

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

Establecimiento y verificación del proceso de esterilización para el control y aseguramiento de la calidad biotecnológica de sistemas de biorreactores enchaquetados

Proyecto Final de Graduación sometido a consideración de la Escuela de Ingeniería Química como requisito final para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Química

Jéssica P. Montero Zamora

Sede Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica
2014

Establecimiento y verificación del proceso de esterilización para el control y aseguramiento de la calidad biotecnológica de sistemas de biorreactores enchaquetados

Proyecto Final de Graduación sometido a consideración de la Escuela de Ingeniería Química como requisito final para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química

Sustentante: Jéssica P. Montero Zamora

Aprobado por:



Ing. Esteban Durán Herrera, Ph.D.
Profesor
Escuela de Ingeniería Química, U.C.R.

Presidente del Tribunal



Ing. Carlos Cartín Caballero
Profesor
Escuela de Ingeniería Química, U.C.R.

Director del Proyecto



Ing. Manuel Molina Córdoba
Profesor asociado
Escuela de Ingeniería Química, U.C.R.

Lector del proyecto



Ing. Iray Mata Araya
Investigadora
Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas

Lectora del proyecto



Ing. Rodolfo Wattson G.
Profesor
Escuela de Ingeniería Química, U.C.R.

Miembro invitado

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
2014

“Cuando quieras emprender algo,
habrá mucha gente que te dirá que
no lo hagas, cuando vean que no te
pueden detener, te dirán cómo lo tienes
que hacer, y cuando finalmente vean
que lo has logrado, dirán que siempre
creyeron en ti.”

John C. Maxwell

A mis padres.
El título que lleve mi nombre en
realidad les pertenece a ellos.

Agradecimientos

La realización de un proyecto no sería posible sin el apoyo de aquellas personas que nos acompañan durante todo el camino, ya sea con el conocimiento profesional necesario o con las palabras de aliento justas en el momento indicado.

A Carlos Cartín Caballero, director del proyecto. Quien confío en esta idea desde el inicio, le agradezco su apoyo durante todo el proceso, en especial en aquellos momentos difíciles. Puedo afirmar que la educación superior necesita más profesores como él, dispuestos a trabajar de forma paralela con los estudiantes y corregirlos cuando sea necesario. A él, a quien ahora considero más que un profesor, un amigo; le deseo el mayor de los éxitos en sus estudios de postgrado.

A Manuel Molina Córdoba, lector del proyecto. Le agradezco haber aceptado ser parte del panel y toda la colaboración y aportes realizados, con su amplio conocimiento en el área de alimentos en conjunto con la ingeniería.

A Iray Mata Araya, lectora del proyecto. Realmente no tengo como agradecerle haberme aceptado en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas y poner en mis manos el desarrollo de este proyecto. Su gusto por el área de bioprocesos lo trasmite a todos aquellos que hemos tenido la oportunidad de trabajar con ella, y le agradezco todos los conocimientos que ha compartido conmigo hasta el momento.

Al Dr. Sergio Madrigal Carballo, director de CENIBiot y a Daniel Esquivel Alvarado, por hacer posible la realización del proyecto de graduación en este centro de investigación, único en el país. Además, de forma muy especial les agradezco permitirme participar en el 1^{er} Congreso de Biotecnología de América Central, Panamá y República Dominicana realizado en San Salvador, El Salvador a finales del año 2013, donde se expuso un avance de lo recopilado en este documento.

A Francisco Aguilar Cascante, coordinador del área de bioprocesos. Le agradezco sus sugerencias y estar siempre pendiente de estado del proyecto, así como el apoyo y comprensión brindados durante los meses en que terminaba el borrador y se realizaban las revisiones del caso.

A Jorge Araya Matthey, químico industrial. Quien me ayudó a procesar las muestras del medio de cultivo previo y posterior a la esterilización, en el analizador bioquímico ubicado en la Unidad de Bioprospección de CENIBiot.

A Roberto Avendaño Vega, biólogo con énfasis en biotecnología. Quien me ayudó a realizar las pruebas de biología molecular para la identificación del microorganismo, y del cual aprendí mucho en los días en que tuve la oportunidad de hacer pruebas en el área de Genómica de CENIBiot.

Extiendo mi agradecimiento a todas aquellas personas, quienes se tomaron uno o varios minutos de su tiempo para atender algunas de mis múltiples consultas. Puedo mencionar entre estas personas a Andrés Sánchez, Alexander Schmidt y Luis Alonso Porras, ingenieros en biotecnología.

A José Pablo Quirós con quien compartí laboratorio durante estos meses de realización del proyecto de graduación, le deseo lo mejor en su vida personal y laboral. A Cristina Mora, María José Fallas y Laura López, gracias por estar siempre pendientes y darme su apoyo desde el inicio hasta el día de defensa de tesis. A mis compañeros y compañeras de carrera, quienes han estado conmigo durante los años de estudio, porque sé que serán profesionales exitosos.

Al Fondo de Becas CONARE-CeNAT por financiar este proyecto, de forma particular a Gustavo Otárola, director administrativo y Mauricio Segura, contador de FUNCeNAT.

A esas personas que saben que el valor agregado del conocimiento es compartirlo.

Resumen

El objetivo de este proyecto es establecer y verificar el proceso de esterilización de biorreactores enchaquetados de vidrio de 7 y 15 litros, para implementarlo como un procedimiento de control y aseguramiento de la calidad biotecnológica del proceso de crecimiento microbiano. Para establecer el tiempo y la temperatura a la cual se debe realizar la esterilización se realizaron múltiples corridas experimentales con agua como volumen de trabajo. Se utilizó el *Bacillus stearothermophilus* como indicador biológico y se estableció el valor mínimo de letalidad (20min) que debía cumplir el proceso.

Se determinaron las siguientes combinaciones de parámetros para el biorreactor enchaquetado de 7L: 1,5 L, 125 °C, 60 min; 3,0 L, 127 °C, 60 min; 4,5 L, 127 °C, 60 min, y para el biorreactor de 15 L: 3,6 L; 125 °C, 75 min, 7,2 L; 127 °C, 75 min siendo la variables volumen de operación, temperatura y tiempo de esterilización, respectivamente. Para el volumen superior del biorreactor de 15 L (10,8 L) no se obtiene un valor de letalidad superior al valor mínimo, por lo que se recomienda esterilizar el biorreactor vacío y el medio de cultivo en botellas. Los valores de letalidad calculados son específicos para las condiciones experimentales de cada corrida.

La verificación de los parámetros de esterilización establecidos se realizó con un medio de cultivo complejo: melaza grado alimenticio. Cada una de las esterilizaciones en los tres volúmenes de operación se realizó por triplicado. Se calculó el valor de letalidad en cada una de las esterilizaciones y se realizaron controles microbiológicos. En todos los casos, incluso en aquellas esterilizaciones en las que no se supera el valor mínimo de letalidad, no se reporta crecimiento de hongos ni de bacterias luego del proceso de esterilización, por lo que el proceso se considera satisfactorio para aplicaciones biotecnológicas.

Se estudió el comportamiento de la concentración de sacarosa y dextrosa, previo y posterior al tratamiento térmico determinado, se encontró en todos los casos un aumento de

la concentración de dichos azúcares atribuido a la degradación de azúcares más complejos en estructuras más simples. Finalmente, con el uso de técnicas de biología molecular se realizó la identificación del principal contaminante bacteriano de la melaza utilizada y se identificó al *Bacillus cereus*. Su presencia respalda los resultados obtenidos en los conteos de unidades formadoras de colonias durante los controles microbiológicos.

Índice

Cita.....	iii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	v
Resumen.....	vii
Índice	ix
Índice de cuadros	xiii
Índice de figuras.....	xvi
Capítulo 1 Introducción	19
Capítulo 2 Procesos de fermentación.....	23
2.1. Aspectos generales de los procesos de fermentación.....	23
2.1.1. Esquema general de un proceso de fermentación industrial	24
2.2. Medios de fermentación	24
2.2.1. Melaza como medio de fermentación complejo.....	25
Capítulo 3 Principios de esterilización	27
3.1. Esterilización.....	27
3.2. Asepsia	28
3.3. Resistencia microbiana: aspectos generales.....	28
3.4. Métodos para lograr la esterilidad.....	30
3.4.1. Esterilización discontinua de medios líquidos	30
3.4.2. Esterilización continua de medios líquidos	33
3.5. Cinética de la desactivación térmica	34
3.5.1. Reducción decimal o valor D	35
3.5.2. Resistencia térmica constante o valor Z	37
3.5.3. Tiempo de muerte térmica o valor F	39
3.6. Relación entre la cinética de desactivación y los parámetros del procesamiento térmico.....	39
3.6.1. Concepto de letalidad	40
3.7. Aseguramiento de la esterilidad	40
3.9. Controles de esterilización	42
Capítulo 4 Tipos de esterilización e indicadores	43
4.1. Esterilización por métodos físicos	43
4.1.1. Vapor húmedo	43
4.1.2. Aire seco.....	45
4.1.3. Esterilización por radiación	45
4.2. Indicadores de esterilidad.....	46
4.2.1. Indicadores químicos.....	46
4.2.2. Indicadores físicos	47

4.2.3. Indicadores biológicos	47
Capítulo 5 Equipo para esterilización	49
5.1. Biorreactor	49
5.2. Autoclave	50
5.2.1. Principios de diseño de una autoclave	50
5.2.1.1. Desplazamiento por gravedad	51
5.2.2. Autoclave del tipo prevacío con puerta horizontal	51
5.3. Data Logger	54
5.4. Analizador bioquímico (YSI)	54
Capítulo 6 Principios de microbiología industrial	57
6.1. Introducción a la microbiología	57
6.2. Contaminantes comunes de los medios de cultivo	57
6.2.1. Hongos	58
6.2.2. Levaduras	58
6.2.3. Bacterias	59
6.3. Medios de cultivo	59
6.3.1. Papa Dextrosa Agar (PDA)	60
6.3.2. Tripticasa Soya Agar (TSA)	60
6.4. Pruebas a nivel industrial para identificar microorganismos contaminantes	61
6.4.1 Recuento total aerobio mesófilo	61
6.4.2. Rayado o estriado	61
Capítulo 7 Materiales, equipo y metodología experimental	63
7.1. Materiales	63
7.1.1. Indicador físico	63
7.1.2. Indicador físico químico	64
7.1.3. Indicadores biológicos	65
7.1.4. Melaza	65
7.1.5. Reactivos	66
7.2. Equipo experimental	67
7.3. Metodología Experimental: Determinación de los parámetros de esterilización	67
7.3.1. Primera Etapa Experimental	68
7.3.1.1. Objetivo experimental	68
7.3.1.2. Variables de la primera etapa experimental	68
7.3.1.3. Metodología experimental de la determinación de los parámetros de esterilización, primera fase experimental	69
7.3.2. Segunda Etapa Experimental	71
7.3.2.1 Objetivo experimental	71
7.3.2.2. Trabajo previo a la segunda etapa experimental	71
7.3.2.3. Variables de la segunda etapa experimental	74

7.3.2.4. Metodología experimental en la comprobación de los parámetros de esterilización de la segunda fase experimental	75
7.3.3. Tercera Etapa Experimental	75
7.3.3.1 Objetivo experimental.....	75
7.3.3.2. Variables de la tercera etapa experimental	76
7.3.3.3. Metodología experimental de la determinación de las concentraciones de azúcares reductores cuarta fase.....	76
7.4. Métodos de análisis.....	77
7.4.1. Determinación de resultado positivo para esterilización con indicadores físicos y físico químicos.....	77
7.4.2. Determinación del crecimiento microbiano de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	78
7.4.3. Determinación de la letalidad del proceso de esterilización.....	78
7.4.4. Determinación de curvas de esterilización	78
7.4.5. Caracterización de la melaza	78
7.4.6. Determinación del crecimiento microbiano en la melaza	79
Capítulo 8 Análisis de resultados.....	81
8.1. Valor de letalidad establecido como aceptable	81
8.2. Valores de los parámetros para la esterilización de biorreactores de 7,0 L.	82
8.3. Valores de los parámetros para la esterilización de biorreactores de 15,0 L.	92
8.4. Verificación de los parámetros determinados para biorreactor de 7,0 L utilizando un medio de cultivo complejo	97
8.4.1. Cuantificación de azúcares fermentables y el estudio de la degradación del medio de cultivo.....	105
8.4.2. Identificación del microorganismo contaminante en la melaza grado alimenticio utilizando técnicas de biología molecular	106
Capítulo 9 Conclusiones y recomendaciones	109
9.1. Conclusiones	109
9.2. Recomendaciones.....	110
Capítulo 10 Nomenclatura.....	113
Capítulo 11 Bibliografía	115
APÉNDICES	118
Muestra de cálculos.....	181
B.1 Cálculo del tiempo de muerte requerido para lograr un SAL de 10^{-6}	181
B.2 Cálculo del valor de letalidad para cada combinación de tiempo y temperatura	181
B.3 Cálculo del área bajo la curva temperatura-tiempo	182
B.4 Cálculo del factor F o tiempo de muerte a partir de los datos de temperatura-tiempo de cada corrida.....	182
B.5 Cálculo de las UFC en la muestra inicial y final de melaza	182
Procedimiento experimental.....	184

C.1 Preparación del biorreactor para llevar a esterilizar	184
C.2 Preparación de placas Petri con agar papa dextrosa (PDA) y agar tripticasa soya (TSA).....	185
C.3 Preparación del agua peptonada tamponada	185
C.4 Activación de las bacterias y hongos presentes en la melaza grado alimenticio .	185
C.5 Dilución seriada de las muestras de melaza, previo y post esterilización	186
C.6 Recuento total por esparcimiento en placa Petri con PDA y TSA	186
C.7 Incubación.....	186
C.8 Conteo	187
C.9 Cuantificación de azúcares (g/L) en el analizador bioquímico.....	187
C.10 Tinción diferencial: tinción de Gram.....	188
C.11 Tinción de estructuras o materiales de reserva: tinción de esporas	188
ANEXOS	189
Anexo 1. Resumen de los resultados obtenidos en cada una de la esterilizaciones realizadas en las fases experimentales 1 y 2	190
Anexo 2. Contribuciones porcentuales de cada una de las etapas de esterilización a la duración total del proceso, en función del aumento y disminución de temperatura en el interior del biorreactor.....	191

Índice de cuadros

Cuadro 2.1	Composición de carbohidratos de la melaza de caña	26
Cuadro 3.1	Clasificación general de los microorganismos según su resistencia	29
Cuadro 3.2	Ecuaciones generales para temperatura en función del tiempo para el calentamiento y enfriamiento de una esterilización discontinua.....	33
Cuadro 3.3	Valores de Z y D para algunos microorganismos.....	38
Cuadro 4.1	Relación tiempo-temperatura en procesos de esterilización térmica.....	44
Cuadro 5.1	Dimensiones y especificaciones de la autoclave utilizada durante la esterilización de los biorreactores de 7 L y 15 L.....	53
Cuadro 7.1	Ficha técnica del indicador biológico Attest TM Indicador Biológico de lectura rápida 1292	65
Cuadro 7.2	Composición en 500 g de la melaza utilizada para el estudio de la esterilización de un medio de cultivo complejo	66
Cuadro 7.3	Especificaciones de los reactivos utilizados en la determinación de la carga microbiana previa y post esterilización.	66
Cuadro 7.4	Composición general del agar papa dextrosa (39 g/L) con un pH de $5,6 \pm 0,2$	67
Cuadro 7.5	Composición general del agar tripticasa soya (40 g/L) con un pH de $7,3 \pm 0,2$	67
Cuadro 7.6	Composición general del agua peptonada tamponada (25,5 g/L) con un pH de $7,2 \pm 0,2$	67
Cuadro 7.7	Especificaciones de los equipos utilizados en la determinación de los parámetros de esterilización de biorreactores enchaquetados	68
Cuadro 7.8	Variables experimentales para la determinación de los valores de temperatura y tiempo de operación del autoclave para el biorreactor de 7 L.....	70
Cuadro 7.9	Variables experimentales para la determinación de los valores de temperatura y tiempo de operación del autoclave para el biorreactor de 7 L.....	71
Cuadro 7.10	Variables experimentales para la verificación de los valores de los parámetros de esterilización para el biorreactor de 7 L.....	75
Cuadro 7.11	Variables experimentales para la verificación de los valores de los parámetros de esterilización para el biorreactor de 7 L.....	77
Cuadro 8.1	Resultados los indicadores físico-químico, físico y biológico y valor calculado de letalidad en las esterilizaciones realizadas con el biorreactor de 7,0 L.	82
Cuadro 8.2	Resumen de resultados de los indicadores físico-químico, físico y biológico y valor calculado de letalidad en las esterilizaciones realizadas con el biorreactor de 7,0 L.	91
Cuadro 8.3	Resultados de los indicadores: físico químico, físico y biológico y valor calculado de letalidad en las distintas esterilizaciones realizadas con el biorreactor de 15,0 L.	92

Cuadro 8.4	Resumen de resultados de los indicadores fisico-químico, físico y biológico y valor calculado de letalidad en las esterilizaciones realizadas con el biorreactor de 15,0 L.	97
Cuadro 8.5	Resultados obtenidos en las distintas corridas realizadas con el biorreactor de 7,0 con melaza como medio de cultivo, para un tiempo de esterilización de 60 min.	98
Cuadro 8.6	Resultados de concentración de azúcares fermentables presentes en las muestras de melaza para cada esterilización con el biorreactor de 7,0, con un tiempo de esterilización de 60 min.	106
Cuadro 8.7	Características de los <i>Bacillus</i> para identificación final, a partir de la información obtenida en la secuencia del microorganismo.	107
Cuadro A. 1	Resultados para la corrida 1 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 127 °C durante 75 min.	119
Cuadro A.2	Resultados para la corrida 2 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 125 °C durante 75 min.	122
Cuadro A.3	Resultados para la corrida 3 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 125 °C durante 60 min.	129
Cuadro A.4	Resultados para la corrida 4 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 127 °C durante 60 min.	131
Cuadro A.5	Resultados para la corrida 5 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 1,5 L a 125 °C durante 60 min.	133
Cuadro A.6	Resultados para la corrida 6 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 125 °C durante 60 min.	136
Cuadro A.7	Resultados para la corrida 7 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 127 °C durante 60 min.	139
Cuadro A.8	Resultados para la corrida 8 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 125 °C durante 65 min.	141
Cuadro A.9	Datos experimentales para la corrida 9 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 125 °C durante 75 min.	144
Cuadro A.10	Resultados para la corrida 10 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 125 °C durante 60 min.	146
Cuadro A.11	Resultados para la corrida 11 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 127 °C durante 60 min.	149
Cuadro A.12	Resultados para la corrida 12 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 125 °C durante 75 min.	151
Cuadro A.13	Resultados para la corrida 13 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 127 °C durante 75 min.	154
Cuadro A.14	Resultados para la corrida 14 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 7,2 L a 127 °C durante 60 min.	157

Cuadro A.15 Resultados para la corrida 15 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 7,2 L a 125 °C durante 75 min	160
Cuadro A.16 Resultados para la corrida 16 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 7,2 L a 127 °C durante 75 min	162
Cuadro A.17 Resultados para la corrida 17 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 10,8 L a 127 °C durante 60 min	165
Cuadro A.18 Resultados para la corrida 18 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 10,8 L a 127 °C durante 75 min	167
Cuadro A.19 Resultados para la corrida 2 con el biorreactor de 7 L, volumen de melaza 1,5 L a 125 °C durante 60 min	170
Cuadro A.20 Resultados para la corrida 6 con el biorreactor de 7 L, volumen de melaza 3,0 L a 127 °C durante 60 min	173
Cuadro A.21 Resultados para la corrida 7 con el biorreactor de 7 L, volumen de melaza 4,5 L a 127 °C durante 60 min	176
CuadroA.22 Conteos y resultados del cálculo de unidades formadoras de colonias bacterianas en la muestra inicial y final de cada esterilización utilizando melaza como medio de cultivo en el biorreactor de 7,0 L.....	170
CuadroA.23 Conteos y resultados del cálculo de unidades formadoras de colonias de hongos en la muestra inicial y final de cada esterilización utilizando melaza como medio de cultivo en el biorreactor de 7,0 L.....	170
CuadroA.24 Resultados de concentración de azúcares fermentables presentes en las muestras de melaza para cada esterilización con el biorreactor de 7,0, con un tiempo de esterilización de 60 min.....	171

Índice de figuras

Figura 3.1	Variación de la temperatura con el tiempo para el caso de esterilización discontinua de un medio líquido.....	31
Figura 3.2	Perfiles de temperatura contra tiempo para los períodos de calentamiento y enfriamiento en un ciclo de esterilización discontinua.....	32
Figura 3.3	Variación de temperatura contra tiempo en esterilizadores continuos.....	34
Figura 3.4	Comportamiento típico de una población microbiana contra el tiempo	35
Figura 3.5	Gráfica semilogarítmica de una población microbiana contra el tiempo	36
Figura 3.6	Gráfica semilogarítmica de población microbiana contra el tiempo a distintas temperaturas.....	36
Figura 3.7	Grafica semilogarítmica del tiempo de reducción decimal contra temperatura, representación gráfica del valor Z	38
Figura 4.1	Indicador fisico-químico para los procesos de esterilización con vapor (3M). 47	
Figura 4.2	Monitores físicos: antes (arriba) y después (abajo) de la esterilización a 121 °C	47
Figura 4.3	Indicador biológico de lectura rápida marca 3M.....	48
Figura 5.1	Biorreactor de 15 litros y equipo de control automático	49
Figura 5.2	Ejemplos de autoclaves: a. Horizontal b. Horizontal de mesa	52
Figura 6.1	Morfología de los hongos. 1. Levaduras	58
Figura 6.2	Técnica para el rayado de una placa Petri en tres zonas	62
Figura 7.1	Indicador físico marca DIACK a la izquierda sin derretir y a la derecha derretido después de un proceso de esterilización.....	63
Figura 7.2	Indicadores físicos químicos marca 3M a la izquierda un resultado negativo para esterilización en el interior del biorreactor, a la derecha un resultado positivo para esterilización en el exterior del biorreactor.....	64
Figura 7.3	Indicadores biológicos marca 3M. a. Antes de la esterilización b. Después de la esterilización y con 48 h de incubación (a la derecha el control negativo para esterilización).....	65
Figura 8.1	Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 7,0 L con un volumen de medio de 1,5 L, un tiempo de esterilización de 60 min y temperatura de esterilización igual a 125 °C	84
Figura 8.2	Comportamiento de la letalidad y la temperatura en función del tiempo, desde que la autoclave comienza el proceso de esterilización y hasta que se alcanza la máxima temperatura en el interior del biorreactor para la corrida experimental 5	85
Figura 8.3	Biorreactores utilizados para el desarrollo del presente proyecto a. 7,0 L b. 15,0 L.....	86
Figura 8.4	Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 7,0 L con un..	88

Figura 8.5 Comportamiento de la letalidad y la temperatura en función del tiempo, desde que la autoclave comienza el proceso de esterilización y hasta que se alcanza la máxima temperatura en el interior del biorreactor para la corrida experimental 4	89
Figura 8.6 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 7,0 L con un volumen de medio de 4,5 L, un tiempo de esterilización de 60 min temperatura	90
Figura 8.7 Comportamiento de la letalidad y la temperatura en función del tiempo, desde que la autoclave comienza el proceso de esterilización y hasta que se alcanza la máxima temperatura en el interior del biorreactor para la corrida experimental 7	91
Figura 8.8 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 15,0 L con un volumen de medio de 3,6 L, un tiempo de esterilización de 75 min y temperatura	94
Figura 8.9 Comportamiento de la letalidad y la temperatura en función del tiempo, desde que la autoclave comienza el proceso de esterilización y hasta que se alcanza la máxima temperatura en el interior del biorreactor para la corrida experimental 12	94
Figura 8.10 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 15,0 L con un volumen de medio de 7,2 L, un tiempo de esterilización de 75 min y temperatura igual a 127 °C	95
Figura 8.11 Comportamiento de la letalidad y la temperatura en función del tiempo, desde que la autoclave comienza el proceso de esterilización y hasta que se alcanza la máxima temperatura en el interior del biorreactor para la corrida experimental 16	96
Figura 8.12 Placas de agar tripticasa soya utilizadas en el conteo de bacterias presentes en la melaza a. dilución 10^{-6} de melaza inicial b. muestra original de melaza final	100
Figura 8.13 Preparación del medio de cultivo para su posterior esterilización a. disoluciones de melaza con una concentración de 30 g por litro de agua peptonada b. crecimiento de melaza en el agitador con control de temperatura.	101
Figura 8.14 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 7,0 L con un volumen de melaza de 1,5 L, un tiempo de esterilización de 60 min y temperatura	102
Figura 8.15 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 7,0 L con un volumen de melaza de 3,0 L, un tiempo de esterilización de 60 min y temperatura	102

Figura 8.16	Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 7,0 L con un volumen de melaza de 4,5 L, un tiempo de esterilización de 60 min y temperatura	103
Figura 8.17	Combinaciones entre los distintos valores de masa de melaza utilizada para determinar diferencias de las medias de las unidades formadoras de colonias linealizadas	104
Figura 8.18	Gráficas de residuos para el valor linealizado de las UFC para el estudio del cumplimiento de los supuestos del modelo.	105
Figura 8.19	Tinciones realizadas al frotis del <i>Bacillus</i> en estudio a. Tinción con azul de coomassie, en azul se observa la cadena correspondiente al microorganismo y en el contraste las esporas b. Tinción con cristal violeta, las bacterias con coloración	108
Figura 8.20	Prueba de movilidad realizada en placas de tripticasa soya, a la izquierda un microorganismo de referencia no móvil (<i>Bacillus aureus</i>) y	108

Capítulo 1 Introducción

Los avances recientes en biología molecular y genética han orientado el interés mundial hacia la biotecnología. Dichos descubrimientos se traducen en nuevos productos y servicios que atraen no solamente a la comunidad científica, sino también al sector industrial (Doran, 1998).

