterias puede ser cubierta mediante 17 batches en el año, de los cuales 6 batches cubrirían la demanda anual de *Bacillus Subtilis*.

El costo de inversión de este proyecto se estima en \$22,420 con un tiempo de recuperación de 9 meses.

Mediante la ejecución de este proyecto en la empresa Quality Corporation, se reduciría hasta en un 91% las importaciones de la cepa *Bacillus Subtilis* para la elaboración de sus productos.

El medio de cultivo 1 presenta persistencia de microorganismos vivos después de ser autoclavado durante 15 minutos a 121°C y se requiere un tiempo de autoclavado de hasta 1 hora para su esterilización.

4.2 Recomendaciones

Realizar un estudio acerca de la influencia de la concentración de los componentes en el medio esporulante y el tiempo de esporulación, sobre el porcentaje de esporulación alcanzado.

Comparar la efectividad de las esporas de *Bacillus Subtilis* producidas con las esporas importadas.

Evaluar el rendimiento en la recuperación de esporas del medio de cultivo líquido por centrifugación y secado.

Estudiar la variación de la cantidad de células viables de las esporas obtenidas con respecto al tiempo de almacenamiento.

Evaluar la producción de otras cepas de bacterias utilizadas por la empresa y determinar su viabilidad para la reducción de importaciones de las mismas.

Elaborar un programa de esterilización del biorreactor entre cada producción de microorganismo para evitar contaminación y pérdidas económicas y de tiempo.

Definir la temperatura y tiempo para la esterilización del medio de cultivo empleado, con el fin de garantizar la ausencia de otros microorganismos.

Difundir los resultados de la presente investigación en la comunidad universitaria.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilera, M. D., & Ramírez, D. P. (2016). *Diseño de un biorreactor a escala de laboratorio y su sistema de control*. Guayaquil, Guayas, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral.

American Petroleum Institute. (2007). *API Standard 650 Welded Steel Tanks for Oil Storage* (11 ed.).

Basamma, H. (2017). Ideal Growth Conditions for Mass Production of Biocontrolagent *Bacillus Subtilis* (Ehrenberg) Cohn. *Plant Archives*, 535-538.

BCE. (6 de marzo de 2018). *Banco Central del Ecuador*. Obtenido de <https://www.bce.fin.ec>

Boyer, H. E., & Gall, T. L. (1985). *Metals Handbook*. OH: ASM International Handbook Committee, ASM International.

Coronel, J. (2015). Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin. *Journal of Applied Microbiology*, 99-111.

Coulson, J. M., Richardson, J. F., Backhurst, J. R., & Harker, J. H. (1999). *Coulson and Richardson's Chemical Engineering* (6th ed., Vol. 1). Butterworth - Heinemann.

Damodaran, A. (5 de Enero de 2018). *Damodaran Online*. Obtenido de <http://pages.stern.nyu.edu>

Doran, P. M. (2013). *Bioprocess Engineering Principles* (2nd ed.). Oxford: Elsevier Ltd.

Goldman, E. (2009). *Practical Handbook of Microbiology*. New York: LCC Grup.

Grunberg, L., & Nissan, A. H. (1949). *Mixture Law for Viscosity*. Nature.

IAPWS. (5 de January de 2018). *The International Association for the Properties of Water and Steam*. Obtenido de www.iapws.org

IUPAC. (2006). *Compendium of Chemical Terminology* (2nd ed.). Zürich, Switzerland.

Liu, S. (2017). *Bioprocess Engineering Kinetics, Sustainability and Reactor Design* (2nd ed.). Syracuse, NY, USA: Elsevier.

Madigan, M. (2003). *Brock Biología de los Microorganismos*. Mexico: Prentice Hall.

MAG. (22 de Febrero de 2017). *Ministerio de Agricultura y Ganadería*. Obtenido de <http://sipa.agricultura.gob.ec>.

Michael T. Madigan, J. M. (2004). *Biología de los Microorganismos*. Madrid: Perarson Educación S.A.

Norris, J. (1971). *Methods in Microbiology*. London: Academic Press.

Okafor, N. (2007). *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Enfield: Scienc Publishers.

Peters, M. S., Timmerhaus, K. D., & West, R. E. (2012). Obtenido de Equipment Costs Plant Design and Economics for Chemical Engineers: <http://www.mhhe.com/engcs/chemical/peters/data/>

Premier Molasses. (2013). *Material Safety Data Sheet, Sugar Cane Molasses*. Foynes.

Rushton, J. H., Costich, E. W., & Everett, H. J. (1950). Power Characteristics of Mixing Impellers. *Chem. Eng. Prog.*, 1 & 2, 395-404, 467-476.

Schafer, M., Hofken, M., & Durst, F. (1997). Detailed LDV Measurements for the Visualization of the Flow Field within a Stirred-tank Reactor equipped with Rushton Turbine. *IChemE*, 75A, 729-736.

Scientific, T. F. (2 de Abril de 2017). *Thermo Fischer Scientific*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/ec>.

Shuler, M. L. (2002). *Bioprocess Engineering, Basic Concepts*. New York: Prentice Hall.

Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering, Basic Concepts* (2 ed.). Upper Saddle River: Prentice-Hall Inc.

Smith, C. A., & Corripio, A. B. (1997). *Principles and Practice of Automatic Process Control* (2nd ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc.

Stainer, R. (1987). *General Microbiology*. London: Prentice Hall.

