

**DISEÑO CONCEPTUAL DE UN BIORREACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA DE *Azotobacter chroococcum* A ESCALA BANCO**

**SONIA MARCELA LÓPEZ LÓPEZ
DANILO SEBASTIÁN VEGA HIGUERA**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D.C
2020**

**DISEÑO CONCEPTUAL DE UN BIORREACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA DE *Azotobacter chroococcum* A ESCALA BANCO**

**SONIA MARCELA LÓPEZ LÓPEZ
DANILO SEBASTIÁN VEGA HIGUERA**

**Proyecto Integral de Grado para optar el título de:
INGENIERO QUÍMICO**

**DIRECTOR:
DIANA MILENA MORALES FONSECA
Microbióloga industrial MSc Ing. Química**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D.C
2020**

Nota De Aceptación

Microbióloga Adriana Inés Pérez Morales

Ing. Angie Tatiana Ramírez Ortega

Bogotá, D.C. febrero, 2020

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. Mario Posada García-Peña

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García-Peña

Vicerrectora Académica y de Posgrado

Dr. Ana Josefa Herrera Vargas

Secretaria General

Dra. Alexandra Mejía Guzmán

Decano General Facultad de Ingenierías

Ing. Julio Cesar Fuentes Arismendi

Director Programa Ingeniería Química

Ing. Leonardo De Jesús Herrera Gutiérrez

Las directivas de la Fundación Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

En principio quiero agradecer a Dios y a la Virgen por permitirme terminar esta importante etapa de mi vida, por cumplir este sueño, llenándome de mucha fortaleza, sabiduría, sin importar cual fuera la circunstancia, siempre estuvo ahí como guía a lo largo de mi formación profesional.

En memoria de mi mamita Mariela, por su amor incondicional, por apoyarme desde el principio de mi carrera, por enseñarme a ser más fuerte, dedicada, confiar en mí, siempre sin importar la distancia. Estés donde estés, de la mano de Dios, siempre serás la mejor mamá del mundo, siempre te llevo en mi corazón.

A mi papá Víctor y a mi hermano Javier por su amor, apoyo, fuerza y vitalidad, juntos sacando adelante, a pesar de mis altibajos y los duros retos que tuvimos que enfrentar como familia en plena etapa estudiantil, ofreciéndose siempre dispuesto a ayudar en todo lo que necesitáramos.

A Faber, por llegar en el momento indicado, impulsándome a sacar lo mejor de mí, brindarme una mano de gran apoyo en las situaciones más difíciles para salir adelante, enseñándome el valor de la perseverancia, paciencia y tranquilidad, siendo la persona más bonita que he podido conocer.

Gracias las personas que ya no están, como mis abuelitos Pablo, Carmen e Ignacia, y mi tío Germán quienes también marcharon durante mi formación como profesional, y sé que desde donde estén, estarán orgullosos de la mi culminación de mi etapa profesional además de su eterna compañía.

A mis amigos, que ustedes muy bien saben quiénes son, les agradezco su paciencia, ternura y apoyo incondicional, por escucharme siempre, por acompañarme en los mejores momentos de mi vida estudiantil y también en los días tristes.

Gracias a cada una de las personas que estuvieron a lo largo de mi camino, aportando cada granito de arena, para poder hoy en día culminar el sueño de ser Ingeniera Química

Sonia Marcela López López

A mis padres por el apoyo brindado en cada momento desde mi formación como persona cuando era niño hasta el día de hoy que siendo un joven adulto soy consciente de todos los sacrificios que han hecho por mí y entre muchas formas de retribuirles esto es viéndome formado como un profesional.

A mi hermana que siempre ha sido como esa segunda mamá que ha estado para darme apoyo y así mismo regañarme como se debe para traerme a donde estoy en este momento.

A mis abuelitos que aunque no están hoy aquí sé que desde el cielo están celebrando este logro conmigo.

A María Paula Muñoz Rodríguez quien es esa persona especial en la vida de uno que llega y le enseña como realmente debe ser la vida junto a alguien, quien me ha apoyado desde que somos amigos hasta el día de hoy siendo mi pareja.

A mi hijo de cuatro patas quien estuvo conmigo viéndome trasnochar esperándome hasta que nos fuéramos descansar juntos.

Y finalmente pero no menos importante a todas esas personas que han estado conmigo, sea que sigan ahí o no, cada persona que ha aportado en mi vida me ha traído hasta aquí así que gracias a todos.

Danilo Sebastián Vega H.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo de grado presentan sus más sinceros agradecimientos a todas las personas que brindaron su apoyo y parte de su tiempo para realizar este trabajo de grado

A nuestra directora, Diana Milena Morales Fonseca, por brindarnos su conocimiento, confianza, ayuda académica, consejos y apoyo orientándonos hacia la ejecución del presente trabajo.

A los codirectores del proyecto, el Ingeniero Químico Felipe Correa Mahecha, por su ayuda, tiempo y asesorías al momento de realizar parte de nuestro documento, siendo indispensables para el culminar el presente proyecto y al ingeniero Biotecnológico Freddy Peñaranda, por su ayuda colaboración, disposición, dedicación, apoyo y tiempo durante las largas jornadas de experimentación que tuvimos, además de sus enseñanzas y sus valiosos conocimientos pudimos culminar con éxito este presente trabajo.

A los orientadores del comité de proyecto de grado de Ingeniería Química, en especial al Ingeniero Fernando Moreno por guiarnos con su asesoría profesional, también estuvo presente colaborándonos y guiándonos desde el comienzo de este proyecto

A la Doctora Milena Salgado por permitirnos dar esta gran oportunidad para trabajar con el equipo de FUNDASES durante la realización de nuestro trabajo.

Al equipo de FUNDASES entre ellos, al siempre querido fitopatólogo investigador y mentor, Noboru Shirame, Consuelo, Andrés y Kimberly por ayudarnos durante los días de nuestra experimentación en el laboratorio, ser guías y estar pendientes de nuestros resultados.

A todos aquellos quienes se comprometieron desde el primer día con nosotros a darle el mejor brillo posible a este trabajo y quienes hoy juntos hemos dado el punto final a este trabajo.

A todos los docentes de la Fundación Universidad de América quienes a lo largo de nuestra vida universitaria se encargaron de transmitirnos su conocimiento para formarnos como Ingenieros Químicos.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	23
OBJETIVOS	25
1. MARCO TEÓRICO	26
1.1 GENERALIDADES DE INOCULANTES BIOLÓGICOS	26
1.2 GENERALIDAD DE LOS BIOPROCESOS	27
1.3 GENERALIDADES DE <i>Azotobacter chroococcum</i>	27
1.4 REACTORES BIOLÓGICOS EN PRODUCCIÓN INDUSTRIAL.	33
1.5 CINÉTICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO	37
1.5.1 Descripción de parámetros cinéticos	38
1.5.1.1 Velocidad específica de crecimiento	38
1.5.1.2 Tiempo de duplicación.	39
1.5.1.3 Rendimiento de biomasa.	40
1.6 TÉCNICAS Y MÉTODOS	40
1.6.1 Cuantificación de células viables por recuento en placa.	40
1.6.2 Cuantificación de sustrato.	41
1.6.2.1 Técnica de hidrólisis de la sacarosa	41
1.6.2.2 Técnica del ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS).	42
1.7. COSTOS FIJOS	42
1.7.1 Costos directos	42
1.7.2 Costos indirectos.	43
2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE <i>Azotobacter chroococcum</i> A PARTIR DE DATOS EXPERIMENTALES	44
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.1.1 Reactivos	44
2.1.1.1 Microorganismo <i>Azotobacter chroococcum</i>	44
2.1.1.2 Medios de cultivo	45
2.1.2 Equipos 47	
2.1.3 Métodos.	48
2.1.3.1 Preparación del preinóculo.	49
2.1.3.2 Preparación de caldos de cultivo.	49
2.1.3.3 Diluciones seriadas y cuantificación de biomasa por recuento en placas.	50
2.1.3.4 Cuantificación de sacarosa mediante la hidrólisis ácida.	50
2.1.3.5 Técnica colorimétrica DNS.	51
2.1.3.6 Identificación microscópica.	51
2.1.3.7 Identificación macroscópica.	53
2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	54
2.2.1 Identificación de variables	54
2.2.2 Ensayos preliminares	54

2.2.2.1. Evaluación de formación de biomasa.	55
2.2.2.2 Determinación de biomasa.	55
2.2.3 Cinética estándar.	55
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
2.3.2 Cinética microbiana estándar	64
2.3.2.2. Cinética microbiana bajo condiciones de producción.	71
3. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL BIORREACTOR	78
3.1 MODO DE OPERACIÓN	78
3.2 BALANCE DE MATERIA	79
3.3 BALANCE DE ENERGIA	84
3.3.1 Masa del medio de cultivo.	85
3.3.2 Calor específico del medio de cultivo (Cp).	86
3.3.3 Balances de calor para el sistema.	88
3.4 SELECCIÓN DE MODO DE AGITACIÓN.	93
3.5 CONFIGURACIÓN GEOMETRICA Y DIMENSIONADO	93
3.6 MODO DE AGITACIÓN	103
3.7 TRANSFERENCIA DE OXÍGENO	103
3.8 AGENTES ANTIESPUMANTES	103
3.9 SISTEMAS DE SEGUIMIENTO.	104
3.10 CONEXIONES	105
3.11 SERVICIOS AUXILIARES	105
3.12 ESTERILIZACIÓN	106
3.13 PROPUESTA DE MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN.	107
4 ANÁLISIS COSTOS AL DISEÑO DE BIORREACTOR PROPUESTO	109
4.1 COSTOS DE LA CONSTRUCCIÓN DEL BIORREACTOR	109
4.1.1 Costos fijos.	109
4.1.2 Costos directos.	109
4.2 COSTOS INDIRECTOS	111
4.2.1 Costos de los servicios.	111
4.2.2 Costos de las Materias primas.	112
4.3. COMPARACIÓN DE COSTOS DE PRODUCCIÓN DEL PROCESO PROPUESTO Y EL PROCESO ACTUAL	114
4.4 ALTERNATIVA PARA ADQUISIÓN DE UN EQUIPO YA COMPLETO	115
5 CONCLUSIONES	118
6 RECOMENDACIONES	119
BIBLIOGRAFIA	120
ANEXOS	130

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. a) Cultivo de <i>Azotobacter chroococcum</i> en agar nutritivo (b) frotis de <i>Azotobacter chroococcum</i> observado al microscopio con presencia de quistes, estructuras de resistencia. Morfología de las bacterias, con estructuras de resistencia "quistes"	29
Figura 2. Fórmula química de la sacarosa, $C_{12}H_{22}O_{11}$.	31
Figura 3. Formula química del manitol, $HOCH_2(CHOH)_4CH_2OH$	31
Figura 4. <i>Azotobacter sp.</i> en la fijación de nitrógeno	32
Figura 5. Representación esquemática de la curva de crecimiento de un cultivo Batch	37
Figura 6. Hidrólisis ácida de la sacarosa	42
Figura 7. Botella de cepa <i>Azotobacter chroococcum</i> .	45
Figura 8. Esquema experimental propuesto para desarrollo investigativo	49
Figura 9. Tinción de Gram de <i>Azotobacter chroococcum</i> correspondiente a un cultivo joven, proveniente de una cepa de segunda generación	53
Figura 10. a) Técnica aislamiento francés para aislar una colonia <i>Azotobacter chroococcum</i> b). Colonias de 48h tras siembra por superficie	54
Figura 11. Unidades experimentales, las unidades de la izquierda son las unidades sometidas a agitación mecánica. Las unidades de la derecha son las unidades sometidas a agitación neumática.	59
Figura 12. Interacciones entre factores	60
Figura 13. Siembra en placa por superficie de <i>Azotobacter chroococcum</i> .	64
Figura 14. Comparación de muestras hidrolizadas, muestra 0h con tono más amarillento que la muestra 48h.	67
Figura 15. Diluciones sembradas en la hora 32 de la cinética	71
Figura 16: Efecto en la morfología durante la producción de biomasa.	76
Figura 17. Representación básica de balance de materia	79
Figura 18. Dimensionado del recipiente del biorreactor	95
Figura 19. Tanque con deflectores con un agitador de turbina de seis aspas con disco, que muestra patrones de flujo: A) vista lateral, b) Vista superior, c) dimensiones de la turbina y el tanque.	96
Figura 30. Diámetro de las aspas	97
Figura 31. Dimensiones de las aspas	98
Figura 22. Figura biorreactor propuesto con sus partes.	101
Figura 23. Biorreactor con chaqueta de refrigeración	102
Figura 24. Bioindicador para autoclave	107
Figura 25. Biorreactor con sistema de automatización de JP Inglobal	116
Figura 26. Biorreactor con sistema de automatización de Bailun biol,	117

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Caldo Ashby - Manitol (FUNDASES)	45
Tabla 2. Caldo Ashby - Sacarosa (MODIFICADO)	46
Tabla 3. Formulación agar Ashby (FUNDASES)	46
Tabla 4. Formulación de agua peptona bufferada 1% (AP1%)	47
Tabla 5. Reactivos para Hidrólisis ácida	47
Tabla 6. Componentes del reactivo DNS. Según MILLER.	47
Tabla 7. Condiciones de operación para la propagación de biomasa <i>Azotobacter. chroococcum.</i>	54
Tabla 8. Resultado promedio de los experimentos	58
Tabla 9. Resumen de los datos obtenidos a partir de los cálculos realizados por el complemento Excel:	62
Tabla 10. Valores de densidad de los componentes del medio líquido Ashby-manitol	85
Tabla 11. Coeficiente de regresión para compuestos químicos, Agua.	87
Tabla 12. Capacidad calorífica de las sustancias presentes en el caldo ashby-manitol.	87
Tabla 13. Condiciones operacionales.	100
Tabla 14. Costos directos para la adquisición de las piezas del fermentador.	110
Tabla 15. Costo de los servicios por lote de producción	112
Tabla 16. Costo de materia prima para producción de 5L	112
Tabla 17. Material de uso personal.	113
Tabla 18. Costos de los servicios durante 48h	114
Tabla 19. Costos de las materias primas con una concentración de 10g/l	115
Tabla 20. Precio de reactor dado por JP Inglobal.	116
Tabla 32. Biorreactor con sistema de automatización de Bailun biol.	117

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Velocidad de crecimiento celular	39
Ecuación 2. Velocidad de crecimiento celular diferencial	39
Ecuación 3. Relación entre el crecimiento de biomasa y el tiempo de duplicación	39
Ecuación 4. Tiempo de duplicación	40
Ecuación 5. Rendimiento de biomasa	40
Ecuación 6. Hidrólisis de sacarosa.	41
Ecuación 7. Determinación del caudal	57
Ecuación 8. Cálculo de vvm	57
Ecuación 9. Ecuación para determinar la concentración de sacarosa hidrolizada en las muestras	66
Ecuación 10. Ecuación del balance general	79
Ecuación 11. Sistema general de reacción	80
Ecuación 12. Expresión de la velocidad másica de generación.	80
Ecuación 13. Expresión de la velocidad volumétrica de crecimiento.	81
Ecuación 14. Expresión de la velocidad másica de consumo.	81
Ecuación 15. Ecuación de primer orden.	81
Ecuación 16. Ecuación para células en reactor batch	81
Ecuación 17. Expresión para volumen constante	82
Ecuación 18. Expresión para la fase exponencial en un cultivo tipo batch.	82
Ecuación 19. Biomasa para modo de operación batch.	83
Ecuación 20. Tiempo de cultivo para modo de operación batch.	83
Ecuación 21. Cálculo del tiempo en operación batch para la primera réplica de las cinéticas bajo condiciones de producción.	83
Ecuación 22. Cálculo del tiempo en operación batch para la segunda réplica de las cinéticas bajo condiciones de producción.	84
Ecuación 23. Balance de energía térmica para operación batch	84
Ecuación 24. Densidad del medio de cultivo	85
Ecuación 25. Masa del medio de cultivo	86
Ecuación 26. Calor específico del agua en función de la temperatura	86
Ecuación 27. Calculo para Cp. del medio Ashby-manitol	88
Ecuación 28. Balance general de balance de calor para un biorreactor	89
Ecuación 29. Balance general de balance de calor para un biorreactor	89
Ecuación 30. Expresión general para un proceso aerobio.	90
Ecuación 31. Entalpia del aire	90
Ecuación 32. Relaciones de densidad y caudal para determinar flujo másico.	91
Ecuación 33. Tasa de calor de intercambio en los alrededores.	92
Ecuación 34. Flujo másico para intercambio de calor en el biorreactor	93
Ecuación 35. Ecuación de volumen para el biorreactor	94
Ecuación 36. Heurística de diseño, relación diámetro y altura.	94
Ecuación 37. Altura de biorreactor a partir de las relaciones de heurísticas	94

Ecuación 38. Diámetro del impulsor	97
Ecuación 39. Relación para obtener distancia del fondo del impulsor	97
Ecuación 40. Dimensión de las paletas del impulsor (ancho)	98
Ecuación 41. Dimensión de las paletas del impulsor (largo)	98
Ecuación 42. Relación para determinar las dimensiones de los deflectores	99
Ecuación 43. Relación para determinar la distancia de los deflectores a la pared del vaso del biorreactor.	99

LISTA DE DIAGRAMAS

	pág.
Diagrama 1. Metodología preparación del preinóculo	49
Diagrama 2. Metodología para preparación de caldos de cultivo	50
Diagrama 3. Metodología para realizar diluciones seriadas y siembra en placa	50
Diagrama 4. Metodología para realizar hidrólisis ácida para sacarosa residual del caldo de fermentación	51
Diagrama 5. Metodología para realizar la cuantificación de sacarosa por colorimetría DNS	51
Diagrama 6. Metodología para tinción de Gram	52
Diagrama 7. Aislamiento de colonias por siembra francesa	53
Diagrama 8. Representación de las variables de entrada y salida del sistema.	55

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Clasificación de los inoculantes biológicos.	26
Cuadro 2. Taxonomía de <i>Azotobacter chroococcum</i>	28
Cuadro 3. Resumen morfología macroscópica de <i>Azotobacter chroococcum</i> .	29
Cuadro 4. Resumen morfología microscópica de <i>Azotobacter chroococcum</i> .	30
Cuadro 5. Factores que influyen en el desarrollo del cultivo <i>Azotobacter chroococcum</i>	30
Cuadro 6. Tabla comparativa de tipos de biorreactores	35
Cuadro 7. Variables de control para un bioproceso.	36
Cuadro 8. Fases del crecimiento celular en cultivo batch	38
Cuadro 9. Equipos empleados en la fase pre experimental y experimental.	48
Cuadro 10. Resultados de las unidades experimentales	60
Cuadro 11. Consecuencias y como se puede evitar la contaminación de agentes extraños en medios de propagación de biomasa	106
Cuadro 12. Equipos necesarios para llevar a cabo la propagación de biomasa	109

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. FICHA ATCC 480 DE <i>Azotobacter chroococcum</i>	131
ANEXO B. MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS	132
ANEXO C. FOTOS DE LOS EQUIPOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO	134
ANEXO D. PREPARACIÓN REACTIVOS DE TRABAJO	135
ANEXO E. PROTOCOLO REALIZACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE SACAROSA HIDROLIZADA	136
ANEXO F. DATOS CRUDOS OBTENIDOS EN LA PREEXPERIMENTACIÓN	137
ANEXO G. RESULTADOS DE MODELO ESTADISTICO ANOVA DOS FACTORES	138
ANEXO H. DATOS CRUDOS OBTENIDOS EN LA EXPERIMENTACIÓN	141
ANEXO I. CARTA PSICOMÉTRICA PARA BOGOTÁ	143
ANEXO J. PLANOS DEL BIORREACTOR	144
ANEXO K. ESTRUCTURA DE LA TAPA CON SUS PARTES	146
ANEXO L. PLANO DIMENSIONES DE LAS ASPAS	147
ANEXO M. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN.	148
ANEXO N. INFORMACION DEL FERMENTADOR DADA POR EL PROVEEDOR	150

ABREVIATURAS

C: Fondo del impulsor

C_p: Capacidad calorífica de la sustancia

$\frac{dM}{dt}$: Término diferencial de acumulación donde M es la masa del componente A en el reactor y t el tiempo.

d: Diámetro

D_t: Diámetro total del tanque

ρ: Densidad

H: Humedad

h: Altura del tanque

h_L: Altura del líquido

H₀: Hipótesis nula

H₁: Hipótesis alterna

J: Joules

K_d: Constante específica de muerte celular.

K_s: Constante de saturación

m: Masa

J: Joules

K_d: Constante específica de muerte celular.

K_s: Constante de saturación

m: Masa

ṁ: Flujo másico

M₀: Biomasa inicial

M₀: Masa de salida de A al reactor

M_i: Masa de entrada de A al reactor

M_t: Corresponde al # de células del inicio de la fase estacionaria

N: Normalidad química.

Q: Calor requerido

Q̇: Caudal

Q̇_{acc}: Tasa de acumulación

Q̇_{evap}: Tasa de pérdida de calor de evaporación del medio

Q̇_{exch}: Tasa de calor de intercambio de los alrededores o al intercambiador

Q̇_{met}: Tasa de generación de calor por el metabolismo

Q̇_{sen}: Tasa de ganancia de entalpia sensible de corriente de aire (entrada-salida).

R_G: Velocidad másica de generación de A por reacción

R_c: Velocidad másica de consumo de A por reacción

r_d: Velocidad volumétrica de muerte celular

rpm: revoluciones por minuto

r_x: Es la velocidad volumétrica de producción de biomasa con unidades ya sean Kg m⁻³s⁻¹

S: Concentración del sustrato limitante

S₀: Cantidad inicial del sustrato en el medio

S_f : Sustrato final
 S_o : Sustrato inicial
 S_t : Corresponde al valor del sustrato correspondiente al # de células del inicio de la fase estacionaria
 t_b : Tiempo de retención en un reactor batch
 t_f : Tiempo final
 t_o : Tiempo inicial
 T : Temperatura
 ΔT : Diferencial de temperatura
 t : tiempo
 μ : velocidad específica de crecimiento
 $\mu_{m\acute{a}x}$: Velocidad específica máxima de crecimiento
 vvm : Volumen de aire por volumen de medio por minuto.
 V : Volumen
 Va : Volumen del recipiente
 Vd : Volumen desplazado
 W : Ancho de las paletas del impulsor.
 x_0 : Concentración de células viables a tiempo cero
 x : Biomasa
 X_f : Biomasa final
 X_o : Biomasa inicial
 $Y_{x/s}$: Factor de rendimiento de sustrato en producto
 Y_{xs} : Rendimiento de biomasa.
 λ : Entalpía

GLOSARIO

BIOMASA: materia viva que representa conjuntos de organismos benéficos para uso potencial en la industria.

CINÉTICA MICROBIANA: es el seguimiento al comportamiento de un microorganismo en cuanto como crece, muere o produce una sustancia, en un medio que puede ser especificado o no, y del cual se pueden obtener parámetros como el tiempo de duplicación, la velocidad máxima de crecimiento, o el rendimiento de biomasa/sustrato; entre otros.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANA ESTÁNDAR: es el seguimiento al comportamiento de un microorganismo en cuanto como crece y muere, en un medio de cultivo especificado y con condiciones de crecimiento determinadas para obtener parámetros como el tiempo de duplicación, la velocidad máxima de crecimiento, o el rendimiento de biomasa/sustrato; entre otros.

COALESCENCIA: capacidad de las burbujas de aire de menor tamaño de unirse para formar burbujas de mayor tamaño, mientras atraviesan el fluido acuoso.

CRECIMIENTO DIAÚXICO: sucede cuando se encuentran medios con múltiples fuentes de carbono, una vez agotado el sustrato, la célula adapta sus "rutas metabólicas" catalizadas por enzimas, a la siguiente fuente de carbono y después de un nuevo periodo de adaptación, se reinicia el crecimiento.

EXOPOLISACÁRIDOS: son moléculas que pertenecen al grupo de los glúcidos y tienen como función ser reserva energética o como unidad estructural, estos pueden ser excretados por la membrana de una célula o ser liberados al momento de la lisis de la misma.

MEDIO DE CULTIVO: es una mezcla de sustancias que puede ser sólida (agares para cultivo), o líquida (caldos de cultivo), para el crecimiento de un organismo como bacterias, hongos, células animales, o vegetales. Estos pueden ser formulados, donde se conocen todos los componentes del medio; como pueden ser complejos, donde no se puede determinar todos los componentes del medio.

PRODUCTIVIDAD: producción de biomasa por unidad de volumen. (g/L)

REACTOR TIPO BANCO: tamaño de reactor de uso para laboratorio, donde el volumen máximo para esta denominación se considera de 10 L de volumen total.

VVM: volúmenes de aire por volumen de líquidos por minuto, esta unidad se utiliza para propagaciones en biorreactores. La primera 'v' representa el volumen de aire (por ejemplo, litro); la segunda 'v' representa por unidad de medio (por ejemplo,

litro); 'm' significa por unidad de tiempo (por ejemplo, minuto). Por ejemplo, 1 vvm (l / l / m) significa que en 1 minuto hay 1 litro de aire que pasa a través de 1 litro de medio.

RESUMEN

Para la elaboración de un biofertilizante fijador de nitrógeno, a partir de la cepa *Azotobacter chroococcum*, es necesario emplear bajo sistemas de biotecnología, la formación de biomasa. El microorganismo mencionado anteriormente, corresponde al principio activo de Azobac, bioproducto elaborado por Fundases, empresa colombiana la cual está orientada a la producción y desarrollo de bioinsumos, donde actualmente, parten de un mejoramiento continuo, planteando desde sus inicios un proceso de escalado desde sus primeras fases a nivel laboratorio hasta la producción en planta donde se viene trabajando en el mejoramiento constante de estos para la producción en serie de bioinsumos. Se hace necesario un diseño conceptual de un biorreactor a escala banco de volumen 7 L, con volumen efectivo de propagación de 5L que permita mantener los factores necesarios para que se alcance una concentración de biomasa que cumpla con la NTC 5842:2018 - Norma técnica colombiana para Bioinsumos de uso agrícola e Inoculantes Biológicos. - A partir de esta propuesta, se realizó una investigación con *Azotobacter chroococcum*, en la cual, en su primera instancia, se realizaron pruebas preliminares y un acercamiento con la cepa, para definir la mejor configuración que garantizó una mayor producción de biomasa, evaluados entre los factores fuentes de carbono y modo de agitación, bajo los macro y micronutrientes que componen el caldo Ashby. Los resultados de estas pruebas fueron evaluados bajo un análisis de varianza de dos factores y cuya configuración manifestó mayor producción de biomasa dio lugar al punto de partida para realizar una experimentación la cual consistió en realizar el seguimiento de la cinética del microorganismo mediante un medio definido con caldo Ashby-sacarosa. El ensayo se realizó por duplicado, a condiciones de aireación de 1vvm y temperatura constante a 30°C durante 48h, además, se realizó una segunda cinética, bajo condiciones de producción, con el medio industrial cuya fuente de carbono es manitol. Como resultado de las cinéticas, se determinó una velocidad específica de crecimiento de *Azotobacter chroococcum* mediante fuente de carbono sacarosa y manitol, de 0.202 h⁻¹ y 0.228 h⁻¹ respectivamente, y un tiempo de duplicación de 4.43 h y 3.038 h respectivamente. A partir de estos resultados cinéticos, se dio paso a realizar especificaciones técnicas del biorreactor de volumen total 7 L y de volumen efectivo de 5 L. Con la cinética obtenida, se identificaron ciertas características las cuales fueron implícitas en el diseño del biorreactor, como las estructuras intercambiables, entre estas el sistema de agitación mecánico con turbina tipo Rushton de paletas planas, disposición de deflectores que eviten la generación de vórtices. Demás de los sistemas de monitoreo de las variables y sensores los cuales realicen un seguimiento más acorde a las características del comportamiento de la biomasa. Finalmente se realizó un análisis económico, donde se describe con detalle el costo que tiene cada pieza que hace parte de este biorreactor, como también la materia prima y servicios públicos que se consumen durante la propagación en el tiempo establecido.

Palabras clave: *Azotobacter chroococcum*, biorreactor, PGPR, curva de crecimiento, propagación de biomasa, diseño, variables de seguimiento.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la población genera un crecimiento de la demanda de productos agrícolas que se estima que para el 2050 ascenderá al 70% de lo que es hoy día la población humana, estimando una población mundial de 9 billones de personas para ese año¹, según las Naciones Unidas. En un mundo donde se necesita tener un aumento considerable de las actividades agrícolas, para suplir las necesidades alimenticias, Colombia tiene mucha tierra apta y disponible para este uso.², aunque el aprovechamiento de su tierra es menos del 2% del total de la tierra disponible, lo que representaría para Colombia una oportunidad para consolidarse como potencia agrícola.

La calidad nutricional del suelo es un factor de impacto para los procesos existentes en la producción alimentaria, ya que determina el rendimiento de cultivo en especial para mejorar la calidad nutricional del suelo y la productividad de los cultivos.

En la historia de la industria agrícola siempre han predominado los fertilizantes químicos que han hecho y continúan haciendo uso de agentes químicos como el amoníaco. Este es uno de tantos agentes usados que ofrecen una respuesta pronta pero dicha productividad no se sostiene por mucho tiempo; dejan una incidencia en el impacto ambiental como a largo plazo se ven las secuelas de su uso, como la reducción del pH, lo cual deja el suelo totalmente árido, afecta la microbiota además de no aportar elementos nutricionales a las plantas. Esto causa pérdidas de productividad de suelos y daños serios al medio ambiente. El exceso de fertilizantes químicos, al no ser absorbidos por las plantas, terminan diluyéndose en el suelo, hasta llegar a acuíferos, ocasionando contaminación, algunas veces irreversible.³

Los biofertilizantes se han popularizado recientemente, dado que aportan un dinamismo biológico, haciendo uso de microorganismos benéficos para el suelo y las plantas, pues hacen del suelo un ecosistema vivo, dinámico y le hacen capaz de retener sus nutrientes, gracias a la diversidad de la microbiota presente, donde esta transforma los nutrientes a la disposición de las plantas.⁴

Se busca la aplicación de biofertilizantes como una iniciativa biotecnológica, dado que el mercado de los biofertilizantes a nivel mundial tiene un estimado al 2018 de U\$10,2

¹ UNITED NATIONS. Revision of World Population Prospects. [Sitio web]. USA. [Consultado: 7 abril de 2019]. 2019 Disponible en: <https://population.un.org/wpp/>

² AGENCIA EFE. La apuesta para convertir a Colombia en una de las despensas del mundo. [Sitio web]. Colombia. [Consultado: 7 noviembre de 2019] Publicado en junio 8 de 2019. Disponible en: <https://www.portafolio.co/economia/la-apuesta-para-convertir-a-colombia-en-una-de-las-despensas-del-mundo-530405>

³ CAMELO RUSINQUE, Mauricio. Desarrollo tecnológico de un biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica *Azotobacter chroococcum*. Tesis de Maestría. Universidad Militar Nueva Granada. 2010. p 11.

⁴ CANO, Mario Alejandro. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. 2011. UDCA. Pg 15-16

bn y tasas de crecimiento del 14,07 % además de ofrecer importantes beneficios al medio ambiente⁵

FUNDASES es una empresa colombiana productora de bioinsumos cuyo principio activo son los microorganismos aplicados a los suelos, entre sus productos manejan biofertilizantes y acondicionadores de suelo.⁶ Dentro de estos productos, se encuentra Azobac cuyo principio activo es *Azotobacter chroococcum*.

Para la producción de estos bioinsumos, se presentan las siguientes fases como la producción de biomasa, la formulación del producto y la longevidad. En este proyecto se desarrolló la fase inicial durante el proceso de producción de un bioinsumos: la producción de Biomasa.

Azotobacter chroococcum es una bacteria la cual actúa como una bacteria promotora de crecimiento vegetal ya que segrega fitohormonas durante su metabolismo, siendo de carácter PGPR, entre sus otras funciones, fija nitrógeno dado que sintetiza la enzima Nitrogenasa y funciona muy bien como acondicionadora del suelo.

Esta propuesta surge por la necesidad de llevar un proceso totalmente controlado en la elaboración de bioinsumos por parte de la empresa FUNDASES, pues desde las primeras fases de sus bioprocesos, necesitan realizar el escalado de manera más controlada para la producción en serie de estos (Bioinsumos).

El diseño se realizó basado en los parámetros cinéticos de la cepa los cuales fueron obtenidos mediante propagaciones a escala laboratorio. Se tomaron las condiciones de proceso que actualmente se usan en esta empresa para aproximar la propagación de biomasa en un proceso similar al industrial. Para la representación del diseño, se utilizó el programa SolidEdge, donde de manera gráfica se demuestran todas las configuraciones que cumpla con las necesidades de la cepa para finalmente plantear una propuesta de mejoramiento en la elaboración de un bioinsumo para que sea usado con seguridad en los suelos agrícolas.

⁵ DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACION (DNP). Crecimiento verde. [Sitio web]. Colombia. [Consultado: 7 de noviembre 2019] Publicado en junio 8 de 2019. Disponible en: https://www.dnp.gov.co/Crecimiento-Verde/Documents/ejes-tematicos/Bioeconomia/Informe%202/ANEXO%201_An%C3%A1lisis%20sector%20agr%C3%ADcola.pdf

⁶ FUNDASES. Home. [Sitio web]. Colombia. [Consultado: 7 de noviembre 2019] Disponible en: Fundases.net

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Diseñar conceptualmente un biorreactor a escala banco para un proceso de propagación de biomasa de la bacteria *Azotobacter chroococcum*, destinada a la elaboración de inoculantes biológicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar parámetros cinéticos de *Azotobacter chroococcum* a partir de datos experimentales
- Establecer los parámetros de diseño de biorreactor a escala banco.
- Realizar el análisis de costos al diseño de biorreactor propuesto y de la producción de un lote de bioinsumo basado en *Azotobacter chroococcum*

1. MARCO TEÓRICO

A continuación, en este capítulo se hablarán de las condiciones y factores de crecimiento importantes en la propagación de biomasa microbiana, también un acercamiento en cuanto al diseño de biorreactores, las configuraciones que satisfacen las necesidades de *Azotobacter chroococcum* y factores a tener en cuenta a la hora del diseño de este.

1.1 GENERALIDADES DE INOCULANTES BIOLÓGICOS

Para el desarrollo de una producción agrícola sostenible es necesario promover el uso de bioinsumos y reducir las aplicaciones de fertilizantes derivados de productos químicos⁷ donde el exceso de estos repercute negativamente en el medio ambiente, especies animales y humanos pueden correr riesgo al estar expuestos bajo trazas de residuos químicos en tejidos de vegetales mediante el consumo de estos productos.

Se conoce como inoculante biológico una formulación de microorganismos benéficos, los cuales son producidos principalmente a partir de bacterias promotoras del crecimiento vegetal⁸, aumentan la disponibilidad de nutrientes por su actividad biológica y ayudan a mejorar la salud del suelo⁹, los fertilizantes microbiológicos son una parte importante de las prácticas agrícolas sostenibles y eco sostenibles con el medio ambiente¹⁰.

Según el Instituto Colombiano Agropecuario ICA, bajo la resolución ICA 00698, los inoculantes biológicos se pueden clasificar como lo está descrito en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de los inoculantes biológicos.

Microorganismos	Descripción
Fijadores de N ₂	Simbióticas Capaces de establecer simbiosis efectiva con plantas leguminosas hospederas para fijar nitrógeno.
	Asimbióticos Microorganismos de vida libre, capaces de fijar nitrógeno atmosférico.

⁷ ROMERO PERDOMO, Felipe., et al. *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization, *Revista Argentina de Microbiología*. 2017, Vol 49, No 4. 378 p.

⁸ ZAMBRANO, Corina., BONILLA, Ruth. Rebeca. Industria de Bioinsumos de uso agrícola en Colombia, *Revista. U.D.C.A Act. & div. Cient.* 2015. 59 p.

⁹ MOSA, Walid Fediala., et al. Microbial products and biofertilizers in Improving growth and productivity of Apple-A review. *Polish Journal of Microbiology*. 2016. Vol. 64, No 3. 243 p.

¹⁰ RAMAZAN C, FAIK K, FARUK A. Mineral nutrition of plant. Principles and perspective. *J plant nut.* 1999. pp 437-442. Citado por RAJA G . Efficacy of Biofertilizers on Changes in Morphological , Physiological and Biochemical Parameters in *Jatropha curcas* L. 2015. p7.

Cuadro 1. (Continuación)

Microorganismos	Descripción
Solubilizadores de fosfatos	solubilizan formas no disponibles de fósforo.
Promotores del crecimiento vegetal	sintetizan sustancias que estimulan o favorecen el crecimiento de la planta.
Transformadores de materia orgánica	aceleran el compostaje y demás procesos de transformación orgánica para la producción de abonos

Fuente: elaboración propia, basada en la información del INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola. Resolución ICA 00698, 2011. P3-4.

1.2 GENERALIDAD DE LOS BIOPROCESOS

Los bioprocesos consisten en biotransformaciones para desarrollar productos a partir de células viables o sus componentes como proteínas de carácter enzimático o metabolitos, ya sea de bacterias, hongos, vegetales o animales. Este involucra la transformación del sustrato determinado, mediante las enzimas que dichas células son capaces de sintetizar, generando cambios físicos o químicos de la materia.

Mediante los bioprocesos, se pueden obtener productos comerciales que son eco sostenibles, para la sustitución progresiva de productos derivados del petróleo que constituyen agentes contaminantes de alimentos y fuentes hídricas ¹¹

1.3 GENERALIDADES DE *Azotobacter chroococcum*

Azotobacter chroococcum es una especie de bacterias rizosféricas utilizada en los cultivos bacterias fijadoras de nitrógeno, (nitrógeno asimilable para las plantas) llamadas también diazotrófica y son productoras de fitohormonas, para la promoción del crecimiento vegetal ¹², las cuales corresponden al grupo de bacterias PGPR, Por sus siglas en inglés, Plant growth-promoting rhizobacteria, Rizobacteria, en español Bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, es un término traído por los fitopatólogos Kloepper y Schroth ¹³ definiéndolas como bacterias que

¹¹ KENNES, Christian. Bioconversion processes. Chemical Engineering Laboratory. CICA. España. 2010 p1.

¹²GONZALES RODRIGUEZ, Raysa M. *et al.* Selección de cepas de *Azotobacter chroococcum* para su aplicación en la aclimatización de plantas in vitro de piña cv. 'Cayena lisa' <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/169/902>

¹³KLOEPPER J.W y SCHROTH M.N. Relationship of in vitro Antibiosis of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Plant Growth and the displacement of root microflora. University of California, Berkely. 1022 p.

colonizan las raíces de las plantas que favorecen y promueven su crecimiento.¹⁴ Además es degradadora de compuestos tóxicos¹⁵, Martinus Beijerinck (1851-1931), aisló por primera vez *Azotobacter*, fijadora de N₂ mediante una estrategia de enriquecimiento clásica¹⁶.

Azotobacter chroococcum está clasificada taxonómicamente como lo descrito en el cuadro 2.

Cuadro 2. Taxonomía de *Azotobacter chroococcum*

Dominio	Bacteria
Reino	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gammproteobacteria
Orden	Pseudomonas
Familia	Pseudomonadaceae/Azotobacteriaceae
Género	<i>Azotobacter</i>

Fuente: elaboración propia, basada en información de WANI, Sartaj A. *Azotobacter chroococcum* – A Potential Biofertilizer in Agriculture: An Overview 2016. pp 335

Son aerobias de vida libre, cuyas morfologías corresponden a: células cocobacilos, levaduriformes, de tamaño que oscila entre 1,0-2,5µ de diámetro. Son bacterias Gram negativas (Componen de una pared celular compleja que consiste en una membrana externa y una capa interna de peptidoglicano que contiene ácido murámico y mureína¹⁷), de respiración aerobia, capaces de fijar N₂¹⁸ (fijan al menos 10 mg de N₂ por gramo de carbohidrato, glucosa consumido) de forma no simbiótica¹⁹.

Puede llegar a crear estructuras de resistencia denominadas quistes, son resistentes a la desecación. Difieren de las endósporas, debido a que no son resistentes al calor y no están completamente latentes, ya que si se les suministra una fuente de carbono podría oxidarla rápidamente. A continuación, la representación morfológica en la figura 1, tanto de manera macroscópica (siembra

¹⁴ BORDA MOLINA, Daniel, et al. Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA). Pontificia Universidad Javeriana. 2009. p 3.

¹⁵ CASTILLO J. Evaluación de la degradación del endosulfán por *Azotobacter chroococcum* y determinación del efecto plaguicida sobre la fijación biológica de nitrógeno y sobre la producción de auxinas. Colombia: Bogotá; 2005. p. 121

¹⁶ MADIGAN, Michael T. et. al. Brock, Biología de los microorganismos. 2009. PEARSON EDUCACIÓN, S.A., 2009. 722 p. ISBN: 978-84-7829-097-0

¹⁷ BIOCULTIVOS S.A. Ficha técnica cepa *Azotobacter chroococcum*. [en línea]. (No hay fecha disponible). [Consultado: 17 septiembre 2018]. Disponible en:

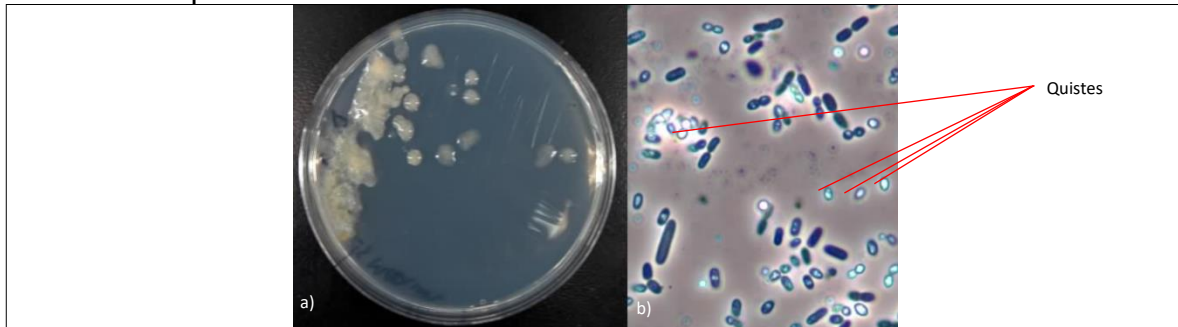
<http://www.biocultivos.com.co/dctos/Ficha+Técnica+Azotobacter+Chroococcum.pdf>

¹⁸ MADIGAN, Michael T. Brock, op cit. 495 p.

¹⁹ BIOCULTIVOS S.A. Op. Cit., p. 3.

en placa de agar nutritivo) y la morfología microscópica, donde se evidencia la formación de quistes.

Figura 1. a) Cultivo de *Azotobacter chroococcum* en agar nutritivo (b) frotis de *Azotobacter chroococcum* observado al microscopio con presencia de quistes, estructuras de resistencia. Morfología de las bacterias, con estructuras de resistencia "quistes"



Fuente: elaboración propia, con base en PLANET BIOTECH. [Sitio web]. India. [Consultado: 17 septiembre 2018]. Disponible en línea [https://www.indiamart.com/proddetail/azotobacter-chroococcum-8655361197.html]

Para la identificación macroscópica, dependiendo el medio de cultivo donde esté sembrada la cepa, puede variar la tonalidad, color y textura de las colonias, dado los requerimientos nutricionales que el medio le proporcione.

Cuadro 3. Resumen morfología macroscópica de *Azotobacter chroococcum*.

Macroscópico		
Medio No Selectivo	Agar Nutritivo	Colonias medianas convexas con borde circular color crema
	Agar Ashby	Colonias pequeñas convexas Con borde circular transparentes
Medio Selectivo	Agar LG	Colonias grandes, cremosas y de consistencia mucosa.

Fuente: elaboración propia basada en información de PLANET BIOTECH. [Sitio web]. India. [Consultado: 17 septiembre 2018]. Disponible en línea [https://www.indiamart.com/proddetail/azotobacter-chroococcum-8655361197.html]

Para la identificación de morfología microscópica, se realiza mediante tinción de Gram²⁰, además que permite definir la clasificación de bacteria según su tipo de pared celular.

²⁰ GRAM, Christian. The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. Fortschritte der Medizin. 1884. 2, p. 185-9.

Cuadro 4. Resumen morfología microscópica de *Azotobacter chroococcum*.

Microscópico	
Morfología Bacteria	Cocobacilos, levaduriformes
Tinción de Gram	Fucsias, características de bacilos Gram negativos
Organización	Individual, pares, cadenas en arreglos irregulares (Cadenas de tamaño variable).

Fuente: elaboración propia basada en información de VALDERRAMA AGUIRRE Lina, C. Evaluación de cepas nativas de *Azotobacter spp* como agente reductor de urea en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp*). Trabajo de Maestría. Cali, Valle del Cauca. Universidad del Valle. Facultad de Ingenierías. 2013. 41 p.

