

Escalado e implementación de un biorreactor para la producción de *Salmonella enteritidis*

Yoel Alfonso-Acosta¹, Guido Riera-González^{1*} y Plino Vargas-Zambrano²

1. Universidad Tecnológica de La Habana. Cujae. Calle 114 No. 11901 e/ Ciclovía y Rotonda, Marianao, La Habana, Cuba.

*guido@quimica.cujae.edu.cu

2. Dpto. de Procesos Agroindustriales, Universidad Técnica de Manabí. Av. Urbina y Che Guevara, Portoviejo, Manabí, Ecuador.

RESUMEN

En este estudio se realizó el escalado y la implementación de un biorreactor discontinuo para la producción de *Salmonella enteritidis*. El diseño se apoyó en un modelo cinético para la obtención de la biomasa y el consumo de sustrato. Este modelo fue ajustado con datos experimentales desde un biorreactor de 50 L. El diseño mecánico se basó en el principio de similitud geométrica entre el modelo y el prototipo. Se empleó el criterio de escalado potencia consumida por unidad de volumen, criterio que marca el régimen de cambio. La potencia consumida por el agitador fue de 70.41 W para el biorreactor de 150 L. Se realizó en ambas escalas una estimación del coeficiente de transferencia de oxígeno y se obtuvieron 2.59 h⁻¹ y 3.18 h⁻¹. En la validación del diseño propuesto del fermentador de 150 L no hubo diferencias estadísticamente significativas en los parámetros estudiados. Resulto que en los biorreactores la concentración de células viables fue de 8 x 10⁹ y 4,5 x 10⁹.

Palabras clave: escalado, biorreactor, *Salmonella enteritidis*.

ABSTRACT

In this study, the scale up and implementation of a discontinuous bioreactor for the production of *Salmonella enteritidis* was developed. The design was based on a kinetic model to obtain biomass and substrate consumption. This model was fitted using experimental data from a 50 L bioreactor. The mechanical design was based on the principle of geometric similarity between the model and the prototype. Scale power consumed per unit volume was used as criteria that marks the exchange rate. The power consumed by the agitator was 70.41 W for the bioreactor of 150 L. An estimate of the oxygen transfer coefficient was obtained in both scales, obtaining 2.59 h⁻¹ and 3.18 h⁻¹. In the validation of the proposed design of the 150 L fermenter, no statistically significant differences were found in the parameters studied. In the bioreactors was obtained as result that the viable cell concentration was 8 x 10⁹ and 4.5 x 10⁹.

Key words: fermentation, bioreactor, *Salmonella enteritidis*.

INTRODUCCIÓN

Salmonella enteritidis, es una bacteria aislada, inicialmente en roedores, se define como fagotipo 6^a (PT6^a), lisina negativa, sensible a muchos antimicrobianos y que presenta tres plasmidios de 59, 4 y 3 Mda. El perfil plasmidial de esta cepa fue caracterizado en el "Public Health Laboratory Service" en Colindale, Inglaterra, por el Dr. E. J. Threlfall, que determinó que el plasmidio de mayor peso molecular (59 Mda) contenía los genes de virulencia de (spv), según refiere Alfonso (1).

La bacteria *Salmonella enteritidis*, fagotipo 6^a, es el principio activo del Biorat. Está incluida en un cebo a base de arroz sin descascarar. Es monopatógena para roedores múridos y algunos integrantes de la familia *Cricetidae*, y ha sido probada su inocuidad para la especie humana y otros animales (2).

Con el objetivo de aumentar la productividad de la Planta de Biorat se decide realizar el diseño de un biorreactor con una capacidad de fermentación de 150 L. para evitar adquirir el inóculo de *Salmonella enteritidis* de la Empresa Productora de Vacunas Virales y Bacterianas, que representa ahorro en la adquisición, transportación y almacenaje adecuado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para la fermentación consta de 2 productos nutrientes que permiten el crecimiento de la *Salmonella enteritidis* var. danysz, lisina negativa, fagotipo 6a, estos componentes son: la salsa de pescado, obtenida por un proceso de fermentación de pequeños peces, que posee un contenido de proteínas por encima del 35 g/L y soya en polvo, con una cantidad de proteínas entre el 45 – 55 %.

Los componentes se agregan en proporción con el volumen de fermentación que se desee realizar, a razón de 10 g de soya en polvo por litro de la cantidad total a fermentar (1.0 %), y 25 mL de salsa de pescado por litro de la cantidad total a fermentar (2.5 % v/v).

Al terminar, se adiciona NaOH o HCL, si fuese necesario, para regular el pH hasta 7. Se enrasa con agua suave hasta el 75 % del fermentador. Una vez realizada esta operación se cierra.

Se parte de un tubo que contiene 10 ml de medio Merezkhonski, en el cual se encuentra conservada la cepa de *Salmonella enteritidis*. Con una aguja larga se toma el contenido y se siembra en un Erlenmeyers de 250 mL, que contiene 100 mL de medio caldo nutriente, se añaden 5 mL del contenido de cepa en el Erlenmeyers. A este cultivo se le realiza tinción de Gram, control de esterilidad en medio tioglicolato y caldo soya triptona para el control del microorganismo. Luego el Erlenmeyers se incuba a 37 °C, durante 20 horas.

Siembra en el fermentador de 50 L

Pasado el periodo de incubación se realiza una observación microscópica para corroborar preliminarmente que no exista contaminación. Una vez obtenido el microorganismo típico de la cepa se procede a sembrar el fermentador de 50 L, que contiene caldo nutriente estéril. El cultivo se mantiene en condiciones de operación de 300 r.p.m. a 37 °C.