Tramper, J. (1991). *Basic Bioreactor Design*.

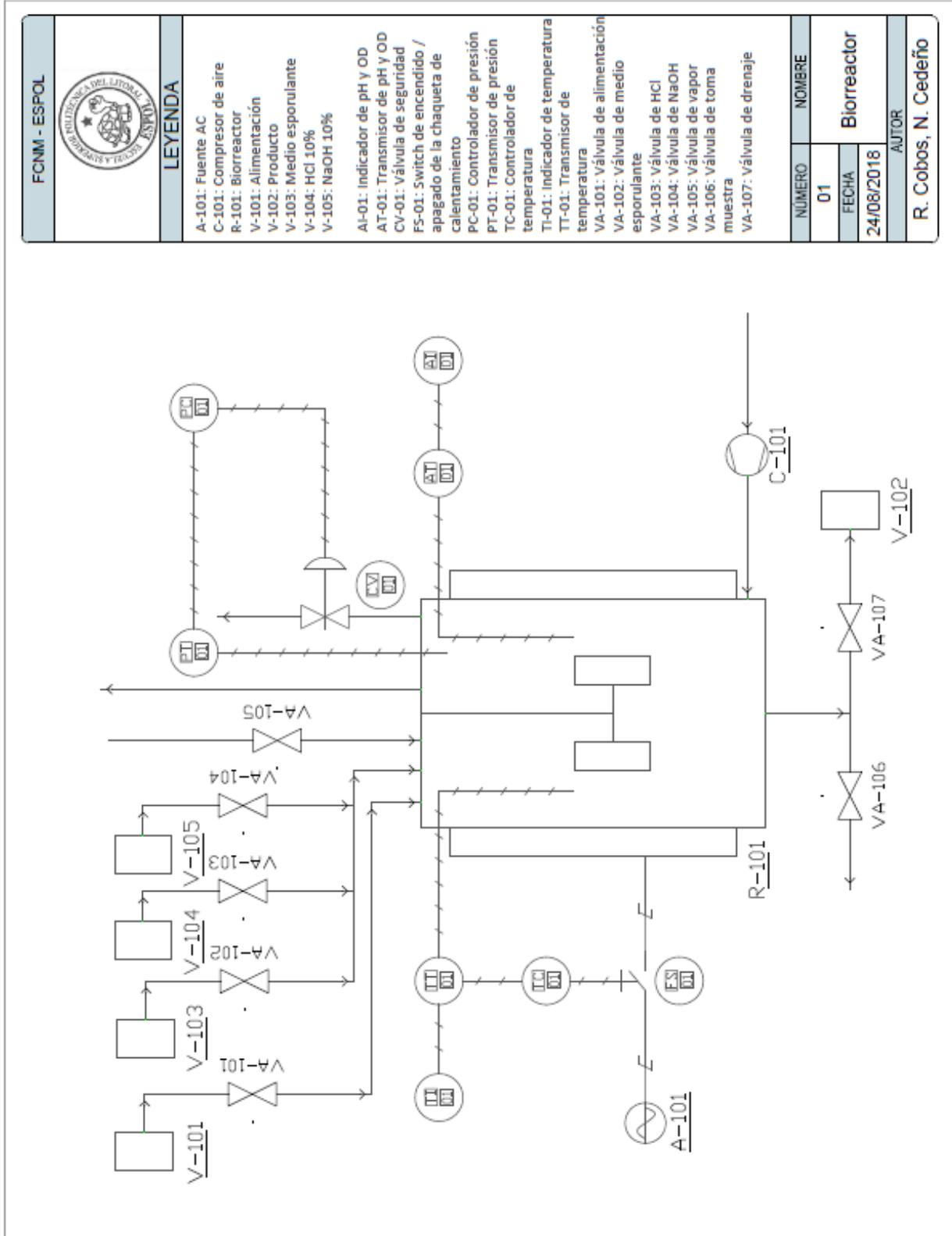
Waites, M. J. (2001). *Industrial Microbiology: An Introduction*. Oxford: Blackwell Science Ltd.

Wistreich, G. (1983). *Prácticas de Laboratorio de Microbiología*. México: Limusa.

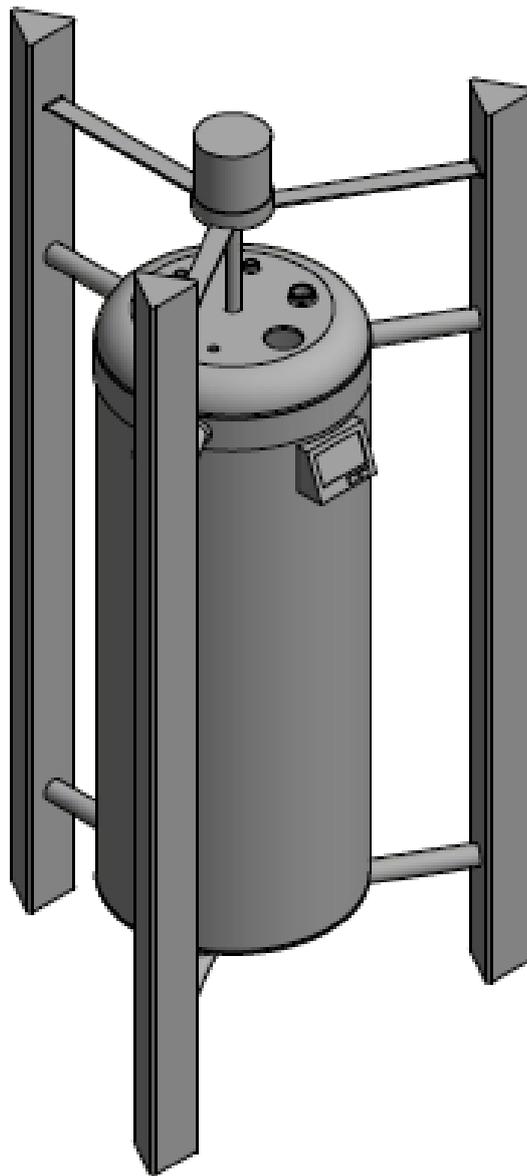
Yang, J. B. (1994). An evidential reasoning approach for multiple attribute decision making with uncertainty". *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*.