El área de bioprocesos, debido a los conocimientos de ingeniería requeridos, ha sido asociada como competencia directa de los ingenieros químicos (Doran, 1998). Sin embargo, cada vez se torna más interdisciplinaria involucrando profesionales en biotecnología, química, microbiología entre otras carreras, que si bien son distintas en esencia, pueden combinarse para desarrollar importantes proyectos.

El bioprocesado es una parte esencial de la producción de muchos alimentos, químicos y fármacos a nivel industrial. Las operaciones de bioprocesos hacen uso de células microbianas, animales o vegetales y componentes de las células como enzimas, utilizadas para la manufactura de nuevos productos y la destrucción o mitigación de los desechos generados por los seres humanos (Doran, 1998).

Independiente del tipo de producto a desarrollar, existen operaciones y cuidados comunes que se deben seguir en el área de bioprocesos. Entre esos cuidados se encuentra la limpieza y esterilización, con el fin de evitar la contaminación con agentes externos, que disminuyan o impidan la obtención del producto de interés.

De acuerdo al preámbulo anterior, se destaca la importancia de establecer procedimientos adecuados para la esterilización de los equipos utilizados, el presente estudio se enfoca en los biorreactores. Tal como se menciona en el Capítulo 3, muchas veces el éxito de una operación no depende solamente del método utilizado sino de la eliminación efectiva de biocontaminantes, con el fin de evitar un posterior rechazo del lote (Liu, 2013)

En el pasado, las formas de manejar los problemas de esterilización eran totalmente empíricas o con teorías que dependían de una serie de supuestos asociados a la forma de la curva temperatura-tiempo de esterilización (Deindoerfer & Humphrey, 1959). Gran parte de los conceptos que se exponen en el presente trabajo se comenzaron a desarrollar en el área de alimentos, debido a la importancia de asegurar condiciones de esterilidad en el proceso de enlatado.

El proyecto: *“Establecimiento y verificación del proceso de esterilización para el control y aseguramiento de la calidad biotecnológica de sistemas de biorreactores enchaquetados”* surge ante la necesidad presentada por investigadores del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) de conocer los factores que influyen en el proceso de esterilización de sus sistemas de fermentación enchaquetados.

El tema en estudio se relaciona específicamente con el área de procesos fermentativos, bioprocesos en general y de aplicación industrial, se busca analizar los patrones de intercambio calórico entre los sistemas de esterilización y los sistemas de fermentación; además de observar el efecto de la temperatura y el tiempo de esterilización en la composición del medio de cultivo.

Se establecerá un procedimiento operativo de control y aseguramiento de la calidad microbiológica, que ayudará a validar el proceso dejando atrás el uso de valores empíricos. Si los valores de temperatura tiempo que se eligen para esterilizar un biorreactor son muy elevados se puede degradar el medio de cultivo, y ya no sería viable para el crecimiento microbiano de la cepa de interés. Por otro lado, si los parámetros son muy bajos pueden quedar otras cepas que van a interferir en los resultados finales.

Entre las ventajas que ofrece el uso de parámetros debidamente validados se encuentran: disminución en los costos de operación debido al consumo energético, un menor tiempo de ejecución de las investigaciones, menor consumo de reactivos para la preparación de

nuevos medios de cultivo y un alto nivel de aseguramiento de la calidad. Lo anterior, es muy importante ya que ofrece seguridad a quien contrata los servicios de CENIBiot, en cuanto a la calidad de la investigación realizada y permite que el escalamiento del proceso para llevarlo a niveles industriales sea confiable.

Capítulo 2 Procesos de fermentación

Con el fin de poner en contexto el tema de esterilización y su utilidad en el área de bioprocesos se incluye el presente capítulo con información general de los procesos de fermentación.

2.1. Aspectos generales de los procesos de fermentación

Un proceso de fermentación es un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador, o de forma general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. Los microorganismos van aumentando su concentración durante el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2003).

En el pasado se le llamaba proceso de fermentación únicamente a los procesos anaerobios, actualmente el término se ha ampliado a procesos aerobios. El bioprocesamiento suele ser aséptico (libre de organismos no deseados), en recipientes mantenidos bajo presión positiva de aire estéril para evitar la entrada de microorganismos contaminantes (Bungay, Humphrey, & Tsao, 1999).

Existen factores internos y externos que afectan el comportamiento de un microorganismo en crecimiento. Los factores internos están representados por la dotación genética del organismo considerado y por sus mecanismos de regulación metabólica. Los factores externos de naturaleza física están vinculados con las condiciones de operación que se utilizan en los reactores y son por ejemplo: la temperatura, la agitación, aireación, entre otros. Es decir, las variables de manipulación física que se fijan o se programan en el curso del proceso de producción.

Modificar algunos de los factores físicos por ejemplo la temperatura, tiene un efecto notable sobre el proceso. Si el valor de temperatura seleccionado no es el adecuado se puede disminuir o aún impedir la formación de un metabolito determinado (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2003).

2.1.1. Esquema general de un proceso de fermentación industrial

Existen 4 etapas diferentes a saber según Ertola, Yantorno, & Mignone:

1. Propagación de cultivos: se realiza en el laboratorio con tubos de ensayo que contienen la cepa de interés.
2. Fermentación: el material microbiológico será la semilla inicial que se siembra en el tanque del biorreactor, posteriormente este inóculo crecido pasa al fermentador industrial.
3. Operaciones de separación y purificación de los productos: estas etapas comprenden en forma general y sucesiva
 - 3.1. Separación de insolubles por filtración, centrifugación o decantación.
 - 3.2. Separaciones primarias por extracción, absorción, adsorción o ultrafiltración.
 - 3.3. Purificación por extracción líquido-líquido o extracción a dos fases acuosas o cromatografía
 - 3.4. Aislamiento del producto.
4. Tratamiento de efluentes: aunque no tiene directa relación con el producto es necesario para controlar la calidad del efluente de la fábrica hacia al ambiente.

2.2. Medios de fermentación

La preparación de medios para el desarrollo de procesos de fermentación es una etapa fundamental, para asegurar la productividad de los mismos. Los medios pueden clasificarse según la naturaleza química de los componentes en: sintéticos o químicamente definidos y complejos. En estos últimos intervienen sustancias de origen animal o vegetal, que aportan

las sustancias elementales, pero son químicamente indefinidas y de composición variable (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2003).

En la industria de fermentación generalmente se utilizan medios complejos, entre los aspectos a considerar están: el costo, la disponibilidad y la estabilidad en su composición química. Los componentes del medio de cultivo fundamentales para los mecanismos bioquímicos son las fuentes de carbono y nitrógeno. Las fuentes de carbono pueden ser hidratos de carbono como glucosa o dextrosa, sacarosa, lactosa, almidón, dextrina; alcoholes como glicerol y manitol e hidrocarburos como hexadecano, octadecano y otros. Adicionalmente, existen otras fuentes de éstos que provienen de subproductos o efluentes agroindustriales que se consideran complejos como son: granos, melazas, celulosas, suero de queso, entre otros. Las fuentes de nitrógeno de naturaleza inorgánica más comunes son el amoníaco o las sales de amonio. Las de origen orgánico puede provenir de hidrolizados de proteínas (peptonas) obtenidas por hidrólisis ácida o enzimática de distintas fuentes proteicas; extracto de carne, levadura, malta y licor de maíz (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2003).

2.2.1. Melaza como medio de fermentación complejo

La melaza se conoce también como jarabe de purga o jarabe incristalizado, es un líquido muy denso y viscoso que se separa de la masa cocida residual del procesamiento de la caña en ingenio y del cual no se puede cristalizar más azúcar (Ramírez, 1986). La melaza sin diluir se sitúa, generalmente, entre 80 y 90 grados Brix (masa total de sacarosa entre masa total del líquido). Por otro lado la melaza integral o sin clarificar, se prepara mediante la inversión parcial del jugo de caña de azúcar, esto para evitar la cristalización de sacarosa, y se concentra hasta 80 u 85 grados Brix (Zuñiga, 2010). En el Cuadro 2.1, se presentan valores típicos del contenido de carbohidratos en una muestra de melaza de caña con un 20% de agua.

Cuadro 2.1 Composición de carbohidratos de la melaza de caña

Materia prima	Carbohidratos %		Tipo de carbohidrato
	Al natural	Base seca	
Melaza de caña	62	77,5	Sacarosa, rafinosa, glucosa, fructosa

Fuente: (Zuñiga, 2010)

Capítulo 3 Principios de esterilización

Para comprender la relevancia de los parámetros tiempo y temperatura en el establecimiento del proceso de esterilización, es necesario estudiar los conceptos básicos asociados a la esterilidad y la resistencia térmica presentada por los microorganismos.

3.1. Esterilización

A continuación, se incluyen varias definiciones dadas por diferentes autores acerca del término esterilización.

De acuerdo a Ertola, Yantorno, & Mignone (2003) esterilización significa la eliminación de toda forma de vida de un medio o material, lo que se lleva a cabo generalmente por medios físicos por ejemplo filtración, o por muerte de los organismos por transferencia de calor, productos químicos u otra vía.

Para Liu (2013), la esterilidad es un concepto absoluto, se dice que un sistema nunca es parcialmente estéril. Los estándares actuales sostienen que el proceso de esterilización es especial, en la medida en que su eficacia no puede verificarse mediante la simple inspección y evaluación del producto final. Es por esto que los procesos de esterilización deben validarse antes de ser utilizados (Garfinkle & Henley, 2003).

Se dice también que la finalidad de un proceso de esterilización consiste en destruir microorganismos presentes en un objeto o en una preparación, asegurarse de que este propósito ha sido cumplido con alto nivel de probabilidad y se encuentra libre de riesgos de infección. El objetivo aceptado para un proceso de esterilización consiste en que la probabilidad de hallar una unidad no estéril sea de menos de una en un millón (Garfinkle & Henley, 2003; Sharma, Mulvaney, & Rizvi, 2003).

De manera práctica, la esterilidad significa la ausencia de cualquier organismo viable detectable. Consiste en un proceso que requiere validación, de forma que se pueda asegurar no solo la calidad del producto final sino también dar garantía de que no hay contaminación cruzada de microorganismo en cada una de las etapas de producción. No considerar los posibles focos de contaminación puede tener altos costos, debido a que los organismos no deseados pueden causar la pérdida de sustrato e incurrir en la inhibición del microorganismos de interés.

En la mayoría de los bioprocesos, la eliminación de biocontaminantes es esencial para el éxito de la operación debido a que la presencia de organismos no deseados es a menudo la base para el rechazo del producto final (Liu, 2013). Los biocontaminantes puede ser bacterias, hongos, levaduras, virus, entre otros.

3.2. Asepsia

La asepsia es la eliminación de microorganismos y es un procedimiento de rutina aplicado en muchas industrias microbiológicas, farmacéuticas y alimentarias. La asepsia requiere que quien trabaja en dicho proceso cumpla con ciertas medidas necesarias como el uso de gabacha, mascarilla, guantes y ropa de protección, para evitar que haya una transferencia de organismos de la persona al producto. Es importante tener claro que el mantenimiento de la asepsia no anula el proceso de esterilización, pero ayuda a reducir la carga de los microorganismos y por tanto disminuye la rigurosidad de las medidas de esterilidad empleadas (Okafor, 2007).

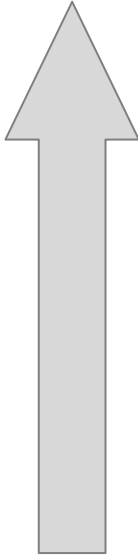
3.3. Resistencia microbiana: aspectos generales

Según el tipo de microorganismo y su resistencia, varía la respuesta que éstos tendrán ante los desinfectantes, antisépticos y esterilizantes. Las esporas bacterianas son generalmente consideradas como las estructuras que presentan mayor resistencia, se producen cuando el microorganismos se encuentra en condiciones de estrés como falta de nutrientes o cambios

drásticos en condiciones ambientales. Otras bioestructuras que también han mostrado una marcada resistencia a procesos químicos y físicos son los priones, que son agentes infecciosos (McDonnell, 2007). Sin embargo, debido a la naturaleza de éstos últimos no se les considera relevantes en el área de bioprocesos, por lo que para efectos prácticos las esporas bacterianas son los organismos con mayor resistencia.

En el Cuadro 3.1 se muestra la clasificación de microorganismos según su resistencia, dicha clasificación es solo una guía y puede variar dependiendo del agente utilizado para desinfectar o esterilizar, según sea el caso. Además, se debe considerar que la resistencia está ligada al contacto directo con el biocida, lo que afecta otras variables como:

Cuadro 3.1 Clasificación general de los microorganismos según su resistencia

Microorganismos	
	Priones
	Esporas bacterianas
	Ooquiste de protozoario
	Huevos de helmintos
	Micobacteria
	Pequeños virus no encapsulados
	Quiste de protozoario
	Esporas fúngicas
	Bacteria Gram Negativas
	Hongos y algas vegetativos
	Hongos y algas vegetativos
	Helmintos vegetativos y protozoarios
	Grandes virus no encapsulados
	Bacteria Gram Positivas
	Virus encapsulados

Fuente: (McDonnell, 2007)

- La cepa microbiana y las condiciones de cultivo para el crecimiento
- La fase de crecimiento del cultivo microbiano
- La superficie de contacto asociada y el medio de cultivo

3.4. Métodos para lograr la esterilidad

Los métodos para lograr la esterilidad pueden ser de tres tipos: por eliminación con medios físicos, por destrucción total y por muerte o inactivación de microorganismos.

La destrucción total es un proceso violento que casi siempre implica calentamiento apreciable del material, como ocurre con la aplicación de una llama. La muerte o inactivación significa la eliminación de microorganismos sin que exista necesariamente desintegración de las células. Se puede efectuar por métodos físicos como calentamiento, seco o húmedo y por radiaciones o con el uso de agentes químicos.

La esterilización térmica es una de las formas más efectivas para destruir los microorganismos no deseados, por ejemplo en la industria alimenticia se utilizan esterilizadores, es decir unidades en las que la materia prima es sometida a altas temperaturas y se mantiene en estas condiciones por un tiempo suficiente, de manera que se asegure la esterilidad comercial (Ghani & Farid, 2006). Los métodos de esterilización se exponen de forma más amplia en el Capítulo 4.

3.4.1. Esterilización discontinua de medios líquidos

En este tipo de esterilización el medio líquido se esteriliza usualmente en el interior del biorreactor, donde se realizará la operación en discontinuo. El líquido se calienta hasta la temperatura de esterilización ya sea introduciendo vapor directamente en el reactor o calentando el recipiente por medio de energía eléctrica. Si se elige la inyección de vapor, éste debe tener una calidad suficientemente alta para evitar la contaminación del medio con iones metálicos u orgánicos. Además se debe considerar la posible dilución debido a la

condensación, esto puede representar entre un 10-20% del volumen del líquido (Doran, 1998).

El aumento de temperatura en el medio de cultivo depende de la velocidad de transmisión de calor desde el vapor o el elemento eléctrico. Al alcanzar la temperatura de esterilización, ésta se mantiene por un periodo de tiempo constante llamado t_{hd} por su nombre en inglés 'holding time temperature'. En la Figura 3.1 se muestra el perfil térmico para el caso de esterilización discontinua.

Para asegurar una adecuada esterilización en estos sistemas, se debe poder calcular el tiempo que es necesario mantener el reactor a temperatura constante para alcanzar el nivel de destrucción celular deseado. Un aspecto importante, es que la atención no se debe centrar únicamente en el tiempo en que el biorreactor se mantiene a temperatura constante, ya que la muerte celular ocurre durante la totalidad del proceso, es decir, esto incluye los períodos de calentamiento y enfriamiento. El t_{hd} puede minimizarse si se consideran numéricamente las contribuciones del aumento y la disminución progresiva de temperatura (Doran, 1998).

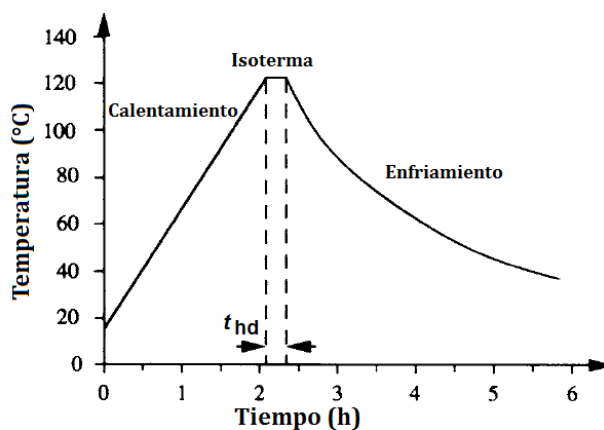


Figura 3.1 Variación de la temperatura con el tiempo para el caso de esterilización discontinua de un medio líquido

Fuente: (Doran, 1998)

Debido a lo anterior, se han realizado estudios para obtener los perfiles que describen el comportamiento de la temperatura con respecto al tiempo. En la Figura 3.2 se muestran

dichos perfiles para esterilizaciones en estado no estacionario, por medio de las ecuaciones del Cuadro 3.2 se puede estimar la temperatura durante los períodos de calentamiento y enfriamiento a partir de las propiedades de transmisión de calor del sistema.

Las ecuaciones mostradas en el Cuadro 3.2 se aplican cuando la temperatura es uniforme en todo el reactor. Sin embargo, si el líquido contiene contaminantes en forma de ‘pellets’ los gradientes de temperatura cobran importancia y alteran las deducciones expuestas hasta el momento. Dado que la transmisión de calor es menor en los sólidos es de esperar que en algún punto el líquido y el interior del sólido, no presenten la misma temperatura.

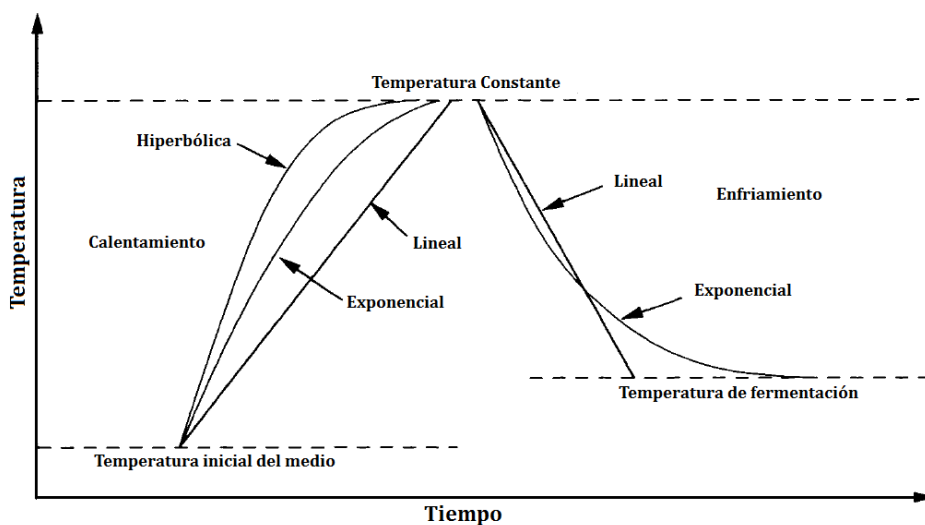


Figura 3.2 Perfiles de temperatura contra tiempo para los períodos de calentamiento y enfriamiento en un ciclo de esterilización discontinua
Fuente: (Doran, 1998)

La muerte celular puede ser mínima por debajo de 100 °C, sin embargo cuando los procesos de aumento y descenso de la temperatura son relativamente lentos, las temperaturas permanecen cercanas a la máxima por un período prolongado y es así como el número de células se ve reducido de manera significativa fuera de la fase isotérmica (ver Figura 3.2). Por lo general, el t_{hd} representa solo unos minutos mientras que el enfriamiento y calentamiento pueden requerir horas (Doran, 1998).

Cuadro 3.2 Ecuaciones generales para temperatura en función del tiempo para el calentamiento y enfriamiento de una esterilización discontinua

Método de transmisión de calor	Perfil de temperatura-tiempo
Calentamiento	
Inyección directa de vapor	$T = T_D \left(1 + \frac{\frac{h\widehat{M}_g t}{M_m C_p T_0}}{1 + \frac{\widehat{M}_g t}{M_m}} \right)$
Calentamiento eléctrico	$T = T_0 \left(1 + \frac{\widehat{Q}_t}{M_m C_p T_0} \right)$
Transmisión de calor desde vapor isotérmico	$T = T_s \left(1 + \frac{T_0 - T_s}{T_s} e^{\left(\frac{-UA}{M_m C_p} \right)} \right)$
Enfriamiento	
Transmisión de calor desde agua de refrigeración no isoterma	$T = T_{ci} \left(1 + \frac{T_0 - T_{ci}}{T_{ci}} e^{\left[\left(\frac{-\widehat{M}_w C_{pw} t}{M_m C_p} \right) \left(1 - e^{\left[\frac{-UA}{\widehat{M}_w C_{pw}} \right]} \right) \right]} \right)$

Fuente: (Deindoerfer & Humphrey, 1959)

3.4.2. Esterilización continua de medios líquidos

Este tipo de esterilización se caracteriza por la exposición del elemento a esterilizar a una elevada temperatura durante un tiempo corto, HTST por su nombre en inglés ‘High Temperature Short Time’, lo que logra una alta destrucción de contaminantes y una disminución en el daño producido a los ingredientes del medio (Doran, 1998).