Determinación de la cinética de crecimiento de la *Salmonella*

En el diseño del reactor biológico es necesario conocer la cinética de crecimiento del microorganismo, el consumo de sustrato, el rendimiento de biomasa y la velocidad específica de crecimiento.

Para la obtención de los parámetros cinéticos del cultivo de *Salmonella enteritidis*, se utiliza una cepa liofilizada y certificada del cepario de la Empresa de Vacunas Virales y Bacteriana, perteneciente al Grupo Empresarial Labiofam. Con el objetivo de reproducir el microorganismo fue inoculado el fermentador de 50 L, con dicha cepa a 37 °C, por 24 horas. Luego se siembra en agar verde brillante, un medio diferencial, donde las colonias que presentaron las características morfológicas típicas de *Salmonella enteritidis* fueron replicadas en el mismo medio hasta obtener un cultivo puro (3, 4).

Para la realización de la cinética se toman, asépticamente, muestras de 10 mL, desde el comienzo a la 0 hora, hasta las 5 horas, con una frecuencia de 0.15 hora. Las muestras se centrifugaron a 5000 r.p.m., por 10 minutos, para separar la biomasa del sobrenadante, según metodología planteada por Villarreal *et al.* (5).

La concentración de biomasa se establece por peso seco (6, 7). En el sobrenadante se determina la concentración de proteínas totales mediante la técnica espectrofotométrica de Lowry (8, 9). En el cálculo del rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) y el consumo de sustrato (C_s) se emplean las ecuaciones 1 y 2.

$$Y_{x/s} = -\frac{X_o - X}{S_o - S} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$C_s = \frac{(S_o - S)}{S_o} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

El crecimiento microbiano fue estudiado y modelado según la ecuación de cinética de crecimiento celular para un sistema discontinuo, y en la etapa exponencial se obtiene la velocidad específica de crecimiento (10).

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X}{X_o}\right)}{t_f + t_o} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

X = Concentración final de biomasa (g/L)

X_o = Concentración inicial de biomasa (g/L)

S = Concentración final de proteínas totales (g/L)

S_o = Concentración inicial de proteínas totales (g/L)

μ = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

t_f = Tiempo final (h)

t_o = Tiempo inicial (h)

El inóculo de *Salmonella enteritidis* tiene que tener una titulación de 2×10^9 UFC/mL, según PNO-08-01-002-2010 (11), para esto se realiza la concentración de microorganismos mediante una cámara Neubauer de un área de 0.0025 mm^2 y una profundidad de 0.1 mm (4), junto con un microscopio Olympus.

Ensayo microbiológico para el conteo de *Salmonella enteritidis* viable

Se toma 10 mL de la muestra y se vierte en 90 mL de solución reguladora de fosfato, pH 7.2, realizando una dilución 1:10. Posteriormente, se realizan diluciones decimales desde 10^7 hasta 10^{11} , con 9 mL de caldo soya triptona, se realizan tres replicas con 1 mL de las diluciones 10^6 a 10^{11} , en cada una de las placas de Petri. En estas se depositan de 15 a 20 mL de medio agar verde brillante estéril fundido y enfriado a temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Se rotan suavemente las placas para homogeneizar y se deja solidificar el medio, a temperatura ambiente. Se invierten las placas y se incuban a una temperatura de 35 a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, de 24 a 48 horas.

Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kLa)

La expresión de kLa relaciona la potencia (P), el volumen (V) y la velocidad del gas (V_s). Para sistemas no viscosos, las correlaciones más utilizadas son las propuestas por van Riet. K. (12), según Alfonso (2015), empleadas por diferentes autores con éxito, obteniéndose la ecuación 4 (13).

$$kLa = 0.026 \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^{0.4} \cdot V_s^{0.5} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$V_s = \frac{Q}{A_{\text{transversal}}} \quad (\text{Ec. 5})$$

Para el cálculo de la velocidad superficial del gas se utiliza la razón entre el flujo volumétrico de aire (Q) y el área de sección transversal del biorreactor ($A_{\text{transversal}}$).

Diseño del biorreactor

Estableciendo las relaciones de magnitudes en el reactor modelo o banco, se busca los criterios de escalado más apropiadas para el caso de estudio. En el sistema se mantiene el principio de semejanza geométrica entre el modelo y el prototipo; pero, en procesos biológicos es necesario, además, un criterio de escalado que asegure el funcionamiento exitoso del prototipo (14).

Para este caso el criterio de escalado, que marca el régimen de cambio, es el de potencia consumida por el agitador, por unidad de volumen del cultivo (P/V), representado por la relación:

$$\left(\frac{P}{V}\right)_1 = \left(\frac{P}{V}\right)_2 \quad (\text{Ec. 6})$$

Siendo:

P_1 = Potencia consumida por el sistema aireado del biorreactor modelo (W)

P_2 = Potencia consumida por el sistema aireado del biorreactor prototipo (W)

V_1 = Volumen del biorreactor modelo (m^3)

V_2 = Volumen del biorreactor prototipo (m^3)

Para el completamiento del diseño de un fermentador prototipo se debe conocer el dimensionamiento del fermentador, estimar el consumo de potencia de agitación y los calores involucrados en el proceso. Al conocer los calores que intervienen en la fermentación se puede conocer la masa del agente de calentamiento, para mantener 37 °C en el medio de cultivo.