Además, de los nutrientes que componen cada medio de cultivo, se deben tener en cuenta factores fisicoquímicos que influyen en el crecimiento para producción de biomasa, como se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 5. Factores que influyen en el desarrollo del cultivo *Azotobacter chroococcum*

Factores que influyen en su crecimiento	
pH	Manejada en un amplio rango de pH entre 4,8 – 8,5. Pero su crecimiento óptimo esta entre pH ideal de 7-7,5. ²¹
Temperatura óptima de crecimiento	Debe manejarse en un rango de temperatura entre 28°C- 32°C.
Oxígeno disuelto	Debe mantener requerimientos básicos de oxígeno del microorganismo dado que es un impacto considerable en el crecimiento bacteriano. Si hay una concentración alta de oxígeno, se forma una cápsula de alginato, cuyo contenido es elevado en ácido glucurónico.
Modo de operación	Para producción de biomasa, industrialmente son usados Bioprocesos en producción Batch y semi-Batch. ²²

Fuente: elaboración propia basada en información de PLANET BIOTECH. [Sitio web]. India. [Consultado: 17 septiembre 2018]. Disponible en línea [<https://www.indiamart.com/proddetail/azotobacter-chroococcum-8655361197.html>] y OROS, Damir. et al.Cultivation of the bacterium *Azotobacter chroococcum* for preparation of biofertilizers. African Journal of Biotechnology. 2011. Vol 10. No 16. pp 4.

En cuanto al consumo de fuentes de carbono, ROBSON, Robert. *et al.* ²³, expresa que *Azotobacter chroococcum* tiene actividades metabólicas codificadas en su

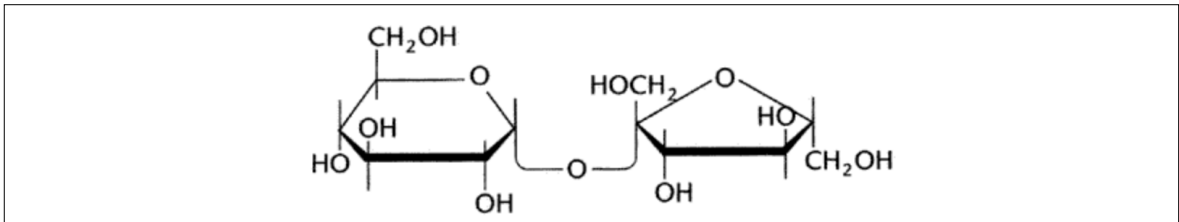
²¹ BIOCULTIVOS S.A. Op. Cit., p. 3.

²² OROS, Damir. *et al.*Cultivation of the bacterium *Azotobacter chroococcum* for preparation of biofertilizers. African Journal of Biotechnology. 2011. Vol 10. No 16. pp 4.

²³ ROBSON, Robert. *et al.* *Azotobacter* Genomes: The Genome of *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 (ATCC 4412) . Illinois Institute of Technology, PLOS ONE. 2015. p 8.

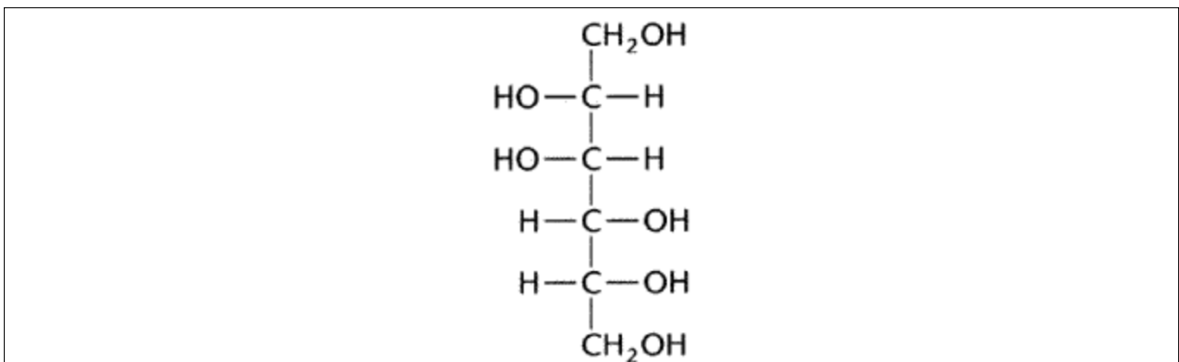
cromosoma, como la obtención de carbono a partir de diferentes fuentes como lo son mono, di y trisacáridos, un disacárido como ejemplo esta la sacarosa, un dímero compuesto por glucosa y fructosa, azúcares de alcoholes primarios y secundarios, ejemplo de estos son el manitol y el sorbitol, cadenas cortas de ácidos orgánicos, y cadenas medias de ácidos grasos.

Figura 2. Fórmula química de la sacarosa, $C_{12}H_{22}O_{11}$.



Fuente: BOUIS, Paul A. Reagent Chemicals; Specifications and Procedures for Reagents and Standard Grade Reference Materials. 2015. 11th Edition. Sucrose. Oxford University Press. pp 689.

Figura 3. Formula química del manitol, $HOCH_2(CHOH)_4CH_2OH$



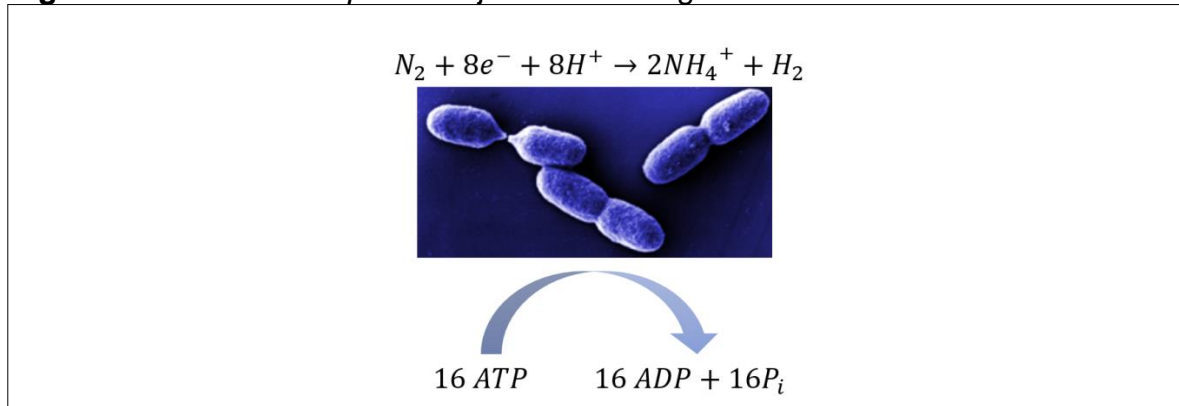
Fuente: BOUIS, Paul A. Reagent Chemicals; Specifications and Procedures for Reagents and Standard Grade Reference Materials. 2015. 11th Edition. Sucrose. Oxford University Press. pp 689.

RAJA G²⁴. determina que la fijación biológica de nitrógeno es esencial para la vida, dado que la disponibilidad de nitrógeno es importante en el proceso de síntesis de ácidos nucleicos, metafóricamente comparados como los bloques de construcción básicos de la vida como por ejemplo los nucleótidos del ADN y RNA, aminoácidos y proteínas.

²⁴ RAJA G . Efficacy of Biofertilizers on Changes in Morphological , Physiological and Biochemical Parameters in *Jatropha curcas L.* Trabajo de doctorado. Tamil Nadu, India. Universidad Bharathidasan. Departamento de ciencia de las plantas . 2012. p9.

Además, BARTON. L²⁵ describe que la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es encontrada solo en procariontas, característica de bacterias heterotróficas aerobias del suelo como *Azotobacter*. La reacción general de fijación de nitrógeno está dada como lo describe la figura 4.

Figura 4. *Azotobacter sp.* en la fijación de nitrógeno



Fuente: elaboración propia, con base en MADIGAN, Michael T., 2009. [Sitio web]. USA. [Consultado: 17 septiembre 2018]. Imagen disponible en línea [<https://biofertilizer.com/azotobacter.htm>]

Describiendo la reacción presente en la figura 4, la fijación de nitrógeno o en otros términos reducción de N₂ a NH₄⁺, consume 8 e⁻. donde se requiere un consumo mínimo de 16 ATP para fijar una molécula de N₂ atmosférico.

Para la generación de ATP debido a sus características aerobias los microorganismos quieren una concentración mínima de O₂, además de una fuente de carbono ya sean mono, di, polisacáridos, ácidos orgánicos y fuentes de nitrógeno que son obtenidas del N₂ atmosférico, nitrato, sales de amonio y ciertos aminoácidos.²⁶

SETHI, Santosh Kumar y ADHIKARY, Siba Prasad ²⁷, relacionan la necesidad de requerimiento de molibdeno para fijar nitrógeno que puede ser parcialmente reemplazado por vanadio. Si la bacteria se encuentra en un medio donde solo este el molibdeno presente, le permite a la bacteria sintetizar la enzima encargada de la fijación del nitrógeno, denominada Nitrogenasa –I, si solo cuenta en el medio con

²⁵ BARTON. L. L. Structural and Functional Relationships in Prokaryotes. 2005. 820 p. citado por CAMELO RUSINQUE, Mauricio. Desarrollo tecnológico de un biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica *Azotobacter chroococcum*. Tesis de Maestría. Universidad Militar Nueva Granada. 2010. p 11.

²⁶ RAJA G. Op. cit., p. 9.

²⁷ SETHI, Santosh Kumar., ADHIKARY, Siba Prasad. *Azotobacter: A Plant Growth-promoting Rhizobacteria Used as Biofertilizer*. Global Science Books. 2011. p 69.

vanadio, le permitirá sintetizar la enzima Nitrogenasa –II, y si el molibdeno y el vanadio se encuentran presentes, se sintetizará la enzima Nitrogenasa –III.

La enzima Nitrogenasa, siendo de carácter catalítico, es la encargada de realizar la fijación biológica de N₂ atmosférico. Aunque esta enzima es sensible al O₂, hace que sea fácilmente degradable bajo las altas demandas de O₂ que tiene *Azotobacter* (bacteria aerobia) ²⁸, MOSHIRI F, *et al*, ²⁹ refieren que para proteger esta enzima, la bacteria crea condiciones parciales de baja presión al interior de la célula, mediante una capsula mucosa compuesta por alginato, con un alto contenido de ácido gulurónico relativamente alto en la superficie celular la cual lo rodea y contribuye a proteger tal enzima de la inactivación oxidativa por una combinación de compartimientos y complejos mecanismos bioquímicos entre los que se encuentra, la protección conformacional o *swithing off*.

Por lo tanto, durante el cultivo de *Azotobacter chroococcum* a una mayor concentración de oxígeno, se forma más ácido L-gulurónico en el alginato, provocando geles densos como consecuencia, se verá un aumento en la viscosidad del caldo. Para reducir la posibilidad de estrés oxidativo y favorecer la propagación celular, en condiciones de aireación se regula el nivel de oxígeno en el proceso de fermentación mediante el control del nivel de saturación de aire parciales de oxígeno (pO₂) aproximadamente en 30% de saturación de aire mediante el control de la velocidad del agitador y la velocidad de flujo de aire³⁰.

1.4 REACTORES BIOLÓGICOS EN PRODUCCIÓN INDUSTRIAL

A nivel industrial los biorreactores usualmente son tanques cilíndricos que pueden ser agitados o sin agitación, también pueden contar con sistema de aireación o no, agregado a esto tiene altas condiciones de inocuidad puesto que las cepas que se trabajan tienden a ser aisladas y se busca evitar a todo costo la contaminación de las mismas. Los biorreactores normalmente se encuentran configurados para permitir las mejores condiciones operacionales de crecimiento de los microorganismos por esta razón tienden a estar equipados con sistemas que puedan controlar temperatura, pH y el oxígeno disuelto en la mezcla. Usualmente son reactores del tipo Batch, pero a nivel industrial se pueden encontrar casos

²⁸ OROZCO P. Francisco Hernando. La biología del Nitrógeno. Conceptos básicos sobre sus transformaciones biológicas. 1999. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. ISBN: 958-9352-11-1.

²⁹ MOSHIRI F, et al. The FeSII protein of *Azotobacter vinelandii* is not essential for aerobic nitrogen fixation, but confers significant protection to oxygen-mediated inactivation of nitrogenase in vitro an in vivo. *Molecular Microbiology*. Vol 14 pp 101-11. Citado por JIMENEZ AVELLA, Diego Javier. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter spp.* mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16s. p 21.

³⁰OROS, Damir et al.. Op. Cit., p. 5.

específicos en los que existen reactores CSTR utilizados como biorreactores.³¹ Como se representa en el cuadro 6.

Cabe resaltar que la agitación prevalece la transferencia de masa, para que los microorganismos presentes puedan tener un acceso a los macro y micronutrientes presentes en el medio³², además, esta condición de operación afecta los costos del proceso.

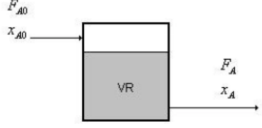
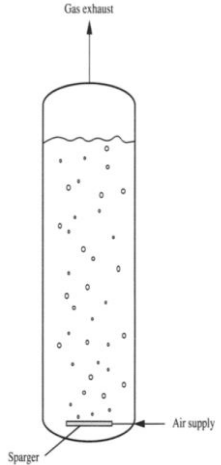
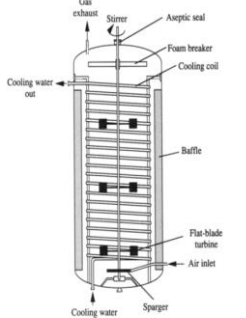
Incluido a esto, se deben prevalecer los sistemas de control debido a que las condiciones de los biorreactores deben ser constantes y específicas para cada cepa, un biorreactor debe contar con un control de temperatura, para mantener estables las variables de un bioproceso, entre las que más destacan: pH, oxígeno disuelto y agitación, los cuales estarán contextualizados en el cuadro 7³³.

³¹ DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. p 350.

³² DALTON H, POSTGATE JR. Effect of oxygen on the growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous culture. Gran Bretaña. 1968. J Gen Microbiol 54: P 465

³³SCRAGG, Alan. Biotecnología para Ingenieros : Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Limusa, Mexico 1997. ISBN: 9789681847081. p 197

Cuadro 6. Tabla comparativa de tipos de biorreactores

Tipo de reactor	Característica	Figura
Reactores no agitados, sin aireación	Los biorreactores sin agitación y sin aireación son utilizados para microorganismos anaerobios, o aerobios facultativos, principalmente en procesos de fermentación, son generalmente de construcción más simples. ³⁴	
Reactores sin agitación mecánica, con aireación.	Los biorreactores sin agitación mecánica con aireación o también llamados biorreactores de columna de burbujas cuentan con sistemas de burbujeo en la parte más baja del tanque, este sistema permite que las burbujas asciendan por todo el tanque transfiriendo oxígeno a la mezcla para de esta manera poder cumplir con la demanda biológica de oxígeno de los microorganismos, así mismo ayuda a mantener el tanque parcialmente homogenizado para evitar la acumulación de sustratos, productos o biomasa en puntos específicos del reactor; este tipo de reactores favorece a microorganismos que tienen baja resistencia al cizallamiento pues las fuerzas de corte que experimentan son menores, agregado a esto, el reactor se utiliza únicamente con microorganismos aerobios. Requiere menos energía que el sistema con agitación mecánica. ³⁵	
Reactores con agitación mecánica y con aireación	Los reactores con agitación mecánica y con aireación, disponen con un sistema de espas que permite mantener la mezcla homogénea y oxigenada pues el movimiento de las espas crean "micro burbujas" que permiten aumentar el oxígeno disuelto, por esta razón este tipo de reactores se usa únicamente con microorganismos aerobios y con cierta resistencia al cizallamiento puesto que el continuo movimiento puede romper la membrana de los microorganismos, o en el caso de hongos filamentosos impide el crecimiento de las estructuras que forman. ³⁶	

Fuente. elaboración propia. Imágenes obtenidas de DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. p 352.

³⁴ DORAN, Pauline., Op Cit. p 352

³⁵ Ibid., p. 353

³⁶ Ibid., p. 355

Cuadro 7. Variables de control para un bioproceso.

Variable	Descripción	Figura
Temperatura	El control de temperatura de los biorreactores al igual que los reactores de la industria química, se hace mediante sensores internos, los cuales manifiestan señales que se manifiestan en el tanque, mediante un transductor que permita traducir las señales y mediante un lazo de control, evaluar si este requiere agregar o retirar calor, esto se realiza mediante intercambiadores de calor como un serpentín interno que permita mantener una temperatura en tanques que no cuenten con agitación, o un enchaquetamiento del reactor en los que sí cuentan con agitación ³⁷	
pH	Algunos microorganismos requieren de niveles de pH muy específicos para evitar una posible inhibición del crecimiento, por esta razón el control de pH se hace indispensable en algunos casos, este se realiza mediante un potenciómetro interno en el reactor que determinara el nivel de pH, posterior a esto la información es llevada un controlador que definirá si en necesario realizar algún cambio en el pH, este cambio lo lleva acabo un dosificador que puede agregar una solución buffer, un ácido o una base para así modificar el pH. ³⁸	
Oxígeno disuelto	El oxígeno disuelto en el caldo de cultivo debe ser constante para asegurar la supervivencia de las cepas, los sensores que miden el oxígeno disuelto y conociendo esto se puede definir si es necesario aumentar o disminuir el burbujeo, en caso de reactores que no cuenten con agitación, eso puesto que normalmente los reactores que tienen agitación tienen como principio tomar el oxígeno presente en el ambiente e integrarlo en la mezcla gracias al moviente que estos producen ³⁹	

Fuente: elaboración propia. Imágenes obtenidas de DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. p 289; ETATRON. Ficha técnica de bomba peristáltica, serie B. [en línea]. (No hay fecha disponible). [Consultado: 29 julio 2019]. Disponible en: [www.etatron.es/etatron/media/blfa_files/MANUAL_BOMBAS_PERISTA LTICAS_castellano.pdf](http://www.etatron.es/etatron/media/blfa_files/MANUAL_BOMBAS_PERISTA_LTICAS_castellano.pdf) y ENDRESS + HAUSSEN. Sensor analógico de oxígeno disuelto Oxymax COS41. [en línea]. (No hay fecha disponible). [Consultado: 29 julio 2019]. Disponible en: <https://www.co.endress.com/es?locale=es>

³⁷ SCRAGG, Alan. Op. Cit, p 198.

³⁸ Ibid., p. 199

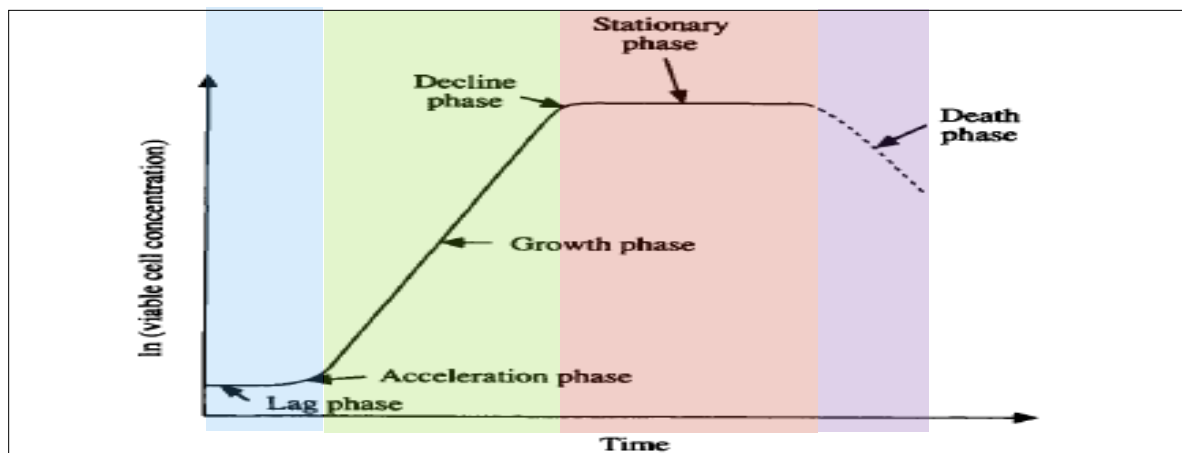
³⁹ Ibid., p. 283

1.5 CINÉTICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

Según T EGLI.⁴⁰, la cinética del crecimiento microbiano, se refiere a la velocidad a la que el número de células individuales (o, más en general, de biomasa activa) cambia en un sistema definido, En relación a la multiplicación y muerte celular.

El papel de la cinética del crecimiento se toma como una herramienta indispensable no solo en los campos aplicados de la industria y la biotecnología ambiental, dado con el conocimiento de la cinética, se sabe el comportamiento del microorganismo ya que de él depende el rendimiento del producto de interés, mediante el entendimiento de las manifestaciones y reacciones de la vida microbiana, como crecimiento, supervivencia, muerte, adaptaciones e interacciones con el medio ambiente⁴¹. DUARTE TORRES⁴² y DORAN, Pauline, representa las etapas representativas de los cambios de biomasa y de su ambiente de la siguiente manera representados en la figura 5, donde se pueden observar varias fases que caracterizan el crecimiento microbiano en estado estacionario.

Figura 5. Representación esquemática de la curva de crecimiento de un cultivo Batch



Fuente: Modificación por los autores, basado en información de DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. p 291.

El cuadro 8 a continuación, corresponde a un resumen del crecimiento celular para un batch.

⁴⁰ T EGLI. Growth Kinetics, Bacterial. Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology, Dübendorf, Switzerland. 2009. 180p.

⁴¹ SEPPULVEDA TORRE,L y AGUILAR C.N. Cinética microbiana del cultivo de microorganismos biofertilizantes. , Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. México. P 343.

⁴²DUARTE TORRES, Alberto. Introducción a la Ingeniería Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Ingeniería Química. Instituto de Biotecnología. 1995. 265 p.

Cuadro 8. Fases del crecimiento celular en cultivo batch

Fase	Descripción	Células	Velocidad específica de crecimiento
Adaptación	las células se adaptan al nuevo ambiente fisicoquímico, como lo es el caldo de cultivo donde esta se encuentra. No existe o existe muy poco crecimiento	# Células vivas= # Células muertas	$\mu=0$
Aceleración	Comienza el crecimiento, donde la velocidad aumenta desde cero hasta un valor máximo.	# Células vivas \geq # Células muertas	$\mu < \mu \text{ máx.}$
Crecimiento	Es aquí donde las células se reproducen, en un medio sin limitación de sustancias nutritivas, alcanzando una máxima velocidad compatible.	# Células vivas $>$ # Células muertas	$\mu \approx \mu \text{ máx.}$
Deceleración	donde la velocidad de crecimiento se ve disminuida al limitarse la disponibilidad de sustancias nutritivas o a la formación de productos inhibidores	# Células vivas $>$ # Células muertas	$\mu < \mu \text{ máx.}$
Estacionaria	Se genera cuando se agota alguna sustancia nutritiva, cesa el crecimiento	# Células vivas=# Células muertas	$\mu =0$
Muerte	Las células pierden su viabilidad y se lisan, No hay registros metabólicos de estas células.	# Células vivas $<$ # Células muertas	$\mu <0$

Fuente: elaboración propia basada en información de DUARTE TORRES Y DORAN, Pauline

1.5.1 Descripción de parámetros cinéticos

1.5.1.1 Velocidad específica de crecimiento: Durante las fases de crecimiento y desaceleración, la velocidad de crecimiento celular ⁴³ se describe por la ecuación 1.

⁴³ DORAN, Pauline. Opcit. 291.

Ecuación 1. Velocidad de crecimiento celular

$$r_x = \mu x$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. p 291.

Donde:

r_x : Es la velocidad volumétrica de producción de biomasa con unidades ya sean $\text{Kg m}^{-3}\text{s}^{-1}$

μ : velocidad específica de crecimiento

x : Biomasa

Esta ecuación de crecimiento celular puede considerarse como una reacción autocatalítica de primer orden. En sistemas cerrados, donde únicamente el crecimiento celular es el que afecta la concentración celular, se podría reescribir de la siguiente manera la ecuación 1.

Ecuación 2. Velocidad de crecimiento celular diferencial

$$r_x = \frac{dx}{dt}$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. p 291.

Integrando la ecuación 2 suponiendo que μ es constante en las condiciones iniciales $x=x_0$ a $t=0$ para obtener: $x = x_0 e^{\mu t}$

Tomando logaritmos neperianos se obtiene

Ecuación 3. Relación entre el crecimiento de biomasa y el tiempo de duplicación

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. p 291.

Donde:

μ : velocidad específica de crecimiento

x_0 : Concentración de células viables a tiempo cero

t : tiempo

1.5.1.2 Tiempo de duplicación. Otra manera de expresar las velocidades de crecimiento celular, se expresan generalmente en términos de tiempo de duplicación,⁴⁴ t_d

⁴⁴ DORAN, Pauline. Op Cit. p291.

Ecuación 4. Tiempo de duplicación

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. p 291.

1.5.1.3 Rendimiento de biomasa. El rendimiento celular se define a través del concepto de nutriente limitante, donde se evalúa en las unidades de sustrato necesarios para la conversión de este en biomasa, definiéndose a continuación:

Ecuación 5. Rendimiento de biomasa

$$Y_{xs} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{M_t - M_0}{S_0 - S_t}$$

Fuente: SCRAGG, Alan. Biotecnología Para Ingenieros, Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Ed. Limusa; México D.F., 2008. Pág. 203.

Donde:

M_t : Corresponde al # de células del inicio de la fase estacionaria

M_0 : Biomasa inicial

S_t : Corresponde al valor del sustrato correspondiente al # de células del inicio de la fase estacionaria

S_0 : Cantidad inicial del sustrato en el medio

1.6 TÉCNICAS Y MÉTODOS

1.6.1 Cuantificación de células viables por recuento en placa. Técnica de medición utilizada en microbiología para reportar el número de células viables o conjunto de estas capaces de formar una colonia por unidad de volumen. Una célula viable es capaz de reproducirse y generar descendencia,⁴⁵ para su debida cuantificación, se han desarrollado métodos de recuentos de estas mediante medios sólidos los cuales manifiestan su crecimiento e identificación macroscópica.

Para recuento de UFC se basó en la norma NTC 4092:2016 Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos⁴⁶, que el rango de conteo debe ser entre 30 -300 colonias por caja de Petri de 9mm de diámetro. Con valores superiores a 300 colonias se manifiesta como cajas muy cargadas de biomasa, donde las colonias

⁴⁵ MADIGAN, Michael T. et. al. Op Cit. 168.

⁴⁶ INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos NTC 4092:2016. Bogotá D.C. El instituto. 2018. 30 p.

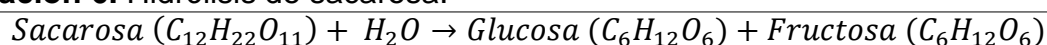
tienden a fusionarse y manifestar estimaciones erróneas.⁴⁷ Conteos inferiores a 30 colonias no poseen un estadístico significativo.

Para llevar a la dilución del caldo madre, y cuantificarlo correctamente, se debe diluir de modo 1: 10, donde 1 ml de caldo madre, pasará caldo de dilución de 9ml previamente estéril para completar 10 ml, y consecutivamente llevarse a las diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-8} .

1.6.2 Cuantificación de sustrato

1.6.2.1 Técnica de hidrólisis de la sacarosa La hidrólisis ácida consiste en el rompimiento del enlace del dímero glucosa-fructosa incorporando una molécula de agua en este enlace, en presencia de ácido clorhídrico HCl y a temperatura de ebullición 92°C. Esta reacción catabólica da origen a dos monosacáridos Glucosa y fructosa, los cuales son azúcares reductores, que son cuantificables por la técnica colorimétrica DNS. Este proceso se denomina inversión de la sacarosa,⁴⁸ descrita en la siguiente ecuación:

Ecuación 6. Hidrólisis de sacarosa.



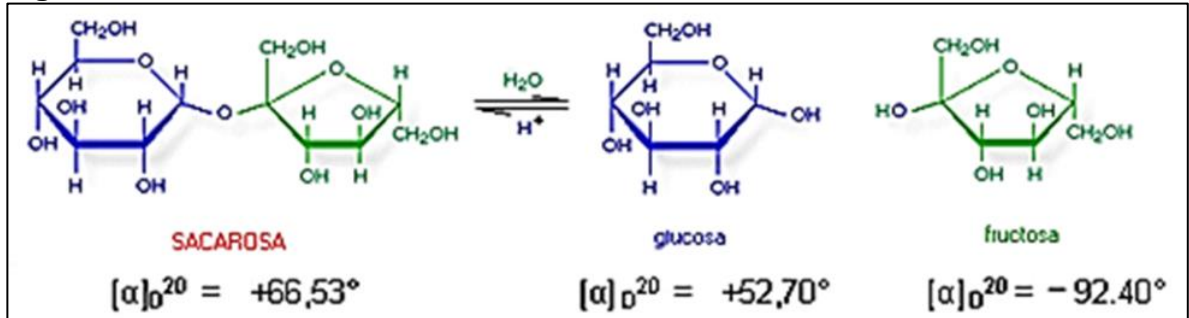
Fuente: GODOY R. Método DNS para la determinación de azúcares reductores totales en melaza, sustrato de fermentación y vinos. Universidad Nacional de Colombia 2002. p. 1-3. Citado por FAJARDO CASTILLO Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO Sandra Constanza. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. 2007 p. 111-112.

La glucosa y la fructosa son monosacáridos con la misma fórmula molecular pero la fructosa es un isómero de la glucosa, por lo tanto, habrá una variación en la estructura de esta.

⁴⁷ Ibid. pp 169

⁴⁸ GODOY R. Método DNS para la determinación de azúcares reductores totales en melaza, sustrato de fermentación y vinos. Universidad Nacional de Colombia 2002. p. 1-3. Citado por FAJARDO CASTILLO Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO Sandra Constanza. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. 2007 p. 111-112.

Figura 6. Hidrólisis ácida de la sacarosa



Fuente: TRIPLÉNACE. Polarimetría II: Constante de velocidad de la hidrólisis de la sacarosa. Consultado el 14 de agosto de 2019. Disponible en: <https://triplenlace.com/2012/11/25/polarimetria-ii-aplicaciones-en-quimica/>

1.6.2.2 Técnica del ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS). Técnica de oxidorreducción que se basa en la capacidad de los azúcares reductores como la sacarosa y la fructosa para reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico⁴⁹ bajo condiciones especiales como lo son el efecto de la temperatura a la que es tratada y el tiempo para la reacción de reducción. Es una técnica colorimétrica, donde a mayores concentraciones de azúcares reductores, viran a una coloración más intensa, a medida que las concentraciones se vean diluidas o menores, se reducirá la coloración esperada. Para llevar a una cuantificación más precisa, se evidencia por medio de la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro UV, a una longitud de onda de 540 nm, seguida la técnica de MILLER.

1.7. COSTOS FIJOS

Según ROJAS MEDINA⁵⁰ son aquellos que permanecen constantes dentro de un periodo determinado, sin importar si cambia el volumen de producción. En el contexto de la producción de biomasa, estos incluyen todos los activos del laboratorio, incluyendo servicios auxiliares para su correcta operación.

1.7.1 Costos directos. SULLIVAN⁵¹, refiere a los costos directos como aquellos que pueden medirse en forma directa y razonable. Además de esto, tienen un efecto directo en la realización de producción de biomasa, donde son incluidos en consideración los materiales, la mano de obra, compra de equipos para monitoreo como sensores pertenecientes para la instrumentación, electricidad, entre otros.

⁴⁹ MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. 1959. Vol 31. No 3. 427 p.

⁵⁰ ROJAS MEDINA, Ricardo Alfredo. Sistemas de costos: Un proceso para su implementación. 2007. Universidad Nacional de Colombia. Sede Manizales. 11 p.

⁵¹ SULLIVAN, William G. Ingeniería económica de De Degarmo. 2004. Editorial Pearson. Edición 12. p30

1.7.2 Costos indirectos. Son aquellos los cuales intervienen en el proceso de producción del producto final pero no es visto físicamente en este, pero son necesarias para lograr la producción del producto final, Como por ejemplo gasto de electricidad, agua entre otros servicios. ⁵²

⁵² BOULANGER JIMENEZ, Francisco y ESPINOZA GUTIERREZ Carlos Luis. Costos industriales. 2007. Editorial tecnologica de Costa rica. ISBN: 9977-66-183-9. P 125

2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE *Azotobacter chroococcum* A PARTIR DE DATOS EXPERIMENTALES

En este capítulo, se dan a conocer los factores ligados al crecimiento de *Azotobacter chroococcum*, para una producción garantizada de biomasa, bajo la referencia de la norma NTC 5842:2018 Norma técnica colombiana, Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes Biológicos. Requisitos.⁵³ Además, se demuestra una descripción del crecimiento de *Azotobacter chroococcum* bajo dos medios de cultivos diferentes, el primero cuya composición es conocida, y el segundo únicamente en conocimiento de su fuente de carbono. Durante los ensayos preliminares, se definió el tipo de fuente de carbono que más producía biomasa, esto fue el punto de partida para la elaboración de la curva de crecimiento microbiano definida como Cinética estándar, posterior a esta, se llevó el seguimiento de la cinética realizada bajo condiciones de producción, donde la formulación del medio es de tipo industrial y su acceso a la formulación es nula. Con los resultados de las curvas de crecimientos, darán pautas para conllevar los balances de materia, destinados para la elaboración del diseño del biorreactor a escala banco con volumen efectivo de 5L.

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la descripción de los materiales como lo son los reactivos y equipos utilizados durante la fase de ensayos preliminares y experimentación con sus respectivas descripciones y usos dentro del laboratorio, además de los métodos implementados para el desarrollo de la investigación. Cabe resaltar que cada uno de los protocolos fueron seguidos bajo los implementados en el laboratorio de microbiología de FUNDASES.

2.1.1 Reactivos

2.1.1.1 Microorganismo *Azotobacter chroococcum*. La cepa de *Azotobacter chroococcum* fue proporcionada por el laboratorio de FUNDASES. Esta proviene del área de producción de la empresa, la cual la almacenan en unas botellas que contienen 60 ml de agar Ashby, la cepa se encuentra dispersada en la superficie y es una cepa que es de segunda generación.

⁵³ INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes Biológicos. Requisitos. NTC 5842. Bogotá D.C. El instituto. 2018. 22 p.

Figura 7. Botella de cepa *Azotobacter chroococcum*.



Fuente: elaboración propia.

2.1.1.2 Medios de cultivo. Para los ensayos preliminares se utilizaron los caldos se utilizó Ashby-sacarosa y Ashby -manitol, para la cinética estándar el medio Ashby sacarosa, seleccionado a partir de los resultados obtenidos del ensayo preliminar y el medio de producción en conocimiento solo de la fuente de carbono.

- **Caldos de cultivo.** El caldo de cultivo utilizado durante la experimentación fue el caldo Ashby, formulación proporcionada por el laboratorio FUNDASES, una modificación del caldo Ashby con una concentración de 10g/l, como se describen en las tablas 9 y 10. modificación resultado de las pruebas preliminares. En los caldos fueron donde se realizó la propagación de biomasa dentro del bidón, para el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*.

Los caldos fueron preparados por componentes, cada reactivo fue pesado acorde al volumen necesario para su preparación, fueron ajustados a un pH entre 7.2 – 7.3. El caldo se caracteriza por tener apariencia lechosa cuando es esterilizado, este color es proporcionado por el carbonato de calcio. Al ser inoculado y por producto del metabolismo, se torna amarillento.

A continuación, en la tabla 1 y 2, los medios utilizados:

Tabla 1. Caldo Ashby - Manitol (FUNDASES)

REACTIVO	GRADO	PRESENTACIÓN	g/L
Manitol	Industrial	Polvo	10
Fosfato dipotásico de hidrógeno	Industrial	Polvo	0.2
Sulfato de magnesio heptahidratado	Industrial	Cristales	0.2
Cloruro de sodio	Industrial	Cristales	0.2
Sulfato de calcio	Reactivo-Analítico	Polvo	0.2
Carbonato de calcio	Reactivo-Analítico	Polvo	0.2

Fuente: Fundación de Asesorías para el Sector Rural- FUNDASES. Laboratorio de microbiología de FUNDASES.

Tabla 2. Caldo Ashby - Sacarosa (MODIFICADO)

REACTIVO	GRADO	PRESENTACIÓN	g/L
Sacarosa	Industrial	Cristales	10
Fosfato dipotásico de hidrógeno	Industrial	Polvo	0.2
Sulfato de magnesio heptahidratado	Industrial	Cristales	0.2
Cloruro de sodio	Industrial	Cristales	0.2
Sulfato de calcio	Reactivo-Analítico	Polvo	0.2
Carbonato de calcio	Reactivo-Analítico	Polvo	0.2

Fuente: Fundación de Asesorías para el Sector Rural- FUNDASES. Laboratorio de microbiología de FUNDASES. Modificación de fuente de carbono por autores.

- **Medio de cultivo sólido.** El medio de cultivo sólido utilizado durante las investigaciones fue el medio Ashby, formulación proporcionada por el laboratorio FUNDASES relacionado en la tabla 3.

El agar Ashby fue preparado por componentes, cada reactivo fue pesado acorde al volumen de preparación, fueron ajustados a un pH entre 7.2 – 7.3. El agar Ashby se caracteriza por tener apariencia lechosa cuando es esterilizado, este color es proporcionado por el carbonato de calcio, se debe tener buena agitación antes de su esterilidad para evitar precipitados de calcio.

Tabla 3. Formulación agar Ashby (FUNDASES)

REACTIVO	GRADO	PRESENTACIÓN	g/L
Manitol	Industrial	Polvo	10
Fosfato dipotásico de hidrógeno	Industrial	Polvo	0.2
Sulfato de magnesio heptahidratado	Industrial	Cristales	0.2
Cloruro de sodio	Industrial	Cristales	0.2
Sulfato de calcio	Reactivo-Analítico	Polvo	0.2
Carbonato de calcio	Reactivo-Analítico	Polvo	0.2
Agar-Agar	Reactivo-Analítico	Polvo	15

Fuente: Fundación de Asesorías para el Sector Rural- FUNDASES. Laboratorio de microbiología de FUNDASES.

- **Solución para diluciones.** Para las diluciones de siembra en placa, se utilizó la solución agua peptona bufferada al 1%, de Difco™. Como lo descrito en la tabla 4. El caldo se ajustada a un pH entre 7.0 – 7.4. El agua peptona bufferada se caracteriza por tener apariencia ligeramente amarilla cuando es esterilizada

Tabla 4. Formulación de agua peptona bufferada 1% (AP1%)

REACTIVO	g/L
Peptona	10
Cloruro de sodio	5
Fosfato disódico	3.5
Fosfato monopotásico	1.5

Fuente: BD Difco TM

- **Hidrólisis ácida de sacarosa.** La Hidrólisis ácida de sacarosa fue realizada según el protocolo de FAJARDO y SARMIENTO ⁵⁴. Los reactivos empleados para este método fueron los siguientes expresados en la tabla 8.

Tabla 5. Reactivos para Hidrólisis ácida

REACTIVO	GRADO	ESTADO	PRESENTACIÓN
Ácido clorhídrico	Reactivo-Analítico	Líquido	Líquida 37% v/v
Hidróxido de sodio	Reactivo-Analítico	Sólido	Gránulos
Fenoltaleína	Reactivo-Analítico	Líquido	Líquida
Agua destilada	Reactivo-Analítico	Líquido	Líquida

Fuente: FAJARDO CASTILLO Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO Sandra Constanza. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. 2007. 47 p.

- **Cuantificación de azúcares reductores por técnica colorimétrica DNS.** Técnica usada por MILLER, Gail, que permite cuantificar los azúcares reductores, durante esta investigación, se cuantificaron los azúcares que fueron hidrolizados de la sacarosa (glucosa y fructosa, ambos reductores), cuyos componentes para su preparación se encuentran en la tabla 6.

Tabla 6. Componentes del reactivo DNS. Según MILLER.

REACTIVO	GRADO	ESTADO	PRESENTACIÓN	% p/p
Ácido 3,5-Dinitrosalicílico	Reactivo-Analítico	Líquido	Polvo	0.63
Sal de Rochelle	Reactivo-Analítico	Sólido	Cristales	18.2
Fenol	Reactivo-Analítico	Líquido	Líquida	0.5
Bisulfito de sodio	Reactivo-Analítico	Sólido	Polvo	0.5
Hidróxido de sodio	Reactivo-Analítico	Sólido	Gránulos	2.14

Fuente: MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. 1959. Vol 31. No 3. 427 p.

2.1.2 Equipos. Los equipos con los que cuenta el Laboratorio de Microbiología de la Fundación de Asesorías para el Sector Rural- FUNDASES y que fueron utilizados en la fase pre experimental y experimental de esta investigación se muestran en el

⁵⁴ FAJARDO CASTILLO Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO Sandra Constanza. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. 2007. P 47

Anexo C su fotografía real. A continuación, una breve descripción en el cuadro 9 de cada uno de los equipos y su función proporcionada en cada instancia de la experimentación.

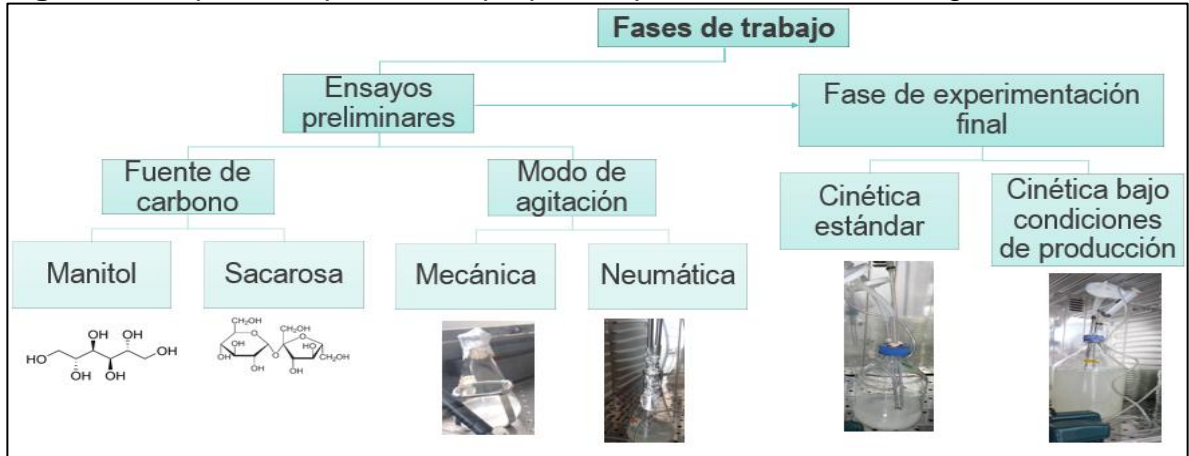
Cuadro 9. Equipos empleados en la fase pre experimental y experimental.

EQUIPOS	MARCA	FUNCIÓN EN LA INVESTIGACION
Autoclave	Sterilof ®	Esterilización de material limpio como materiales, elementos de vidrio, medios de cultivo a 121°C, 15 PSI por 15 min. También esteriliza medios residuales, de descarte, a 121°C, 15 PSI por 30 min.
Balanza analítica	Sartorius ®	Peso de reactivos.
Bombas neumáticas	Resun	Alimento de aire durante las fermentaciones
Cabina de flujo laminar	Telstar ®	Proporcionar un ambiente estéril para siembras en superficie, trabajos microbiológicos en cabina
Centrifuga	Boeco ® C 28 A	Centrifugación de muestras de fermentación, uso del sobrenadante para cuantificación de sustrato
Espectrofotómetro	Spectroquant ® Pharo 300	Lectura de absorbancias en el protocolo DNS
Incubadora	Memert ®	Proporciona estabilidad de la temperatura de caldos de cultivo y placas de agar Ashby inoculadas.
Microscopio	Olympus ® CX 21	Usado a 100 x para determinación de morfología microscópica tras tinción de Gram
Plancha de calentamiento	Thermolyne ®	Calentamiento y agitación para la preparación de medios de cultivo
Potenciómetro	SI Analíticos ®	Medición de pH de las muestras tomadas de los fermentadores
Refrigerador	Supernordico ®	Almacenamiento de muestras, reactivos, sustancias de investigación a -4°C
Shaker	Thz	Agitación y control de temperatura para las primeras pruebas experimentales
Ultracongelador	Biobase ®	Almacenamiento de muestras para posterior análisis a -40°C
Vortex	Maximix II Thermolync ®	Mezclado para diluciones de las muestras en tubos de ensayo de 14 mm.

Fuente: elaboración propia.

2.1.3 Métodos. A continuación, se describe cada uno de los procesos que fueron llevados a cabo durante la fase de experimentación del proyecto. con el fin de dar cumplimiento a los objetivos propuestos. Para el desarrollo experimental, se planteó el siguiente esquema de trabajo experimental, manifestado en la figura 8.

