



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Tema: Determinación de la velocidad máxima de transferencia de oxígeno y la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno en cultivos por lote de la bacteria *Bacillus subtilis* DS23 en un biorreactor

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previa a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

El estudio forma parte del Proyecto de Investigación “Formulación de biosanitizantes a partir de tensioactivos microbianos para su aplicación en la Industria de Alimentos” CEDIA-CEPRAXIII,2019, aprobado mediante Resolución 1357-CU-P-2019 por el Honorable Consejo Universitario de la Universidad Técnica de Ambato.

Autora: Daniela Estefanía Robalino Travez

Tutora: Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

Ambato – Ecuador

Enero 2020

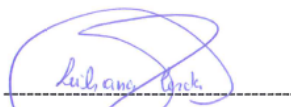
APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 11 de diciembre del 2019



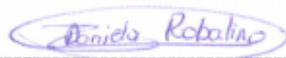
Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 180414808-6

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Daniela Estefanía Robalino Travez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Daniela Estefanía Robalino Travez


C.I. 050379614-6

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del tribunal



Dr. David Andrés Terán Mera

C.I. 1716569726



Dr. Mario Daniel García Solís


C.I. 1103605471

Ambato, 09 de Enero del 2020

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto de Investigación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Daniela Estefanía Robalino Travez

C.I. 050379614-6

AUTORA

DEDICATORIA

Porque todas las cosas proceden de él, existen por él y para él. ¡A él sea la gloria por siempre! Amén.

Romanos 11:36

A mi madrecita Suzana Robalino por ser una mujer que me llena de orgullo, la amo con todo mi corazón, no habrá manera de devolverle todo lo que me ha brindado incluso antes que hubiese nacido; no sé en donde me encontraría de no ser por su amor, apoyo y paciencia infinita.

Este es un logro que conseguimos juntas.

A mi mejor amigo Marcelo Calvache (Chelito) que, en su gloria este, por todos los momentos compartidos, por siempre tener una palabra de aliento, una sonrisa en todo momento y por siempre creer en que lograría grandes cosas en esta vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios y a la Virgen de Guadalupe por darme la dicha de vivir día a día una nueva aventura, protegerme y bendecirme siempre.

A mi mamá, sin duda Dios y la vida me regaló a la mejor mamá papá del mundo, gracias por todo el esfuerzo, los consejos, la dedicación, la paciencia, confianza e infinito amor para conmigo y mis hermanos.

A mi tía la Dra. Teresa Robalino por ser como mi hermana mayor, por todo el apoyo y cariño que me ha brindado desde pequeña.

A mis abuelitos Gloria y Camilo por quererme, consentirme y apoyarme más que nieta como su hija.

A mi querida tutora Dra. Lilitiana Cerda y al Dr. David Terán por darme la oportunidad de participar en su proyecto para poder realizar mi trabajo de titulación, por compartir todos sus conocimientos, por la paciencia y dedicación que me brindaron. Gracias por todo, son un gran equipo y sin duda alguna son fuente de inspiración.

Al Dr. Alberto Aguirre mi primer tutor, gracias por los conocimientos compartidos, la confianza, dedicación, paciencia y sobre todo por la preocupación brindada a pesar de la distancia.

A mis amigos de la universidad con los que compartí gratos momentos que están guardados en mi corazón, gracias por la confianza, las enseñanzas, el apoyo incondicional, pero sobre todo gracias por soportar mi carácter. En especial a Chelito quien fue el mejor amigo que la vida

*me pudo dar, también a Dayita y Jarol a quienes conozco desde que
inicie la carrera.*

*A mis amigos de laboratorio Lupita, Esteban, More y Abi, por todos los
momentos, risas y conocimientos compartidos mientras realizábamos la
fase experimental de nuestros proyectos de investigación.*

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Desinfectantes convencionales	1
1.1.1.1 Tensioactivos sintéticos	1
1.1.1.1.1 Clasificación de los tensioactivos sintéticos	2
1.1.1.1.2 Usos de los tensioactivos sintéticos.....	4
1.1.1.1.3 Alteraciones provocadas por tensioactivos sintéticos	4
1.1.1.2 Tensioactivos de origen microbiano	5
1.1.1.2.1 Clasificación de los biotensioactivos	7
1.1.1.3 Importancia fisiológica de los biotensioactivos.....	8
1.1.1.4 <i>Bacillus subtilis</i> productor de biotensioactivos	9
1.1.1.5 Moléculas bioactivas producidas por <i>Bacillus subtilis</i>	10
1.1.1.6 Escalamiento de la producción de tensioactivos microbianos.....	11
1.1.1.6.1 Velocidad máxima de transferencia de oxígeno	13
1.1.1.6.2 Velocidad específica máxima de consumo de oxígeno	14
1.2 Objetivos	14
1.2.1 Objetivo General	14
1.2.2 Objetivos Específicos.....	14
CAPITULO II	16
MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 Materiales, equipos y reactivos	16
2.1.1 Materiales.....	16
2.1.1.1 Material Biológico.....	16
2.1.1.2 Material de Laboratorio.....	16

2.1.2	Equipos.....	17
2.1.3	Reactivos.....	17
2.2	Métodos.....	18
2.2.1	Cultivo y mantenimiento de <i>B. subtilis</i> DS23 en placa.....	18
2.2.2	Cultivo de <i>B. subtilis</i> DS23 en el biorreactor	18
2.2.3	Descripción del biorreactor.....	19
2.2.3.1	Parámetros de operación del biorreactor Winpact, SF-02 series para el cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> DS23	20
2.2.4	Caracterización de la producción de TSM en un biorreactor de 5 litros.	21
2.2.4.1	Recuperación del biotensioactivo.....	22
2.2.5	Determinación de la concentración de biomasa.....	23
2.2.6	Determinación de la concentración de biotensioactivo producido	23
2.2.7	Determinación de la velocidad máxima de transferencia de oxígeno y la velocidad máxima de consumo de oxígeno en el biorreactor	24
2.2.7.1	Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno (NA)	24
2.2.7.2	Determinación de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO)	26
2.2.7.3	Determinación de la q_{O_2}	26
CAPITULO III.....		28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		28
3.1	Análisis y discusión de resultados.....	28
3.1.1	Curva estándar de <i>Bacillus subtilis</i> DS23	28
3.1.2	Crecimiento celular de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 en el biorreactor	30
3.1.2	Producción de biotensioactivo en el biorreactor.....	37
3.1.1	Determinación de la velocidad máxima de transferencia de oxígeno y la velocidad máxima de consumo de oxígeno en el biorreactor	41
CAPITULO V		47
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		47
4.1	Conclusiones	47

4.2 Recomendaciones.....48
ANEXOS61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Orientación de moléculas de tensioactivo en agua, los círculos azules representan la parte hidrofílica del tensioactivo y las líneas azules la parte hidrofóbica (Morales Quintana, 2009).....	2
Figura 2. Estructura general de las tres familias de biotensioactivos sintetizados por especies de <i>Bacillus subtilis</i> : Familia de las iturinas, Familia de las surfactinas y Familia de las fengicinas.....	11
Figura 3. Fermentador/biorreactor paralelo Winpact, SF-02 series.....	20
Figura 4. Curva de desgasificación y gasificación usando el Método Dinámico de Humphrey.....	25
Figura 5. Datos para el cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (KLa) usando el Método Dinámico de Humphrey.....	25
Figura 6. Curva estándar de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 en matraces de 500 mL.....	29
Figura 7. Promedio de biomasa obtenida entre replicas durante el crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 en el biorreactor de 5 litros.....	33
Figura 8. Prueba de Tukey para la biomasa producida por <i>Bacillus subtilis</i> DS23.....	34
Figura 9. Concentración de biotensioactivo en suspensiones celulares de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 para diferentes velocidades de agitación en el biorreactor de 5 litros.....	38
Figura 11. Gráfica de Cajas y Bigotes de la concentración de Biotensioactivo.....	40
Figura 12. Datos para el cálculo de la velocidad de consumo de oxígeno (NA) tras la desgasificación al medio de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 en un biorreactor de 5 litros.....	43

Figura 13. Gasificación del medio de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 en un biorreactor de 5 litros.....	43
Figura 14. Datos para el cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{LA}) en el cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 en un biorreactor de 5 litros	44
Figura 15. Comportamiento de la VTO durante el cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 en un biorreactor de 5 litros	45
Figura 16. Comportamiento de O ₂ durante el cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 en un biorreactor de 5 litros	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones de los biotensioactivos en diferentes campos.....	5
Tabla 2. Biotensioactivos y sus microorganismos productores	7
Tabla 3. Composición del medio mineral.	18
Tabla 4. Parámetros de operación del biorreactor para el cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> DS23	20
Tabla 5. Soluciones agregadas para mantener constante el pH y controlar la espuma del caldo de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 en un biorreactor de 5 litros	22
Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos para cultivos celulares de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 bajo diferentes condiciones de agitación en un biorreactor de 5 litros	30
Tabla 7. Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 a 150 rpm en biorreactor de 5 litros.....	31
Tabla 8. Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 a 200 rpm en biorreactor de 5 litros.....	31

Tabla 9. Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 a 300 rpm en biorreactor de 5 litros.....	32
Tabla 10. ANOVA para Biomasa (g/L) por Velocidad de Agitación (rpm).....	33
Tabla 11. Producción de biotensioactivo a 150 rpm en biorreactor de 5 litros.....	37
Tabla 12. Producción de biotensioactivo a 200 rpm en biorreactor de 5 litros.....	37
Tabla 13. Producción de biotensioactivo a 300 rpm en biorreactor de 5 litros.....	37
Tabla 14. ANOVA para Biotensioactivo (g/L) por Velocidad de Agitación (rpm)	40

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Expresión para la determinación de la concentración de biomasa.....	23
Ecuación 2. Expresión para la determinación de la concentración de biotensioactivo...	23
Ecuación 3. Determinación de la VTO	26
Ecuación 4. Determinación de qO_2	26

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Características del biorreactor	61
Anexo 2. Características del sistema.....	62
Anexo 3. Requisitos de uso.....	63
Anexo 4. Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> DS23 en el biorreactor.....	63
Anexo 5. Medio mineral para preparar el inóculo de <i>Bacillus subtilis</i> DS23.....	64

Anexo 6. Recuperación del biotensioactivo producido por <i>Bacillus subtilis</i> DS23 por Liofilización	64
Anexo 7. Biotensioactivo seco producido por <i>Bacillus subtilis</i> DS23.....	65

RESUMEN

Esta investigación se realizó con la finalidad de optimizar la producción de biotensioactivos con actividad anfipática a partir de *Bacillus subtilis* DS23, el mismo que se ha caracterizado por ser uno de los microorganismos que mejor rendimiento presentan al momento de producir este tipo de compuestos. La experimentación se llevó a cabo en un biorreactor de 5 litros manteniendo constantes parámetros como el pH a 6.5, la temperatura a 30°C y la aireación en 1 volumen de aire por volumen de medio por minuto (vvm), se trabajó con velocidades de agitación de 150, 200 y 300 revoluciones por minuto (rpm) siendo este el único parámetro que se varió. Se demostró que la producción de biomasa y de biotensioactivo en un biorreactor de tanque agitado están fuertemente influenciadas por la agitación. Los mejores resultados tanto de biomasa como de biotensioactivo se obtuvieron a 300 rpm, velocidad de agitación que se usó para determinar los parámetros planteados en esta investigación. Empleando el método dinámico de Humphrey usando aire como gas portador de oxígeno, se evaluó el efecto del oxígeno disuelto en el medio sobre el crecimiento y la producción de biotensioactivo mediante la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}), la velocidad específica de consumo de oxígeno (qO_2) y la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) obteniendo 0.002 h^{-1} , $0.079\text{ mmol O}_2/\text{L}\cdot\text{h}$ y 0.312 h^{-1} respectivamente. Se decidió evaluar estos parámetros por ser claves en cultivos aerobios además que se pretende que sirvan como criterios de escalamiento en investigaciones futuras.

Palabras claves: biorreactor, transferencia de oxígeno, biotensioactivo, cultivos por lote, bacteria *Bacillus subtilis* DS23

ABSTRACT

This research was carried out with the purpose of optimizing the production of biosurfactant with amphipathic activity from *Bacillus subtilis* DS23, which has been characterized as one of the microorganisms that have the best performance when producing this type of compounds. The experimentation was carried out in a 5-liter bioreactor maintaining constant parameters such as pH at 6.5, temperature at 30 ° C and aeration in 1 volume of air per volume of medium per minute (vvm), working with speeds of agitation of 150, 200 and 300 revolutions per minute (rpm) being this the only parameter that was varied. It was shown that the production of biomass and bio-surfactant in a stirred tank bioreactor is strongly influenced by agitation. The best results of both biomass and biosurfactant were obtained at 300 rpm, agitation speed that was used to determine the parameters proposed in this investigation. Using the Humphrey dynamic method using air as an oxygen-carrying gas, the effect of dissolved oxygen in the medium on the growth and production of biosurfactant was assessed by estimating the volumetric oxygen transfer coefficient (KLa), the specific rate of oxygen consumption (qO₂) and the oxygen transfer rate (VTO) obtaining 0.002 h⁻¹, 0.079 mmol O₂ / L * h and 0.312 h⁻¹ respectively. It was decided to evaluate these parameters because they are key in aerobic crops, and they are intended to serve as scaling criteria in future research.

Keywords: bioreactor, oxygen transfer, biosurfactant, batch crops, *Bacillus subtilis* DS23 bacteria

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Desinfectantes convencionales

1.1.1.1 Tensioactivos sintéticos

Los tensioactivos llamados también agentes de superficie o surfactantes son sustancias químicas que tienden a disminuir la tensión superficial o interfásica de una interfase. Normalmente aire-agua o grasa-agua, al concentrarse en la superficie e interfase de una solución acuosa modificando las propiedades de la superficie (Ospina, 2012; Sánchez, 2006). Constituyen una clase importante de productos químicos industriales ampliamente utilizados en casi todos los sectores de la industria moderna. En 1984, la industria empezó con un consumo de 1,7 millones de toneladas de este producto, aumentando a 15,93 millones de toneladas en el 2014. Este consumo prevé un aumento exponencial esperado de 24,19 millones de toneladas para el 2022 (Palmer & Hatley, 2018; Powderliquiddeterg, 2016).

El creciente consumo de tensioactivos sintéticos se debe a la aplicabilidad que le confieren sus dos grupos: hidrofílico e hidrofóbico (Jardak, Drogui, & Daghrir, 2016), de modo que la parte hidrofílica se orienta hacia el fluido y la parte hidrofóbica tiende a alejarse del agua (Morales Quintana, 2009) tal como se muestra en la Figura 1. En términos generales, estos compuestos alteran las relaciones de energía en las interfaces, de esta forma provocan alteraciones en la tensión superficial o interfacial (Jardak, Drogui, & Daghrir, 2016).

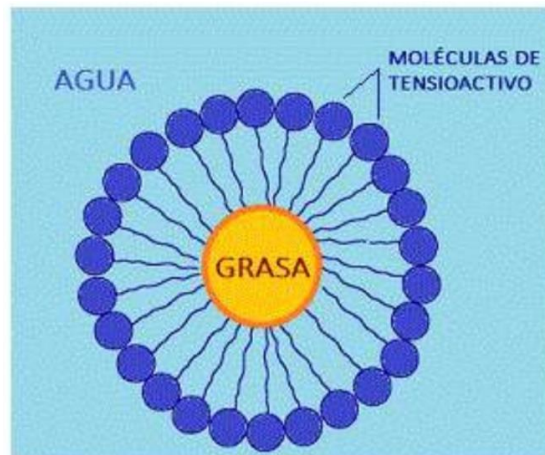


Figura 1. Orientación de moléculas de tensioactivo en agua, los círculos azules representan la parte hidrofílica del tensioactivo y las líneas azules la parte hidrofóbica (Morales Quintana, 2009)

1.1.1.1.1 Clasificación de los tensioactivos sintéticos

Los tensioactivos se clasifican según la carga de su grupo hidrofílico como: aniónicos (con carga negativa), catiónicos (con carga positiva), no iónicos (sin carga) y anfóteros (ambas cargas) (Jones-Costa et al., 2018).