Dimensionamiento del biorreactor

Para el cálculo del dimensionamiento hay que tener en cuenta el espacio disponible en la planta. Las dimensiones se calculan con una relación de altura/diámetro igual a 1 (15, 16), mediante la siguiente ecuación:

$$V_F = \frac{\pi \cdot D^2 \cdot H}{4} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde:

H = Altura del líquido en el reactor (m)

D = Diámetro del reactor (m)

V = Volumen del líquido en el reactor (m^3)

Dimensionamiento de los impulsores

Los impulsores son cuchillas planas tipo Roushton, por lo que sus dimensiones se calculan con las ecuaciones:

$$D_i = \frac{D_F}{3} \quad (\text{Ec. 8})$$

$$A_i = \frac{D_i}{5} \quad (\text{Ec. 9})$$

$$D_d = \frac{2 \cdot D_i}{3} \quad (\text{Ec. 10})$$

$$L_i = \frac{D_i}{4} \quad (\text{Ec. 11})$$

Se necesita que los impulsores estén ubicados estratégicamente dentro del biorreactor.

$$H_a = 1 \cdot D_i \quad (\text{Ec. 12})$$

$$H_b = 2 \cdot D_i \quad (\text{Ec. 13})$$

$$H_c = 3 \cdot D_i \quad (\text{Ec. 14})$$

Donde:

V_F = Volumen del biorreactor (m^3)

H = Altura (m)

D_F = Diámetro del biorreactor (m)

D_i = Diámetro del impulsor (m)

A_i = Ancho de las cuchillas (m)

D_d = Diámetro del disco (m)

L_i = Longitud de las cuchillas, desde el impulsor al primer cojinete (m)

H_a = Distancia entre el fondo del biorreactor al primer agitador (m)

H_b = Distancia entre el fondo del biorreactor al segundo agitador (m)

H_c = Distancia entre el fondo del biorreactor al tercer agitador (m)

Para el completamiento del diseño de un biorreactor prototipo se debe estimar el consumo de potencia de agitación y los calores involucrados en el proceso. Conociendo los calores que intervienen en la fermentación se puede conocer la masa del agente de calentamiento para mantener 37 °C en el medio de cultivo (15).

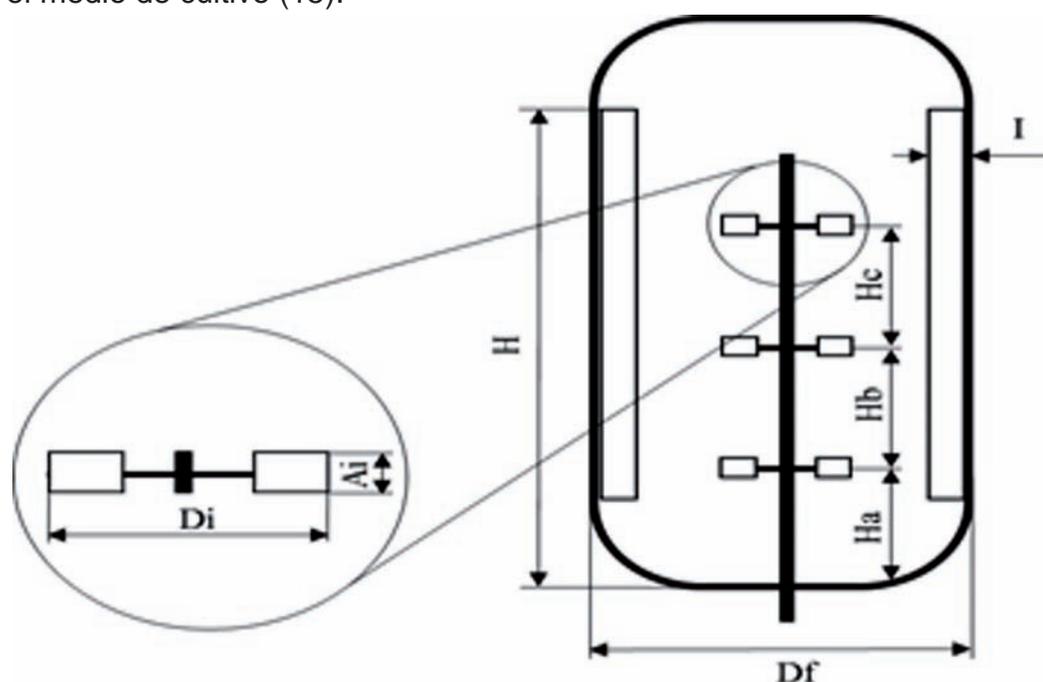


Figura 1. Fermentador de 50 L de capacidad con sus relaciones de magnitud estándar para agitadores de turbina de hojas planas.

Potencia consumida para la agitación

La potencia requerida para mezclar fluidos no aireados depende de la velocidad del agitador, la forma y el tamaño del impulsor, la geometría del tanque y la densidad y viscosidad del fluido. La relación entre estas variables generalmente se expresa en términos de números adimensionales, como el número de Reynolds (Re), ecuación (15) citada en (14) y el número de Potencia (N_p) ecuación (16) citada en (13). Este para biorreactores agitados mecánicamente se define como

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D^2}{\mu_m} \quad (\text{Ec. 15})$$

$$P = N_p \cdot \rho N^3 D_i^5 \quad (\text{Ec. 16})$$

Siendo:

Re = Número de Reynolds (adimensional)

ρ = Densidad del medio de cultivo (kg/m^3)

μ_m = Viscosidad del medio (kg/m s)

N = Velocidad del agitador (rpm)

N_p = Número de potencia (adimensional)

D_i = Diámetro del impelente (m)

P = Potencia consumida por el agitador (W)

Balance de calor

Se realizó un balance de calor en el proceso de fermentación con la metodología planteada por Ortega (17).

$$\begin{array}{ccccccc} \text{Razón de} & & & & & & \\ \text{acumulación} & = & \text{Calor} & - & \text{Calor} & + & \text{Calor} \\ \text{de calor} & & \text{entra} & & \text{sale} & & \text{evoluciona} \\ & & & & & & \text{do} \\ & & & & & & - \\ & & & & & & \text{Calor} \\ & & & & & & \text{transferido} \end{array}$$

