

Diseño de un biorreactor para la producción de inóculo de *Salmonella enteritidis*

Design of biorreactor for the production of inoculum of *Salmonella enteritidis*

Ing. Yoel Alfonso-Acosta^{1*}

MsC. Arley Pérez-Rojas²

Dr.C. Mario Yll-Lavín²

¹Empresa productora y comercializadora de productos biofarmacéuticos y químicos.
Labiofam, Matanzas, Cuba.

²Departamento de Química e Ingeniería Química, Universidad de Matanzas, Cuba.

*Autor para la correspondencia. correo electrónico: yoel.alfonso.1989@gmail.com

RESUMEN

El propósito de este estudio fue realizar el diseño de un biorreactor batch con volumen de 150 L para la producción de *Salmonella enteritidis*, variedad *danysz*. El diseño se apoyó en un modelo cinético para la obtención de la biomasa y el consumo de sustrato. Este modelo fue ajustado usando 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 del criterio de escalado potencia consumida por unidad de volumen, criterio que marca el régimen de cambio. El tiempo de fermentación fue de 3,35 h, mientras que la potencia consumida fue de 11 W. Los calores involucrados en el proceso de fermentación fueron: calor sensible, calor disipado por la agitación, calor intercambiado por la chaqueta y el calor generado por el microorganismo con valores de 2 640 kcal/h, 9,47 kcal/h, 24 768 kcal/h y 27 398 kcal/h respectivamente.

Palabras clave: fermentación; biorreactor; *Salmonella enteritidis*; potencia por unidad de volumen.

ABSTRACT

The purpose of this study was to design a batch bioreactor with a volume of 150 L for the production of *Salmonella enteritidis*, danysz variety. The design was based on a kinetic model for obtaining biomass and substrate consumption. This model was adjusted 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. The power criterion consumed per unit volume was used, criterion that marks the regime of change. The fermentation time was of 3,35 hours, while the power consumed was 11 W. The heats involved in the fermentation process were: sensible heat, heat dissipated by agitation, heat exchanged by the jacket and the heat generated by the microorganism with values of 2 640 kcal / h, 9,47 kcal / h, 24 768 kcal / h and 27 398 kcal / h respectively.

Keywords: fermentation; bioreactor; *Salmonella enteritidis*; power v/s unit volume.

Recibido: 13/2/2018

Aprobado: 5/7/2018

Introducción

Por más de 30 años en Cuba se ha trabajado en el desarrollo de métodos biológicos para el control de roedores de importancia en la salud pública y la agricultura. Desde 1985, el Biorat se ha empleado de forma masiva en objetivos urbanos, agrícolas y pecuarios en

Cuba, países de Centro América, El Caribe, América del Sur, Asia y África, sin que hasta la fecha se haya relacionado su utilización con brotes epidémicos en humanos o animales que no son objeto del control. La bacteria *Salmonella enteritidis*, fagotipo 6a, 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*, donde ha sido probada su inocuidad para la especie humana y otros animales.

S. enteritidis es una bacteria aislada inicialmente desde roedores, caracterizada 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, el cual determinó que el plasmidio de mayor peso molecular (59 Mda) contenía los genes de virulencia de (spv).⁽¹⁾

La Planta de Biorat de Matanzas posee una tecnología obsoleta, casi todo el proceso se hace de forma manual. Sin embargo, el producto que se obtiene resulta de interés a nivel nacional e internacional y su demanda así lo demuestra. Uno de los problemas que más atenta contra la productividad de la fábrica es la necesidad de adquirir el inóculo de *S. enteritidis* de la Empresa Productora de Vacunas Virales y Bacterianas. Esta acción conlleva a gastos en la adquisición, transportación y almacenaje adecuado. De acuerdo con los antecedentes descritos, se impone la necesidad de diseñar un biorreactor que sea capaz de satisfacer las necesidades de esta materia prima a la industria.

Materiales y métodos

Preparación del medio de cultivo

Trasplante de la cepa

Se parte de un tubo que contiene 10 ml de medio Merezhkonski en el cual se encuentra conservada la cepa de *S. enteritidis*. Con una aguja larga se toma el contenido y se siembra en un erlenmeyer de 250 mL, que contienen 100 mL de medio Caldo Nutriente, añadiendo

5 mL del contenido de cepa en el erlenmeyer. 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 erlenmeyer se incubó a 37 °C durante 20 h.