- **Aniónicos:** Se caracterizan porque se disocian en un anión anfífilo responsable de la actividad superficial y un contraión catiónico, que suele ser un metal alcalino (sodio, potasio, entre otros) o un amonio cuaternario. Son los tensioactivos más utilizados como emulsionantes, solubilizantes, humectantes y detergentes. A este grupo pertenecen: los alquil benceno sulfonatos, los jabones, agentes espumantes como el dodecil sulfato sódico, humectantes del tipo sulfocinato y dispersantes del tipo lignosulfonatos (Sánchez, 2006). Son ampliamente usados debido a su excelente capacidad de limpieza a nivel doméstico e industrial, flexibilidad en las formulaciones y bajo coste de fabricación (Piasecki, 2002).
- **Catiónicos:** Se disocian en un catión anfífilo y un contraión aniónico (halogenuro). La gran mayoría de compuestos pertenecientes a este grupo son

compuestos nitrogenados como las sales de amonio y sales de amonio cuaternario, entre los que se destacan el cloruro de benzalconio y el bromuro de hexadecil trimetilamonio. Estos tensioactivos generalmente son más costosos que los aniónicos y los no iónicos debido al número y tipo de reacciones necesarias para su síntesis (**Zografi, Schott, & Swarbrick, 1990; Pérez, y otros, 2002; Haldar, Kondaiah, & Bhattacharya, 2005**). Sin embargo, son excelentes agentes antiestáticos, suavizantes para el cabello e inhibidores de la corrosión, también se pueden utilizar como desinfectantes de heridas en la piel y para la desinfección de material quirúrgico (**Yanai, y otros, 2006**).

- **No iónicos:** Esta clase de tensioactivos no se ionizan en solución acuosa puesto que su grupo hidrófilo (alcohol, fenol, éter, éster o amida) no se puede disociar por lo que no se ven afectados por el pH de la solución. Son muy utilizados en preparaciones farmacéuticas (**Kolodziejska, 2005; Vyas, y otros, 2005**), en la industria cosmética y como emulsionantes y solubilizantes en los alimentos. Los tensioactivos más usados de este grupo son: el nonil fenol etoxilado y el triestearato de sorbitano (**Rosen, 1993; Golemanov, Tcholakova, Denkov, & Gurkov, 2006**)
- **Anfóteros:** Los tensioactivos de este grupo dan lugar a disociaciones aniónicas y catiónicas en función del pH de la solución, pueden poseer propiedades solubilizantes de los aniónicos y desinfectantes de los catiónicos. El más representativo de este grupo es el alquil dimetil betaína. Son compuestos de alto costo al igual que los catiónicos por lo que se usa en sectores específicos como productos cosméticos (**Rushton, Gummer, & Flasch, 1994; Guin, 2000**) y en champús para bebés donde su elevada biocompatibilidad es primordial (**Reynolds, 1993**).

1.1.1.1.2 Usos de los tensioactivos sintéticos

Por su naturaleza, los tensioactivos se utilizan ampliamente en productos de lavado y cosméticos como agentes emulsionantes y promotores de espuma en industrias como la alimentaria, agrícola, farmacéutica y cosmética (**Ivanković & Hrenović, 2010**).

En los productos de limpieza, los tensioactivos aniónicos son los de mayor uso, representando un 28% en el mercado global de detergentes, con perspectivas de crecimiento del 2,5% para el año 2020 (**Jones-Costa et al., 2018**). Dentro de los tensioactivos aniónicos más utilizados están el sulfonato de alquilbenceno lineal y lauril éter sulfato de sodio (**Thomas, Gough y Freeman 2017; Paulo et al. 2017**). Estos compuestos se utilizan debido a su efectividad, relación costo/rendimiento, versatilidad y registro de seguridad ambiental. Sin embargo, a pesar de estas excelentes características, existen numerosos estudios y revisiones científicas que han reportado un efecto tóxico de los tensioactivos aniónicos (**Jardak et al., 2016**).

La toxicidad de los tensioactivos químicos en general está relacionada con las altas concentraciones que se encuentran en aguas superficiales, sedimentos, lodos y suelos (**Sobrino-Figueroa, 2018**). Por lo tanto, la introducción de estos compuestos residuales en el medio ambiente a través de diferentes fuentes da lugar a graves problemas ambientales, incluidos el riesgo ecológico y el daño a la salud humana (**Jardak et al., 2016**).

1.1.1.1.3 Alteraciones provocadas por tensioactivos sintéticos

En ambientes acuáticos los tensioactivos provocan la formación de espuma reduciendo los niveles de oxígeno, lo cual genera la disminución de la calidad de agua ocasionando efectos tóxicos para los organismos que viven en estos (**Jardak et al., 2016**).

Existe evidencia científica que indica que estos productos dañan las branquias de los peces y causa una secreción excesiva de moco. Además, producen alteraciones marcadas en la morfología de la piel de anfibios, causando hiperplasia o hipertrofia del epitelio (**Rissoli, y otros, 2016**). Asimismo, el uso de agua contaminada con detergente, aplicada al cultivo

de fréjol reduce la tasa de fotosíntesis y el contenido de clorofila lo cual indica disminución de la productividad, mientras que, en seres humanos, el contacto con tensioactivos aniónicos provoca dermatitis y úlceras aftosas (**Rebello, Asok, Mundayoor, & Jisha, 2014**).

Lo que no ocurre con el uso de tensioactivos microbianos debido a su baja casi nula toxicidad según estudios previos realizados (**Medina & Rodríguez, 2010; Ospina, 2012; Zaragoza Martínez, 2012**).

1.1.1.2 Tensioactivos de origen microbiano

Los biotensioactivos o biosurfactantes son compuestos biológicos anfífilos de comportamiento químico dual, solubles tanto en agua como en grasas. Son producidos por microorganismos como levaduras, bacterias y hongos filamentosos (**Banat, Makkar, & Cameotra, 2000**). El desarrollo de la biotecnología ha posibilitado la producción de biotensioactivos a gran escala para ser utilizados en diferentes campos industriales (**Nuñez, y otros, 2014**) como se puede apreciar en la Tabla 1.

Tabla 1. Aplicaciones de los biotensioactivos en diferentes campos

Campo	Aplicaciones
Industria Petrolera	Extracción de petróleo, biorremediación de hidrocarburos, biodesulfuración de petróleo.
Saneamiento ambiental	Biorremediación de suelos contaminados por metales tóxicos. Biorremediación de suelos y aguas contaminadas por derrames de gasolina o petróleo.
Industria cosmética y farmacéutica	En productos anticaspa, bacteriostáticos y desodorantes.

En la industria alimentaria	En agentes de limpieza, en la producción de mayonesa y para el control de olores.
En la agricultura	En el control biológico de patógenos en los cultivos y para el aumento de la disponibilidad de micronutrientes del suelo

Fuente: **(Cameotra & Makkar, 2004)**

Además, con el aumento de la conciencia ambiental y el énfasis en una sociedad sostenible en armonía con el medio ambiente mundial. Los tensioactivos microbianos han cobrado importancia en los últimos años debido a su baja toxicidad y alta biodegradabilidad en comparación con los tensioactivos químicos sintéticos **(Van Hamme, Singh, & Ward, 2006)**. En vista de la capacidad que tienen los biotensioactivos como inhibidores del crecimiento de microorganismos y de formación de biopelículas, se ha considerado posible su uso como agente de limpieza a nivel industrial **(Masip, 2016; Gaiker, 2015)**.

En la industria alimentaria en particular, la limpieza es una etapa importante de la producción y calidad del producto final. El uso de biotensioactivos posibilitan que los equipos a usarse en esta industria estén libres de impurezas, así como también se reduzca la presencia de microorganismos contaminantes gracias a sus propiedades detergentes, humectantes, emulsionantes, espumantes y dispersantes **(Torrecilla, 2011)**.

Los productos de limpieza fabricados a partir de biotensioactivos se utilizan cada vez más en aplicaciones de limpieza doméstica, profesional e industrial **(Al-Ajlani, Sheikh, Ahmad, & Hasnain, 2007)**. Esto debido a que los biotensioactivos pueden degradar la suciedad, los residuos de alimentos y la grasa mediante la acción enzimática y metabólica además de eliminar a los microorganismos asociados con los problemas de olor **(Abatenh, Gizaw, Z, & et al, 2017)**. Se conoce que numerosos géneros microbianos (Tabla 2) son capaces de producir biotensioactivos durante su proceso metabólico **(Nuñez, y otros, 2014)**.

Tabla 2. Biotensioactivos y sus microorganismos productores

Biotensioactivo	Microorganismo
Glicolípidos	<i>Alcanivoras borkumensis, Tsukamurella spp</i>
Ramno lípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa, Serratia rubidea</i>
Soforolipidos	<i>Torulopsis bombicola, Cadida apícola</i>
Trehalolipidos	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium spp, Arthrobacter spp., Nocardia spp</i>
Peptido-lipidico	<i>Bacillus licheniformis, Myroides spp</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Lactobacillus spp</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramidisina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Alasán	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Emulsán	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposán	<i>Candida lipolytica</i>
Lipoproteína	<i>Candida tropicalis</i>
Arthrofactina	<i>Arthrobacter spp</i>
Streptofactina	<i>Streptomyces tendae</i>

Fuente: (Jiménez, Medina, & Gracida, 2010)

1.1.1.2.1 Clasificación de los biotensioactivos

Tomando en cuenta la naturaleza química de los biotensioactivos se clasifican en los siguientes tipos:

- **Biotensioactivos Glucolípidos:** Son moléculas que tienen en su estructura química una parte de lípido o grasa y una parte de azúcar. La mayoría de los biotensioactivos conocidos son glucolípidos. Entre los glucolípidos más conocidos son los ramnolípidos, que son bioemulsificantes que han sido muy estudiados, por su alta actividad emulsificante y alta afinidad por moléculas orgánicas hidrofóbicas.
- **Biotensioactivos Lipoproteínas y lipopéptidos:** Son compuestos químicos que tienen en su estructura una parte de lípido o grasa y otra parte de proteína. Las surfactinas son las moléculas más representativas de este grupo por su capacidad de reducir la tensión superficial.
- **Biotensioactivos ácidos grasos:** Son compuestos producidos por microorganismos que tienen la capacidad de oxidar alcanos a ácidos grasos que tienen propiedades tensioactivas.
- **Biotensioactivos Fosfolípidos:** Son compuestos químicos que tienen grupos fosfato, unidos a una parte con estructura de lípido.
- **Biotensioactivos poliméricos:** Son macromoléculas de alto peso molecular. Los compuestos más estudiados de este grupo son: Emulsán, Liposán, mannoпротеína y complejos de polisacáridos-proteínas (**Cameotra & Makkar, 2004**).

1.1.1.3 Importancia fisiológica de los biotensioactivos

Diferentes investigadores han estudiado el papel fisiológico de los biotensioactivos. Alguno de los papeles que se les atribuyen a los biotensioactivos son: interacción célula/célula para la formación de biofilms (**Neu, 1996; Ron & Rosenberg, 2001; Van Hamme, Singh, & Ward, 2006**). También muy probablemente estén implicados en la diferenciación celular (**Banat, Makkar, & Cameotra, 2000**), accesibilidad a sustratos (**Van Hamme, Singh, & Ward, 2006**) y resistencia a compuestos tóxicos gracias a sus

propiedades antifúngicas y antivirales, principalmente en lipopéptidos y glicolípidos (**Kitamoto, Isoda, & Nakahara, 2002**). Además, cuando los microorganismos patógenos infectan plantas o animales producen biotensioactivos que actúan como agentes dispersantes para el microorganismo y como agentes humectantes para la célula hospedadora (**Spök, Arvanitakis, & McClung, 2018**).

La mayoría de las funciones citadas de los biotensioactivos tienen lugar extracelularmente, siendo posible que todavía estén por descubrir nuevas actividades intracelulares.

1.1.1.4 *Bacillus subtilis* productor de biotensioactivos

Bacillus subtilis pertenece a la familia *Bacillaceae*, género *Bacillus*, es un bacilo Gram-positivo, aerobio estricto, productor de endosporas, antibióticos y biofilms, se lo encuentra comúnmente en el suelo. En cultivo en placa, las colonias son de color blanco, consistencia viscosa, margen ondulado, elevación plana y forma irregular (**Yáñez, 2012**).

El potencial de *Bacillus subtilis* se basa en su capacidad de producir gran variedad de moléculas bioactivas con propiedades antifúngicas, junto con una baja toxicidad, alta biodegradabilidad y características amigables con el ambiente en comparación con productos químicos (**Chen, y otros, 2008**). *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de formar endosporas que le proporciona un alto nivel de resistencia a condiciones ambientales extremas favoreciendo al desarrollo de bioproductos (**Errington, 2003; Ongena, Henry, & Thonart, 2009**).

Por otro lado, *Bacillus subtilis* también es capaz de producir biotensioactivos, **Gómez & Loyola (2017)** señalan que *B. subtilis* tiene la capacidad de producir 0.4 g/L de tensioactivo a nivel de matraces. Sin embargo, es importante mencionar que no se ha podido determinar con claridad el papel fisiológico que estas moléculas desempeñan para los microorganismos que las producen. Debido a la amplia variedad estructural y de especies que los sintetizan (**Becerra & Horna, 2016**). Estas especies pueden ocupar

hábitats muy distintos, lo más acertado sería adjudicarles diversas funciones, aunque todas ellas estarían en relación directa con su carácter anfifílico.

1.1.1.5 Moléculas bioactivas producidas por *Bacillus subtilis*

Dentro de los compuestos producidos por *Bacillus subtilis* sobresalen los lipopéptidos por su alta actividad biocida, potencial biotecnológico y posibles aplicaciones en biocontrol (**Chen, y otros, 2008**). Estas moléculas bioactivas están agrupadas en tres familias: surfactinas, fengicinas e iturinas, biosurfactantes activos de membrana con potentes actividades antimicrobianas (**Muaaz, Muhammad, Zeeshan, & Shahida, 2007; Peypoux, Bonmatin, & Wallach, 1999**).

- La familia de las surfactinas (Figura 2) son heptapéptidos, exhiben funciones antimicrobianas, antitumorales y antivirales (**Rodriguez, Banat, Teixeira, & Oliveira, 2006**), e inhiben la formación de biopelículas de otras bacterias al interferir con la unión de las células a las superficies (**Mireles, Toguchi, & Harshey, 2001**).
- La familia de las iturinas principalmente iturina A y C, micosubtilinas y bacilomicinas D, F y L (Figura 2), también son heptapéptidos al igual que las surfactinas, esta familia tiene actividad antifúngica e inhibitoria del crecimiento de un amplio rango de patógenos de plantas (**Romero, y otros, 2007**).

La familia de las fengicinas son decaapéptidos con un anillo interno de lactona en la fracción peptídica, son menos conocidas que las iturinas y las surfactinas pero mantienen una actividad fungitóxica fuerte, especialmente contra los hongos filamentosos (**Vanittanakom, Loeffler, Koch, & Jung, 1986; Romero, y otros, 2007**).