Se desprecian las pérdidas de calor al exterior, por tanto queda el balance de calor de la forma:

$$Q_a = Q_g + Q_{met} - Q_{int} \quad (\text{Ec. 17})$$

Calor disipado por el agitador

Energía disipada por el agitador, se formula como la energía específica que suministra el agitador, para una velocidad de giro dada. Esta potencia se considera que se transforma totalmente en flujo de calor (17):

$$Q_{agit} = N_p \cdot \rho N^3 D_i^5 \quad (\text{Ec. 18})$$

Calor intercambiado con la chaqueta

Por medio de un balance de calor en el sistema de proceso fluido térmico en la chaqueta, se llega a la expresión:

$$Q_{int} = U \cdot A \cdot \Delta T_{media} \quad (\text{Ec. 19})$$

Calor metabólico

Este es el calor producido por los microorganismos como resultado del metabolismo, es necesaria para el crecimiento y producción de energía, con la metodología empleada por Mendoza (18), que expresa:

$$Q_{met} = V_f \cdot \frac{Y_{x/s} \cdot S_0 \cdot \mu}{Y_{kcal}} \quad (\text{Ec. 20})$$

Cantidad de agua

Se realiza un balance para el agua de enfriamiento, el flujo másico de agua se puede obtener con la ecuación:

$$Q_{\text{agua}} = 60.54 \frac{\text{kcal}}{\text{h}} \quad (\text{Ec. 21})$$

Donde:

Q_{ac} = Velocidad de acumulación de calor (kcal/h)

Q_{ag} = Velocidad de generación de calor debido a agitación (kcal/h)

Q_{met} = Velocidad de generación de calor metabólico (kcal/h)

U = Coeficiente global de transferencia de calor (kW/m² °C)

ΔT = Diferencia de temperatura entre el medio de cultivo y el medio de enfriamiento (°C)

A = Área de transferencia de calor (m²)

C_p = Capacidad calórica (kcal/kg °C)

m = Flujo másico de agua (kg/h)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la cinética de crecimiento de la *Salmonella enteritidis* en fermentador de 50 L

Durante el tiempo de operación de la fermentación fue monitoreado el rendimiento de biomasa en función del sustrato, la concentración de biomasa y el consumo de sustrato contra el tiempo entre otros parámetros. Después de 4 horas de fermentación la densidad óptica se mantuvo constante y el pH alcanzó el valor de 7.2 y dio por terminado el proceso de fermentación. En la tabla 1 se observan los parámetros estudiados.

Tabla 1. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Salmonella enteritidis* en biorreactor de 50 L

Corridas del proceso de fermentación											
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	
X_0	1.83	1.43	1.37	1.91	1.58	1.34	1.47	1.82	1.43	1.69	g/L
X	6.94	6.76	6.29	6.34	6.59	6.53	6.67	6.97	6.21	6.86	g/L
S_0	9.94	9.59	9.81	9.54	9.65	9.35	9.47	9.13	9.25	9.32	g/L
S	1.26	1.48	1.53	1.78	1.43	1.72	1.12	1.20	1.94	1.68	g/L
μ_{max}	0.619	0.628	0.636	0.633	0.691	0.644	0.662	0.658	0.635	0.657	h ⁻¹
$Y_{x/s}$	0.645	0.694	0.649	0.617	0.682	0.643	0.664	0.609	0.622	0.684	g/g
C_s	85.45	84.58	85.32	83.81	84.52	85.14	84.58	85.37	85.49	84.57	%

En la curva de crecimiento (figura 2), se definen dos de las fases características para *Salmonella enteritidis*, durante un proceso de fermentación. La fase denominada exponencial se observa con claridad, esta culmina a las tres horas de cultivo y se alcanzó una concentración celular de 6.01 g de peso seco/ L. La velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) promedio calculada, a partir de los datos experimentales de esa etapa, es igual a 0.672 h⁻¹.

En la literatura se reportan valores de μ_{max} para varias especies del genero *Salmonella* en función de la temperatura de cultivo. En la tabla 2 se relaciona esta variable, teniendo en cuenta la temperatura de cultivo estudiada (19).

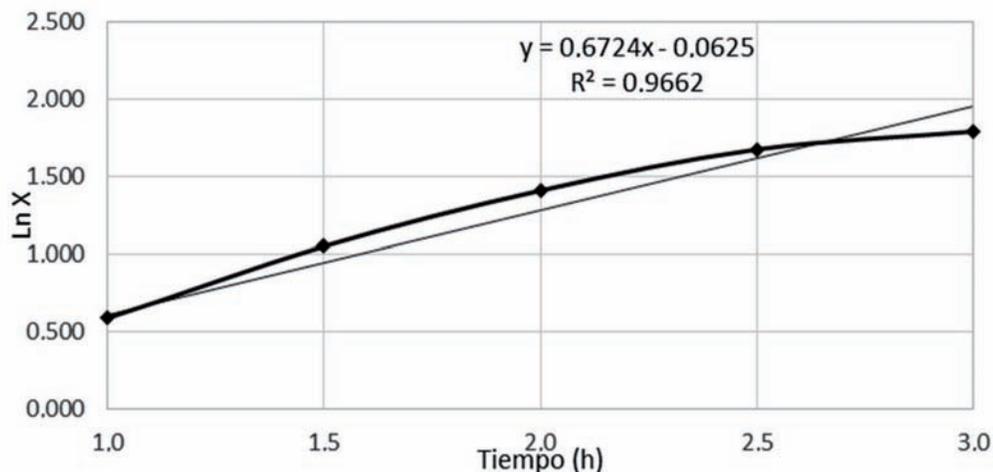


Figura 2. Cinética de crecimiento promedio de los 10 procesos de fermentación.