Si se le compara con la operación discontinua, representa un ahorro del 20-25% en vapor además la duración total del proceso es menor debido a que el aumento y disminución de la temperatura se dan casi de forma instantánea.

En la Figura 3.3 se muestran los perfiles típicos de temperatura contra tiempo durante una esterilización continua, este comportamiento se logra al precalentar el medio de cultivo y hacerlo pasar por un intercambiador de calor, al inyectar directamente vapor se favorece un ahorro energético y del tiempo de enfriamiento del medio estéril.

El tiempo de exposición al agente esterilizante, depende de la longitud de la tubería en la sección isoterma del equipo. Luego el medio es enfriado, al hacerlo pasar por una válvula de expansión a una cámara de vacío. Finalmente, en un intercambiador de calor se sustrae el calor residual que a su vez es utilizado para calentar el medio que entra al proceso (Doran, 1998).

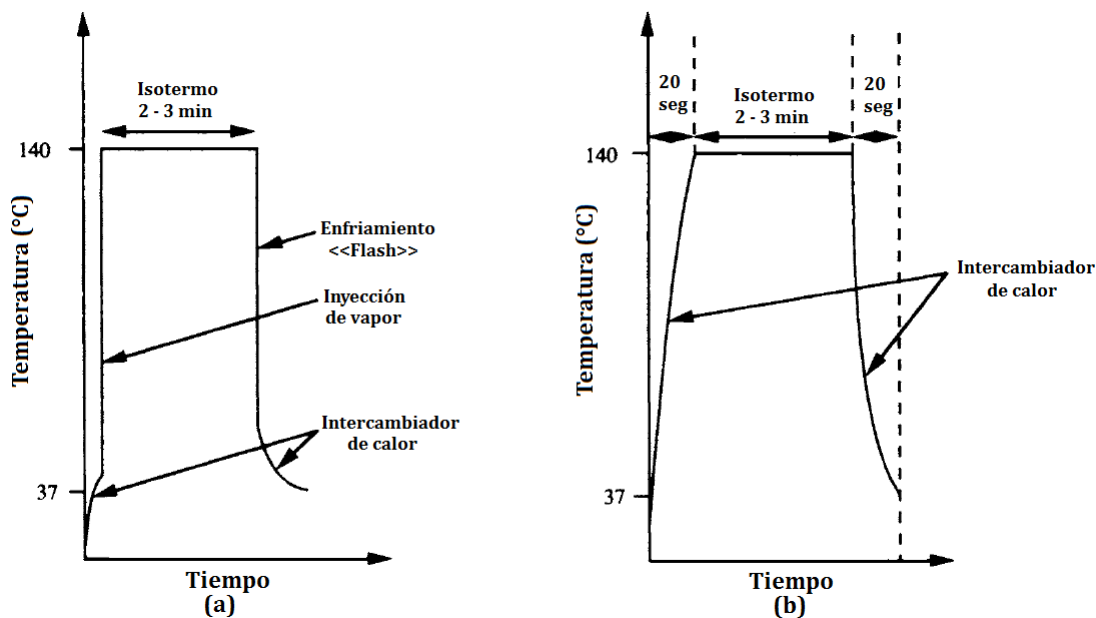


Figura 3.3 Variación de temperatura contra tiempo en esterilizadores continuos
Fuente: (Doran, 1998)

3.5. Cinética de la desactivación térmica

Los tres parámetros más importantes usados para caracterizar la inactivación térmica son la reducción decimal, la resistencia térmica y el tiempo de muerte térmica (Gould, 2004).

3.5.1. Reducción decimal o valor D

Al someter a un tratamiento térmico a una población de esporas microbianas, dicha población presenta una reducción con comportamiento logarítmico con respecto al tiempo como se muestra en la Figura 3.4. Si se utilizan coordenadas semilogarítmicas para el eje de las abscisas se obtiene una línea recta tal como se observa en la Figura 3.5. La pendiente de esta línea está directamente relacionada con la reducción decimal (Singh & Heldmand, 1993).

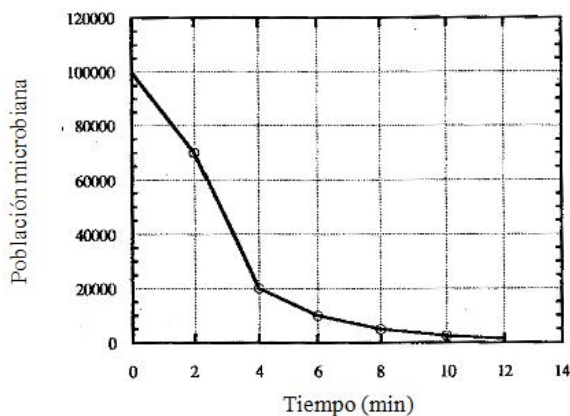


Figura 3.4 Comportamiento típico de una población microbiana contra el tiempo
Fuente: (Singh & Heldmand, 1993)

El tiempo de reducción decimal se define como, el tiempo (en minutos) requerido para reducir la población de microorganismos viables a un 10% de su valor inicial a una temperatura constante, es decir, cuando se utiliza la escala semilogarítmica, el valor D es el tiempo requerido para reducir la población microbiana en un ciclo logarítmico. La exposición de la población microbiana a temperaturas más altas implica una reducción en el valor D, como se muestra en la Figura 3.6.

A partir de la definición de reducción decimal se obtienen las ecuaciones 3.1; 3.2 y 3.3:

$$\log N_0 - \log N = \frac{t}{D} \quad [3.1]$$

Se puede obtener una expresión que permita determinar el valor D a una nueva temperatura si se conoce su resistencia térmica constante (ver sección 3.5.2) y se tiene un valor D asociado a una temperatura específica.

De la Ecuación 3.4 se despeja la relación logarítmica para la reducción decimal a dos distintas temperatura.

$$\frac{\log(D_{T_1})}{\log(D_{T_2})} = \frac{T_2 - T_1}{z} \quad [3.4]$$

Donde D_{T_2} y T_2 son los valores de referencia, tal como lo muestra la ecuación 3.5.

$$\frac{D_{T_1}}{D_{T_2}} = 10^{\frac{T_2 - T_1}{z}} \quad [3.5]$$

La ecuación 3.6 es el resultado de ordenar la expresión anterior con el fin de obtener una ecuación que permita calcular un nuevo valor de reducción decimal.

$$D_{T_1} = D_{T_2} 10^{\frac{T_2 - T_1}{z}} \quad [3.6]$$

3.5.2. Resistencia térmica constante o valor Z

La resistencia térmica de las esporas bacterianas o microorganismos se denomina como la constante Z, y representa el aumento de temperatura necesario para causar una reducción de 90% en la reducción decimal (D) (Singh & Heldmand, 1993).

Al graficar el valor D de forma semilogarítmica en función de diferentes valores de temperatura, se puede determinar el aumento de temperatura necesario para lograr una reducción de un ciclo logarítmico, este valor corresponde al valor de Z. Lo anterior, se muestra gráficamente en la Figura 3.7 y da origen a la expresión matemática de la Ecuación 3.7.

$$Z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_{T_1} - \log D_{T_2}} \quad [3.7]$$

Los valores D y Z son característicos para cada microorganismo, en el Cuadro 3.3 se muestran distintos datos de referencia para estos valores, a partir de ellos se puede calcular la reducción decimal a la temperatura de interés.

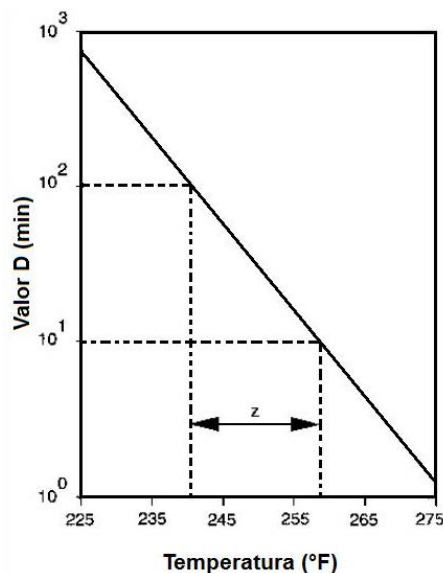


Figura 3.7 Gráfica semilogarítmica del tiempo de reducción decimal contra temperatura, representación gráfica del valor Z
Fuente: (Valentas, Rotstein, & Singh, 1997)

Cuadro 3.3 Valores de Z y D para algunos microorganismos.

Microorganismo	Valor D (min)	Temperatura (°C)	Valor Z (°C)
<i>Salmonella sp.</i>	0,58 - 0,98	60	9,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,0 - 15,0	60	8,8
<i>Escherichia coli</i>	0,1	65	10,6
<i>Clostridium botulinum spores</i>	0,21	121	10,2
<i>Bacillus cereus</i>	2,0 - 8,0	100	12,8
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	4,0 - 5,0	121	8,0
<i>Bacillus coagulans</i>	0,1 - 0,2	121	8,9
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	3,0 - 4,0	121	10,2
<i>Clostridium sporogenes</i>	0,1 - 3,0	80	8,0
<i>Levaduras y mohos</i>	0,5 - 3,0	65	3,5

Fuente: (Kumar, 2007)

3.5.3. Tiempo de muerte térmica o valor F

Tiempo requerido para causar una reducción establecida en una población de microorganismos, se conoce como tiempo de muerte térmica, puede expresarse como un múltiplo del valor D (Singh & Heldmand, 1993).

La letalidad (valor F) es una medida del tratamiento de calor o los procesos de esterilización. Con el fin de comparar las capacidades relativas de los procesos de esterilización de calor, se establece una unidad de letalidad. Por conveniencia, esta se define como el calentamiento equivalente de 1 min a una temperatura de referencia, que es por lo general $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ para los procesos de esterilización (Valentas, Rotstein, & Singh, 1997).

3.6. Relación entre la cinética de desactivación y los parámetros del procesamiento térmico

La disminución en la población microbiana (N) generalmente sigue un modelo de cinética de primer orden, donde k es la constante de reacción (Doran, 1998).

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad [3.8]$$

Al separar variables e integrar desde la población inicial (N_0) en el tiempo cero a la población final (N) al tiempo t , se obtiene la expresión:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -kt \quad [3.9]$$

Al cambiar el logaritmo de base natural al \log_{10} se tiene:

$$2,303 \log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -kt \quad [3.10]$$

$$\log N - \log N_0 = -\frac{k}{2.303} t \quad [3.11]$$

De la Ecuación 3.1

$$\log N_0 - \log N = \frac{t}{D} \quad [3.12]$$

Y por comparación se obtiene:

$$k = \frac{2,303}{D} \quad [3.13]$$

Las ecuaciones anteriores son utilizadas para obtener la expresión matemática que permita calcular la letalidad de un proceso de esterilización.

3.6.1. Concepto de letalidad

En la ecuación 3.14 aparece la demostración matemática de la expresión de letalidad, como la integral de la velocidad letal desde un tiempo igual cero y hasta un tiempo determinado, a partir de las ecuaciones 3.6 y 3.12 se obtiene (Valentas, Rotstein, & Singh, 1997).

$$\frac{d(\log N)}{dt} = \frac{-1}{D_{T_2} 10^{\frac{T_2-T_1}{z}}} \quad [3.14]$$

Al separar variables resulta la expresión:

$$\int_{N_0}^N d(\log N) = \frac{-1}{D_{T_2}} \int_0^t 10^{\left(\frac{T-T_2}{z}\right)} dt \quad [3.15]$$

Finalmente se llega a la siguiente igualdad:

$$F = D_{T_2} [\log(N_0) - \log(N)] = \int_0^t 10^{\left(\frac{T-T_2}{z}\right)} dt \quad [3.16]$$

El cálculo de la letalidad de una esterilización (F) se utiliza para determinar el tiempo equivalente durante el cual el medio de cultivo ha sido sometido a una temperatura determinada con el fin de garantizar que se ha alcanzado la esterilidad.

3.7. Aseguramiento de la esterilidad

En los últimos años el concepto de aseguramiento de la calidad, es decir confirmar que la preparación, el material o el objeto que ha sido sometido a un proceso de esterilización es efectivo en términos de eliminación de contaminantes microbianos, ha cambiado con respecto a la forma tradicional de ver la esterilidad (Baird, 2004).

Este cambio se ha originado debido al enfoque matemático de la muerte de células microbianas como una función de probabilidad basada en el tiempo de exposición al agente letal. Al mismo tiempo, se sabe que una exposición indefinida al agente letal puede dañar las propiedades del producto final. Por lo que se requiere asegurar la esterilidad pero también la aceptabilidad del producto para su uso posterior.

Surge entonces el concepto de Nivel Requerido de Aseguramiento de la Esterilidad, SAL (por sus siglas en inglés), el cual se deriva de lo que se considera el riesgo máximo aceptable.

En la industria farmacéutica y de dispositivos médicos, la definición se ha basado en un SAL igual o menor a 10^{-6} . Es decir, que la probabilidad de que un artículo no quede estéril sea igual o menor a una en un millón. En el caso menos estricto de preparados asépticos sensibles a la temperatura se acepta un SAL del orden de 10^{-3} (Baird, 2004).

Uno de las principales dificultades para alcanzar condiciones estériles es la presencia de zonas de difícil transferencia de calor conocido como puntos fríos, tal como se explica en la sección siguiente.

3.8. Punto frío y la transferencia de calor

En una prueba de penetración de calor se coloca un termopar dentro del recipiente en estudio, de manera que mida la temperatura del medio en el punto de calentamiento más lento, este sitio es llamado punto frío. Para recipientes con calentamiento conductivo o con agitación este punto coincide con el centro geométrico. Sin embargo, en el caso de calentamiento convectivo sin agitación este punto se localiza un poco más abajo del centro geométrico (Sharma, Mulvaney, & Rizvi, 2003).

Para esta prueba se registran dos temperaturas con respecto al tiempo:

- Temperatura de la cámara del autoclave

- Temperatura en el punto frío

La diferencia entre estas dos temperaturas representa la fuerza impulsora que calienta el biorreactor. Y como es de esperar, conforme la temperatura del interior se acerca a la temperatura de la cámara la velocidad del calentamiento disminuye de manera exponencial

3.9. Controles de esterilización

Un tipo de indicador externo indirecto para controlar la efectividad del proceso de esterilización es el gráfico temperatura-tiempo usualmente instalado en el panel de control de la autoclave. Estos gráficos registran la duración de la exposición a la esterilización y la exposición de la temperatura para cada carga que se ha procesado. Los esterilizadores más modernos pueden estar equipados con un listado computarizado, que registra los parámetros de cada fase del proceso de esterilización. Los monitores de control brindan una manera de verificar la eficiencia y la eficacia de una esterilización.

Un monitor o indicador químico es un objeto tratado con un material que cambia sus características cuando se esteriliza. Esto puede ser en la forma de una tinta impregnada en tiras de papel o cinta y colocada fuera del equipo a esterilizar o una sustancia que se incorpora en un frasco o ampolla de vidrio (Fuller, 2007). Debido a la importancia de los indicadores de esterilización en el Capítulo 4 se trata el tema de forma detallada haciendo énfasis en los utilizados para determinar la esterilización de los biorreactores en estudio

Capítulo 4 Tipos de esterilización e indicadores

En este capítulo se presentan los principales métodos de esterilización. Se hace énfasis en la esterilización física con vapor húmedo por ser la utilizada en el caso en estudio.

4.1. Esterilización por métodos físicos

4.1.1. Vapor húmedo

El modo de acción del vapor húmedo como agente esterilizador reside en la desnaturalización de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, lo cual provoca la muerte celular. El campo de acción de este tipo de esterilización incluye microorganismos como bacterias, hongos, virus, protozoarios y esporas.

Tal como se observó en el Cuadro 3.1 las esporas bacterianas tienen una alta resistencia por lo que para inactivarlas se requiere una alta temperatura, que logre penetrar las múltiples capas protectoras de las esporas bacterianas, la presencia de estas capas y algunas sustancias como el ácido dipicolínico y calcio juegan un papel importante en la resistencia al calor de estos microorganismos (McDonnell, 2007).

El vapor a baja presión, es muy útil y de gran valor en la esterilización de los medios de cultivo y los equipos de fermentación. Después de la esterilización se mantienen las condiciones asépticas, haciendo pasar vapor por las válvulas y sellos (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2003).

La esterilización con vapor húmedo es óptima cuando el vapor saturado se encuentra en el límite de fases líquido-vapor, la utilización de vapor sobrecalentado aumenta los costos de operación sin mejorar la transferencia de calor. Por esta razón, se considera que utilizar vapor sobrecalentado es menos eficiente, debido a que en estas condiciones el vapor se comporta como un gas y la transferencia de calor es lenta.

La presencia de aire en un espacio con vapor reduce la eficiencia del proceso, debido a que el aire se lleva parte de la carga calórica, de modo que reduce la presión parcial del vapor de agua. Lo anterior ocasiona que la temperatura alcanzada sea menor a la asociada con la presión total registrada y prologando el tiempo de operación para lograr la esterilización deseada. Reducir el tiempo del proceso de esterilización es posible si se utiliza un sistema eficiente de desplazamiento de aire.

Se conocen algunas relaciones de temperatura tiempo dadas con el fin de estandarizar el proceso de esterilización. En el Cuadro 4.1. se muestran las relaciones dadas por la institución Farmacopea Británica.

Cuadro 4.1 Relación tiempo-temperatura en procesos de esterilización térmica

Proceso	Temperatura (°C)	Duración del proceso
Calor húmedo (autoclave)	121	15
	126	10
	134	3
Aire seco	160	120
	170	60
	180	30

Fuente: (Gould, 2004)

Los valores de tiempo mostrados en el cuadro anterior, no incluyen los períodos de calentamiento y enfriamiento por lo que se hace necesario un estudio particular de los diferentes sistemas a esterilizar, para poder así determinar el tiempo total del proceso y la temperatura a la que debe someterse. El tiempo que tarda en alcanzarse la temperatura de operación del autoclave es llamado CUT (Come Up Time, por sus siglas en inglés) (Ramaswamy & Marcotte, 2006).

Entre las ventajas de utilizar vapor como medio de esterilización se menciona la operación segura y eficiente al esterilizar líquidos, materiales y otros dispositivos. Adicionalmente este método ha demostrado una amplia gama de efectividad y un factor de seguridad bastante significativo en el aseguramiento de la letalidad.

Asimismo, entre sus desventajas se encuentra el cuidado que se debe tener con los materiales sensibles a la temperatura o a la presión y el tiempo necesario para que el objeto se enfríe y sea fácilmente manipulable (McDonnell, 2007).

4.1.2. Aire seco

Corresponde a la aplicación de calor por medio de aire seco (cuya humedad es menor al 100%). Para el tratamiento con aire seco se utilizan hornos alimentados con aire precalentado por un sistema eléctrico. Los más modernos incluyen ventiladores que distribuyen el aire de manera uniforme (McDonnell, 2007).

Los tiempos y temperaturas son mayores que los utilizados en la esterilización con vapor húmedo, debido a que el aire es un conductor menos eficiente que el vapor. Adicionalmente el proceso tiene una aplicación más limitada ya que ciertos materiales sensibles a la temperatura no lo resistirían. Por otro lado la esterilización con aire seco es más económica que el proceso con vapor húmedo (McDonnell, 2007).

4.1.3. Esterilización por radiación

Se basa en el trastorno ocasionado por la radiación en los átomos de las moléculas que son esenciales para el metabolismo y la supervivencia. El efecto de letalidad se produce al afectar directamente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

En este tipo de esterilización se utilizan fuentes de alta energía o radiación por ionización. La radiación por ionización tiene suficiente energía como para liberar los electrones de los átomos deseados en un compuesto dado.

Los tipos más utilizados son la radiación gamma (γ) y rayos X . El primero ocasiona la liberación del núcleo atómico mientras que los rayos X pueden ocasionar la liberación de los electrones que orbitan el núcleo.

Estas fuentes se utilizan para una gran variedad de procesos de desinfección y esterilización que incluyen dispositivos médicos, alimentos (por ejemplo: pasteurización), cosméticos, aguas residuales entre otros (McDonnell, 2007).

4.2. Indicadores de esterilidad

El uso de indicadores de esterilidad se requiere para llevar un control de la efectividad del proceso de esterilización. Se pueden utilizar medios químicos, físicos o biológicos. Los indicadores se utilizan no solo en la estandarización de esta operación sino también de forma diaria como parte de los controles de rutina.

4.2.1. Indicadores químicos

Los indicadores químicos están limitados en términos de su especificidad y sensibilidad. Al seleccionar el indicador se debe considerar su fiabilidad, estabilidad y seguridad. Sin embargo, estos indicadores no pueden ser considerados sustitutos de indicadores microbianos. Por lo que su uso es complementario en la esterilización de una carga, en la Figura 4.1 se muestra un ejemplo. Entre las distintas funciones que tienen los indicadores químicos se mencionan las siguientes (Baird, 2004):

- Indicadores de temperatura específica: muestran si se ha alcanzado una temperatura particular, tienen la desventaja de que no indican el período de tiempo por el cual se estuvo expuesto a esta temperatura. Se utilizan para detectar fallos en el esterilizador o autoclave y en los instrumentos de control de temperatura.
- Indicadores multiparámetro del proceso: se ven afectados por diferentes componentes, tales como el calor y el tiempo exposición.
- Indicadores de rendimiento: a menudo en forma de cinta adhesiva, son útiles para distinguir entre los elementos esterilizados y los que no.

- Indicadores de prueba Bowie-Dick: se utilizan para controlar la eliminación efectiva del aire en autoclaves con ciclos de vacío previo y la penetración del vapor en el material.



Figura 4.1 Indicador fisico-químico para los procesos de esterilización con vapor (3M)
Fuente: (Solutions.3M.com)

4.2.2. Indicadores físicos

Los monitores físicos de esterilización a utilizar en este proyecto se muestran en la Figura 4.2. Dichos monitores contienen un pellet de un material termolábil y cambia de forma durante el ciclo de esterilización si se logra alcanzar la temperatura adecuada de fusión. Si el pellet se mantiene intacto la temperatura de esterilización no fue alcanzada lo que puede indicar la presencia de puntos fríos o algún otro fallo en el proceso (DIACK, 2013).



Figura 4.2 Monitores físicos: antes (arriba) y después (abajo) de la esterilización a 121 °C
Fuente: (diakinc.com)

4.2.3. Indicadores biológicos

Son utilizados ampliamente para validar y monitorear la letalidad del proceso de esterilización mediante la integración de todos los parámetros implicados: tiempo, temperatura, tamaño del recipiente a esterilizar entre otros.

Estos indicadores consisten en una ampolla que contiene una solución con una población bacteriana conocida, la cual ha sido seleccionada por su alta resistencia a los procesos de esterilización. En el mercado se encuentran disponibles preparados que contienen un número conocido de microorganismos; generalmente se utilizan para dicho fin, endoesporas bacterianas de *Bacillus* y *Clostridium* (Baird, 2004). Las esporas de *Geobacillus stearothermophilus* son de los organismos más resistentes al vapor húmedo por lo que se utilizan para confirmar y validar el proceso. (McDonnell, 2007).