Siembra en el fermentador de 50 L

Pasado el periodo de incubación del erlenmeyer con caldo nutriente se realiza observación microscópica para corroborar preliminarmente que no exista contaminación. Una vez obtenido 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 del microorganismo en cuestión, los parámetros cinéticos, o sea, el comportamiento en la formación de biomasa, 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*, se utiliza una cepa liofilizada y certificada del cepario de la Empresa Productora de Vacunas Virales y Bacterianas, pertenecientes al Grupo Empresarial Labiofam. Con el objetivo de reproducir al microorganismo fue inoculado el biorreactor de 50 L, con dicha cepa a 37 °C por 24 h. Luego se siembra en Agar verde brillante, un medio diferencial, donde las colonias que presentaron las características morfológicas típicas de *Salmonella* fueron replicadas en el mismo medio, hasta obtener un cultivo puro.^(2,3)

Para la realización de la cinética se toma asépticamente muestras de 10 mL desde 0 h a 5 h con una frecuencia de 0,5 h. Las muestras se centrifugaron a 5 000 r.p.m. por 10 min, para separar la biomasa del sobrenadante.⁽⁴⁾

La concentración de biomasa se establece por peso seco.⁽⁵⁾ En el sobrenadante se determina la concentración de proteínas totales mediante la técnica espectrofotométrica de Lowry.⁽⁶⁾ En el cálculo del rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) y el consumo de sustrato (CS) se emplean las ecuaciones siguientes, respectivamente.⁽⁷⁾

$$Y_{x/s} = - \frac{X_0 - X}{S_0 - S} \quad (1)$$

$$C_s = \frac{(S_0 - S)}{S_0} \cdot 100 \quad (2)$$

El crecimiento microbiano fue estudiado y modelado según la ecuación de Monod para un sistema discontinuo.⁽⁸⁾ La ecuación de Monod, relaciona la velocidad máxima de crecimiento con la concentración del sustrato limitante, la que se expresa como: ⁽⁹⁻¹²⁾

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (3)$$

donde:

X = Concentración final de biomasa. (g/L)

X₀ = Concentración inicial de biomasa. (g/L)

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

S₀ = Concentración inicial de proteínas totales. (g/L)

μ = Velocidad específica de crecimiento. (h⁻¹)

μ_{máx} = Velocidad específica máxima de crecimiento. (h⁻¹)

K_s = Constante de saturación. (g/L)

El valor μ_{máx} y la constante de saturación K_s se obtiene por el método del recíproco, a partir de la gráfica de 1/μ contra 1/S, aplicado a los datos experimentales.⁽¹³⁾ El inóculo de *Salmonella* tiene una titulación de 2 x 10⁹ UFC/mL según PNO – 08-01-002. 2010 ⁽²⁾, para esto se realiza la concentración de microorganismos mediante una cámara Neubauer de un área de 0,002 5 mm² y una profundidad de 0,1 mm ⁽⁷⁾, junto con un microscopio Olympus, Tailandés.

Diseño del biorreactor

Tiempos de fermentación

En el diseño del biorreactor son utilizadas las modelaciones matemáticas y las técnicas de escalado industrial. La primera parte de la investigación se realiza experimentalmente a nivel de banco, en un biorreactor de 50 L (fig.1) de capacidad, dotado de los elementos necesarios para el posterior escalado a otro de 150 L. En el mismo se le determina el tiempo de fermentación del microorganismo. Según el balance de biomasa se llega a: ⁽¹⁴⁾

$$FX_o = FX + \frac{dX}{dt} \cdot V - r_x \cdot V \quad (4)$$

Esta ecuación es ajustada a un biorreactor discontinuo, donde $FX_o = FX = 0$, los volúmenes se mantienen constantes y considerando que no hay muerte celular, la ecuación de balance para el crecimiento microbiano será:

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

$$\int_{x_o}^x \frac{dX}{r_x} = \int_0^t dt \quad (6)$$

expresada en velocidad específica de crecimiento (μ)

$$t = \int_{x_o}^x \frac{dX}{r_x} \quad (7)$$

queda para una biorreacción en que cumpla con la ecuación de Monod:

$$t = \int_{X_0}^X \frac{K_S + S}{\mu_{\max} \cdot X \cdot S} \cdot dX \quad (8)$$

siendo:

F = Velocidad del flujo volumétrico del medio. (m³/h)

r_x = Velocidad de duplicación. (g/L h)

t = Tiempo de fermentación. (h)

Ya establecido el tiempo de fermentación y las relaciones de magnitudes en el reactor modelo o banco, se busca los criterios de escalado más apropiado para el caso de estudio. En el sistema se mantiene el principio de semejanza entre el modelo y el prototipo, pero en procesos biológicos es necesario además un criterio de escalado, que asegure el funcionamiento exitoso del prototipo, y este criterio sería el régimen de cambio entre ambas escalas.⁽¹⁵⁾

Para este caso el criterio de escaldado que marca el régimen de cambio es el de potencia consumida por el agitador por unidad de volumen del cultivo (Pg/V), donde para que sea llevado a efecto en la práctica existe la relación:

$$\frac{P_{g1}}{V_1} = \frac{P_{g2}}{V_2} \quad (9)$$

$$\pi \cdot N_1 D_{i1} = \pi \cdot N_2 D_{i2} \quad (10)$$

siendo:

P_{g1} = Potencia consumida por el sistema aireado del biorreactor modelo. (W)

P_{g2} = Potencia consumida por el sistema aireado del biorreactor prototipo. (W)

V₁ = Volumen del biorreactor modelo. (m³)

V_2 = Volumen del biorreactor prototipo. (m³)

Dimensionamiento del biorreactor

Para el cálculo del dimensionamiento hay que tener en cuenta el espacio disponible en la planta. Las dimensiones se calcula con una relación de altura - diámetro (H:D) de 2:1 mediante la siguiente ecuación: ⁽¹⁶⁾

$$V_F = \frac{\pi \cdot D^2 \cdot H}{4} \quad (11)$$

Dimensionamiento de los impulsores

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

$$D_i = \frac{D_F}{3} \quad (12)$$

$$A_i = \frac{D_i}{5} \quad (13)$$

$$D_d = \frac{2 \cdot D_i}{3} \quad (14)$$

$$L_i = \frac{D_i}{4} \quad (15)$$

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

$$H_a = 1 \cdot D_i \quad (16)$$

$$H_b = 2 \cdot D_i \quad (17)$$

$$H_c = 3 \cdot D_i \quad (18)$$

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 del primer agitador al segundo agitador. (m)

H_c = Distancia del segundo agitador 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.⁽¹⁷⁾

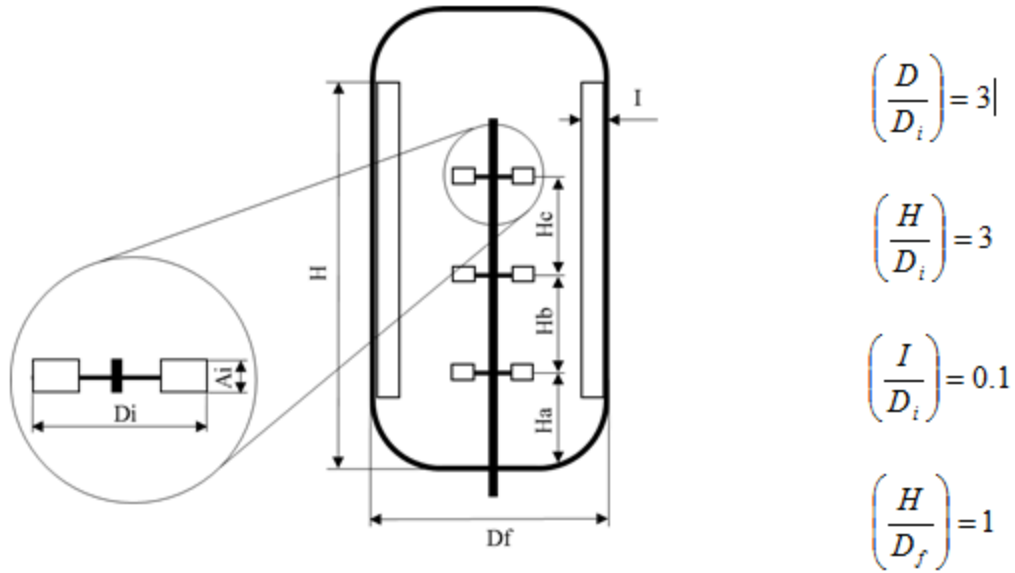


Fig.1 - Fermentador de 50 L de capacidad con sus relaciones de magnitudes estándares para agitadores de turbina de hojas planas