Tabla 2. Velocidad máxima de crecimiento de varias especies de *Salmonella* publicada en la literatura

Temperatura de cultivo	<i>Salmonella enteritidis</i> (20)	<i>Salmonella typhimurium</i> (21)	<i>Salmonella heidelberg</i> (22)
37.8 °C ± 2	0.743 h ⁻¹	0.906 h ⁻¹	1.236 h ⁻¹

Estos valores son superiores a los reportados en el presente estudio. Es preciso destacar que estas diferencias que existen en los valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ pueden deberse a la diferencia de los medios de cultivos empleados, ya que estos valores reportados fueron empleados como medio de cultivo, carne de cerdo y pollo.

Conteo de *Salmonella enteritidis* viable en fermentador de 50 L

El conteo de células viables en proceso de fermentación de 50 L (0.05 m³) de *Salmonella enteritidis*, según procedimiento PNO – 8-01-002 (11), muestra valores muy por encima de lo normado (2x10⁹ UFC/mL), esto se debe a que la fermentación es a pequeña escala y se tiene más control del proceso de fermentación. Los valores de células viables obtenidas están entre 7x10⁹ y 9x10⁹ UFC/mL. Estos resultados se muestran en la figura 3.

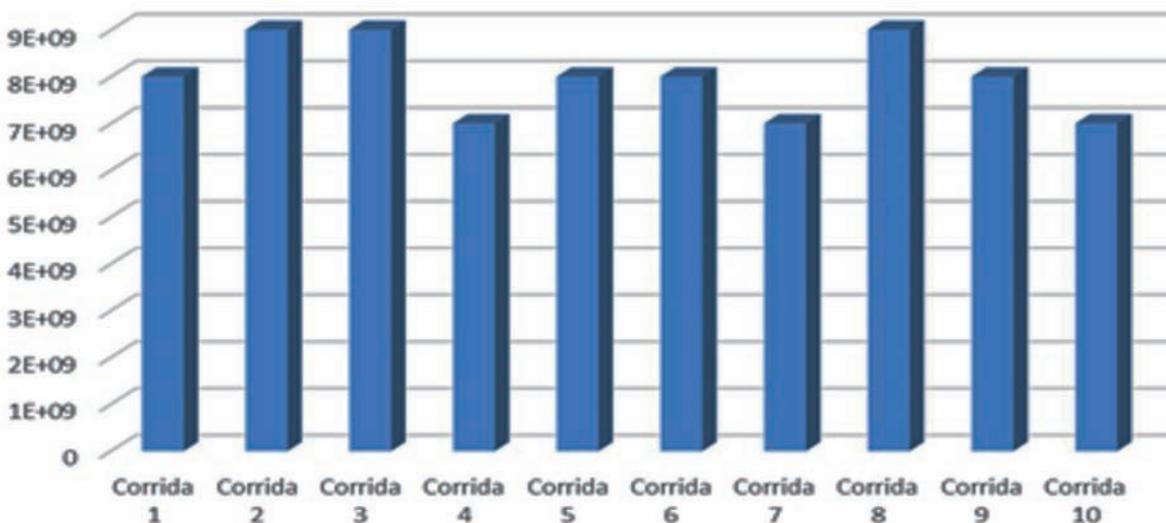


Figura 3. Conteo de *Salmonella enteritidis* viable en fermentador de 50 L.

Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kLa)

En todas las escalas, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno aumenta a medida que el volumen de líquido se incrementa. Esto se debe a que, al trabajarse con un sistema de agitación múltiple, la corriente de aire se desplaza desde el aspersor hacia la punta del agitador, donde la probabilidad de ruptura de las burbujas de aire es mayor (23). Esto se evidencia en los resultados de la estimación del coeficiente de transferencia de oxígeno en los biorreactores modelo y prototipo. Estos valores se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de coeficiente de transferencia de oxígeno calculado en ambas escalas en condiciones de fermentación

kLa en fermentador de 50 L (0.05 m ³)	kLa en fermentador de 150 L (0.150 m ³)	U/M
2.59	3.18	h ⁻¹

Esta característica inherente al disco turbina hace que las burbujas se trasladen hacia las paletas, se rompan y provoquen que, a cualquier tiempo, exista una cantidad mínima de burbujas que se dispersan por los costados del reactor.

En la literatura hay informes de valores de kLa obtenidos en el intervalo de 0.98 h⁻¹ a 11.49 h⁻¹ para cultivos de varias especies de género *Salmonellas* (23). Como se observa en la tabla 3, los valores de kLa se encuentran en el intervalo publicado.

Diseño del biorreactor en fermentador de 150 L

Dimensionamiento del fermentador

En la tabla 4 se muestra el dimensionamiento del fermentador diseñado. El sistema de agitación del fermentador es de turbina, tipo Rushton de seis hojas planas, para asegurar homogeneidad en todo el volumen de trabajo. Se emplean tres turbinas a lo largo del eje de agitación, que se encuentran de manera equidistantes. Asimismo, cuenta con cuatro deflectores, con la finalidad de mejorar el sistema de agitación y facilitar la limpieza.