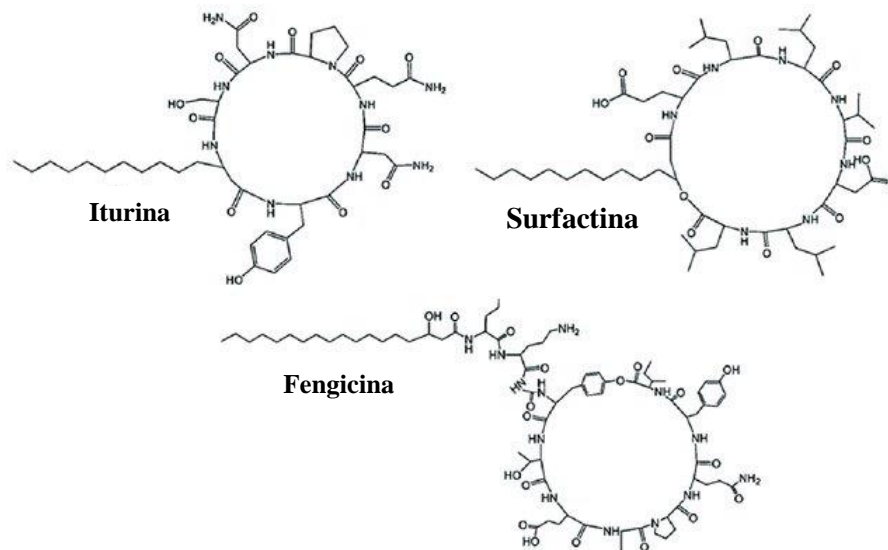


Figura 2. Estructura general de las tres familias de biotensioactivos sintetizados por especies de *Bacillus subtilis*: Familia de las iturinas, Familia de las surfactinas y Familia de las fengicinas. (Khan, Maymon, & Hirsch, 2017).

1.1.1.6 Escalamiento de la producción de tensioactivos microbianos

Tradicionalmente el escalado de procesos químicos y bioquímicos se ha realizado con el uso de números adimensionales. En el caso de los procesos bioquímicos, se tiene en cuenta relaciones que dan información acerca de las necesidades ambientales de la célula como la cantidad de oxígeno requerida para el transporte de electrones en los procesos metabólicos, entre otros. Estos métodos de escalado se fundamentan en un régimen de operación asociado al fenómeno de transferencia de masa, energía y/o cantidad de movimiento en el proceso (Leib, Pereira, & Villadsen, 2001). Es así, como se selecciona las relaciones de variables que dan origen a los números adimensionales y se escoge el criterio de escalado.

Las investigaciones más recientes con respecto al escalado de procesos se desarrollan siguiendo los métodos tradicionales de escalado, puesto que desde la década de los años sesenta del siglo XX no ha habido aportes significativos en los métodos de escalado (Bisio

& Kabel, 1985), solo han surgido relaciones empíricas a partir de la combinación de números adimensionales existentes o nuevos números adimensionales que han surgido como resultado de las correlaciones de datos históricos de un proceso (**Vandekerckhove, Moerman, & Van Huller, 2008; Bogaerts & Vande, 2004**).

Algunos parámetros de escalado como: los sistemas de enfriamiento, calentamiento, transferencia de calor, tamaño de escala de operación, entre otros no pueden ser mantenidos por economía o por factores geométricos a nivel industrial, (**Nienow, 2001; Gonzalez-Castellanos, 2000**). Sin embargo, las variaciones más significativas en el escalado ascendente son cambios bruscos en las condiciones ambientales que experimentan los microorganismos, debido a largos tiempos de mezclado y a la formación de compartimentos (**González-Castellanos, 2000**).

Se debe considerar que cuando se lleva a cabo un escalamiento los microorganismos experimentan cambios en las condiciones hidrodinámicas, dependiendo de su tamaño. Sin embargo, las enzimas y las bacterias son tan pequeñas, que se ven menos afectadas por el estrés dinámico del fluido. Además, se ha demostrado experimentalmente, en el caso de microorganismos filamentosos, que hay modificación de la viscosidad de los medios, razón por la cual se presentan problemas de transferencia de masa, energía y mezclado (**Bayrock & Ingledew, 2005**).

Por tal motivo, se recomienda tener en cuenta el análisis del régimen, es decir el efecto de los gradientes de oxígeno y de concentración. Puesto que el cambio de escala es una proyección en la cual los datos obtenidos en un sistema se utilizan para diseñar otro de tamaño diferente; así se puede plantear una serie de relaciones para ambos sistemas (**Ruiz, 2009**) y evitar problemas relativos al escalado de procesos que involucran fluidos de comportamiento no newtoniano, propiedades físicas dependientes de la temperatura, heterogeneidad de los materiales y espumas, entre otros. Los cuales se resumen en fenómenos de transferencia de masa, energía y cantidad de movimiento (**Hoyos & Mejía, 2009**).

1.1.1.6.1 Velocidad máxima de transferencia de oxígeno

En la presente investigación se consideró la velocidad máxima de transferencia de oxígeno como uno de los criterios de escalamiento puesto que la transferencia de oxígeno constituye un factor muy importante en el crecimiento de los microorganismos y es variable fundamental para el escalado y la economía de los sistemas de biosíntesis aerobia **(Nienow, 2001)**.

Además, la concentración de oxígeno disuelto en un cultivo con microorganismos aerobios depende de la tasa de transferencia de oxígeno, de la fase gas al líquido, de la velocidad de transporte del oxígeno hacia las células y de la tasa de consumo de oxígeno por los microorganismos para el crecimiento, mantenimiento y producción de metabolitos y estructuras celulares **(Galaction, Cascaval, Oniscu, & Turnea, 2004)**.

En un biorreactor, la transferencia de oxígeno está afectada por diferentes factores que intervienen sobre la hidrodinámica de este como: las propiedades físicas tanto del medio de cultivo como del gas utilizado para aportar el oxígeno, los parámetros geométricos del biorreactor, las condiciones de operación a las que se desarrolla el proceso y el tipo de microorganismo cultivado **(Deckwer & Schumpe, 1993)**.

Con el propósito de conocer el efecto de estos factores sobre la transferencia de oxígeno, se han desarrollado diferentes trabajos para evaluar la incidencia de cada factor buscando mejorar los procesos de transferencia de oxígeno. Logrando en algunos casos superar las limitaciones a las que los microorganismos se encuentran expuestos en los diseños convencionales **(García-Ochoa & Gómez, 2009)**.

Uno de los factores que afecta de gran manera a la transferencia de oxígeno es la concentración de oxígeno disuelto puesto que es un nutriente limitante en cultivos con alta demanda de oxígeno. Lo cual puede deberse a la velocidad de crecimiento del microorganismo, a una alta producción de biomasa o a que las propiedades reológicas de los medios de cultivo ofrezcan resistencia a la transferencia de masa **(Casas, Santos, & García-Ochoa, 2000)**.

Sin embargo, una de las razones principales por las que la disponibilidad del oxígeno en el medio de cultivo es limitada, está relacionada con su baja solubilidad en soluciones acuosas de nutrientes. Para superar este inconveniente y evitar que la transferencia de oxígeno sea el paso controlador para el crecimiento microbiano, viéndose afectado el cultivo y el bioproceso, **García-Ochoa F. , Gómez, Santos, & Merchuk (2010)**, recomiendan emplear como alternativas convencionales cambios en la velocidad de agitación, en el flujo de aireación o en los sistemas de distribución de aire (**Akita & Yoshida, 1973; Nikakhtari & Hill, 2005; Flores-Cotera & García-Salas, 2005; Yazdian, Shojaosadati, Nosrati, Pesaran Hajiabbas, & Vasheghani-Farahani, 2009; Moraveji, Mohsenzadeh, Fakhari, & Davarnejad, 2012**)

1.1.1.6.2 Velocidad específica máxima de consumo de oxígeno

El segundo criterio de escalado que se consideró estudiar es la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno que se ve afectada por muchos factores, siendo los más importantes la especie celular utilizada, la fase de crecimiento del cultivo y la naturaleza de la fuente de carbono en el medio. En cultivos discontinuos, la velocidad de consumo de oxígeno varía con el tiempo, debido a que la concentración de células aumenta durante el cultivo y a los cambios fisiológicos en las diferentes fases de crecimiento (**Torres & J, 2008**).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Determinar la velocidad máxima de transferencia de oxígeno (VTO_{max}) y la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno (qO_{2max}) en cultivos por lotes de *Bacillus subtilis* DS23 en un biorreactor.

1.2.2 Objetivos Específicos

Evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de biomasa y

biotensioactivo en cultivos de *Bacillus subtilis* DS23 a nivel de biorreactor.

Caracterizar la producción del tensioactivo microbiano a distintas velocidades de agitación en cultivos por lotes de la bacteria *Bacillus subtilis* DS23 en un en biorreactor.

Determinar la VTO_{max} y la qO_{2max} a la velocidad de agitación en la que exista la mayor producción de tensioactivo microbiano.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales, equipos y reactivos

2.1.1 Materiales

2.1.1.1 Material Biológico

La cepa *Bacillus subtilis* DS23 fue proveída por el banco de cepas del Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador (CIBE) proporcionada por el Dr. Jonathan Coronel León y conservada en el laboratorio de Canje de Deuda de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología en un cultivo líquido con 20% de glicerol a -80°C.

2.1.1.2 Material de Laboratorio

- Material de vidrio (GLASSCO).
 - Probetas de 10, 100, 200, 1000 mL
 - Matraces Erlenmeyer de 100, 200, 500, 1000 y 2000 mL
 - Vasos de precipitación de 50 y 100 mL
 - Balón de aforo de 10, 100 y 500 mL
 - Botellas de esterilización
- Espátulas estériles
- Magnetos (Golderie Trading)
- Toallas de papel

- Tubos de centrifuga de 45 mL
- Puntas de 1000 μ L
- Cajas Petri de vidrio

2.1.2 Equipos

- Biorreactor autoclavable Winpact SF/02 series
- pH-metro (Thermo Scientific)
- Incubadora (Lab- INCUBATOR- Digisystem Laboratory Inc)
- Estufa (Precision-Thermo Scientific)
- Autoclave (H1-CLAVETM HV-110)
- Cabina de flujo laminar (OptiMAIR^R)
- Agitador incubador orbital (Incu-Shaker mini-Benchmarle)
- Micropipeta manual (Thermo Scientific, Dinamarca)
- Balanza analítica (Adventurer Pro)
- Balanza analítica (Mettler Toledo XSE205 DualRange)
- Centrifuga (Rotina 380- Hettich Zentrifugen)
- Espectrofotómetro UV-VIS (accuSkan GO- Fisher Scientific)
- Liofilizador Labconco
- Ultra congelador Binder
- Software de análisis gráfico

2.1.3 Reactivos

- Etanol al 96% de pureza (ISSE LABS)
- Sulfato cúprico (CuSO_4) (ISSE LABS)
- Agua destilada (ISSE LABS).
- Hidróxido de sodio (NaOH) (ISSE LABS).
- Ácido Clorhídrico concentrado (HCl) (ISSE LABS).
- Metanol al 100% de pureza (ISSE LABS).
- 1,3-Butilglicol
- LB agar
- D-glucosa

- Extracto de levadura
- Nitrato de Sodio (NaNO_3)
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4)
- Fosfato mono potásico (KH_2PO_4)
- Sulfato de Magnesio Heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de Hierro Heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de Calcio (CaCl_2)

2.2 Métodos.

2.2.1 Cultivo y mantenimiento de *B. subtilis* DS23 en placa

La cepa de *B. subtilis* DS23 se sembró en agar nutritivo y se conservó en un cultivo Luria Bertani (LB) líquido con 20% de glicerol a -80°C . Antes de iniciar cada experimentación a nivel biorreactor, *B. subtilis* DS23 se sembró en cajas Petri usando medio LB sólido, estas cajas se usaron posteriormente para preparar el inóculo para el crecimiento en el biorreactor.

2.2.2 Cultivo de *B. subtilis* DS23 en el biorreactor

Para el cultivo del microorganismo en el biorreactor se utilizó un medio mineral (Tabla 3), para su preparación la fuente de carbono y las sales minerales se prepararon y autoclavaron por separado (Anexo 5).

Tabla 3. Composición del medio mineral.

Componente	Unidad (g/L)
D- Glucosa	20
Extracto de levadura	1
NaNO_3	8.5
Na_2HPO_4	5.7
KH_2PO_4	4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.21

FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01
CaCl ₂	*7x10 ⁻⁶

Fuente: (Mnif, Sahnoun, Banat, Ellouze-Chaabouni, & Ghribi, 2014)

Para la medición de CaCl₂ se realizó una solución STOCK (700 mg CaCl₂/L) debido a que la cantidad que debía pesarse era sumamente pequeña y las balanzas analíticas no tienen la capacidad de medir esas cantidades. En el medio de cultivo mineral se colocó 10 uL de la solución STOCK por cada litro de cultivo.

El inóculo para el biorreactor se preparó con *Bacillus subtilis* DS23 sembrado anteriormente en cajas Petri y con un asa se pasó la bacteria a 5 matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 100 ml de medio de cultivo mineral cada uno durante 8 horas de incubación a 37°C y 150 rpm.

Transcurridas las 8 horas se midió por triplicado la densidad óptica (OD) a 600 nm, se obtuvieron valores muy cercanos a 1 en cada uno de los matraces, dichos valores dieron como resultado de 1.006 g/L a 1.008 g/L de biomasa producida en cada matraz. Seguido de la medición, se colocó el inóculo de los 5 matraces al biorreactor que ya contenía 4.5 L de medio mineral. Se puso en marcha el biorreactor y de inmediato se volvió a medir la DO, en donde se obtuvo un valor de 0.119 que corresponde a 0.1 g/L de biomasa inicial que es la cantidad con la que se pretendía iniciar el proceso.

2.2.3 Descripción del biorreactor

El biorreactor autoclavable Winpact SF/02 series (Figura 3), consta de tres partes principales:

- El biorreactor de vidrio autoclavable con su plancha de calentamiento.
- Los accesorios del biorreactor utilizados en la operación de este.
- El biocontrolador para la medición y control de las variables de proceso con sus respectivas salidas del controlador para mantener las condiciones de proceso en el

punto de consigna.

Las características de cada componente se detallan en los Anexos 1,2,3.



Figura 3. **Fermentador/biorreactor paralelo Winpact, SF-02 series** (Major Science, 2015)

2.2.3.1 Parámetros de operación del biorreactor Winpact, SF-02 series para el cultivo de *Bacillus subtilis* DS23

Tabla 4. Parámetros de operación del biorreactor para el cultivo de *Bacillus subtilis* DS23

Parámetro	Descripción
Temperatura de cultivo	30 °C
Tiempo de cultivo	24 horas
Tipo de agitador	Turbina Rushton de seis palas
Número de agitadores	3 (33.5 cm de altura)
Número de deflectores	3
Dimensiones de los deflectores	Altura (32, 35.5, 37 cm) Diámetro (0.8, 08, 0.5 cm)
Tipo de difusor de aire	Difusor en anillo con poro de 1mm de diámetro
Tamaño de burbuja	2-10 μ m
Proporción del biorreactor	2.17:1
Control de pH	Automatizado con soluciones:

	<ul style="list-style-type: none"> - NaOH (0.35M) para basificar el medio - H₂SO₄ (0.35M) para acidificar el medio
Control de espuma	Butilglicol (10%)

2.2.4 Caracterización de la producción de TSM en un biorreactor de 5 litros.

Inicialmente se realizaron cultivos por lotes de la bacteria *Bacillus subtilis* DS23 en un biorreactor de 5 litros (Anexo 4) a distintas velocidades de agitación (150, 200 y 300 rpm). Considerando que las células bacterianas se desarrollan perfectamente hasta 300 rpm cuando se trabaja a nivel de biorreactor (**Delaunay, Lapujade, Engasser, & Goergen, 2002; Okino, Suda, Keitaro, Inui, & Yukawa, 2008**), pasada esta velocidad de agitación es muy probable que la bacteria se vea afectada por la fuerza de cizalla (**Doran, 1995**).