Después del proceso de esterilización se cultivan los indicadores biológicos bajo las condiciones especificadas por el fabricante. Si no se produce ningún crecimiento de microorganismos, se dice que la letalidad del proceso es la requerida. Por el contrario si hay crecimiento microbiano se debe identificar si deriva del inóculo original o si es por contaminación accidental durante la manipulación del cultivo.

Para evitar la contaminación durante la manipulación, algunos indicadores biológicos contienen el inóculo en una ampolla y en el vial que contiene a la ampolla se encuentra el medio de cultivo desarrollado para el crecimiento bacteriano de la especie de interés, para la validación del proceso de esterilización en estudio. Luego del proceso de esterilización se recupera el vial y se quiebra la ampolla, y se coloca en contacto el inóculo con el medio de crecimiento, sin necesidad de abrir el recipiente o vial. Luego se debe llevar a incubación por un tiempo definido, en el caso de los indicadores utilizados en este proyecto (ver Figura 4.3.), se requiere que el vial se incube por 48 horas a 60 °C.



Figura 4.3 Indicador biológico de lectura rápida marca 3M
Fuente: (Solutions.3M.com)

Capítulo 5 Equipo para esterilización

A continuación se incluye una explicación a detalle de los equipos más importantes utilizados durante el desarrollo de este proyecto.

5.1. Biorreactor

Recipiente en el cual se lleva a cabo una reacción biológica bajo condiciones controladas para la obtención de un metabolito de interés, la Figura 5.1 muestra un ejemplo (Moreno & Bayo, 1996).



Figura 5.1 Biorreactor de 15 litros y equipo de control automático
Fuente: (Tomado de: cenibiot.go.cr)

Los biorreactores, llamados también fermentadores, son recipientes de reacción, en los que se crean las condiciones óptimas para el cultivo y la multiplicación de microorganismos. Bacterias, hongos y algas constituyen el grupo de microorganismos más importante en los bioprocesos (Hopp, 2005).

Las condiciones necesarias para el crecimiento de los microorganismos determinan la forma de construcción de los biorreactores como por ejemplo (Hopp, 2005):

- El cultivo estéril de los microorganismos, lo cual implica que la alimentación del reactor debe estar libre de cualquier agente extraño, así como el aseguramiento de la siembra estéril de cultivos de microorganismos seleccionados.
- El mantenimiento durante el crecimiento de las condiciones necesarias de temperatura, pH y una buena mezcla de la disolución de cultivo.
- Suministro suficiente de los nutrientes es decir, la fuente de carbono, nitrógeno y fósforo, sales nutritivas y otros nutrientes menores (trazas) necesarios para sustentar a los microorganismos.
- En el caso de fermentaciones aerobias se requiere la aireación de la disolución de cultivo, es decir, el suministro de oxígeno atmosférico suficiente.
- La interrupción del crecimiento y la recolección; es decir, el vaciado del biorreactor y otras operaciones para obtener el producto final, el cual puede ser la biomasa o un producto del metabolismo de los mismos.

5.2. Autoclave

La esterilización mediante vapor a presión es de los métodos más aplicados excepto en los casos en los que la penetración del vapor pueda representar un problema. Los equipos para este tipo de esterilización se encuentran en una gran variedad de formas y tamaños en hospitales, clínicas, laboratorios de microbiología y en industria de bioprocesos.

5.2.1. Principios de diseño de una autoclave

En términos generales las características de construcción del autoclave son las siguientes (Sharma, Mulvaney, & Rizvi, 2003):

- La cámara del autoclave está diseñada y construida siguiendo las normas del American Society of Mechanical Engineers Code y posee paredes metálicas gruesas con la capacidad de soportar grandes presiones. Las condiciones normales de uso son 15 psi y 121 °C.

- Una puerta resistente provista de un sistema de cierre hermético diseñado para soportar la presión y evitar fugas.
- En el interior de la cámara hay al menos un termopar, con la finalidad de registrar los datos de temperatura-tiempo en el interior.
- A través de las tuberías internas se suministra vapor, agua y aire para calentar y enfriar. El flujo de estas tuberías se controla mediante válvulas de conexión-desconexión y reguladoras.
- Válvulas de alivio para eliminar vapor y aire de la cámara. Así como una válvula de desagüe permite desalojar el agua.

Uno de los principales problemas en el proceso de esterilización con vapor húmedo es la ineficiente remoción del aire dentro de la cámara ocasionando una disminución en la eficiencia del proceso. Las técnicas básicas para remover el aire son: (1) desplazamiento por gravedad (2) dilución por flujo de masa (3) dilución por pulsos de presión (4) esterilización a alto vacío (5) pulsos de presión y desplazamiento por gravedad (Block, 1971).

5.2.1.1. Desplazamiento por gravedad

Técnica estándar de la remoción del aire, se basa en la diferencia de densidad entre el vapor y el aire. Debido a que el aire tiene una densidad mayor, al alimentar vapor éste se ubica en la parte superior de la autoclave (Block, 1971).

5.2.2. Autoclave del tipo prevacío con puerta horizontal

En la Figura 5.2. se muestra una ilustración de los autoclaves del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas, la Figura 5.2.a muestra el equipo utilizado para la esterilización de los biorreactores involucrados en el proyecto.

El autoclave utilizado es de la marca Tuttnauer, tipo prevacío con una puerta horizontal deslizable. Diseñado para su uso en hospitales, centros médicos e industrias biotecnológicas.

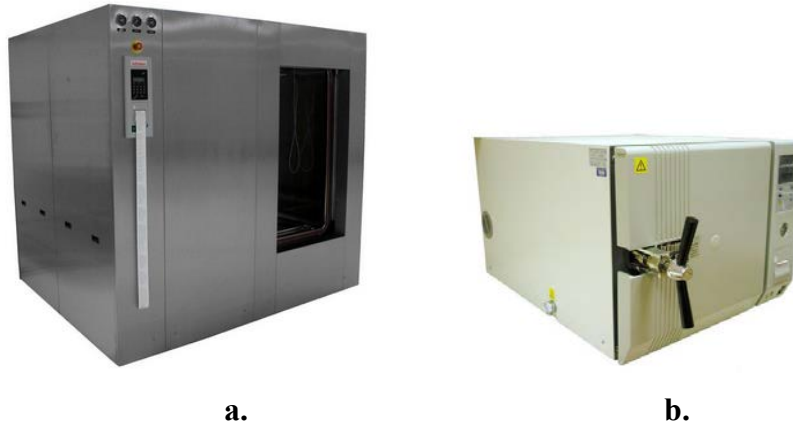


Figura 5.2 Ejemplos de autoclaves: a. Horizontal b. Horizontal de mesa
(Tomado de: cenibiot.go.cr)

El autoclave opera con vapor saturado como agente esterilizante y tiene un límite máximo de temperatura de 137 °C y una presión de 2,3 bar (Tuttnauer, 2009).

Se puede operar en cualquiera de sus diez programas diseñados, tres de ellos para instrumentos sin envoltura, dos para instrumentos envueltos, cuatro para instrumentos envueltos y paquetes, tres para ciclos con escape lento de presión y dos programas de prueba (Bowie & Dick Test y Leakage Test).

Está equipado con una puerta horizontal que opera por sistema hidráulico a través de un cilindro de aceite. El sellado de la cámara se da debido a un empaque de silicón resistente al calor, que se encuentra en una abertura de la puerta del autoclave.

El sistema de control del esterilizador (autoclave) asegura una operación automática durante todo el ciclo, después de que se han seleccionado los parámetros y se inicia la operación no se requiere la intervención de un operario.

Es sistema está equipado con tres sensores de temperatura, tres transductores de presión, tres manómetros y tres interruptores de seguridad que tienen las siguientes funciones: los sensores de temperatura se encuentran en el desagüe, línea de condensado y en la cámara. Los transductores de presión están ubicados en la cámara, en la chaqueta y en la puerta. Los manómetros se encuentran ubicados en la cámara, la chaqueta y la puerta (Tuttnauer, 2009).

En el Cuadro 5.1 se presentan las dimensiones y especificaciones del equipo dadas por el fabricante.

Cuadro 5.1 Dimensiones y especificaciones de la autoclave utilizada durante la esterilización de los biorreactores de 7 L y 15 L

Información del producto		Modelo: T-MAX-12 SP-1H
Volumen de la cámara		1040 L
Dimensiones de la cámara	W	660 mm
	H	1220 mm
	D	1300 mm
Dimensiones externas	W	2060 mm
	H	2010 mm
	L	1850 mm
Alimentación		
Suministro de agua Con una dureza máxima entre 0,7-2,0 mmol/l Temperatura recomendada: 15 ° C		<ol style="list-style-type: none"> 1. Conexión roca ½" 2. Presión: 2-5 bar 3. Consumo: 14 LPM máximo, 510 LPH promedio
Aire comprimido		<ol style="list-style-type: none"> 1. Presión: 6-8 bar 2. Consumo: 100 LPM 3. Conexión: rosca ¼"
Vapor		<ol style="list-style-type: none"> 1. Presión: 3,5-4,5 bar 2. Conexión: rosca 1"
Electricidad		Trifásico, 480 V/60 Hz, 6 A Monofásico, 115 V/60 Hz, 3 A

Fuente: (Tuttnauer, 2009)

5.3. Data Logger

El registrador de temperatura en tiempo real de la marca MadgeTech (MadgeTech, 2008). Se programa mediante el software MadgeTech 2.05 en el cual se puede programar el equipo para que comience a registrar los datos a una hora determinada, así mismo se indica el intervalo de tiempo en el cual el equipo va a registrar la temperatura.

Una vez terminada la corrida experimental el Data Logger es conectado a la computadora y sus datos son descargados para un posterior análisis.



Figura 5.3. Data Logger
Fuente: (MadgeTech, 2008)

5.4. Analizador bioquímico (YSI)

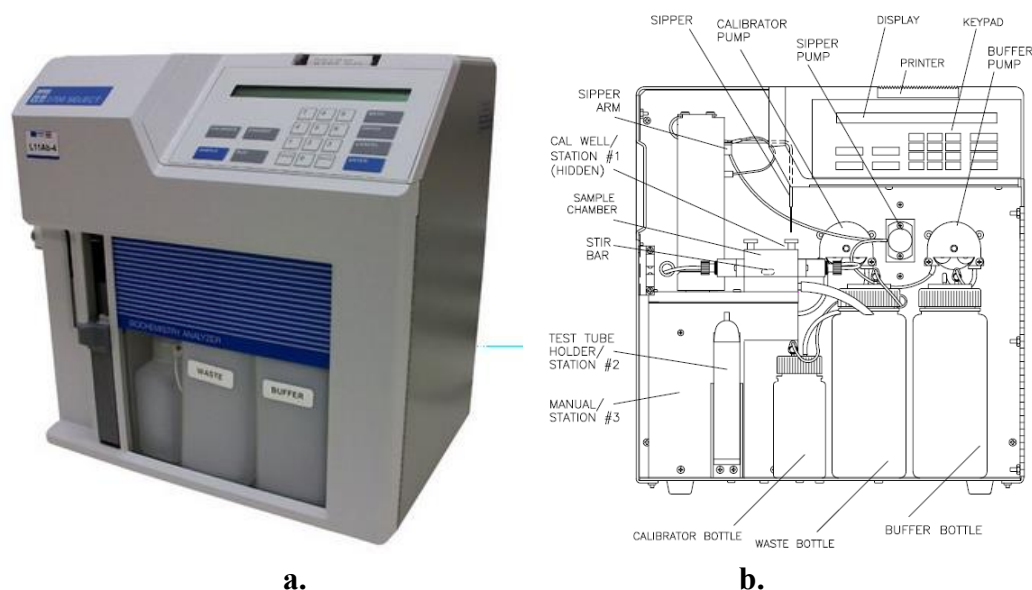
El analizador bioquímico “YSI Model 2700 SELECT Biochemistry Analyzer” es un instrumento de laboratorio destinado a la investigación en procesos de la industria alimentaria y aplicaciones de bioprocesos (YSI-Incorporated, 2000).

Este equipo ofrece gran precisión y especificidad si se le compara con métodos más rigurosos que consumen gran cantidad de tiempo. Las mediciones se ven poco afectadas por el color de la muestra, turbidez, densidad, viscosidad, pH, volatilidad, gravedad específica, temperatura, índice de refracción, actividad óptica o la presencia de proteínas y otras sustancias bioquímicas.

El analizador bioquímico se puede utilizar para la medición de diferentes analitos, realizar el cambio de un analito a otro puede tomar tiempo. Por lo que se recomienda su

programación para uno de los siguientes analitos: D-glucosa (Dextrosa), L-lactosa, sacarosa, lactosa, etanol, L-glutamato, L-glutamina, metanol, galactosa y peróxido de hidrógeno. Si se le configura para análisis simultáneos se pueden realizar las siguientes combinaciones: dextrosa y L-lactosa, dextrosa y sucrosa y también L-glutamato y L-glutamina (YSI-Incorporated, 2000).

Otra de las ventajas que ofrece el equipo es la selección de diferentes tamaños de la muestra a analizar que pueden ir desde 5 hasta 65 microlitros.



a.
b.
Figura 5.4. Analizador bioquímico **a.** YSI Model 2700 SELECT
b. Diagrama interno del equipo
Fuente: (Tomado de: cenibiot.go.cr)

Capítulo 6 Principios de microbiología industrial

En el siguiente capítulo se incluyen conceptos básicos relacionados con el conteo de unidades formadoras de colonias como parte de los controles de esterilización realizados a nivel industrial.

6.1. Introducción a la microbiología

La microbiología es el estudio de los microorganismos. Un amplio y diverso grupo de organismos microscópicos que existen como células aisladas o asociadas; también abarca el estudio de los virus que son microscópicos pero no celulares. Algunos microorganismos son perjudiciales y otros beneficiosos para el ser humano. La producción de vino, queso yogurt, penicilina y el tratamiento de aguas residuales son ejemplos de algunas de las aplicaciones en que se aprovechan los microorganismos (Pelczar & Chan, 1981).

La microbiología trata de las células vivas y su funcionamiento. Esta disciplina gira en torno a dos ejes distintos (Madigan, Martinko, & Parker, 2003):

- Como ciencia biológica básica, la microbiología proporciona herramientas de investigación para estudiar la naturaleza de los procesos vitales
- Como ciencia biológica aplicada, la microbiología trata de muchos problemas prácticos importantes en la medicina, agricultura e industria.

6.2. Contaminantes comunes de los medios de cultivo

Se incluye información general acerca de los microorganismos que se encuentran comúnmente como contaminantes en el área de bioprocesos.

6.2.1. Hongos

Los hongos están formados por células eucariotas. Pueden ser unicelulares o pluricelulares, los primeros están formados por células aisladas redondas u ovaladas, denominadas levaduras. Los pluricelulares están constituidos por células alargadas que crecen al extender sus extremos formando largos filamentos llamados hifas. A éstos se les denominan mohos y al crecer forman ramificaciones de filamentos entrecruzados, los hongos se pueden apreciar en panes o frutas enmohecidas.

Existen hongos filamentosos macroscópicos, forman estructuras con un elevado nivel de complejidad y organización de sus hifas y presentan una morfología característica: setas (Prats, 2005).

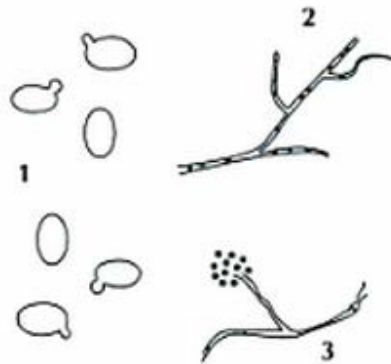


Figura 6.1 Morfología de los hongos. 1. Levaduras
2. Hongos filamentosos (mohos) 3. Hongos esporulados
Fuente: (Prats, 2005)

6.2.2. Levaduras

Las levaduras tienen forma redonda con un diámetro entre 3 y 30 μm , por lo que se pueden observar al microscopio óptico. En los medios de cultivo sólidos las levaduras crecen dando lugar a colonias compactas, visibles macroscópicamente aproximadamente a las 24 – 48 horas de incubación, de forma similar a las bacterias (Prats, 2005).

6.2.3. Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares muy pequeños y relativamente sencillos, su material genético no está rodeado por una membrana nuclear especial, se les llama procariotas.

Se han clasificado como bacterias Gram Positivo y Gram Negativo, en función de su comportamiento en la tinción de Gram. A las bacterias que se tiñen de color violeta oscuro se les llama Gram Positivo y a las que se tornan rosadas Gram Negativo, esta diferencia se debe a la morfología de la pared celular de la bacteria (Granados & Vilaverde, 1997).

6.3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son utilizados para distintos propósitos: el conteo, aislamiento, mantenimiento de cultivos para uso posterior, así como para facilitar el crecimiento y reconocimiento de algún tipo de microorganismo en particular (García, 2004).

Consisten en medios artificiales preparados en laboratorios, se busca que provean las condiciones óptimas para que los microorganismos crezcan adecuadamente como temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno, así como un grado adecuado de acidez o alcalinidad y los nutrientes necesarios (nitrógeno, carbono, azufre, fósforo, sales minerales, factores de crecimiento, agua y energía).

Los medios sólidos y semisólidos contienen un agente solidificante: el agar. El agar se obtiene de las algas marinas de la familia *Rhodophyceae* y es altamente resistente a la actividad microbiana, entre otras características funde a 98 °C y solidifica entre 42 – 45 °C. Tiempo atrás se utilizaba gelatina sin embargo debido a que algunos microorganismos la hidrolizaban y a que se licuaba a la temperatura de incubación (35 °C), se buscó otro componente más estable. (Escuela de Ciencias Biológicas UNA, 2011).

Tal como se menciona en la sección 2.2 existen tres tipos distintos de medios de cultivo: sintéticos o medios químicamente definidos y complejos, pero otra clasificación se presenta a continuación según su selectividad:

- Medios de cultivos selectivos: un medio selectivo favorece el crecimiento de ciertas bacterias e inhibe el de otras
- Medios diferenciales: permite distinguir diferencias metabólicas de las bacterias
- Medios selectivo-diferenciales: son muy útiles ya que, además de la selección de un tipo de bacteria se logra obtener información de sus características metabólicas.

6.3.1. *Papa Dextrosa Agar (PDA)*

El agar papa dextrosa es un medio no selectivo, rico en una infusión de papa que promueve el crecimiento de levaduras y hongos. La adición en el medio de ácido tartárico baja su pH para inhibir del crecimiento de bacterias, sin embargo, existe la posibilidad de que crezcan ciertas cepas bacterianas tolerantes a los medio ácidos y esto provocaría un error positivo en el conteo de los microorganismos de interés (Yousef & Carlstrom, 2003). Se utiliza para aislar todo tipo de hongos como *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium (Verticillium)* y *Metarhizium* (Cañedo & Ames, 2004).

6.3.2. *Trypticasa Soya Agar (TSA)*

El medio tripticasa soya es un medio de cultivo que favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, en especial bacterias anaerobias facultativas y aerobias comunes (MacFaddin, 1985; Marshall, 1993). Debido a sus propiedades la entidad Farmacopea de Estados Unidos (USP) y la Farmacopea Europea (EP) utilizan la fórmula de este medio para su uso en pruebas de esterilidad (Becton Dickinson France SA, 2003).

El Cuadro 7.5 incluye la composición general de este agar, donde la caseína y el extracto de haba proporcionan los aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas complejas, mientras que el cloruro de sodio se adiciona para mantener el equilibrio osmótico.

6.4. Pruebas a nivel industrial para identificar microorganismos contaminantes

6.4.1 Recuento total aerobio mesófilo

El recuento total es una prueba de rutina en muchos laboratorios de análisis de alimentos, con el fin de evaluar la calidad sanitaria de los productos busca verificar además de las condiciones higiénicas de la materia prima la adecuada manipulación durante su producción.

En el recuento de microorganismos aerobios mesófilos se estima la flora total pero no se especifica el tipo de patógeno contaminante. Tiene un valor limitado como prueba indicadora de la presencia de patógenos o sus toxinas, esto responde a las necesidades de la industria de evaluar de forma rápida la presencia de contaminantes que puedan interferir en la aprobación de un lote de producción.

A excepción de los productos que se elaboran por fermentación, no se esperan altos recuentos microbianos, debido a que podrían ser un indicador de materia prima contaminada, deficientes métodos de manipulación, indicios de descomposición del producto, entre otros. (Pascual & Calderón, 2000). El método de recuento en placa se utiliza para determinar el número de microorganismos por gramo o por mililitro de muestra, partiendo de las diluciones seriadas (ver Apéndice D) y utilizando placas de agar.

6.4.2. Rayado o estriado

El rayado consiste en la inoculación de una muestra en un medio sólido, en la placa Petri se puede esparcir una porción de la muestra en la superficie utilizando un asa bacteriológica de forma tal que las células queden separadas individualmente, lejos unas de otras. Durante la incubación, cada célula bacteriana se reproduce tan rápidamente que entre 18 y 24 horas se producen masas bacterianas visibles a simple vista, llamadas colonias.

Se dice que cada colonia procede de una bacteria progenitora, cuyos individuos son de una sola especie. Una colonia que ha crecido separada de las otras, al transferirse a un medio de cultivo nuevo dará lugar a un cultivo puro (Olivas, 2001).

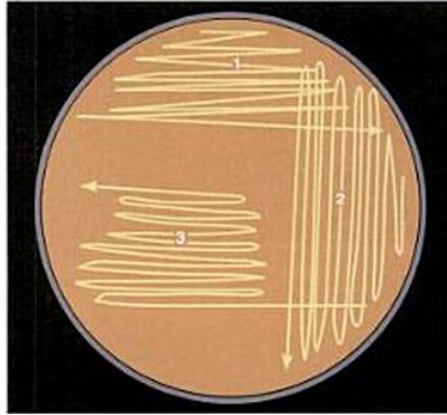


Figura 6.2 Técnica para el rayado de una placa Petri en tres zonas
Fuente: (Tortora, Funke, & Case, 2007)

Capítulo 7 Materiales, equipo y metodología experimental

En el presente capítulo se da una descripción de la metodología empleada para lograr el objetivo general de este proyecto, el cual es establecer y verificar el proceso de esterilización de los biorreactores enchaquetados de vidrio de 7 y 15 litros, para implementarlo como un procedimiento de control y aseguramiento de la calidad biotecnológica del proceso de crecimiento microbiano. De igual manera, se especifican los equipos y reactivos usados en las diferentes etapas de la investigación.

7.1. Materiales

Seguidamente se especifican los principales materiales empleados para evaluar la esterilización de los biorreactores luego del proceso de esterilización, los cuales ya han sido tratados en el capítulo 4.

7.1.1. Indicador físico

Los indicadores físicos, como se describe en la sección 4.3.2, consisten en pellets que se derriten al alcanzar una temperatura determinada, es importante señalar que estos indicadores son independientes del tiempo. Los pellets utilizados son de la marca DIACK y la temperatura a la cual el material del interior se funde es 121 °C (250 °F). En la Figura 7.1. se muestra una fotografía del pellet antes y después de una esterilización.