La potencia consumida para la agitación

Las relaciones de escalado son significativamente simples cuando se escala con semejanza geométrica y cuando el régimen de flujo del reactor de menor escala es completamente turbulento. El número de Reynolds para reactores agitados mecánicamente se define por la ecuación siguiente: ⁽¹⁵⁾

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D^2}{\mu_m} \quad (19)$$

El régimen de transición de laminar a turbulento ocurre cuando $Re \approx 100$ y el régimen turbulento ocurre cuando $Re \geq 1\,000$. La mayoría de los reactores agitados a escala industrial operan en régimen turbulento completamente desarrollado.

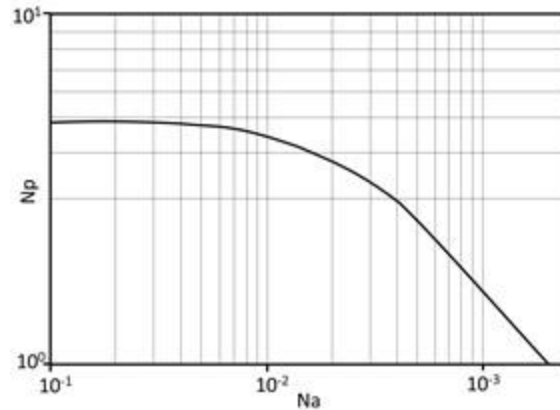


Fig. 2 - Relación entre el número de potencia y el número de aeración para turbinas Rushton

La mayoría de los procesos fermentativos discontinuos necesitan de un sistema de agitación. Para estimar la potencia en un sistema aireado se hace uso de un módulo adimensional llamado número de aeración (N_a). Este módulo se define como el cociente entre la velocidad superficial del gas y la velocidad tangencial en el extremo del impulsor. El valor de N_a indica el grado de dispersión de las burbujas alrededor del impulsor.⁽¹⁷⁾

$$N_a = \frac{Q_{aire} \cdot V_F}{N \cdot D^3} \quad (20)$$

Para el cálculo de la potencia se emplea la relación entre el número de potencia (N_p) y N_a , se obtiene mediante la existencia de correlaciones empíricas para cada tipo de agitador (fig. 2).

$$P_g = n \cdot N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5 \quad (21)$$

siendo:

Re = Número de Reynolds. (adimensional)

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

μ_m = Viscosidad del medio. ($\text{kg}/\text{m s}$)

N_a = Módulo de aireación. (adimensional)

Q_{aire} = Velocidad volumétrica del aire. (vvm)

N = Velocidad del agitador. (rpm)

n = número de impelente. (adimensional)

Balance de calor

Los calores involucrados en el proceso de fermentación son:

$$Q_{ac} = Q_{gen} + Q_{ag} + Q_{air} - Q_{sen} - Q_{int} + Q_{evap} \quad (22)$$

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:

$$Q_{agit} = \frac{P_g}{V} \quad (23)$$

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 siguiente expresión.

$$Q_{int} = U \cdot A \cdot \frac{\Delta T_{media}}{V} \quad (24)$$

Calor sensible

La temperatura del medio de cultivo debe permanecer constante en 37 °C. El calor para alcanzar la temperatura deseada se expresa en la ecuación:

$$Q_{sen} = m \cdot C_p \cdot (\Delta T) \quad (25)$$

Cantidad de agua

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

$$m_{(agua)} = \frac{Q_{int}}{C_{P (agua)} \cdot \Delta T} \quad (26)$$

donde:

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

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

Q_{air} = Velocidad de generación por aireación. (kcal/h)

Q_{evap} = Velocidad de pérdida de calor por evaporación. (kcal/h)

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

Q_{int} = Velocidad de intercambio de calor en el biorreactor. (kcal/h)

Q_{sen} = Velocidad de generación de calor sensible. (kcal/h)

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

ΔT = Diferencia media 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 = Masa

Resultados y discusión

Determinación de la cinética de crecimiento de la *Salmonella*

A las 24 h de realizada la prueba, se obtiene un cultivo del microorganismo en Agar verde brillante. Mediante la siembra sucesiva por estriado simple se obtiene un cultivo puro del

aislamiento. Las características morfológicas de las colonias de *Salmonella* son: colonias de forma redondeadas, de color rojas o rosadas.