ANEXOS

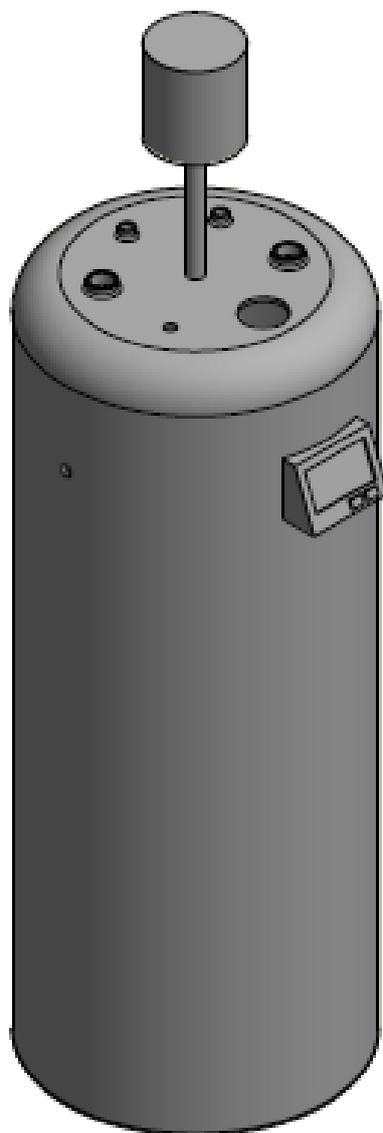
ANEXO A. P&ID DEL BIORREACTOR



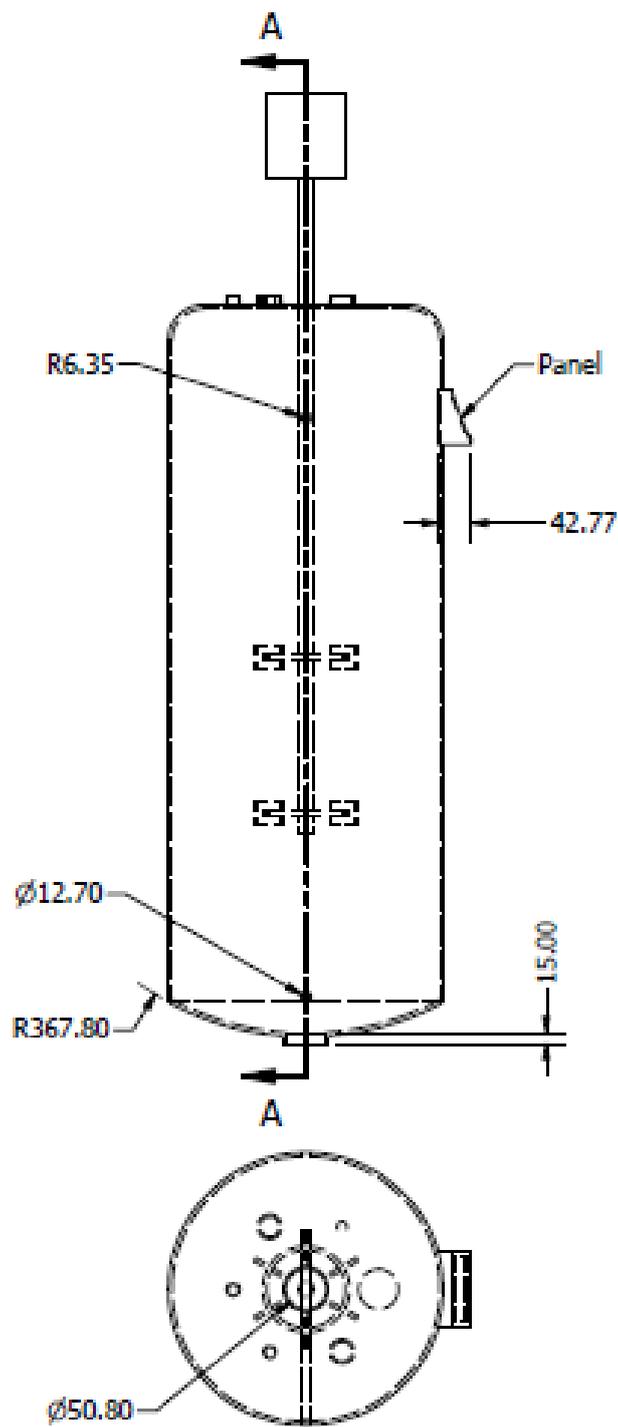
ANEXO B. PLANOS ESQUEMÁTICOS



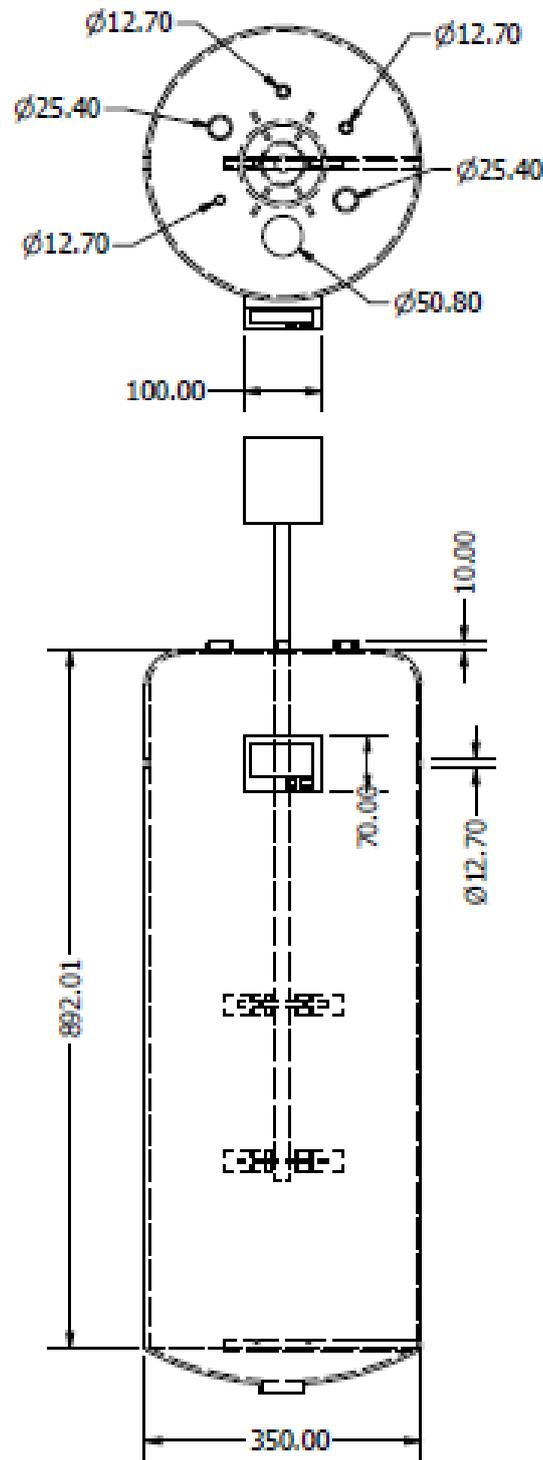
TITLE			
BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE ESPORAS BACILLUS SUBTILIS			