Figura 7.1 Indicador físico marca DIACK a la izquierda sin derretir y a la derecha derretido después de un proceso de esterilización

7.1.2. Indicador físico químico

Los indicadores físico químicos de la marca 3M se utilizan para monitorear la penetración del agente esterilizante. Con estos integradores químicos, como los llama el proveedor, se busca controlar los tres parámetros de las autoclaves: temperatura, tiempo.

Consiste en un papel (tipo secante) y un pellet químico sensible a la temperatura, contenidos en una tira de materiales laminados. El vapor entra por la parte superior permeable del integrador, el pellet químico se derrite y migra en forma de tinta por el papel.

Son utilizados para llevar un control en cada uno de los paquetes de la carga a esterilizar, en este caso se coloca un indicador en el interior del biorreactor y otro en el exterior. A este tipo de monitores se les considera de fácil lectura debido a que su resultado no está sujeto a interpretación visual, una vez que termina el proceso de esterilización se observa si el lote es aceptado o rechazado (3M Chile, 2013).

En la Figura 7.2. se muestran estos indicadores para el caso de una esterilización incompleta, donde la tinta aún se encuentra en el área de rechazo y por otro lado un caso donde el proceso es completo y se acepta el lote.



Figura 7.2. Indicadores físicos químicos marca 3M a la izquierda un resultado negativo para esterilización en el interior del biorreactor, a la derecha un resultado positivo para esterilización en el exterior del biorreactor

7.1.3. Indicadores biológicos

En la Figura 7.3 se muestran los indicadores biológicos de la marca 3M de lectura rápida tipo (RRBI) Attest™ 1292.

En el Cuadro 7.1 se muestra la información técnica suministrada por el proveedor acerca de la población de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC® 7953.

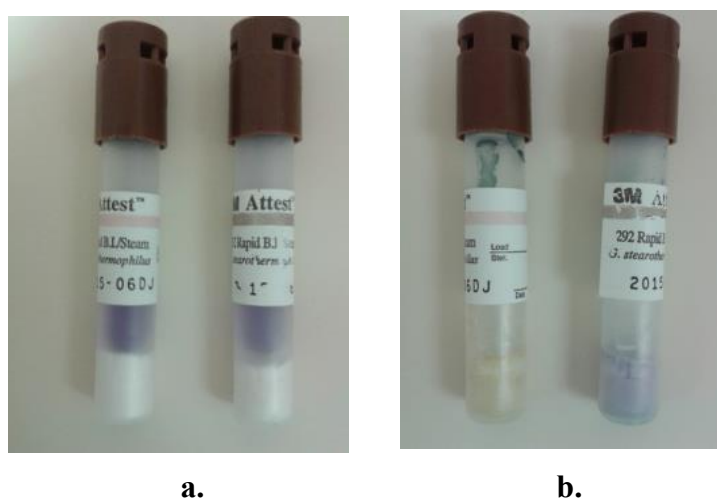


Figura 7.3 Indicadores biológicos marca 3M. **a.** Antes de la esterilización **b.** Después de la esterilización y con 48 h de incubación (a la derecha el control negativo para esterilización)

Cuadro 7.1 Ficha técnica del indicador biológico Attest™ Indicador Biológico de lectura rápida 1292

Población inicial (promedio)	9,1 x 10 ⁵ U.F.C
Valor D a 121 °C	1,7 min
Tiempo supervivencia ¹	6,73 min
Tiempo de letalidad ²	16,93 min
Valor Z	24 °C

¹ Tiempo al cabo del cual solo se encuentran formas viables como mínimo en el 90 % de los indicadores biológicos, con una confianza del 95 %

² Tiempo al cabo del cual solo se encuentran formas viables en un máximo del 1 % de los indicadores biológicos con un margen de confianza del 95 %.

7.1.4. Melaza

La melaza utilizada es de grado alimenticio. La composición reportada por el fabricante para este producto se encuentra en el Cuadro 7.2.

Cuadro 7.2 Composición en 500 g de la melaza utilizada para el estudio de la esterilización de un medio de cultivo complejo (presentación comercial)

Componente	Cantidad (mg)
Potasio	2,931
Sodio	94,00
Hierro	18,50
Fósforo	87,00
Calcio	692,00
Niacina	2,50
Rivoflavina	21,50
Tiamina	10,00
Magnesia	264,00

7.1.5. Reactivos

En el Cuadro 7.3 se presenta la lista de los reactivos utilizados en este proyecto, relacionados con el conteo microbiano en la melaza.

Cuadro 7.3 Especificaciones de los reactivos utilizados en la determinación de la carga microbiana previa y post esterilización.

Reactivo	Fabricante	Calidad
Agar papa dextrosa (PDA)	OXOID	Reactivo
Agar tripticasa soya (TSA)	OXOID	Reactivo
Agua peptonada tamponada	MERCK	Reactivo
Cristal violeta	Prelab	Reactivo
Lugol	Prelab	Reactivo
Decolorante (alcohol-acetona)	Prelab	Reactivo
Safranina	Prelab	Reactivo

Además de la lista general de reactivos presentada se incluye un listado de la composición más común encontrada en la literatura y manuales de laboratorio para preparar los medios de cultivo PDA y TSA.

Cuadro 7.4 Composición general del agar papa dextrosa (39 g/L) pH: $5,6 \pm 0,2$

Componente	Cantidad (g)
Extracto de papa	4,0
Dextrosa	20,0
Agar	15,0

Fuente: (Escuela de Ciencias Biológicas UNA, 2011)

Cuadro 7.5 Composición general del agar tripticasa soya (40 g/L) pH: $7,3 \pm 0,2$

Componente	Cantidad (g)
Caseína pancreática digestiva	15,0
Enzimas digestivas de haba de soya	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar	15,0

Fuente: (Escuela de Ciencias Biológicas UNA, 2011)

Cuadro 7.6 Composición general del agua peptonada tamponada (25,5 g/L) pH: de $7,2 \pm 0,2$

Componente	Cantidad (g)
Peptona de caseína	10,0
Cloruro sódico	5,0
Dihidrogenofosfato potásico	1,5
Hidrogenofosfato disódico dodecahidratado	9,0

Fuente: (Escuela de Ciencias Biológicas UNA, 2011; Merck, 2014)

7.2. Equipo experimental

El Cuadro 7.7 muestra los equipos de interés empleados para las pruebas de esterilización durante la realización de este proyecto.

7.3. Metodología Experimental: Determinación de los parámetros de esterilización

El desarrollo experimental se subdivide en tres fases principales. La primera consiste en la determinación de los parámetros de esterilización para tres volúmenes de agua con biorreactores de 7 y 15 L. Las esterilizaciones con melaza como medio de cultivo y las pruebas microbiológicas corresponden a las fases 2 y 3 respectivamente y se desarrollaron de forma paralela.

Cuadro 7.7 Especificaciones de los equipos utilizados en la determinación de los parámetros de esterilización de biorreactores enchaquetados

Equipo	Fabricante	Ámbito	Placa/Serie CENIBiot
Autoclave	Tuttnauer	121-137 °C 2-3 bar	0586
Biorreactor 7 L	Applikon	0 – 7 L	0788 / 7 L L1B7-9
Biorreactor 15 L	Applikon	0 – 15 L	0795 / 15 L L1B15-3
Cámara de bioseguridad	ESCO	-	0576
Data Logger	MadgeTech	0 – 125 °C	-
Incubadora biológica	Thermo Scientific	20 - 80 °C	L151b-8

7.3.1. Primera Etapa Experimental

7.3.1.1. Objetivo experimental

Determinar los valores de temperatura y tiempo de operación del autoclave para biorreactores enchaquetados con tres diferentes volúmenes de agua.

7.3.1.2. Variables de la primera etapa experimental

Para evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo en las esterilizaciones realizadas en esta etapa, se consideran las siguientes variables:

Variables fijas

- Capacidad total del biorreactor: 7 litros o 15 litros según sea el caso.
- Dimensiones de la cámara de la autoclave: 1040 L.
- Pulsos de vacío del autoclave: 2 pulsos con el fin de extraer el aire dentro de la cámara.
- Tipo de escape en el enfriamiento: lento (para materiales sensibles como el vidrio y evitar la pérdida del líquido en el frasco del biorreactor).
- Tiempo de secado en el autoclave: 0 minutos.
- Temperatura final del proceso: 100 °C.

- Tiempo de calentamiento: 10 min.

VARIABLES EXPERIMENTALES

- Temperatura: 125 y 127 °C.
- Tiempo de esterilización: 60 y 75 min.
- Volumen de agua en el biorreactor de 7 L: 1,5; 3,0 y 4,5 L.
- Volumen de agua en el biorreactor de 15 L: 3,6; 7,2 y 10,8 L.

VARIABLES DE RESPUESTA:

- Resultado de esterilización según indicador físico: positivo o negativo.
- Resultado de esterilización según indicador físico químico: positivo o negativo.
- Resultado de esterilización según indicador biológico: positivo o negativo. Se determina si hay crecimiento microbiano de las esporas de *Geobacillus stearothermophilus*.
- Letalidad (F) del proceso de esterilización. Se obtiene a partir de los perfiles temperatura-tiempo realizados para cada corrida.

7.3.1.3. Metodología experimental de la determinación de los parámetros de esterilización, primera fase experimental

Se detalla a continuación, la metodología para determinar los valores de temperatura y tiempo de operación del autoclave para biorreactores enchaquetados con tres diferentes volúmenes de agua.

Para esterilizar cada uno de los biorreactores, se debe preparar previamente el equipo, es decir, lavarlo y armarlo. Se llena la chaqueta del equipo con agua de ósmosis, hasta aproximadamente la mitad de su capacidad y se alimenta el interior del biorreactor con la cantidad de medio según el volumen de trabajo de la corrida a realizar. El procedimiento se detalla en el Apéndice C.1.

Se procede a encender el autoclave y se espera a que la caldera genere vapor, se colocan los indicadores en el biorreactor y se programa el Data Logger para su inicio a la hora exacta en la que se va a introducir el biorreactor en el autoclave.

Al terminar el proceso, el equipo libera la presión y cuando se ha alcanzado la temperatura final y la presión cero en la cámara del autoclave se puede abrir. Se deben esperar unos minutos hasta que el biorreactor baje su temperatura y sea fácil de manipular, para extraer los indicadores y el Data Logger. Se verifican los resultados de la esterilización con los indicadores. Se utilizan los datos de del Data Logger para obtener el perfil temperatura-tiempo y con ellos se calcula la letalidad del proceso.

En el Cuadro 7.8, se muestran los valores de las variables de estudio en cada una de las corridas experimentales para el biorreactor de 7 L. En el Cuadro 7.9, se detalla la misma información para el biorreactor de 15 L.

Cuadro 7.8 Variables experimentales para la determinación de los valores de temperatura y tiempo de operación del autoclave para el biorreactor de 7 L.

Volumen de medio (L)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1,5	60	125
		127
	75	125
		127
3,0	60	125
		127
	75	125
		127
4,5	60	125
		127
	75	125
		125

7.3.2. Segunda Etapa Experimental

7.3.2.1 Objetivo experimental

Comprobar los valores de los parámetros de esterilización obtenidos, utilizando un medio de cultivo complejo, la melaza.

Cuadro 7.9 Variables experimentales para la determinación de los valores de temperatura y tiempo de operación del autoclave para el biorreactor de 7 L

Volumen de medio (L)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
3,6	60	125
		127
	75	125
		127
7,2	60	125
		127
	75	125
		127
10,8	60	125
		127
	75	125
		125

7.3.2.2. Trabajo previo a la segunda etapa experimental.

Para verificar los parámetros obtenidos en la primera etapa experimental se necesita realizar pruebas microbiológicas de las esterilizaciones con medio de cultivo complejo. Puesto que en este punto de la investigación no se conoce la identidad ni características de los microorganismos presentes en el medio, se realiza un trabajo previo para determinar la combinación de factores que permiten realizar un conteo microbiano. Los procedimientos para realizar la prueba se especifican en los apéndices del C.2 al C.8.

Se detalla a continuación, el proceso seguido para determinar la combinación de factores adecuados. Cada factor se evalúa por separado y se fija antes de continuar con el siguiente.

Medio de cultivo a esterilizar:

Para el medio de cultivo complejo a esterilizar en el biorreactor se utiliza melaza grado alimenticio. Se escoge este medio puesto que es común en las fermentaciones realizadas en el CENIBiot y es el que más ha presentado dificultades para esterilizarse.

Concentración de medio de cultivo

Para evaluar la concentración de medio de cultivo que permitiera el conteo de las unidades formadoras de colonias se utilizan dos concentraciones:

- 15 g/L
- 30 g/L

Se utilizan estas concentraciones, debido a que asemejan las condiciones de las fermentaciones comunes en proyectos desarrollados en el CENIBiot. Se utiliza la concentración de unidades formadoras de colonias en el conteo final en las placas para determinar cual concentración utilizar.

Diluciones seriadas

En las pruebas microbiológicas de conteo se deben realizar diluciones seriadas (1:10) como se describe en el Apéndice C.5. Para determinar el solvente que permite una posterior lectura se prueba las siguientes sustancias:

- Agua salina
- Agua peptonada

Se utiliza la dispersión de las unidades formadoras en las placas en el conteo final para determinar la sustancia a utilizar.

Medio de cultivo en placa Petri

Para determinar el crecimiento de hongos y bacterias existen diferentes medios de cultivo. Para crecimiento de hongos se utilizó el agar papa dextrosa, el cual tiene buenos resultados. Para bacterias se compara el crecimiento en placas utilizando los siguientes medios sólidos:

- Agar nutritivo
- Agar tripticasa soya

Se utiliza la concentración de unidades formadoras y la dispersión de la mismas en el medio para determinar cual utilizar.

Activación de bacterias y hongos en el medio de cultivo

Debido a que la melaza se almacena en frío para conservarla, es necesario promover la activación de los microorganismos presentes, ya que si esto no se realiza el conteo se dificulta, lo cual introduce un error negativo. Para realizar este pretratamiento se consideran los siguientes casos:

- Sin crecimiento previo
- Con crecimiento previo

Se utiliza la concentración de unidades formadoras en el conteo final en las placas para determinar la activación a utilizar.

Periodo de incubación

Luego de sembrar las diluciones seriadas, los platos de Petri se deben incubar para poder contar las unidades formadoras de colonias. Para hongos, el periodo (detallado en el Apéndice C.7) establecido en los protocolos resultó satisfactorio. Para determinar el periodo de incubación de las bacterias se prueban los siguientes tiempos de incubación

- 8 horas.

- 16 horas.
- 24 horas.

Se utiliza la dispersión de las unidades formadoras en las placas en el conteo final para determinar el tiempo de incubación.

7.3.2.3. Variables de la segunda etapa experimental

De acuerdo a los resultados obtenidos en la primera etapa experimental, para evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo en las esterilizaciones de un medio de cultivo complejo, se consideran las siguientes variables:

Variables fijas

- Medio de cultivo en biorreactor: melaza.
- Concentración del medio de cultivo: 30 g/L.
- Capacidad total del biorreactor: 7 L.
- Tiempo de esterilización: 60 minutos
- Para el resto de las variables fijas se toman en cuenta las mismas de la primera fase experimental.

Variables experimentales

- Temperatura: 125 y 127 °C.
- Volumen de medio en el biorreactor de 7 L: 1,5; 3,0 y 4,5 L.

Variables de respuesta:

- Letalidad del proceso de esterilización. Se obtiene a partir de los perfiles temperatura-tiempo realizados para cada corrida.
- Resultado de esterilización según pruebas microbiológicas: en UFC/mL.

7.3.2.4. Metodología experimental en la comprobación de los parámetros de esterilización de la segunda fase experimental

Se describe a continuación, la metodología para comprobar los valores de los parámetros de esterilización en un medio de cultivo complejo. Se sigue la misma metodología experimental descrita en la sección 7.3.1.2. con la diferencia de que en la segunda fase el medio de cultivo a esterilizar y se toman muestras del medio de cultivo previo y posterior al proceso de esterilización, para realizar el análisis microbiológico. Para cada corrida se realizan tres repeticiones.

El procedimiento del conteo microbiano, se detalla en el Anexo C. El objetivo de este procedimiento es determinar la reducción en el número de unidades formadoras de colonias de bacterias y hongos existentes en la muestra original.

En el Cuadro 7.10 se detallan variables de estudio en cada una de las corridas experimentales.

Cuadro 7.10 Variables experimentales para la verificación de los valores de los parámetros de esterilización para el biorreactor de 7 L

Corrida	V (L)	T (°C)
1	1,5	125
2	3,0	127
3	4,5	127

7.3.3. Tercera Etapa Experimental

7.3.3.1 Objetivo experimental

Definir el tratamiento térmico que asegure la esterilidad del medio de cultivo y a la vez la menor degradación posible de los nutrientes analizados.

7.3.3.2. Variables de la tercera etapa experimental

Para evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo en la degradación de un medio de cultivo complejo en la tercera etapa experimental, se consideran las siguientes variables:

Variables fijas

- Cantidad de muestra a analizar: 2 mL.
- Para el resto de las variables fijas se toman en cuenta las mismas de la segunda fase experimental.

Variables experimentales

- Temperatura: 125 y 127 °C.
- Volumen de medio en el biorreactor de 7 L: 1,5; 3,0 y 4,5 L.

Variables de respuesta:

- Concentración de sacarosa y glucosa

7.3.3.3. Metodología experimental de la determinación de las concentraciones de azúcares reductores cuarta fase

Se detalla a continuación, la metodología para evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo en la degradación de un medio de cultivo complejo. Para esto se cuantificará, por medio de análisis de azúcares fermentables utilizando un analizador bioquímico (YSI), la degradación de los nutrientes después del proceso de esterilización.

Se toma una alícuota de aproximadamente 2 mL de las muestras sin esterilizar y de las muestras luego del proceso de esterilización y se colocan en tubos de ensayo en el carrusel del analizador bioquímico. Se utilizan dos analizadores ya que en uno de ellos se encuentra la membrana de glucosa y en la otra de sacarosa. Además de las muestras analizadas deben correrse primero dos estándares y un patrón para evaluar la linealidad del equipo.

Estas pruebas se realizan en la sección de Bioprospección del CENIBiot, el equipo utilizado y otras especificaciones dadas por el fabricante, se muestran en la sección 5.4. En el Apéndice C.9 se muestra un resumen del procedimiento experimental.

En el Cuadro 7.11 se detallan las variables de estudio en cada una de las corridas experimentales.

Cuadro 7.11 Variables experimentales para la verificación de los valores de los parámetros de esterilización para el biorreactor de 7 L

Corrida	V (L)	T (°C)
1	1,5	125
2	3,0	127
3	4,5	127

7.4. Métodos de análisis

A continuación se describen los métodos de análisis utilizados para cuantificar las variables de respuesta requeridas durante la etapa experimental.

7.4.1. Determinación de resultado positivo para esterilización con indicadores físicos y físico químicos

Se determina de forma visual el resultado esterilización con los monitores físico y físico químico, una vez extraídos del biorreactor. En el caso de los indicadores físicos, como los mostrados en la Figura 7.1, si el pellet en el interior de la ampolla de vidrio se funde indica que durante el proceso se alcanzó o superó los 121 °C. Para los monitores físico-químicos, tal como se indica en la Figura 7.2, se considera un resultado positivo cuando la tinta recorre la totalidad del indicador hasta el área de aceptación.

7.4.2. Determinación del crecimiento microbiano de *Geobacillus stearothermophilus*

Se procede a incubar el monitor, para lo cual es necesario quebrar la ampolla que se encuentra dentro del vial plástico, con el fin de poner en contacto el contenido microbiológico de la ampolla con el medio de cultivo, esto se realiza bajo condiciones de asepsia. Si luego de la permanencia de la muestra en la incubadora biológica por 72 horas a 60 °C el cultivo cambia su coloración púrpura a amarillo indica el crecimiento microbiano de la cepa, es decir un resultado negativo para esterilización.

7.4.3. Determinación de la letalidad del proceso de esterilización

Para evaluar el grado de efectividad del proceso se calcula la letalidad para cada una de las esterilizaciones realizadas. Tal como lo indica el desarrollo matemático mostrado en la sección 3.6.1 para poder calcular la letalidad en un intervalo de tiempo, primero se debe obtener la letalidad en cada uno de los puntos. Para las esporas de *Geobacillus stearothermophilus* la temperatura de referencia es de 121 °C y el valor Z igual a 24 °C (Singh & Heldmand, 1993).

7.4.4. Determinación de curvas de esterilización

La elaboración de los perfiles temperatura-tiempo para cada una de las esterilizaciones se basan en la identificación de manera gráfica de las tres etapas de interés en el proceso de esterilización: calentamiento, temperatura constante y enfriamiento (Doran, 1998). Para los casos en estudio, los perfiles incluyen la temperatura reportada por el Data Logger y la temperatura de la cámara del autoclave, ambos contra el tiempo.

7.4.5. Caracterización de la melaza

Para evaluar la degradación de los azúcares producto del tratamiento térmico aplicado a la melaza, se hace uso del analizador bioquímico o YSI. Con este equipo se determinan la

concentración de glucosa y sacarosa presentes en las muestras iniciales y finales del proceso de esterilización. En el Apéndice C.9 se muestra el procedimiento detallado de cuantificación de azúcares.

7.4.6. Determinación del crecimiento microbiano en la melaza

Con el fin de determinar la identidad del principal contaminante presente en la melaza se recurrió al uso de técnicas de biología molecular, dichos análisis se realizaron en el área de Genómica de CENIBiot. A continuación, se describe de forma general la metodología utilizada. Inicialmente se debe tener el microorganismo de interés aislado, para lo cual se utilizaron las placas con agar en las que se realizó un aislamiento por rayado y se dejó crecer el microorganismo. Luego, se pasó una colonia microbiana de la biomasa a un medio líquido para favorecer el crecimiento del microorganismo puro (ver sección 6.4.2).

Luego de al menos 48 horas con agitación (170 rpm) e incubación a 35 °C, se procedió a la etapa de lisis, es decir, el rompimiento de las células para poder así obtener el ADN. Se buscó amplificar la región conservada 16S (región evolutivamente poco variable) y se amplificó en un equipo que permite realizar ciclos de temperaturas (termociclador). Es decir, se aumentó el número de copias mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Una vez que el material de interés ha sido amplificado, se utilizó un secuenciador. En este equipo, mediante electroforesis (técnica analítica que permite la separación y cuantificación de analitos), se leen las bases nitrogenadas que conforman la región estudiada. Finalmente, se procesó la información, es decir, los pares de bases identificados en el paso anterior con ayuda del software BioEdit. Se utilizó la base de datos en línea del Centro Nacional de información Biotecnológica (siglas en inglés ‘NCBI’) y se realizó un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar la secuencia obtenida con referencias de microorganismos identificados en investigaciones a nivel mundial.

Capítulo 8 Análisis de resultados

En este capítulo se discuten los resultados obtenidos luego del trabajo experimental realizado con diferentes combinaciones de tiempo, temperatura y volumen de medio según la capacidad total del reactor, con el fin de establecer y verificar los parámetros de esterilización.

8.1. Valor de letalidad establecido como aceptable

Tal como se muestra en el Cuadro 7.1. cada una de las ampollas del indicador biológico contiene una población microbiana establecida por el fabricante de $9,1 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias de *Geobacillus stearothermophilus*. Al definir un nivel requerido de aseguramiento de la esterilidad o SAL igual a 10^{-6} , se establece un nivel de seguridad comparable con el que se utiliza en la industria farmacéutica. Este valor SAL significa que la probabilidad de encontrar una unidad no estéril es de una en un millón. En la sección B.1 (Apéndice B) se muestra a detalle el cálculo de la letalidad mínima requerida para alcanzar este valor SAL. Se obtiene como resultado un valor de letalidad de 10,2 min.