Durante el tiempo de operación de la fermentación fue monitoreado la concentración de biomasa y el consumo de sustrato contra el tiempo. Después de 4 h de fermentación, la densidad óptica se mantuvo constante y el pH alcanzó el valor de 7,2. Se evaluó el rendimiento de biomasa y el consumo de sustrato. En la tabla 1 se observa los parámetros estudiados.

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

Parámetros		Valores	Unidad
X ₀	Concentración de biomasa inicial.	0,45	g/L
X	Concentración de biomasa final.	1,92	g/L
S ₀	Concentración de sustrato inicial.	8,02	g/L
S	Concentración de sustrato final.	3,96	g/L
μ _{máx}	Velocidad específica máxima de crecimiento.	0,753	h ⁻¹
K _s	Constante de saturación.	0,383	g/L
Y _{x/s}	Rendimiento celular en base al sustrato.	0,362	$\frac{\text{g célula}}{\text{g sustrato}}$
C _s	Consumo de sustrato.	50,62	%

Diseño del reactor biológico

Tiempos de fermentación

El modo de operación escogido fue discontinuo (batch) debido a las ventajas que ofrece, entre las que se pueden destacar: su fácil manejo y construcción y la minimización de los riesgos de contaminación por microorganismos externos.^(18,19) Como se puede apreciar en la tabla 1 la K_s es despreciable con respecto a la concentración de sustrato inicial, por lo que según Doran 2013, μ = máx, quedando el tiempo de fermentación en 3,35 h. El tiempo de fermentación calculado es semejante al tiempo real de fermentación en la industria como se refleja en Tecnología de producción del rodenticida Biológico Biorat.⁽¹⁾

En las tabla 2 se muestran el dimensionamiento del biorreactor diseñado.

Tabla 2 - Resultados del diseño del biorreactor prototipo

Elemento		Valores	Unidades
V	Volumen del fermentador	0,150	m ³
D _F	Diámetro del fermentador	0,444	m
H	Altura	0,971	m
D _i	Diámetro del impulsor	0,148	m
A _i	Ancho de las cuchillas	0,029	m
D _d	Diámetro del disco	0,098	m
L _i	Longitud de las cuchillas	0,037	m
H _a	Distancia entre el fondo del fermentador al primer agitador.	0,148	m
H _b	Distancia del primer agitador al segundo agitador.	0,296	m
H _c	Distancia del segundo agitador al tercer agitador.	0,444	m
N _b	Número de <i>baffles</i> .	4	U

El sistema de agitación del biorreactor 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, las cuales se encuentran ubicadas de manera equidistantes. Así mismo, cuenta con cuatro *baffles* con la finalidad de mejorar el sistema de agitación y facilitar la limpieza.⁽²⁰⁾

Velocidad de agitación y potencia consumida por el agitador

Para lograr que no exista muerte celular por agitación excesiva, es necesario calcular la velocidad de agitación para el biorreactor prototipo. Teniendo en cuenta la ecuación (10) la velocidad de agitación calculada para el prototipo fue de 168 r.p.m.

El número de potencia es de 1,8 según fig. 2, pero como el biorreactor modelo no cumple con las relaciones de magnitudes estándares para agitadores de turbina de hojas planas, por lo que el N_p de trabajo se obtiene mediante la ecuación siguiente:

$$N_p = N_p' \frac{\left(\frac{D}{D_i}\right)^{0.5} \left(\frac{H}{D_i}\right)^{0.5} \left(\frac{I}{D_i}\right)^{0.3}}{\left(\frac{D}{D_i}\right)^{0.5} \left(\frac{H}{D_i}\right)^{0.5} \left(\frac{I}{D_i}\right)^{0.3}} \frac{\text{Condiciones de trabajo}}{\text{Condiciones estándar}} \quad (27)$$

siendo:

N_p = Número de potencia de trabajo. (adimensional)

N_p' = Número de potencia calculado. (adimensional)

I = Ancho de los baffles.

El número de potencia de trabajo del biorreactor prototipo fue de 1,53. En la tabla 3 se muestra los valores de Velocidad de agitación y potencia consumido entre el modelo y el prototipo.