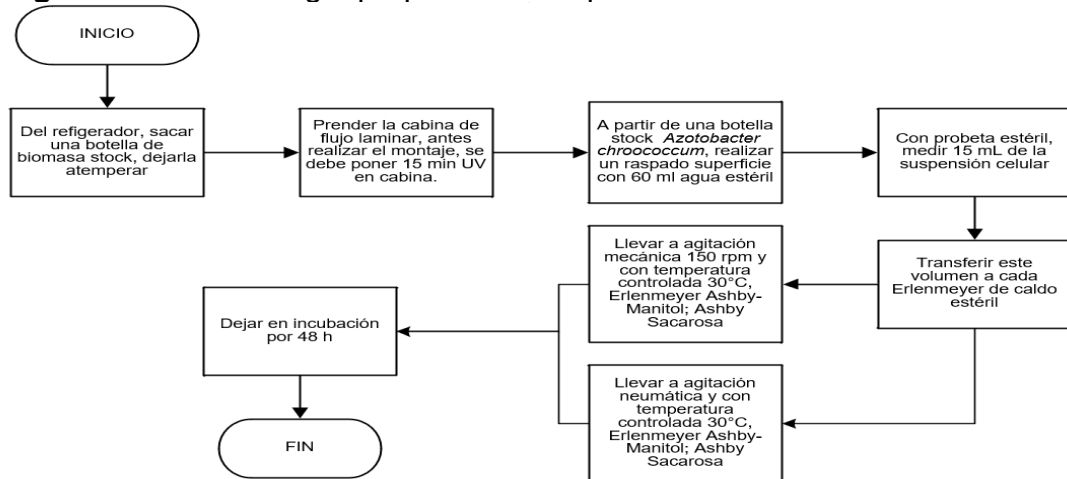
Figura 8. Esquema experimental propuesto para desarrollo investigativo



Fuente: elaboración propia

2.1.3.1 Preparación del preinóculo. La técnica de la preparación del preinóculo, fue proporcionada por el laboratorio de microbiología de FUNDASES, descrita en el diagrama 1.

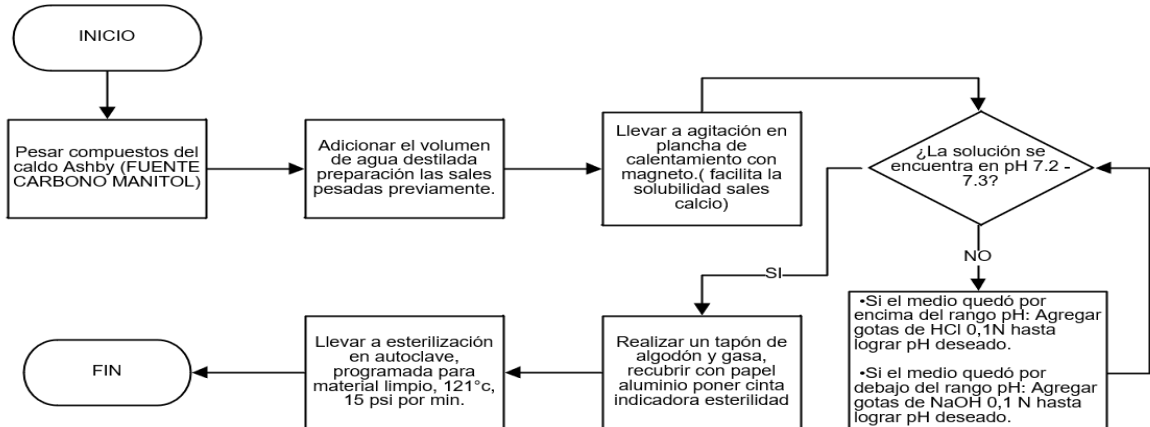
Diagrama 1. Metodología preparación del preinóculo



Fuente: elaboración propia, basada en información proporcionada por FUNDASES

2.1.3.2 Preparación de caldos de cultivo. Los caldos de cultivo se prepararon siguiendo la información expresada por fundases, tal como lo describe en el diagrama 2.

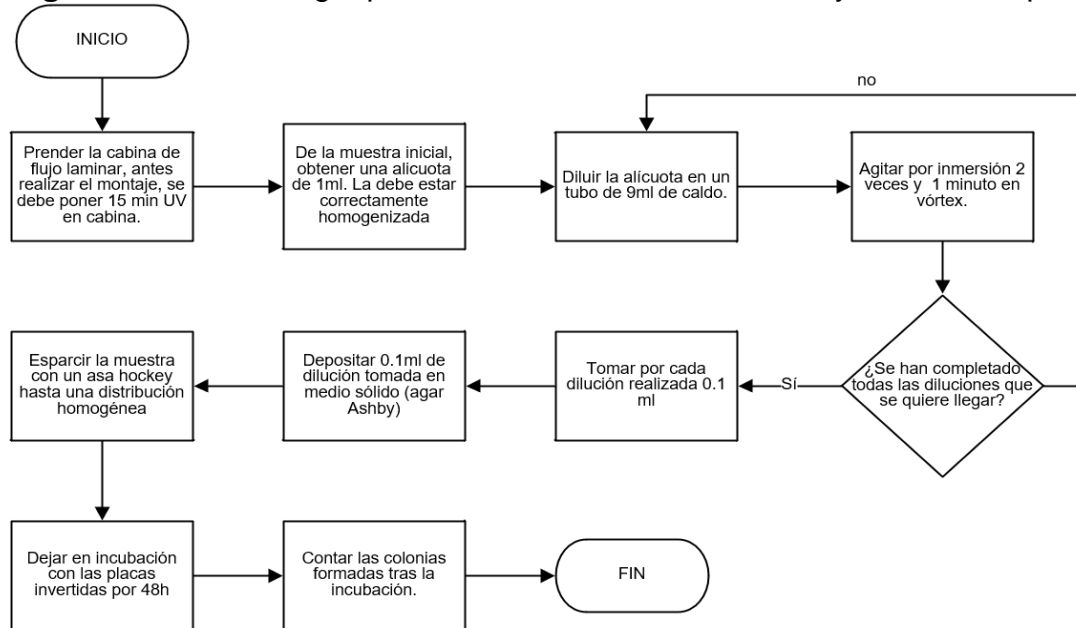
Diagrama 2. Metodología para preparación de caldos de cultivo



Fuente: elaboración propia, basada en información proporcionada por FUNDASES

2.1.3.3 Diluciones seriadas y cuantificación de biomasa por recuento en placas. Las diluciones fueron realizadas siguiendo la el protocolo proporcionado por fundases, tal como lo representa en el diagrama 3.

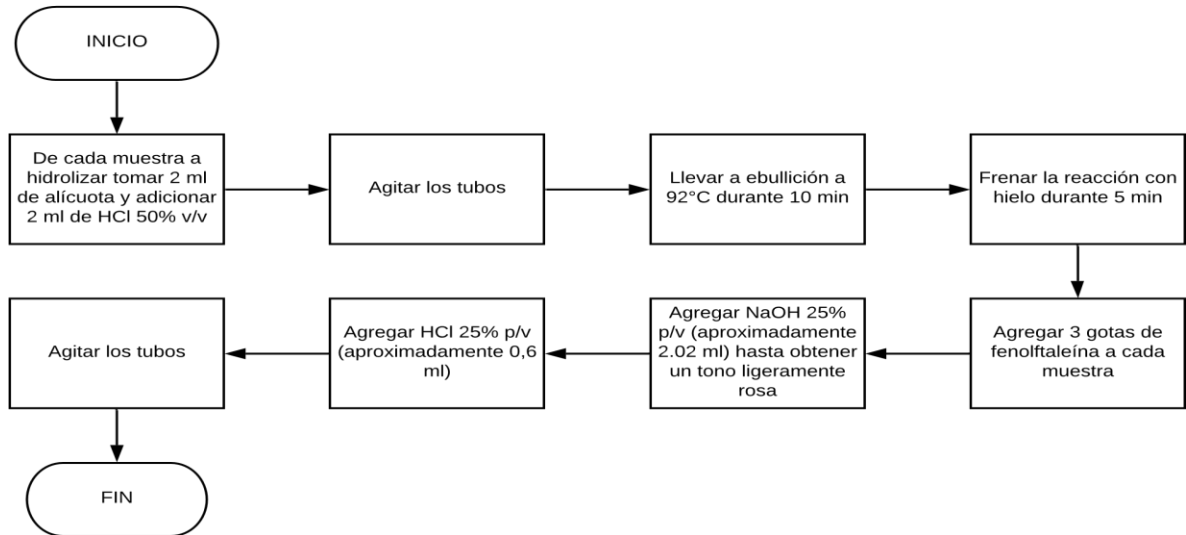
Diagrama 3. Metodología para realizar diluciones seriadas y siembra en placa



Fuente: elaboración propia, basada en información proporcionada por FUNDASES.

2.1.3.4 Cuantificación de sacarosa mediante la hidrólisis ácida. Para llevar a cabo la cuantificación de la sacarosa residual de las muestras, se debe realizar la metodología explicada en la figura 12 y continua a esta, realizar la técnica colorimetría DNS como lo explica el diagrama 4.

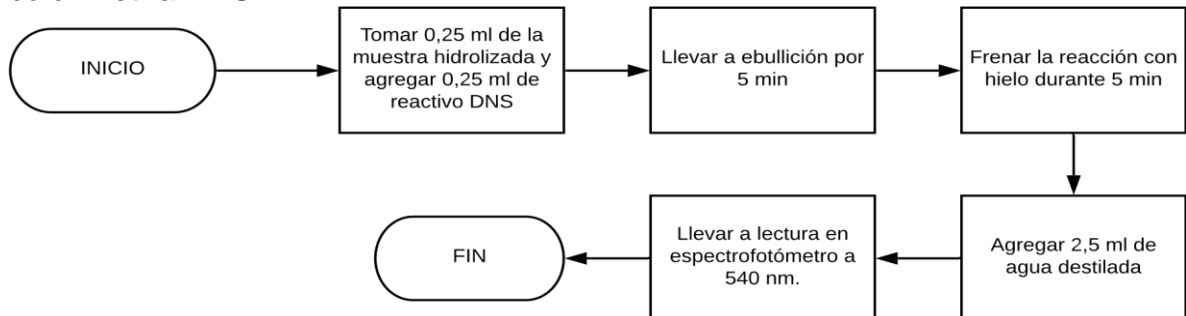
Diagrama 4. Metodología para realizar hidrólisis ácida para sacarosa residual del caldo de fermentación



Fuente: elaboración propia basada en protocolo de FAJARDO CASTILLO Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO Sandra Constanza. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. 2007 p. 111-112.

2.1.3.5 Técnica colorimétrica DNS.

Diagrama 5. Metodología para realizar la cuantificación de sacarosa por colorimetría DNS

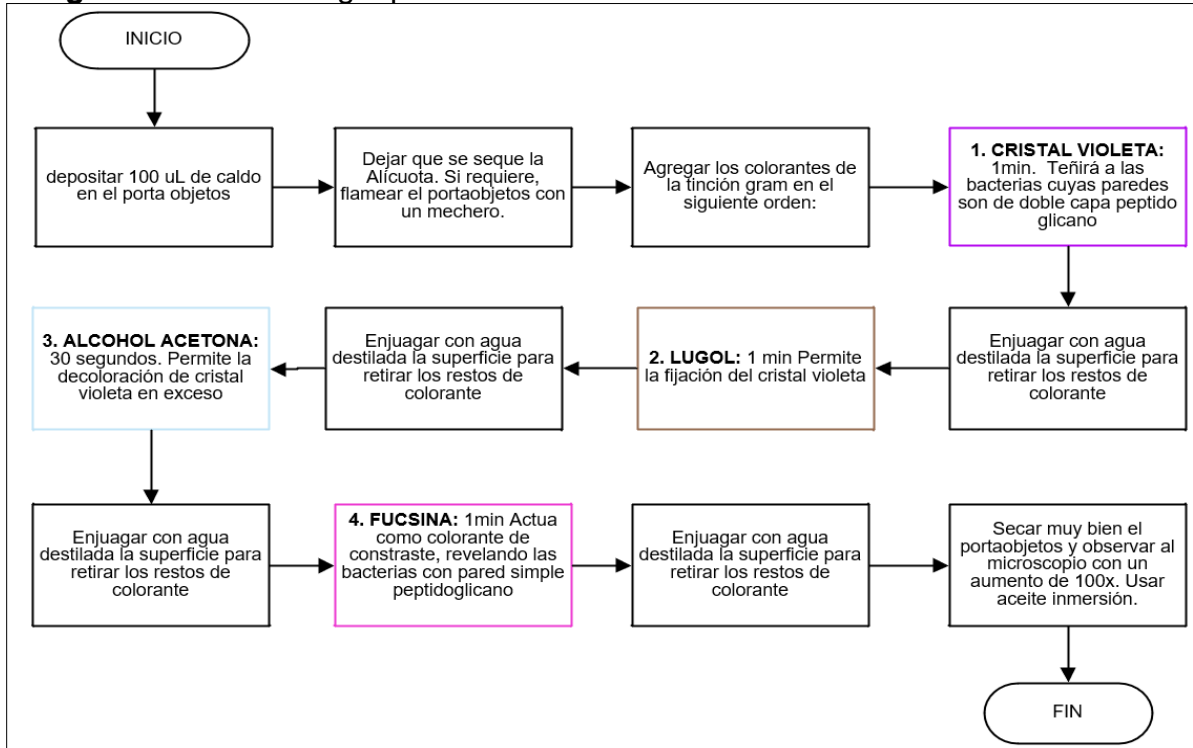


Fuente: elaboración propia basada en información de GODOY R. Método DNS para la determinación de azúcares reductores totales en melaza, sustrato de fermentación y vinos. Universidad Nacional de Colombia 2002. p. 1-3. Citado por FAJARDO CASTILLO Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO Sandra Constanza. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. 2007 p. 111-112.

2.1.3.6 Identificación microscópica. Para llevar el seguimiento del cambio de la morfología de la cepa a través de toda la experimentación, se deben realizar

tinciones de Gram, una técnica desarrollada por GRAM, Christian ⁵⁵ en 1884, a continuación, la metodología de las tinciones de Gram, representado en el diagrama 6.

Diagrama 6. Metodología para tinción de Gram

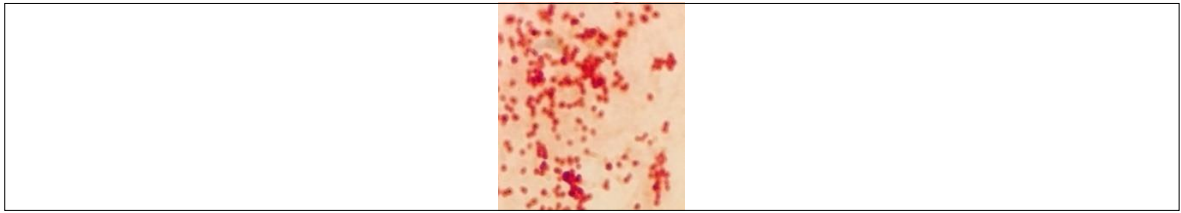


Fuente: elaboración propia, basada en información proporcionada por FUNDASES

La bacteria tras la coloración de Gram, se torna de color fucsia, lo que representa una bacteria Gram negativa, de forma cocobacilos, levaduriformes. En la mayoría de observaciones en el microscopio, como lo demuestra la figura 9, se encuentra que *Azotobacter chroococcum* es una bacteria que forma duplas o en aglomeraciones de más de 4 bacterias.

⁵⁵ GRAM, Christian. The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. Fortschritte der Medizin. 1884. 2, p. 185-9.

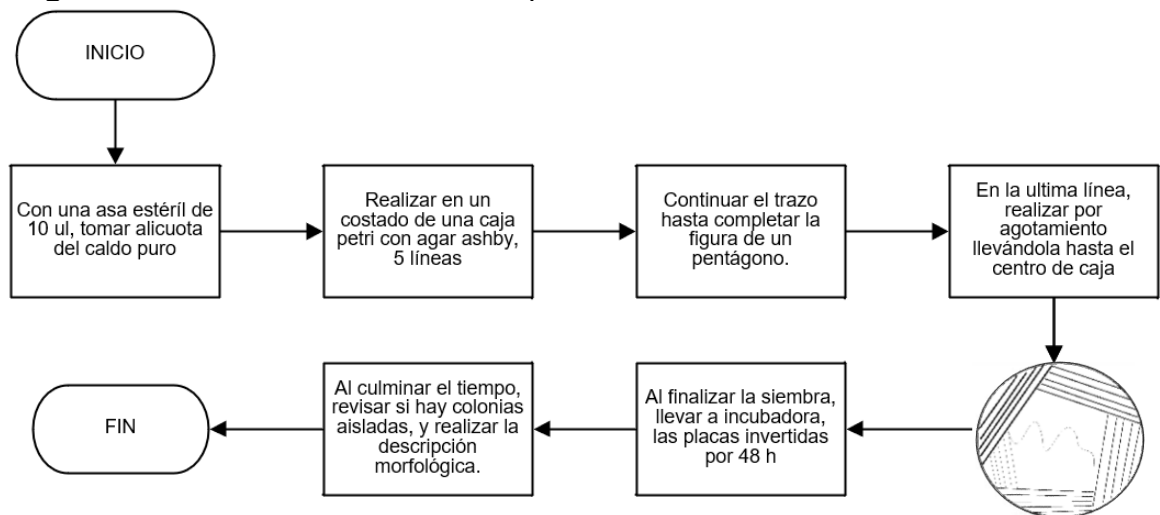
Figura 9. Tinción de Gram de *Azotobacter chroococcum* correspondiente a un cultivo joven, proveniente de una cepa de segunda generación



Fuente: elaboración propia

2.1.3.7 Identificación macroscópica. Para la identificación macroscópica, se realizan técnicas de aislamiento de colonias de un cultivo puro, el procedimiento del aislamiento se especifica en el diagrama 7.

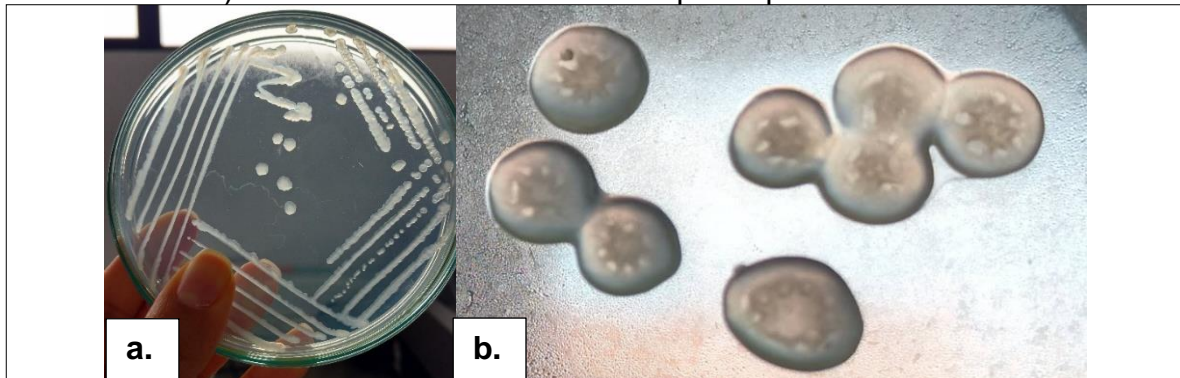
Diagrama 7. Aislamiento de colonias por siembra francesa



Fuente: elaboración propia, basada en información proporcionada por FUNDASES

Las colonias características formadas por *Azotobacter chroococcum* en agar Ashby son de color traslúcido, y en el centro de la colonia, algunas alcanzan a formar una especie de estrella en el centro de color un poco más oscuro, típico de la colonia. Tienen elevación convexa, de borde entero en colonias jóvenes y se torna ondulado a medida de la maduración de la colonia (Posterior a 72 h en incubación o a temperatura ambiente), de forma es circular y textura cremosa.

Figura 10. a) Técnica aislamiento francés para aislar una colonia *Azotobacter chroococcum* b). Colonias de 48h tras siembra por superficie



Fuente: elaboración propia.

2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.2.1 Identificación de variables. Las principales variables que se tuvieron en cuenta para un crecimiento adecuado del microorganismo fueron pH, temperatura y modo de agitación, dado que son variables que inciden directamente en el crecimiento, adaptación y muerte del microorganismo. THOMPSON Y SKERMAN⁵⁶ demostraron que *Azotobacter chroococcum* tienen un rango de crecimiento de pH entre 6.5 – 10.

Tabla 7. Condiciones de operación para la propagación de biomasa *Azotobacter chroococcum*.

Variables	Rango de medida	Autores
pH	6-10	THOMPSON Y SKERMAN; BORDA MOLINA et al.; FUNDASES.
Temperatura	30°C +-2	OROS, Damir; CAMELO-RUSINQUE, Mauricio, et al, BORDA MOLINA et al
Modo de agitación	Mecánica:150 - 180 rpm Neumática: p30%	OROS, Damir. DALTON H, POSTGATE JR ⁵⁷ ; OROS, Damir.

Fuente: elaboración propia

2.2.2 Ensayos preliminares. Durante la fase de ensayos preliminares, solo se tuvieron en cuenta los factores evaluados como fuente de carbono y el modo de agitación. La variable temperatura se mantuvo definida a 30°C. La única variable de respuesta del experimento corresponde a las unidades formadoras de colonia (UFC/ml) obtenida en cada unidad experimental después de 48 h fueron

⁵⁶ THOMPSON JP y SKERMAN VBD. Azotobacteraceae: the Taxonomy and Ecology of the Aerobic Nitrogen-Fixing Bacteria. 1979. Academic Press London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco.

⁵⁷ DALTON H, POSTGATE JR. Op Cit p 465.

consideradas variables de respuesta. De manera resumida, se presenta el siguiente diagrama

Diagrama 8. Representación de las variables de entrada y salida del sistema.



Fuente: elaboración propia

2.2.2.1 Evaluación de formación de biomasa. Se tomó la cepa *Azotobacter chroococcum* almacenada en una botella usada para procesos de producción industrial a temperatura ambiente (Protocolo FUNDASES), se realizó un barrido de la superficie del medio de cultivo presente de este, con 120 ml de agua estéril, se homogenizo y se aseguró de obtener la mayor área de biomasa raspada con asa estéril, y con una probeta estéril, se transfirieron 20 ml de este preinóculo a los 6 Erlenmeyer previamente preparados y esterilizados, para completar un volumen efectivo de 200 ml. Posteriormente, se repitió el mismo procedimiento de inoculación para las unidades experimentales que conllevaban sistema de agitación neumática.

Las unidades experimentales sometidas a sistema de agitación mecánica, fueron recubiertos con un tapón de tela, a una velocidad de 150 rpm y los que fueron sometidos a agitación neumática se le acopló un soporte siliconado y debidamente cubierto con papel aluminio, para evitar cualquier posible entrada de agentes contaminantes al medio de estudio, el flujo de aire se realizó con bombas neumáticas con una tasa de entrada de aire de 1 vvm.

Únicamente se realizó el conteo de la biomasa y la toma del pH previo y posterior a la fermentación transcurridas las 48h.

El ensayo se realizó por triplicado. En el primer punto de muestreo (hora 0) se tiene una concentración de biomasa aproximada de $2.34 \cdot 10^7$ y $4.62 \cdot 10^8$ UFC/ml.

2.2.2.2 Determinación de biomasa. La cuantificación de biomasa se hizo por medio de recuento en placa por superficie, las diluciones decimales se efectuaron desde la dilución 10^{-1} hasta 10^{-8} . Para el conteo del número de colonias, correspondientes a cada dilución, se depositó en la superficie del agar Ashby 100 μ l de la suspensión celular a medir y con un rastrillo microbiológico se esparció por toda la superficie de una manera homogénea.

2.2.3 Cinética estándar. Al realizar el respectivo barrido de la superficie de la botella con 60 ml de agua estéril, se inoculo el caldo Ashby-sacarosa con la concentración bacteriana del 10% en volumen, método propuesto por CRUEGER &

CRUEGER⁵⁸ el cual afirma que el porcentaje del inóculo se debe ajustar al 10% v/v, para iniciar la fermentación.

Se instalaron las piezas esterilizadas para proporcionar suministro de aire, toma de muestra y salida de gases. Se llevó a incubación por 48 h tomando a cada 4 h alícuotas para toma de muestra.

Para esta fermentación el pH fue controlado en un rango de 6-7.5 con una solución de NaOH 0.1 N y la temperatura fue establecida de 30°C +- 0.1°C. La selección de fuente de carbono y el control de pH fue según los resultados de las pruebas preliminares. Según CAMELO-RUSINQUE⁵⁹ et al, y PEÑA, C.,⁶⁰ et al, informan que la aireación necesaria para asegurar la propagación de biomasa del género *Azotobacter* en sistemas de aireación es de 0.8 -1 vvm. Se aseguró que la entrada de aire al sistema fuera de este rango, calculados por la técnica de vvm (volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto)

Para determinar la cantidad de microorganismos viables se realizó un recuento en placa de superficie mencionada en el numeral 2.1.3.3. A su vez, se realizó el protocolo de cuantificación de azúcares reductores mediante el protocolo de DNS, mencionada en el anexo E.

Para realizar el cálculo de los vvm que se necesitaban, se realizó una prueba con un recipiente vacío de volumen 0.24L, donde este se sumergió en un recipiente con agua, por completo ocupando todo su volumen, y posteriormente, se sumergió la extensión de la manguera de la bomba neumática, mientras se suministraba aire al recipiente de 0.24L, simultáneamente, se registró el tiempo con un cronómetro, dando como respuesta lo siguiente:

Volumen del recipiente (Va): 0.24L

Tiempo en llenarse (t): 60.143 s

Teniendo los valores del volumen del recipiente y del tiempo, mediante la ecuación 7, se determinó el caudal del aire de salida de la bomba neumática.

⁵⁸ CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. 3ª ed. Madrid: Acribia, 1993.

⁵⁹ CAMELO-RUSINQUE, Mauricio, et al. Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. 2015. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA, Laboratorio de microbiología de suelos, Mosquera, Cundinamarca. Rev Argent Microbiol. 2017; 49(3): pp 289-296.

⁶⁰ PEÑA, C., et al. Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* in a stirred fermentor simulating the evolution of power input observed in shake flasks. 2008. Process Biochemistry, 43(7), pp 775–778.

Ecuación 7. Determinación del caudal

$$\text{Caudal } (Q) = \frac{Va}{t} = \frac{0.24L}{60.143 \text{ s} * \frac{1\text{min}}{60\text{s}}} = 0.2394 \frac{L}{\text{min}}$$

Fuente: CABRERA, Ricardo. Fluidos, hidrodinámica - caudal - principio de continuidad. [Consultado: 24 octubre 2019]. Página web. Disponible en: [https://ricuti.com.ar/no_me_salen/hidrodinamica/FT_caudal.html]

Donde:

Va : Volumen del recipiente

t : Tiempo

Ecuación 8. Cálculo de vvm

$$vvm = \frac{Q}{Vd}$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. p 291.

Donde:

Vd : Volumen desplazado

Q : Caudal

Por lo tanto:

$$vvm = \frac{0.2394 \frac{L}{\text{min}}}{0.24L}$$

$$vvm = 0.997 \text{ min}^{-1}$$

2.2.1 Cinética a condiciones de producción. Se realizó el barrido de la superficie de la botella con 100 ml de agua estéril, se inoculo del 10% V/V, completando un volumen total de 1000 ml metodología de CRUEGER & CRUEGER⁶¹. Se dejó en incubación y con aireación constante por 20 h, dado que, según los resultados de la cinética estándar, en esta hora, finaliza la fase exponencial. Transcurridas 24 h, del inoculo producido, se midió 500 ml para el primer bidón de 4500 ml de medio industrial. Completando un volumen total de 5000 ml. Se realizó por duplicado.

Se instalaron las piezas esterilizadas para proporcionar suministro de aire, toma de muestra y salida de gases. Se llevó a incubación por 48 h tomando a cada 4 h alícuotas para toma de muestra. Para esta fermentación el pH no fue controlado dado que se adaptaron las medidas de producción de la empresa. La temperatura fue establecida de 30°C +- 0.1°C. La fuente de carbono del medio industrial es únicamente manitol. El suministro de aireación fue como lo descrito en el numeral

⁶¹ Crueger, W.; Crueger, Op cit 54

En cada toma de muestra, se tomaron 14 ml de alícuota, a partir de este volumen se realizaron la cuantificación de microorganismos viables por recuento en placa de superficie mencionada en el numeral 2.1.3.3.; se tomó el valor del pH con un potenciómetro verificado anteriormente con las soluciones bufferadas de este, se calculó la densidad de cada muestra por picnometría.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestran los resultados de las pruebas preliminares de donde se seleccionó la fuente de carbono que más favorecía al crecimiento de biomasa para continuar a la experimentación.

2.3.1 Ensayos preliminares. Para determinar la fuente de carbono que más favorece la producción de biomasa para *Azotobacter chroococcum*. Se tuvo en cuenta la cantidad de biomasa producida en cada una de las diferentes fermentaciones realizadas, mostradas con un promedio en la tabla 8. El experimento se realizó por triplicado. Los resultados completos se encuentran en el Anexo F.

La agitación mecánica fue a 150 rpm y la agitación neumática fue de 1 vvm.

Tabla 8. Resultado promedio de los experimentos

No.	MEDIO	Concentración t=0h UFC/ml	Concentración t=48h UFC/ml	pH inicial	pH final	Variación de pH
1	Caldo Ashby-Manitol agitación mecánica	2.34E+07	3.51E+07	7.24	6.058	1.182
2	Caldo Ashby-Manitol agitación neumática	4.62E+08	3.49E+08	7.24	6.013	1.204
3	Caldo Ashby-Sacarosa agitación mecánica	2.34E+07	2.23E+07	7.36	6.036	1.617
4	Caldo Ashby-Sacarosa agitación neumática	4.62E+08	3.98E+08	7.36	5.544	2.086

Fuente: elaboración propia.

Los resultados obtenidos a través de las fermentaciones realizadas muestran que los medios con fuente de carbono de sacarosa son los que más predominan para la producción de biomasa.

Como lo muestra la tabla 17, todos los experimentos cumplieron con el valor mínimo requerido por la norma NTC 5842:2018, dado que según la norma se debe asegurar para microorganismos asimbióticos fijadores de nitrógeno un mínimo de biomasa de 1×10^4 UFC/ml, todos se encuentran dentro de la especificación de la norma.

También se evidencia que la actividad metabólica de la cepa, tiende a reducir el pH del medio, con lo que se puede apreciar en la tabla 8, el delta de pH mayor obtenido fue por Caldo Ashby sacarosa con agitación neumática. Independiente a este

conjunto de unidades experimentales, se puede observar que hay una disminución de pH mucho mayor entre las unidades experimentales de sacarosa ante las de manitol, sobre todo en las unidades que fueron sometidas a agitación neumática. La figura 11, es una fotografía de las unidades experimentales utilizadas.

Figura 11. Unidades experimentales, las unidades de la izquierda son las unidades sometidas a agitación mecánica. Las unidades de la derecha son las unidades sometidas a agitación neumática.

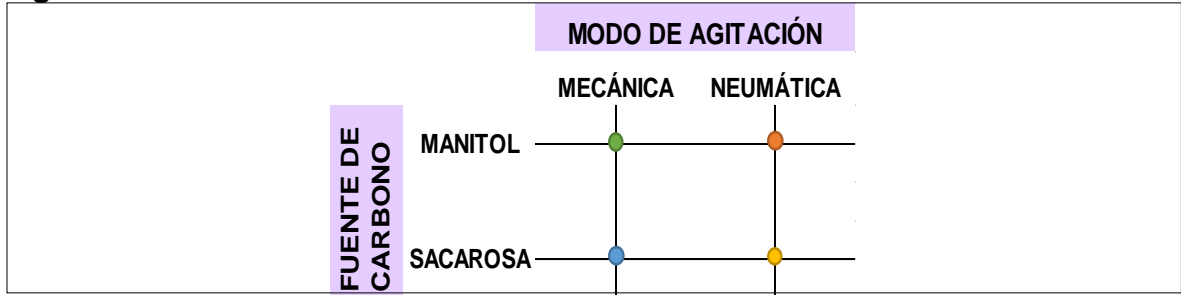


Fuente: elaboración propia.

Para el análisis de los resultados, se planteó un Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo, basado en que es una situación donde se requiere estudiar el efecto de dos factores, como lo expresado en la figura 12, el Factor A (filas), como fuente de carbono y Factor B (columnas), como modo de agitación, dando una respuesta en UFC/ml, de manera experimental, donde se determina no solo si cada uno de los dos factores influye en la producción de biomasa, sino también si hay una interacción significativa entre ellos. Se realizó mediante el complemento de Microsoft Excel ®⁶², donde inicialmente se plantean las siguientes interacciones entre los factores Fuente de carbono y Modo de agitación.

⁶² MICROSOFT. Usar las Herramientas para análisis para realizar análisis de datos complejos [En línea]. 2019. [Consultado: 14 septiembre 2019]. Disponible en: <https://support.office.com/es-es/article/usar-las-herramientas-para-an%C3%A1lisis-para-realizar-an%C3%A1lisis-de-datos-complejos-6c67ccf0-f4a9-487c-8dec-bdb5a2cefab6>

Figura 12. Interacciones entre factores



Fuente: elaboración propia

El resumen de los resultados se puede apreciar en el cuadro 10, donde el total de las observaciones o resultados experimentales fueron 12 en total, los cuales tienen unidades de UFC/ml.

Cuadro 10. Resultados de las unidades experimentales

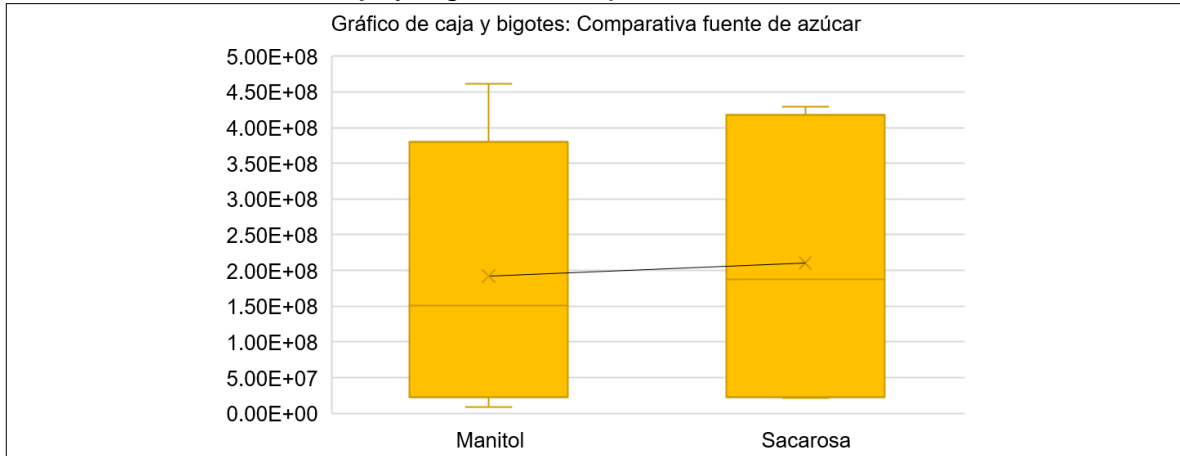
		MODO DE AGITACIÓN	
		Mecánica	Neumática
FUENTE DE CARBONO	Manitol	2.73E+07	4.61E+08
		6.89E+07	3.53E+08
		9.01E+06	2.32E+08
	Sacarosa	2.12E+07	3.51E+08
		2.24E+07	4.14E+08
		2.33E+07	4.30E+08

Fuente: elaboración propia.

Para dar un primer acercamiento de los datos obtenidos de manera experimental, se realizó un Gráfico de caja y bigotes donde se realizaron comparativas entre la fuente de carbono y el modo de agitación.

Como se ve en la gráfica 1, se presume que tiene un mejor rendimiento de producción de biomasa con fuente de carbono sacarosa, pero no es tan diferente como lo es con respecto a los resultados de manitol. Sin embargo, es un primer acercamiento para la interpretación de los resultados obtenidos experimentalmente.

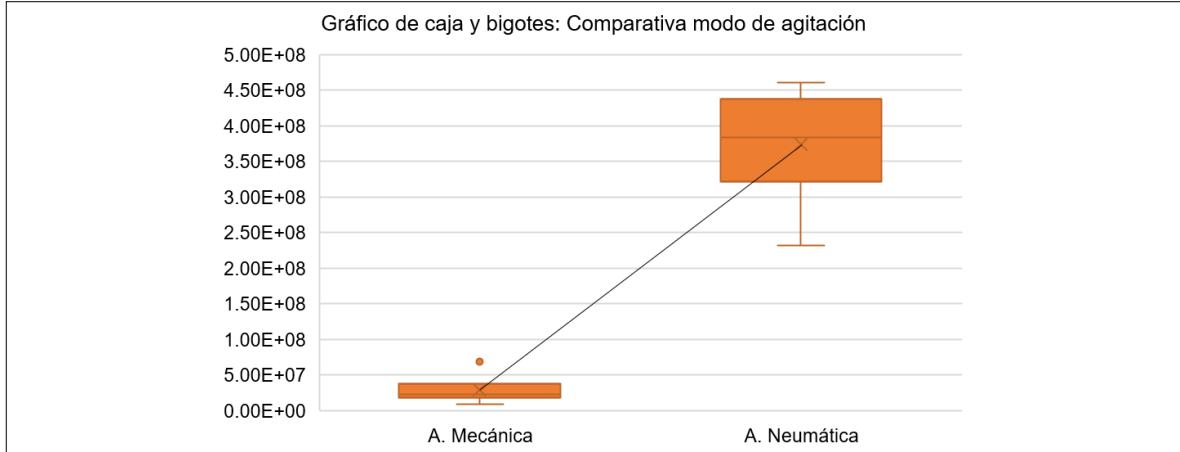
Gráfica 1. Gráfico de caja y bigotes: Comparativa fuente de azúcar.



Fuente: elaboración propia

Como se ve en la gráfica 2, un diagrama de cajas y bigotes, presume que hay un mayor efecto de la agitación neumática en comparación a la agitación mecánica para obtener un mejor rendimiento de producción de biomasa y con lo demostrado en los datos experimentales, la producción por agitación neumática es superior a comparación de la agitación mecánica.

Gráfica 2. Gráfico de caja y bigotes: Comparativa modo de agitación.



Fuente: elaboración propia

Por lo tanto, se requiere plantear un modelo estadístico ANOVA de dos factores, bajo las siguientes hipótesis:

FACTOR FUENTE DE CARBONO

H_0 : Hipótesis nula, no existe diferencia significativa en la producción de biomasa por efecto de la fuente de carbono

H₁: Hipótesis alterna, existe diferencias significativas en la producción de biomasa dependiendo de la fuente de carbono

FACTOR MODO DE AGITACIÓN

H₀: Hipótesis nula, no existe diferencia significativa en la producción de biomasa por efecto del modo de agitación

H₁: Hipótesis alterna, existen diferencias significativas en la producción de biomasa dependiendo del modo de agitación

INTERACCION ENTRE FACTORES (FUENTE DE CARBONO-MODO AGITACION)

H₀: Hipótesis nula, no existe diferencia significativa en la producción de biomasa por efecto de la interacción de los factores

H₁: Hipótesis alterna, existen diferencias significativas en la producción de biomasa por efecto de la interacción de los factores

Esta prueba estadística fue aplicada para los datos obtenidos en las unidades experimentales mediante Excel en el menú Análisis de datos y tomando un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 9. Resumen de los datos obtenidos a partir de los cálculos realizados por el complemento Excel:

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados (SC)</i>	<i>Grados de libertad (gl)</i>	<i>Promedio de los cuadrados (CM)</i>	<i>F</i>	<i>Valor para F crítico $\alpha:0.05$</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Conclusión</i>
Factor A (Fuente de C)	1.012E+15	1	1.012E+15	0.257	5.318	0.626	No rechaza H ₀
Factor B (Modo de agitación)	3.571E+17	1	3.571E+17	90.5	5.318	1.23E-05	Rechaza H ₀
Interacción (AB)	2.913E+15	1	2.913E+15	0.739	5.318	0.415	No rechaza H ₀
Error	3.153E+16	8	3.942E+15				
Total	3.925E+17	11					

Fuente: elaboración propia.

Para mayor información de datos, revisar el anexo G. Resultados de modelo estadístico ANOVA dos factores.

Según el análisis ANOVA con un 95% de confianza se concluye que para el factor A, la fuente de carbono no tiene un efecto significativo en la producción de biomasa,

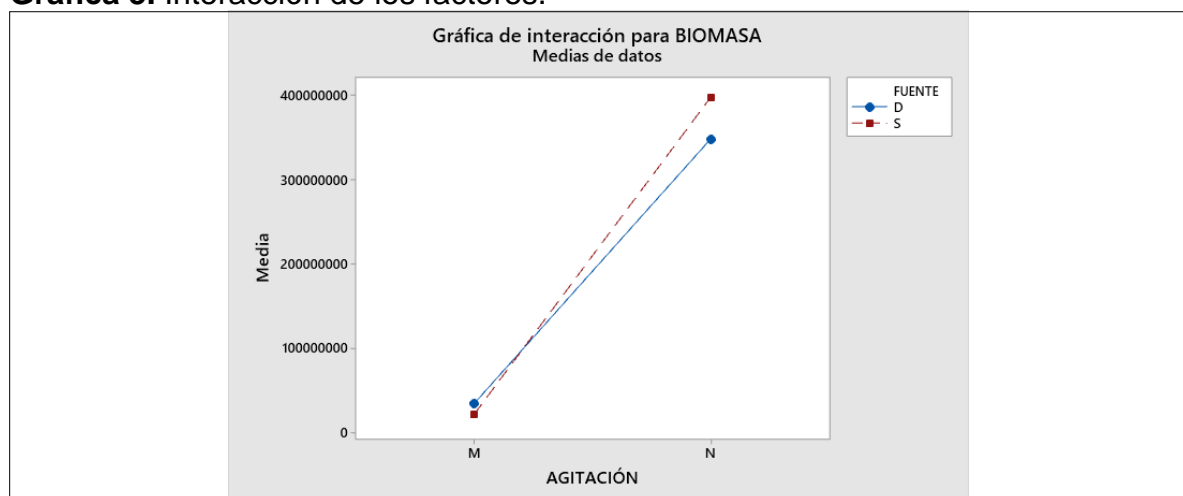
lo que indica que dentro del diseño realizado independiente de que se utilice sacarosa o manitol no se identifica diferencia en la producción de biomasa

Con respecto al factor B, Modo de agitación, con el análisis ANOVA con un 95% de confianza se concluye que la agitación tiene un efecto significativo en la producción de biomasa, lo que indica que, dentro del diseño realizado, prevalece la producción de biomasa mediante la agitación neumática sobre la mecánica, dado que *Azotobacter chroococcum* es una bacteria aeróbica y necesita constantemente una fuente de oxígeno, por lo tanto se puede analizar que la disponibilidad de oxígeno en los sistemas mecánicos no es la mejor a comparación de la constante disponibilidad de oxígeno que proporcionan los sistemas neumáticos. Adicional a esto, la solubilidad del oxígeno está ligada a la forma en la que se agregue en el sistema, por esta razón es necesario contar con suministro constante de oxígeno para evitar un gran tamaño de burbuja y facilitar la transferencia de masa de O₂ en la interfaz gas-liquido.

Y finalmente para la interacción de los factores A y B, mediante el análisis ANOVA con un 95% de confianza se concluye que no se obtiene una diferencia significativamente estadística para la interacción de los Factores A y B, es decir, acepta la hipótesis nula, dado que ambos factores como fuente de carbono y modo de agitación en conjunto, no están afectando de manera significativamente estadística la producción de biomasa en 48 h.

Se realizó un análisis gráfico final de interacción entre los factores, denotando que el tratamiento con mejor respuesta para producción de biomasa está constituido por el sistema que utiliza como fuente de carbono sacarosa y mecanismo de agitación neumática, demostrado en la gráfica 3.

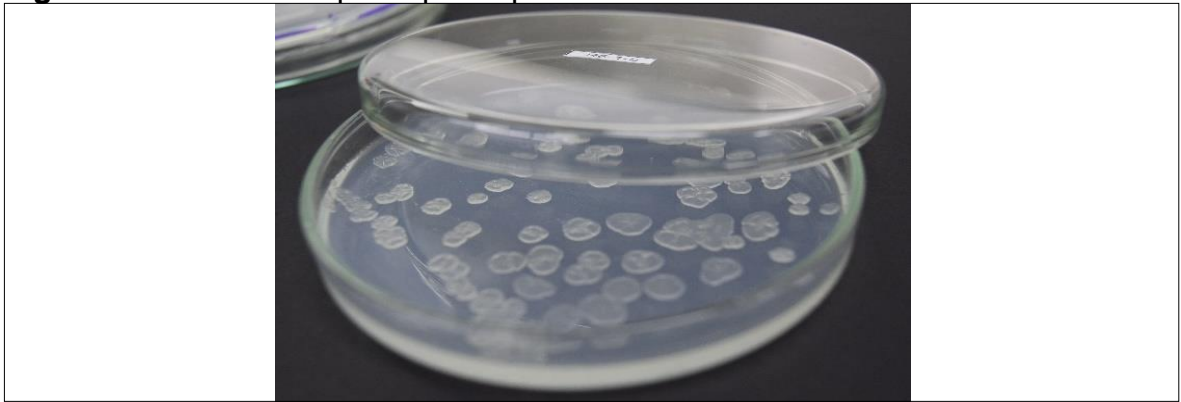
Gráfica 3. Interacción de los factores.