SIZE		DESCRIPTION	REV
A4		BIORREACTOR Y SOPORTE	
SCALE	1/8		SHEET 1 OF 7



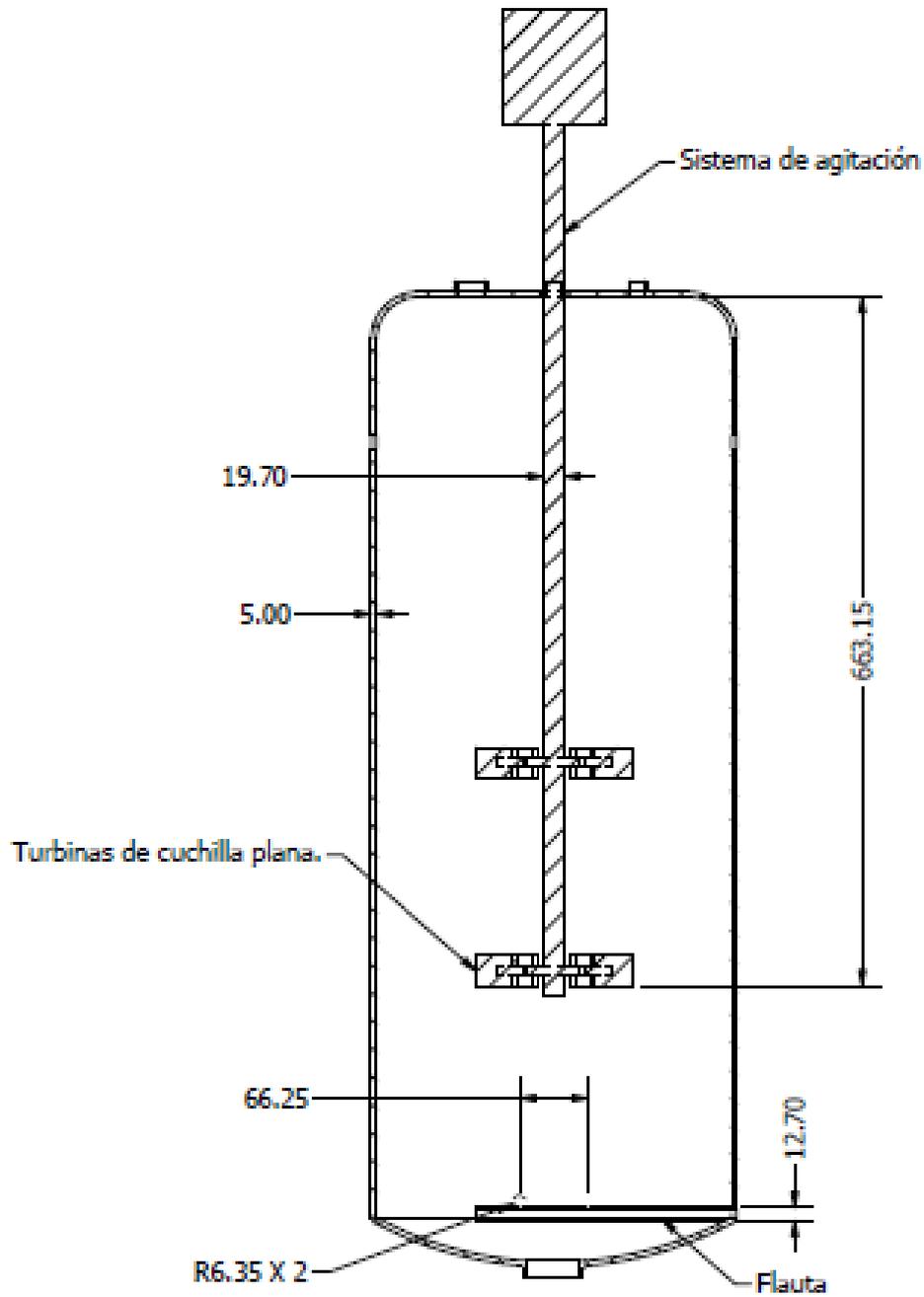
TITLE			
BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE ESPORAS BACILLUS SUBTILIS			
SIZE		DESCRIPTION	REV
A4		BIORREACTOR	
SCALE	1/6		SHEET 2 de 7