Tabla 4. Resultados del diseño del biorreactor prototipo

Elementos		Valores	Unidades
V _F	Volumen del fermentador	150 (0.150)	L (m ³)
D _F	Diámetro del fermentador	0.576	m
H _f	Altura total	0.720	m
D _i	Diámetro del impulsor	0.192	m
A _i	Ancho de las cuchillas	0.0384	m
D _d	Diámetro del disco	0.128	m
L _i	Longitud de las cuchillas	0.048	m
H _a	Distancia del fondo al primer agitador	0.192	m
H _b	Distancia del fondo al segundo agitador	0.384	m
H _c	Distancia del fondo al tercer agitador	0.576	m
N _b	Número de deflectores	4	U

Potencia consumida por el agitador y velocidad de agitación

Para hallar la potencia consumida por el agitador del fermentador de 150 L, se emplea la relación de P/V con respecto al fermentador de 50 L, donde se tiene:

$$P_2 = 70.41 \text{ W}$$

Para lograr que no exista muerte celular por agitación excesiva, es necesario calcular la velocidad de agitación para el fermentador prototipo. Este parámetro se estima a partir de la ecuación 16, manteniendo el N_p constante.

$$N_2 = 196 \text{ rpm}$$

Balance de calor

Para estas determinaciones se emplean las ecuaciones descritas en el acápite de materiales y métodos. Los resultados obtenidos son:

- Calor acumulado.
Se desprecia por ser este un sistema estacionario.
- Calor disipado por el agitador

$$Q_{agit} = 60.54 \frac{kcal}{h}$$

- Calor intercambiado con la chaqueta

$$Q_{int} = 7205.31 \frac{kcal}{h}$$

- Calor metabólico

$$Q_{met} = 1177.02 \frac{kcal}{h}$$

- Cantidad de agua de calentamiento

El flujo másico de agua se calcula con un 10 % de pérdida de calor.

$$m_{(agua)} = 128.90 \frac{kg}{h} \quad m_{(agua)} = 0.128 \frac{m^3}{h}$$

El flujo másico de agua se calculó con un 10 % de pérdida de calor (24). La cantidad de agua es de 0.128 m³/h, este flujo de agua será capaz de mantener la temperatura a 37 °C, durante la fermentación.

Determinación de la cinética de crecimiento de Salmonella enteritidis en fermentador de 150 L (0.150 m³)

En la fermentación, en el biorreactor de 150 L (0.150 m³), fueron determinados varios parámetros cinéticos que se relacionan a continuación. Al alcanzar las 4 horas de fermentación, la densidad óptica se mantuvo constante y el valor de pH alcanzó el entorno de 7.4. Se evaluaron el rendimiento de biomasa y el consumo de sustrato, entre otros parámetros. La tabla 5 muestra cómo los parámetros cinéticos tienen un comportamiento similar en las 10 corridas.

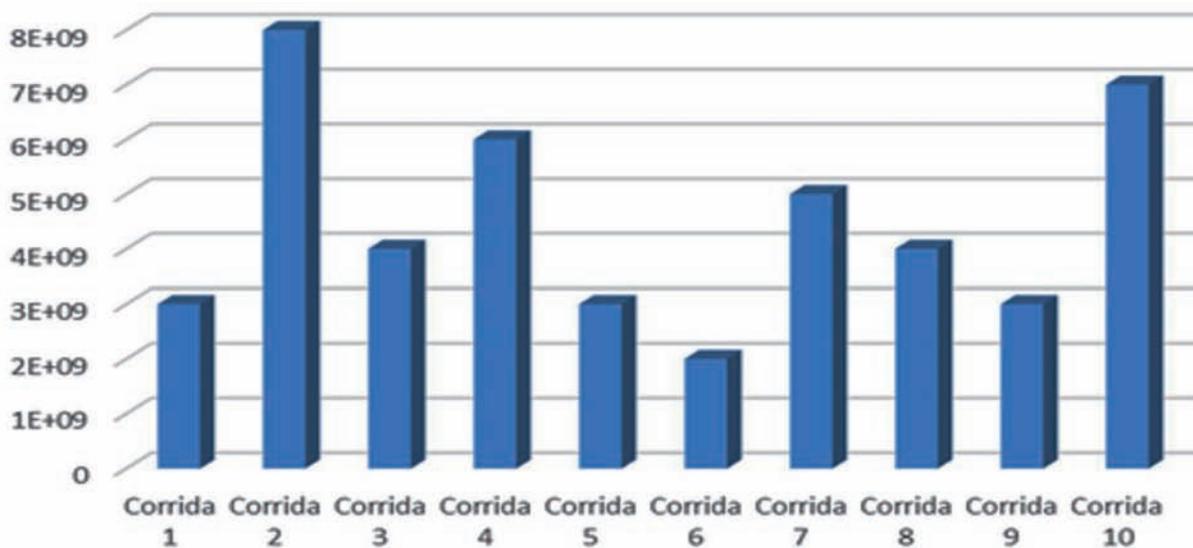
Conteo de Salmonella enteritidis viable en fermentador de 150 L (0.150 m³)

Los estudios realizados en el conteo de células viables en proceso de fermentación de 150 L (0.150 m³) de *Salmonella enteritidis* resultaron positivos al obtenerse valores por encima de 2x10⁹ UFC/mL, como lo establece el PNO 8-01-002 (11).

En la figura 4 se muestra el comportamiento del conteo de *Salmonella enteritidis* viable en las 10 fermentaciones que se realizaron, los valores de células viables reportadas están entre 2x10⁹ y 8x10⁹ UFC/mL.