Fuente: elaboración propia, mediante el uso del software Minitab ®. Licencia gratis meses entre septiembre y octubre 2019.

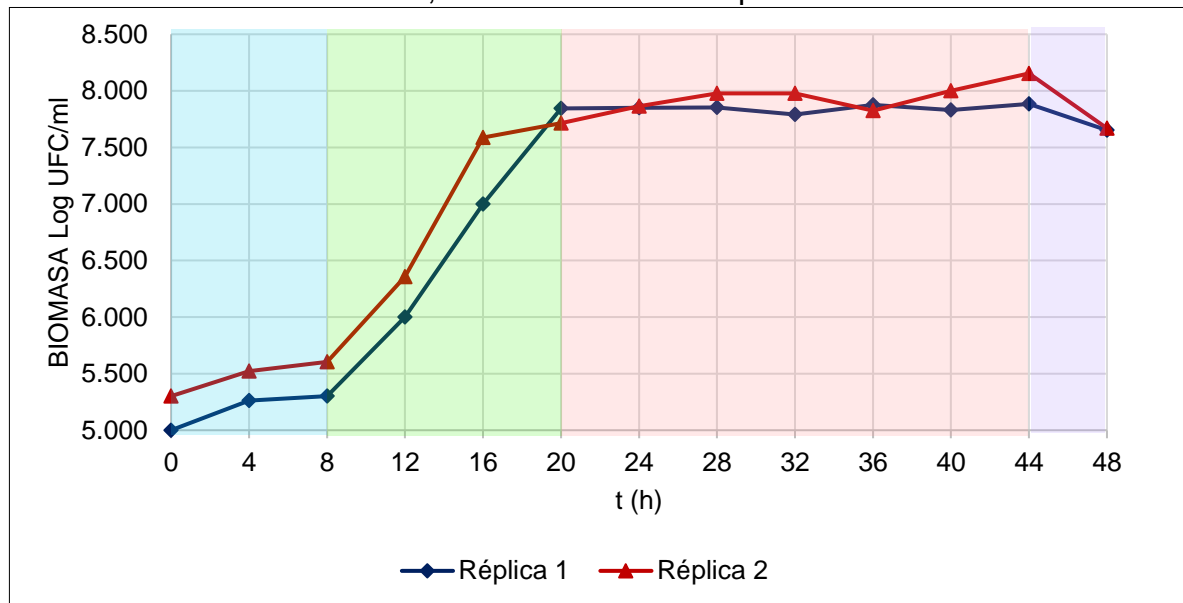
2.3.2 Cinética microbiana estándar. La cinética estándar, se tomó como una referencia para el reconocimiento de las fases de crecimiento para *Azotobacter chroococcum*. En el anexo H están los datos crudos obtenidos durante las fermentaciones de las dos réplicas. La cuantificación celular se realizó mediante la técnica de siembra en placa según el numeral 2.1.3.3, como lo visto en la figura 13, únicamente se deben identificar las colonias características de *Azotobacter chroococcum*. Según los conteos realizados, se realizó la curva de crecimiento de *Azotobacter chroococcum*, como se puede manifestar en la gráfica 4.

Figura 13. Siembra en placa por superficie de *Azotobacter chroococcum*.



Fuente: elaboración propia

Gráfica 4. Curva de crecimiento de *Azotobacter chroococcum* en caldo Ashby-sacarosa a escala laboratorio, con dos unidades experimentales.



Fuente: elaboración propia

Las fases que se identifican en el crecimiento microbiano para las dos réplicas representados con sombreado de color corresponden a:

Sector azul como fase de adaptación, tanto para la réplica 1 y 2, la cual parte desde la hora 0 con una concentración celular de $1 \cdot 10^5$ UFC/ml y $2 \cdot 10^5$ UFC/ml respectivamente y finaliza con una concentración celular a las 8 horas de $2 \cdot 10^5$ UFC/ml y $4 \cdot 10^5$ UFC/ml respectivamente. En esta fase, las células se adaptan al nuevo ambiente fisicoquímico ofrecido por el caldo Ashby-sacarosa. Gráficamente y cuantitativamente hay muy poco crecimiento de la cepa, sin cambios exponenciales en las cantidades de biomasa. En el transcurso de la hora 8 se encuentra en la fase de crecimiento acelerado, donde la velocidad aumenta desde cero hasta un valor máximo.⁶³

Sector verde como fase exponencial, donde las células se reproducen sin limitaciones nutricionales a una velocidad máxima de crecimiento, esta fase inicia en la hora 8 con una concentración celular de $2 \cdot 10^5$ UFC/ml y $4 \cdot 10^5$ UFC/ml respectivamente y para ambas réplicas, finaliza en la hora 20, con una concentración celular de $7 \cdot 10^7$ UFC/ml y $5 \cdot 10^7$ UFC/ml. Para procesos de propagación microbiana, es una de las fases más importantes porque es donde se obtiene el mayor crecimiento y por lo tanto mayor producción de biomasa.

Sector rosa como fase estacionaria, inicia a partir de la hora 20 y finaliza en la hora 44 para ambas réplicas con una concentración celular promedio de $6.9 \cdot 10^7$ UFC/ml y $8.9 \cdot 10^7$ UFC/ml, respectivamente, según la gráfica 1 se puede ver que para la réplica 1, se mantiene constante durante la propagación de biomasa, pero para la réplica 2, se manifiesta una deflexión en las concentraciones celulares a partir de la hora 32 a la hora 36, dada por posiblemente al agotamiento nutricional de la fuente de carbono principal, pero a partir de la hora 36 retoma la concentración celular que llevaba anteriormente, y hasta manifestarla en la hora 44 de una concentración de $1.4 \cdot 10^8$ UFC/ml. Este aumento se podría deber a que la bacteria realizó un crecimiento diaúxico⁶⁴, como tomar otro nutriente del medio para aumentar su población de biomasa, se podría deber a la toma de nitrógeno de la fuente de aire, como nutriente adicional, para retomar su crecimiento.

Sector violeta como fase de muerte, inicia en la hora 44 en adelante, hasta la hora 48 finalizando con una concentración celular de $4.50 \cdot 10^7$ UFC/ml y de $4.67 \cdot 10^7$ UFC/ml.

Además de la cuantificación de biomasa, se conoce la composición inicial del medio 10g/L de Sacarosa para el medio Ashby-sacarosa, como lo especificado en el anexo B, pero para realizar la cuantificación de este, se realizó primero la hidrólisis ácida

⁶³ DUARTE. Op Cít 45.

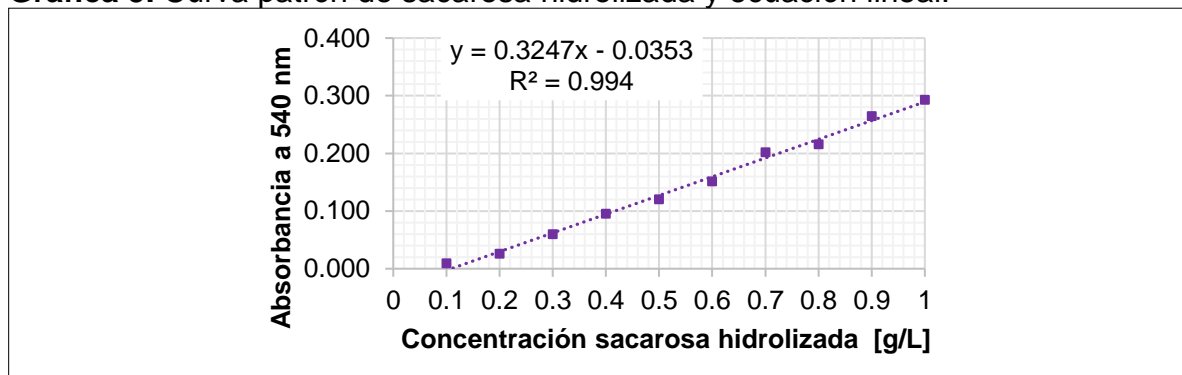
⁶⁴ SCHASCHKE, Carl. Dictionary of Chemical Engineering - differential scanning calorimetry (DSC). 2014. Oxford University Press p105-106.

(rompimiento del dímero de la sacarosa) para después realizar la cuantificación mediante la técnica colorimétrica DNS. Como lo especificado en el anexo E.

Para la cuantificación, se realizó la curva patrón de azúcar hidrolizada por triplicado, metodología seguida de CASTILLO y SARMIENTO ⁶⁵, los resultados de la curva se encuentran en el anexo E y en la gráfica 5, la curva patrón de sacarosa hidrolizada.

En la ecuación lineal, “y” corresponde a la lectura de absorbancia del espectrofotómetro UV y “x” corresponde a la concentración de sacarosa hidrolizada en g/L. Donde a partir de la gráfica 5 se determinará la ecuación 9, determinación de sacarosa hidrolizada en la muestra, con esta ecuación, se puede determinar la concentración de sacarosa en cada muestra, mediante las lecturas de absorbancias detectadas.

Gráfica 5. Curva patrón de sacarosa hidrolizada y ecuación lineal.



Fuente: elaboración propia.

Para las lecturas de las muestras de la cinética se despeja “x” quedando de la siguiente manera:

Ecuación 9. Ecuación para determinar la concentración de sacarosa hidrolizada en las muestras

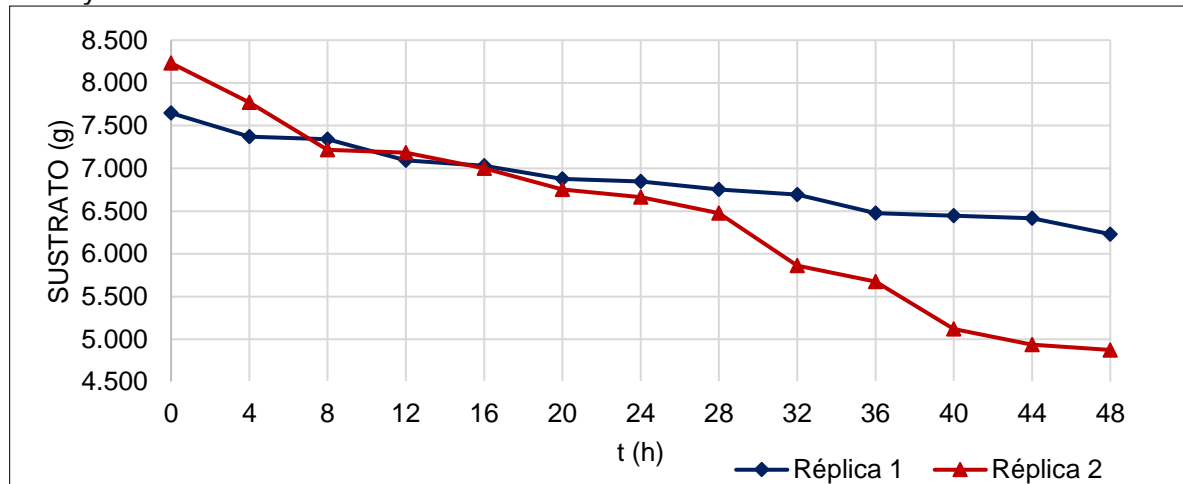
$$x = \frac{y + 0.0353}{0.3247}$$

Fuente: elaboración propia

Con cada punto detectado mediante la absorbancia en el espectrofotómetro, se parte para realizar la gráfica 6.

⁶⁵ CASTILLO Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO Sandra Constanza. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. 2007 p. 111.

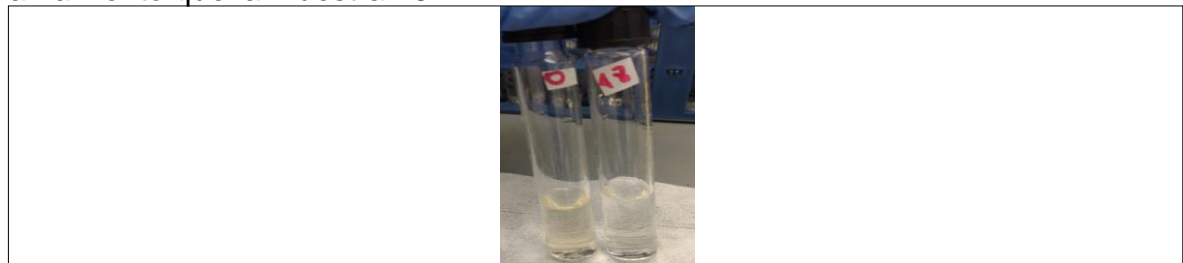
Gráfica 6. Curva de consumo de sustrato de *Azotobacter chroococcum* en caldo Ashby-sacarosa



Fuente: elaboración propia

Cada una de las muestras tomadas directamente de las unidades experimentales, fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos, donde el sobrenadante, se apartado de la biomasa, para realizar la hidrólisis ácida. La figura 14, corresponde a una fotografía de las muestras hidrolizadas, como se ve a simple vista, la concentración de sacarosa de la muestra 0 h es mucho mayor que la concentración en la de la muestra 48h, como lo demostrado en la ligera coloración amarilla entre las muestras, pero para tener un valor mas preciso de esta diferencia se aplica a estas muestras hidrolizadas la técnica colorimétrica DNS, según el numeral 2.1.3.4.

Figura 14. Comparación de muestras hidrolizadas, muestra 0h con tono más amarillento que la muestra 48h.



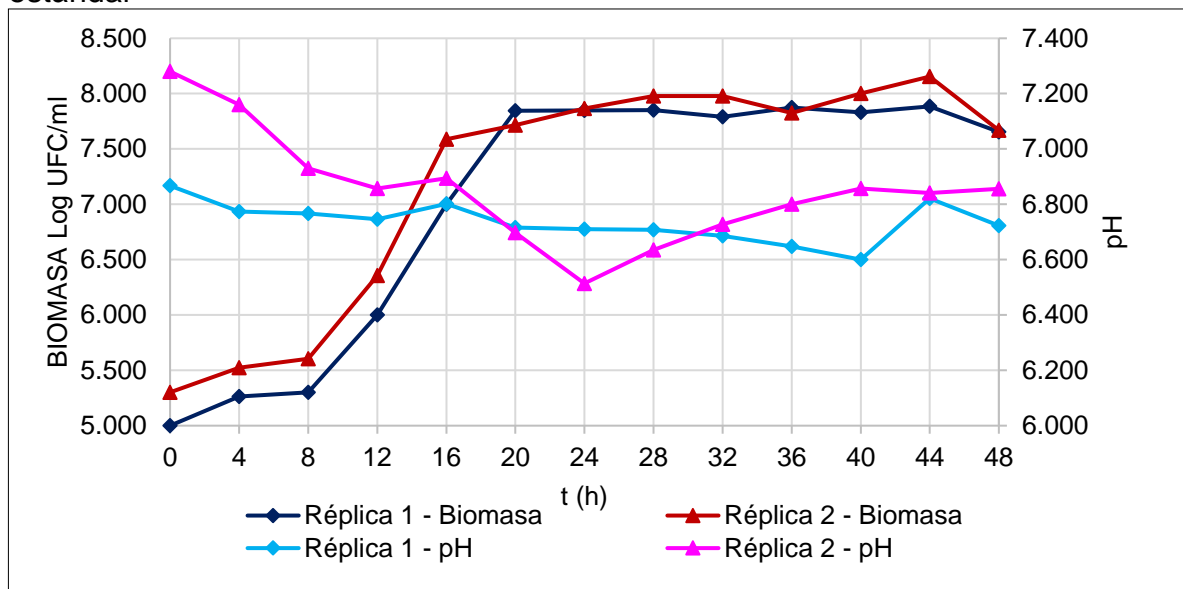
Fuente: elaboración propia.

Como lo demostrado en la gráfica 6, el valor máximo cuantificado de sacarosa reportado en la hora 0, tanto para las réplicas 1 y 2 el cual manifestaron 7.647 g/L y 8.232 g/L, lo que indica que la hidrólisis ácida no cataboliza en su totalidad el proceso, lo cual afecta la cuantificación con DNS (azúcares reductores disponibles). Sin embargo, es una medida práctica, accesible y económica para emplearla en su uso inmediato.

El valor mínimo reportado durante el consumo de sacarosa en la última toma de muestra, la hora 48, para las réplicas 1 y 2 fue de 6.230 g/L y 4.875 g/L respectivamente, lo que indica que tuvo una diferencia de 1.417 g/L y 3.357 g/L, lo que corresponde el consumo total de sacarosa por la cepa durante la propagación para ambas unidades experimentales.

A lo largo de la cinética estándar en las dos réplicas, se trató de regular el pH, con NaOH 0.1 N, dado a la respuesta de los ensayos preliminares, la cual manifestó que el pH del medio compuesto de sacarosa se vería bastante disminuido por su metabolismo, se reguló a un pH cercano a 7.

Gráfica 7. Relación Biomasa/pH registrado para la réplica 1 y 2 para cinética estándar



Fuente: elaboración propia

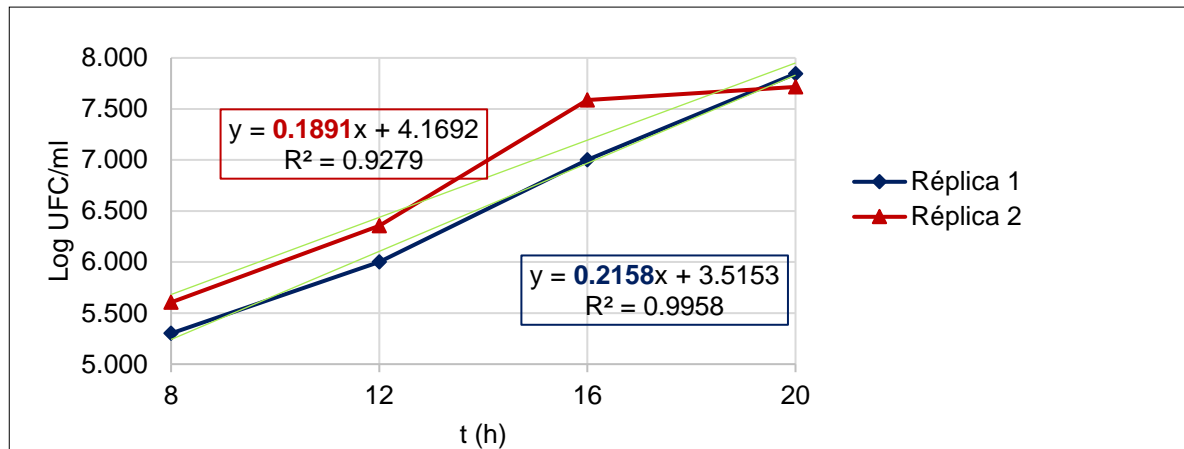
Como se puede observar en la gráfica 4, la disminución de pH no afecta ni incide directamente en la formación de biomasa, dado que es un pH que aun tolera la bacteria y se encuentra dentro de valores acordes para su metabolismo celular según THOMPSON Y SKERMAN⁶⁶ donde el pH que tolera *Azotobacter chroococcum* es entre 6-10.

- **Determinación de los parámetros cinéticos.** La velocidad específica de crecimiento para *Azotobacter chroococcum* se calculó realizando la linealización de la curva de crecimiento en el medio Ashby-Sacarosa, luego se aplicó el método de mínimos cuadrados para obtener la recta de regresión, y por lo tanto la ecuación de la recta, cuya pendiente representa la velocidad específica de crecimiento. Para la

⁶⁶ THOMPSON JP y SKERMAN. Op Cit. pp 21.

anterior linealización se tomaron los datos desde la hora 8 hasta la hora 20, teniendo en cuenta que esta es la fase exponencial de crecimiento del microorganismo.

Gráfica 8. Linealización de la fase exponencial de crecimiento de *Azotobacter chroococcum* en el caldo ashby-sacarosa a escala laboratorio



Fuente: elaboración propia

De acuerdo la ecuación 3, una gráfica de $\ln x$ vs tiempo tiene como resultado una línea con pendiente μ en unidades de h^{-1} . Siempre y cuando μ sea constante, se manifestaría a partir de la ecuación 4, el valor de t_d en horas.

Dado así, para la primera réplica, un tiempo de duplicación de:

$$t_{d1} = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{\ln 2}{0.2158 \text{ h}^{-1}} = 3.212 \text{ h}$$

Y para la segunda réplica, un tiempo de duplicación de:

$$t_{d2} = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{\ln 2}{0.1891 \text{ h}^{-1}} = 3.665 \text{ h}$$

Entre unidades experimentales, la velocidad específica de crecimiento en el medio Ashby – sacarosa, la diferencia fue de 0.0267 h^{-1} y una diferencia de los tiempos de duplicación fue de 27.1 min aproximadamente.

Se puede debe la diferencia dado que la cinética de crecimiento para las réplicas, durante la fase exponencial para ambas cepas se ajustaron a una ecuación de orden uno con un $R^2 > 0.92$, donde se representa la dispersión alrededor de la línea de regresión. Pero los pocos puntos obtenidos durante las 12 horas de la fase exponencial, no permiten dar un ajuste líneal más alto.

Por falta de datos experimentales, puede tenerse un valor estimado pero no el mas exacto correspondiente al tiempo de duplicación. La segunda réplica obtuvo un tiempo de duplicación de 27.1 minutos más que la primera réplica, se podría considerar a la concentración celular con la que se realizó la primera propagación dado que en la segunda réplica se inició con una diferente que la primera réplica, en el mismo exponencial, lo cual no representa una diferencia representativa para cuantificación de biomasa.

- **Rendimiento Biomasa sustrato.** El rendimiento del proceso relaciona la producción de biomasa con el consumo de sustrato (fuente de carbono) en el mismo intervalo de tiempo entre la hora 0 y la hora 48.

Para la primera réplica:

$$Y_{xs} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{M_t - M_0}{S_0 - S_t} = \frac{\left(7.5 * 10^7 \frac{UFC}{ml} - 1 * 10^5 \frac{UFC}{ml}\right) * \frac{1000 ml}{1 L}}{7.647 \frac{g}{L} - 6.477 * \frac{g}{L}}$$

$$Y_{xs} = 6.4 * 10^{10} \frac{UFC}{g}$$

Para la segunda réplica:

$$Y_{xs} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{M_t - M_0}{S_0 - S_t} = \frac{\left(1.43 * 10^8 \frac{UFC}{ml} - 2 * 10^5 \frac{UFC}{ml}\right) * \frac{1000 ml}{1 L}}{8 - 232 \frac{g}{L} - 4.937 * \frac{g}{L}}$$

$$Y_{xs} = 4.32 * 10^{10} \frac{UFC}{g}$$

Según lo obtenido, para las dos unidades experimentales, da como resultado que por cada gramo de sacarosa se puede obtener $6.4 * 10^{10} \frac{UFC}{g}$ y $4.32 * 10^{10} \frac{UFC}{g}$ respectivamente. Este valor muestra el requerimiento nutricional que tiene la bacteria para reproducirse en las condiciones nutricionales y de operación establecidas en el experimento, además de mostrar la cantidad de biomasa que se puede generar por el aporte de un gramo de sustrato.

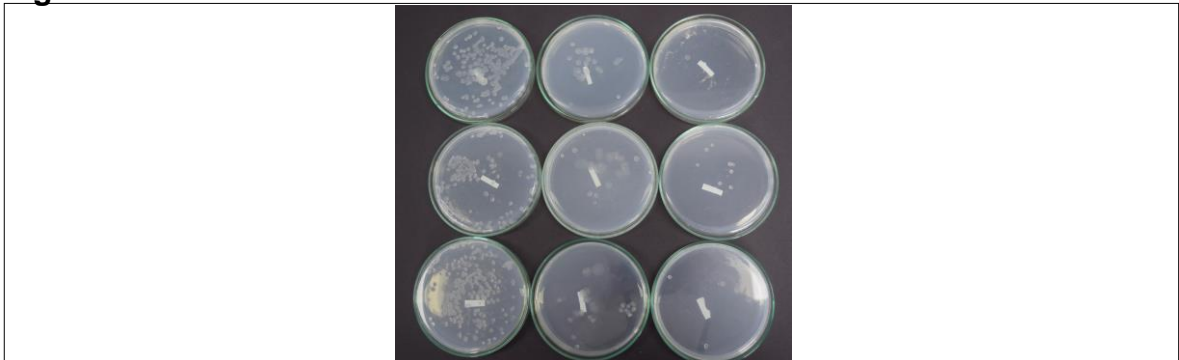
Teniendo en cuenta que el sustrato utilizado en la fermentación tiene varios componentes y suponiendo que cada uno de estos se aporta en una cantidad equivalente a su concentración dentro del caldo, se puede decir que para producir $6.4 * 10^{10} \frac{UFC}{g}$ de biomasa, se necesitan un (1) gramo de sacarosa (fuente de carbono). Siendo el único componente del que más aportan nutricionalmente al

crecimiento de la bacteria. Si esto fuera así, se consumiría en promedio un 23.8% de la cantidad de sacarosa presente en el caldo Ashby-sacarosa, libre de nitrógeno, lo que supone un consumo bajo de la fuente de carbono, posiblemente un bajo rendimiento, sin embargo, se debe tener en cuenta que la hidrólisis ácida realizada bajo la metodología de FAJARDO y SARMIENTO⁶⁷, no cataboliza en su totalidad las moléculas presentes del medio.

2.3.2.2 Cinética microbiana bajo condiciones de producción. Durante el desarrollo de la cinética bajo condiciones de producción, del caldo de propagación únicamente se conoce la fuente de carbono, manitol que es el sustrato empleado por la empresa para la preparación de medios de cultivo de producción.

Dadas las respuestas experimentales de la cinética estándar, se tomó como referencia para la preparación de material más precisa, y un conocimiento de la manifestación de las fases de crecimiento para *Azotobacter chroococcum*. En el anexo H están los datos crudos obtenidos durante las fermentaciones de las dos réplicas. La cuantificación celular se realizó mediante la técnica de siembra en placa según el numeral 2.1.3.3 y se realizó conteo en placa, como se manifiesta en la figura 15. Los resultados de los conteos, se manifiestan en la gráfica 9.

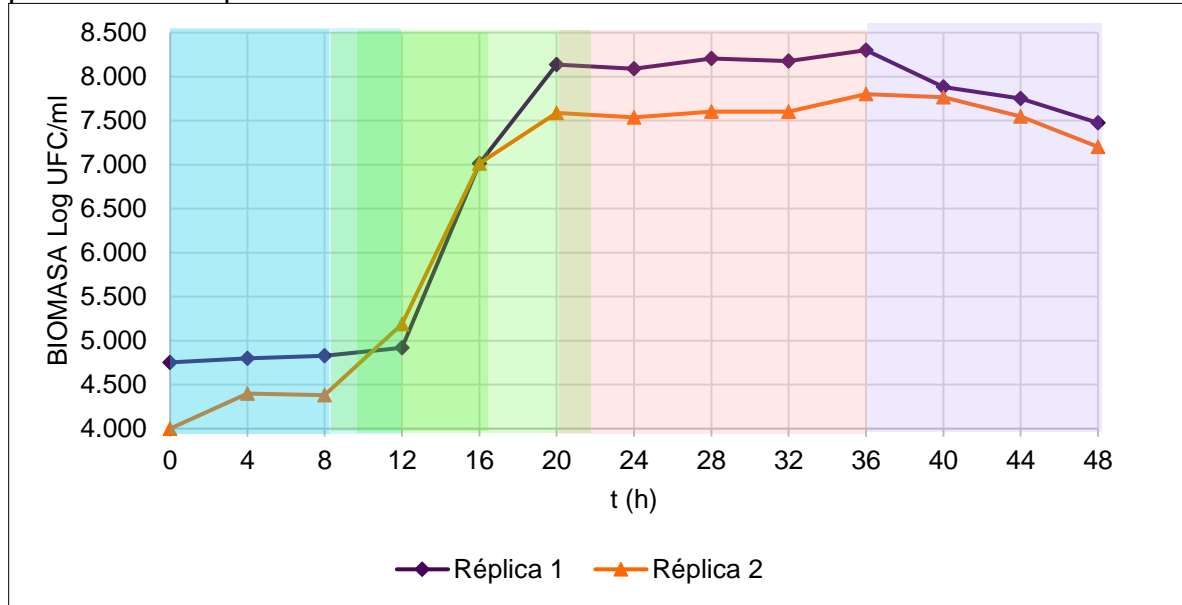
Figura 15. Diluciones sembradas en la hora 32 de la cinética



Fuente: elaboración propia

⁶⁷ FAJARDO y SARMIENTO. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Op Cit. 78

Gráfica 9. Curva de crecimiento de *Azotobacter chroococcum* en caldo de producción. Réplica 1.



Fuente: elaboración propia

Las fases que se identifican en el crecimiento microbiano para las dos réplicas de la cinética bajo condiciones de producción identificadas con sombreado de color corresponden a:

Sector azul como fase de adaptación, que definido para la réplica 1, el cual parte desde la hora 0 con una concentración celular de $5.67 \cdot 10^4$ UFC/ml y finaliza en la hora 12 con una concentración celular de $8.33 \cdot 10^4$ UFC/ml, y para la réplica 2, que inicia hora 0 con una concentración celular de $1 \cdot 10^4$ UFC/ml y finaliza en la hora 8 con una concentración celular de $2.4 \cdot 10^4$ UFC/ml. En esta fase, las células de *Azotobacter chroococcum* se adaptan al nuevo ambiente fisicoquímico ofrecido por el medio de producción de FUNDASES. Gráficamente y cuantitativamente hay muy poco crecimiento de la cepa sin variaciones en las concentraciones de biomasa.

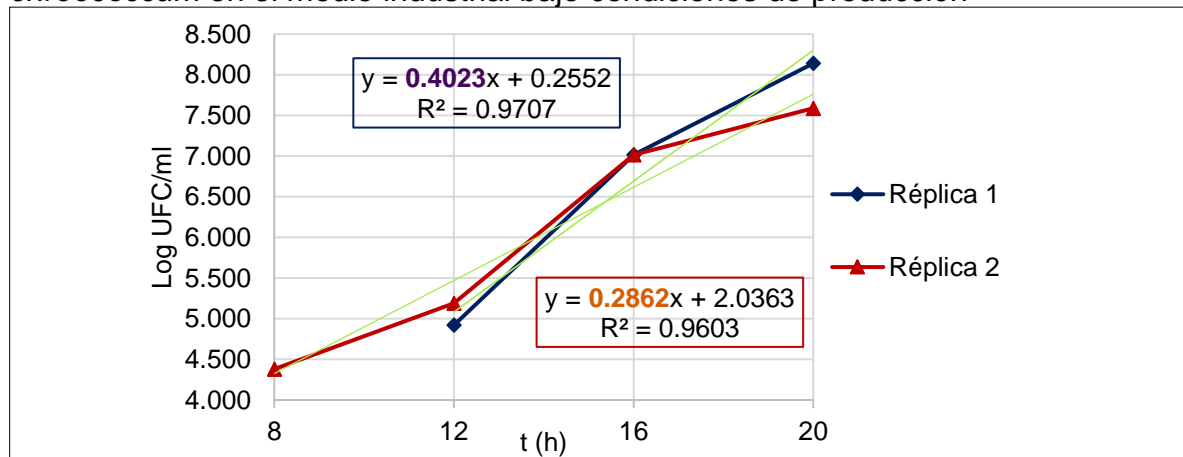
Sector verde como fase exponencial, donde las células se reproducen sin limitaciones nutricionales a una velocidad máxima de crecimiento, esta fase inicia para la primera réplica en la hora 12 con una concentración celular de $8.33 \cdot 10^4$ UFC/ml y finaliza entre la hora 20, con una concentración celular de $1.38 \cdot 10^8$ UFC/ml, para la segunda réplica, esta fase inicia en la hora 8 con una concentración celular de $2.4 \cdot 10^4$ UFC/ml y finaliza entre la hora 20, con una concentración celular de $3.87 \cdot 10^7$ UFC/ml. Para procesos de propagación microbiana, es una de las fases más importantes porque es donde se obtiene el mayor crecimiento, y por lo tanto mayor producción de biomasa

Sector rosa como fase estacionaria inicia a partir de la hora 20 para ambas réplicas, y finaliza en la hora 36, con un promedio de concentración celular de $1.54 \cdot 10^8$ UFC/ml y $4.33 \cdot 10^7$ UFC/ml respectivamente. Los comportamientos para ambas réplicas se mantuvieron estables.

Sector violeta como fase de muerte la cual inicia a partir de la hora 36 hasta las 48h, alcanzando una concentración celular final de $3 \cdot 10^7$ UFC/ml y de $1.59 \cdot 10^7$ UFC/ml respectivamente.

- **Determinación de los parámetros cinéticos.** La velocidad específica de crecimiento para *Azotobacter chroococcum* se calculó realizando la linealización de la curva de crecimiento en el medio de producción proporcionado por FUNDASES, luego se aplicó el método de mínimos cuadrados para obtener la recta de regresión, y por lo tanto la ecuación de la recta, cuya pendiente representa la velocidad específica de crecimiento. Para la anterior linealización se tomaron los datos desde la hora 12 hasta la hora 20, para la primera réplica y desde la hora 8 hasta la hora 20 para la segunda réplica, teniendo en cuenta que está es la fase exponencial de crecimiento del microorganismo.

Gráfica 10. Linealización de la fase exponencial de crecimiento de *Azotobacter chroococcum* en el medio industrial bajo condiciones de producción



Fuente: elaboración propia

De acuerdo la ecuación 3, una gráfica de $\ln x$ vs tiempo tiene como resultado una línea con pendiente μ en unidades de h^{-1} . Siempre y cuando μ sea constante, se manifestaría a partir de la ecuación 4, el valor de t_d en horas.

Dado así, para la primera réplica, un tiempo de duplicación de:

$$t_{d1} = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{\ln 2}{0.4023 \text{ h}^{-1}} = 1.723 \text{ h}$$

Y para la segunda réplica, un tiempo de duplicación de:

$$t_{dz} = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{\ln 2}{0.2862 \text{ h}^{-1}} = 2.422 \text{ h}$$

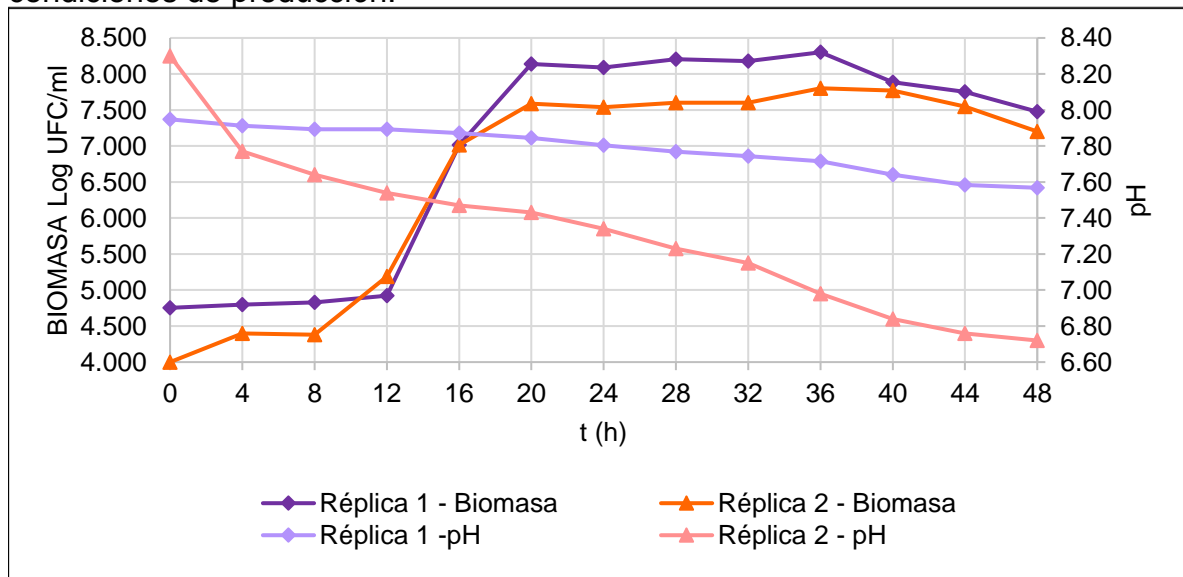
Entre unidades experimentales, la velocidad específica de crecimiento en el medio Ashby – sacarosa, la diferencia fue de 0.1161 h^{-1} y una diferencia de los tiempos de duplicación fue de 42.3 min aproximadamente.

Durante la fase exponencial para ambas réplicas se ajustaron a una ecuación de orden uno con un $R^2 > 0.96$, donde se representa la dispersión alrededor de la línea de regresión. Pero los pocos puntos obtenidos durante las la fase exponencial, no permiten dar un ajuste líneal más alto, además que la fase exponencial para la réplica 1 fue de 8 h mientras que para la réplica 2 fue de 12 h.

Por falta de datos experimentales, puede tenerse un valor estimado con mayor grado de error correspondiente al tiempo de duplicación. La segunda réplica obtuvo un tiempo de duplicación de 42.3 minutos más que la primera réplica.

- **Seguimiento del pH a lo largo de la propagación.** A lo largo de la cinética bajo condiciones de producción, en las dos réplicas, no se reguló el pH, dado que, en la empresa, este factor no se controla; como se demuestra en la gráfica 11, la disminución del pH tanto para la réplica 1 y 2 fueron de 0.95 y 1.58 unidades de pH respectivamente. Esta variación se le puede atribuir a que las sales que componen el caldo industrial, posiblemente actúen como amortiguadores de pH, para evitar la rápida acidificación del medio de cultivo.

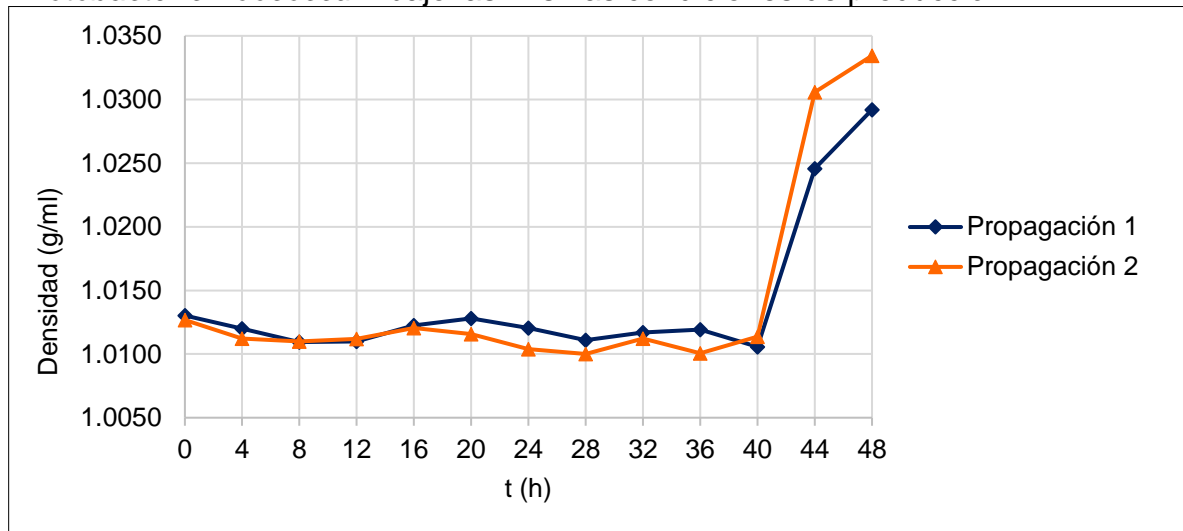
Gráfica 11. Relación Biomasa/pH registrado para la réplica 1 y 2 para cinética bajo condiciones de producción.



Fuente: elaboración propia

- **Seguimiento de la densidad a lo largo de la propagación.** Además del seguimiento cinético durante las propagaciones bajo condiciones de producción, otro factor medido durante este seguimiento fue la densidad del medio de cultivo, según lo representado en la gráfica 12.

Gráfica 12. Curva comparativa de las dos réplicas del comportamiento densidad de *Azotobacter chroococcum* bajo las mismas condiciones de producción.



Fuente: elaboración propia

Según la gráfica 12, ambas propagaciones mantienen densidades semejantes a lo largo de las fermentaciones, a escala de 5L, donde el cambio más notable se manifestó a partir de la hora 40, la variación de la densidad se debe al aumento de biomasa y también la formación de biofilms segregados por las bacterias y también dado la fase de muerte que inicia a las 36h, donde se demuestra un gran cambio de la morfología de las células, y aumento de los exopolisacáridos producto de las bacterias. DE BELS, *Marisa*, et al., en su trabajo growth of indigenous *Azotobacter* spp. under various cultural conditions⁶⁸ en el 2016, manifestaron también un aumento en la densidad del caldo usado (Caldo Ashby-manitol) para la cepa nativa de *Azotobacter* spp. en Thailandia.

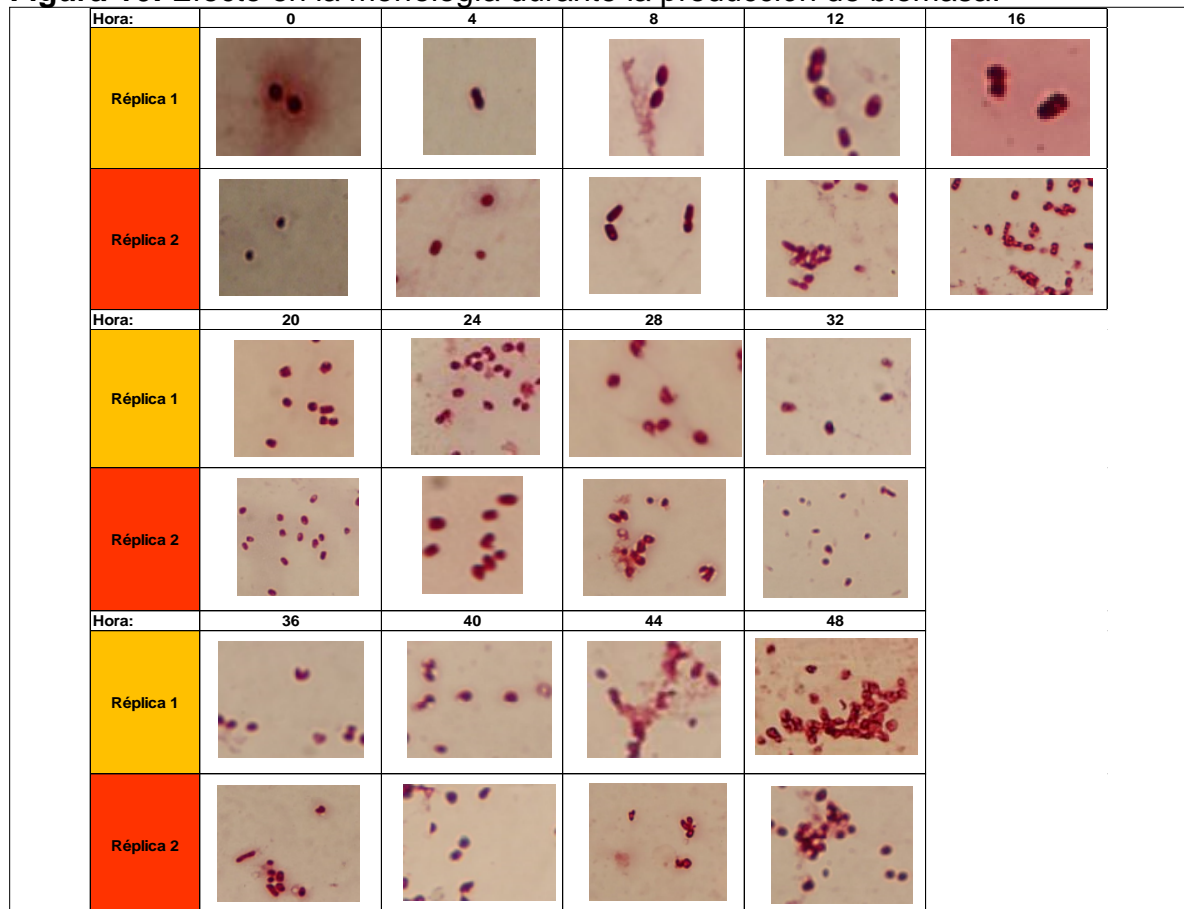
- **Seguimiento en la morfología durante la producción de biomasa.** Durante las propagaciones de biomasa, se realizó un seguimiento de la morfología de la cepa microscópicamente, mediante la tinción de Gram, de acuerdo al numeral 2.1.3.5. del presente documento. Este seguimiento permite revisar las condiciones de viabilidad de las células mediante tinción de Gram.