TITLE			
BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE ESPORAS BACILLUS SUBTILIS			
SIZE		DESCRIPTION	REV
A4		VISTAS LATERAL E INFERIOR	
SCALE	1 / 8		SHEET 3 DE 7

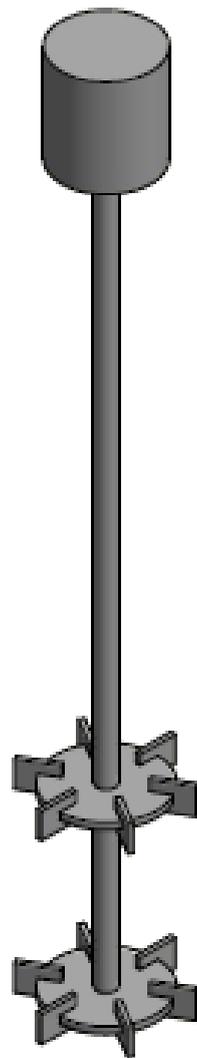


TITLE			
BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE ESPORAS BACILLUS SUBTILIS			
SIZE		DESCRIPTION	REV
A4		VISTAS SUPERIOR Y FRONTAL	
SCALE	1 / 8	SHEET 4 OF 7	

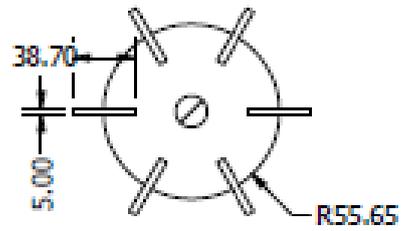
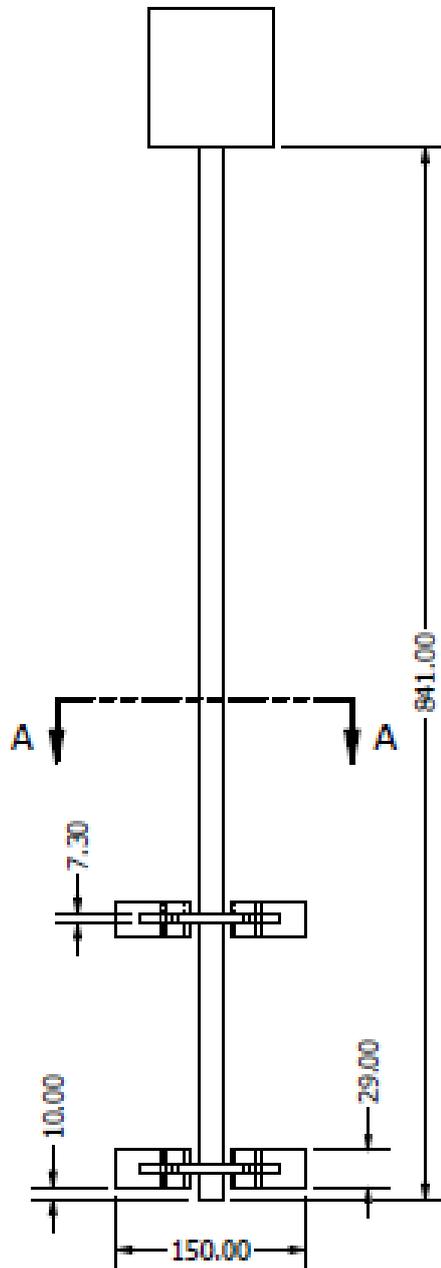


SECTION A-A

TITLE			
BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE ESPORAS BACILLUS SUBTILIS			
SIZE		DESCRIPTION	REV
A4		VISTA DE CORTE SECCIÓN A-A	
SCALE	1/9		SHEET 5 OF 7



TITLE			
BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE ESPORAS BACILLUS SUBTILIS			
SIZE		DESCRIPTION	REV
A4		AGITADOR	
SCALE	1 / 5		SHEET 6 OF 7