Por otro lado, por una revisión bibliográfica previamente realizada se decidió utilizar una tasa específica de aireación de 1 vvm (5 litros de aire por minuto). **Sánchez, Dustet, Coca, Iliná, & Martínez** (2009) mencionan en un estudio que la cantidad de aire suministrado puede afectar directamente al crecimiento celular así como a la producción del producto de interés por la excesiva formación de espuma. Además, tomando en cuenta que *Bacillus subtilis* DS23 se desarrolla adecuadamente en un pH= 7.0, aunque para la producción de los biotensioactivos es necesario acidificar un poco el medio (**Yáñez Mendizábal, 2012**), se realizó un control a través de la pantalla del biocontrolador del biorreactor de manera continua a pH = 6.5, para mantener constante este valor fue necesario agregar ciertas soluciones que se detallan en la Tabla 5.

Además, como resultado de la agitación y aireación se produjo bastante cantidad de espuma, para poder controlar dicha espuma fue necesario agregar Butilglicol al 10% (Tabla 5) para no afectar al desarrollo del microorganismo. La cantidad de butilglicol añadido vario entre las velocidades de agitación usadas debido a que la producción de espuma incrementó conforme aumentó la agitación, limitando que se pueda asegurar que

su efecto en la producción de biomasa y biotensioactivo sea similar. Cada ensayo en biorreactor se realizó por duplicado (réplicas independientes).

Tabla 5. Soluciones agregadas para mantener constante el pH y controlar la espuma del caldo de cultivo de *Bacillus subtilis* DS23 en un biorreactor de 5 litros

Velocidad de agitación (rpm)	NaOH 0.35 M agregado (ml)	H₂SO₄ 0.35 M agregado (ml)	Butilglicol 10% agregado (ml)
150	5	25	30
150	5	25	30
200	5	30	37
200	7	27	37
300	5	25	40
300	5	25	40

Durante los ensayos se cuantificó la concentración de biomasa a través de la medición de la densidad óptica del cultivo cada hora de la experimentación de acuerdo con la curva estándar de *Bacillus subtilis* DS23 elaborada previamente (Figura 6) y la producción de biotensioactivo se lo realizó por peso seco tomando muestras cada 4 horas de la experimentación.

2.2.4.1 Recuperación del biotensioactivo

El medio de cultivo de *Bacillus subtilis* DS23 presente en el biorreactor se transfirió a tubos Falcon de 50 mL, los cuales se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos para separar la biomasa (pellet) del sobrenadante (tensioactivo). Tras la centrifugación al sobrenadante libre de células que se obtuvo, se traspasó a vasos de precipitación (Labconco) hasta 135 mL y se le añadió 1 mL de HCl concentrado (37%) para llegar a un pH de 2. Posteriormente se dejaron los vasos a 16°C por 24 horas. Transcurrido ese

tiempo, se agregó NaOH (35%) para basificar la solución hasta llegar a un pH de 7. Después las muestras se las llevaron al ultracongelador durante 1 hora.

Finalmente, el biotensioactivo que muy probablemente sea un lipopéptido se recuperó por liofilización (31 Pa, -38°C), terminada la liofilización (Anexos 6 y 7) se dejó los vasos con las muestras en una estufa a 70°C durante 24 horas para quitarles completamente la humedad para calcular la concentración del biotensioactivo producido por peso seco. Es importante mencionar que no se realizó ningún control negativo por cuestiones de logística.

2.2.5 Determinación de la concentración de biomasa

Para estimar la concentración de biomasa se utilizó la ecuación resultante de la curva estándar de *Bacillus subtilis* DS23 realizada previamente (Figura 6):

Ecuación 1. Expresión para la determinación de la concentración de biomasa

$$y = 1.0247x - 0.0157$$

Dónde

y: Concentración de biomasa (g/L).

x: Densidad óptica medida.

2.2.6 Determinación de la concentración de biotensioactivo producido

Para estimar la concentración de biotensioactivo producido se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación 2. Expresión para la determinación de la concentración de biotensioactivo

$$[BTS] = \frac{PMS - PV}{V}$$

Dónde

[BTS]: Concentración de biotensioactivo (g/L).

PMS: Peso del vaso con la muestra seca (g).

PV: Peso del vaso vacío (g).

V: Volumen de la muestra tomada (L).

2.2.7 Determinación de la velocidad máxima de transferencia de oxígeno y la velocidad máxima de consumo de oxígeno en el biorreactor

Para la determinación de estos parámetros, se eligió la velocidad de agitación a la que se produjo la mayor concentración de tensioactivo (300 rpm, 30°C), aunque hubiese sido idóneo trabajar con todas las velocidades de agitación con las que se experimentaron para conocer si hubiese existido una saturación de oxígeno en el medio y por ende una velocidad máxima de transferencia, sin embargo, por cuestiones de logística esto no fue posible. La velocidad máxima de transferencia de oxígeno (VTO_{max}) y la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno (q_{O2max}) del cultivo se determinaron a través del método dinámico de Humphrey (**Bandyopadhyay, Humphrey, & Taguchi, 1967**).

Se optó por analizar la VTO_{max} y la q_{O2max} por ser parámetros operacionales importantes dentro de cultivos bacterianos aerobios y que han sido utilizados con éxito como criterio de escalamiento en trabajos con otros cultivos aerobios bacterianos (**Díaz-Barrera, Gutierrez, Martínez, & Altamirano, 2014; Wang, y otros, 2010**).

2.2.7.1 Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno (NA)

Durante la fermentación se cortó el suministro de aire por unos minutos, haciendo que el sistema responda modificando la concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido (C_L) y de su variación se pueda calcular el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($K_L a$). En la Figura 4 se observa cómo se da la disminución del oxígeno disuelto al interrumpir la aireación, teniendo en cuenta que el flujo de aire se debe reponer antes que C_L alcance una concentración crítica de oxígeno, valor bajo el cual la velocidad del

metabolismo del microorganismo se hace dependiente de C_L (Acevedo, Gentina, & Illanes, 2002).

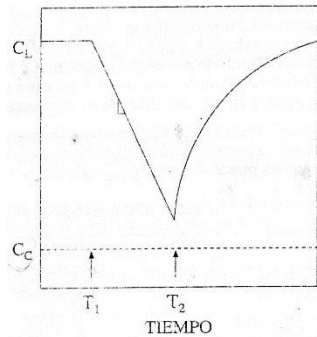


Figura 4. Curva de desgasificación y gasificación usando el Método Dinámico de Humphrey (Acevedo, Gentina, & Illanes, 2002)

Posteriormente se reanudó el suministro de aire a las condiciones establecidas logrando que C_L en el biorreactor aumentara, en este transcurso de tiempo se midió la variación de oxígeno. Conforme aumentaba la concentración de C_L se fue haciendo mediciones con el fin de obtener una pendiente igual a $-1/K_L a$ como se aprecia en la Figura 5, por despeje se obtuvo el valor de $K_L a$. Esto se realizó hasta cuando los parámetros cinéticos (C_L) y los parámetros físicos (respiración) se mantuvieron constantes (Zaragoza R. , 2009). Además, aplicando la ley de Henry se obtuvo el valor de la concentración de equilibrio de oxígeno disuelto (C^*) que ayudó en cálculos que se presenten más adelante.

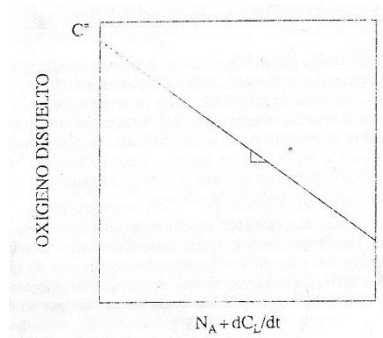


Figura 5. Datos para el cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($K_L a$) usando el Método Dinámico de Humphrey (Acevedo, Gentina, & Illanes, 2002)

2.2.7.2 Determinación de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO)

Con los parámetros medidos en el apartado anterior, se procedió al cálculo de VTO para lo cual se aplicó la ecuación 1, considerando que la VTO para biorreactores de laboratorio recomendada en bibliografía está en un rango de 60-120 mmol O₂/L y el $K_L a$ esta entre 60 – 500 h⁻¹ (Acevedo, Gentina, & Illanes, 2002).

Ecuación 3. Determinación de la VTO

$$VTO = K_L a(C^* - C_L)$$

Donde:

VTO: Velocidad de transferencia de oxígeno (mmol O₂/h)

$K_L a$: Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h⁻¹)

C*: Concentración de equilibrio de oxígeno disuelto (mmol O₂/L)

C_L: Concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido (mmol O₂/L)

Al calcular la VTO para cada tiempo en el que se midió C_L, se obtendrán datos para realizar una gráfica de tiempo vs C_L, en donde se podrá apreciar la VTO_{max} que puede alcanzar el cultivo en el biorreactor.

2.2.7.3 Determinación de la qO₂

Para el cálculo de este parámetro se aplicó la ecuación 3 ya que del primer apartado se conocía N_A, así como también la biomasa que se produjo en el transcurso de la experimentación.

Ecuación 4. Determinación de qO₂

$$q_{O_2} = \frac{N_A}{X}$$

Donde:

q_{O₂} = Velocidad específica de consumo de oxígeno (h⁻¹)

N_A = Velocidad de consumo de oxígeno (mmol O₂/L*h)

$X =$ Biomasa producida (g/L)

Al igual que en la VTO_{max} , el valor de q_{O_2max} fue posible obtener al realizar una gráfica de tiempo vs q_{O_2} , en la que se pudo apreciar la máxima q_{O_2} a la que puede llegar el cultivo en el biorreactor.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

3.1.1 Curva estándar de *Bacillus subtilis* DS23

Los cultivos iniciales de *Bacillus subtilis* DS23 se los hicieron en matraces de 500 ml, a 37°C y 1500 rpm con el fin de obtener la curva estándar de crecimiento de este microorganismo (Figura 6). Misma que fue clave para entender el comportamiento que presenta de *Bacillus subtilis* DS23 y poder establecer las condiciones de experimentación a nivel de biorreactor. Considerando que *Bacillus subtilis* es uno de los microorganismos más estudiados como productores de biotensioactivos (**Ghojavand, y otros, 2008; Joshi, y otros, 2008; Whang, Liu, Ma, & Cheng, 2008; Youssef, y otros, 2007**).

Además, **Gómez & Loyola** (2017) en un trabajo similar indican que la especie *Bacillus subtilis* tiene elevada actividad superficial. Por lo que se puede considerar que *Bacillus subtilis* DS23 tiene excelente actividad superficial y que además tiene la capacidad de limpiar superficies sin la necesidad de subir la temperatura.

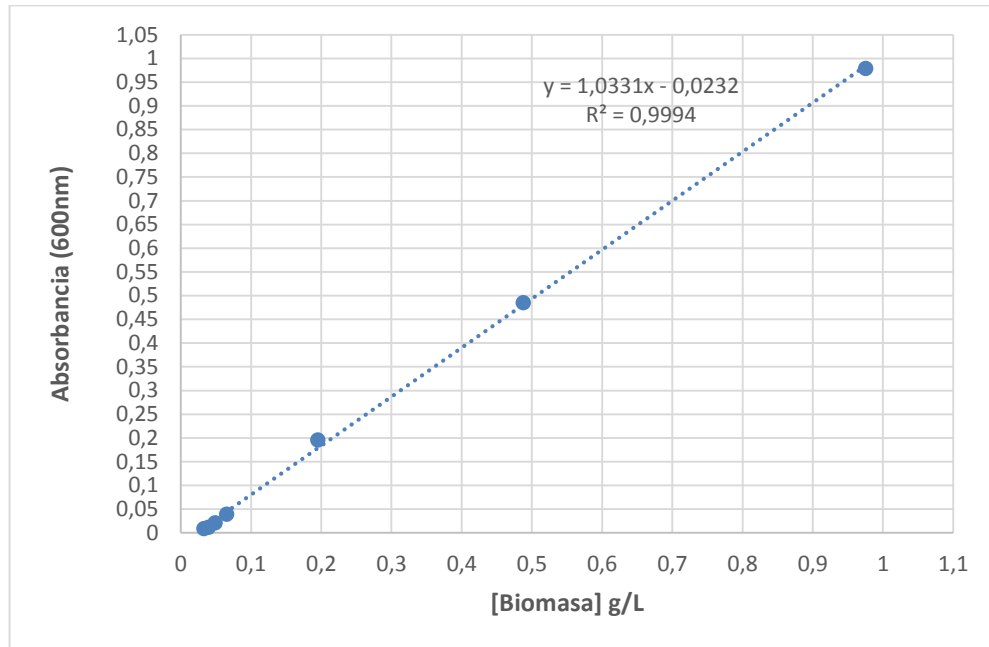


Figura 6. Curva estándar de *Bacillus subtilis* DS23 en matraces de 500 mL

En el marco de estudio del proceso fermentativo de producción por dicha cepa, se evaluó parámetros (velocidad de agitación, VTO_{max} y Q_{O2max}) que de cierta forma inciden sobre la producción de biotensioactivos. Además, **Martínez** (2011) recomienda usar caldo nutritivo para producir buena cantidad de biotensioactivo. Sin embargo, para que la producción de este compuesto sea económicamente factible a nivel industrial se debe considerar el uso de materias primas de bajo costo. Bajo este contexto, se estableció un medio de cultivo de tipo mineral con glucosa y extracto de levadura como fuentes de carbono para llevar a cabo la experimentación, puesto que existe investigaciones que señalan que la naturaleza de los componentes del medio de cultivo juega un papel crucial sobre la producción de biotensioactivos (**Syldatk & Wagner, 1987**). Las condiciones de trabajo en cuanto a velocidad de agitación se refieren, así como las concentraciones de biomasa y biotensioactivo obtenidos se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos para cultivos celulares de *Bacillus subtilis* DS23 bajo diferentes condiciones de agitación en un biorreactor de 5 litros

Velocidad de agitación	Caudal de aire (vvm)	Biomasa máxima (g/L)	Tensioactivo máximo (g/L)
150	5	1.012 ± 0.305	6.446
150	5	1.012 ± 0.314	6.361
200	5	1.030 ± 0.315	7.434
200	5	1.027± 0.313	7.294
300	5	1.038 ± 0.282	9.694
300	5	1.036 ± 0.289	9.689

3.1.2 Crecimiento celular de *Bacillus subtilis* DS23 en el biorreactor

Se realizó dos réplicas independientes para cada velocidad de agitación experimentada, para analizar los resultados obtenidos entre réplicas se sacó el promedio de los valores medidos con su respectiva desviación estándar (Tabla 7,8,9), esto con el fin de conocer que tan similares fueron las réplicas. Como se puede apreciar en la Figura 7 en general las réplicas son bastante similares, a excepción del segundo muestreo de 300 rpm que tiene una desviación estándar de 0.049 que es indicativo que se produjo un error experimental, ya sea en el momento de toma de muestra o en la lectura de la densidad óptica.

Asimismo, las concentraciones (g/L) promedio de biomasa obtenidas durante la fase exponencial (las primeras 8 horas de cultivo) y la fase estacionaria (desde la 8 hora hasta las 24 horas de cultivo) fueron 0.740 ± 0.305 (150 rpm, 5 vvm), 0.745 ± 0.314 (150 rpm, 5 vvm), 0.787 ± 0.315 (200 rpm, 5 vvm), 0.788 ± 0.313 (200 rpm, 5 vvm), 0.887 ± 0.282 (300 rpm, 5 vvm), 0.882 ± 0.289 (300 rpm, 5 vvm). En la figura 7, también se evidencia que el crecimiento de *Bacillus subtilis* DS23 en biorreactor se dio desde el inicio del

cultivo tanto a 150, 200 y 300 rpm, logrando una concentración máxima de biomasa de 1.038 g/L a 300 rpm a las 7 horas de cultivo como se reportó anteriormente en la Tabla 6.