Es importante aclarar que aun cuando la definición de esterilidad se expresa como una función de probabilidad, esto no significa que una unidad no estéril en 10^6 sea aceptable (Padrón, y otros, 2001).

La letalidad de un proceso de esterilización por calor húmedo es función de la temperatura del vapor y del tiempo de exposición. Esto explica porque diferentes combinaciones de temperatura y tiempo pueden lograr un resultado que se considere aceptable. Para comparar distintos tratamientos se hace necesario el uso de la letalidad acumulada llamada también tiempo equivalente, representada como F. Este parámetro permite juzgar la efectividad del proceso de esterilización (Padrón, y otros, 2001).

Para la presente investigación se considera que una exposición equivalente a 121 °C durante 20 min debe asegurar condiciones estériles sin sobreexponer el medio de cultivo al tratamiento térmico. Al realizar las gráficas de temperatura-tiempo para cada una de las corridas experimentales y calcular el área bajo la curva (partiendo de la interpretación física de la expresión matemática de la Ecuación 3.16) los valores obtenidos deben igualar o superar los 20 minutos, para así ser considerados como aceptables.

8.2. Valores de los parámetros para la esterilización de biorreactores de 7,0 L.

Para determinar los valores de los parámetros de operación del autoclave para esterilizar biorreactores enchaquetados de 7,0 litros se utilizan dos niveles de tiempo (60 y 75 min), dos niveles de temperatura (125 y 127 °C) y tres niveles de volumen (1,5; 3,0 y 4,5 L).

El uso de estos valores para cada una de las variables en estudio obedece a una sugerencia dada por los investigadores del CENIBiot a partir de un estudio preliminar y a su experiencia en la esterilización de fermentadores. Los resultados del trabajo experimental con biorreactores de 7,0 L se presentan en el Cuadro 8.1.

Cuadro 8.1 Resultados los indicadores físico-químico, físico y biológico y valor calculado de letalidad en las esterilizaciones realizadas con el biorreactor de 7,0 L.

Volumen de medio (L)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Indicador Físico Químico ^a	Indicador Físico ^a	Indicador biológico ^a	F ₀ (min)
1,5	60	125	+	+	+	20,9
		127	+	+	+	17,7
3,0	60	125	+	+	+	21,6
		127	+	+	+	25,8
3,0	75	125	+	+	+	39,6
		127	+	+	+	17,4
4,5	60	125	+	+	+	23,3
		127	+	+	+	20,4
	65	125	+	+	+	31,3
		127	+	+	+	

^a +: positivo para esterilización
- : negativo para esterilización

De realizarse la totalidad de las corridas se tendrían 12 resultados de letalidad, sin embargo antes de comenzar la interpretación de los resultados presentados anteriormente, es importante resaltar una particularidad de esta experimentación. Aunque la esterilización es un paso de gran importancia, corresponde al inicio de una serie de procedimientos en el proceso de fermentación. Por lo tanto, lo que se desea no es encontrar cualquier combinación de parámetros que garanticen la esterilidad, sino que se prefieren los resultados que minimicen el tiempo y la temperatura, es decir, los niveles bajos de estas variables. Lo anterior se prefiere puesto que implica menores costos en el consumo energético del generador eléctrico que alimenta vapor al autoclave, así como también minimiza el tiempo requerido en la esterilización de los biorreactores enchaquetados.

Debido a lo anterior, para el caso del volumen de 1,5 L no se consideran las demás combinaciones posibles entre los parámetros de temperatura y tiempo, ya que con un tiempo de esterilización de 60 min a 125 °C se obtuvo un valor de letalidad de 20,9 min y se observa que el resultado de los tres indicadores utilizados es positivo para esterilización. El comportamiento de la temperatura contra el tiempo para esta primera corrida experimental se muestra en la Figura 8.1, la cual tiene el comportamiento esperado, descrito por Doran (1998) para la esterilización discontinua de medios líquidos, es decir un comportamiento ascendente durante el calentamiento, una meseta corta de temperatura constante y una etapa descendente durante el enfriamiento. Los datos experimentales se incluyen en el Cuadro A.5 (Apéndice A).

En la Figura 8.1 se observa que los datos obtenidos del autoclave son escasos en el periodo de calentamiento y enfriamiento, ya que durante el calentamiento solo se registra la temperatura al inicio de la operación (tiempo cero) y en los pulsos de calor, es decir cada vez que se extrae una porción del aire de la cámara y se alimenta vapor vivo. El tiempo de calentamiento (CUT) es de 9 minutos. Una vez alcanzada la temperatura programada para el ciclo de esterilización, comienza el registro de temperaturas minuto a minuto, en esta corrida esto tarda 60 minutos y luego inicia el enfriamiento.

En el Anexo 2, se incluyen las contribuciones porcentuales de cada una de las etapas a la duración total del proceso. El enfriamiento es la etapa más extensa, para el caso de la corrida 5 comprende un 66,5% del tiempo total (212 min) calculado desde el momento en que se alcanza el valor máximo de temperatura en el interior del biorreactor y hasta que se abre la cámara del autoclave. En la Figura 8.2 se presenta el comportamiento grafico de las curvas de letalidad acumulada y la temperatura interna en el biorreactor contra el tiempo, para esta corrida.

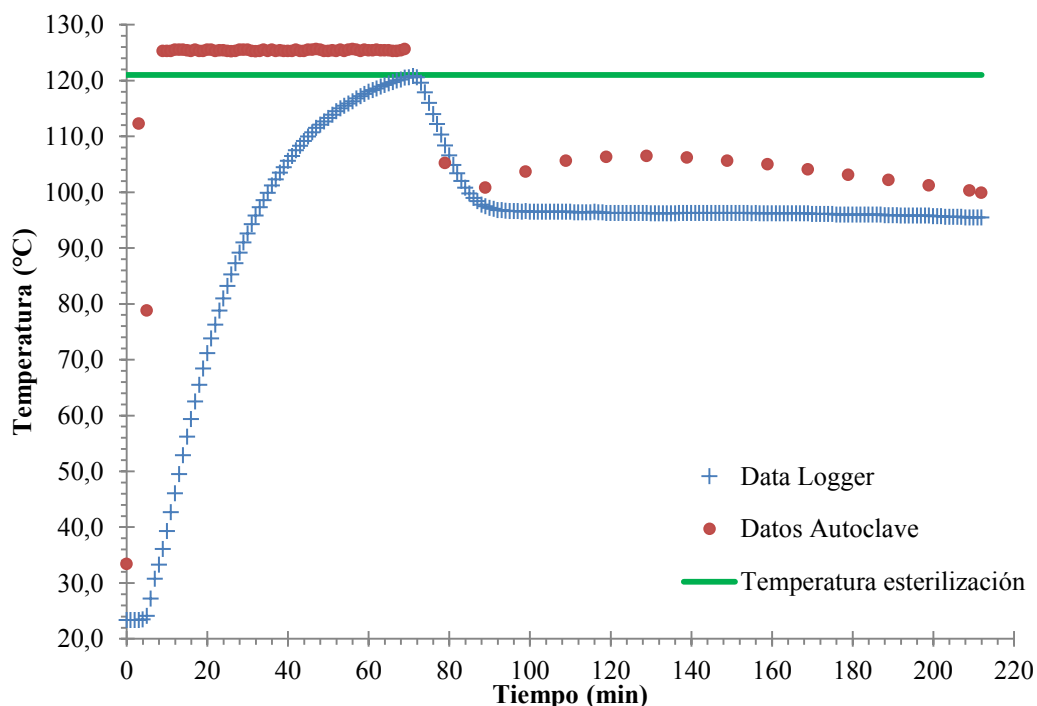


Figura 8.1 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 7,0 L con un volumen de medio de 1,5 L, un tiempo de esterilización de 60 min y temperatura de esterilización igual a 125 °C

Se observa en la figura siguiente que antes de los 35 minutos la letalidad acumulada es mínima (equivalente a 0,8). Esto sucede puesto que el aporte a la letalidad del proceso es mínima a temperaturas inferiores a los 100 °C. A partir de esta temperatura la curva muestra un aumento de pendiente marcada. Se obtiene un valor de letalidad acumulada de 20,0 a los 70 minutos, es decir 1 minuto luego de que el autoclave ha finalizado su proceso. Esto indica que no hay posibilidad de disminuir el tiempo de operación para obtener una esterilización aceptable. El no considerar la totalidad del enfriamiento en el cálculo de la

letalidad, no constituye un error sino más bien una decisión adrede, con el fin de que la letalidad del enfriamiento brinde un factor de seguridad. Por lo que para efectos del presente estudio la letalidad “real” siempre será mayor a la letalidad calculada.

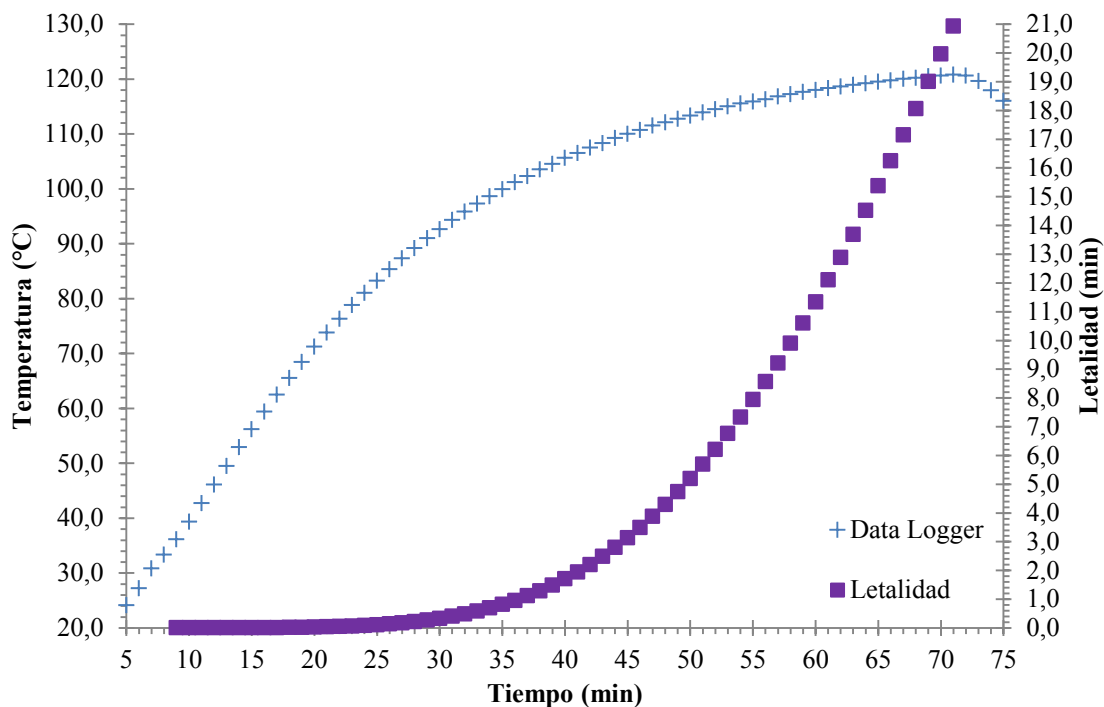


Figura 8.2 Comportamiento de la letalidad y la temperatura en función del tiempo, desde que la autoclave comienza el proceso de esterilización y hasta que se alcanza la máxima temperatura en el interior del biorreactor para la corrida experimental 5

Los datos seleccionados para estimar este parámetro corresponden a los comprendidos entre el momento en el que la temperatura del autoclave alcanza la temperatura de esterilización programada hasta el momento en que en el interior del biorreactor se alcanza la máxima temperatura. Para la lectura inicial, aunque según el sensor de temperatura del autoclave ya ha iniciado la esterilización, dentro del biorreactor todavía se está en la etapa de calentamiento. Este calentamiento se mantiene por varios minutos, esto implica que al alcanzar dentro del reactor la etapa de temperatura constante el tiempo de esterilización prácticamente ha terminado para el autoclave.

Relativo a la transferencia de calor, se observa como las curvas correspondientes a los registros del Data Logger no alcanzan la temperatura de esterilización programada en la

autoclave, esto debido a que la transferencia de calor se disminuye por pérdidas energéticas como: conductividad del material de los biorreactores, el espacio vacío que queda en la chaqueta del equipo, entre otros. Este comportamiento en la transferencia de calor, justifica que se deba programar el autoclave a una temperatura mayor a la temperatura deseada de esterilización (121°C). El gradiente entre la temperatura de la cámara y el interior del fermentador representa la fuerza impulsora de la transferencia de calor y conforme esta diferencia disminuye, la velocidad de calentamiento disminuye de manera exponencial (Sharma, Mulvaney, & Rizvi, 2003).

Para facilitar la transferencia de calor, se llena la chaqueta con agua hasta la marca de 3,0 L en el biorreactor de 7,0 L y hasta la marca de 8,0 L en el biorreactor de 15,0 L. Se debe tener en cuenta que el agua dentro de la chaqueta no requiere condiciones de esterilidad debido a que no tiene contacto con el medio de cultivo en ningún momento de una fermentación. Sin embargo, cumple un papel importante como facilitador del flujo de calor, entre el agente esterilizante (vapor húmedo) y el interior del biorreactor.

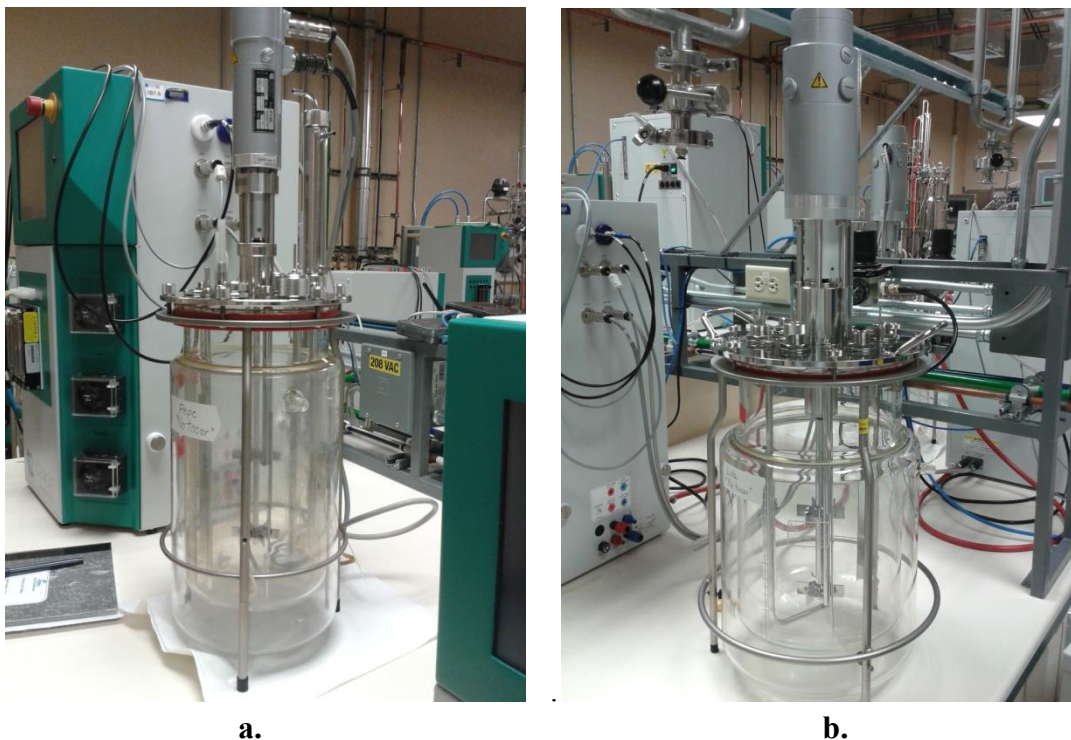


Figura 8.3 Biorreactores utilizados para el desarrollo del presente proyecto

a. 7,0 L **b.** 15,0 L

Una de las dificultades presentadas en la etapa experimental fue la ubicación del Data Logger en un punto cercano a la zona de lento calentamiento (punto frío). Debido a que el intercambio de calor entre el biorreactor y la cámara es del tipo convectivo, el punto frío se encuentra ligeramente más abajo del centro geométrico del reactor (Sharma, Mulvaney, & Rizvi, 2003). Se recomienda ubicar el registro de temperatura en la zona que represente la mayor dificultad en el proceso de esterilización. Sin embargo el punto indicado coincide con el eje central del biorreactor, donde se encuentran las aspas del agitador, por lo que para fines prácticos el registrador se ubica lo más cerca posible sin hacer contacto directo con ninguna de las piezas de acero inoxidable. Lo anterior con el fin de que los resultados correspondan únicamente al calor recibido por el medio líquido en el interior.

Para el volumen de medio de 3,0 L al analizar los resultados obtenidos se observa que sí es necesario probar combinaciones con los valores altos y bajos de los parámetros de temperatura-tiempo, ya que con 60 minutos y 125 °C se alcanza una letalidad de 17,7 minutos; menor a la considerada como aceptable. Al aumentar la temperatura a 127 °C, manteniendo el tiempo de operación en 60 minutos, se observa que se alcanza una letalidad de 21,6 minutos. Este comportamiento es lógico, puesto que a mayores temperaturas la letalidad puntual es más alta y hay un mayor potencial para la transferencia de calor, por lo que la temperatura del biorreactor aumenta más rápidamente. Para los casos con tiempo de operación de 75 minutos, las letalidades son de 25,8 minutos a 125 °C y de 39,6 minutos a 127 °C. Este resultado es atribuido al aumento en el tiempo de exposición del biorreactor al tratamiento térmico. Para este tiempo de operación los valores de letalidad acumulada son muy superiores a 20, por lo tanto, no se consideran estas condiciones por las consideraciones económicas y prácticas mencionadas anteriormente.

Por lo tanto, para el volumen de medio de 3,0 L se selecciona la combinación 60 minutos a 127 °C como condiciones de operación del autoclave. Los datos experimentales de esta corrida aparecen en el Cuadro A.4 y el perfil de temperatura-tiempo en la Figura 8.4. El tiempo en el que se alcanza la temperatura de operación (CUT) para estas condiciones es de 9 minutos. La duración total de esta corrida es 239 minutos (~4 horas). Aunque los

valores de los parámetros son distintos a los utilizados para el volumen de medio de 1,5 L, el comportamiento de las curvas es similar. De forma que al igual que en el caso anterior, la temperatura en el interior del biorreactor apenas supera los 121 °C, pero al estudiar los resultados de los monitores sus lecturas son positivas para esterilidad.

La Figura 8.5, incluye las curvas de letalidad acumulada y temperatura en el interior del biorreactor contra el tiempo. En esta se aprecia como la temperatura supera los 100 °C hasta el minuto 39. Se observa nuevamente que antes de este momento, el aporte a la letalidad acumulada es mínimo (correspondiente a 0,8 minutos).

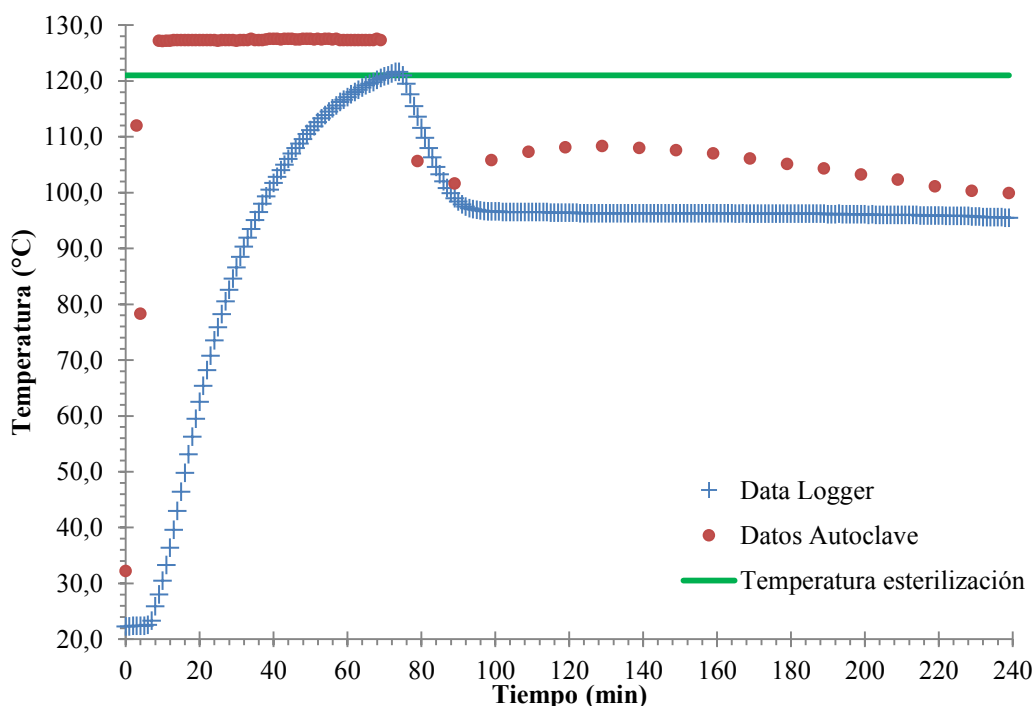


Figura 8.4 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 7,0 L con un volumen de medio de 3,0 L, un tiempo de esterilización de 60 min y temperatura igual a 127 °C

En la Figura 8.5 anterior se muestra que para estas condiciones se alcanza un valor de letalidad acumulada de 20 minutos en el minuto 73, es decir 4 minutos luego de que el autoclave ha terminado, por lo tanto no se considera factible disminuir más el tiempo de operación.