SECTION A-A
SCALE 1 / 4

TITLE			
BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE ESPORAS BACILLUS SUBTILIS			
SIZE	DESCRIPTION	REV	
A4	VISTAS FRONTAL Y DE CORTE		
SCALE	1 / 5	SHEET 7 OF 7	

ANEXO C. FLUJO DE CAJA

Año	0	1	3	3	4	5	6	7	8	9	10
Costo de importación anual		\$ 34,285.71	\$ 34,285.71	\$ 34,285.71	\$ 34,285.71	\$ 34,285.71	\$ 34,285.71	\$ 34,285.71	\$ 34,285.71	\$ 34,285.71	\$ 34,285.71
Costo de producción anual		\$ 3,272.88	\$ 3,272.88	\$ 3,272.88	\$ 3,272.88	\$ 3,272.88	\$ 3,272.88	\$ 3,272.88	\$ 3,272.88	\$ 3,272.88	\$ 3,272.88
Ahorro anual		\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84
Depreciación de equipos		\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00
Utilidad antes de impuestos		\$ 28,772.84	\$ 28,772.84	\$ 28,772.84	\$ 28,772.84	\$ 28,772.84	\$ 28,772.84	\$ 28,772.84	\$ 28,772.84	\$ 28,772.84	\$ 28,772.84
Impuestos (22%)		\$ 6,330.02	\$ 6,330.02	\$ 6,330.02	\$ 6,330.02	\$ 6,330.02	\$ 6,330.02	\$ 6,330.02	\$ 6,330.02	\$ 6,330.02	\$ 6,330.02
Utilidad después de impuestos		\$ 22,442.81	\$ 22,442.81	\$ 22,442.81	\$ 22,442.81	\$ 22,442.81	\$ 22,442.81	\$ 22,442.81	\$ 22,442.81	\$ 22,442.81	\$ 22,442.81
Depreciación de equipos		\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00	\$ 2,240.00
Inversión	\$ -22,400.00										
Valor de desecho											\$ 150,724.07
Flujo de proyecto	\$ -22,400.00	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 31,012.84	\$ 181,736.91
Flujo acumulado	\$ -22,400.00	\$ 8,612.84	\$ 39,625.68	\$ 70,638.52	\$ 101,651.36	\$ 132,664.20	\$ 163,677.03	\$ 194,689.87	\$ 225,702.71	\$ 256,715.55	\$ 438,452.46

ANEXO D. CÁLCULOS REALIZADOS

D.1 Volumen

D.1.1 Volumen efectivo del reactor

$$V = 1.2 \frac{N_{req}}{C_{alc}} = 1.3 * \frac{7 * 10^{14} UFC}{1.38 * 10^{10} UFC/mL} * \frac{1L}{1000mL} = 65.9L$$

V es el volumen del líquido en el biorreactor, N_{req} es la cantidad final de bacterias que se desea obtener en cada lote y C_{alc} es la concentración de bacterias al final del proceso de esporulación.

D.1.2 Volumen total del recipiente

$$V_T = \frac{V}{0.75} = \frac{60.9L}{0.75} = 82.3L$$

V_T es el volumen total del recipiente.

D.2 Propiedades físicas del medio de cultivo

D.2.1 Densidad

$$\begin{aligned} \rho &= \frac{m_w + m_b + m_m}{V} = \frac{\rho_w V_w + m_b + m_m}{V} = \frac{\rho_w (V - V_b - V_m) + m_b + m_m}{V} \\ \rho &= \rho_w \left(1 - \frac{V_b + V_m}{V} \right) + C_b + C_m = \rho_w \left(1 - \frac{\frac{m_b}{\rho_b} + \frac{m_m}{\rho_m}}{V} \right) + C_b + C_m \\ \rho &= \rho_w \left(1 - \frac{C_b}{\rho_b} - \frac{C_m}{\rho_m} \right) + C_b + C_m \\ \rho &= 993.3 \text{ kg/m}^3 \left(1 - \frac{2 \text{ kg/m}^3}{1165 \text{ kg/m}^3} - \frac{5 \text{ kg/m}^3}{1400 \text{ kg/m}^3} \right) + 2 \text{ kg/m}^3 + 5 \text{ kg/m}^3 = 995 \text{ kg/m}^3 \end{aligned}$$

ρ es la densidad del medio, m_w es la masa de agua en el medio, m_b es la masa inicial de bacterias, m_m es la masa de melaza en el medio, ρ_w es la densidad del agua a 37°C, V_w es el volumen de agua en el medio, V_b es el volumen de bacterias

en el medio, V_m es el volumen de melaza añadido, C_b es la concentración inicial de bacterias, C_m es la concentración inicial de melaza, ρ_b es la densidad de las bacterias en estado sólido y ρ_m es la densidad de la melaza.