Tabla 7. Crecimiento de *Bacillus subtilis* DS23 a 150 rpm en biorreactor de 5 litros

Tiempo	[Biomasa]1 g/L	[Biomasa]2 g/L	Desviación Estándar	Promedio [Biomasa] g/L
0	0.100	0.100	0.000	0.100
1	0.219	0.193	0.018	0.206
2	0.347	0.315	0.023	0.331
3	0.449	0.447	0.001	0.448
4	0.567	0.562	0.004	0.564
5	0.637	0.658	0.015	0.647
6	0.701	0.734	0.023	0.718
7	0.787	0.802	0.011	0.794
8	0.838	0.869	0.022	0.854
9	0.905	0.926	0.015	0.915
10	0.957	0.984	0.019	0.971
23	1.011	1.012	0.001	1.011
24	1.012	1.012	0.000	1.012
25	1.012	1.012	0.000	1.012
26	1.012	1.012	0.000	1.012
27	1.012	1.012	0.000	1.012
28	1.012	1.012	0.000	1.012

Tabla 8. Crecimiento de *Bacillus subtilis* DS23 a 200 rpm en biorreactor de 5 litros

Tiempo (h)	[Biomasa]1 g/L	[Biomasa]2 g/L	Desviación Estándar	Promedio [Biomasa] g/L
0	0.100	0.100	0.000	0.100
1	0.232	0.241	0.007	0.237
2	0.384	0.386	0.001	0.385
3	0.489	0.493	0.003	0.491
4	0.589	0.599	0.007	0.594
5	0.697	0.689	0.006	0.693

6	0.789	0.797	0.006	0.793
7	0.890	0.899	0.007	0.895
8	0.982	0.986	0.003	0.984
9	1.016	1.015	0.001	1.016
10	1.030	1.027	0.001	1.028
23	1.030	1.027	0.001	1.028
24	1.030	1.027	0.001	1.028
25	1.030	1.027	0.001	1.028
26	1.030	1.027	0.001	1.028
27	1.030	1.027	0.001	1.028
28	1.030	1.027	0.001	1.028

Tabla 9. Crecimiento de *Bacillus subtilis* DS23 a 300 rpm en biorreactor de 5 litros

Tiempo	[Biomasa]1 g/L	[Biomasa]2 g/L	Desviación Estándar	Promedio [Biomasa] g/L
0	0.100	0.100	0.000	0.100
1	0.371	0.302	0.049	0.337
2	0.566	0.564	0.001	0.565
3	0.735	0.749	0.009	0.742
4	0.891	0.885	0.004	0.888
5	1.005	1.003	0.001	1.004
6	1.034	1.032	0.001	1.033
7	1.038	1.032	0.004	1.035
8	1.038	1.036	0.001	1.037
9	1.038	1.036	0.001	1.037
10	1.038	1.036	0.001	1.037
23	1.038	1.036	0.001	1.037
24	1.038	1.036	0.001	1.037
25	1.038	1.036	0.001	1.037
26	1.038	1.036	0.001	1.037
27	1.038	1.036	0.001	1.037
28	1.038	1.036	0.001	1.037

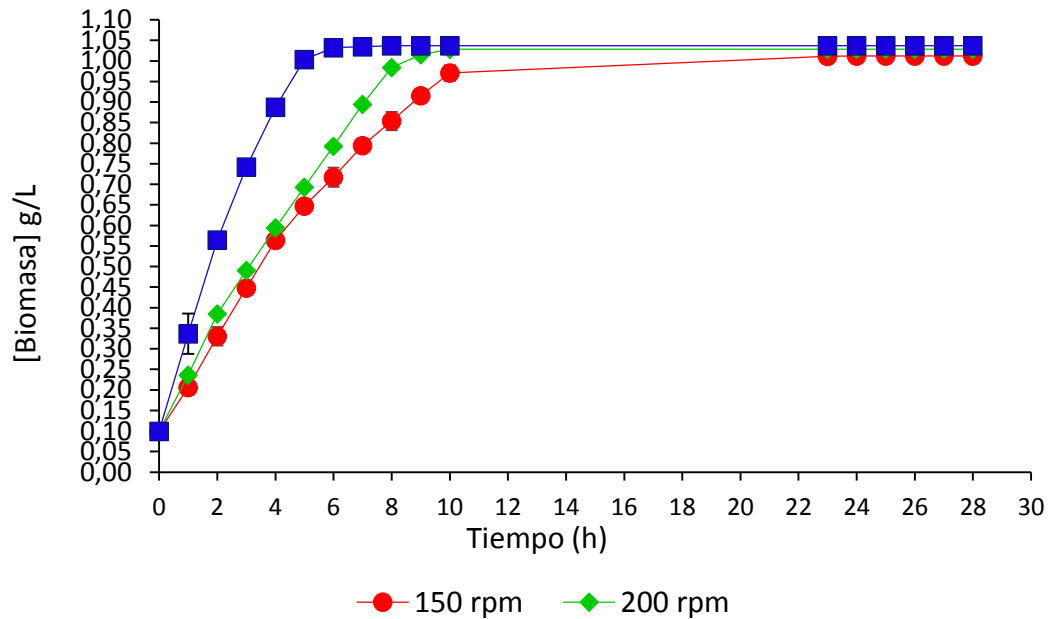


Figura 7. Promedio de biomasa obtenida entre replicas durante el crecimiento de *Bacillus subtilis* DS23 en el biorreactor de 5 litros

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de varianza para la concentración de biomasa (Tabla 10), el Valor-p del factor velocidad de agitación fue superior a 0.05, lo que indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de concentración de biomasa entre un nivel de velocidad de agitación y otro, con un nivel de confianza del 95,0%, estos resultados se pueden corroborar con la Figura 8. Demostrándose que la velocidad de agitación tiene escasa influencia en la producción de biomasa.

Tabla 10. ANOVA para Biomasa (g/L) por Velocidad de Agitación (rpm)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.179693	2	0.0898466	0.98	0.3839
Intra grupos	4.41575	48	0.0919949		
Total (Corr.)	4.59545	50			

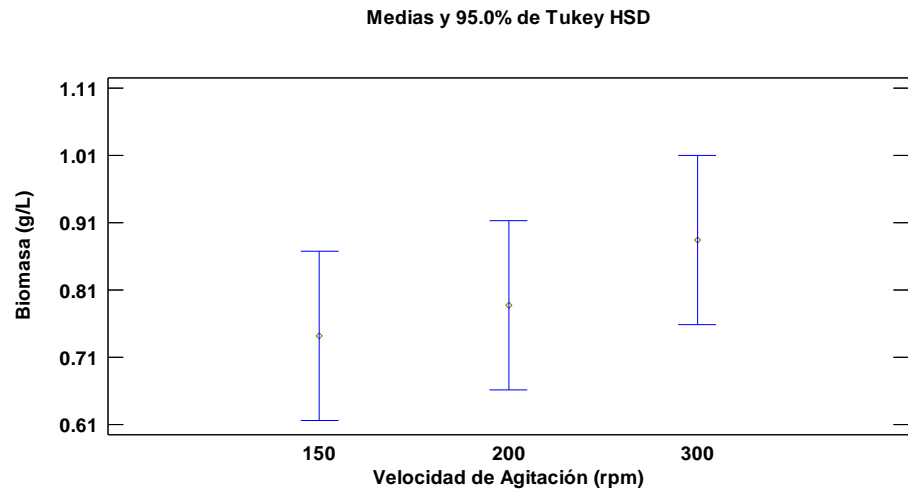


Figura 8. Prueba de Tukey para la biomasa producida por *Bacillus subtilis* DS23

Mediante revisión bibliográfica se determinó que la velocidad de agitación y el caudal de aire suministrado al medio de cultivo tienen un efecto significativo sobre la concentración del biotensioactivo obtenido. En esta investigación los mejores resultados en cuanto a producción de biomasa y producción de biotensioactivo se refiere se obtuvieron a una velocidad de agitación de 300 rpm.

Asimismo, **Peña, Trujillo-Roldán, & Galindo (2000)** reportaron cultivos de *Bacillus subtilis* a diferentes y altas velocidades de agitación, en donde, a 700 rpm, controlando la concentración de oxígeno disuelto de manera estricta se obtuvieron mayores velocidades de crecimiento que en cultivos a 300 rpm, pero con diferencia en el tamaño celular. Siendo más grandes las células crecidas a bajas velocidades de agitación. Además, que transcurridas varias horas de cultivo la viabilidad de *Bacillus subtilis* fue afectada a velocidades de agitación altas (**Sahoo, Rao, Suresh, & Suraishkumar, 2004; Sahoo, Rao, & Suraishkumar, 2006**). Sin embargo, los datos mencionados de dichas investigaciones no concordaron con los de esta investigación ya que se realizó una prueba piloto con *Bacillus subtilis* DS23 a 400 rpm, 30°C donde las bacterias murieron a las 3 horas de cultivo debido al exceso de espuma que se produjo en el biorreactor.

También es importante mencionar que un cultivo en biorreactor brinda la posibilidad de monitorear en línea parámetros como pH, temperatura, velocidad de agitación a la que se encuentra el caldo de cultivo, así como también a las condiciones que se desea trabajar. En esta investigación, el pH y la temperatura se mantuvieron constantes a lo largo de las experimentaciones. Es importante mencionar que debido a las velocidades de agitación y aireación a las que se trabajó se produjo bastante espuma que pudo afectar al proceso, pero para evitar esto es necesario la adición de agentes antiespumantes, **Ochoa (1994) y Lloyd, Lodge, & Wynes (1974)** en un estudio de fermentación sumergida de *Bacillus subtilis* usaron copolímeros de órgano-silicón (una parte de antiespumante por 20,000 partes de medio de cultivo) para la producción de alfa-amilasas, logrando un buen control de

espuma formada, así como también un incremento efectivo en la producción de alfa-amilasas.

De la misma forma, **Lloyd, Lodge, & Wynes** (1974) recomiendan usar una concentración de una parte de espumante de órgano-silicón por 4,000 partes de medio de cultivo. Mencionan también que este tipo de antiespumante no deja residuos oleosos en el medio de cultivo. En esta investigación se utilizó butilglicol en grado alimenticio (10%) por su capacidad de reducir la formación de espuma sin afectar negativamente al crecimiento celular (**Masafumi, Keiko, & Masaharu, 2007**).

Del mismo modo, en la Figura 8 se observa que *Bacillus subtilis DS23* a 300 rpm crece mucho más rápido que a 150 y 200 rpm. Esta aseveración puede ser comprobada con las velocidades de crecimiento que fueron calculadas tomando la fase exponencial de cada una de las curvas de crecimiento, obteniendo una velocidad de crecimiento de 0.196 h^{-1} a las 10 horas de cultivo a 150 rpm, 0.248 h^{-1} a las 8 horas de cultivo a 200 rpm y 0.516 h^{-1} a las 7 horas de cultivo a 300 rpm. Esta diferencia puede deberse a la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO), al mezclado y la aireación del biorreactor.

Existen investigaciones con otras cepas de *Bacillus* en donde se ha evidenciado que la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) es utilizado como criterio de escalado. **Potumarthi, Subhakar, & Jetty** (2007) mencionan que un incremento de la VTO en un biorreactor favorece a la producción de proteasas en cultivos de *Bacillus licheniformis NCIM-2042*. Por otra parte, **Fahim, y otros** (2012) utilizaron una VTO de $21.39 \text{ kg O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ para el escalado de un cultivo de *Bacillus subtilis BBG21* y su producción de lipopéptidos.

3.1.2 Producción de biotensioactivo en el biorreactor

Los resultados obtenidos para la concentración de biotensioactivo en las muestras tomadas cada cuatro horas durante el crecimiento de *Bacillus subtilis* DS23, considerando que durante la noche no se realizó ningún tipo de muestreo se presentan en las Tablas 11,12,13 y para cada una de las velocidades de agitación experimentadas la Figura 9. Se esperaba que la producción se diera únicamente en la fase exponencial del crecimiento celular, sin embargo, se registró que en la fase estacionaria se seguía produciendo el biotensioactivo, pero en menor cantidad.

Tabla 11. Producción de biotensioactivo a 150 rpm en biorreactor de 5 litros

Tiempo (h)	[Tensioactivo]1	[Tensioactivo]2	Desviación Estándar	Promedio
4	3.887	3.739	0.105	3.813
8	6.446	6.361	0.060	6.404
12	5.467	5.316	0.107	5.392
16	5.144	5.061	0.059	5.103

Tabla 12. Producción de biotensioactivo a 200 rpm en biorreactor de 5 litros

Tiempo (h)	[Tensioactivo]1	[Tensioactivo]2	Desviación Estándar	Promedio
4	4.209	4.135	0.052	4.172
8	7.434	7.294	0.099	7.364
12	6.974	6.805	0.120	6.890
16	6.520	6.408	0.079	6.464

Tabla 13. Producción de biotensioactivo a 300 rpm en biorreactor de 5 litros

Tiempo (h)	[Tensioactivo]1	[Tensioactivo]2	Desviación Estándar	Promedio
4	5.910	5.867	0.031	5.888
8	9.694	9.689	0.004	9.691
12	9.005	9.081	0.054	9.043
16	8.543	8.548	0.004	8.546

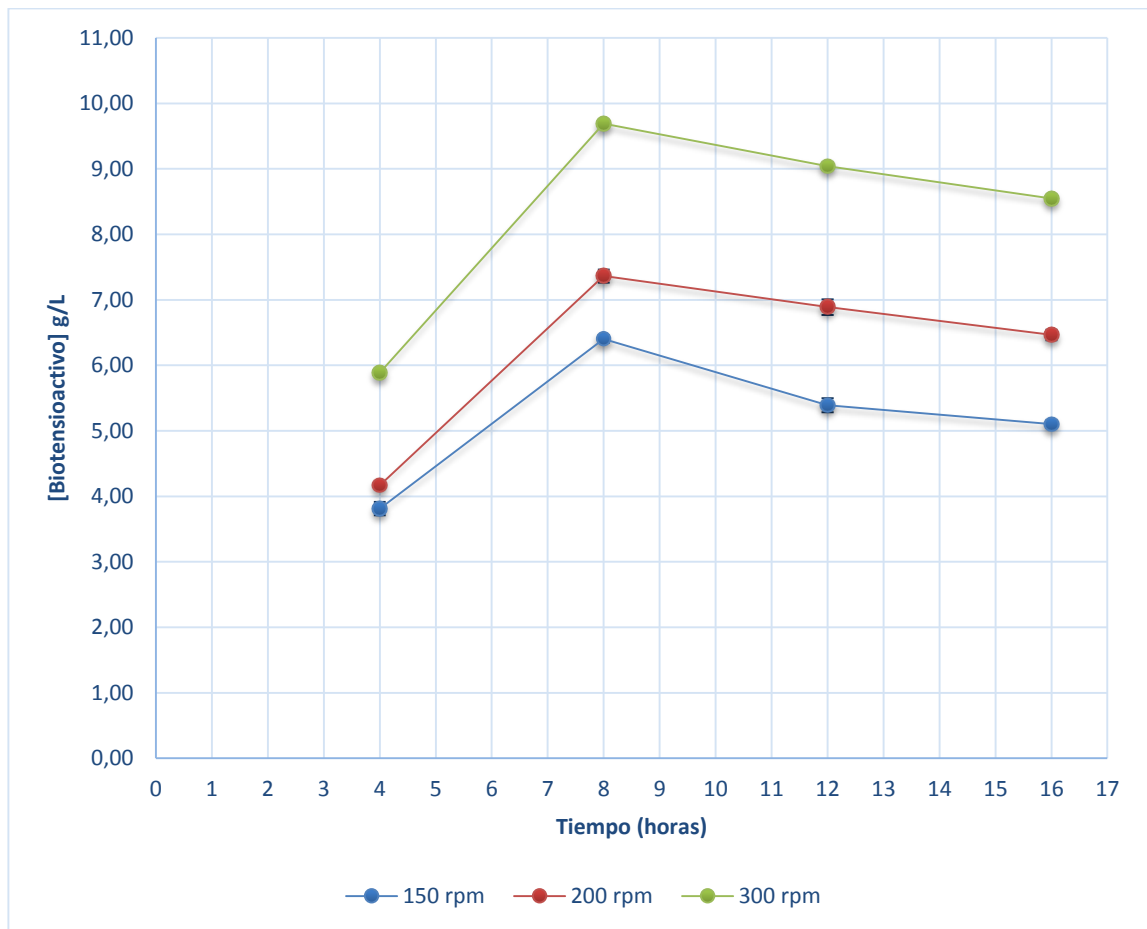


Figura 9. Concentración de biotensioactivo en suspensiones celulares de *Bacillus subtilis* DS23 para diferentes velocidades de agitación en el biorreactor de 5 litros.