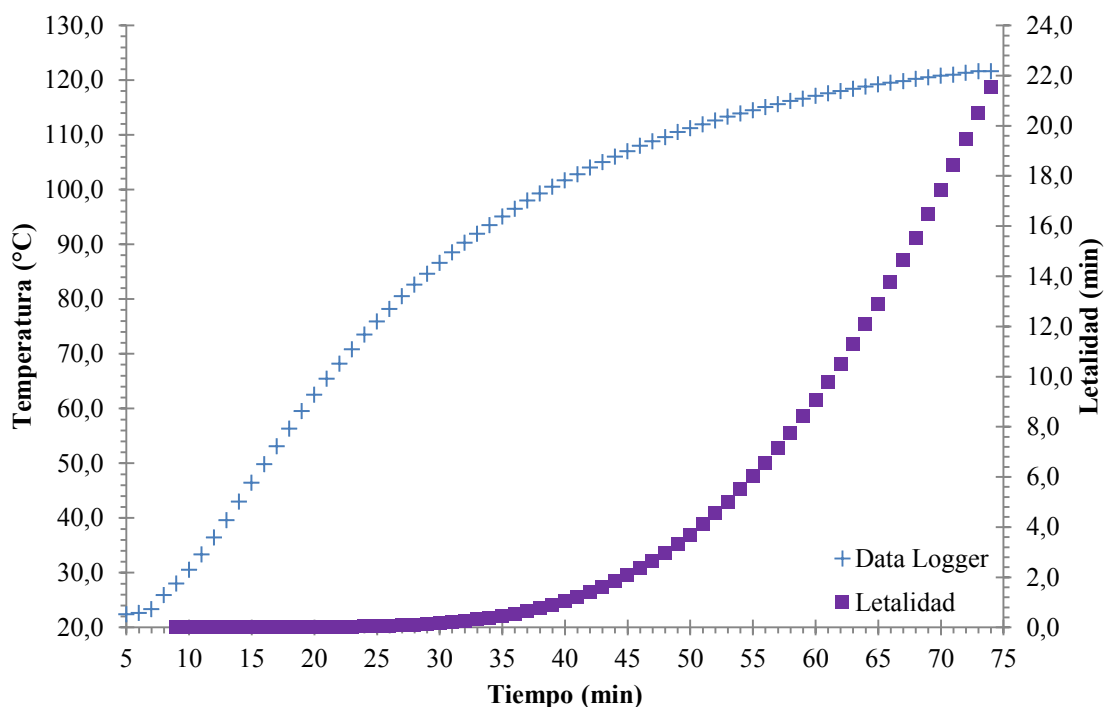


Figura 8.5 Comportamiento de la letalidad y la temperatura en función del tiempo, desde que la autoclave comienza el proceso de esterilización y hasta que se alcanza la máxima temperatura en el interior del biorreactor para la corrida experimental 4

Para el volumen de medio de 4,5 L fue necesario probar combinaciones de temperatura-tiempo, ya que con 60 minutos y 125 °C se alcanza una letalidad de 17,4. Al aumentar el volumen de medio de cultivo la letalidad acumulada disminuye, puesto que al haber mayor cantidad de medio, se dificulta la transferencia de calor. Adicionalmente, para volúmenes mayores a los 3 L, el nivel de líquido excede al del agua en la chaqueta, lo cual dificulta aún más la transferencia de calor. Para una temperatura de operación de 127 °C, la letalidad acumulada alcanza un valor de 23,3 minutos. Para un tiempo de operación de 75 minutos, a 125 °C se alcanza una letalidad acumulada de 31,3. Se observa en el Cuadro A.9 que la letalidad acumulada en estas condiciones alcanza un valor de 20 minutos a los 76 minutos, es decir 8 minutos antes de que acabara el proceso en el autoclave. Por lo tanto, se decide disminuir el tiempo de operación a 65 minutos, con la misma temperatura, para estas condiciones el valor de letalidad acumulada es de 20,4 minutos. Se obtienen resultados satisfactorios con las condiciones de 127 °C y 60 minutos; y con las condiciones de 125 °C y 65 minutos, sin embargo, se establecen las condiciones en las cuales la caldera del

autoclave debe alimentar menor cantidad de vapor. Para todas las corridas realizadas los indicadores dieron resultados positivos para esterilización.

Por lo tanto, se escoge como condiciones de operación para el volumen de 4,5 L un tiempo de 60 minutos y una temperatura de 127 °C. Ya que se ha alcanzado la letalidad deseada y los monitores indicaban positivo para esterilización, no se considera la corrida experimental con los niveles más altos de los parámetros (127 °C y 75 minutos) por aumentar el costo energético al proceso.

En la Figura 8.6 se presenta el perfil temperatura-tiempo para las condiciones seleccionadas, y en la Figura 8.7 las gráficas de letalidad acumulada y temperatura contra tiempo para el ámbito en el que se calcularon las letalidades puntuales.

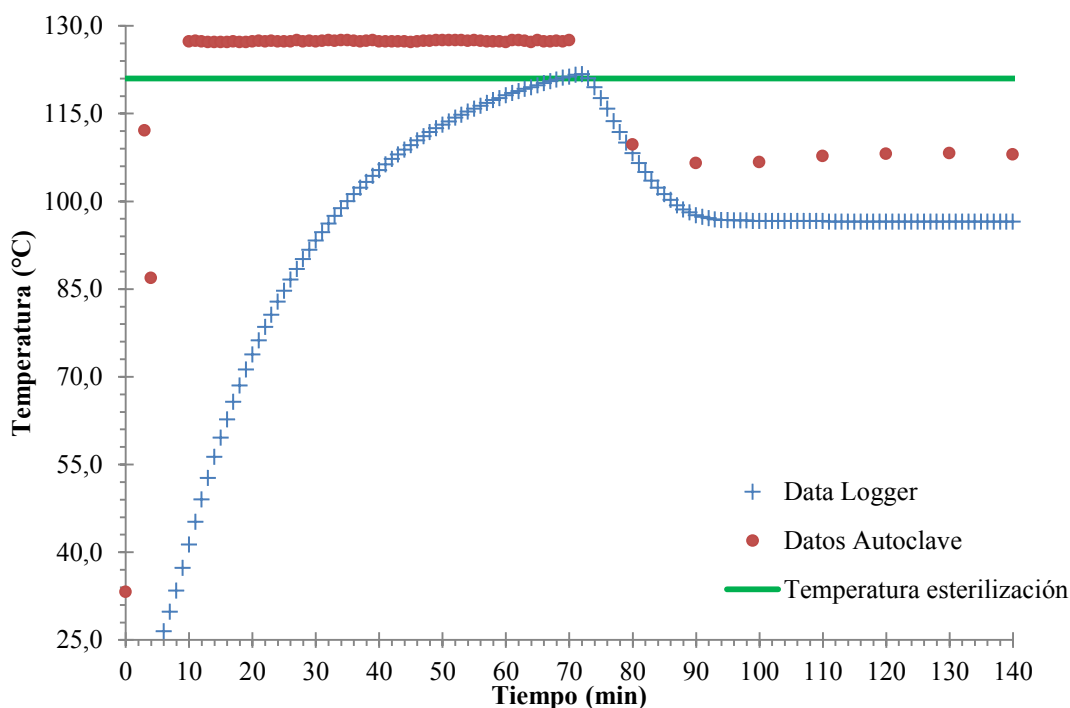


Figura 8.6 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 7,0 L con un volumen de medio de 4,5 L, un tiempo de esterilización de 60 min temperatura igual a 127 °C.

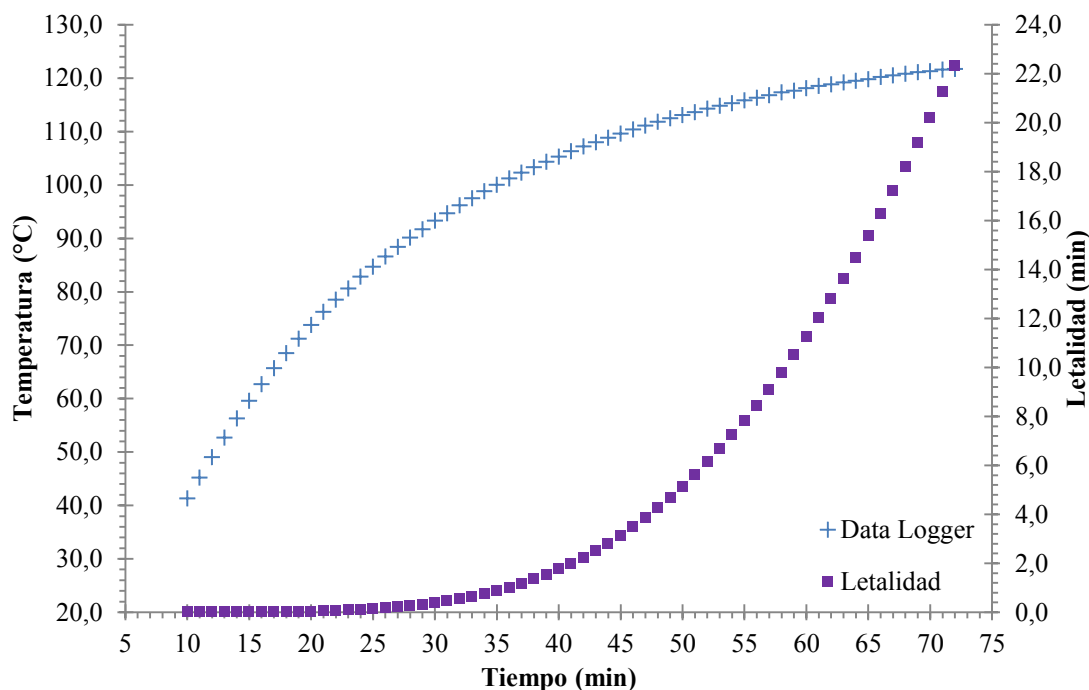


Figura 8.7 Comportamiento de la letalidad y la temperatura en función del tiempo, desde que la autoclave comienza el proceso de esterilización y hasta que se alcanza la máxima temperatura en el interior del biorreactor para la corrida experimental 7

En la Figura 8.6 el comportamiento típico del perfil temperatura-tiempo. En la Figura 8.7 se observa que nuevamente a temperaturas menores a los 100 °C el aporte a la letalidad acumulada es mínimo (0,9 minutos), la cual se alcanza a los 35 minutos. Se alcanza una letalidad acumulada de 20,0 aproximadamente a los 70 minutos, 1 minuto posterior a la finalización del calentamiento del autoclave, por lo cual no se considera que se pueda disminuir el tiempo de operación. El Cuadro 8.2 incluye un resumen de los resultados obtenidos en la primera etapa experimental para el biorreactor de 7,0 L.

Cuadro 8.2 Resumen de resultados en las esterilizaciones realizadas con el biorreactor de 7,0 L.

Volumen de medio (L)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Indicador Físico Químico ^a	Indicador Físico ^a	Indicador biológico ^a	F ₀ (min)
1,5		125	+	+	+	20,9
3,0	60	127	+	+	+	21,6
4,5		127	+	+	+	23,3

^a +: positivo para esterilización -: negativo para esterilización

8.3. Valores de los parámetros para la esterilización de biorreactores de 15,0 L.

De forma similar a la expuesta en el apartado anterior, para determinar los valores de los parámetros de operación del autoclave para biorreactores enchaquetados de 15,0 litros con tres diferentes volúmenes de medio, se utilizan dos niveles de tiempo (60 y 75 min), dos niveles de temperatura (125 y 127 °C) y tres niveles de volumen (3,6; 7,2 y 10,8 L).

En el Cuadro 8.3 se muestran los resultados obtenidos para la letalidad en las corridas experimentales realizadas con el segundo tamaño de biorreactor. Así como las lecturas de los monitores de esterilidad.

El perfil térmico se mantiene para el biorreactor de 15,0 L; es decir, la forma de la curva temperatura-tiempo (Figura 3.2) es similar a los perfiles obtenidos con el biorreactor de 7,0 L. Sin embargo, tal como lo evidencia el Cuadro 8.3 se requiere de mayores tiempos o temperaturas para alcanzar la letalidad acumulada requerida.

Cuadro 8.3. Resultados de los indicadores: físico químico, físico y biológico y valor calculado de letalidad en las distintas esterilizaciones realizadas con el biorreactor de 15,0 L.

Volumen de medio (L)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Indicador Físico Químico ^a	Indicador Físico ^a	Indicador biológico ^a	F ₀ (min)
3,6	60	125	-	+	-	13,4
		127	+	+	+	16,4
	75	125	+	+	+	26,9
		127	+	+	+	32,2
7,2	60	127	+	-	-	10,9
	75	125	+	-	+	17,6
		127	+	+	+	20,8
10,8	60	127	+	-	-	12,7
	75	127	+	-	-	14,8

^a +: positivo para esterilización

- : negativo para esterilización

El reactor de 15,0 L es, desde el punto de vista de valores de los parámetros en estudio, más difícil de esterilizar. Este comportamiento cumple lo esperado puesto que al ser el

reactor más grande, tiene una relación de área superficial-volumen menor al de un reactor más pequeño, al ser la transferencia de calor proporcional al área superficial, disminuye dicha transferencia. Lo anterior justifica que se necesite de mayores tiempos o temperaturas para obtener resultados aceptables. Adicionalmente una mayor cantidad de medio, implica mayor tiempo para que se dé de transferencia de calor necesaria para alcanzar una temperatura dada. Para los volúmenes de 3,6 y 7,2 L solo fue posible superar el valor de 20,0 minutos de letalidad acumulada en los niveles altos de tiempo de operación (75 minutos). En los niveles bajos inclusive hubo resultados negativos para esterilización utilizando los indicadores, esto se atribuye a que el tiempo de esterilización no favorece a la transferencia de calor lo que impide que no se alcance ni siquiera la temperatura necesaria para derretir el pellet (indicador físico).

Para el biorreactor con el volumen de 3,6 L, no se alcanza el valor de 20,0 minutos de letalidad acumulada con los parámetros de esterilización 60 minutos y 125 °C. Pero se observa que el indicador físico da resultado positivo para esterilización. El pellet se derrite si su temperatura llega a 121 °C, aunque en el Cuadro A.11 se observa que no se registra una temperatura mayor a 119,5 °C, este indicador no está en el punto frío, por lo cual es posible que haya alcanzado una temperatura ligeramente más alta. El indicador biológico requiere de 10,2 minutos de letalidad acumulada para disminuir su población en seis ciclos logarítmicos. Para un tiempo de 75 minutos de operación del autoclave se alcanzan valores de letalidad acumulada de 26,9 minutos a 125 °C y 32,2 minutos a 127 °C. En la Figura 8.8 se muestra el perfil tiempo-temperatura para esta corrida. La duración fue de 247 minutos (~4,1 horas). Se nota que al comparar la curva con otros perfiles que se requiere de aproximadamente 15 minutos adicionales para alcanzar su máxima temperatura. La Figura 8.9 muestra la gráfica de letalidad acumulada y temperatura en función de tiempo. Se observa que se alcanza un valor de temperatura 100 °C hasta los 43 minutos. Esto significa que se requiere de un mayor tiempo para alcanzar temperaturas que den aportes significativos a la letalidad. Se supera un valor de letalidad acumulada de 20,0 minutos en el minuto 81, cuando todavía está funcionando el generador de vapor del autoclave.

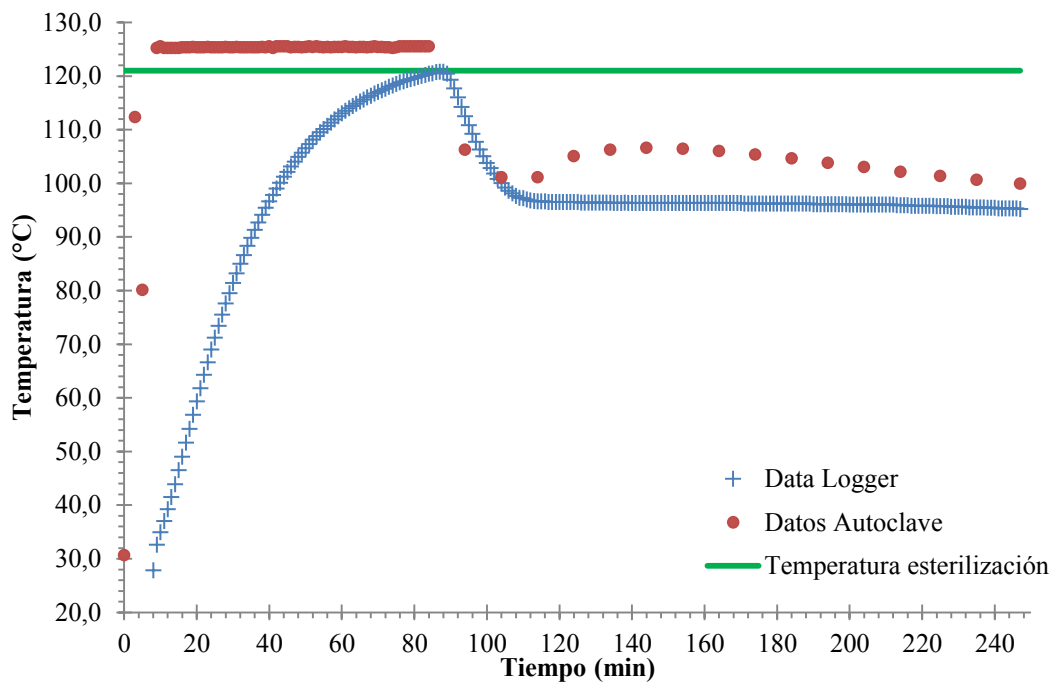


Figura 8.8 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 15,0 L con un volumen de medio de 3,6 L, un tiempo de esterilización de 75 min y temperatura igual a 125 °C

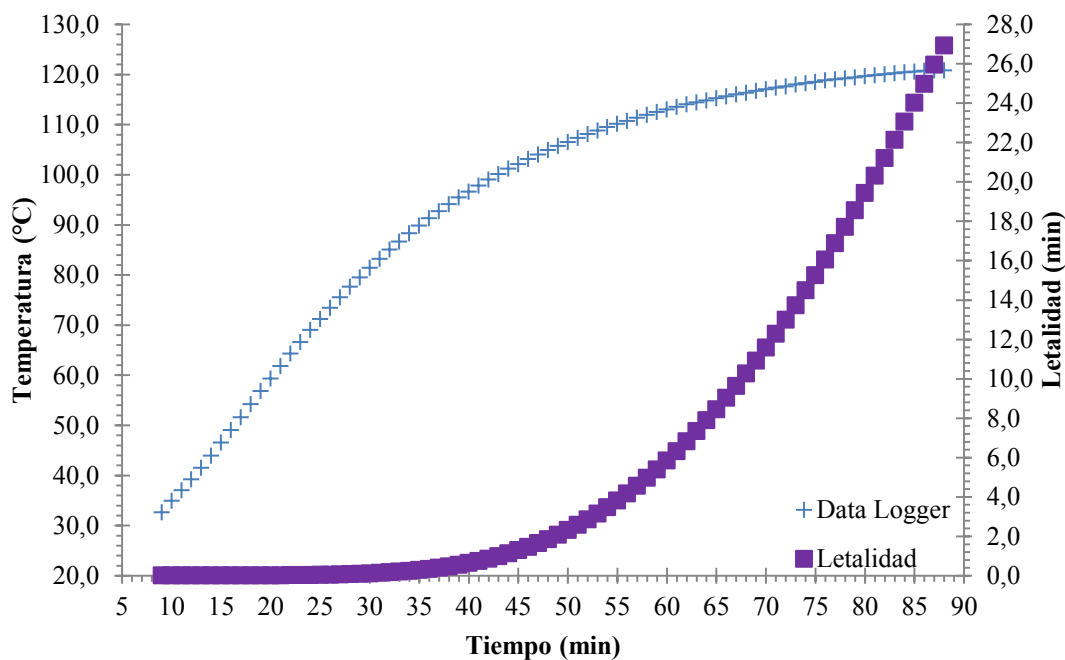


Figura 8.9 Comportamiento de la letalidad y la temperatura en función del tiempo, desde que la autoclave comienza el proceso de esterilización y hasta que se alcanza la máxima temperatura en el interior del biorreactor para la corrida experimental 12

Para 7,2 L de medio de cultivo no se realiza la corrida a 60 minutos y 125 °C debido a que la letalidad acumulada a 127 °C es menor a 20 minutos, y a 125 °C sería aún menor. Para este volumen sólo se alcanza el valor necesario de letalidad acumulada para 75 minutos de tiempo de operación con una temperatura de 127 °C. En la Figura 8.10 se muestra el perfil tiempo-temperatura para la corrida experimental número 16. La duración fue de 230 minutos (~3,8 horas). De forma similar al perfil anterior se requieren cerca de 15 minutos adicionales para alcanzar la máxima temperatura.

En la Figura 8.11 se muestra la gráfica de letalidad acumulada o tiempo equivalente y temperatura en función de tiempo. Se alcanzan los 100 °C hasta el minuto 50. Al comparar este resultado con el perfil anterior se observa como se necesitan alrededor de 10 minutos adicionales para alcanzar un mismo valor de temperatura (100 °C). Se alcanza el valor de letalidad acumulada igual a 20,0 minutos en el minuto 89, es decir, 3 minutos luego de que el autoclave a terminado la etapa de esterilización.

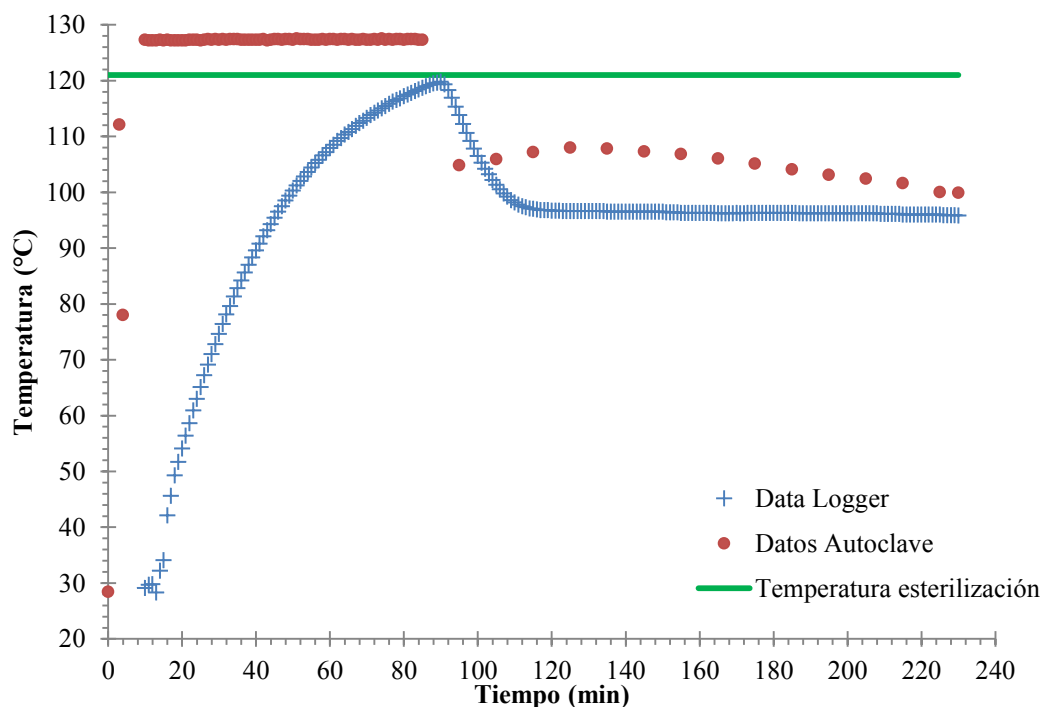


Figura 8.10 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 15,0 L con un volumen de medio de 7,2 L, un tiempo de esterilización de 75 min y temperatura igual a 127 °C

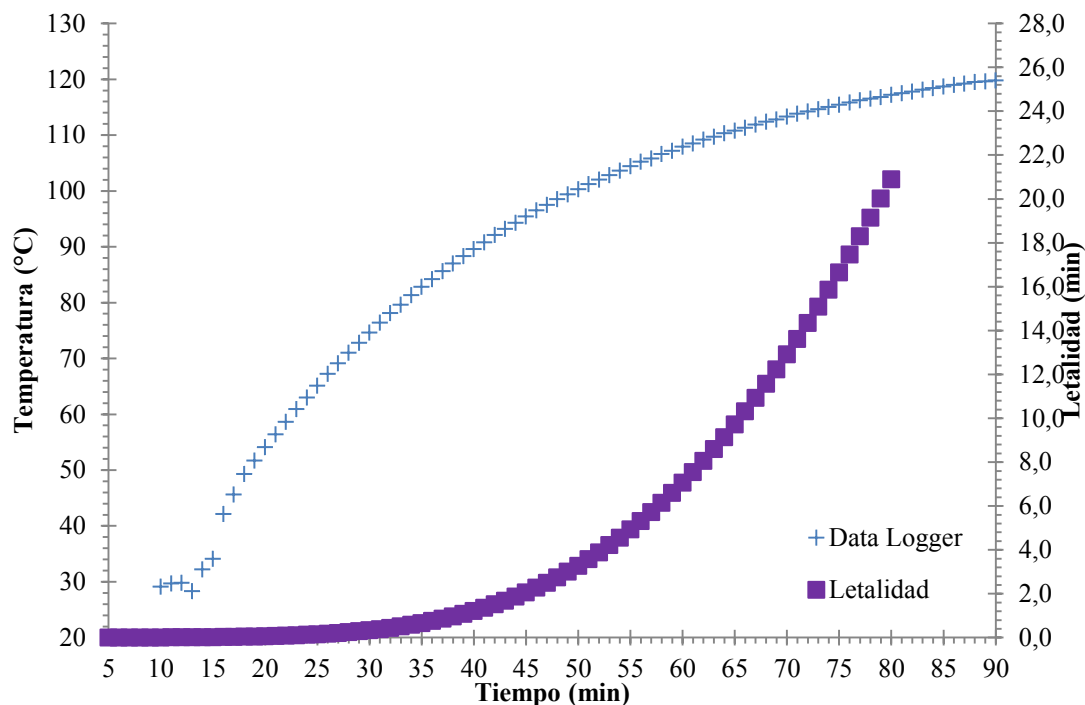


Figura 8.11 Comportamiento de la letalidad y la temperatura en función del tiempo, desde que la autoclave comienza el proceso de esterilización y hasta que se alcanza la máxima temperatura en el interior del biorreactor para la corrida experimental 16

Se realizan dos corridas para el volumen superior. Pero ninguna de ellas supera los 20 minutos de letalidad ni se logra que el pellet utilizado como indicador físico se funda. Puesto que con los parámetros establecidos no es posible esterilizar de manera satisfactoria el reactor con 10,8 L de medio y dado para el resto de volúmenes se necesitan de parámetros más altos, se decide recomendar utilizar una operación alternativa de esterilización. Se recomienda que el medio de cultivo y reactor se esterilicen por separado, y se trasvase el medio de cultivo bajo condiciones asépticas. El Cuadro 8.4 incluye un resumen de los resultados obtenidos en la primera etapa experimental para el biorreactor de 15,0 L.