D.2.2 Viscosidad

$$x_m = \frac{n_m}{n_w + n_m} = \frac{1}{\frac{n_w}{n_m} + 1} = \frac{1}{\frac{M_m n_w}{M_w n_m} + 1} = \frac{1}{\frac{M_m}{M_w} \left(\frac{m}{m_m} - 1 \right) + 1} = \frac{1}{\frac{M_m}{M_w} \left(\frac{\rho}{C_m} - 1 \right) + 1}$$

$$x_m = \frac{1}{\frac{201.2 \text{ g/mol}}{18.02 \text{ g/mol}} \left(\frac{995 \text{ kg/m}^3}{5 \text{ kg/m}^3} - 1 \right) + 1} = 4.5 * 10^{-4}$$

x_m es la fracción molar de melaza en el medio, n_m es la cantidad de moles de melaza en el medio, n_w es la cantidad de moles de agua en el medio, M_m es la masa molar de la melaza y m es la masa total en el medio.

$$\mu = \mu_m^{x_m} \mu_w^{1-x_m} = 5000^{4.5*10^{-4}} * 0.69^{1-4.5*10^{-4}} \text{ cp} = 0.694 \text{ cp}$$

μ es la viscosidad del medio, μ_m es la viscosidad de la melaza y μ_w es la viscosidad del agua a 37°C.

D.3 Dimensiones del recipiente

D.3.1 Diámetro

$$V_T = \frac{\pi H D^2}{4} = \frac{\pi A R D^3}{4}$$

$$D = \sqrt[3]{\frac{4V_T}{\pi A R}} = \sqrt[3]{\frac{4 * 82.3 \text{ L}}{2.5\pi} * \frac{\text{m}^3}{1000 \text{ L}}} = 0.35 \text{ m}$$

H es la altura del biorreactor, D es el diámetro y AR es la relación altura – diámetro.

D.3.2 Altura

$$H = ARD = 2.5 * 0.35m = 0.87m$$

D.3.3 Espesor

$$e = \frac{gD\rho H}{2S} = \frac{9.81 \text{ m/s}^2 * 0.35m * 995 \text{ kg/m}^3 * 0.85m}{2 * 290MPa} = 0.003mm$$

e es el espesor del recipiente, ρ es la densidad del medio de cultivo, g es la gravedad y S es el esfuerzo de fluencia del material empleado. De acuerdo con el estándar API 650 para diámetros menores de 3.2m el espesor de diseño es el máximo valor entre el espesor calculado y 5mm, por lo cual se escoge 5mm como espesor de diseño.

D.4 Aireación

D.4.1 Requerimiento de oxígeno

$$F_g = 2 \frac{\dot{n}RT}{P} = 2 \frac{\dot{n}_{O_2}RT}{Px_{O_2}} = 2 \frac{qN_{req} RT}{Px_{O_2}}$$
$$F_g = 2 \frac{1.5 * 10^{-10} \text{ mmol/h} * 7 * 10^{14} * 8.3145 \text{ J/molK} * 300K}{101325Pa * 0.21} * \frac{\text{mol}}{1000\text{mmol}} = 24.6 \text{ m}^3/\text{h}$$

F_g es el flujo volumétrico de aire suministrado a condiciones ambientales, \dot{n} es el flujo molar de aire suministrado, R es la constante de los gases, T es la temperatura ambiente, P es la presión atmosférica, \dot{n}_{O_2} es el flujo molar de oxígeno suministrado, x_{O_2} es la fracción molar de oxígeno en el aire y q es el requerimiento específico de oxígeno.

D.4.2 Potencia de aireación

$$P_v = \rho g F_g H = 995 \text{ kg/m}^3 * 9.81 \text{ m/s}^2 * 24.6 \text{ m}^3/\text{h} * 0.85m * 0.8 * \frac{h}{3600s} = 45W$$

P_v es la potencia requerida por el compresor y g es la aceleración de la gravedad.

D.5 Agitación

D.5.1 Diámetro de impulsores

$$D_i = 0.4D = 0.4 * 0.35m = 0.14m$$

D_i es el diámetro de los impulsores.

D.5.2 Velocidad angular

$$\frac{F_g}{N_i D_i^3} = 0.2 \sqrt{\frac{D_i N_i^2 D_i}{D g}}$$

$$\frac{5F_g}{N_i D_i^3} = N_i D \sqrt{\frac{1}{gD}}$$

$$5F_g \sqrt{gD} = D_i^4 N_i^2$$

$$N_i = \frac{\sqrt{5F_g \sqrt{gD}}}{D_i^2} = \frac{\sqrt{5 * 24.6 \text{ m}^3/\text{h} * \frac{\text{sh}}{\text{min}^2} \sqrt{9.81 \text{ m}/\text{s}^2 * 0.35\text{m}}}}{0.15^2 \text{m}^2} = 771 \text{rpm}$$

N_i es la velocidad angular del sistema de agitación.

D.5.3 Potencia de agitación

$$P = N_p \rho N_i^3 D_i^5 = 5 * 995 \text{ kg}/\text{m}^3 * 771^3 \text{ min}^{-3} * 0.15^5 \text{m}^5 * \frac{\text{min}^3}{60^3 \text{s}^3} * \frac{\text{kW}}{1000\text{W}} = 1.79 \text{kW}$$

P es la potencia requerida por el motor del sistema de agitación y N_p es el número de potencia.

D.6 Calentamiento

E.6.1 Potencia de la resistencia eléctrica

$$\dot{Q} = \frac{mc(T_R - T_o)}{t} = \frac{\rho Vc(T_R - T_o)}{t}$$
$$= \frac{995 \text{ kg/m}^3 * 0.0659 \text{ m}^3 * 4180 \text{ J/kg}^\circ\text{C} (37^\circ\text{C} - 27^\circ\text{C})}{15 \text{ min}} * \frac{\text{min}}{60 \text{ s}} * \frac{\text{kW}}{1000 \text{ W}} = 3.02 \text{ kW}$$

\dot{Q} es la potencia requerida por la resistencia eléctrica, c es el calor específico del medio de cultivo, T_R es la temperatura de operación del biorreactor, T_o es la temperatura ambiente y t es el tiempo de calentamiento.