⁶⁸ DE BELS, *Marisa*, et al., Growth of indigenous *Azotobacter* spp. under various cultural conditions. Kasetsart University. Thailand. En: The 43rd Congress on Science and Technology of Thailand (STT 43). P 93.

La figura 16, consiste en la recopilación de fotografías de tinciones de gram realizadas a partir de las alícuotas obtenidas de las propagaciones realizadas, donde claramente se puede observar que durante las primeras 20 h de propagación, *Azotobacter chroococcum* mantiene la forma que la caracteriza, de forma cocobacilos levaduriforme, de color fucsia tras tinción de Gram. A medida que va aumentando el tiempo de propagación, esta bacteria tiende a aglomerarse en duplas o racimos. Las fotografías que demuestran esta morfología corresponden a células que provienen de un cultivo joven, de segunda generación, donde las bacterias aún son jóvenes y mantienen un mayor nivel de actividad metabólica lo que representa el uso de biomasa más efectiva en la fijación de nitrógeno

Después de las 36h y hasta las 48h se puede observar una variación en la morfología tomando forma de bacilos, que podría estar relacionada con las cinéticas realizadas, dado que, a condiciones de producción, inicia la fase muerte a partir de la hora 36. Se puede atribuir una relación directa con el aumento de la densidad del medio y el cambio de morfología, dado que se presentó un aumento representativo de la densidad a partir de las horas de muerte manifestadas en las gráficas de la cinética.

Figura 16: Efecto en la morfología durante la producción de biomasa.



Fuente: elaboración propia

Finalmente, para concluir este capítulo, se resalta que entre las 8 -20 independientemente de la fuente de carbono se configura la fase exponencial, resaltando la importancia de la fase para procesos de propagación, dado que la velocidad de crecimiento es máxima y no hay limitación del crecimiento, ni por sustrato, ni existe la presencia de inhibidores.^{69,70} dando como resultado comparativo entre las fuentes de carbono sacarosa y manitol, los parámetros cinéticos promedio, las velocidades específicas de crecimiento (μ) sacarosa es de $0.202 h^{-1}$ y un tiempo de duplicación (t_d) de 3.42 h y que con sustrato manitol, el μ es $0.344 h^{-1}$ y t_d de 2.01 h, lo que indica que la bacteria demora más en reproducirse bajo un medio de sacarosa, el cual representa una diferencia de (μ) $0.14 h^{-1}$ y (t_d) 1.41h.

Además, ante el máximo crecimiento alcanzado a las 20h de propagación, se podría plantear una reducción de costos, dado que el proceso actual usado por la empresa para las propagaciones, tardan 48h. Conocida su cinética, se podría hablar de reducción de tiempo en propagación incidiendo en la disminución en el consumo energético, y también una disminución en la demanda de materias primas causando una disminución dado que se habla cerca de una reducción cercana al 50% de la concentración actualmente utilizada, dado el consumo máximo evidenciado fue de 3.53 g de sacarosa.

También según el seguimiento de pH durante la propagación de biomasa bajo condiciones estándar, cuya fuente de carbono fue sacarosa, se presentó una acidificación más rápida (también como lo demostrado en las pruebas preliminares) pero no alcanza niveles de pH por debajo de los estimados para propagación dando como conclusión que una variación de pH no interfiere para el desarrollo de cada una de las fases de la célula. Pero se debe tener en cuenta que, bajo medio de Sacarosa, se debe procurar no dejar acidificar tanto el medio, dado que, si el pH no se encuentra dentro del rango establecido, puede haber inhibición de crecimiento, situación que no se manifestó en la propagación realizada bajo condiciones industriales, donde las condiciones nutricionales de medio industrial, se evidenció un crecimiento hasta 1×10^8 UFC/ml. Los componentes del medio de cultivo pueden actuar como buffer que amortiguan la variación en la reducción del pH al comparar con el efecto causado por el cultivo en la cinética estándar, pero dichos componentes no se conocen dado que la formulación es de secreto industrial.

⁶⁹ DUARTE Op cit 54

⁷⁰ DORAN Op cit 291

3. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL BIORREACTOR

En este capítulo se dan a conocer las dimensiones que corresponderían al diseño del biorreactor a escala banco para la propagación de biomasa de *Azotobacter chroococcum*, donde se relacionan los cálculos para las dimensiones del recipiente, distancia entre los agitadores bajo las relaciones de diseño y una propuesta de material para la construcción del biorreactor.

Las especificaciones técnicas parten del comportamiento de las variables obtenidas de la cinética realizada bajo condiciones de producción. Las variables obtenidas como el pH que oscilo por las primeras 20 h entre 7.84 hasta 7.27, la hora 20 corresponde la hora de interés para la propagación del microorganismo, donde es inicio de la hora de latencia, y el pH transcurrido las 48h es de 6.57.

La temperatura se estableció según reportes bibliográficos de OROS DAMIR et al; CAMELO RUSINQUE et al; BORDA MOLINA et al, definido en 30°C +- 2°C.

Dado que *Azotobacter chroococcum* es aeróbico, se requiere un sistema de aireación en el prototipo, donde cumpla con una aireación interna de 1 vvm.

El sistema siempre debe mantenerse en constante agitación, para favorecer la transferencia de masa y que el microorganismo pueda acceder a los nutrientes presentes en el medio.

Con respecto al caldo de cultivo, es un medio líquido donde la composición de agua corresponde aproximadamente al 98.912% p/p, la composición conocida de la fuente de carbono es manitol, correspondiendo a aproximadamente al 0.9891% p/p del medio. Los macro y micronutrientes son de secreto industrial. Pero estos en la composición final del medio oscilan en un 0.099% p/p del total del medio de cultivo.

3.1 MODO DE OPERACIÓN

Existen tres modos principales de operación de un biorreactor: discontinuo, de alimentación intermitente y continuo, ⁷¹pero los que son aplicados más frecuentes para el crecimiento de microorganismos en medio líquido corresponde a continuo y batch.⁷² Cabe resaltar que el sistema corresponde a un medio aerobio, donde constantemente se debe agregar un flujo de aire entrante debido a la baja solubilidad del oxígeno en medio acuoso, también mientras se elimina el dióxido de carbono y otros gases que son producidos en el proceso, por eso se considera en

⁷¹ DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Ed. Acribia S.A. Zaragoza (España). 1995. Pág. 371

⁷² CARDONA ARRIETA Jessica Paola. Desarrollo de la ingeniería básica para la producción de la bacteria *Bacillus popilliae* en control de chiza a nivel de planta piloto en the elite flower ltda. 2011. Tesis para optar el título de Ingeniero Químico. Universidad de América. Bogotá D.C. p. 20-21.

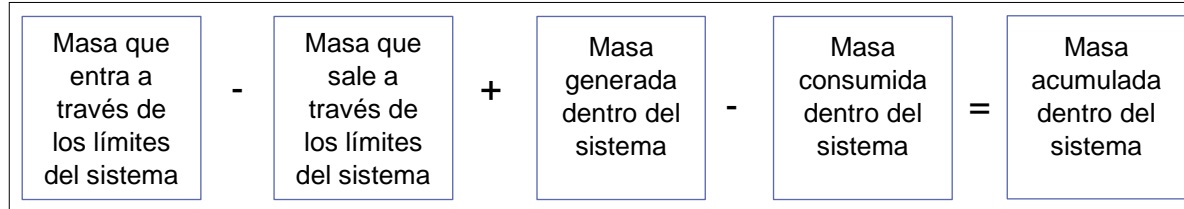
los reactores tipo batch que lo único prevaeciente para entrada y salida de sustancias son de tipo líquido.

El modo escogido fue batch, dado que ofrece ventajas como su fácil manejo de operación y construcción, además minimiza los riesgos por contaminación por microorganismos externos.⁷³ En este modo, todos los nutrientes y biomasa inicial son agregados al inicio de la preparación del lote, excepto el oxígeno y sustancias químicas que son utilizadas para efectos de regulación de pH como lo son el NaOH al 0.1N y el HCl al 0.1 N. Una vez agregados al sistema, no se vuelve a agregar demás sustancias, y se espera al tiempo de reacción establecido. A diferencia de los sistemas continuos, dado que, en estos durante la producción de un lote, los nutrientes deben ser agregados continuamente y partes del caldo el cual puede llegar a contener contenido de biomasa si es retirado de manera continua, al implementar este tipo de sistema, incrementa el costo con respecto al modo batch.

3.2 BALANCE DE MATERIA

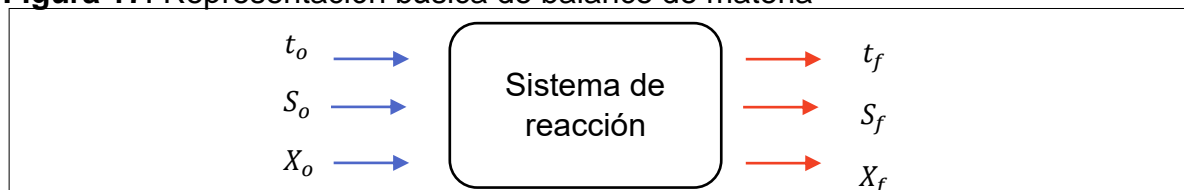
Al ser el modo de operación tipo batch, la biomasa no es agregada ni retirada en el transcurso de la reacción, por lo tanto, se describe en la siguiente ecuación, partiendo desde un balance general, representado de igual manera en la figura 27.

Ecuación 10. Ecuación del balance general



Fuente: elaboración propia guiada por DORAN.⁷⁴

Figura 17. Representación básica de balance de materia



Fuente: elaboración propia.

⁷³ KARANTHAND. G; RAJ, E. Fermentation Technology and Biorreactor Design. 2da edición. Food Science and Technology. New York. Marcel dekkar. 2006. ISBN 987-9381-16-5, citado por ACOSTA Yoel Alfonso. Diseño de un biorreactor para la producción de inocular de Salmonella Enteritidis. 2018. Planta de bioplaguicida de Matanzas. Cuba. P 14.

⁷⁴ DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos., Op Cit. p 54.

Donde:

t_0 : Tiempo inicial

S_0 : Sustrato inicial

X_0 : Biomasa inicial

t_f : Tiempo final

S_f : Sustrato final

X_f : Biomasa final

Partiendo de la ecuación 10, del balance general, la ecuación 11 describe el balance de masa general para un reactor discontinuo.

Ecuación 11. Sistema general de reacción

$$\frac{dM}{dt} = M_i - M_0 + R_G - R_c$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. 371 p.

Donde:

$\frac{dM}{dt}$: termino diferencial de acumulación donde M es la masa del componente A en el reactor y t el tiempo.

M_i : masa de entrada de A al reactor

M_0 : masa de salida de A al reactor

R_G : velocidad másica de generación de A por reacción

R_c : velocidad másica de consumo de A por reacción

Con las afirmaciones anteriores se entiende como $M_i = M_0 = 0$ dado que la biomasa ni entra ni sale del recipiente mientras sucede la reacción de propagación.

Aunado a esto, se sabe que:

Ecuación 12. Expresión de la velocidad másica de generación.

$$R_G = r_x V$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. 375 p.

Donde r_x corresponde a la velocidad volumétrica de producción de biomasa, dada en unidades por ejemplo de $\text{kg m}^{-3} \text{s}^{-1}$ y V es volumen.

Además, durante la fase tanto de crecimiento y de decrecimiento celular, la velocidad de crecimiento celular se describe mediante la ecuación

Ecuación 13. Expresión de la velocidad volumétrica de crecimiento.

$$r_x = x * \mu$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. 375 p.

Donde:

x : concentración celular de células viables con unidades por ejemplo de kg m^{-3}

μ : velocidad específica de crecimiento.

Si se produce muerte celular durante el crecimiento,

Ecuación 14. Expresión de la velocidad másica de consumo.

$$R_c = r_d V$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. 375 p.

Donde:

r_d : velocidad volumétrica de muerte celular

Y a su vez, mediante una ecuación de primer orden

Ecuación 15. Ecuación de primer orden.

$$r_d = K_d x$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. 375 p.

Donde:

K_d : constante específica de muerte celular.

x : biomasa.

Partiendo de lo anterior y para el balance de materia de células en un reactor tipo batch corresponde a:

Ecuación 16. Ecuación para células en reactor batch

$$\frac{d(xV)}{dt} = \mu xV - K_d xV$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. 375 p.

Siendo el volumen V constante a lo largo de la reacción:

Ecuación 17. Expresión para volumen constante

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - K_d)x$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. 375 p.

Organizando las variables para integración se tiene que

$$\frac{dx}{x} = (\mu - K_d)dt$$
$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = \int_{t_0}^t (\mu - K_d) dt$$

Integrando y teniendo en cuenta que $t_0 = 0$

$$\ln x - \ln x_0 = (\mu - K_d)t$$

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = (\mu - K_d)t$$

$$\frac{x}{x_0} = e^{(\mu - K_d)t}$$

$$x = x_0(e^{(\mu - K_d)t})$$

Se aplica para cultivo tipo batch que $\mu \equiv \mu_{m\acute{a}x}$ durante la mayor fase de crecimiento, por lo tanto.

Ecuación 18. Expresión para la fase exponencial en un cultivo tipo batch.

$$x = x_0(e^{(\mu_{m\acute{a}x} - K_d)t})$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. 375 p.

Si x_f es la concentración final de biomasa tras un tiempo de cultivo batch t_b se obtiene, partiendo desde la ecuación 18 del cambio de variable de t a t_b

$$\ln\left(\frac{x_f}{x_0}\right) = (\mu_{m\acute{a}x} - K_d)t_b$$

$$t_b = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x} - K_d} * \ln\left(\frac{x_f}{x_0}\right)$$

Donde:

t_b : tiempo de retención en un reactor batch

X_f : biomasa final

X_o : biomasa inicial

K_d : constante específica de muerte celular.

$\mu_{m\acute{a}x}$: velocidad máxima de crecimiento

Si la velocidad de muerte celular es despreciable en comparación con la de crecimiento expresado como $K_d \ll \mu_{m\acute{a}x}$ se obtienen las ecuaciones 19 y 20.

Ecuación 19. Biomasa para modo de operación batch.

$$x = x_0(e^{\mu_{m\acute{a}x} * t})$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. 375 p.

Ecuación 20. Tiempo de cultivo para modo de operación batch.

$$t_b = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} * \ln\left(\frac{x_f}{x_0}\right)$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. 375 p.

Mediante la ecuación 20 se puede calcular el tiempo necesario para alcanzar una determinada población celular x_f a partir de una población inicial x_0 .

Reemplazando la velocidad específica de crecimiento, la concentración inicial de biomasa y teniendo en cuenta la concentración final de biomasa al finalizar la fase exponencial, es decir en la hora 20, se obtiene la ecuación 21 y 22.

Ecuación 21. Cálculo del tiempo en operación batch para la primera réplica de las cinéticas bajo condiciones de producción.

$$t_b = \frac{1}{0.402h^{-1}} * \ln\left(\frac{1.38 * 10^8 UFC/ml}{5.67 * 10^4 UFC/ml}\right)$$

$$t_b = 19.39h$$

Fuente: elaboración propia.

Para obtener una concentración de biomasa igual a $1.38 * 10^8 UFC/ml$, partiendo del dato de respuesta del cultivo discontinuo seguido anteriormente, como cultivo inicial de $5.67 * 10^4 UFC/ml$, se necesario un transcurso de 19 horas y 23.4 minutos aproximadamente.

Ecuación 22. Cálculo del tiempo en operación batch para la segunda réplica de las cinéticas bajo condiciones de producción.

$$t_b = \frac{1}{0.286 \text{ h}^{-1}} * \ln \left(\frac{3.87 * 10^7 \text{ UFC/ml}}{1 * 10^4 \text{ UFC/ml}} \right)$$
$$t_b = 28.86 \text{ h}$$

Fuente: elaboración propia.

Para obtener una concentración de biomasa igual a $3.87 * 10^7 \text{ UFC/ml}$, partiendo del dato de respuesta del cultivo discontinuo seguido anteriormente, como cultivo inicial de $1 * 10^4 \text{ UFC/ml}$, se necesario un transcurso de 28 horas y 51.6 minutos aproximadamente.

A partir de los resultados experimentales, se determinaron los resultados para un cultivo para modo de operación batch, con una diferencia de 9h y 28.2 minutos, es una diferencia que puede determinar mucho más consumo energético en el tiempo de las propagaciones de biomasa. Por lo que se determinó un rango de 19-28h de retención en el tanque.

3.3 BALANCE DE ENERGIA

Para el balance de energía que requiere el diseño únicamente corresponde al calor requerido para mantener el sistema a temperatura de crecimiento requerida para el microorganismo 30°C de la siguiente manera, expresado en la ecuación 23.

Ecuación 23. Balance de energía térmica para operación batch

$$Q_{(requerido)} = m_{(medio \text{ de cultivo})} [kg] * Cp_{(medio \text{ de cultivo})} \left[\frac{J}{Kg * K} \right] * \Delta T [K]$$

Fuente: DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. 93 p.

Donde:

Q : calor requerido

Cp : capacidad calorífica de la sustancia

m : masa

ΔT : diferencial de temperatura

De acuerdo a las variables para el calor requerido de la ecuación 23, se debe conocer la masa del medio de cultivo en kg y el Cp del medio de cultivo en unidades de $\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$

3.3.1 Masa del medio de cultivo. Dado que el medio de cultivo, el acceso a la composición tanto de macro y micro nutrientes es nula, se hace una estimación para caldo de cultivo conocido Ashby-manitol. El cual está constituido por agua correspondiente al 98.912%, la fuente de carbono es manitol, constituye al 0.9891% del medio. Los macro y micronutrientes constituyen en un 0.099% del total del medio de cultivo, lo cual está representado en la tabla 10.

Tabla 10. Valores de densidad de los componentes del medio líquido Ashby-manitol

REACTIVO	g/L	COMPOSICIÓN (%)	DENSIDAD a 30°C (kg/m ³)
Agua	1000	0.9891	996.0159 ⁽⁷⁵⁾
Manitol	10	0.0099	1480-1520
Fosfato dipotásico de hidrógeno	0.2	0.0002	2440
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2	0.0002	2660
Cloruro de sodio	0.2	0.0002	2160
Sulfato de calcio	0.2	0.0002	2320
Carbonato de calcio	0.2	0.0002	2710

Fuente: elaboración propia, basada en información de ÇENGEL, Yunus A., BOLES, Michael A. Termodinámica. 7ma edición. 2012. Mexico: McGraw-Hill, 1999. pg 914. (recursos electrónicos Knovel)

La densidad de la mezcla es calculada de la siguiente forma, bajo la ecuación 24:

Ecuación 24. Densidad del medio de cultivo

$$\rho_M \left[\frac{kg}{m^3} \right] = \rho_{H_2O} * 98.91\% + \rho_{C_6H_{14}O_6} * 0.9\% + 0.02\% (\rho_{K_2HPO_4} + \rho_{MgSO_4} + \rho_{NaCl} + \rho_{CaSO_4} + \rho_{CaCO_3})$$

Fuente: elaboración propia, basada en DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. p 93.

Donde:

ρ_M : Densidad del medio

⁷⁵ ÇENGEL, Yunus A., BOLES, Michael A. Termodinámica. 7ma edición. 2012. Mexico: McGraw-Hill, 1999. pg 914.

Desarrollando la ecuación 24 se obtiene lo siguiente:

$$\rho_M \left[\frac{kg}{m^3} \right] = 996.0159 * 98.91\% + 1500 * 0,9\% + 0.02\% (2440 + 2660 + 2160 + 2320 + 2710)$$
$$\rho_M \left[\frac{kg}{m^3} \right] = 1002.447$$

Al conocer la densidad del medio de cultivo, se puede determinar su masa.

Ecuación 25. Masa del medio de cultivo

$$m_{Medio\ de\ cultivo} [kg] = \rho_M \left[\frac{kg}{m^3} \right] * V_{Medio\ de\ cultivo}$$

Fuente: elaboración propia, basada en DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. 93 p.

Desarrollando la ecuación 25 se obtiene lo siguiente:

$$m_{Medio\ de\ cultivo} [kg] = 1002.447 \frac{kg}{m^3} * 5L * \frac{1 m^3}{1000 L} = 5.0122 kg.$$

3.3.2 Calor específico del medio de cultivo (Cp). Según CARDONA ⁷⁶, el calor específico del medio de cultivo también se establece como una mezcla, donde se debe conocer el calor específico de cada sustancia y sus fracciones correspondientes.

El calor específico para el agua corresponderá a 30°C, dado que es la temperatura del crecimiento de *Azotobacter chroococcum* y dicha temperatura se mantendrá mientras concluye la reacción de propagación.

Para obtener el Cp molar del agua, se calcula mediante la capacidad calorífica de líquidos mediante la formula

Ecuación 26. Calor específico del agua en función de la temperatura

$$C_p = A + BT + CT^2 + DT^3.$$

Fuente: COKER, A. Kayode. Ludwig's Applied Process Design for Chemical and Petrochemical Plants, Volume 2. 4th Edition. 2010. Elsevier. 1 p.

Los términos A, B, C y D corresponden a los coeficientes de regresión para el agua, en [J/ mol*K] y T corresponde a la temperatura establecida en K.

⁷⁶ CARDONA ARRIETA Jessica Paola. Op Cit p. 20-21.

Tabla 11. Coeficiente de regresión para compuestos químicos, Agua.

A	B	C	D
92.053	-4.00E-02	-2.11E-04	5.35E-07

Fuente: COKER, A. Kayode. Ludwig's Applied Process Design for Chemical and Petrochemical Plants, Volume 2. 4th Edition. 2010. Elsevier. 1 p.

Desarrollando la ecuación 26 y con base en las constantes de la tabla 21, se estima que el Cp del agua a 30°C será la presentada a continuación:

$$C_{p \text{ H}_2\text{O @ 303.15 K}} = [92.053 - (4 * 10^{-2} * 305.15) - (2.11 * 10^{-4} * 305.15^2) + (5.35 * 10^{-7} * 305.15^3)] * \frac{J}{mol * K}$$

$$C_{p \text{ H}_2\text{O @ 303.15 K}} = 75.444 \frac{J}{mol * K}$$

Conocida la capacidad calorífica del agua a 30°C, se deben calcular la capacidad calorífica del resto de las sustancias que componen el medio de cultivo, para este análisis se partió de la composición del caldo Ashby, Dado que no se tuvo el acceso a la información del caldo industrial.

Tabla 12. Capacidad calorífica de las sustancias presentes en el caldo ashby-manitol.

REACTIVO	g/L	COMPOSICIÓN (%)	Masa Molar (g/mol)	Cp 30°C (J/mol*K)	Cp (J/kg*K)
Agua	1000	98.912%	18.000	75.404	1.357
Manitol	10	0.989%	182.172	239.000	43.539
Fosfato dipotásico de hidrógeno	0.2	0.020%	174.176	145.300	25.308
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2	0.020%	120.368	158.990	19.137
Cloruro de sodio	0.2	0.020%	58.500	190.454	11.142
Sulfato de calcio	0.2	0.020%	136.141	182.000	24.778
Carbonato de calcio	0.2	0.020%	100.087	67.447	6.751

Fuentes: elaboración propia, realizada bajo la información proporcionada de YAWS, Carl L. Yaws' Critical Property Data for Chemical Engineers and Chemists. (2012; 2013; 2014). Knovel y YAWS, Carl L. Yaws' Handbook of Thermodynamic Properties for Hydrocarbons and Chemicals. 2009. Knovel.

Con base a la información de la tabla 12, se calcula el Cp del medio de la siguiente manera, bajo la ecuación 27.

Ecuación 27. Calculo para Cp. del medio Ashby-manitol

$$Cp_{Medio} \left[\frac{J}{Kg * K} \right] = Cp_{H_2O} * 98.91\% + Cp_{C_6H_{14}O_6} * 0.9\% + 0.02\% (Cp_{K_2HPO_4} + Cp_{MgSO_4} + Cp_{NaCl} + Cp_{CaSO_4} + Cp_{CaCO_3})$$

Fuente: COKER, A. Kayode. Ludwig's Applied Process Design for Chemical and Petrochemical Plants, Volume 2. 4th Edition. 2010. Elsevier. 1 p.

Por lo tanto, reemplazando cada Cp en la ecuación 27, se tiene lo siguiente:

$$Cp_{Medio} \left[\frac{J}{Kg * K} \right] = 75.444 * 98.91\% + 43.539 * 0.9\% + 0.02\% (25.308 + 19.137 + 11.142 + 24.778 + 6.751); Cp_{Medio} \left[\frac{J}{Kg * K} \right] = 75.071 \frac{J}{Kg * K}$$

Finalmente, el calor requerido para el sistema se calcula de la siguiente manera Retomando la ecuación 23:

$$Q_{(requerido)} = m_{(medio de cultivo)} [kg] * Cp_{(medio de cultivo)} \left[\frac{J}{Kg * K} \right] * \Delta T [K].$$
$$Q_{(requerido)} = 5.0122 \text{ kg} * 75.071 \frac{J}{Kg * K} * (305.15 - 295.15) K$$
$$Q_{(requerido)} = 3794.73 \text{ J}$$

3.3.3 Balances de calor para el sistema. La energía que necesita el sistema puede intercambiarse mediante la transferencia convectiva, que conlleva a los sistemas líquidos que corresponden al medio de cultivo y al líquido refrigerante del enchaquetamiento, el cual consiste en agua que pasa a través de la chaqueta, y existe transferencia de calor mediante conducción, que refiere a la pared del biorreactor. Dado al tamaño propuesto, existe una gran relación entre la superficie-volumen, y se notará un efecto positivo para mantener la temperatura en niveles óptimos de 30°C +/- 2°C si se genera una remoción de calor.

Se parte desde una ecuación inicial para el planteamiento general del balance energético del biorreactor a manera macroscópica:

Ecuación 28. Balance general de balance de calor para un biorreactor

$$\dot{Q}_{acc} = \dot{Q}_{met} - \dot{Q}_{exch} - \dot{Q}_{evap} - \dot{Q}_{sen}$$

Fuente: GUTIERREZ ROJAS, M. et al. Heat transfer in Citric Acid Production by Solid State Fermentation. Process Biochemistry 1996. v 31,n4:363-9 pp.; y PANDEY, A. Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. Neuropsychological rehabilitation. 2001. Asiatech Publishers Inc. New Delhi. 75 p.

Donde:

\dot{Q}_{acc} : Tasa de acumulación

\dot{Q}_{met} : Tasa de generación de calor por el metabolismo

\dot{Q}_{exch} : Tasa de calor de intercambio de los alrededores o al intercambiador

\dot{Q}_{evap} : Tasa de pérdida de calor de evaporación del medio

\dot{Q}_{sen} : Tasa de ganancia de entalpia sensible de corriente de aire (entrada-salida).

Dada la ecuación 28, se estima que, para el balance del sistema planteado, la tasa de acumulación (\dot{Q}_{acc}) sea de 0, al igual que la la pérdida de calor (\dot{Q}_{evap}) para este análisis se asume como 0, dada que la perdida por evaporación es realmente despreciable para el sistema, dado que el aire de salida no es de temperatura cercana a la del cambio de fase, acomodando los términos de la ecuación 28, da como resultado:

Ecuación 29. Balance general de balance de calor para un biorreactor

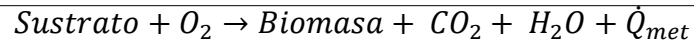
$$0 = \dot{Q}_{met} - \dot{Q}_{exch} - \dot{Q}_{sen}$$

Fuente: elaboración propia a partir de información de GUTIERREZ ROJAS, M. et al. Heat transfer in Citric Acid Production by Solid State Fermentation. Process Biochemistry 1996. v 31,n4:363-9 pp.; y PANDEY, A. Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. Neuropsychological rehabilitation. 2001. Asiatech Publishers Inc. New Delhi. 75 p.

Para obtener el calor generado de metabolismo, representado como el calor del crecimiento celular, \dot{Q}_{met} durante un proceso de propagación, sería conveniente conocer el calor molar de combustión del sustrato que es consumido.⁷⁷

⁷⁷ FIGUEROA MONTERO, Arturo Alejandro. Modelamiento de la transferencia de calor y masa (agua) en un biorreactor de charolas para fermentación en medio sólido. 2011. Tesis para obtener el grado de Doctor en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. p35

Ecuación 30. Expresión general para un proceso aerobio.



Fuente: PANDEY, A. Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. Neuropsychological rehabilitation. 2001. Asiatech Publishers Inc. New Delhi. 75 p.

DUTTA, Rajiv, asegura que el calor de la combustión de los microorganismos es bastante constante con un valor típico de 5 kcal / g. Donde la cantidad de calor generado depende de la eficiencia de la utilización de energía de carbono.

La cantidad de calor generado depende de la eficiencia del carbono y el aprovechamiento energético. Por lo tanto, la medición del calor de la fermentación puede estar relacionada indirectamente con el crecimiento celular.⁷⁸

El calor sensible, \dot{Q}_{sen} , puede ser calculada a partir de la entalpia del aire, la cual es generalmente definida por PANDEY, A. et al.

Ecuación 31. Entalpia del aire

$$\dot{Q}_{sen} = ((0.24 + 0.45H)T + \lambda H) * \dot{m} \text{ de aire seco}$$

Fuente: PANDEY, A. Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. Neuropsychological rehabilitation. 2001. Asiatech Publishers Inc. New Delhi. 75 p.

Donde \dot{Q}_{sen} hace referencia a la entalpia del aire húmedo en unidades de [kcal/kg aire seco]. H: es la humedad absoluta del aire [kg agua/kg aire seco], el cual es obtenido mediante la lectura de la carta psicrométrica diseñada para Bogotá por ALONSO PUERTO, Efraín⁷⁹ Esta carta se puede encontrar en el anexo I del documento. λ , como el calor latente de vaporización del agua [kcal/kg agua], y T, temperatura a la que está. Por lo tanto, se tiene que:

Un valor de humedad absoluta del aire de 111.25 grains/lbm, convertidas a SI, se obtiene que

$$H = 111.25 \frac{\text{grains}}{\text{lbm}} * \frac{6.47989 * 10^{-5} \text{kg}}{1 \text{ grain}} * \frac{2.2046 \text{ lbm}}{1 \text{ kg}}$$

$$H = 0.0159 \frac{\text{kg agua}}{\text{kg aire seco}}$$

⁷⁸ DUTTA, Rajiv. Fundamentals of biochemical engineering. 2008. Ane Books India, 2008 Editorial Springer. ISBN 978-81-8052-202-4. P119.

⁷⁹ ALONSO PUERTO, Efrain. Bogotá psychrometric chart. Pagina web[En línea] Consultada el 30 de octubre de 2019. Disponible en: <https://efrainpuerto.files.wordpress.com/2011/12/bogotc3a1-psychrometric-chart.pdf>

Por lo tanto, se conoce como \dot{Q}_{sen}

$$\dot{Q}_{sen} = \left(0.24 + \left(0.45 * 0.0159 \frac{kg \text{ agua}}{kg \text{ aire seco}} \right) \right) * 30^{\circ}C + 539.4 \frac{kcal}{kg}^{80}$$

$$* 0.0159 \frac{kg \text{ agua}}{kg \text{ aire seco}}$$

$$\dot{Q}_{sen} = 15.987 \frac{kcal}{kg \text{ aire seco}}$$

Partiendo de la ecuación 29, se puede conocer la tasa de intercambio de calor:

$$\dot{Q}_{exch} = \dot{Q}_{met} - \dot{Q}_{sen}$$

Se convierte todo el calor obtenido únicamente a unidades de Watts,
Donde:

$$\dot{Q}_{met} = 5 \frac{kcal}{g} * 2.066 * 10^{-5} \frac{g \text{ de Sacarosa Consumida}}{s} * \frac{4184 \text{ J}}{1 \text{ kcal}}$$

$$\dot{Q}_{met} = 0.432 \text{ w}$$

Y para Q_{sen} :

Se parte de las definiciones

$\rho = \frac{m}{V}$ y $Q = \frac{V}{t}$; donde se iguala volumen, generando una expresión:

Ecuación 32. Relaciones de densidad y caudal para determinar flujo másico.

$$\dot{m} = \frac{\dot{Q}}{\rho}$$

Fuente: elaboración propia.

Donde:

\dot{m} : Flujo másico

\dot{Q} : Caudal

ρ : Densidad

Donde el caudal \dot{Q} corresponde al flujo de aire de entrada por la bomba neumática de 2.11 L/min; t es el tiempo de propagación estimado a 20h; ρ como densidad del aire a una temperatura de 20°C, de 1.204 kg/m³ según CRITTENDEN, John C ⁸¹

⁸⁰ ÇENGEL, Yunus A., BOLES, Michael A. Termodinámica. 7ma edición. 2012. Mexico: McGraw-Hill, 1999. pg 914.

⁸¹ CRITTENDEN, John C. et al. MWH's Water Treatment - Principles and Design (3rd Edition) - En: B.2Change in Atmospheric Pressure with Elevation. John Wiley & Sons. p1859.

$$\dot{m} = \frac{2.11 \frac{L}{min} * \frac{1m^3}{1000L} * \frac{1 min}{60 s}}{1.204 \frac{kg}{m^3}}$$

$$\dot{m} = 2.921 * 10^{-5} \frac{kg \text{ de aire seco}}{s}$$

Entonces:

$$\dot{Q}_{sen} = 15.987 \frac{kcal}{kg \text{ aire seco}} * 2.921 * 10^{-5} \frac{kg \text{ de aire seco}}{s} * \frac{4184 J}{1 kcal}$$

$$\dot{Q}_{sen} = 1.954 w$$

Por lo tanto, el calor de intercambio será:

$$\dot{Q}_{exch} = \dot{Q}_{met} - \dot{Q}_{sen}$$

$$\dot{Q}_{exch} = 0.432 w - 1.954 w.$$

$$\dot{Q}_{exch} = -1.522 w.$$

El signo negativo indica que es un calor de enfriamiento, lo cual concuerda con DUTTA, lo que significa que se debe poner un sistema de enchaquetamiento que retire -1.522 W del calor generado durante la propagación de biomasa. Se plantea agua como refrigerante para retirar este calor.

Dado que el \dot{Q}_{exch} es la tasa de calor de intercambio de los alrededores o al intercambiador quiere decir que este calor es igual al recibido por el agua de refrigeramiento lo que quiere decir que:

Ecuación 33. Tasa de calor de intercambio en los alrededores.

$$\dot{Q}_{exch} = \dot{Q}_{H_2O} = \dot{m}_{H_2O} * C_{p_{H_2O}} * \Delta T$$

Fuente: elaboración propia.

De la ecuación 33, se puede obtener el flujo másico de agua requerido en el sistema para mantener la temperatura del medio en el parámetro establecido de $30 \pm 2^{\circ}C$. Para ello se asume una diferencia de $\Delta T = -1^{\circ}C = -1 K$, no se fijan unos valores dados que estos se acoplaran a la temperatura que será medida cuando el reactor ya este instalado.

Despejando de la ecuación 33 se obtiene que:

Ecuación 34. Flujo másico para intercambio de calor en el biorreactor

$$\dot{m}_{H_2O} = \frac{\dot{Q}_{H_2O}}{Cp_{H_2O} * \Delta T}$$

Fuente: elaboración propia.

Donde:

$$Cp_{H_2O} = 4180 \frac{J}{kg * K} \text{ según ÇENGEL, Yunus.}^{82}$$

$$\dot{m}_{H_2O} = \frac{-1.522 \text{ w}}{4180 \frac{J}{kg * K} * -1 K}$$

$$\dot{m}_{H_2O} = 3.641 \times 10^{-4} \frac{kg}{s} * 3600 \frac{s}{h} = 1.311 \frac{kg}{h}$$

Dando como resultado, un flujo de agua refrigerante de $1.311 \frac{kg}{h}$ durante la propagación de biomasa.

3.4 SELECCIÓN DE MODO DE AGITACIÓN.

La producción de biomasa de *Azotobacter chroococcum*, es un proceso aeróbico, siendo una de las tareas más difíciles de lograr dado que la solubilidad del oxígeno en agua es muy baja, incluso menos en caldos de fermentación.⁸³ OROS DAMIR⁸⁴ resalta que un porcentaje el cual debe mantenerse esta bacteria es de una presión parcial de oxígeno en aproximadamente pO_2 30%. Para proporcionar un porcentaje parcial de oxígeno constante a lo largo de la fermentación, se debe contemplar una constante agitación para hacer que se favorezca más esta transferencia, además que también favorecerá la mezcla de macro y micronutrientes para mantener una propagación homogénea.

3.5 CONFIGURACIÓN GEOMETRICA Y DIMENSIONADO

Definiendo el modo de operación de acuerdo al numeral 3.1 donde fue establecido el modo de operación tipo Batch, el biorreactor consistirá en un recipiente de vidrio borosilicato, dado a la particularidad de que es traslucido y permite ver a través del biorreactor y poder realizar seguimientos cualitativos in situ, del contenido del biorreactor, entre otras características, el vidrio boro silicato tiene la resistencia a cambios bruscos de temperatura, el cual resiste las condiciones de la autoclave.

⁸² ÇENGEL, Yunus A., BOLES, Michael A. Termodinámica. 7ma edición. 2012. México: McGraw-Hill, En: Tablas de propiedades, figuras y diagramas (unidades SI), Tabla A-3. p 912.

⁸³ DUAN, Y., & Shi, F. Bioreactor design for algal growth as a sustainable energy source. En: Reactor and Process Design in Sustainable Energy Technology. 2014. PP 30

⁸⁴ OROS, Damir et al.. Op. Cit., p. 1

La geometría del biorreactor corresponde a ser cilíndrica, cuyo volumen corresponde a la siguiente ecuación:

Ecuación 35. Ecuación de volumen para el biorreactor

$$V_{\text{biorreactor}} = \pi * \frac{d^2}{4} * h$$

Fuente: GEANKOPLIS, Christie J. Procesos de transporte y operaciones unitarias. Tercera edición. México. 1998. Compalía editorial continental, S.A. pg 165.

Donde:

V : Volumen

d : Diámetro

h : Altura

Donde se debe llevar a cabo la heurística de la relación del volumen y el diámetro.

Ecuación 36. Heurística de diseño, relación diámetro y altura.

$$d \approx \frac{2}{3} h$$

Fuente: TRUJILLO ROLDAN, Mauricio. Memorias del II Curso Internacional Escalado de Bioprocesos y Entrenamiento en Operación de Biorreactores. [6 de septiembre del 2012]. Consultado el 30 de octubre de 2019. Página web, disponible en <https://ciencias.medellin.unal.edu.co/eventos/cursodebiorreactores/>

Si se igualan las ecuaciones 35 y 36, se obtiene la siguiente relación

Ecuación 37. Altura de biorreactor a partir de las relaciones de heurísticas

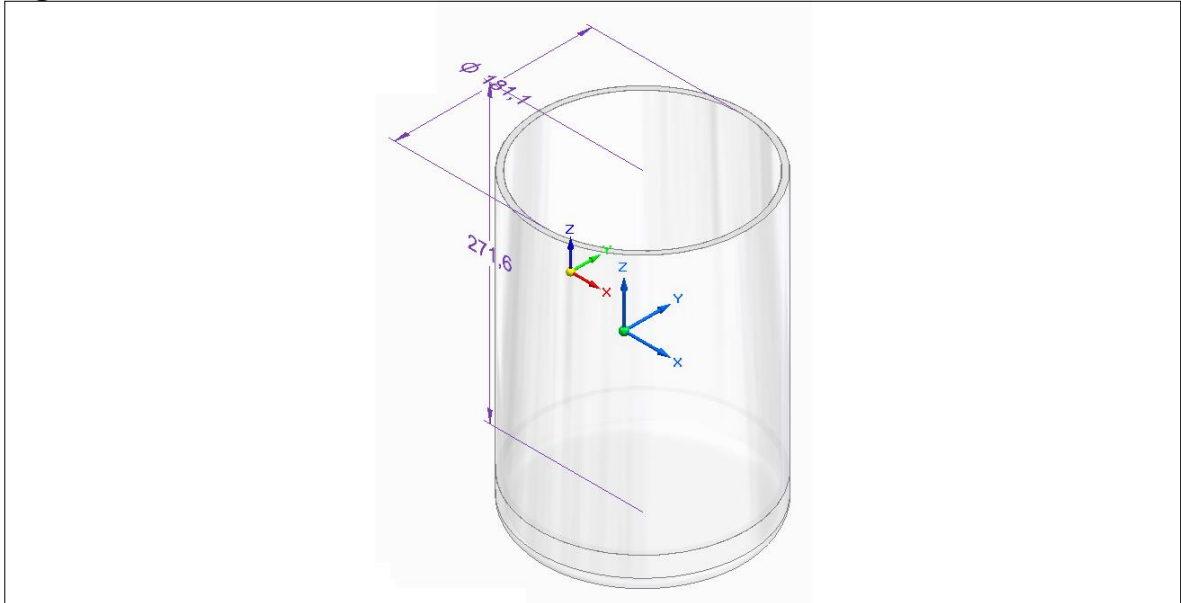
$$h = \sqrt[3]{\frac{V_{\text{biorreactor}} * 9}{\pi}}$$

Fuente: GEANKOPLIS, Christie J. Procesos de transporte y operaciones unitarias. Tercera edición. México. 1998. Compalía editorial continental, S.A. pg 165.

$$h = \sqrt[3]{\frac{7 * 10^{-3} m^3 * 9}{\pi}}$$
$$h = 0.2716 m ; d = 0,1811 m$$

A continuación, en la figura 18, a modo de ejemplificación de todas las dimensiones presentes del tanque de mezclado, calculadas en la ecuación 37.

Figura 18. Dimensionado del recipiente del biorreactor



Fuente: elaboración propia en Solid edge, 2020. Versión de prueba utilizada entre los meses octubre y noviembre de 2019.

Para el momento de la operación del biorreactor, se debe utilizar solo del 60-75% de su volumen total la por seguridad en la operación. Conociendo esto, el 75% correspondiente a un volumen total de $5.25 * 10^{-3} m^3$.

Para conocer la altura del medio líquido, se parte de la ecuación 38.

$$h_L = \sqrt[3]{\frac{5.25 * 10^{-3} m^3 * 9}{\pi}} = h_L = 0.2468 m.$$

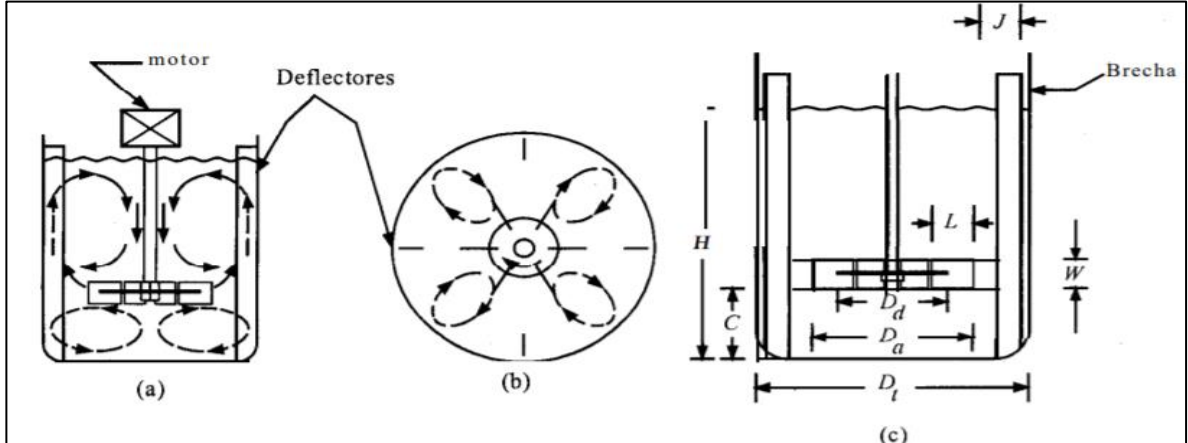
Para el dimensionamiento interno, correspondiente a los agitadores y placas deflectoras necesarias, el uso de estos, son usados para velocidades altas, dado a que, si no están presentes, se puede generar la formación de vórtices (remolinos) y esto no genera una buena capacidad de mezclado.⁸⁵ La figura 19 representa el dimensionamiento interno para el tanque agitado.

Para la funcionalidad del proceso para favorecer la transferencia de masa del medio de cultivo a las células, además del intercambio gaseoso del aire constantemente entrante, se escogen los agitadores de turbina de disco (Turbina Rushton), estas pueden tener entre cuatro a seis aspas planas, también sobresalen dado a que estas permiten manejar un amplio rango de viscosidad. Otra particularidad de este tipo de agitadores, es su orden de velocidad media, que oscila entre las 100 a 300

⁸⁵ GEANKOPLIS, Christie J. Procesos de transporte y operaciones unitarias. Tercera edición. México. 1998. Compalia editorial continental, S.A. pg 165.

rpm, son incluso más económicas y fáciles de construir que los agitadores de hélice o de placas inclinadas.⁸⁶

Figura 19. Tanque con deflectores con un agitador de turbina de seis aspas con disco, que muestra patrones de flujo: A) vista lateral, b) Vista superior, c) dimensiones de la turbina y el tanque.