Tabla 5. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Salmonella enteritidis* en biorreactor de 150 L (0.150 m³)

Corridas de procesos de fermentación											
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	
X ₀	1.22	1.81	1.45	1.39	0.99	1.52	1.05	1.32	1.28	1.09	g/L
X	6.41	6.27	6.53	6.02	6.49	6.53	6.43	6.92	6.87	6.92	g/L
S ₀	9.02	9.59	9.43	9.53	8.93	9.49	9.09	9.22	9.83	9.91	g/L
S	1.96	1.46	1.33	1.64	1.38	1.56	1.27	1.42	1.61	1.16	g/L
μ _{max}	0.638	0.675	0.628	0.661	0.611	0.633	0.681	0.663	0.682	0.691	h-1
Y _{x/s}	0.554	0.549	0.561	0.551	0.543	0.557	0.558	0.559	0.558	0.553	g/g
Cs	85.04	84.82	85.29	83.49	84.07	85.62	84.97	85.64	85.57	84.32	%

**Figura 4.** Conteo de *Salmonella enteritidis* viable en fermentador de 150 L (0.150 m³).

Validación del escalado

Para la validación del escalado se realizaron comparaciones estadísticas con los resultados de las corridas experimentales realizadas en ambos fermentadores.

Análisis estadístico en el fermentador de 50 L (0.050 m³)

En la tabla 6 se presentan los resultados estadísticos de las mediciones de las corridas experimentales estudiadas en el fermentador de 50 L.

Tabla 6. Resumen estadístico de las variables en las fermentaciones

	X ₀	X	S ₀	S	μ _{max}	Y _{x/s}	Cs
Recuento	10	10	10	10	10	10	10
Promedio	1.587	6.616	9.505	1.514	0.646	0.551	84.884
Varianza	0.0608	0.0858	0.1111	0.0513	0.0007	0.00003	0.5231
Desviación estándar	0.210	0.272	0.2531	0.2685	0.0210	0.0296	0.5526
Coefic. de variación	13.27 %	4.12 %	2.66 %	17.73 %	3.85 %	4.56 %	0.65 %
Error estándar	0.0666	0.0862	0.0800	0.0849	0.0066	0.0093	0.1747
Sesgo estandarizado	0.5209	-0.2407	0.3864	0.0028	1.2405	0.0773	-0.7942
Curtois estandarizada	-1.0289	-0.8870	-0.3761	-0.6735	0.6442	-0.8568	-0.22514

Como se observa en la tabla 6, todas las variables analizadas tienen pocas variaciones al tener pequeñas desviaciones estándar. El coeficiente de variación tiende a un comportamiento menor de 20 %, por lo que el promedio es representativo del conjunto de datos, indica que existe homogeneidad en la muestra. Ninguna de las variables muestra valores de sesgo estandarizado y de curtosis estandarizada fuera del intervalo de -2 a 2, lo cual permite afirmar que todas las variables cumplen con la distribución normal.

Análisis estadístico en el fermentador de 150 L (0.150 m³)

En la tabla 7 se presentan los resultados estadísticos de las mediciones de las corridas experimentales estudiadas en el fermentador de 50 L.

Tabla 7. Resumen estadístico de las variables en las fermentaciones

	Xo	X	So	S	$\mu_{m\acute{a}x}$	Yx/s	Cs
Recuento	10	10	10	10	10	10	10
Promedio	1.312	6.539	9.404	1.479	0.656	0.554	84.88
Varianza	0.0612	0.0863	0.1109	0.0518	0.0008	0.00004	0.5229
Desviación estándar	0.2466	0.2930	0.3334	0.2266	0.0271	0.00547	0.7232
Coefic de variación	18.80 %	4.48 %	3.54 %	15.32 %	4.87 %	0.83 %	0.85 %
Error estándar	0.0780	0.0926	0.1054	0.0716	0.0085	0.0017	0.2287
Sesgo estandarizado	0.8660	-0.1136	0.0756	1.1113	-0.4818	-1.2044	-1.0371
Curtosis estandarizada	0.3101	-0.2711	-0.7144	0.7980	-0.8122	0.3502	-0.1361

En la tabla 7 se observa cómo las variables muestran valores de sesgo estandarizado y de curtosis estandarizada, fuera del intervalo de -2 a 2, permite afirmar que todas las variables cumplen con la distribución normal. El coeficiente de variación muestra un comportamiento menor a 20 %, significa que el promedio es representativo del conjunto de datos y, por ende, homogéneo. Todas las variables analizadas tienen pocas variaciones al tener pequeñas desviaciones estándar.

Análisis estadístico entre ambas escalas

En el análisis de los parámetros cinéticos entre el modelo y el prototipo se realizaron dos pruebas, la prueba de rangos múltiples y prueba de hipótesis. A continuación se muestran los resultados.

Pruebas de Múltiples Rangos

La tabla 8 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes a otras.

La tabla muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0 % de confianza. Esto demuestra que estos valores pertenecen a una misma población. Por lo que se evidencia reproducibilidad entre ambas escalas.

Tabla 8. Resumen estadístico de las variables en las fermentaciones

Método: 95.0 porcentaje LSD	Casos	Media	Grupos homogéneos
Biomasa final (X_{50L}) Fermentador 50 L	10	6.616	X
Biomasa final (X_{150L}) Fermentador 150 L	10	6.539	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
X_{50L} F-50 L - X_{150L} F-150		0.077	0.0256734
Método: 95.0 porcentaje LSD	Casos	Media	Grupos homogéneos
Velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) Fermentador 50 L	10	0.546	X
Velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) Fermentador 150 L	10	0.556	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
μ_{max} F-50 L - μ_{max} F-150		-0.01	0.0228157
Método: 95.0 porcentaje LSD	Casos	Media	Grupos homogéneos
Rendimiento de biomasa (Yx/s) Fermentador 50 L	10	0.650	X
Rendimiento de biomasa (Yx/s) Fermentador 150 L	10	0.654	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Yx/s F-50 L - Yx/s F-150		0.0034	0.0200575