Tabla 3 - Velocidad de agitación y potencia consumida en el biorreactor modelo y prototipo

Elemento	Velocidad de agitación (N)	Potencia consumida (P)
Biorreactor de 50 L	250 rpm	3,67 W
Biorreactor de 150 L	168 rpm	11,01 W

Balance de calor

Los resultados de los valores de los calores involucrados en el proceso de fermentación se relacionan en la tabla 4:

Tabla 4 - Calores involucrados en el proceso de fermentación

Calores involucrados en el proceso		Valores
Q_{ac}	Calor acumulado se desprecia por ser este un sistema estacionario.	
Q_{gen}	Calor generado.	$27398,53 \frac{kcal}{h}$

Q_{ag}	Calor disipado por el agitador.	$9,47 \frac{kcal}{h}$
Q_{air}	Calor por aireación se desprecia ya que la presión de la salida del aireador es aproximada a la presión de la superficie del líquido.	
Q_{sen}	Calor sensible.	$2640 \frac{kcal}{h}$
Q_{int}	Calor intercambiado con la chaqueta.	$24768 \frac{kcal}{h}$
Q_{evap}	Calor por evaporación, como la temperatura de trabajo es 37 °C, el calor por evaporación es despreciable.	

Cantidad de agua de calentamiento

El flujo másico de agua se calculó utilizando un 10 % de pérdida de calor.⁽²¹⁾ La cantidad de agua es de 4,8 m³/h, este flujo de agua será capaz de mantener la temperatura a 37 °C durante la fermentación.

Conclusiones

Se diseñó un biorreactor de 150 L de capacidad empleando la técnica de escaldo Potencia del motor por unidad de volumen del medio. La velocidad específica máxima de crecimiento de la salmonella enteritidis se comportó con un valor de 0,753 h⁻¹, una constante de saturación de 0,383 g/l. El rendimiento celular en base al sustrato de 0,362 g células/g sustrato y un consumo de sustrato de un 50,02 %. Se dimensionó el biorreactor prototipo para su construcción y se propuso un modelo diseñado por la empresa globo inox. El tiempo de fermentación de la *salmonella enteritidis* fue de 3,35 h, tiempo muy semejante al que normalmente transcurre en la industria. La velocidad de agitación que se obtuvo del biorreactor fue de 168 rpm con una potencia consumida de 11,01W. El volumen de agua para calentamiento durante el proceso de fermentación fue de 4,8 m³.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Laboratorio de Microbiología de la Planta de Bioplaguicida de Matanzas. Un agradecimiento especial a Lic. David Roberto Martínez Llaneras y a la MsC. Rosa M. González Hernández por su contribución a este estudio.

Referencias bibliográficas

1. LABIOFAM. Tecnología de producción del rodenticida Biológico Biorat. 4^{ta} edición. La Habana. 2016.
2. LABIOFAM. Pureza microbiológica del inóculo de BIORAT obtenido por fermentación. PNO – 08-01-003. 2^{da} edición. La Habana. Cuba. 2017.
3. MORENO LÓPEZ, J. P.; SEBASTIÁN GARCÍA, J.; EDISON BELTRAN, J.; ALEXANDER PARDO, J. “Uso de medios selectivos como prueba preliminar para la búsqueda de Salmonella spp. y Escherichia coli en el agua de grifo de la sede principal y la granja La Esperanza de la Universidad de Cundinamarca”. *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cundinamarca*. 2017, **3** (1), 20-29. ISSN: 2422-3484.
4. VILLARREAL CAMACHO, J.; PEREIRA SANANDRES, N.; SOTO VARELA, Z.; HERNÁNDEZ AGUIRRE, E.; GONZALEZ PEDRAZA, J. “Aislamiento microbiológico de Salmonella spp. y herramientas moleculares para su detección”. *Revista Salud Uninorte*. **30** (1), 73-94. 2014. ISSN: 0120-5552.
5. DE MARTÍN BARRY, Ana María. *Control del metabolismo de Saccharomyces cerevisiae en la síntesis de Glutación*. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada. España. 2005. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/15792390.pdf>.
6. STOSCHECK. C. M. “Quantitation of protein”. In: *Methods in Enzimology*. “Guide to Protein Purification”. Dutschen, M. P. (ed) **182**, 50 – 68 Chapter 6. Academia Press. 1980.
7. SERNA. COCK, L. “Actividad antimicrobiana y cinética de fermentación de Weissella confusa contra Xanthomonas albilineans”. *Rev. Fac. Ing. Univ.* 2013, **55** (55-65). ISSN 2323-0118.
8. LÓPEZ BURITICÁ, K.; CASANOVA TRUJILLO, S.; ACOSTA MEDINA, C. D. “Análisis del crecimiento microbiano mediante la cinética de Monod y Haldane en un RCTA utilizado