Fuente: GEANKOPLIS, Christie J. Procesos de transporte y operaciones unitarias. Tercera edición. México. 1998. Compalia editorial continental, S.A. pg 165.

QUINTERO RAMIREZ, Rodolfo.⁸⁷, CASTILLO URIBE, Vladimir., y GEANKOPLIS, Christie J. y TREYBAL., Robert E., establecieron que existen semejanzas geométricas para el diseño de un agitador, donde se incluyen variables a considerar, también como las expresadas en la figura 29, como Diámetro del estanque (D_t), Diámetro de las paletas (D_a), Altura del fluido (H), ancho y cantidad de placas deflectoras o baffles (J), distancia desde el fondo del tanque hasta el impulsor (C) y la brecha que existe entre la placa deflectora y el deflector (F).

Partiendo del dimensionado estimado, relaciones para la configuración geométrica del biorreactor, y con las dimensiones obtenidas:

$$H \approx 0,27 m$$

$$D_t \approx 0,18 m$$

$$H_L \approx 0,25 m$$

Donde:

H : Altura del tanque

D_t : Diámetro total del tanque

H_L : Altura del líquido

⁸⁶ CASTILLO URIBE, Vladimir. Diseño y cálculo de un agitador de fluidos. Tesis para obtener el título de Ingeniero Mecánico. Universidad del Bío Bío. 2013. pg 28

⁸⁷ QUINTERO RAMÍREZ, Rodolfo. Transferencia de oxígeno y diseño de fermentadores. En: Ingeniería bioquímica. México: Editorial Alhambra Mexicana, 1987. p. 81-95. Citado por CARDONA CARDONA ARRIETA Jessica Paola. Desarrollo de la ingeniería básica para la producción de la

Se debe establecer el diámetro del impulsor, D_a , el cual conlleva ambos extremos de las paletas de la turbina se toma la siguiente relación, donde puede ser desde 0.3 hasta 0.5.

Ecuación 38. Diámetro del impulsor

$$\frac{D_a}{D_t} = 0.5$$

Fuente: CASTILLO URIBE, Vladimir. Diseño y cálculo de un agitador de fluidos. Tesis para obtener el título de Ingeniero Mecánico. Universidad del Bío Bío. 2013. pg 28; y QUINTERO RAMÍREZ, Rodolfo. Transferencia de oxígeno y diseño de fermentadores. En: Ingeniería bioquímica. México: Editorial Alhambra Mexicana, 1987. p. 81-95.

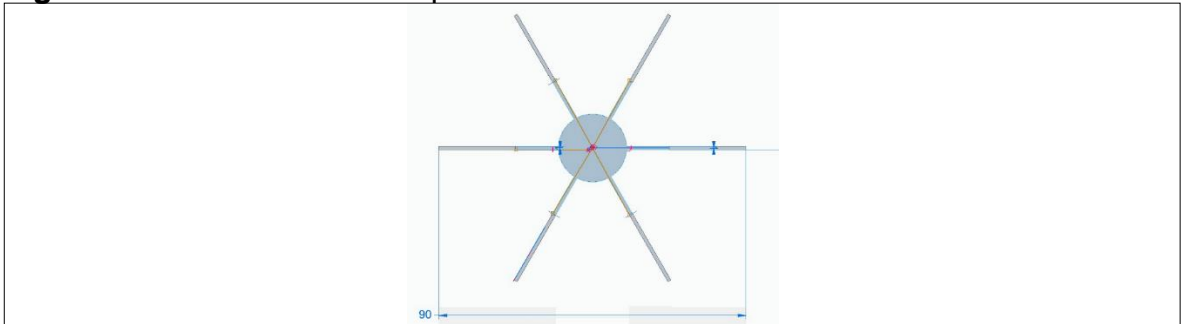
Donde:

D_a : Diámetro del impulsor

D_t : Diámetro total del tanque

$$D_a = 0.5 * 0,18 m = 0.09 m.$$

Figura 20. Diámetro de las aspas



Fuente: elaboración propia en Solid Edge, 2020. Versión de prueba utilizada entre los meses octubre y noviembre de 2019.

La distancia del fondo a la base del impulsor se da mediante la siguiente relación:

Ecuación 39. Relación para obtener distancia del fondo del impulsor

$$\frac{C}{D_t} = 0.33 ; C = 0.18m * 0.33 ; C = 0.059 m$$

Fuente: CASTILLO URIBE, Vladimir. Diseño y cálculo de un agitador de fluidos. Tesis para obtener el título de Ingeniero Mecánico. Universidad del Bío Bío. 2013. pg 28; y QUINTERO RAMÍREZ, Rodolfo. Transferencia de oxígeno y diseño de fermentadores. En: Ingeniería bioquímica. México: Editorial Alhambra Mexicana, 1987. p. 81-95.

Donde:

C : Fondo del impulsor

Las dimensiones de las paletas del impulsor se determinan mediante las siguientes relaciones:

Ecuación 40. Dimensión de las paletas del impulsor (ancho)

$$\frac{W}{D_a} = 0.2 ; W = 0.2 * 0.09 \text{ m} ; W = 0.018 \text{ m}.$$

Fuente: CASTILLO URIBE, Vladimir. Diseño y cálculo de un agitador de fluidos. Tesis para obtener el título de Ingeniero Mecánico. Universidad del Bío Bío. 2013. pg 28; y QUINTERO RAMÍREZ, Rodolfo. Transferencia de oxígeno y diseño de fermentadores. En: Ingeniería bioquímica. México: Editorial Alhambra Mexicana, 1987. p. 81-95.

Donde:

W : Ancho de las paletas del impulsor.

Ecuación 41. Dimensión de las paletas del impulsor (largo)

$$\frac{L}{D_a} = 0.25 ; L = 0.25 * 0.09 \text{ m} ; L = 0.0225 \text{ m}.$$

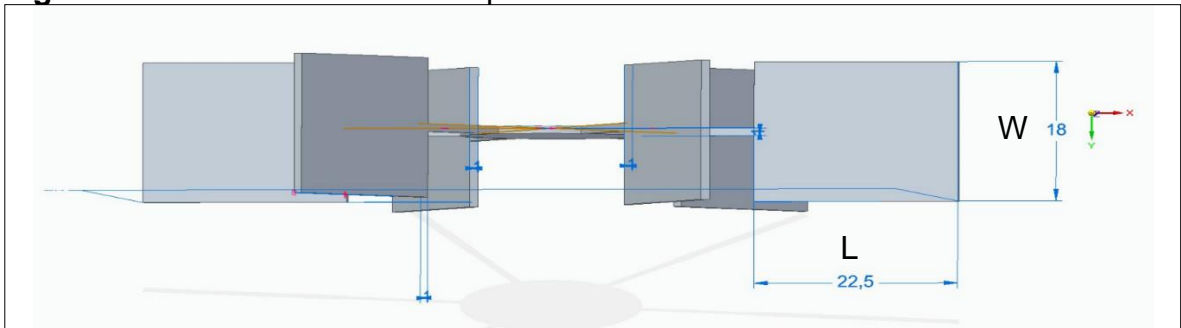
Fuente: CASTILLO URIBE, Vladimir. Diseño y cálculo de un agitador de fluidos. Tesis para obtener el título de Ingeniero Mecánico. Universidad del Bío Bío. 2013. pg 28; y QUINTERO RAMÍREZ, Rodolfo. Transferencia de oxígeno y diseño de fermentadores. En: Ingeniería bioquímica. México: Editorial Alhambra Mexicana, 1987. p. 81-95.

Donde:

L : Largo de las paletas del impulsor.

La figura 32 representa el dimensionamiento de las paletas, en conjunto.

Figura 21. Dimensiones de las asp



Fuente: elaboración propia en Solid Edge, 2020. Versión de prueba utilizada entre los meses octubre y noviembre de 2019.

Las dimensiones de los baffles o deflectores se determinan a partir de la siguiente relación, se establece la necesidad de 4 de estos, dado la generación de vórtices por el agitado de las aspas de la turbina Rushton.

Ecuación 42. Relación para determinar las dimensiones de los deflectores

$$\frac{J}{D_t} = 0.1 ; J = 0.18m * 0.1 ; J = 0.018 m$$

Fuente: CASTILLO URIBE, Vladimir. Diseño y cálculo de un agitador de fluidos. Tesis para obtener el título de Ingeniero Mecánico. Universidad del Bío Bío. 2013. pg 31; y QUINTERO RAMÍREZ, Rodolfo. Transferencia de oxígeno y diseño de fermentadores. En: Ingeniería bioquímica. México: Editorial Alhambra Mexicana, 1987. 92p .

Donde:

J : Ancho del baffle.

Las dimensiones entre placa y el estanque se da mediante la siguiente relación:

Ecuación 43. Relación para determinar la distancia de los deflectores a la pared del vaso del biorreactor.

$$\frac{f}{D_t} = 0.02 ; f = 0.18 m * 0.02 ; f = 3,6 mm$$

Fuente: CASTILLO URIBE, Vladimir. Diseño y cálculo de un agitador de fluidos. Tesis para obtener el título de Ingeniero Mecánico. Universidad del Bío Bío. 2013. pg 31; y QUINTERO RAMÍREZ, Rodolfo. Transferencia de oxígeno y diseño de fermentadores. En: Ingeniería bioquímica. México: Editorial Alhambra Mexicana, 1987. 92 p.

Donde:

f : Distancia de los baffles a la pared del biorreactor.

Conociendo todas las dimensiones del biorreactor, en el Anexo J, Anexo K y Anexo L, se encontrarán todas las configuraciones geométricas.

Para la puesta en marcha del biorreactor, se establecen las condiciones de operacionales, como lo estipulado en la tabla 13.

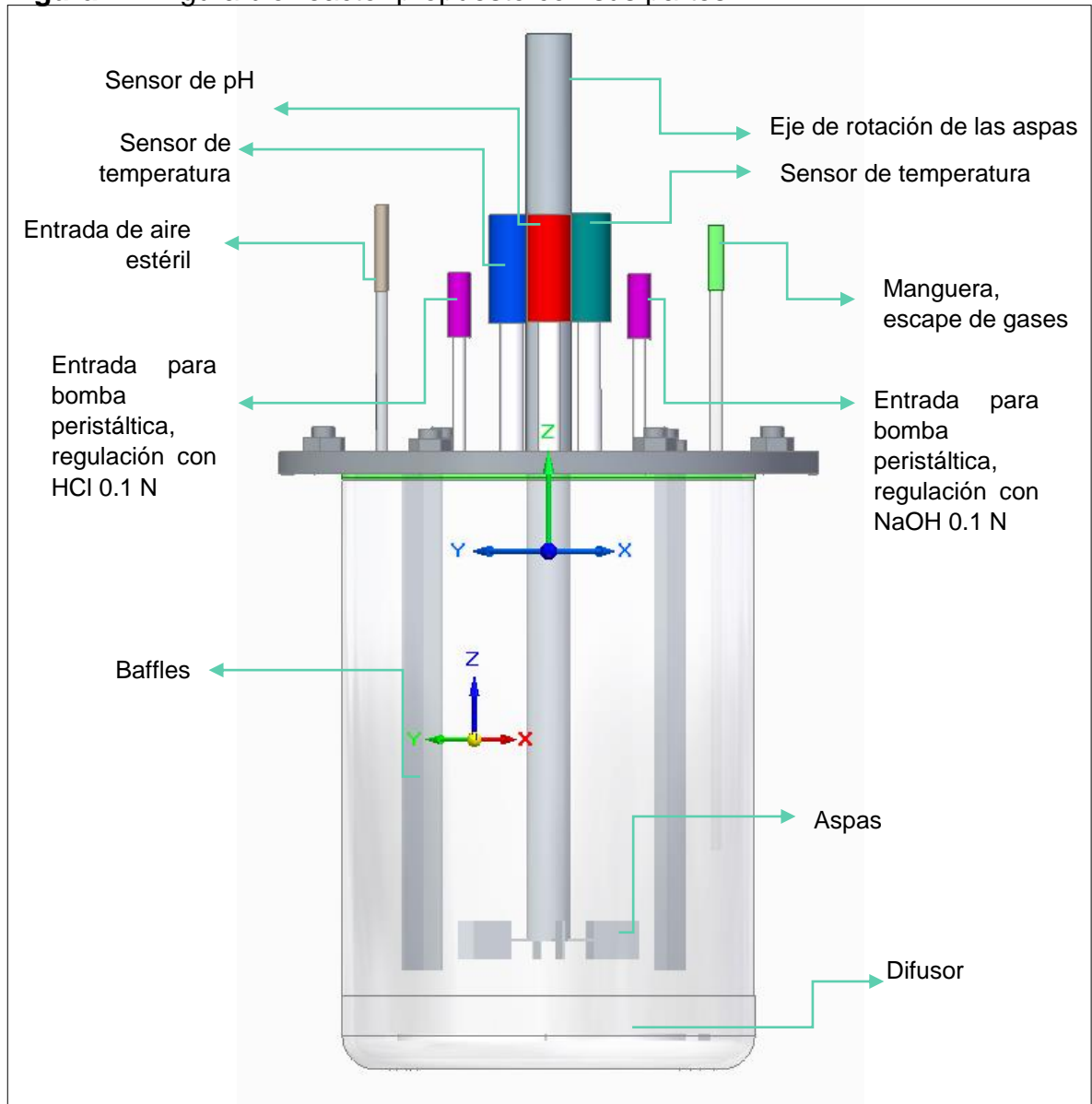
Tabla 13. Condiciones operacionales.

Condiciones de operación	Abreviatura	Valor	Unidad
Temperatura	T	30	°C
Volumen de aireación	vvm	1	vvm
Flujo masico de agua de refrigeración	\dot{m}	1.311	Kg/h
pH	pH	6.5-7.5	pH
Tiempo de retención	Tb	19-27	h

Fuente: elaboración propia.

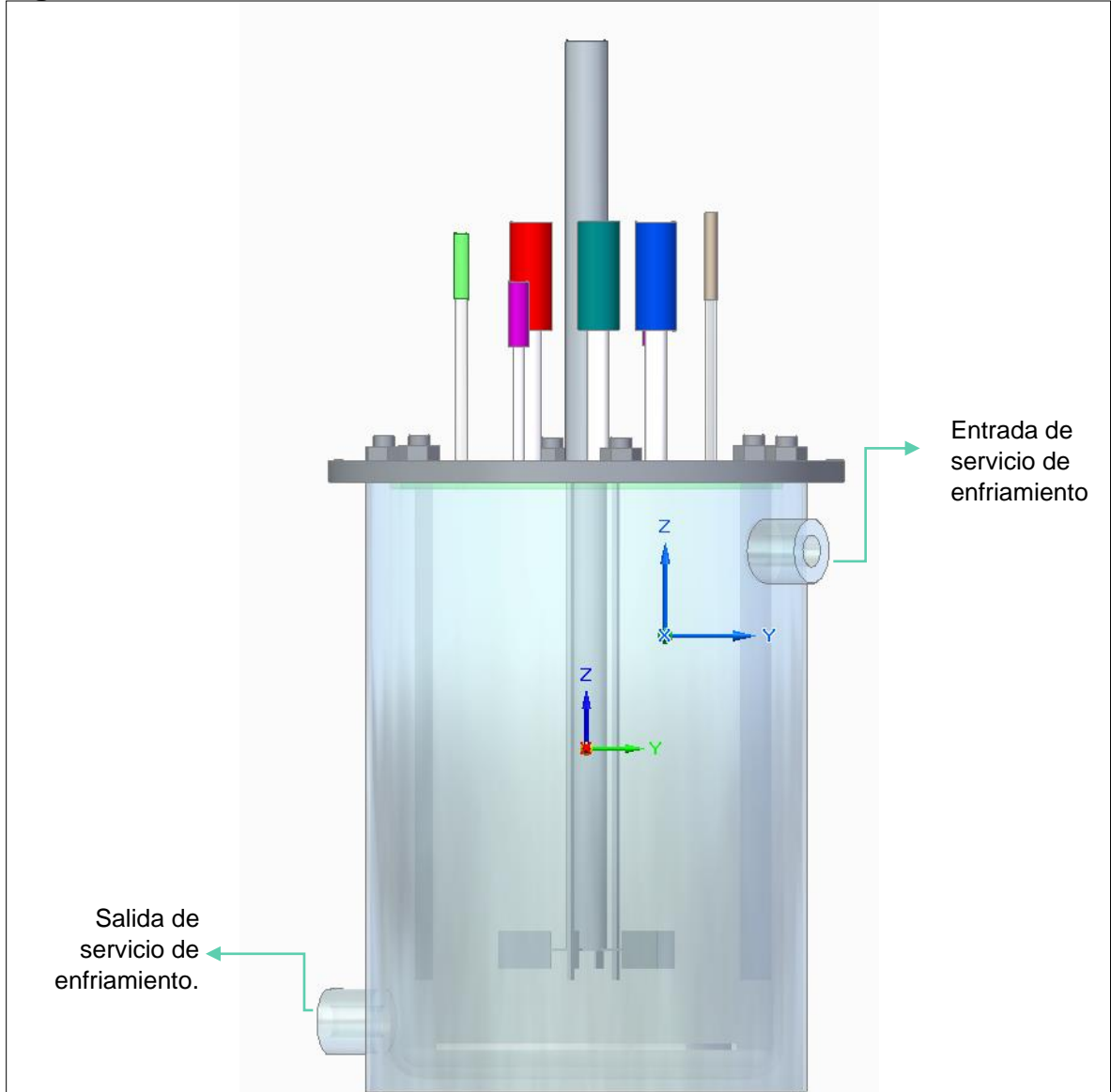
Finalmente, se realizó el prototipo en el programa Solidedge 2020. Versión de prueba utilizada entre los meses octubre y noviembre de 2019. Donde se pueden manifestar la correcta disposición de los elementos que lo componen, dentro de su dimensionamiento interno, y la entrada para sensores de seguimiento de pH, temperatura y aireación, como lo demuestran las figuras 22 y 23.

Figura 22. Figura biorreactor propuesto con sus partes.



Fuente: elaboración propia en Solid Edge, 2020. Versión de prueba utilizada entre los meses octubre y noviembre de 2019.

Figura 23. Biorreactor con chaqueta de refrigeración



Fuente: elaboración propia en Solid Edge, 2020. Versión de prueba utilizada entre los meses octubre y noviembre de 2019.

3.6 MODO DE AGITACIÓN

El tipo de flujo existente en un sistema agitado depende del diseño del rodete. Para garantizar un flujo radial, se deben manejar las palas de los rodetes rectas y paralelas al eje vertical del agitador del tanque, la turbina de paletas planas propuesta proporcionará una agitación eficiente bajo una velocidad entre 150 -180 rpm. A diferencia de los rodetes de flujo axial, que generarían corrientes de flujo paralelo al eje, cuyas paletas planas deben tener una inclinación inferior a 90°, este tipo de rodetes son especiales únicamente para corrientes verticales fuertes, como una mezcla heterogénea que contenga partículas sólidas, para evitar que estas se depositen en el fondo.

El agitador tipo turbina de paletas planas, generará una corriente de flujo en dirección radial o tangencial, donde se creará cierto flujo circular, que se verá reducido mediante la colocación de 4 deflectores.^{88 89}. Además, una de las características de las palas del rodete planas, es que, al ser completamente lisas, evitarán el resguardo de microorganismos sobre estas.

3.7 TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

La respiración de *Azotobacter chroococcum* es aeróbica, por lo tanto, se necesita dentro del diseño del biorreactor, un sistema de inyección de oxígeno, mediante burbujas, las cuales son el medio de transferencia de materia gas-líquido. La salida de las burbujas se da mediante los difusores ubicados debajo del rodete. Al estar constantemente en rotación los rodetes tipo turbina, ante la salida de las burbujas por el difusor, este provoca un alto nivel de dispersión del gas a través de todo el recipiente. También es de importancia conocer las sustancias típicas del medio de cultivo, el cual contiene un porcentaje de sales, las cuales impiden la coalescencia⁹⁰ donde se evita que las burbujas colisionen entre sí, para formar burbujas más grandes, un tamaño mayor de la burbuja impide una óptima transferencia de oxígeno a las células.

3.8 AGENTES ANTIESPUMANTES

En sistemas aeróbicos, es muy común la formación de espuma. El control de esta está incluido en uno de los parámetros más sobresalientes a la hora del diseño, dado que, si esta no se retira debidamente, puede interferir con la salida de los gases del producto de propagación, también se puede considerar como posible vía de acceso ante microorganismos contaminantes.

Existen dos modos de sistemas antiespumantes disponibles en la industria.

⁸⁸DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos., Op Cit. 149

⁸⁹ MCCABE, Warren. Agitación y mezcla de líquidos. En: Operaciones unitarias en Ingeniería Química. 7ª Edición. Madrid: Ms Graw Hill, 2007.p.287-288.

⁹⁰ DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos., Op Cit. 213

El primero y el más recomendado es de destrucción mecánica, donde son usados discos rotatorios de alta velocidad que giran en la superficie del recipiente,⁹¹ o dispositivos rotativos ultrasónicos⁹². El segundo método de control de espuma es de manera química, que dependiendo de su naturaleza, pueden ser antiespumantes orgánicos, el cual es mezcla de dispersiones orgánicas de poliéter a base de polipropileno sin silicona, y también los antiespumantes de siliconas los cuales se componen de un polímero a base de silicona que tiene un rango de peso molecular de 3.200 a 16.500 Da.⁹³ Sin embargo, no siempre se pueden agregar agentes antiespumantes y químicos para la reducción de la espuma ya que puede causar efectos inhibitorios sobre el crecimiento de microorganismos⁹⁴, agregado a esto alteran las propiedades del líquido, como la disminución de la movilidad de la interfase gas-líquido, disminuyendo el valor del K_La pero reduce el tamaño de burbuja.

Dada los resultados experimentales de las cinéticas realizadas, se manifestó evidencia de espuma después de las 30 horas de propagación bajo agitación únicamente neumática, se podría evaluar con el modelo que combine tanta agitación neumática con mecánica para reevaluar si es necesario implementar sistemas antiespumantes hasta las 20 h de propagación y cual de los modos de sistemas antiespumantes le favorece más.

3.9 SISTEMAS DE SEGUIMIENTO.

El entorno en el biorreactor requiere el control y la medición de al menos algunos parámetros. Para el seguimiento de las variables como lo son pH, pO₂, temperatura, detección de espuma, es necesario contar con los sensores que indiquen el valor el cual cada variable se encuentra, además, y por lo conocido en las cinéticas, se sabe que el valor del pH se verá acidificado por el metabolismo de *Azotobacter chroococcum*, para ello, se debe de disponer bombas peristálticas de regulación del pH, que conforme a lo obtenido mediante la señal del sensor de pH, y según las diferencias numéricas en el *setpoint*, se deberán activar estas bombas ante la regulación del pH presente en el medio. Estas deben agregar NaOH con una concentración de 0.1N, para regular el pH. El pH siempre debe estar entre un rango de 7-7.5.

ABRAHAM, E, et al. ⁹⁵ enuncia que hay sensores ópticos conocidos como óptodos, los cuales permiten mediciones no invasivas en medios de cultivo. Uno de sus

⁹¹ Ibid., p 215

⁹² GARRETT, P.R. Garrett, P. R. Defoaming: Antifoams and mechanical methods. 2015. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 20(2), pp. 81–91.

⁹³ SIGMA ALDRICH. Product description Antifoams. [en línea]. En Merck. No hay fecha disponible. [Consultado: 25 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antifoams.html>

⁹⁴ NAJAFPOUR, G. D. Bioreactor Design. Biochemical Engineering and Biotechnology. 2015. pp 193–226.

⁹⁵ ABRAHAM, E, et al. Biorreactor for scale-up Process control. En: Mesenchymal Stromal Cells. Sowmya Viswanathan and Peiman Hematti. Walkersville,MD, United States. 2017 p.158.

principales fabricantes es PreSens (Precision Sensing GmbH, Regensburg, Alemania), estos se denominan “Sensor Spots” y son principalmente utilizados para realizar el seguimiento del pH, oxígeno disuelto o CO₂ disuelto de los cultivos en conjunción con una fibra óptica fijada frente al punto del sensor para recipientes de vidrio o plásticos transparentes. Lo particular de estos sensores es que no son invasivos y pueden establecerse desde fuera del recipiente, lo cual es bastante favorable ya que evita contaminaciones.

Además, STANBURY, Peter. F et al.⁹⁶ enuncia que el monitoreo de la temperatura es uno de los parámetros más importantes para cualquier proceso. Uno de los sensores con mayor precisión ($\pm 0.25\%$) son los termómetros de resistencia eléctrica, donde son usados normalmente una RTD de resistencia que, a 0°C, tiene 100 Ω , y a medida que aumente su temperatura, aumentará su resistencia eléctrica. La lectura se obtiene normalmente mediante el uso de un puente de circuito Wheatstone y es una medida de la temperatura promedio del elemento sensor. Siempre tendrá que mantenerse una temperatura de 30°C \pm 2°C. En el lugar donde estará ubicado el biorreactor, estará dentro una incubadora cuya temperatura se encuentre a 30°C, lo que no se considerará necesario agregarle al equipo un sistema de enchaquetamiento, dado que representaría un mayor gasto energético teniendo a disposición un entorno de temperatura favorable para la producción de biomasa.

Se debe resaltar que los soportes correspondientes a la instrumentación deben ser esterilizables, preferiblemente con vapor. Deben ser capaces de soportar altas temperaturas, (121°C) en presencia de alta humedad (100%). Dado el caso si se presentan equipos sensibles a la temperatura se puede realizar la esterilización química, pero es menos deseable.⁹⁷

3.10 CONEXIONES

Para las conexiones requeridas y accesos dentro del biorreactor, se deben manejar tuberías que permitan la entrada de sustancias de estado líquido como del caldo del medio de cultivo para producción de biomasa, entrada del inóculo, y salida del producto, también para la conexión de entrada de aire estéril y la salida de productos gaseosos de fermentación, se deberán construir todas estas tuberías en acero inoxidable de grado 316.

3.11 SERVICIOS AUXILIARES

No únicamente el sistema, (biorreactor) realizará todo por si solo para obtener un producto eficaz y deseable, sino también tendrá que disponer de servicios auxiliares que, integrados al sistema, permitirán una operación final exitosa.

⁹⁶ STANBURY, Peter. F et al. . Instrumentation and control. En: Principles of fermentation technology. Elsevier Science Ltd. 2 ed. Wheeler Road, Burlington MA. p. 215- 226.

⁹⁷ LIU, Shijie. .Bioreactor Design and Operation. 2013. Bioprocess Engineering, 915–964.

Incluidos entre los sistemas auxiliares que se requieren para preparar un lote de *Azotobacter chroococcum* son:

- a) Agua destilada para la preparación del medio de cultivo
- b) Aire estéril para el suministro de oxígeno
- c) Servicio de esterilización por autoclave
- d) Incubadora o espacio termostataado a 30°C
- e) Energía eléctrica suficiente para suplir los requerimientos mecánicos como el motor de rotación del de agitación de aspas, resistencias eléctricas para temperatura optima del agua y aireación para el funcionamiento de las bombas neumáticas

3.12 ESTERILIZACIÓN

El producto de propagación de biomasa es producido mediante el cultivo del microorganismo, en un medio enriquecido con nutrientes. Pero si la fermentación es invadida por un microorganismo extraño, pueden ocurrir consecuencias y las formas en que se pueden evitar en el cuadro 11.

Cuadro 11. Consecuencias y como se puede evitar la contaminación de agentes extraños en medios de propagación de biomasa

CONSECUENCIAS	COMO SE PUEDE EVITAR
<ul style="list-style-type: none"> • El medio tendría que proporcionar los nutrientes tanto para el microorganismo de producción como para el microorganismo contaminante, lo cual representa una pérdida de productividad. • El microorganismo extraño podría contaminar el producto final • El microorganismo contaminante podría producir compuestos o metabolitos que perjudiquen la extracción del producto final, o también podría degradarlo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Usar un inoculo puro para el inicio de la propagación • Esterilizar el medio a emplear, recipiente del fermentador y todos los materiales y equipos que se agregaran a la propagación durante el proceso • Es indispensable mantener condiciones asépticas durante la fermentación.

Fuente: elaboración propia, basada en la información de STANBURY, Peter. F et al. Steriliation. En: Principles of fermentation technology. Elsevier Science ltd. 2 ed. Wheeler Road, Burlington MA. p. 215- 226p 123.

El calor húmedo es usado universalmente para la esterilización de medios de fermentación.

La esterilización mediante vapor compone de una primera etapa, la cual consiste en el calentamiento, otra de mantenimiento de 121°C por 15min, y la otra es el enfriamiento.

Dado el tamaño del biorreactor propuesto, la esterilización mediante calor húmedo (autoclave) será la más adecuada, también se debe realizar un seguimiento de esterilización mediante las cintas indicadoras y un control biológico del correcto

funcionamiento de la autoclave, como está representado en la figura 24. Los materiales deben ser estables bajo altas temperaturas (121°C) y presión (15 psi) de la autoclave.

Figura 24. Bioindicador para autoclave



Fuente: elaboración propia

Uno de los bioindicadores de esterilidad usado para verificar la efectividad de la autoclave en la esterilización es Sterikon® plus, el cual consiste en una ampolleta con un caldo nutritivo, azúcar, indicador de pH y esporas bacterianas no patógenas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 79531⁹⁸. Cuando se realiza la esterilización a 121°C por 15 minutos, se deberá manifestar en la ampolleta un color rojo-violeta, el cual indica una correcta esterilización, como lo mostrado en la figura 29, pero si es inadecuada la esterilización, se tornará de color amarillo-naranja. Después, se deberá incubar por 48h a 60°C ± 2°C. Se deberá mantener el color rojo-violeta para garantizar que se está realizando una correcta esterilización, manifestando que no hay desarrollo ni crecimiento de las esporas de *Geobacillus stearothermophilus*.

3.13 PROPUESTA DE MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN.

La propagación de biomasa debe cumplir con estrictos requisitos asépticos. Es importante seleccionar materiales que puedan soportar repetidos ciclos de esterilización por vapor, y que estos materiales no interfieran con el proceso metabólico. Como se plantea un diseño para escala banco, es posible utilizar vidrio y / o acero inoxidable. El vidrio es útil porque proporciona superficies lisas, no es tóxico, es resistente a la corrosión y generalmente es fácil de limpiar.

Se cuenta con un recipiente de vidrio borosilicato con un fondo redondo. COWAN, C. T. y THOMAS, C. R ⁹⁹ afirman que el diámetro practico más grande para

⁹⁸ MERCK MILLIPORE. Sterikon® plus bioindicador para control de autoclaves. DataSheet. En: Merck [Sitioweb]. Colombia. [Consultado: 23 septiembre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Sterikon-plus-Bioindicator,MDA_CHEM-110274#anchor_BRO

⁹⁹COWAN, C. T.y THOMAS, C. R. Materials of construction in the biological process industries. 1988. Process Biochem. 23(1), pp. 5-111988 Citado por STANBURY, Peter. F et al. . Design of a Fermenter. En: Principles of fermentation technology. Elsevier Science ltd. 2 ed. Wheeler Road, Burlington MA. p. 172

fermentadores de vidrio es de 60 cm, por lo tanto, el diámetro propuesto para el diseño, está por debajo del diámetro máximo posible. Los recipientes de este material deben esterilizarse en autoclave.

El cilindro de vidrio debe contar con una placa superior de acero inoxidable, SOLOMONS¹⁰⁰ indica que para resistir con seguridad las presiones de trabajo, el diámetro de la placa superior no debe excederse de 30 cm, considerándolo como el límite superior.

El Instituto Americano del Hierro y el Acero (AISI)¹⁰¹ establece que los aceros que contienen menos del 4% de cromo se clasifican como aleaciones de acero y las que contienen más más del 4% están clasificados como aceros inoxidables.

Por lo tanto, AISI califica que el acero de grado 316 contiene 18% de cromo, 10% de níquel y 2-2.5% de molibdeno, composición la cual aplica para un actual y común uso en la construcción de fermentadores

Los anillos elastoméricos FKM (fluoroelastómeros) son anillos circulares de varias configuraciones de sección transversal instalados en la unión de la tapa del fermentador y del recipiente en vidrio. Cierra cualquier posible abertura y evitar la pérdida de líquido o gas, o la posible entrada de sustancias contaminantes. Denominados O-Rings por MARTINI¹⁰², son anillos que resisten a las condiciones del proceso de propagación, pero estos son de uso limitado por lo que deben ser revisados regularmente por desgaste o daños. Son de uso estático, además se usan en las entradas y salidas de tuberías.

En el Anexo M se especificará las propiedades físicas y mecánicas para los materiales mencionados, donde finalmente se propondrá que sea un cilindro de vidrio con base curva en vidrio borosilicato, el agitador, difusor y tapa serán de acero inoxidable 316L y para los sellos serán por medio de O-ring de Viton.

¹⁰⁰ SOLOMONS, G. L. Materials and Methods in Fermentation. 1969. Academic Press, London. Citado por STANBURY, Peter. F et al. . Design of a Fermenter. En: Principles of fermentation technology. Elsevier Science Ltd. 2 ed. Wheeler Road, Burlington MA. p. 172.

¹⁰¹ AMERICAN IRON AND STEEL INSTITUTE. Washington, DC. [Consultado: 23 septiembre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: <https://www.steel.org/industry-data/reports>

¹⁰² MARTINI, Leonard. Practical Seal Design.1984. Dekker, New York. P 20

4. ANÁLISIS COSTOS AL DISEÑO DE BIORREACTOR PROPUESTO

En este capítulo, se permite determinar de una manera muy aproximada el capital necesario que se requiere para llevar a cabo la producción de un lote del producto Azobac, bajo la capacidad de procesamiento por lote de 5L efectivos durante las primeras 20h de propagación, además se incluye un análisis proyectado tanto para los costos del proceso actual para dar finalmente una conclusión respecto a los ahorros que se pueden tomar con un nuevo planteamiento en cuanto a reducción de horas de trabajo y cantidad de sustrato.

4.1 COSTOS DE LA CONSTRUCCIÓN DEL BIORREACTOR

4.1.1 Costos fijos. Para el análisis del prototipo propuesto, se tomó en cuenta que las partes que constituyen para la construcción del biorreactor permanecerán dentro de un periodo determinado, sin importar si existe un cambio en el volumen de producción.

4.1.2 Costos directos. Dentro de los costos directos, se encuentra la adquisición de equipos necesarios, según lo planteado en el capítulo 3 del presente documento, los equipos que se necesitan para llevar a cabo el proceso de propagación de biomasa, son los siguientes, nombrados en la tabla 23. También se incluyen equipos para preparación de material estéril.

Cuadro 12. Equipos necesarios para llevar a cabo la propagación de biomasa

USO	EQUIPO	CANTIDAD	MATERIAL
	Autoclave	1	Acero inoxidable
Equipos para preparación de material	Potenciómetro	1	Específico del proveedor
	Balanza analítica	1	Específico del proveedor
	Microscopio	1	Específico del proveedor
Piezas y sensores del Biorreactor	Vaso biofermentador (7L)	1	Vidrio borosilicato
	Piezas metálicas biofermentador	7	Acero inoxidable AISI 316
	Piezas O 'ring en FKM	1	FKM/FMP
	Rotámetro Disco rotatorio anti espuma** Opcional en función Tiempo proceso	1	Acero inoxidable AISI 316
	Sensor de temperatura	1	Específico del proveedor
	Sensor de pH	1	Específico del proveedor

Cuadro 12. (Continuación)

USO	EQUIPO	CANTIDAD	MATERIAL
Piezas y sensores del biorreactor	Sensor de pO ₂	1	Específico del proveedor
	Sensor nivel de espuma ** Opcional en función Tiempo proceso	1	Específico del proveedor
	Bomba peristáltica	1	Específico del proveedor
	Bomba neumática	1	Específico del proveedor

Fuente: elaboración propia

Teniendo en cuenta que los equipos para preparación de material ya se encuentran dentro de las instalaciones del laboratorio, únicamente se realiza una estimación de costos de las piezas e instrumentación del biorreactor. Para la estimación de los costos de estos equipos, se han empleado cotizaciones consultadas en catálogos y proveedores. En la tabla 14 se muestran los precios en pesos colombianos tomando la tasa representativa del mercado de \$3337 pesos colombianos por cada dólar.

Tabla 14. Costos directos para la adquisición de las piezas del fermentador.

EQUIPO	CANTIDAD	PRECIO UNIDAD USD	FLETE DE IMPORTACIÓN 15%	PRECIO UNIDAD COP
Vaso biofermentador Pirex 7L	1	\$429.00	\$493.35	\$1,431,573.00
Piezas metálicas biofermentador	14	\$6.00	\$6.90	\$20,022.00
Oring Parker Viton (FKM) 2-442	1	\$2.98	\$3.43	\$9,944.26
Rotámetro Dwyer	1	\$120.00	\$138.00	\$400,440.00
Sensor de temperatura	1	\$45.00	\$51.75	\$150,165.00
Sensor de pH Sensor de pH higiénico para aplicaciones estériles	1	\$650.00	\$747.50	\$2,169,050.00
Sensor de pO ₂ Sensores ópticos de oxígeno disuelto	1	\$2,400.00	\$2,760.00	\$8,008,800.00

Tabla 14. (Continuación)

EQUIPO	CANTIDAD	PRECIO UNIDAD USD	FLETE DE IMPORTACIÓN 15%	PRECIO UNIDAD COP
Sensor nivel de espuma	1	\$54.26	\$62.40	\$181,065.62
Bomba peristáltica	1	\$300.00	\$345.00	\$1,001,100.00
TOTAL				\$13,372,159.88

Fuente: elaboración propia, basada en información de FIGMAY¹⁰³, STANDAR SEAL¹⁰⁴, ENDRESS¹⁰⁵, METTLER TOLEDO¹⁰⁶ y BAODING SINGAL FLUID TECHNOLOGY Co¹⁰⁷.

4.2 COSTOS INDIRECTOS

Son aquellos los cuales intervienen en el proceso de producción del producto final pero no es visto físicamente en este, para este caso, se trata del gasto de electricidad y agua.

4.2.1 Costos de los servicios. Para obtener los costos de consumo energético y de acueducto, se siguió el costo actual en 2019, que proporciona CODENSA¹⁰⁸, el costo de cada kW consumido es de \$ \$567.1362 para sector industrial y mediante el ACUEDUCTO¹⁰⁹, por cada metro cubico consumido de agua, para un sector industrial, equivale a \$ 3601.86, los datos recopilados para el costo energético, se resumen en la tabla 15.

¹⁰³ FIGMAY. Empresa especializada en la fabricación de equipos de vidrio borosilicato y cuarzo. 2019. Pagina web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://figmay.com/>

¹⁰⁴ STANDAR SEAL .Oring Parker Viton (FKM). 2019. . Pagina web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://standard-seal.com/viton-50/V0986-2-442>

¹⁰⁵ ENDRESS. Nivel de punto. Liquidos. 2019. Pagina web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.mx.endress.com/es/instrumentacion-campo/DC21AS>

¹⁰⁶ TECSOIN.<Laura.amezquita@tecsoin.com>. “COTIZACIÓN SENSORES DE PH Y OXIGENO DISUELTO” [Correo electronico]. 11 octubre 2019. Enviado a usuario de la universidad America.

¹⁰⁷ BAODING SINGAL FLUID TECHNOLOGY Co. Bomba peristáltica. 2019. . Pagina web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: [https://spanish.alibaba.com/product-detail/peristaltic-pump0358486078.html?](https://spanish.alibaba.com/product-detail/peristaltic-pump0358486078.html?spm=a2700.galleryofferlist.normalList.1.1d5d2a49U0S5Pu&s=p)

[spm=a2700.galleryofferlist.normalList.1.1d5d2a49U0S5Pu&s=p](https://spanish.alibaba.com/product-detail/peristaltic-pump0358486078.html?spm=a2700.galleryofferlist.normalList.1.1d5d2a49U0S5Pu&s=p)

¹⁰⁸ CODENSA. Tarifario enero 2019. Pagina web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.enel.com.co/content/dam/enel-co/espa%C3%B1ol/personas/1-17-1/2019/Tarifario-enero-2019.pdf>

¹⁰⁹ ACUEDUCTO DE BOGOTÁ. Tarifas servicios de acueducto y alcantarillado. 2019. Pagina web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.acueducto.com.co/wps/portal/EAB/>

Tabla 15. Costo de los servicios por lote de producción

SERVICIO	UNIDADES	Tiempo de uso (h)	TOTAL PRECIO
Agua	Agua de refrigeración (Agua de acueducto)	\$/L	26.33 \$ 94.84
	Agua destilada (preparación medios)	\$/L	5 \$ 5,500.00
	Agua lavado material	\$/L	20 \$ 72.04
Energía eléctrica	Plancha de calentamiento	\$/kWh	1 \$ 1,134.27
	Autoclave (servicio de esterilización)	\$/kWh	8 \$ 49,907.99
	Servicios de seguimiento	\$/kWh	20 \$ 68,056.34
TOTAL			\$124,765.48

Fuente: elaboración propia basada en información de CODENSA. Tarifario enero 2019. Página web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.enel.com.co/content/dam/enel-co/espaspa%3%B1ol/personas/1-17-1/2019/Tarifario-enero-2019.pdf> y ACUEDUCTO DE BOGOTÁ. Tarifas servicios de acueducto y alcantarillado. 2019. Página web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.acueducto.com.co/wps/portal/EAB/>

4.2.2 Costos de las Materias primas. Entre las materias primas, se consideran los compuestos químicos que son necesarios para la preparación del caldo industrial, se realizó un análisis de costos para los compuestos correspondientes al caldo Ashby, representados en la tabla 16.

Tabla 16. Costo de materia prima para producción de 5L

MATERIA PRIMA	CANTIDAD POR LOTE (g/L)	% P/P	PRESENTACIÓN	PRECIO A LA VENTA	Con IVA incluido	\$(COP)/g	COSTO TOTAL PARA 5L
Sacarosa usp	25	0.50%	1 kg	\$ 2,600	\$ 3,094	\$ 1.54700	\$ 38.68
Fosfato dipotásico de hidrógeno	1	0.02%	1kg	\$ 457,200	\$ 544,068	\$ 1,088	\$ 1,088.14

Tabla 16. (Continuación)

MATERIA PRIMA	CANTIDAD POR LOTE (g/L)	% P/P	PRESENTACIÓN	PRECIO A LA VENTA	Con IVA incluido	\$(COP)/g	COSTO TOTAL PARA 5L
Sulfato de magnesio hepta-hidratado	1	0.02%	1kg	\$ 235,200	\$ 279,888	\$ 560	\$ 559.78
Cloruro de sodio	1	0.02%	1kg	\$ 10,000	\$ 11,900	\$ 24	\$ 23.80
Sulfato de calcio	1	0.02%	1kg	\$ 181,200	\$ 215,628	\$ 431	\$ 431.26
Carbonato de calcio	1	0.02%	1kg	\$ 486,000	\$ 578,340	\$ 1,157	\$ 1,156.68
Agua destilada	5000	99.40%	20 kg	\$ 20,000	\$ 23,800	\$ 1	\$ 5,950.00
	5030	100.00%				TOTAL \$ (COP)	\$ 9,248.32

TOTAL (g)

Fuente: elaboración propia basada en información proporcionada por BLAMIS.<asesorventas8@blamis.com.co>. “Cotización reactivos calidad USP” [Correo electrónico]. 17 mayo 2019. Enviado a usuario de la universidad América.

Además de las materias primas que van directamente dentro del producto, también se deben tener en cuenta otros materiales, como los de protección personal, y de desinfección, aunque la producción no está bajo riesgo biológico, como lo demostrado en el Anexo A, es necesario usar material de protección para proteger y evitar cualquier posible contaminación cruzada del producto. La información de los conceptos de materia de uso personal se describe en la tabla 17.

Tabla 17. Material de uso personal.

CONCEPTO	Consumo por lote	Unidad	Costo unitario (\$COP)	Costo por lote
Tapabocas desechables	1	pieza	\$ 10,000.00	\$ 200.00
Guantes de nitrilo (pares)	1	pieza	\$ 25,000.00	\$ 250.00
Cofias	1	pieza	\$ 10,000.00	\$ 200.00
Batas	1	pieza	\$ 30,000.00	\$ 30,000.00
Agentes de desinfección	50	ml	\$ 11,030.00	\$ 275.75
			TOTAL	\$ 30,925.75

4.3. COMPARACIÓN DE COSTOS DE PRODUCCIÓN DEL PROCESO PROPUESTO Y EL PROCESO ACTUAL

Para el cálculo de este apartado, y lo planteado en el capítulo 2, se quiere mostrar una comparativa de costos que se necesitan para llevar a cabo la producción de un lote de 5L de Azobac, producto registrado ante ICA por FUNDASES.