CONCLUSIONES

El proceso de fermentación discontinua desarrollado es escalable a 150 L, lográndose se reprodujeron los resultados de concentración de biomasa ($X_0 = 1.312$ g/mL - $X = 6.539$ g/mL), rendimiento de biomasa (0.554 g/g) y velocidad específica de crecimiento (0.672 h⁻¹) empleando como criterio de escalado P/V constante. En la validación del diseño propuesto del fermentador de 150 L con respecto al fermentador de 50 L no se obtuvieron diferencias significativas estadísticamente, en los parámetros estudiados como: concentración de biomasa y sustrato y la velocidad específica de crecimiento. Se determinó la concentración de células viables en el cultivo de *Salmonella enteritidis* en ambas escalas que mostró para los biorreactores de 50 L y 150 L resultados de 8×10^9 y 4.5×10^9 , respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alfonso, Y. Propuesta de diseño de los principales equipos tecnológicos de la Planta de ronedificada biológico Biorat. Cuba, Universidad de Matanzas. 2015.
2. Alfonso, Y. Diseño de los principales equipos de la planta de Biorat. Lituania, Editorial Académica Española. 2019
3. Moreno, E., Venegas D. Diseño y construcción de un biorreactor esterilizable y de bajo costo para el estudio de crecimiento de microorganismos. Bogota, Colombia, Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 2017.
4. Serna, L., et al. Actividad antimicrobiana y cinética de fermentación de *Weissella confusa* contra *Xanthomonas albilineans*. Acta Agronómica 62(2). 2013.
5. Villarreal, J., et al. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. Revista Salud Uninorte 30(1). 2014

6. Martínez, D. Obtención de un biocatalizador termoestable a partir de la expresión de la β -fructosidasa de *Thermotoga maritima* en *Pichia pastoris* GS115 para la producción de azúcares invertidos. Cuba, Universidad Central Marta Abreu de las Villas. 2015
7. Martin, A. Control del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* en la síntesis de Glutati6n. Espa1a, Universidad de Granada. 2005
8. Flores, L. and A. Ruiz. Implementaci6n de una metodolog1a anal1tica para la cuantificaci6n de prote1nas en la microalga *Arthrospira platensis*. Revista de la Sociedad Qu1mica del Per1 4(83). 2017
9. Waterborg, J. H. The Lowry Method for Protein Quantitation. The Protein Protocols Handbook. H. Press. New York, Estados Unidos. 2009
10. Ruiz, O. Proceso de fermentaci6n para la obtenci6n del pl1smido pIDKE2 en *E. coli*, un candidato vacunal contra el virus de la Hepatitis C. Cuba, Instituto Superior Polit1cnico Jose Antonio Echeverr1a. 2013
11. Labiofam. Pureza microbiol6gica del in6culo de BIORAT obtenido por fermentaci6n. Labiofam. Cuba. PNO – 08-01-002. 2010
12. van Riet K. apud Alfonso, Y. van Riet K. (1979) Review of measuring methods and results in non-viscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels, Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev., 18, 367-375.
13. Quir6s, J. Determinaci6n de los modelos para la predicci6n de los coeficientes volum1tricos de transferencia de masa (kLa) ox1geno-medio de cultivo en biorreactores tipo tanque agitado. San Juan, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 2014
14. Doran, P. Bioprocess Engineering Principles. Oxford. United Kindon, Elsevier Science & Technology Principles. 2013
15. Mu1oz, E. Escalamiento del proceso de obtenci6n de fructo oligosac1ridos a partir de jugo de ca1a mediante s1ntesis enzim1tica con c1lulas permeabilizadas de *Candida ap1cola*. Centro de investigaci6n y asistencia en tecnolog1a y dise1o del estado de Jalisco. Mexico. 2016
16. Arezo, F. Puesta a punto del proceso de producci6n de ant1geno fimbriales K99 y F17 de *Escherichia coli*. Uruguay, Universidad ORT. 2016.
17. Gonz1lez, K. and Torres M. (2015). "Dise1o de un tanque agitado para la etapa de hidr6lisis en la producci6n de miel de agave." Revista J6venes Investigadores 3(1).
18. Ortega F, P1rez O, L6pez E. Modelo Semif1sico de Base Fenomenol6gica del Proceso Continuo de Fermentaci6n Alcoh6lica. Informaci6n Tecnol6gica, 27(1). 2016
19. Mendoza, J. Dise1o de un biorreactor para elaborar vino de frutas Instituto Politecnico Nacional. 2006
20. Almeida, C. The transfer and growth of *Salmonella* modelled during pork processing and applied to a risk assessment for the catering sector. Denmark, Technical University of Denmark. 2012
21. Zhang, J., Liu, G., Li, P. and Qu, Y. Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat. Food Control 21, 198-202. 2010
22. Moller C.O.A., Nauta M.J., Christensen B.B., Dalgaard P., Hansen T.B. Modelling transfer of *Salmonella Typhimurium* DT104 during simulation of grinding of pork. Journal of Applied Microbiology. 112 (1), 90-98. 2012.
23. Alban L., Baptista F.M., M6gelmoose V., Sorensen L.L., Christensen H., Aabo S., Dahl J. *Salmonella surveillance* and control for finisher pigs and pork in Denmark – A case study. Food Research International. 45, 656-665. 2012
24. Arias, M., et al. Determinaci6n de coeficientes de transferencia de calor y masa en un agitador rotatorio para utilizarlo en procesos fermentativos de *Salmonella* spp. Revista Colombiana de biotecnolog1a 3(1). 2016
25. Serrat Diaz, M.; Mendez Hernandez, A. A. "Construcci6n y Validaci6n Experimental de un Biorreactor Artesanal Tipo Tanque Agitado para Fermentaciones Sumergidas a Escala de Laboratorio". Revista Tecnolog1a Qu1mica [online]. 2015, 35, (3), 362-375. ISSN 2224-6185.