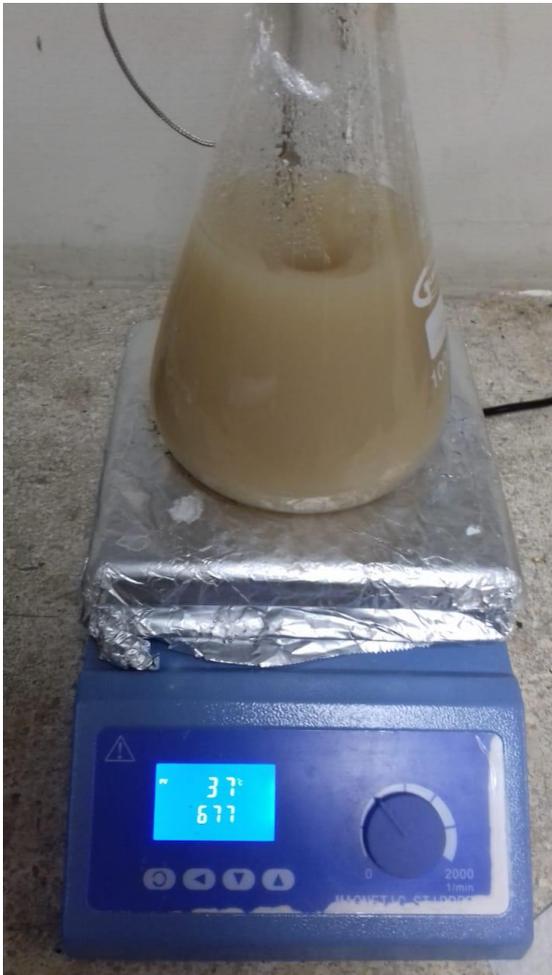
ANEXO E. FOTOS DE EXPERIMENTACIÓN



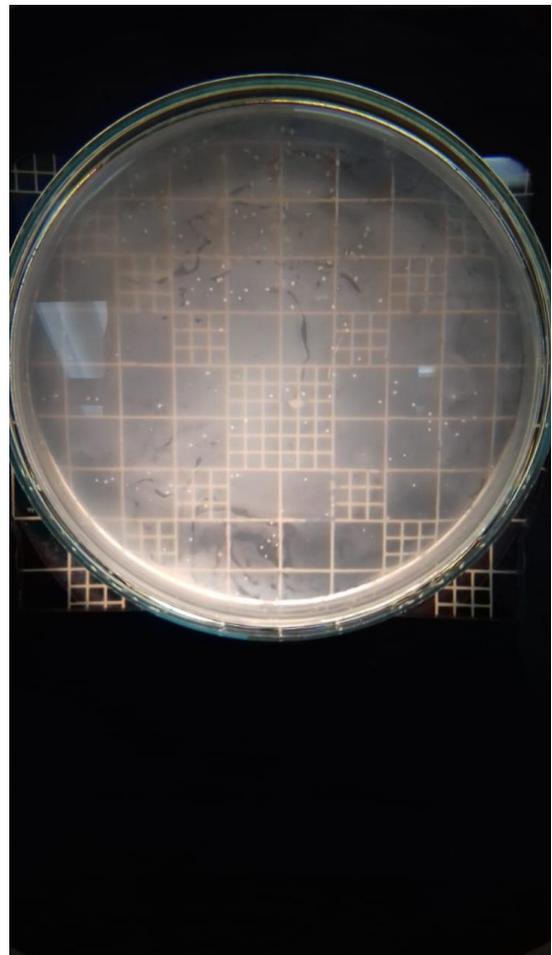
Medios de cultivo esterilizados



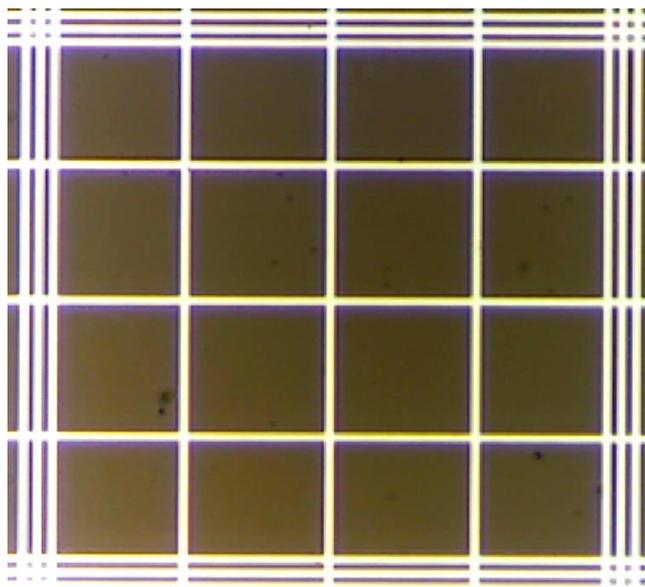
Medios de cultivo después de la autoclave



Experimentación en matraz de 1L



Conteo en caja Petri



Conteo en cámara de Petroff-Hausser



Experimentación en reactor de 20 L