A continuación, en la tabla 18, se calcularon los costos con las horas llevadas como lo realizan hoy en día, durante 48h.

Tabla 18. Costos de los servicios durante 48h

SERVICIO		UNIDADES	Tiempo de uso (h)	TOTAL, PRECIO
Agua	Agua de refrigeración (Agua de acueducto)	\$/L	48	\$ 172.89
	Agua destilada (preparación medios)	\$/L	5	\$ 5,500.00
	Agua lavado material	\$/L	20	\$ 72.04
Energía eléctrica	Plancha de calentamiento	\$/kWh	1	\$ 1,134.27
	Autoclave (servicio de esterilización)	\$/kWh	8	\$ 49,907.99
	Servicios de seguimiento	\$/kWh	48	\$163,335.23
TOTAL				\$220,122.41

Fuente: elaboración propia basada en información de CODENSA. Tarifario enero 2019. Página web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.enel.com.co/content/dam/enel-co/espac3%B1ol/personas/1-17-1/2019/Tarifario-enero-2019.pdf> y ACUEDUCTO DE BOGOTÁ. Tarifas servicios de acueducto y alcantarillado. 2019. Página web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.acueducto.com.co/wps/portal/EAB/>

Respecto a los costos planteados en el numeral 4.1.2.1, se observa que si se sigue llevando la producción hasta las 48h, se tienen que pagar un excedente de \$95,415.75 COP, lo que genera un incremento del 76.51% de los servicios para mantener una producción durante 48h, cabe resaltar que a esta hora como lo demostrado en el numeral 2.3.2, no es la mejor hora para suspender el proceso, dado que a esta hora no hay un número máximo de producción de biomasa.

Si se mantiene la fuente de carbono con manitol, se verá afectado de la siguiente manera como esta en la tabla 19.

Tabla 19. Costos de las materias primas con una concentración de 10g/l

MATERIA PRIMA	CANTIDAD POR LOTE (g/L)	PRECIO A LA VENTA	CON IVA INCLUIDO	\$(COP)/g	COSTO TOTAL PARA 5L
D-manitol usp	50	\$ 10,500	\$ 12,495	\$ 0.49980	\$ 24.99
Fosfato dipotásico de hidrogeno	1	\$ 457,200	\$ 544,068	\$ 1,088	\$ 1,088.14
Sulfato de magnesio heptahidratado	1	\$ 235,200	\$ 279,888	\$ 560	\$ 559.78
Cloruro de sodio	1	\$ 10,000	\$ 11,900	\$ 24	\$ 23.80
Sulfato de calcio	1	\$ 181,200	\$ 215,628	\$ 431	\$ 431.26
Carbonato de calcio	1	\$ 486,000	\$ 578,340	\$ 1,157	\$ 1,156.68
Agua destilada	5000	\$ 20,000	\$ 23,800	\$ 1	\$ 5,950.00
TOTAL (g)	5055			TOTAL \$ (COP)	\$ 9,234.64

Fuente: elaboración propia basada en información proporcionada por BLAMIS.<asesorventas8@blamis.com.co>. “Cotización reactivos calidad USP” [Correo electrónico]. 17 mayo 2019. Enviado a usuario de la universidad América.

Dado que los costos planteados en el numeral 4.1, son planteados bajo una reformulación de medio, basados en sacarosa, y como el consumo de sustrato se considera que es aproximadamente 3 g, se podría plantear la posibilidad de reducir la concentración de la fuente de carbono a un 50%, pero como el proceso actual se maneja bajo una fuente de carbono Manitol, se presenta una variedad de precios, donde no se puede comparar de manera certera. Las comparaciones obtenidas demuestran un aumento de \$ 90.12 COP si se llegara a reformular el medio con la mitad de fuente de carbono.

3.14 ALTERNATIVA PARA ADQUISICION DE UN EQUIPO YA COMPLETO

Cabe mencionar que hay empresas que se dedican a la elaboración de estos biorreactores, de volumen 7L, de materiales idénticos a los propuestos.

Una de estas empresas, es JP Inglobal, ubicada en la ciudad de Bogotá, D.C, la cual tiene las especificaciones técnicas dadas en el anexo N.

De manera general, se describe el producto como Vaso de 7 L Total, volumen de trabajo hasta 5.3 Litros, construcción en vidrio de borosilicato con chaqueta térmica

de agua y fondo toriesférico¹¹⁰. La figura 25 representa un biorreactor completo, con sistemas de lazos de control.

Figura 25. Biorreactor con sistema de automatización de JP Inglobal



Fuente: JP Inglobal. <comercial@jpinglobal.com>. “BIOREACTORES” [Correo electrónico]. 23 septiembre 2019. Enviado a usuario de la universidad América.

El fabricante, maneja los siguientes precios, como lo estipula la tabla 20.

Tabla 20. Precio de reactor dado por JP Inglobal.

Ítem	Referencia	Precio unitario	IVA	Total
BIOREACTOR DIGITAL AUTOCLAVABLE - CAPACIDAD TOTAL 7 LITROS	JPFM7L	\$72,000,000	\$13,680,000.00	\$85,680,000

Fuente: elaboración propia, basada en información proporcionada por JP Inglobal. <comercial@jpinglobal.com>. “BIOREACTORES” [Correo electrónico]. 23 septiembre 2019. Enviado a usuario de la universidad América.

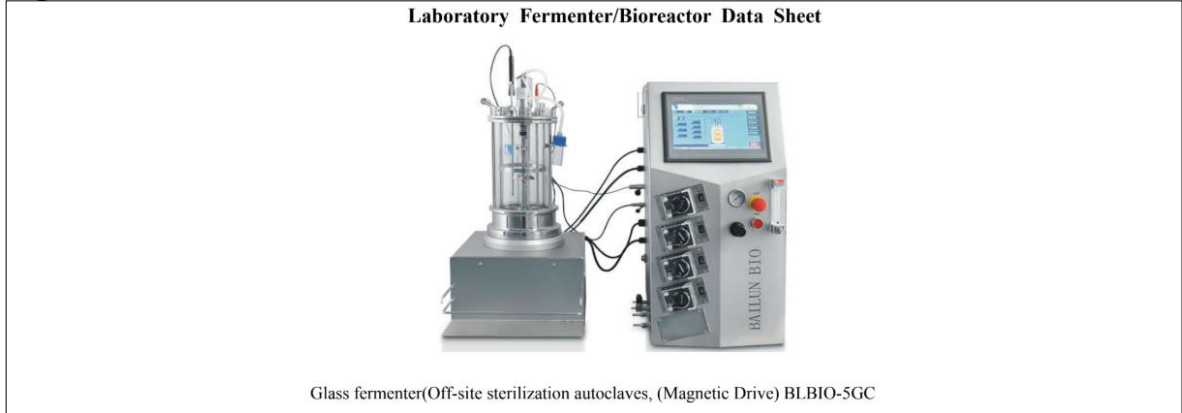
Otra de estas empresas, es Bailun biol, ubicada en la ciudad de Shanghái, la cual tiene las especificaciones técnicas dadas en el anexo N.

De manera general, se describe el producto como Vaso de 7 L Total, volumen de trabajo hasta 5.3 Litros, construcción en vidrio de borosilicato con chaqueta térmica de agua y fondo toriesférico¹¹¹ La figura 26 representa un biorreactor completo, con sistemas de lazos de control.

¹¹⁰ JP Inglobal.<comercial@jpinglobal.com>. “BIOREACTORES” [Correo electrónico]. 23 septiembre 2019. Enviado a usuario de la universidad América.

¹¹¹ BAILUN BIOTECHNOLOGY.< service@fermentertech.com>. “7L Glass fermenter” [Correo electrónico]. 15 de mayo 2019. Enviado a usuario de la universidad América.

Figura 26. Biorreactor con sistema de automatización de Bailun biol,



Fuente: BAILUN BIOTECHNOLOGY.< service@fermentertech.com>. “7L Glass fermenter” [Correo electrónico]. 15 de mayo 2019. Enviado a usuario de la universidad América.

El fabricante, maneja los siguientes precios, como lo estipula la tabla 32.

Tabla 21. Biorreactor con sistema de automatización de Bailun biol.

Ítem	Referencia	Precio unitario	Flete 15%	Total USD	Total COP
7 liters glass fermenter(Off-site sterilization autoclaves)	BLBIO-7GJ BLBIO-7GC	\$18,670	\$2,800.50	\$21,471	\$71,647,058.50

Fuente: elaboración propia basada en información proporcionada por BAILUN BIOTECHNOLOGY.< service@fermentertech.com>. “7L Glass fermenter” [Correo electrónico]. 15 de mayo 2019. Enviado a usuario de la universidad América.

Dado los comparativos entre los biorreactores, implementar el sistema de automatización completo para un biorreactor es lo que más puede llegar a costar en el mercado.

5. CONCLUSIONES

- La configuración de factores fuente de carbono y mecanismo de agitación que más favorece la producción de biomasa corresponde a la fuente de carbono sacarosa y mecanismo de agitación neumática.
- Independiente de la fuente de carbono durante las primeras 20 h que corresponden a las fases de adaptación y exponencial no se ve afectada en la extensión del tiempo.
- La concentración celular al final de la fase exponencial alcanza entre $5 \cdot 10^7$ UFC/ml y $1 \cdot 10^8$ UFC/ml que son el punto máximo de unidades celulares durante la cinética ya sea tomando fuente de carbono manitol o Ashby.
- Con la determinación de los parámetros cinéticos, los parámetros cinéticos promedio, el velocidades específicas de crecimiento (μ) sacarosa es de 0.202 h^{-1} y un tiempo de duplicación (t_{dup}) de 3.43 h y que con sustrato manitol, el μ es 0.344 h^{-1} y t_{dup} de 3.57 h, lo que indica que la bacteria demora más en reproducirse bajo un medio de manitol, el cual representa una diferencia de μ 0.142 h^{-1} y de t_{dup} de 8.4minde más ante manitol.
- El material apropiado para la construcción del biorreactor a escala banco es de es vidrio borosilicato para el recipiente por su alta resistencia térmica y acero inoxidable 316 AISI para la tapa del fermentador, aspas y baffles, además de Anillo O´ring FKM ya que es un material altamente física y químicamente estable
- El control del pH durante la cinética estándar fue un parámetro evaluado, sin embargo, resultó poco representativo durante la producción de biomasa, ya que *Azotobacter chroococcum* mantiene un rango de pH entre 6-10, y siempre se mantuvo en este rango, con una caída máxima de 0.66 pH
- El máximo consumo de sustrato con sacarosa fue de 3.357 g, de 10g ,se podría reformular el medio, disminuyendo las cantidades de materia prima que se usan para la elaboración hasta en un 50%, tomando en cuenta la fuente sacarosa.

6. RECOMENDACIONES

- La cinética se podría ajustar a mejor a algún modelo cinético como Monod, Moser, Teisser, entre otros, pero para ello, se necesitan hacer más muestreos para la fase exponencial de la cinética, especialmente durante las 8-20h de propagación, se podría emplear muestreos cada dos horas, para obtener un mejor ajuste a alguno de estos modelos con afinidad al sustrato, denotando una reducción de la desviación estándar.
- Para una cuantificación más acertada para sacarosa se podrían evaluar otros métodos más selectivos como enzimas mediante kits enzimáticos
- Para una cuantificación de manitol, usar el kit de ensayo enzimático, proporcionado por Merck o Abcam, el cual permite la transformación de manitol a fructosa y su respectiva cuantificación por espectrofotometría.
- No se tuvo en cuenta la densidad para el diseño del biorreactor, dado que la variación de densidad es baja y por tanto no afecta la reología del medio, que va directamente implicado lo de la potencia del sistema de agitación.
- En caso de implementarse el sistema propuesto, se requiere de una prueba piloto en la que se lleve a cabo la medición exacta de producción de espuma, y realizar una evaluación dentro del biorreactor. Basado en esto se deberá realizar un estudio con los distintos tipos de antiespumantes para comprobar si es necesario adicionarlos.
- Definir y evaluar un parámetro para el escalado del bioproceso.
- Dado la descripción de la cinética del microorganismo, es recomendable en términos de biomasa, reducir el tiempo del proceso dado que la mayor concentración del microorganismo se alcanza a las 20h
- Se recomienda realizar una caracterización completa a las células para así poder determinar su actividad enzimática lo que asegura su viabilidad como producto.
- Dado que para poder conocer las pérdidas de calor que el sistema tendrá es necesario conocer los coeficientes de convección en el interior del biorreactor se propone realizar un estudio termodinámico al sistema cuando este ya se encuentre construido.

BIBLIOGRAFIA

ACUEDUCTO DE BOGOTÁ. Tarifas servicios de acueducto y alcantarillado. 2019. Página web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.acueducto.com.co/wps/portal/EAB/>

ALFAFLEX. FKM VITON™ En: Catalogo de cauchos [Sitio web]. Bélgica.. [Consultado: 8 octubre 2019]. Disponible en: <http://www.alfaflex.com/en/products/30000/31000/fkm-vitontrade-0>

ALONSO PUERTO, Efraín. Bogotá psychrometric chart. Página web [En línea] Consultada el 30 de octubre de 2019. Disponible en: <https://efrainpuerto.files.wordpress.com/2011/12/bogotc3a1-psychrometric-chart.pdf>

AMÉRICAN IRON AND STEEL INSTITUTE. Washington, DC. [Consultado: 23 septiembre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: <https://www.steel.org/industry-data/reports>

ATCC. Strain Designations: NRS 12 / Type Strain: no / Biosafety Level: 1. 2019. Página web. [En línea]. [Consultado: 1 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/480.aspx>

BABOIAN, Robert. NACE Corrosion Engineer's Reference Book. 2016. 4th Edition. NACE International. p704

BAILEY, James E y OLLIS, David F. Biochemical engineering fundamentals. 1979. Second edition p45.

BAILUN BIOTECHNOLOGY. <service@fermentertech.com>. "7L Glass fermenter" [Correo electrónico]. 15 de mayo 2019. Enviado a usuario de la universidad América.

BAODING SINGAL FLUID TECHNOLOGY Co. Bomba peristáltica. 2019.. Página web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://spanish.alibaba.com/product-detail/peristaltic-pump0358486078.html?>

BARTON. L. L. Structural and Functional Relationships in Prokaryotes. 2005. 820 p. citado por CAMELO RUSINQUE, Mauricio. Desarrollo tecnológico de un biofertilizante con base en la

BEESON, Harold D, et al. Safe Use of Oxygen and Oxygen Systems - Handbook for Design, Operation, and Maintenance. 2007. 2nd Edition) - Appendix B: Physical Properties of Engineering Materials. ASTM International. p864

BEJAN, Adrian. Convection Heat Transfer. 2013. (4th Edition). John Wiley & Sons. p234

BIOCULTIVOS S.A. Ficha técnica cepa Azotobacter chroococcum. [en línea]. (No hay fecha disponible). [Consultado: 17 septiembre 2018]. Disponible en: [<http://www.biocultivos.com.co/dctos/Ficha+Tecnica+Azotobacter+Chroococcum.pdf>]

BLAMIS. <asesorventas8@blamis.com.co>. "Cotización reactivos calidad USP" [Correo electrónico]. 17 mayo 2019. Enviado a usuario de la universidad América.

BLANCH, Harvey W., y CLARK, Douglass S. Biochemical Engineering. 1996. Second Edition. Marcel Dekker, INC. p428.

BORDA MOLINA, Daniel, et al. Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de Azotobacter nigricans obtenido en un cultivo de Stevia rebaudiana Bert. Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA). Pontificia Universidad Javeriana. 2009. p 3.

BOUIS, Paul A. Reagent Chemicals; Specifications and Procedures for Reagents and Standard Grade Reference Materials. 2015. 11th Edition. Sucrose. Oxford University Press. pp 689.

BOULANGER JIMENEZ, Francisco y ESPINOZA GUTIERREZ Carlos Luis. Costos industriales. 2007. Editorial tecnológica de Costa rica. ISBN: 9977-66-183-9. P 125
CABRERA, Ricardo. Fluidos, hidrodinámica - caudal - principio de continuidad. [Consultado: 24 octubre 2019]. Página web. Disponible en: [https://ricuti.com.ar/no_me_salen/hidrodinamica/FT_caudal.html]

CAMELO RUSINQUE, Mauricio. Desarrollo tecnológico de un biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica Azotobacter chroococcum. Tesis de Maestría. Universidad Militar Nueva Granada. 2010. p 11.

CAMELO-RUSINQUE, Mauricio, et al. Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. 2015. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA, Laboratorio de microbiología de suelos, Mosquera, Cundinamarca. Rev. Argent Microbiol. 2017; 49(3): pp 289-296.

CANO, Mario Alejandro. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, Trichoderma spp. y Pseudomonas spp. una revisión. 2011. UDCA. Pg. 15-16

CARDONA ARRIETA Jessica Paola. Desarrollo de la ingeniería básica para la producción de la bacteria Bacillus popilliae en control de chiza a nivel de planta piloto en the elite flower ltda. 2011. Tesis para optar el título de Ingeniero Químico. Universidad de América. Bogotá D.C. p. 20-21.

CASTILLO J. Evaluación de la degradación del endosulfán por *Azotobacter chroococcum* y determinación del efecto plaguicida sobre la fijación biológica de nitrógeno y sobre la producción de auxinas. Colombia: Bogotá; 2005. p. 121

CASTILLO URIBE, Vladimir. Diseño y cálculo de un agitador de fluidos. Tesis para obtener el título de Ingeniero Mecánico. Universidad del Bío. 2013. pg. 28

ÇENGEL, Yunus A., BOLES, Michael A. Termodinámica. 7ma edición. 2012. México: McGraw-Hill, pg 914.

CHEMOURS. Properties of Viton™. En: Introduction to Viton and elastomers. [Sitio web]. USA. [Consultado: 8 octubre 2019]. Disponible en: http://chemours-site.force.com/CRG_VitonProperties

CODENSA. Tarifario enero 2019. Página web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.enel.com.co/content/dam/enel-co/espa%C3%B1ol/personas/1-17-1/2019/Tarifario-enero-2019.pdf>

COKER, A. Kayode. Ludwig's Applied Process Design for Chemical and Petrochemical Plants, Volume 2. 4th Edition. 2010. Elsevier. p 1.

COONEY, C.I., et al. Measurement of heat evolution and correlation with oxygen consumption during microbial growth. 1968. Biotechnol Bioeng; 11: p269-81.

COWAN, C. T.y THOMAS, C. R. Materials of construction in the biological process industries. 1988. Process Biochem. 23(1), pp. 5-111988 Citado por STANBURY, Peter. F et al. Design of a Fermenter. En: Principles of fermentation technology. Elsevier Science Ltd. 2 ed. Wheeler Road, Burlington MA. p. 172

CRITTENDEN, John C. et al. MWH's Water Treatment - Principles and Design (3rd Edition) - En: B.2Change in Atmospheric Pressure with Elevation. John Wiley & Sons. p1859.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. 3ª ed. Madrid: Acribia, 1993.

DALTON H, POSTGATE JR. Effect of oxygen on the growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous culture. Gran Bretaña. 1968. J Gen Microbiol 54: P 465

DE BELS, Marisa, et al., Growth of indigenous *Azotobacter* spp. under various cultural conditions. Kasetsart University. Thailand. En: The 43rd Congress on Science and Technology of Thailand (STT 43). P 93.

DERRADJI, Mehdi Wang y JUN LIU, Wenbin. Phthalonitrile Resins and Composites - Properties and Applications. 2018 Elsevier. p439

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACION (DNP). Crecimiento verde. [Sitio web]. Colombia. [Consultado: 7 de noviembre 2019] Publicado en junio 8 de 2019. Disponible en: https://www.dnp.gov.co/Crecimiento-Verde/Documents/ejes-tematicos/Bioeconomia/Informe%20ANEXO%201_An%C3%A1lisis%20sector%20agr%C3%ADcola.pdf

DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia, España. 1995. ISBN: 8420008532. p 350.

DUAN, Y., & Shi, F. Bioreactor design for algal growth as a sustainable energy source. En;. Reactor and Process Design in Sustainable Energy Technology. 2014. PP 30

DUARTE TORRES, Alberto. Introducción a la Ingeniería Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Ingeniería Química. Instituto de Biotecnología. 1995. 265 p.

DUTTA, Rajiv. Fundamentals of biochemical engineering. 2008. Ane Books India, 2008 Editorial Springer. ISBN 978-81-8052-202-4. P119.

EFE. La apuesta para convertir a Colombia en una de las despensas del mundo. [Sitio web]. Colombia. [Consultado: 7 noviembre de 2019] Publicado en junio 8 de 2019. Disponible en: <https://www.portafolio.co/economia/la-apuesta-para-convertir-a-colombia-en-una-de-las-despensas-del-mundo-530405>

ENDRESS + HAUSSEN. Sensor analógico de oxígeno disuelto Oxymax COS41. [en línea]. (No hay fecha disponible). [Consultado: 29 julio 2019]. Disponible en: <https://www.co.endress.com/es?locale=es>

ENDRESS. Nivel de punto. Líquidos. 2019. Página web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.mx.endress.com/es/instrumentacion-campo/DC21AS>

ETATRON. Ficha técnica de bomba peristáltica, serie B. [en línea]. (No hay fecha disponible). [Consultado: 29 julio 2019]. Disponible en: www.etatron.es/etatron/media/blfa_files/MANUAL_BOMBAS_PERISTA

FAJARDO CASTILLO Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO Sandra Constanza. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. 2007. P 47

FIGMAY. Empresa especializada en la fabricación de equipos de vidrio borosilicato y cuarzo. 2019. Página web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://figmay.com/>

FIGUEROA MONTERO, Arturo Alejandro. Modelamiento de la transferencia de calor y masa (agua) en un biorreactor de charolas para fermentación en medio sólido. 2011. Tesis para obtener el grado de Doctor en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. p35

FUNDASES. Home. [Sitio web]. Colombia. [Consultado: 7 de noviembre 2019] Disponible en: Fundases.net

GARRETT, P.R. Garrett, P. R. Defoaming: Antifoams and mechanical methods. 2015. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 20(2), pp. 81–91.

GEANKOPLIS, Christie J. Procesos de transporte y operaciones unitarias. Tercera edición. México. 1998. Compalia editorial continental, S.A. pg 165.

GODOY R. Método DNS para la determinación de azúcares reductores totales en melaza, sustrato de fermentación y vinos. Universidad Nacional de Colombia 2002. p. 1-3. Citado por FAJARDO CASTILLO Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO Sandra Constanza. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. 2007 p. 111-112.

GONZALES RODRIGUEZ, Raysa M. et al. Selección de cepas de *Azotobacter chroococcum* para su aplicación en la aclimatación de plantas in vitro de piña cv. 'Cayena lisa' <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/169/902>

GRAM, Christian. The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medizin*. 1884. 2, p. 185-9.

GUTIERREZ ROJAS, M. et al. Heat transfer in Citric Acid Production by Solid State Fermentation. *Process Biochemistry* 1996. v 31, n4: p363-9.

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO - ICA. Requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola. Resolución ICA 00698, 2011. P3-4.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Compendio de normas para trabajos escritos NTC-1486-6166. Bogotá D.C. El instituto. 2018. ISBN 9789588585673 153 p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos. NTC 4092. Bogotá D.C. El instituto. 2016. 43 p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes Biológicos. Requisitos NTC 5842 Bogotá D.C. El instituto. 2018. 56 p

JP Inglobal. <comercial@jpinglobal.com>. "BIOREACTORES" [Correo electrónico]. 23 septiembre 2019. Enviado a usuario de la universidad América.

KARANTHAND. G; RAJ, E. Fermentation Technology and Biorreactor Design. 2da edición. Food Science and Technology. New York. Marcel dekkar. 2006. ISBN 987-9381-16-5, citado por ACOSTA Yoel Alfonso. Diseño de un biorreactor para la producción de inóculo de Salmonella Enteritidis. 2018. Planta de bioplaguicida de Matanzas. Cuba. P 14

KARGI F. y MOO-YOUNG, M. Transport phenomena in bioprocesses. 1985. En Comprehensive Biotechnology, vol 2. Ed. M. MooYoung, CL Cooney & A.E Humphrey. Pergamon Press. Oxford. CH.2 pp5-26

KENNES, Christian. Bioconversion processes. Chemical Engineering Laboratory. CICA. España. 2010 p1.

KLOEPPER J.W y SCHROTH M.N. Relationship of in vitro Antibiosis of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Plant Growth and the displacement of root microflora. University of California, Berkely. 1022 p.

KUTZ, Myer. Handbook of Environmental Degradation of Materials.2018. 3rd Edition. Elsevier. p501

LICARI, James J. SWANSON, Dale W. Adhesives Technology for Electronic Applications - Materials, Processes, Reliability. 2005. William Andrew Publishing. p 654

LIU, Shijie. . Bioreactor Design and Operation. 2013. Bioprocess Engineering, 915–964.

LOW, I. M. Ceramic Matrix Composites - Microstructure, Properties and applications. 2006. Woodhead Publishing. p45

MADIGAN, Michael T. et. al. Brock, Biología de los microorganismos. 2009.PEARSON EDUCACIÓN, S.A., 2009. 722 p. ISBN: 978-84-7829-097-0

MARTINI, Leonard. Practical Seal Design.1984. Dekker, New York. P 20

MCCABE, Warren. Agitación y mezcla de líquidos. En: Operaciones unitarias en Ingeniería Química. 7ª Edición. Madrid: Ms Graw Hill, 2007.p.287-288

MELLADO BOSQUE, Jesús Alberto. Tablas Fisher. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro UAAAN. [en línea]. (No hay fecha disponible). [Consultado: 16 septiembre 2019]. Disponible en: <http://www.uaaan.mx/~jmelbos/tablas/distf.pdf>

MERCK MILLIPORE. Sterikon® plus bioindicador para control de autoclaves. DataSheet. En: Merck [Sitio web]. Colombia. [Consultado: 23 septiembre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Sterikon-plus-Bioindicador,MDA_CHEM-110274#anchor_BRO

MICROSOFT. Usar las Herramientas para análisis para realizar análisis de datos complejos [En línea]. 2019. [Consultado: 14 septiembre 2019]. Disponible en: <https://support.office.com/es-es/article/usar-las-herramientas-para-an%C3%A1lisis-para-realizar-an%C3%A1lisis-de-datos-complejos-6c67ccf0-f4a9-487c-8dec-bdb5a2cefab6>

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 1959. Vol 31. No 3. p 427

MOSA, Walid Fediala., et al. Microbial products and biofertilizers in Improving growth and productivity of Apple- A review. *Polish Journal of Microbiology*. 2016. Vol. 64, No 3. 243 p.

MOSHIRI F, et al. The FeSII protein of *Azotobacter vinelandii* is not essential for aerobic nitrogen fixation, but confers significant protection to oxygen-mediated inactivation of nitrogenase in vitro and in vivo. *Molecular Microbiology*. Vol 14 pp 101-11. Citado por JIMENEZ AVELLA, Diego Javier. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16s. p 21.

NAJAFPOUR, G. D. Bioreactor Design. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. 2015. pp 193–226.

NKS. Acero inoxidable 316. En: NKS [Sitio web]. Mexico. [Consultado: 8 octubre 2019]. Disponible en: <https://nks.com/es/distribuidor-de-acero-inoxidable/aceros-inoxidables-316/>

OROS, Damir. *et al.* Cultivation of the bacterium *Azotobacter chroococcum* for preparation of biofertilizers. *African Journal of Biotechnology*. 2011. Vol 10. No 16. pp 4.

OROZCO P. Francisco Hernando. La biología del Nitrógeno. Conceptos básicos sobre sus transformaciones biológicas. 1999. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. ISBN: 958-9352-11-1.

PANDEY, A. Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. *Neuropsychological rehabilitation*. 2001. Asiatech Publishers Inc. New Delhi. p75.

PEÑA, C., et al. Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* in a stirred fermentor simulating the evolution of power input observed in shake flasks. 2008. *Process Biochemistry*, 43(7), pp 775–778.

PLANET BIOTECH. [Sitio web]. India. [Consultado: 17 septiembre 2018]. Disponible en línea [<https://www.indiamart.com/proddetail/azotobacter-chroococcum-8655361197.html>]

QUINTERO RAMÍREZ, Rodolfo. Transferencia de oxígeno y diseño de fermentadores. En: *Ingeniería bioquímica*. México: Editorial Alhambra Mexicana, 1987. p. 81-95. Citado por CARDONA ARRIETA Jessica Paola. Desarrollo de la ingeniería básica para la producción de la bacteria *Bacillus popilliae* en control de chiza a nivel de planta piloto en the elite flower ltda. 2011. Tesis para optar el título de Ingeniero Químico. Universidad de América. Bogotá D.C. p. 20-21.

RAJA G. Efficacy of Biofertilizers on Changes in Morphological, Physiological and Biochemical Parameters in *Jatropha curcas L.* Trabajo de doctorado. Tamil Nadu, India. Universidad Bharathidasan. Departamento de ciencia de las plantas. 2012. p9.

RAMAZAN C, FAIK K, FARUK A. Mineral nutrition of plant. Principles and perspective. *J plant nut.* 1999. pp 437-442. Citado por RAJA G. Efficacy of Biofertilizers on Changes in Morphological, Physiological and Biochemical Parameters in *Jatropha curcas L* 2015. p7.

ROBSON, Robert. *et al.* *Azotobacter Genomes: The Genome of Azotobacter chroococcum NCIMB 8003 (ATCC 4412)*. Illinois Institute of Technology, PLOS ONE. 2015. p 8.

ROJAS MEDINA, Ricardo Alfredo. *Sistemas de costos: Un proceso para su implementación*. 2007. Universidad Nacional de Colombia. Sede Manizales. p11

ROMERO PERDOMO, Felipe., et al. *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization, *Revista Argentina de Microbiología*. 2017, Vol 49, No 4. 378 p.

SCHASCHKE, Carl. *Dictionary of Chemical Engineering - differential scanning calorimetry (DSC)*. 2014. Oxford University Press p105-106.

SCIENTIFIC GLASS. *Propiedades físicas del vidrio borosilicato*. En: *Scientificglass* [Sitio web]. Reino Unido. [Consultado: 8 octubre 2019]. Disponible en: https://www.scientificglass.co.uk/contents/enuk/d115_Physical_Properties_of_Boro

SCRAGG, Alan. *Biotecnología para Ingenieros: Sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. Limusa, México 1997. ISBN: 9789681847081. p 197

SETHI, Santosh Kumar., ADHIKARY, Siba Prasad. Azotobacter: A Plant Growth-promoting Rhizobacteria Used as Biofertilizer. Global Science Books. 2011. p 69.

SEPPULVEDA TORRE,L y AGUILAR C.N. Cinética microbiana del cultivo de microorganismos biofertilizantes. , Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. México. P343.

SIGMA ALDRICH. Product description Antifoams. [en línea]. En Merck. No hay fecha disponible. [Consultado: 25 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antifoams.html> silicate_Glass.html

SOLOMONS, G. L. Materials and Methods in Fermentation. 1969. Academic Press, London. Citado por STANBURY, Peter. F et al. Design of a Fermenter. En: Principles of fermentation technology. Elsevier Science Ltd. 2 ed. Wheeler Road, Burlington MA. p. 172.

STANBURY, Peter. F et al. Instrumentation and control. En: Principles of fermentation technology. Elsevier Science Ltd. 2 ed. Wheeler Road, Burlington MA. p. 215- 226.

STANDAR SEAL. Oring Parker Viton (FKM). 2019.. Página web. [En línea]. [Consultado: 9 octubre 2019]. Disponible en: <https://standard-seal.com/viton-50/V0986-2-442>

SULLIVAN, William G. Ingeniera económica de De Degarmo. 2004. Editorial Pearson. Edición 12. p30

T EGLI. Growth Kinetics, Bacterial. Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology, Dübendorf, Switzerland. 2009. 180p.

TECSOIN. <Laura.amezquita@tecsoin.com>. "COTIZACIÓN SENSORES DE PH Y OXIGENO DISUELTO" [Correo electrónico]. 11 octubre 2019. Enviado a usuario de la universidad América.

THOMPSON JP y SKERMAN VBD. Azotobacteraceae: the Taxonomy and Ecology of the Aerobic Nitrogen-Fixing Bacteria. 1979. Academic Press London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco.

TRIPLENLACE. Polarimetría II: Constante de velocidad de la hidrólisis de la sacarosa. Consultado el 14 de agosto de 2019. Disponible en: <https://triplenlace.com/2012/11/25/polarimetria-ii-aplicaciones-en-quimica/>

TRUJILLO ROLDAN, Mauricio. Memorias del II Curso Internacional Escalado de Bioprocesos y Entrenamiento en Operación de Biorreactores. [6 de septiembre del

2012]. Consultado el 30 de octubre de 2019. Página web, disponible en <https://ciencias.medellin.unal.edu.co/eventos/cursodebiorreactores/>

UNITED NATIONS. Revision of World Population Prospects. [Sitio web]. USA. [Consultado: 7 abril de 2019]. 2019 disponible en: <https://population.un.org/wpp/>

VALDERRAMA AGUIRRE Lina, C. Evaluación de cepas nativas de *Azotobacter spp* como agente reductor de urea en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp*). Trabajo de Maestría. Cali, Valle del Cauca. Universidad del Valle. Facultad de Ingenierías. 2013. 41 p.

WALPOLE, et al. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 2012. Novena edición. Always Learning. Pearson. ISBN 9780321629111. p569.

WANI, Sartaj A. *Azotobacter chroococcum* – A Potential Biofertilizer in Agriculture: An Overview 2016. Pp 335)

YAWS, Carl L. Yaws' Critical Property Data for Chemical Engineers and Chemists. (2012; 2013; 2014). Knovel.

YAWS, Carl L. Yaws' Handbook of Thermodynamic Properties for Hydrocarbons and Chemicals. 2009. Knovel.

ZAMBRANO, Corina., BONILLA, Ruth. Rebeca. Industria de Bioinsumos de uso agrícola en Colombia, Revista. U.D.C.A Act. & div. Cient. 2015. 59 p.

ZHENG, Hongfei. Solar Energy Desalination Technology. 2017. Elsevier. p345

ANEXOS

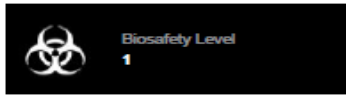
ANEXO A.

FICHA ATCC 480 DE *Azotobacter chroococcum*

Ficha ATCC 480 DE *Azotobacter chroococcum*



Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Azotobacter chroococcum* (ATCC® 480™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

Description

Designation: NRS 12
Deposited Name: *Azotobacter chroococcum* Beijerinck

Propagation

Medium
ATCC® Medium 12: Azotobacter Supplement

Growth Conditions
Temperature: 26.0°C

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. From a single tube of #12 broth (5 to 6 ml), withdraw approximately 0.5 to 1.0 ml with a Pasteur or 1.0 ml pipette and use to rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer the rehydrated pellet back into the broth tube. Mix well
4. Incubate at 26°C. Growth should occur in 2 to 3 days.
5. After growth appears in the broth, a second tube of broth, a slant, and/or a plate may be inoculated. It is advisable to establish good growth in the primary tube before making subsequent transfers.

Notes

Growth occurs on solid medium within 3 to 5 days. Colonies are entire, glistening, smooth, translucent and brownish-cream in color.

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate. This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Fuente: ATCC. Strain Designations: NRS 12/ Type Strain: no / Biosafety Level: 1. 2019. Página web. [En línea]. [Consultado: 1 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/480.aspx>

¹¹²ATCC. Strain Designations: NRS 12 / Type Strain: no / Biosafety Level: 1. 2019. Pagina web. [En línea]. [Consultado: 1 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/480.aspx>

ANEXO B. MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS

FORMACIÓN DE BIOMASA

- AGAR ASHBY

El medio agar Ashby es un medio preparado por componentes, primero, se deben diluir todos los componentes sin el agar, se debe ajustar dentro de un pH 7,2-7,3 con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N. Llevar a completa disolución y finalmente agregar el agar, llevar a completa disolución y esterilizar en autoclave 121°C por 15 min. La tabla 33 representa todos los componentes para preparar el medio por partes.

Reactivo	g/L
Manitol	10
Fosfato dipotásico de hidrógeno	0,2
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,2
Cloruro de sodio	0,2
Sulfato de calcio	0,2
Carbonato de calcio	0,2
Agar-Agar	15

Fuente: FUNDASES

- AGUA PEPTONA 1%

Disolver 10 g de medio en 1 L de agua destilada, llevar a completa disolución y dispensar en tubos de 9 ml. Esterilizar en autoclave 121°C por 15 min. La tabla 34 contiene los componentes que conforman el agua peptona, según el fabricante DIFCO.

Reactivo	g/L
Peptona	10
Cloruro de sodio	5
Fosfato disódico	9
Fosfato monopotásico	1,5

Fuente: Difco TM

- **CALDO ASHBY (MANITOL)**

El caldo de cultivo Ashby es un medio preparado por componentes, llevar a disolución todos los componentes, se debe ajustar dentro de un pH 7,2-7,3 con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N. Esterilizar en autoclave 121°C por 15 min.

Caldo Ashby – Manitol (FUNDASES)

Reactivo	g/L
Manitol	10
Fosfato dipotásico de hidrógeno	0,2
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,2
Cloruro de sodio	0,2
Sulfato de calcio	0,2
Carbonato de calcio	0,2

Fuente: FUNDASES

- **CALDO ASHBY (SACAROSA)**

El medio agar Ashby es un medio preparado por componentes, llevar a disolución todos los componentes, se debe ajustar dentro de un pH 7,2-7,3 con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N. Esterilizar en autoclave 121°C por 15 min.

Caldo Ashby modificado - sacarosa

Reactivo	g/L
Sacarosa	10
Fosfato dipotásico de hidrógeno	0,2
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,2
Cloruro de sodio	0,2
Sulfato de calcio	0,2
Carbonato de calcio	0,2

Fuente: Elaboración propia, dada modificación de sustrato en base de formulación de FUNDASES

ANEXO C. FOTOS DE LOS EQUIPOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO

Equipos usados en el laboratorio

Autoclave



Espectofotómetro



Refrigerador



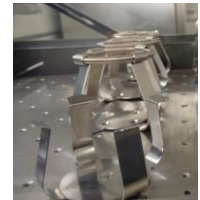
Balanza analítica



Incubadora



Shaker



Bombas neumáticas



Microscopio



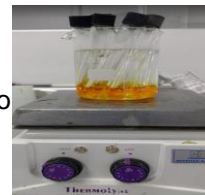
Ultracongelador



Centrifuga



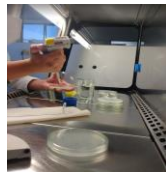
Plancha de calentamiento



Vortex



Cabina de flujo laminar



Potenciometro



ANEXO D. PREPARACIÓN REACTIVOS DE TRABAJO

1. Hidróxido de Sodio (NaOH 25% p/v)¹¹³

- Pesar 25,46 g de NaOH y disolver en 50 mL de agua destilada
- Llevar a un balón aforado y a la solución alcalina preparada anteriormente aforar con agua destilada hasta 100 ml.
- Mezclar
- Almacenar en frasco ámbar

2. Ácido Clorhídrico (HCl 50% v/v)

- Medir 50 mL de HCl 37% v/v y disolver en 25 mL de agua destilada.
- Llevar a un balón aforado y a la solución ácida preparada anteriormente aforar con agua destilada hasta 100 ml.
- Mezclar
- Almacenar en frasco ámbar

3. Ácido Clorhídrico (HCl 5% v/v)

- Medir 13,69 mL de HCl 37% v/v y disolver en 100 mL de agua destilada.
- Llevar a un balón aforado y a la solución ácida preparada anteriormente aforar con agua destilada hasta 100 ml.
- Mezclar
- Almacenar en frasco ámbar

¹¹³ GODOY R.. Op.cit. p. 111. Citado por FAJARDO CASTILLO Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO Sandra Constanza. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. 2007 p. 111-112.

**ANEXO E.
PROTOCOLO REALIZACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE SACAROSA
HIDROLIZADA.**

Inicialmente, se realizó la curva patrón de sacarosa preparando una concentración Stock de 10 g/L, esta curva es utilizada para conocer la concentración de azúcares reductores totales obtenidos en la Hidrólisis de la sacarosa empleada como fuente de carbono en el medio Ashby-Sacarosa.

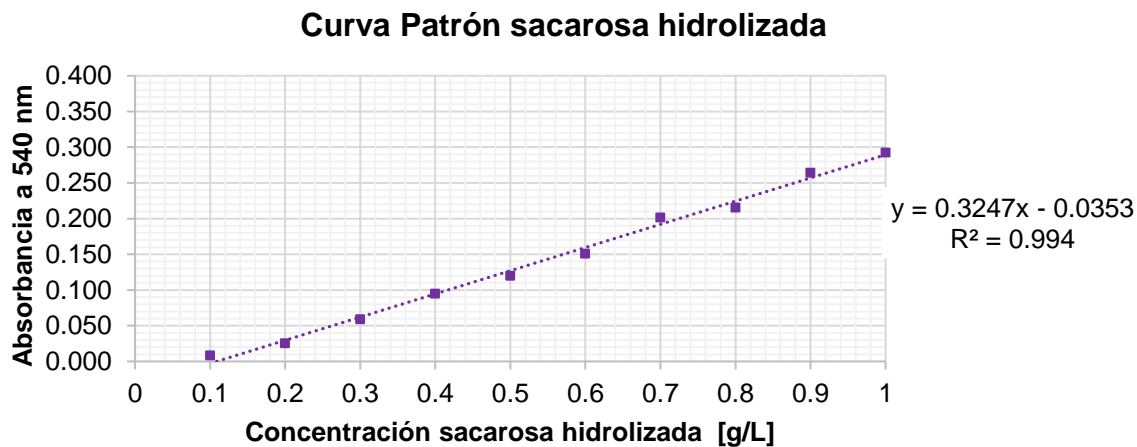
Tras la Hidrólisis, por la técnica colorimetría del DNS, se desarrollaron las absorbancias obtenidas a continuación.

Datos absorbancia de sacarosa. Promedio de tres réplicas

Puntos de curva	Solución Sacarosa(mL)	Agua Destilada (mL)	Concentración Final [g/L]	Abs 540 nm
1	0,1	9,9	0,1	0,009
2	0,2	9,8	0,2	0,025
3	0,3	9,7	0,3	0,059
4	0,4	9,6	0,4	0,095
5	0,5	9,5	0,5	0,120
6	0,6	9,4	0,6	0,151
7	0,7	9,3	0,7	0,202
8	0,8	9,2	0,8	0,215
9	0,9	9,1	0,9	0,264
10	1	9	1	0,292

Fuente: Elaboración propia.

Curva patrón de sacarosa y ecuación lineal.



Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO F.
DATOS CRUDOS OBTENIDOS EN LA PREEXPERIMENTACIÓN**

Resultados de las unidades experimentales.

	EXPERIMENTO	BIOMASA (UFC/ml)		pH	
		INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
AGITACIÓN MECANICA SHAKER	M1	1.40E+08	5.07E+07	7.24	6.092
	M2	1.40E+08	9.23E+07	7.24	6.041
	M3	1.40E+08	1.44E+07	7.24	6.042
	S1	1.40E+08	2.21E+06	7.63	5.783
	S2	1.40E+08	9.97E+05	7.63	6.364
	S3	1.40E+08	1.17E+05	7.63	5.891
AGITACIÓN NEUMATICA AGITACIÓN	M1	2.77E+09	5.62E+05	7.24	5.491
	M2	2.77E+09	1.08E+08	7.24	6.314
	M3	2.77E+09	2.29E+08	7.24	6.304
	S1	2.77E+09	1.10E+08	7.63	5.476
	S2	2.77E+09	4.73E+07	7.63	5.602
	S3	2.77E+09	3.20E+07	7.63	5.555

Fuente: Elaboración propia

**ANEXO G.
RESULTADOS DE MODELO ESTADISTICO ANOVA DOS FACTORES**

Para desarrollar el análisis de varianza de dos factores, se debe realizar bajo los siguientes factores:

Análisis de varianzas de dos factores. Formulario

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA
FACTOR A	SCA	a-1	$s_1^2 = \frac{SCA}{a-1}$	$f_1 = \frac{s_1^2}{s^2}$
FACTOR B	SCB	b-1	$s_2^2 = \frac{SCB}{b-1}$	$f_2 = \frac{s_2^2}{s^2}$
INTERACCION AB	SC(AB)	(a-1)(b-1)	$s_3^2 = \frac{SC(AB)}{(a-1)(b-1)}$	$f_3 = \frac{s_3^2}{s^2}$
ERROR TOTAL	SCE	gl tot - gla-glb-glab	$s^2 = \frac{SCE}{(n-1)}$	
Total	STC	N-1		

Fuente: WALPOLE, et al. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 2012. Novena edición. Always Learning. Pearson. ISBN 9780321629111. p569.