De igual manera, de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de varianza para la concentración de Biotensioactivo producido (Tabla 14), el valor-p del factor concentración de Biotensioactivo fue menor a 0,05, lo que indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del biotensioactivo entre un nivel de velocidad de agitación y otro, con un nivel del 95% de confianza. Según **Gutierrez (2012)** una significancia diferente de cero indica que los factores que cumplen con este parámetro influyen significativamente sobre el proceso en análisis.

Tabla 14. ANOVA para Biotensioactivo (g/L) por Velocidad de Agitación (rpm)

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	20.0944	2	10.0472	5.08	0.0333
Intra grupos	17.7941	9	1.97712		
Total (Corr.)	37.8885	11			

En la gráfica de cajas y bigotes (Figura 11) se puede apreciar que existe diferencias significativas en la producción de biotensioactivo presentándose una asimetría negativa lo que es indicativo que la media es menor que la mediana. Esto muy probablemente se debió a que el cultivo a 300 rpm tuvo una velocidad de crecimiento mayor y llegó a la fase estacionaria antes que los cultivos a 200 y 150 rpm.

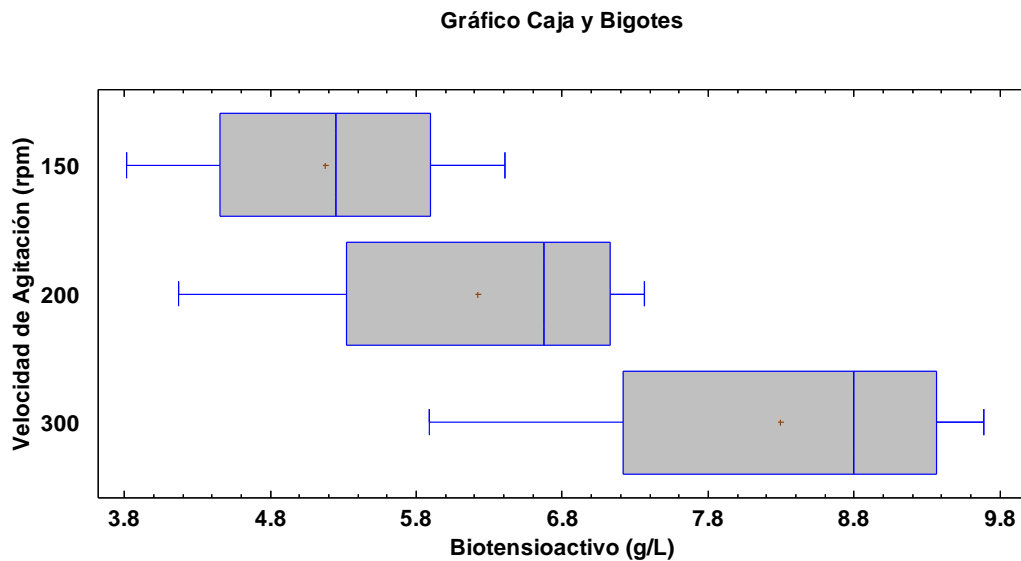


Figura 10. Gráfica de Cajas y Bigotes de la concentración de Biotensioactivo

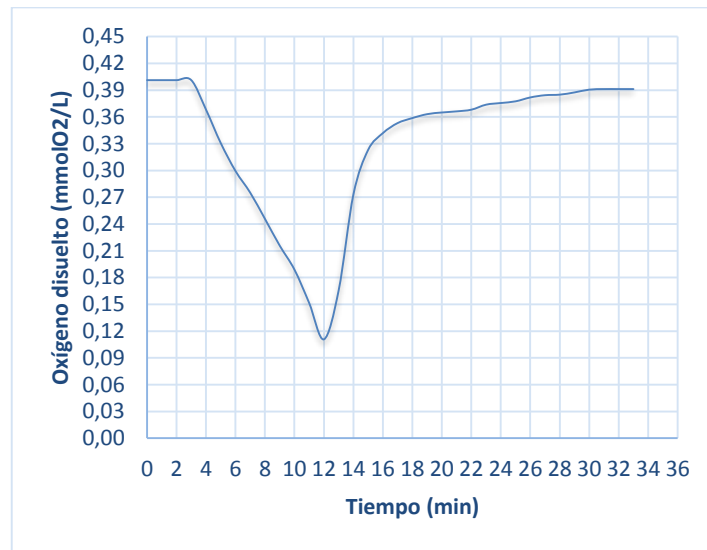
En base a los resultados presentados en la Figura 9 se recomienda que en futuras investigaciones para la producción de biotensioactivo a partir de *Bacillus subtilis* DS23 se detenga el cultivo en el biorreactor cuando se obtenga la máxima cantidad de biotensioactivo que sería a las horas 8 de cultivo, dando la posibilidad que se inicie con un nuevo cultivo.

3.1.1 Determinación de la velocidad máxima de transferencia de oxígeno y la velocidad máxima de consumo de oxígeno en el biorreactor

Aprovechando la característica aerobia de *Bacillus subtilis* DS23 se consideró la evaluación de la VTO_{max} y q_{O2max} como factores determinantes en la producción de biotensioactivos. **Klockner y Buchs** (2012) mencionan que procesos de cultivos aerobios en biorreactores de tanque agitado son muy utilizados y que en estos procesos la velocidad de transferencia de oxígeno se ve afectada por la agitación y suministro de gases. En algunas investigaciones se reportan como la transferencia de oxígeno aumenta el metabolismo y favorece al crecimiento de levaduras (**Anderlei, Zang, Papaspyrou, & Buchs, 2004**) y como en el caso de las bacterias la transferencia de oxígeno influye en el metabolismo y la producción de metabolitos (**Schleputz, Gerhards, & Buchs, 2013**).

Para conocer el valor de oxígeno disuelto en el que se alcanzaría el 100% de saturación al trabajar con una temperatura de 30°C, 1 atm de presión atmosférica se usó una calculadora de oxígeno disuelto online (**Munson, y otros, 2004**), al ingresar la temperatura, esta calculadora arrojó un valor de 7.55 mg/L de oxígeno disuelto valor en el cual se alcanzaría el 100% de saturación. Tras el corte del suministro de aire se dejó que C_L disminuyera su concentración hasta al 80% de saturación de oxígeno disuelto correspondiente a un valor de 6.04 mg/L para evitar que se alcance una concentración crítica de oxígeno provocando que la velocidad de metabolismo se vuelva dependiente de C_L .

En la Figura 10 se puede apreciar que solo fue necesario 12 minutos para que se lleve a cabo la desgasificación sin llegar a alterar las condiciones del cultivo, se llegó hasta un C_L de $0.111 \text{ mmol O}_2/\text{L}$ (23.4%), inmediatamente se suministró nuevamente aire y tras cerca de 20 minutos se logró alcanzar casi las concentraciones de oxígeno disuelto de partida, logrando tener una gráfica característica del método dinámico de Humphrey, en donde los datos de la desgasificación sirvieron para calcular N_A y $K_L a$.



Tras graficar los datos de la desgasificación se obtuvo una ecuación de la recta como se puede apreciar en la Figura 11, en donde la pendiente es igual a N_A , con un valor de $-0.0311 \text{ mmolO}_2/\text{L}$. Por otro lado, se graficó los datos que se obtuvo tras la gasificación (Figura 12) del medio con el fin de usar la ecuación de la recta resultante para calcular K_{LA} . A la ecuación obtenida se la derivó y el resultado de la derivación sirvió para obtener datos de dC_L/dt que graficados con los C_L obtenidos tras la gasificación permitieron obtener una gráfica (Figura 13) cuya ecuación de la recta presenta una pendiente igual a $-1/K_{LA}$, por despeje se obtuvo el valor de K_{LA} igual a 0.002 h^{-1} .

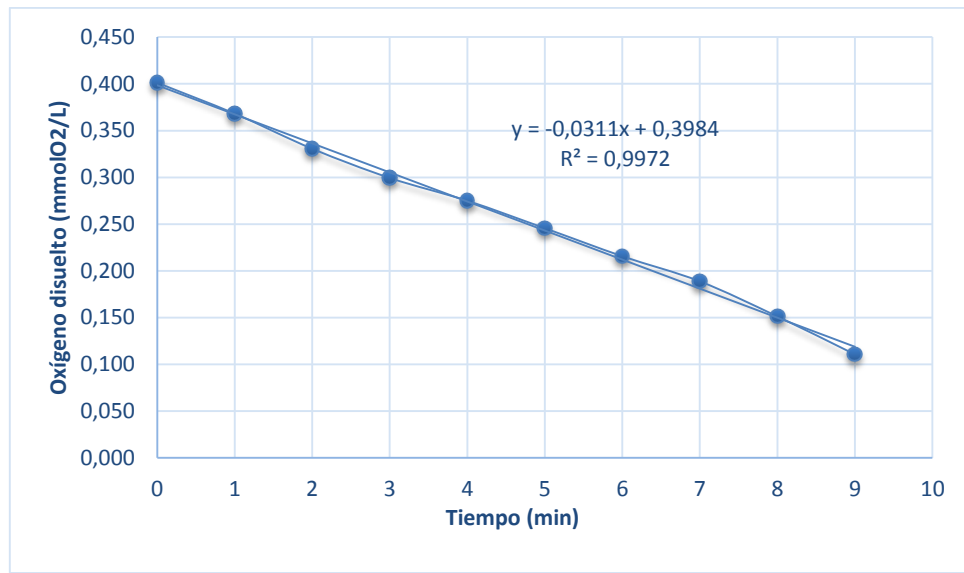


Figura 11. Datos para el cálculo de la velocidad de consumo de oxígeno (NA) tras la desgasificación al medio de cultivo de *Bacillus subtilis* DS23 en un biorreactor de 5 litros

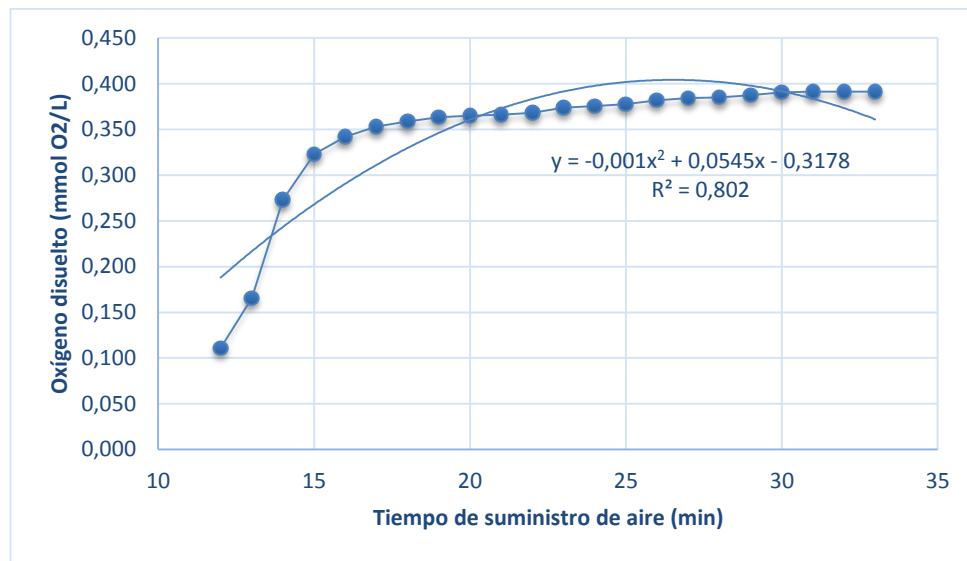


Figura 12. Gasificación del medio de cultivo de *Bacillus subtilis* DS23 en un biorreactor de 5 litros

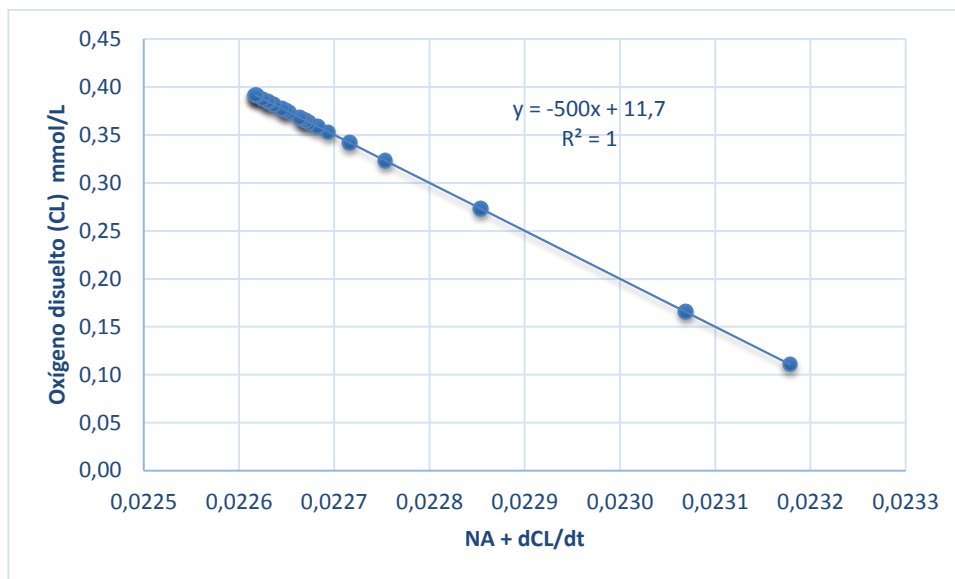


Figura 13. Datos para el cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{LA}) en el cultivo de *Bacillus subtilis* DS23 en un biorreactor de 5 litros

Por la ley de Henry se determinó la concentración saturada de oxígeno durante el equilibrio, con una constante de Henry igual a 8.05×10^{-4} atm mol⁻¹ de O₂ mol⁻¹ de agua (Doran, 1995). Además, considerando que la concentración media de oxígeno en el aire es 0.21%, la concentración saturada de oxígeno en el equilibrio en el medio de cultivo sería igual a 0.0503mmol/L a presión atmosférica.

Una vez que se determinó N_A , K_{LA} y C^* se procedió a calcular las VTO, en la Figura 14 se puede apreciar como este parámetro va aumentando de forma significativa hasta llegar a un valor máximo de 0.076 mmol O₂/L*h siendo este valor la VTO_{max} que puede llegar a alcanzar en la fase estacionaria el cultivo a las condiciones de trabajo establecidas, muy probablemente se alcanzó este valor en la fase estacionaria debido a que las células perdían ya su viabilidad y buscaban una manera de mantenerse vivas, además que la velocidad de transferencia de oxígeno se pudo ver afectada por las condiciones de agitación, aireación así como también las condiciones del caldo de cultivo. (Moreno & Chávez, 2016). Por otro lado, tomando en cuenta los factores que afectan a la velocidad de transferencia de oxígeno, si se hubiese trabajado con las otras velocidades de agitación (150 y 200 rpm) muy probablemente los valores de los parámetros calculados hubiesen sido menores a los

obtenidos a 300 rpm, por lo que se hubiese podido demostrar si la agitación tiene alguna influencia en las variables de estudio.