para el tratamiento de aguas residuales”. *Revista NOOS*. 2013, **2**, 11-16. ISSN 2346-2779. Disponible en: http://www.revistanooos.co/wp-content/uploads/2015/06/2.-An%C3%A1lisis_del_crecimiento_microbiano_mediante_la_cin%C3%A9tica_de_Monod_y_Haldane_en_un_RCTA_utilizado_para_el_tratamiento_de_aguas_residuales.pdf

9. SHOU HU, W. *Engineering Principles in Biotechnology*. 1^{ra} ed. Hoboken, NJ, USA: JohnWiley & Sons. 2018. ISBN 9781119159032.

10. TSIPA, A; KOUTINAS, M; USAKU, C; MANTALARIS, A. “Optimal bioprocess design through a gene regulatory network – Growth kinetic hybrid model: Towards replacing Monod kinetics”. *Revista Metabolic Engineering. Elsevier*. **48**, 129 – 137. ISSN 1096-7176, 2018.

11. ZAMBRANO, J.; CARLSSON, B.; DIEHL, S. “Optimal steady-state design of zone volumes of bioreactors with Monod growth kinetics”. *Biochemical Engineering Journal. Elsevier*. **100**, 59-66. 2015. ISSN 1369-703X

12. SIDHU, H.; NELSON, M. I.; BALAKRISHNAN, E. “An Analysis of a Standard Reactor Cascade and a Step-Feed Reactor Cascade for Biological Processes Described by Monod Kinetics”. *Chemical Product and Process Modeling*. 2014, **10** (1), 27–37. ISSN 1934-2659

13. JULIAN RICARDO, M. C. *et al.* “Simulación del proceso fermentativo de la cerveza Tímina de 10° con formulación 70/30”. *Revista Tecnología Química*. 2018, **38** (2), 353–368. ISSN 2224-6185.

14. SINGH, J.; KAUSHIK, S.; BISWAS, S. “Bioreactors–Technology & Design Analysis”. *The Scitech Journal*. 2014, **1**. 28–36. ISSN 2348-2311.

15. MUÑOZ EQUIHUA, E. S. *Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con células permeabilizadas de candida apícola*, Tesis de maestría, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco, México. 2016. Disponible en: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023 /384>

16. TORRES COLUNGA, K. I.; GONZÁLEZ PONCE, M. del R. "Diseño de un tanque agitado para la etapa de hidrólisis en la producción de miel de agave". *Revista Jóvenes Investigadores*. 2015 **1**, (3). 22-26. ISSN 2395-9797.
17. DORAN, P. M. *Bioprocess engineering principles*. 2^{da} ed. USA. Elsevier. 2013. ISBN 978-0-12-220851-5.
18. KARANTHAND. G; RAJ, E. *Fermentation Technology and Bioreactor Design*. 2da. edición. Food Science and Technology. New York. Marcel dekkar. 2006. ISBN 987-9381-16-5.
19. MADIGAN, T. M. *et al. Biology of microorganisms*. 2015. 14^{ta} edición. USA. Prentice Hall Hispanoamericana. ISBN 978-0-321-89739-8.
20. RAFFO DURÁN, J; FIGUEREDO CARDERO, A.; DUSTET MENDOZA, J. C. Características de la hidrodinámica de un biorreactor industrial tipo tanque agitado. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2014, **13**, (3), 824-839. ISSN 1665-2738.
21. SERRAT DIAZ, M.; MENDEZ HERNANDEZ, A. A. "Construcción y Validación Experimental de un Biorreactor Artesanal Tipo Tanque Agitado para Fermentaciones Sumergidas a Escala de Laboratorio". *Revista Tecnología Química [online]*. 2015, **35**, (3), 362-375. ISSN 2224-6185. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852015000300010 & lng=es&nrm=iso.