Donde SCA y SCB se les denomina la suma de cuadrados para los efectos principales (Fuente de carbono y modo de agitación)

$$SC_A = \sum_{i=1}^a \frac{Y_{i...}^2}{bn} - \frac{Y_{...}^2}{N},$$

$$SC_B = \sum_{j=1}^b \frac{Y_{...j}^2}{an} - \frac{Y_{...}^2}{N},$$

Y SCAB corresponde a la suma de cuadrados de la interacción de A y B

$$SC_{AB} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \frac{Y_{i...}^2}{n} - \frac{Y_{...}^2}{N} - SC_A - SC_B$$

SCT el total

$$SC_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n Y_{ijk}^2 - \frac{Y_{...}^2}{N}$$

Y el SCE corresponde a la suma de cuadrados del error.

$$SC_E = SC_T - SC_A - SC_B - SC_{AB}$$

Resultados por Excel, aplicación del análisis de varianza

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	Mecánica	Neumática	Total
<i>Manitol</i>			
Cuenta	3	3	6
Suma	1.052E+08	1.047E+09	1.152E+09
Promedio	3.508E+07	3.489E+08	1.920E+08
Varianza	9.436E+14	1.310E+16	3.517E+16
<i>Sacarosa</i>			
Cuenta	3	3	6
Suma	6.685E+07	1.195E+09	1.262E+09
Promedio	2.228E+07	3.984E+08	2.104E+08
Varianza	1.101E+12	1.723E+15	4.314E+16
<i>Total</i>			
Cuenta	6	6	
Suma	1.721E+08	2.242E+09	
Promedio	2.868E+07	3.737E+08	
Varianza	4.270E+14	6.665E+15	

ANÁLISIS DE VARIANZA

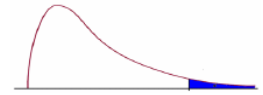
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Promedio de los cuadrados (CM)	F	Valor crítico para F ($\alpha : 0.05$)	Probabilidad ad	Conclusión
Factor A (Fuente de C)	1.012E+15	1	1.012E+15	0.257	5.318	0.626	No rechaza Ho
Factor B (Modo de agitación)	3.571E+17	1	3.571E+17	90.591	5.318	1.23E-05	Rechaza Ho
Interacción (AB)	2.913E+15	1	2.913E+15	0.739	5.318	0.415	No rechaza Ho
Error	3.153E+16	8	3.942E+15				
Total	3.925E+17	11					

Fuente: Elaboración propia.

Tabla de Fisher con significancia 0.05.

Distribución F 0.05

En las columnas se encuentran los valores F que corresponden al área 0.05 a la derecha
 En las columnas se encuentran los grados de libertad del numerador
 En los renglones se encuentran los grados de libertad del denominador.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	30	40	60	120
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.0	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.24	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.22	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.17	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.95	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.87	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35

Para calcular el valor F en excel, se utiliza la función de la distribución F inversa
=distr.f.inv(0.05; gl num; gl den)

© Ing. Jesús Alberto Mellado Bosque

Fuente: MELLADO BOSQUE, Jesús Alberto. Tablas Fisher. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro UAAAN. [en línea]. (No hay fecha disponible). [Consultado: 16 septiembre 2019]. Disponible en: <http://www.uaan.mx/~jmelbos/tablas/distf.pdf>

Valor en tabla de Fisher correspondiente al análisis de las columnas (Factor A, B y filas y columnas (AB))

**ANEXO H.
DATOS CRUDOS OBTENIDOS EN LA EXPERIMENTACIÓN**

- **Cinética estándar**

✓ Resultados del seguimiento de la cinética del primer experimento

Hora	BIOMASA		SUSTRATO	
	UFC/mL	LOG UFC/ml	g/L	pH.
0	1,00E+05	5,000	7,647	7,168
4	1,83E+05	5,263	7,370	6,935
8	2,00E+05	5,301	7,339	6,918
12	1,00E+06	6,000	7,093	6,865
16	1,00E+07	7,000	7,031	7,005
20	7,00E+07	7,845	6,877	6,791
24	7,06E+07	7,849	6,846	6,775
28	7,11E+07	7,852	6,754	6,769
32	6,17E+07	7,790	6,692	6,714
36	7,50E+07	7,875	6,477	6,618
40	6,76E+07	7,830	6,446	6,500
44	7,67E+07	7,885	6,415	7,052
48	4,50E+07	7,653	6,230	6,806

Fuente: Elaboración propia

✓ Resultados del seguimiento de la cinética del segundo experimento

Hora	BIOMASA		SUSTRATO	
	UFC/mL	LOG UFC/ml	g/L	pH.
0	2,00E+05	5,301	8,232	7,280
4	3,33E+05	5,523	7,770	7,160
8	4,03E+05	5,605	7,216	6,930
12	2,27E+06	6,356	7,185	6,857
16	3,87E+07	7,587	7,000	6,894
20	5,20E+07	7,716	6,754	6,698
24	7,33E+07	7,865	6,662	6,514
28	9,49E+07	7,977	6,477	6,635
32	9,49E+07	7,977	5,861	6,728
36	5,66E+07	7,753	5,676	6,800
40	1,00E+08	8,000	5,122	6,857
44	1,43E+08	8,154	4,937	6,841
48	4,67E+07	7,670	4,875	6,856

Fuente: Elaboración propia

- **Cinética a condiciones de producción**

- ✓ Resultados del seguimiento de la cinética del primer experimento

Hora	BIOMASA		pH.	DENSIDAD
	UFC/mL	LOG UFC/ml		g/mL
0	5.67E+04	4.753	7.37	1.0130
4	6.29E+04	4.799	7.28	1.0120
8	6.74E+04	4.829	7.23	1.0109
12	8.33E+04	4.921	7.23	1.0110
16	1.03E+07	7.014	7.18	1.0123
20	1.38E+08	8.139	7.11	1.0128
24	1.23E+08	8.091	7.01	1.0121
28	1.61E+08	8.206	6.92	1.0111
32	1.50E+08	8.176	6.86	1.0117
36	2.00E+08	8.301	6.79	1.0119
40	7.67E+07	7.885	6.6	1.0106
44	5.67E+07	7.753	6.46	1.0246
48	3.00E+07	7.477	6.42	1.0292

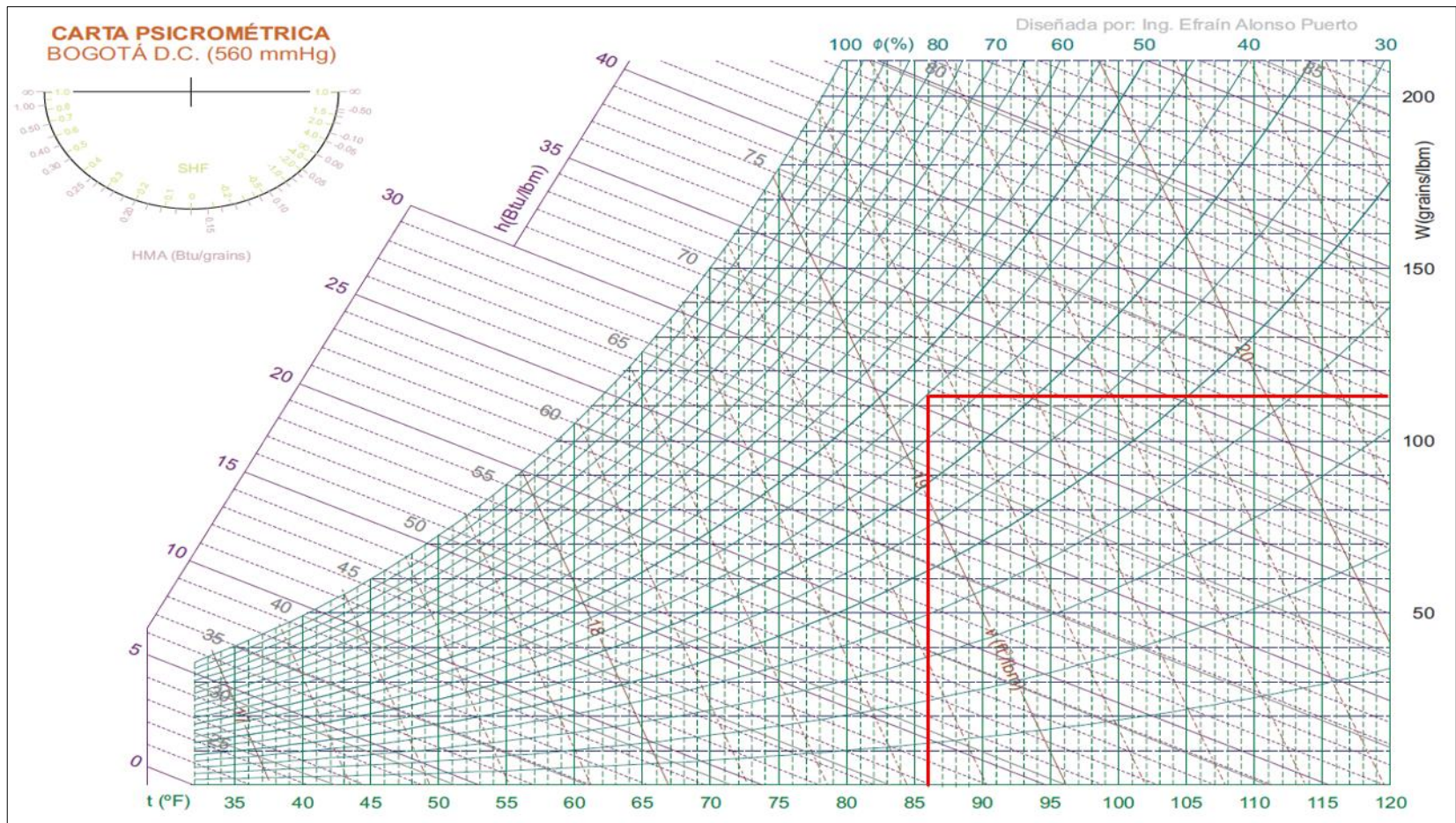
Fuente: Elaboración propia

- ✓ Resultados del seguimiento de la cinética del segundo experimento

Hora	BIOMASA		pH.	DENSIDAD
	UFC/mL	LOG UFC/ml		g/mL
0	1.00E+04	4.000	8.30	1.0127
4	2.50E+04	4.398	7.77	1.0112
8	2.40E+04	4.380	7.64	1.0110
12	1.55E+05	5.190	7.54	1.0112
16	1.03E+07	7.014	7.47	1.0120
20	3.87E+07	7.587	7.43	1.0116
24	3.45E+07	7.538	7.34	1.0104
28	4.00E+07	7.602	7.23	1.0100
32	4.00E+07	7.602	7.15	1.0112
36	6.33E+07	7.802	6.98	1.0101
40	5.87E+07	7.768	6.84	1.0114
44	3.54E+07	7.549	6.76	1.0306
48	1.59E+07	7.202	6.72	1.0334

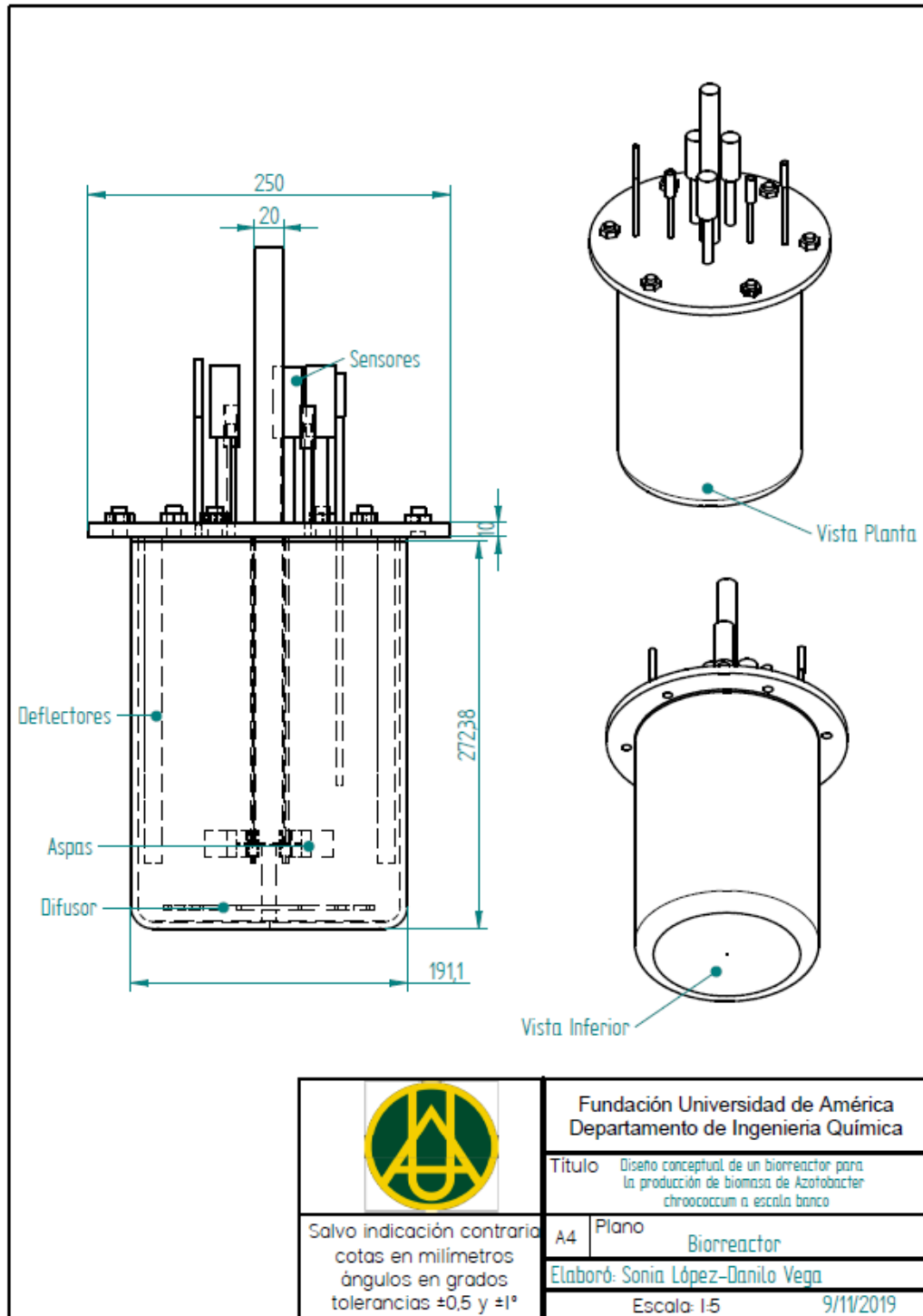
Fuente: Elaboración propia

ANEXO I. CARTA PSICOMÉTRICA PARA BOGOTÁ

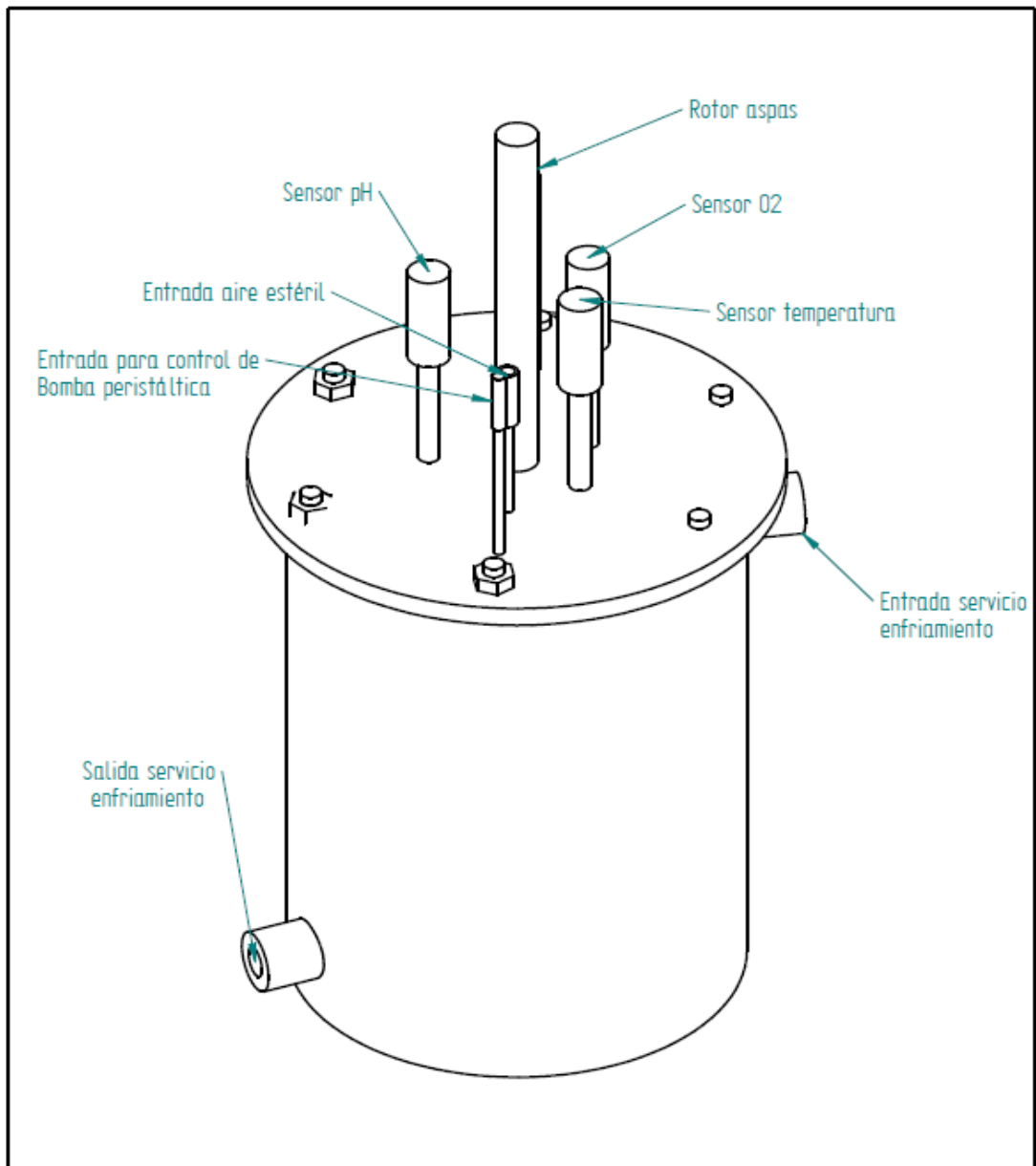



Fuente: ALONSO PUERTO, Efraín. Bogotá psychrometric chart. Página web [En línea] Consultada el 30 de octubre de 2019. Disponible en: <https://efrainpuerto.files.wordpress.com/2011/12/bogotc3a1-psychrometric-chart.pdf>

ANEXO J. PLANOS DEL BIORREACTOR



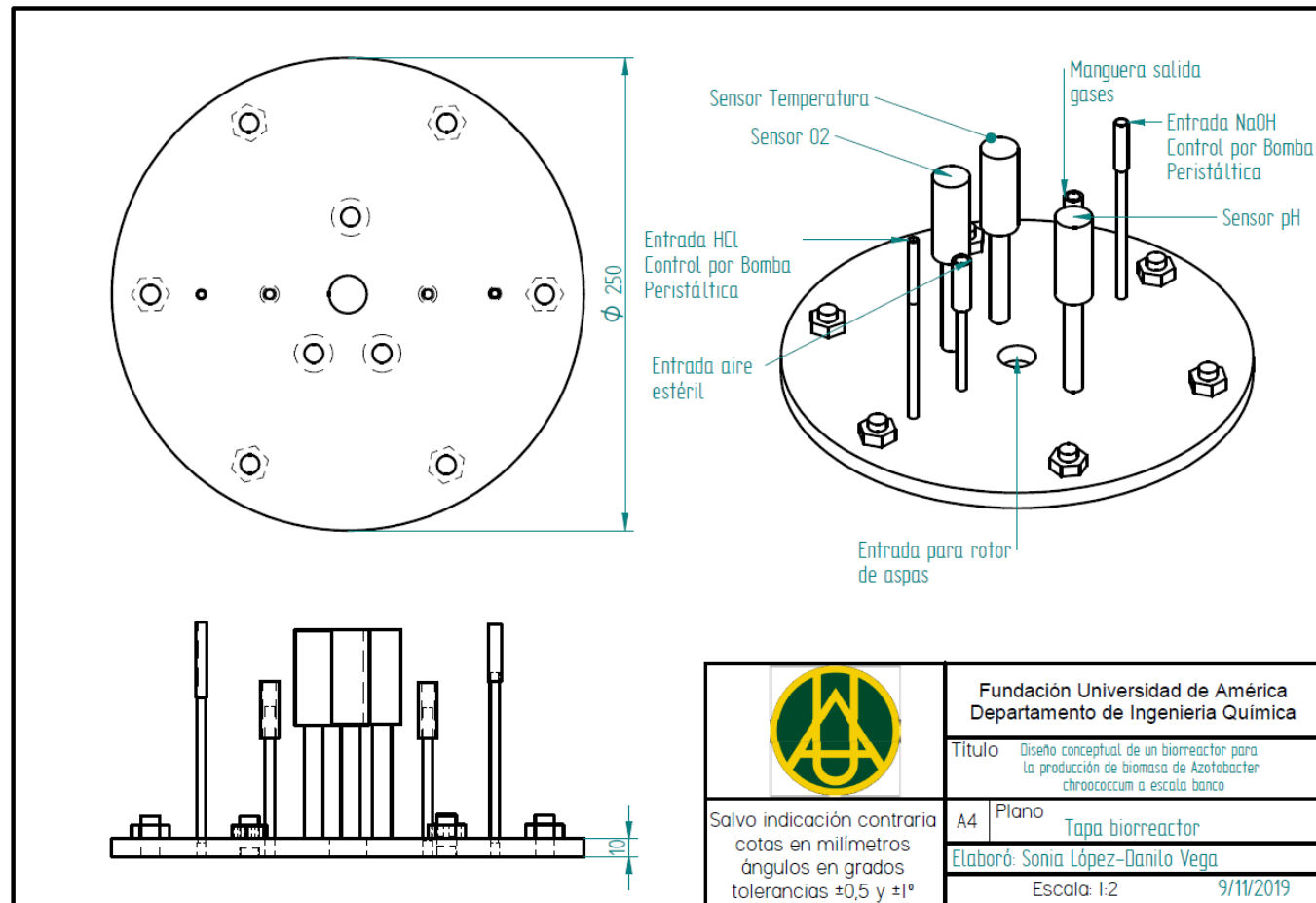
Fuente:Elaboración propia en Solid Edge, 2020. Versión de prueba utilizada entre los meses octubre y noviembre de 2019.



	Fundación Universidad de América Departamento de Ingeniería Química	
	Título: Diseño conceptual de un biorreactor para la producción de biomasa de <i>Azotobacter chroococcum</i> a escala banco	
Salvo indicación contraria cotas en milímetros ángulos en grados tolerancias ± 0.5 y $\pm 1^\circ$	A4	Plano Biorreactor con enchaquetamiento
	Elaboró: <u>Sonia López-Daniilo Vega</u>	
Escala: 1:2.5		9/11/2019

Fuente: Elaboración propia en Solid Edge, 2020. Versión de prueba utilizada entre los meses octubre y noviembre de 2019.

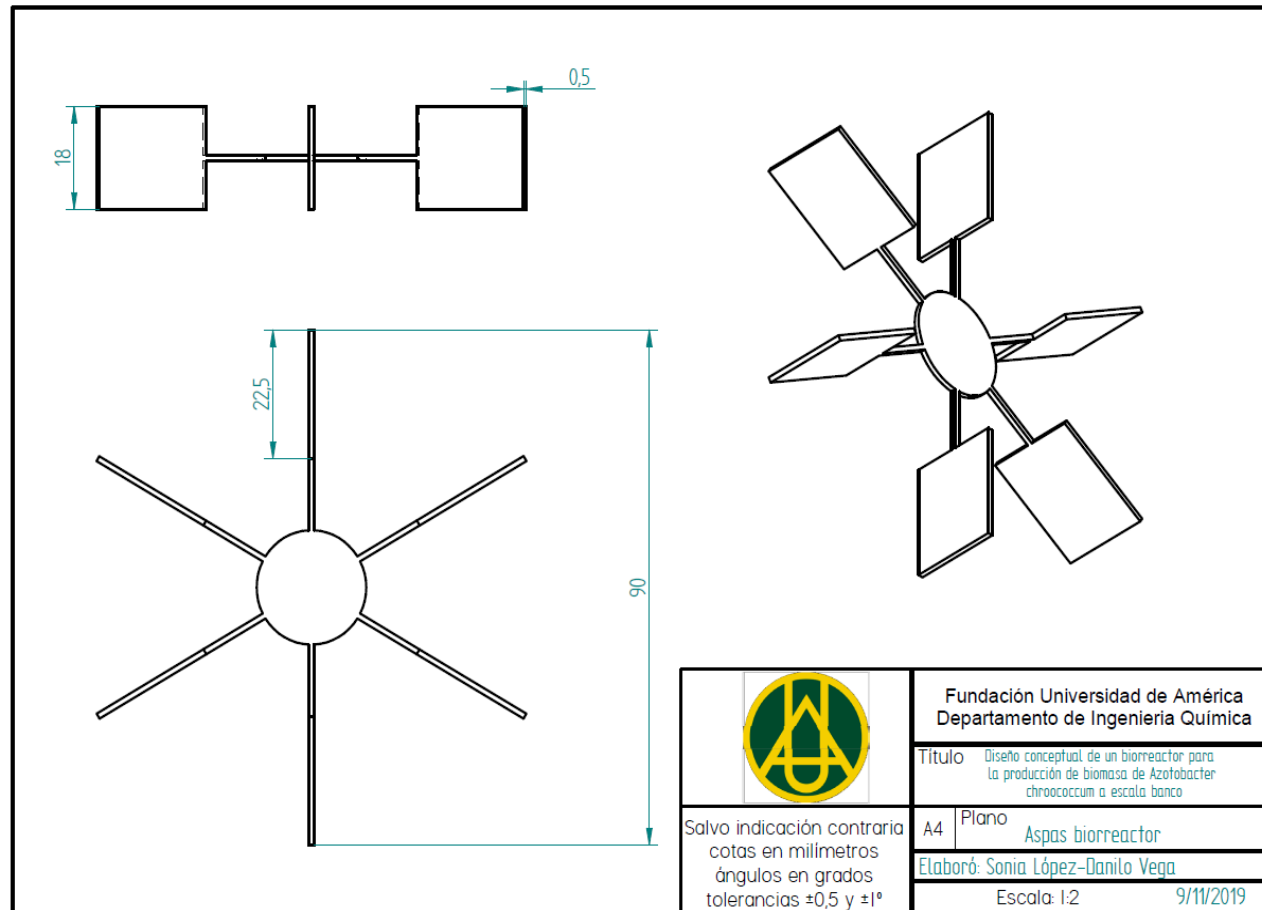
ANEXO K. ESTRUCTURA DE LA TAPA CON SUS PARTES



	Fundación Universidad de América Departamento de Ingeniería Química	
	Título: Diseño conceptual de un biorreactor para la producción de biomasa de Azotobacter chroococcum a escala banco	
	A4	Plano Tapa biorreactor
	Elaboró: Sonia López-Danilo Vega	
Salvo indicación contraria cotas en milímetros ángulos en grados tolerancias $\pm 0,5$ y $\pm 1^\circ$		Escala: 1:2 9/11/2019

Fuente: Elaboración propia en Solid Edge, 2020. Versión de prueba utilizada entre los meses octubre y noviembre de 2019.

**ANEXO L.
PLANO DIMENSIONES DE LAS ASPAS**



Fuente: Elaboración propia en Solid Edge, 2020. Versión de prueba utilizada entre los meses octubre y noviembre de 2019.

**ANEXO M.
PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN.**

Propiedades físicas, químicas y mecánicas de los materiales de construcción.

PROPIEDADES	VIDRIO DE BOROSILICATO	ACERO INOXIDABLE AISI 316	O ring, VITON (TERPOLIMERO FPM)
COMPOSICIÓN			
B ₂ O ₃ %	21-24	-	-
SiO ₂ %	72-75	-	-
CaO%	0-1	-	-
Fe ₂ O ₃ %	0-0.3	-	-
C%	-	0.08	-
Si%	-	1	-
Mn%	-	2	-
Cr%	-	16-18	-
Ni%	-	10-14.	-
Mo%	-	2-3.	-
FPM/FKM	F%	-	66
	Otros%	-	34
FISICAS			
Densidad (g/cm ³)	2.23	8.027	1.9
Punto de fusión (°C)	800	1371.1-1398.8	400
Capacidad calorífica (kJ/kg°K)	0.8	0.50241	0.18
Conductividad térmica K (W/mK)	0.8-1.09	16.3	0.2248
Coefficiente de expansión térmica líneal media (x10 ⁻⁶ K ⁻¹)	(3.3 ± 0.1)	16-18	8.3-11.0
Temperatura de trabajo °C	250-550	>1150	desde -35°C a 220
ELECTRICAS			
resistividad eléctrica volumetrica (microhomios ohm- cm)	8 @ 250°C	29.4 @ 21°C	2.0 x10 ¹³
	6.5 @ 350°C		

(Continuación)

PROPIEDADES	VIDRIO DE BOROSILICATO	ACERO INOXIDABLE AISI 316	O ring, VITON (TERPOLIMERO FPM)
MECANICAS			
Módulo de elasticidad E (N/mm ²)	64*10 ³	1.93E+05	-
Indice de Poisson μ	0,2	-	-
Límite elastico (Mpa)	-	230	3.4-20.7
Fuerza de Tension (Mpa)	-	570	6

Fuente: Elaboración propia basa en información de las fuentes. ^{114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126}

¹¹⁴ LOW, I. M. Ceramic Matrix Composites - Microstructure, Properties and applications. 2006. Woodhead Publishing. p45

¹¹⁵ LICARI, James J. SWANSON, Dale W.. Adhesives Technology for Electronic Applications - Materials, Processes, Reliability. 2005. William Andrew Publishing. p 654

¹¹⁶ ZHENG, Hongfei. Solar Energy Desalination Technology. 2017. Elsevier. p345

¹¹⁷ BEJAN, Adrian. Convection Heat Transfer. 2013. (4th Edition). John Wiley & Sons. p234

¹¹⁸ DERRADJI, Mehdi Wang y JUN LIU, Wenbin. Phthalonitrile Resins and Composites - Properties and Applications. 2018 Elsevier. p439

¹¹⁹ BEESON, Harold D, et al. Safe Use of Oxygen and Oxygen Systems - Handbook for Design, Operation, and Maintenance. 2007. 2nd Edition) - Appendix B: Physical Properties of Engineering Materials. ASTM International. p864

¹²⁰ KUTZ, Myer. Handbook of Environmental Degradation of Materials. 2018. 3rd Edition. Elsevier. p501

¹²¹ BABOIAN, Robert. NACE Corrosion Engineer's Reference Book. 2016. 4th Edition. NACE International. p704

¹²² SCIENTIFIC GLASS. Propiedades físicas del vidrio borosilicato. En: Scientificglass [Sitio web]. Reino Unido. [Consultado: 8 octubre 2019]. Disponible en: https://www.scientificglass.co.uk/contents/enuk/d115_Physical_Properties_of_Borosilicate_Glass.html

¹²³ VIDRASA. Op cit. p3

¹²⁴ NKS. Acero inoxidable 316. En: NKS [Sitio web]. Mexico. [Consultado: 8 octubre 2019]. Disponible en: <https://nks.com/es/distribuidor-de-acero-inoxidable/aceros-inoxidables-316/>

¹²⁵ ALFAFLEX. FKM VITON™ En: Catalogo de cauchos [Sitio web]. Belgica.. [Consultado: 8 octubre 2019]. Disponible en: <http://www.alfaflex.com/en/products/30000/31000/fkm-vitontrade-0>

¹²⁶ CHEMOURS. Properties of Viton™. En: Introduction to Viton and elastomers. [Sitio web]. USA. [Consultado: 8 octubre 2019]. Disponible en: http://chemours-site.force.com/CRG_VitonProperties

**ANEXO N.
INFORMACION DEL FERMENTADOR DADA POR EL PROVEEDOR**

Biorreactores de JpInglobal, con sistema de automatización.¹²⁷



23 de 09 del 2019.

Dr (a). A quien corresponda

UNIVERSIDAD AMERICA

REF. 2019-7274

 JP BIOINGENIERIA S.A.S. NIT. 900409216-6	FICHA TECNICA BIOREACTOR/FERMENTADOR CAPACIDAD 7 LITROS - SISTEMA AVANZADO	FJP-785 Versión 1 Pág. 1 de 1. JPFM7L
Marca: JPINGLOBAL		
Modelo: 2019		
Referencia: JPFM7L		
Tipo de control : Por microprocesador		
Descripción: Bioreactor de 7 litros para laboratorio		
ESPECIFICACIONES TECNICAS		
ítem	Descripción	
Frasco del Bioreactor/fermentador	Vaso de 7 L Total, volumen de trabajo hasta 5.3 Litros, construcción en vidrio de borosilicato con chaqueta térmica de agua y fondo torisférico.	
Imagen		
Componentes estándar	Entrada de aire por medio de membranas de alta esterilidad grandes con conector y cabezal Cuellos laterales roscados para ingreso de sensores, elementos de medición y toma muestras. Tapones abiertos (Juntas de silicona) (Abertura y arandelas de separación en acero inoxidable) Uniones (Juntas) de silicona para puertos inutilizados	

¹²⁷ JP Inglobal.<comercial@jpinglobal.com>. “BIOREACTORES” [Correo electrónico]. 23 septiembre 2019. Enviado a usuario de la universidad America.

	<p>Puerto cuádruple con conexiones doble sello versátil para cualquier aplicación. Soportes laterales totalmente ajustables para mantener la presión distribuida en el cierre Difusor de aire Micro-Sparger autolimpiador</p>
<p>Pantalla Modulo Controlador microprocesado</p>	<p>TOUCH-SCREEN a todo color de 15 Pulgadas para operación y control de modulo principal Interface de señales para todas las variables con conectividad via cable USB para la pantalla touch Las conexiones y entradas del módulo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Motor especial para largas jornadas de fermentación • Sensor de temperatura (Pt-100); • Control automático de la temperatura dentro de recipiente • Nivel de espuma a través de la varilla conductora • Válvula de alivio para la despresurización automática • Electrodo de PH • Sensor de oxigeno disuelto • Sensor de dióxido de carbono gaseoso; • USB para el almacenamiento de datos.
<p>Mantenimiento y calibración inmediato Software Para control, operación y visualización de gráficos, datos, configuración de parámetros de bombas peristálticas y exportaciond e datos.</p>	<p>El fermentador se puede calibrar y controlar utilizando una conexión por WIFI desde cualquier parte del país La interfaz gráfica del fermentador contiene:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pantalla de Control <p>Indicadores de estado de bombas peristalticas. Indicador de sistema de calefacción. Estado y control ON-OFF de electroválvula de Aire. Estado y control ON-OFF de electroválvula de Oxígeno. Estado y control ON-OFF de electroválvula de CO2.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Temperatura: <p>Visualización de Setpoint (Resolución de 0.1°C). Temperatura actual del proceso(Resolución de 0.1°C). Estado de control de temperatura.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Agitación: <p>Visualización de Setpoint (Resolución de 1 RPM). Velocidad de agitación actual del proceso(Resolución de 1 RPM). Estado de control de agitación.</p> <ul style="list-style-type: none"> • pH: <p>Visualización de Setpoint (Resolución de 0.1). Valor actual de pH del proceso(Resolución de 0.01). Estado de control de pH. Configuración de banda muerta (Resolución de 0.1)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Oxígeno Disuelto: <p>Visualización de Setpoint (Resolución de 0.1 %). Valor actual de la concentración de oxígeno disuelto del proceso(Resolución de 0.1 %). Estado de control de Oxígeno disuelto.</p>
	<p>Configuración de histeresis (Resolución de 1%)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Foam: <p>Estado del control Anti espuma.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pantalla Monitor: <p>Visualización en gráfica de 2 dimensiones, de los valores actuales de todas las variables del fermentador (Temperatura (°C), Agitación (RPM), pH, Oxígeno Disuelto (%OD)). Configuración de tiempo de muestreo desde 1 hasta 3600 segundos. Configuración de inicio y pausa de adquisición de datos. Opción de exportación de datos obtenidos de la adquisición de datos a Excel a través de puerto USB.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pantalla Bombas Peristalticas: <p>Bomba Peristaltica Acido: Configuración de setpoint. Configuración de Periodo (Segundos). Configuración de inicio y pausa de control manual de bomba peristaltica. Bomba Peristaltica Base: Configuración de setpoint. Configuración de Periodo (Segundos). Configuración de inicio y pausa de control manual de bomba peristaltica. Bomba Peristaltica Foam: Configuración de setpoint. Configuración de Periodo (Segundos). Configuración de inicio y pausa de control manual de bomba peristaltica. Bomba Peristaltica Medio (Velocidad Variable): Configuración de setpoint o velocidad (%). Configuración de inicio y pausa de control manual de bomba peristaltica.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Además la interfaz gráfica permite añadir al usuario información más detallada del Batch actual: <p>Nombre de Experimentador. Número de identificación. Nombre del Batch. Fecha de inicio del Batch. Hora de inicio del Batch. Observaciones adicionales.</p>
PH	<p>Sensor digital de PH autoclavable Controlador automático de Ph 0 - 14 con una exactitud de ± 0,01 pH Modo de control PID Mettler Toledo Electrodo para pH de inmersión ajustable con cable de bajo ruido</p>
OD	<p>Sensor Óptico de oxígeno disuelto Exactitud 1 metro de cable para conexión de sensores</p>

	<p>Electrodo autoclavable Mettler Toledo Se entrega cable para electrodo y electrolito Electrodo para pH de inmersión ajustable con cable de bajo ruido.</p>
Tapa y sellamientos	<p>15 puertos de ingreso En acero inoxidable 316L con dispositivo de cierre a través de tornillos de acero inoxidable. Soporte inferior en acero inoxidable con topes para soportar el peso del equipo Sellos por medio de O'ring de Viton aprobado FDA.</p> <p>Ingresos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Perforación para Pt-100 • pH • O2 • 1 entrada simple • 1 entrada triple (para la adición de ácido, base, antiespumante y nutrientes) • Aspersor de aire tipo disco perforado • Sensor de nivel regulable (líquido/espuma) • Muestreo con control • Septum holder • Mancal • Condensador de reflujo en acero inoxidable 316L.
Mangueras	Especiales para alimentar el fermentador 12 metros
Sentido de la regulación de las variables de control	Ajustable ascendente o descendente para cultivos continuos
Control de temperatura	Sensor de temperatura PT100 para bioreactor Desde temperatura ambiente + 5°C hasta 70°C Control a través de la circulación de agua del baño termostatzado
Flujo metros (Rotámetro)	Lectura directa Reglaje manual y calibrador de giro
Antifoam	Cantidad 2 para verificación de presión de ingreso aire, O2 y CO2 Anti-espumante con sistema de detención sin sondas, controlador por medio de módulo de jeringa miniatura de 5 ml (Accesorio incluido)
Condensador	Condensador del gas de salida de vidrio
Sistema de muestreo	Jeringa, libre de contaminación con reservorio autoclavable. Incluye 6 filtros absolutos para aire con porosidad de 0,22 micrómetros.
Bafile lateral quiebra ondas	Removible de 4 palas a 90° en acero 316L
Agitación	Motor de agitación de alto torque especial para largas jornadas de fermentación Motor de agitación de 100 – 1200 RPM, calibrado de fábrica para agitación entre 100 a 1200 RPM Resolución +-1RPM Tubo de agitación y aireación
Agitador	Material acero inoxidable 316L, con el retén en viton. 2 propelas tipo RUSHTON de altura ajustable.
Bomba peristáltica con pantalla	Tres Bombas de cuatro rodets Peristálticas WATSON MARLOW Control de velocidad de 0 a 999 Horas o continuo Sistema de compresión suave
Componentes sistema de muestreo estéril	Barras y placas de soporte para conexión a la entrada "PUMP" Cables de conexión individual por bomba Pinzas de obstrucción para manguera en acero inoxidable Alimentador y muestreo con 3 botellas para reactivos con capacidad de 250 ml con cánulas y conexión de doble sello en PEEK (Polieterecetona) Soporte Dispositivo toma muestra en vidrio Filtro para jeringa 3 Pinzas para manguera Manguera siliconada
Fuente de alimentación AC	110V /60 Hz
Material de construcción modulo principal (Gabinete)	Acero con tratamiento anticorrosivo y pintura electrostática blanca Cable de energía Potencia en pleno funcionamiento (110 V)
Incluye	Kit para mantenimiento de Bioreactor Sujetadores en acero inoxidable para botellas de reactivos Filtros de venteo para cada conexión (entrada y salida) Manguera de silicona Manual de instrucciones en idioma español Capacitación en sitio
Opcionales (mediante solicitud inicial a fábrica):	<ul style="list-style-type: none"> • Bioreactor múltiple • Sistema de enfriamiento • Jarras adicionales • Bombas adicionales • Sistema de fotoperiodo Led

INVERSIÓN MODELO 2019				
Item	Referencia	Cantidad	Precio Unitario	Total
BIOREACTOR DIGITAL AUTOCLAVABLE - CAPACIDAD TOTAL 7 LITROS	JPFM7L	1	\$ 72.988.000 + IVA	\$ 72.988.000 + IVA

NOTA 1: Este valor incluye el equipo puesto en Bogotá - Colombia
 NOTA 2: A estos valores se debe agregar el IVA vigente a la fecha de la factura.
 NOTA 3: Tiempo de entrega: 45 Días hábiles después de generada la OC.
 NOTA 4: Forma de pago 50% anticipo 50% Despacho
 NOTA 5: Tiempo de garantía un año
 NOTA 6: Si es distribuidor sugerimos aumentar del 25 %
 NOTA 7: Valides de la oferta 45 días hábiles

Cordialmente

Mauricio Paez Velasquez
 Gerente comercial
 Cel. 3164643827 Tel. +57 (1) 756-8668
 Edificio JINGLOBAL calle 80 # 69 P -07 Bogotá-Colombia
<https://www.instagram.com/jinglobal/>
www.jinglobal.com comercial@jinglobal.com

Biorreactores de Bailun Biotechnology Co., Ltd, con sistema de automatización¹²⁸



BaiLun Biotechnology Co., Ltd
6848# Liuxiang Rd., Jiading, Shanghai, China
sales@fermentertech.com Tel: +86- 139-17391617

Laboratory Fermenter/Bioreactor Data Sheet



Glass fermenter(Off-site sterilization autoclaves, (Magnetic Drive) BLBIO-5GC

Products and name of goods, quantity and price

USD

Serial	Name	Type	Qua.	List price	Disc. price
1	7 liters glass fermenter(Off-site sterilization autoclaves)	BLBIO-7GJ BLBIO-7GC	1	18670	13200
2	Chiller(option)	15C-30C	1	2000	1500
3	Autoclave for sterilization	100l volume	1	3500	3000

Delivery: about 4 weeks.

Terms: CIF by sea.

Payment: Prepay.

Warranty: 1 year

Without mechanical sealing, magnetic force stirrer can be used during the sterilization.

It is suitable for generic microorganism culture specially for the medicament microbe culture with long ferment cycle.

Mechanical stirrer with mechanical sealing is suitable for microbe culture in the ropy medium (i.e. xanthan gum)

¹²⁸ BAILUN BIOTECHNOLOGY.< service@fermentertech.com>. "7L Glass fermenter" [Correo electronico]. 15 de mayo 2019. Enviado a usuario de la universidad America.



BaiLun Biotechnology Co., Ltd
 6848# Liuxiang Rd., Jiading, Shanghai, China
 sales@fermentertech.com Tel: +86- 139-17391617

BLBIO-7GC/7GJ auto fermenter

一、 System constitute:

No	Item	Description
1	Vessel system	7 liters total volume 3-5 liters working volume Glass vessel with rounded bottom and double jacket for temperature control Lid Stainless steel 316L With sterile and pressure proof ports 14 x diameter 12mm and 2 x diameter 19mm 1 port for top drive 5 x 1-way connection piece, height adjustable harvest tube. Drive Direct drive from top, DC motor, 90 W, 30 – 1200 rpm Agitation Mechanical seal, shaft, 2 height adjustable six – blade stirrer, removable baffle cage Aeration Auto cleavable sterile filter, check valve, connection piece, aeration
		tube with ring sparger Required air pressure approx. 1.5 bar Ventilation Reflux cooler, connection piece, auto cleavable sterile filter Temperature Circuit Connected to glass double jackets, all four temperature circuits connected by central supply and drain lines. Probes Autoclavable temperature probe Pt100 incl. connecting cable Autoclavable pH-gel-electrode incl. connecting cable Autoclavable height adjustable antifoam-probe incl. connecting cable Sampling System Autoclavable sampling system Inoculum Cup for silicone diaphragm Measurement of Controls Integrated in stainless steel trunking Power supply Main power supply for all electrical circuits, 1 x 230V, 50 Hz

<http://www.blbio.com/en> professional integrity excellence <http://www.fermentertech.com>