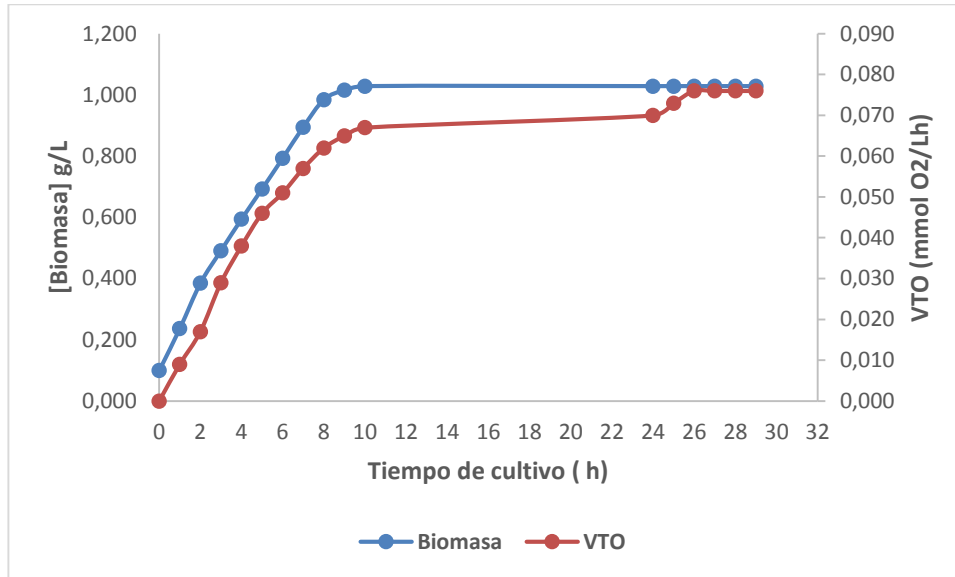


Figura 14. Comportamiento de la VTO durante el cultivo de *Bacillus subtilis* DS23 en un biorreactor de 5 litros

Con respecto a la velocidad específica de consumo de oxígeno en la Figura 15 se aprecia como el consumo de oxígeno cayó drásticamente con el transcurso del tiempo de cultivo, consiguiendo una qO_{2max} igual a 0.312 h^{-1} , los valores obtenidos pudieron deberse a una disminución del metabolismo aerobio celular, lo cual pudo asociarse a la falta de nutrientes en el medio, o quizá a la pérdida de la viabilidad celular a la velocidad de agitación trabajada (Bedoya & Hoyos, 2010). Resultados similares se han obtenido para otros tipos de cultivos (Thanh, Murthy, Yu, .J, & Paek, 2006; Huang, Shen, & Chan, 2002).

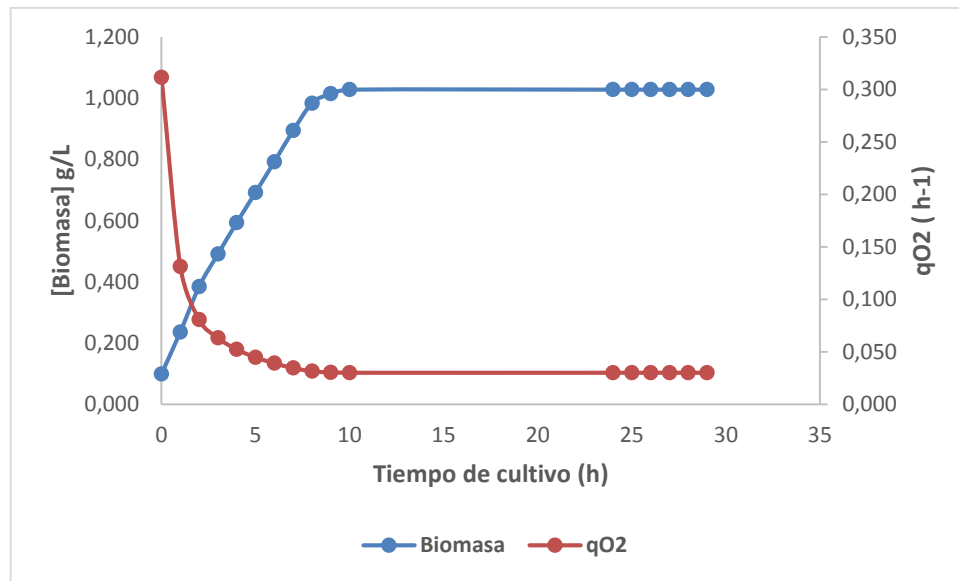


Figura 15. Comportamiento de O₂ durante el cultivo de *Bacillus subtilis* DS23 en un biorreactor de 5 litros

Es importante mencionar que a pesar de que el método dinámico de Humphrey permite realizar una determinación *in situ*, es rápido ya que solo se requiere un electrodo de oxígeno, los resultados de esta investigación pudieron verse afectados por el tiempo de respuesta del electrodo.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Se determinó la velocidad máxima de transferencia de oxígeno (VTO_{max}) y la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno (q_{O2max}) en un cultivo por lote de *Bacillus subtilis* DS23 en un biorreactor lo cual resultó tener gran impacto para el adecuado desarrollo del microorganismo, así como también en la producción del producto de interés.

Se evaluó el efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de biomasa y biotensioactivo en cultivos de *Bacillus subtilis* DS23 a nivel de biorreactor, se observó que mientras aumentaba la velocidad de agitación mayor era la producción de biotensioactivo, en el caso de la biomasa también mejoró en tiempo el crecimiento a pesar de que estaba al límite de verse afectada por la fuerza de cizalla.

Se caracterizó la producción del tensioactivo microbiano a 150, 200, 300 rpm en un cultivo por lote de la bacteria *Bacillus subtilis* DS23 en un biorreactor, obteniendo la mejor producción a 300 rpm con una cantidad de 9.689 g/L.

Se determinó la VTO_{max} y la q_{O2max} de un cultivo por lote de la bacteria *Bacillus subtilis* DS23 en un biorreactor a 300 rpm obteniéndose valores de 0.079 mmol O₂/h y 0.312 h⁻¹ respectivamente, estos valores son bajos y atractivos desde el punto de vista industrial.

4.2 Recomendaciones

- Eliminar el extracto de levadura del medio mineral con el fin de incrementar la producción de biotensioactivo como se menciona en la literatura.
- Evaluar nuevas fuentes de carbono de bajo costo para la producción de biotensioactivos a escala industrial de tal forma que se reduzcan costos de producción para que su utilización sea competitiva comparada con los tensioactivos químicos.
- Purificar y caracterizar el biotensioactivo producido por *Bacillus subtilis* DS23.
- Establecer nuevas condiciones para el proceso de cultivo en biorreactor que permitan optimizar y potenciar la producción de tensioactivo.
- Considerar el uso de agentes antiespumantes que desintegren de mejor manera la espuma producida.

BIBLIOGRAFÍA

- Abatenh, E., Gizaw, B., Z, T., & et al. (2017). Application of microorganisms in bioremediation-review. *Journal of Environmental Microbiology*, 1(1), 2-9.
- Acevedo, F., Gentina, J. C., & Illanes, A. (2002). *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica* (3 ed.). Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Akita, K., & Yoshida, F. (1973). Gas holdup and volumetric mass transfer coefficient in bubble columns. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 12(1), 76-80.
- Al-Ajlani, M. M., Sheikh, M. A., Ahmad, Z., & Hasnain, S. (2007). Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microbial Cell Factories*, 6, 1–8
- Albarracín, F., & Carrascal, A. (2005). Manual de buenas prácticas de manufactura para microempresas lácteas. I.
- Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., & Buchs, J. (2004). Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 17, 187-194.
- ARCSA, A. N. (2015). *Normativa técnica sanitaria sobre prácticas correctivas de higiene*. Obtenido de <https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2016/02/NORMATIVA-TECNICA-SANITARIA.pdf>
- Banat, I. (2000). Biosurfactants, more in demand than ever. *Biofutur*, 198, 44-47.
- Bandyopadhyay, B., Humphrey, A., & Taguchi, H. (1967). Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 9(4), 533-544.
- Bayrock, D., & Ingledew, W. (2005). Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus*-contaminated continuous, and batch fermentations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 83-88.
- Becerra, L., & Horna, M. (2016). Isolation of biosurfactant producing microorganisms and lipases from wastewaters from slaughterhouses and soils contaminated with hydrocarbons. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-29.

- Bedoya, J., & Hoyos, R. (2010). Agitation-aeration relation effects on cell culture of *Azadirachta indica* A. Juss neem on Azadirachtin production in a stirred tank bioreactor. *Universidad Nacional de Colombia*, 63(1), 5298-5301.
- Bisio, A., & Kabel, R. (1985). Scale-up of chemical processes. *John Wiley and Sons*.
- Bogaerts, P., & Vande, W. (2004). Parameter identification for state estimation - application to bioprocess software sensors. *Chemical Engineering Science*, 59, 2465-2476.
- Bonmatin, J., Laprévote, O., & Peypoux, F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb Chem High Throughput Screen*, 6, 541-556.
- Caidedo, A. (2007). *Método dinámico*. Obtenido de <http://biorreactores.tripod.com/C5MDin.htm>
- Cameotra, S., & Makkar, R. (2004). Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinions in Microbiology*, 7(3), 262-266.
- Casas, J., Santos, V., & García-Ochoa, F. (2000). Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2), 282-291.
- Carpentier, B., & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 499-511.
- Chávez, C. (2018). *Limpieza y desinfección* . Obtenido de <http://indiquimica.com.ec/guia-buenas-practicas-de-manufactura-bpm-para-alimentos-mantenimiento-limpieza-y-desinfeccion-parte-5/>
- Chen, H., Wang, L., Su, C., Gong, G., Wang, P., & Yu, A. (2008). Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol*, 47, 180-186.
- Chen, H., Wang, L., Su, C., Gong, G., Wang, P., & Yu, A. (2008). Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol*, 47, 180-186.
- Cooper, D. (1986). Biosurfactants. *Microbiol Sci*, 3, 145-149.

- Deckwer, W., & Schumpe, A. (1993). Improved Tools for bubble column reactor design and scale-up. *Chemical Engineering Process*, 48(5), 889-911.
- Delaunay, S., Lapujade, P., Engasser, J., & Goergen, J. (2002). Flexibility of the metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262, a glutamic acid-producing bacterium, in response to temperature upshocks. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 28, 333-337.
- Díaz, A., & Rosario, U. (2009). Buenas prácticas de manufactura Una guía para pequeños y medianos agroempresarios . *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura - IICA*, 41.
- Díaz, A., & Uría, R. (2012). Buenas Prácticas de Manufactura (Una guía para pequeños y medianos agroempresarios). In *Saudi Med J* (Vol. 33).
- Díaz-Barrera, A., Gutierrez, J., Martínez, F., & Altamirano, C. (2014). Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* grown at two bioreactor scales under oxygen-limited conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering [en línea]*, 1133-1140.
- Doran, P. M. (1995). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Dufour, S., Deleu, M., Nott, K., Wathélet, B., Thonart, P., & Paquot, M. (2005). Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation of their physico-chemical properties. *Biochim Biophys Acta*, 1726, 87-95.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol*, 1, 117-126.
- Fahim, S., Dimitrov, K., Gancel, F., Vauchel, P., Jacques, P., & Nikov, I. (2012). Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21. *Bioresource Technology*, 126, 1-6.
- Flores-Cotera, L., & García-Salas, S. (2005). Gas holdup, foaming and oxygen transfer in a jet loop bioreactor with artificial foaming media and yeast culture. *Journal of Biotechnology*, 116(4), 387-396.
- Fuster, N. (2006). *Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas*. 160.

- Gaiker. (2015). *Desarrollamos nuevos detergentes de origen microbiano, respetuosos con el medio ambiente*. Obtenido de <http://www.gaiker.es/cas/noticias/desarrollamos-nuevos-detergentes-de-origen-microbiano-respetuosos-con-el-medio-ambiente.aspx?id=a2dfc332-0ecd-4a6e-8fee-93028133d6b3&origen=noticias>
- Galaction, A., Cascaval, D., Oniscu, C., & Turnea, M. (2004). Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal*, 20(1), 85-94.
- García-Ochoa, & Gómez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology advances*, 153-176.
- García-Ochoa, F., Gómez, E., Santos, V., & Merchuk, J. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 289-307.
- Garcinuño, R. (2017). Contaminación de los alimentos durante los procesos de origen y almacenamiento. *Aldaba*, 36, 54-61.
- Ghojavand, H., Vahabzadeh, F., Mehranian, M., Radmehr, M., Shahraki, K., Zolfagharian, F., . . . Roayaei, E. (2008). Isolation of thermotolerant, halotolerant, facultative biosurfactant-producing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*(80), 1073-1085.
- Golemanov, K., Tcholakova, S., Denkov, N., & Gurkov, T. (2006). Selection of surfactants for stable paraffin-in-water dispersions, undergoing solid-liquid transition of the dispersed particles. *Langmuir*, 22, 3560-3569.
- Gómez, I., & Loyola, M. (2017). Desarrollo de productos emulsionados utilizando tensoactivos de origen microbiano. *Escuela Superior Politécnica del Litoral*, 16.
- González-Castellanos, R. (2000). Principios básicos de escalado. La Habana , Cuba: Editorial Universitaria.
- Gonzalez-Castellanos, R. (2000). *Principios básicos de escalado*. Matanzas: Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba.
- Guin, J. (2000). Reaction to cocamidopropyl hydroxysultaine, an amphoteric surfactant and conditioner. *Contact Dermatitis*, 42, 284.

- Haldar, J., Kondaiah, P., & Bhattacharya, S. (2005). Synthesis and antibacterial properties of novel hydrolyzable cationic amphiphiles. Incorporation of multiple head groups leads to impressive antibacterial activity. *J Med Chem*, 48, 3823-3831.
- Hoyos, B., & Mejía, M. (2009). Fundamentos de Termodinámica Clásica para Ingeniería. Medellín, Colombia.
- Huang, S., Shen, ..., & Chan, H. (2002). Development of a bioreactor operation strategy for L-Dopa production using *Stizolobium hassjoo* suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(6), 779-791.
- Ivanković, T., & Hrenović, J. (2010). Surfactants in the environment.
- Jardak, K., Drogui, P., & Daghrir, R. (2016). Surfactans in aquatic and terrestrial environment occurrence behavior and treatment processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3195-3216.
- Jiménez, D., Medina, A., & Gracida, J. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensioactivos: una revisión. *Revista Internacional de contaminación ambiental*, 16(1), 4-8.
- Jimenez, D., Medina, S., Gracida, & Jorge. (2009). Propiedades, aplicaciones y produccion de biotensioactivos. *Universidad Politecnica de Pachuca*, 71-78.
- Jones-Costa, M., Franco-Belussi, L., Vidal, F., Gongora, N., Castanho, L., Dos Santos Carvalho, C., . . . Salla, R. (2018). Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS). *Ecotoxicology and Environmental Safety [en línea]*, 151(January), 184-190.
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., & Desai, A. (2008). Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresour Technol*, 99, 195-199.
- Khan, N., Maymon, M., & Hirsch, A. (2017). Antifungal Activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and Analysis of the Mechanisms Used in Biocontrol. *Microorganisms*, 5(75), 6.

- Kitamoto, D., Isoda, H., & Nakahara, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J. Biosci. Bioeng*, *94*, 187-201.
- Klockner, W., & Buchs, J. (2012). Advances in shaking technologies. *Trends in Biotechnology*, *30*, 307-314.
- Kolodziejska, J. (2005). Possibilities of application of non-ionic surfactants belonging to Rofam, Rokopol and Rokanol class in the prescription of dental anti-inflammatory gels. *Polim Med*, *35*, 49-66.
- Lang, S., & Wagner, F. (1987). Structure and properties of biosurfactants in Biotechnology and the Surfactant Industry. (N. Kosaric, W. Cains, & N. Gray, Edits.) *Marcel Dekker Inc*, 21-47.
- Leib, T., Pereira, C., & Villadsen, J. (2001). Bioreactors: a chemical engineering perspective. *Chemical Engineering Science*, *56*, 5485-5497.
- Lloyd, N., Lodge, R., & Wynes, R. (1974). Assigned to standard brands, Inc. En S. J. Gutcho, microbial enzyme production. *Noyes Data Corporation*, *2*.
- Major Science. (2015). *Sistema de fermentación Evo de Winpact, FS-07 series*. Obtenido de <https://www.majorsci.com>
- Martínez, X. (2011). Producción de biosurfactantes por microorganismos aislados de sitios extremos contaminados con hidrocarburos. *Instituto Politécnico Nacional Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología*, *67*.
- Masafumi, S., Keiko, H., & Masaharu, H. (2007). Agente antiespumante para fermentación y procedimiento de producción por fermentación usando el mismo. *Oficina Española de Patentes y Marcas*, *2*.
- Masip, I. (2016). *Tensioactivos biocompatibles derivados de aminoácidos*. Obtenido de <http://www.dicat.csic.es/rdcsic/index.php/tecnologias-quimicas-2/129-ofertas-tecnologicas-quimica/380-tensioactivos-biocompatibles-derivados-de-aminoacidos>
- Medina, S., & Rodríguez, J. (2010). Biosurfactant properties, applications and production: a review. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, *26*(1), 65–84.

- Mireles, J., Toguchi, A., & Harshey, R. (2001). Salmonella enterica serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol*, *183*, 5848-5854.
- Mnif, I., Sahnoun, R., Banat, I., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2014). Evaluation of *B. subtilis* SPB1 biosurfactants potency for diesel-contaminated soil washing: optimization of oil desorption using Taguchi design. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(2), 851-861
- Morales, L. (2007). Estudio del proceso de transferencia de calor convectivo en nanofluidos. *Fundación Universidad del Norte*, 14.
- Moraveji, M., Mohsenzadeh, E., Fakhari, M., & Davarnejad, R. (2012). Effects of surface active agents on hydrodynamics and mass transfer characteristics in a split-cylinder airlift bioreactor with packed bed. *Chemical Engineering Research and Design*, *90*(7), 899-905.
- Moreno, R., & Chávez, F. (2016). *Transferencia de oxígeno en biorreactores agitados y neumáticos*.
- Muaaz, A.-A., Muhammad, A. S., Zeeshan, A., & Shahida, H. (2007). Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microbial Cell Factories*, *6*(17), 141-172.
- Munson, B., Axler, R., Hagley, C., Host, G., Merrick, G., & Richards, C. (2004). *Water on the web*. Obtenido de <http://www.waterontheweb.org/>
- Neu, T. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol*, *60*, 151-166.
- Nienow, A. (2001). Scale-up, scale-down of stirred bioreactors. Birmingham: Centre for bioprocess engineering, the University of Birmingham, U. K.
- Nikakhtari, H., & Hill, G. (2005). Hydrodynamic and oxygen mass transfer in an external loop airlift bioreactor with a packed bed. *Biochemical Engineering Journal*, *27*(2), 138-145.
- Nuñez, R., Villaverde, M., Ortiz, E., Almazán, V., Castro, J., & Díaz, Y. (2014). Taxonomic and nutritional studies of surfactant-producing maine bacteria.

- Ochoa, M. (1994). Producción de alfa-amilasa por una cepa nativa de *Bacillus* y su aplicación al tratamiento del almidón residual en granos de malta agotados. *Universidad Autónoma de Nuevo León*, 40-43.
- Okino, S., Suda, M., Keitaro, F., Inui, M., & Yukawa, H. (2008). Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 78, 449-454.
- Ongena, M., Henry, G., & Thonart, P. (2009). The roles of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Recent Developments in Management of Plant Diseases, Plant Pathology in the 21st Century Springer Verlag*, 59-69.
- Ospina, J. (2012). Diseño, síntesis y caracterización fisicoquímica de surfactantes derivados de γ -aminoácidos preparados a partir de (-) - verbenona. *Universidad Autónoma de Barcelona*, 1.
- Palmer, M., & Hatley, H. (2018). The role of surfactants in wastewater treatment: Impact, removal and future techniques: A critical review. *Water Research*, 147, 60-72.
- Paulo, A. M. S., Aydin, R., Dimitrov, M. R., Vreeling, H., Cavaleiro, A. J., García-Encina, P. A., ... Plugge, C. M. (2017). Sodium lauryl ether sulfate (SLES) degradation by nitrate-reducing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(12), 5163–5173
- Peña, C., Trujillo-Roldán, M., & Galindo, E. (2000). Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol*, 27, 390-398.
- Pérez, L., Garcia, M., Ribosa, I., Vinardell, M., Manresa, M., & Infante, M. (2002). Biological properties of arginine-based gemini cationic surfactants. *Environ Toxicol Chem*, 21, 1279-1285.
- Peypoux, F., Bonmatin, J., & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51, 553-563.
- Piasecki, A. (2002). Biodegradable and chemically degradable anionic surfactants. En A. Hubbard, & M. Dekker (Edits.), *Encyclopedia of surface and colloid science* (págs. 701-723). New York.
- Potumarthi, R., Subhakar, C., & Jetty, A. (2007). Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis*

- NCIM-2042: effect of aeration and agitation regimes. *Biochemical Engineering Journal*, 34, 185-192.
- Powderliquiddeterg. (2016). *Detergente liquido y en polvo*. Obtenido de <https://powerliquiddeterg.wixsite.com/entstehung/mercado-1>
- Rebello, S., Asok, A., Mundayoor, S., & Jisha, M. (2014). Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. *Environmental Chemistry Letters*, 12, 275-287.
- Reynolds, E. (1993). Martindale. *The extra pharmacopoeia*, 1215-1216.
- Rissoli, R., Abdala, F., Costa, M., Rantin, F., Mckenzie, D., & Kalinin, A. (2016). Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original ® and Roundup Transorb ® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. *Chemosphere [en línea]*, 156, 37-44.
- Rodriguez, L., Banat, I., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Antimicrob. Chemother.*, 57, 609-618.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R., Dufour, S., Veening, J., Arrebola, E., . . . Kuipers, O. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* towards *Podosphaera fusca*. *Mol Plant Microbe Interact*, 20, 430-440.
- Ron, E., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol*, 3, 229-236.
- Rosen, M. (1993). A new generation of surfactants. *Chemtech*, 23, 30-33.
- Ruiz, A. (2009). *Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante*. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/17185314.pdf>
- Rushton, H., Gummer, C., & Flasch, H. (1994). 2-in-1 shampoo technology: state-of-the-art shampoo and conditioner in one. *Sin Pharmacol*, 7, 78-83.
- Sahoo, S., Rao, K., & Suraishkumar, G. (2006). Reactive oxygen species induced by shear stress mediate cell death in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng*, 94(1), 118-127.
- Sahoo, S., Rao, K., Suresh, A., & Suraishkumar, G. (2004). Intracellular reactive oxygen species mediate suppression of sporulation in *Bacillus subtilis* under shear stress. *Biotechnol Bioeng*, 87(1), 81-89.

- Sánchez, L. (2006). Influencia de la contracción en las propiedades biológicas de tensioactivos aniónicos derivados de la N, N - dioctanoil lisina: citotoxicidad y ecotoxicidad in vitro. *Universidad de Barcelona*, 4.
- Sánchez, O., Dustet, J., Coca, J., Iliná, A., & Martínez, J. (2009). *Efecto de la velocidad de agitación y aireación sobre la producción de penicilina acilasa de Mucor griseocyanus en fermentación sumergida*.
- Santos, V., Galdeano, C., Gomez, E., Alcon, A., & Garcia-Ochoa, F. (2006). Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: Modelling and difference in results. *Biochemical engineering Journal*, 32, 198-204.
- Schleputz, T., Gerhards, J., & Buchs, J. (2013). Ensuring constant oxygen supply during inoculation is essential to obtain reproducible results with obligatory aerobic acetic acid bacteria in vinegar production. *Process Biochemistry*, 48, 398-405.
- Sobrino-Figueroa, A. (2018). Toxic effect of commercial detergents on organisms from different trophic levels. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(14), 13283-13291.
- Spök, A., Arvanitakis, G., & McClung, G. (2018). Status of microbial based cleaning products in statutory regulations and ecolabelling in Europe, the USA, and Canada. *Food and Chemical Toxicology*, 116(Parte A), 10-19. doi:10.1016/j.fct.2017.12.057
- Sydatk, C., & Wagner, F. (1987). Production of biosurfactants in Biosurfactants and Biotechnology. (N. Kosaric, W. Cairns, & G. N.C, Edits.) *Marcel Dekker Inc*, 89-120.
- Thanh, N., Murthy, K., Yu, C., J, H., & Paek, K. (2006). Effect of oxygen supply on cell growth and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*. *Journal of plant physiology*, 1337-1341.
- Thomas, R., Gough, R., & Freeman, C. (2017). Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) removal in constructed wetlands: The role of plants in the treatment of a typical pharmaceutical and personal care product. *Ecological Engineering*, 106, 415–422.

- Torrecilla, O. (2011). *Importancia de la limpieza química en la industria láctea*. Obtenido de <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/limpieza-en-la-industria-lactea-t29004.htm>
- Torres, A., & J, Q. (2008). Determination of the specific oxygen uptake. Medellín, Colombia. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfiua/n43/n43a03.pdf>
- Van Hamme, J., Singh, A., & Ward, O. (2006). Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol*, 24, 604-620.
- Vandekerckhove, A., Moerman, W., & Van Huller, S. (2008). Full-scale modelling of a food industry wastewater treatment plant in view of process upgrade. *Chemical Engineering Journal*, 348, 185-194.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., & Jung, G. (1986). Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *Antibiot*, 39, 888-901.
- Vyas, S., RP, S., Jain, S., Minshra, V., Mahor, S., Singh, P., . . . Dubey, P. (2005). Non-ionic surfactant based vesicies (niosomes) fo non-invaseve topical genetic immunization against hepatitis B. *Int J Pharm*, 296, 80-86.
- Wang, Z.-J., Wang, H.-Y., Li, Y.-L., Chu, J., Huang, M.-Z., Zhuang, Y.-P., & Zhang, S.-L. (2010). Improved vitamin B12 production by step-wise reduction of oxygen uptake rate under dissolved oxygen limiting level during fermentation process. *Bioresource Technology*, 101(8), 2845-2852. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.048
- Whang, L., Liu, P., Ma, C., & Cheng, S. (2008). Application of surfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazardous Mater*, 151, 155-163.
- Yanai, R., Yamada, N., Ueda, K., Tajiri, M., Matsumoto, T., Kido, K., . . . Nishida, T. (2006). Evaluation of providone-iodine as a disinfectant solution for contact lenses: antimicrobial activity and cytotoxicity for corneal epithelial cells. *Cont Lens Anterior Eye*, 85-91.
- Yáñez Mendizábal, V. (2012). Potencial de la cepa CPA-8 de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta. *Universidad de Lleida*, 16-20.

- Yáñez, V. (2012). Potencial de la cepa CPA-8 de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta. *Universidad de Lleida*, 42.
- Yazdian, F., Shojaosadati, S., Nosrati, M., Pesaran Hajiabbas, M., & Vasheghani-Farahani, E. (2009). Investigation of gas properties, design, and operational parameters on hydrodynamic characteristics, mass transfer, and biomass production from natural gas in an external airlift loop bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 64(10), 2455-2465.
- Youssef, H., Simpson, D., Duncan, K., McInemey, M., Folmsbee, M., Fincher, T., & Knapp, R. (2007). In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. *Appl Environ Microbiol*, 73(4), 1239-1247.
- Zaragoza, A. (2012). Propiedades bioquímicas de tensioactivos biológicos de origen bacteriano. *Dialnet*, 18-20.
- Zaragoza, R. (2009). Modelo para la estimación de la tasa de respiración en un SBR. *Universidad Nacional Autónoma de México*, 12-13.
- Zografi, G., Schott, H., & Swarbrick, J. (1990). Interfacial phenomena. (A. Gennaro, Ed.) *Remington's pharmaceutical sciences*, 257-272.

ANEXOS

Anexo 1. Características del biorreactor

Unidad de control	Panel de control	Interfaz táctil a color de 10.4" (Resolución: 800 x 600 píxeles)
	Puerto de comunicación	Control remoto a través de conexión Ethernet Exportación de datos a través de puerto USB
	Dimensión	Anchura x profundidad = 15.75" x 23.62" (400mm x 600mm); Altura: 29.14" (740mm)
	Weight	Approx. 88.18lb (40kg)
	Voltaje nominal	110V~/220V~; 50/60 Hz, 10 ^a
Aireación	Rociador	Orificio
	Deflectores	Deflectores extraíbles de acero inoxidable de 316L
Temperatura	Calefacción	Sistema de termostato: intercambiador de calor integrado (calefactor de 550W, bomba de circulación de agua)
		Sistema de calefacción seca (manta calentadora o unidad de base calentadora)
	Enfriamiento	Válvula de serpentín de enfriamiento
	Sonda	Sondas RTD PT100 de platino, no autoclavable
Agitación	Rango de velocidad	Para líneas de células extremadamente sensibles a la fuerza de cizallamiento: 30-300 rpm Para fermentación y el cultivo de células: 30 - 1800 rpm
	Resolución	1rpm
	Modo de control	Control manual o programable de 15 pasos PID

pH	Rango	2 - 12pH
	Resolución	0.01pH
	Sonda	Electrodo relleno de Gel, autoclavable
	Modo de control	Control manual/ /programable de 15 pasos PID
OD	Rango	0 - 100%
	Resolución	0.10%
	Sonda	Sensor polarográfico de OD; autoclavable
Espuma / nivel	Sonda	Protector de acero inoxidable de 316L con tubo de teflón, autoclavable, control de sensibilidad ajustable
Bomba peristáltica	Número de bombas	4 bombas incorporadas
	Tipo de motor	Motor paso a paso preciso, con velocidad mínima de 1 rpm
	Rango de velocidad	0 a 65 rpm
	Resolución	1 rpm
	Modo de control	Control de alimentación de 15 pasos manual o programable; la bomba puede ser asignada para ácido, base, antiespumante, y/o sustrato; la bomba puede calcular el caudal y el volumen total

Fuente: (Major Science, 2015)

Anexo 2. Características del sistema

Controlador	Controlador de sistema de calefacción doble
	Rotámetro incorporado
	4X cabezales de bombas incorporadas
Recipiente	Recipiente incluye cuerpo de vidrio, placa de cabeza, barra de manejo T, 2 adaptadores para las sondas
	Deflector y condensador ensamblados

	Volumen de trabajo: 7 L - Volumen total: 9.3 L
--	--

Fuente: (Major Science, 2015)

Anexo 3. Requisitos de uso

Fuente de energía	100-120V / 210-230V, 50-60Hz con interruptor de seguridad de corte de electricidad
Fuente de agua	10 psig (0.69 barg), 14.5 psig (1 barg) máximo; (El agua suministrada al fermentador debe ser suavizada y al menos 15 ° C por debajo de la temperatura de funcionamiento)
Fuente de aire	10 psig (0.69 barg), 29.0 psig (2 barg) máximo; el aire debe ser seco, libre de aceite y filtrado.
Esterilización	Autoclave; el tamaño de la cámara interior del autoclave debe ser capaz de acomodar el recipiente con el condensador adjunto.

Fuente: (Major Science, 2015)

Anexo 4. Crecimiento de *Bacillus subtilis* DS23 en el biorreactor



Anexo 5. Medio mineral para preparar el inóculo de *Bacillus subtilis* DS23



Anexo 6. Recuperación del biotensioactivo producido por *Bacillus subtilis* DS23 por Liofilización



Anexo 7. Biotensioactivo seco producido por *Bacillus subtilis* DS23