Los casos expuestos en las secciones 8.2 y 8.3 tienen entre sus similitudes que a pesar de que la temperatura en el interior del biorreactor no supera por 15 minutos los 121 °C (ver Cuadro 4.1), luego de llevar a la incubadora biológica por 48 horas a 60 °C la población de *Geobacillus stearothermophilus* y un indicador que no se ha expuesto al proceso de

esterilización (indicador negativo) se observa que en el indicador (control positivo) no hay crecimiento microbiano, es decir, se logró inactivar las esporas que residían dentro de la ampolla. Para explicar estos resultados es importante, recordar la sección 3.4.1 en la cual se menciona que la muerte celular (inactivación) ocurre en la totalidad del proceso y no solo en la etapa a temperatura constante, en especial para procesos extensos, como lo son los casos en estudio. La exposición del medio de cultivo a temperaturas cercanas a la máxima por un cierto periodo de tiempo tiene un efecto letal importante sobre los microorganismos, y a esto se atribuye la reducción en el número de células del contaminante fuera de la fase isotérmica.

Cuadro 8.4 Resumen de resultados de los indicadores físico-químico, físico y biológico y valor calculado de letalidad en las esterilizaciones realizadas con el biorreactor de 15,0 L.

Volumen de medio (L)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Indicador Físico Químico ^a	Indicador Físico ^a	Indicador biológico ^a	F ₀ (min)
3,6	75	125	+	+	+	26,9
7,2		127	+	+	+	20,8

^a +: positivo para esterilización
- : negativo para esterilización

8.4. Verificación de los parámetros determinados para biorreactor de 7,0 L utilizando un medio de cultivo complejo

En la segunda etapa experimental y con el fin de determinar si los parámetros encontrados en etapas anteriores son aplicables a medios de cultivos complejos como la melaza, se realizan esterilizaciones en el biorreactor de 7,0 L con los parámetros de tiempo y temperatura expuestos en la sección 8.2 (Cuadro 8.2) según el volumen de trabajo.

Se realiza cada una de las pruebas por triplicado, los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 8.5. Se debe mencionar que para este caso particular, el uso de los indicadores de esterilidad pasa a segundo plano y cobran mayor importancia las pruebas microbiológicas. Dichas pruebas permiten cuantificar la carga inicial de microorganismos en la melaza, es

decir, el medio de cultivo que no ha sido sometido a un proceso de esterilización, así como la reducción microbiana luego de dicho proceso.

En el Cuadro 8.5, se exponen los resultados de letalidad y los conteos microbianos realizados a las muestras de melaza. Los resultados de cada una de las réplicas se presentan en lo Cuadro A.22 y A.23 El valor de letalidad disminuye conforme aumenta el volumen de medio, aun cuando los volúmenes de medio de 3,0 y 4,5 L son sometidos a una temperatura mayor. Este resultado se encuentra dentro de lo esperado, si se considera que la melaza es una sustancia muy viscosa por lo que la transferencia de calor resulta menos eficiente en comparación con las esterilizaciones realizadas con agua.

Cuadro 8.5 Resultados obtenidos en las distintas corridas realizadas con el biorreactor de 7,0 L con melaza como medio de cultivo, para un tiempo de esterilización de 60 min.

T (°C)	V (L)	Hongos^a (UFC ₁ /mL)	Hongos^b (UFC ₂ /mL)	Bacterias^a (UFC ₁ /mL)	Bacterias^b (UFC ₂ /mL)	F₀ (min)
125	1,5	9,00 x10 ⁸	0	3,00 x10 ⁸	0	21,4
127	3,0	3,80 x10 ¹⁰	0	2,20 x10 ⁹	0	15,0
127	4,5	6,00 x10 ⁸	0	6,50 x10 ⁹	0	9,28

^a Conteos iniciales

^b Conteos finales

Para el volumen de 1,5 L no hay una diferencia significativa en el valor de letalidad si se le compara con las corridas con agua como medio de cultivo. Sin embargo, la diferencia resulta importante en los otros dos niveles de volumen. Aun cuando podría parecer que el tratamiento térmico determinado no es aplicable a este medio de cultivo, cabe dejar de lado el resultado numérico de la letalidad para enfocarse en el estudio de los conteos microbianos.

Antes de proceder a este análisis, durante la etapa experimental se debió establecer un procedimiento para el conteo de los microorganismos en la melaza alimenticia, debido a que en pruebas preliminares fue difícil realizarlo puesto que no se presentaba crecimiento luego de la incubación. O caso contrario, el crecimiento era tan rápido que tras dejar las

muestras en incubación al final del día, a la mañana del día siguiente la placa ya no era contable, es decir, ya no se distinguían las unidades formadoras de colonias, haciendo impráctico el tiempo de conteo.

Se determinó que una concentración de melaza de 30 g/L resultaba adecuada ya que se ajusta a los valores que usualmente se utilizan en investigaciones realizadas en CENIBiot. Se realizaron pruebas preliminares con una concentración de 15 g/L sin embargo los conteos no eran prácticos, ya que se encontraban por debajo de los límites establecidos del método.

Con el fin de cuantificar la carga microbiana de la melaza previo y posterior al tratamiento de esterilización, se sembraron en placas de agar papa dextrosa y tripticasa soya muestras de 100 μ L de las diluciones seriadas para la melaza inicial y final. Al inicio del procedimiento, no se conocía cuál de las diluciones seriadas (ver Apéndice D, sección D.4) sería la que permitiría realizar los conteos, por lo que inicialmente se sembraron todas las diluciones desde 10^0 (muestra original) hasta 10^{-7} , por duplicado. Para la melaza sin esterilizar se siembran las diluciones de 10^{-6} y 10^{-7} . Y para el caso de la melaza esterilizada se realiza el mismo estudio y se siembran las diluciones 10^0 y 10^{-1} . Sembrar el resto de las diluciones seriadas no aportaba información relevante a la investigación, debido al rápido crecimiento de las bacterias en las placas, al revisarlas luego de 16 horas de incubación a 35 °C (bacterias) las diluciones más concentradas presentaban colonias del microorganismo tan crecidas que se unían como una sola la cual no era posible cuantificar.

Se determinó con las corridas 1 y 2 (Cuadros A.22 y A.23), que si bien las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} permitían un conteo adecuado de las placas, el número de unidades formadoras de colonias permanecía por debajo de los valores consultados en la literatura, por lo que se realizó una búsqueda bibliográfica que dio un primer indicio de la identidad del contaminante principal de la melaza *Bacillus Cereus*, ya que para este microorganismo el intervalo de conteo aceptable es menor. (ver Apéndice D, sección D.7).

Uno de los resultados más importantes arrojados por esta investigación se enfoca en los conteos microbianos de la melaza luego del proceso de esterilización, ya que no se registra crecimiento de bacterias ni hongos en ninguna de las diluciones sembradas en las placas de Petri.

En la Figura 8.12, se muestra un ejemplo de dos placas de tripticasa soya agar. En la imagen a la izquierda se muestra un conteo típico de bacterias luego de la incubación, las colonias se señalan con marcador en el plato de Petri en el cual se sembró la muestra de melaza no estéril. En el plato de Petri que se observa en la figura a la derecha se observa como al sembrar una muestra que sí ha sido esterilizada ya no se encuentra crecimiento microbiano luego de la incubación.

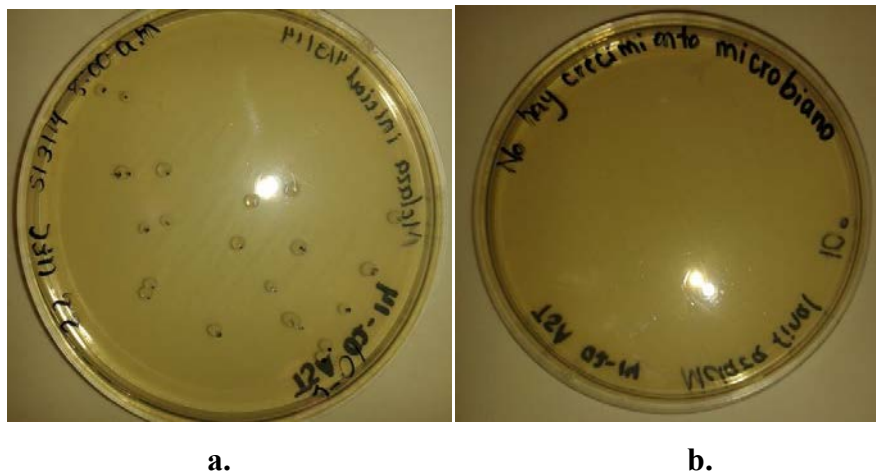


Figura 8.12 Placas de agar tripticasa soya utilizadas en el conteo de bacterias presentes en la melaza **a.** dilución 10^{-6} de melaza inicial **b.** muestra original de melaza final

Las disoluciones de melaza se realizaron en agua peptonada tamponada. De esta forma se promueve un mayor crecimiento microbiano. El agua peptonada se debe esterilizar con el fin de eliminar cualquier contaminación proveniente de su preparación. La disolución de melaza se realiza en la cámara de bioseguridad con el fin de mantener las condiciones asépticas y luego se dejaba en incubación por 16 horas a 170 rpm y 35 °C en el equipo de agitación con control de temperatura. Estas dos operaciones se ilustran en la Figura 8.13.

Los Erlenmeyers en los que se preparaba la disolución se dejaban en crecimiento durante la noche y luego de 16 horas de incubación, se procedía a llenar el biorreactor con el volumen necesario para comenzar el proceso de esterilización. Se tomaban muestras de la melaza inicial (aproximadamente 10 mL) para realizar las pruebas microbiológicas y los análisis de azúcares (sección 8.4.1).

En las Figura 8.14, 8.15 y 8.16, se muestran los perfiles térmicos de una corrida experimental para cada volumen. El comportamiento de la curva sigue manteniendo la misma tendencia que el mostrado en gráficos anteriores. Sin embargo, sí hay una diferencia en las Figuras 8.15 y 8.16 ya que en ellas la curva para los datos de temperatura interna del biorreactor en función del tiempo, no se acerca a los 121 °C. Esto evidencia que al aumentar el volumen de melaza disminuye la penetración de calor en el interior del biorreactor. Las gráficas siguientes corresponden a las corridas con el valor de letalidad asociado a la mediana de cada triplete de datos.



a.

b.

Figura 8.13 Preparación del medio de cultivo para su posterior esterilización **a.** disoluciones de melaza con una concentración de 30 g por litro de agua peptonada **b.** crecimiento de melaza en el agitador con control de temperatura.

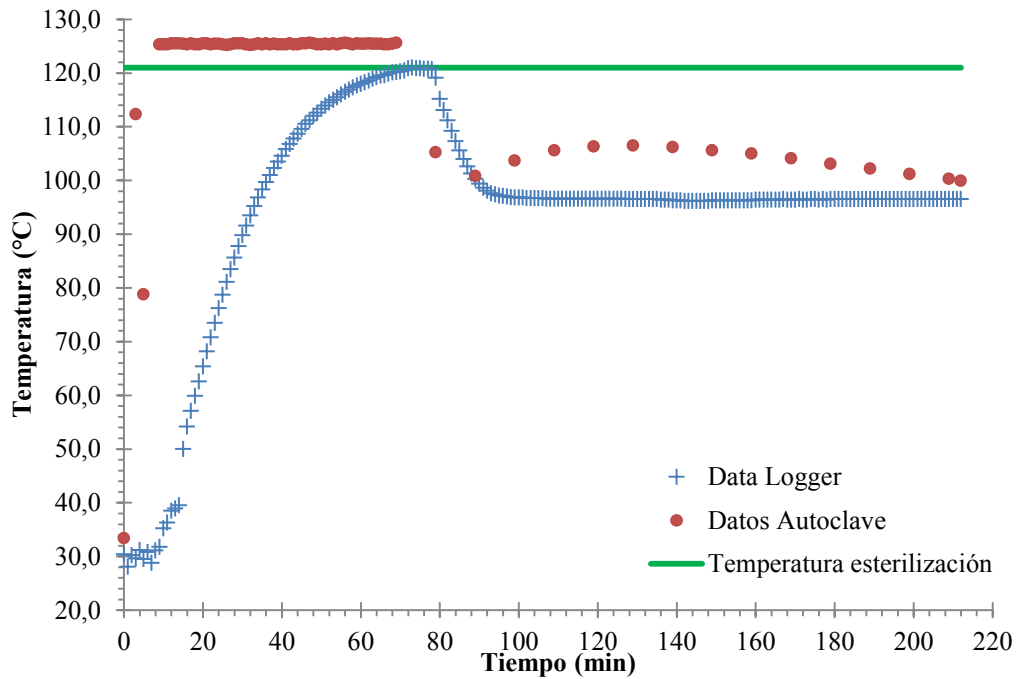


Figura 8.14 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 7,0 L con un volumen de melaza de 1,5 L, un tiempo de esterilización de 60 min y temperatura igual a 125 °C

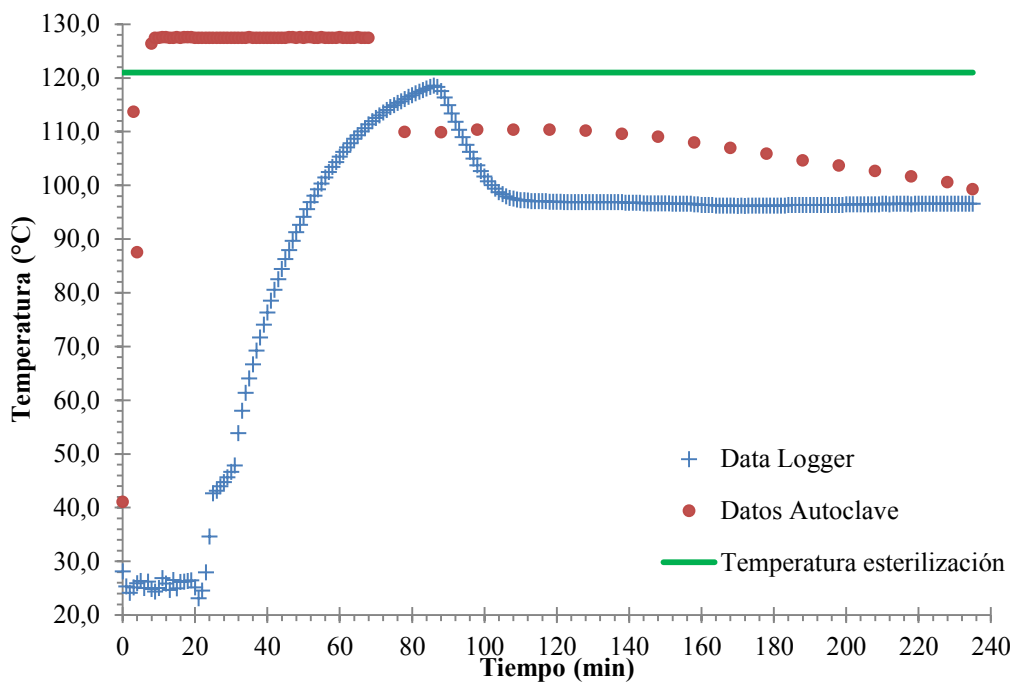


Figura 8.15 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 7,0 L con un volumen de melaza de 3,0 L, un tiempo de esterilización de 60 min y temperatura igual a 127 °C

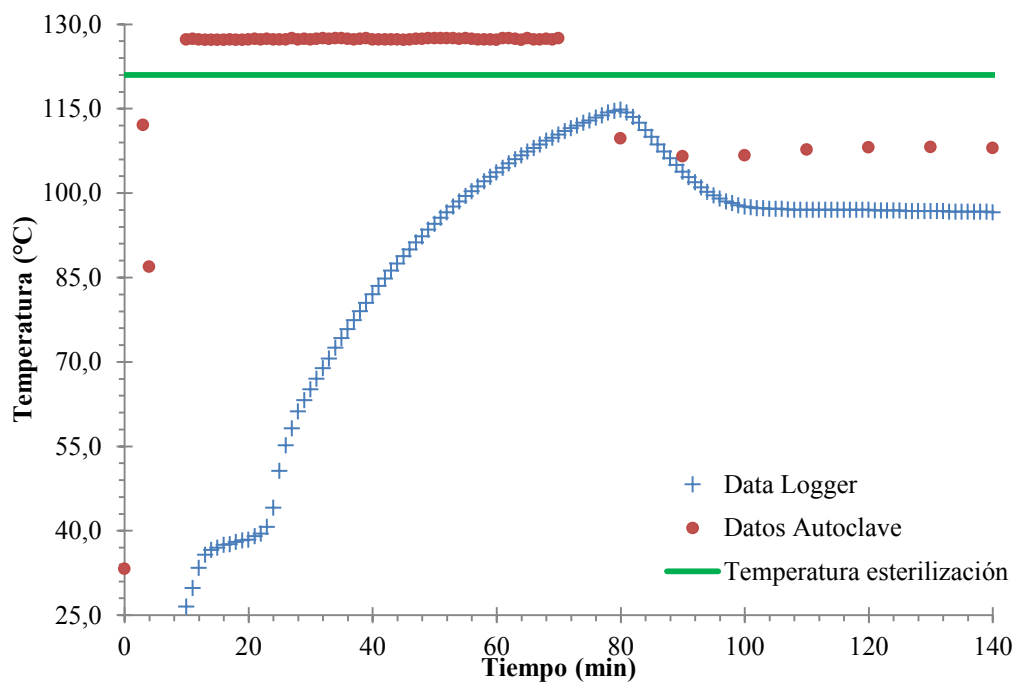


Figura 8.16 Curva temperatura tiempo para el biorreactor enchaquetado de 7,0 L con un volumen de melaza de 4,5 L, un tiempo de esterilización de 60 min y temperatura igual a 127 °C

Se realizó un análisis estadístico para estudiar si hubo diferencias significativas entre los distintos volúmenes de medio, comparando en cada caso pares de datos de unidades formadoras de colonias asociadas a la masa de melaza inoculada. Previo al análisis estadístico, se deben linealizar los resultados de UFC para cada esterilización, para este fin se escoge una linealización logarítmica (Jarvis, 2008). De acuerdo a la Figura 8.17, se puede afirmar con un nivel de confianza del 96% que hay una diferencia en la carga microbiana inicial a distintos volúmenes de melaza. Las muestras tratadas presentan una diferencias si se compara el nivel más bajo de masa con el más alto. Lo anterior denota que la diferencia en UFC iniciales es importante sólo para diferencias de volúmenes grandes. Para el procesamiento de estos datos se utiliza el software Minitab.

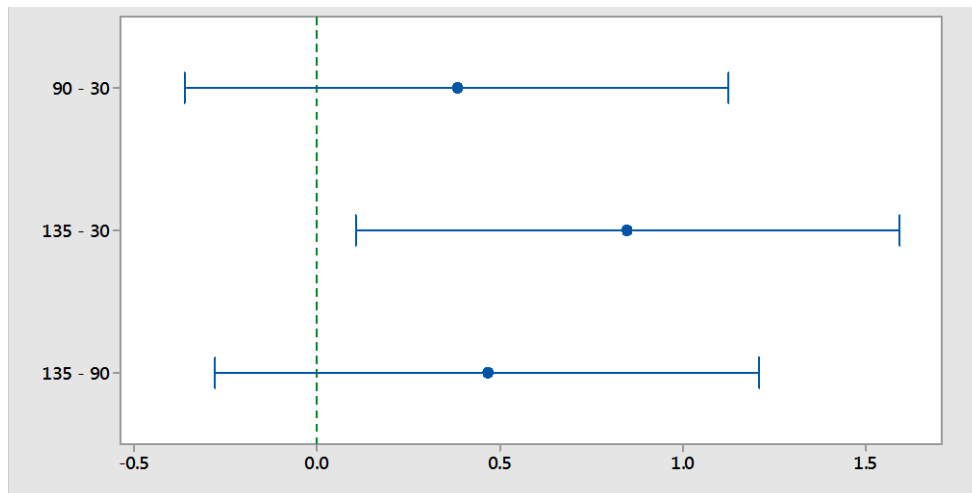


Figura 8.17 Combinaciones entre los distintos valores de masa de melaza utilizada para determinar diferencias de las medias de las unidades formadoras de colonias linealizadas

En la Figura 8.18 se presentan las gráficas de residuos para el caso en estudio, los datos se ajustan a una línea recta por lo que se acepta el supuesto de normalidad. En la gráfica de residuos contra valores ajustados se observa un comportamiento similar para las muestras que corresponden a una misma masa de melaza, por lo que no se aprecia un comportamiento aleatorio marcado. El histograma confirma que no hay valores atípicos y el gráfico de residuos contra orden de observación presenta un comportamiento aleatorio con valores alrededor de cero. Para este análisis se obtuvo un valor p igual a 0,175 por lo que se rechazó la hipótesis de que todas las muestras eran iguales y confirma la hipótesis de que al menos una de las muestras es diferente a las demás.

Se concluye entonces que el tratamiento térmico determinado en la primera etapa experimental es aplicable al biorreactor de 7,0 L para esterilizar melaza de grado alimenticio. Lo anterior debido a que las pruebas microbiológicas muestran que no hay crecimiento de hongos ni bacterias en el medio de cultivo esterilizado.

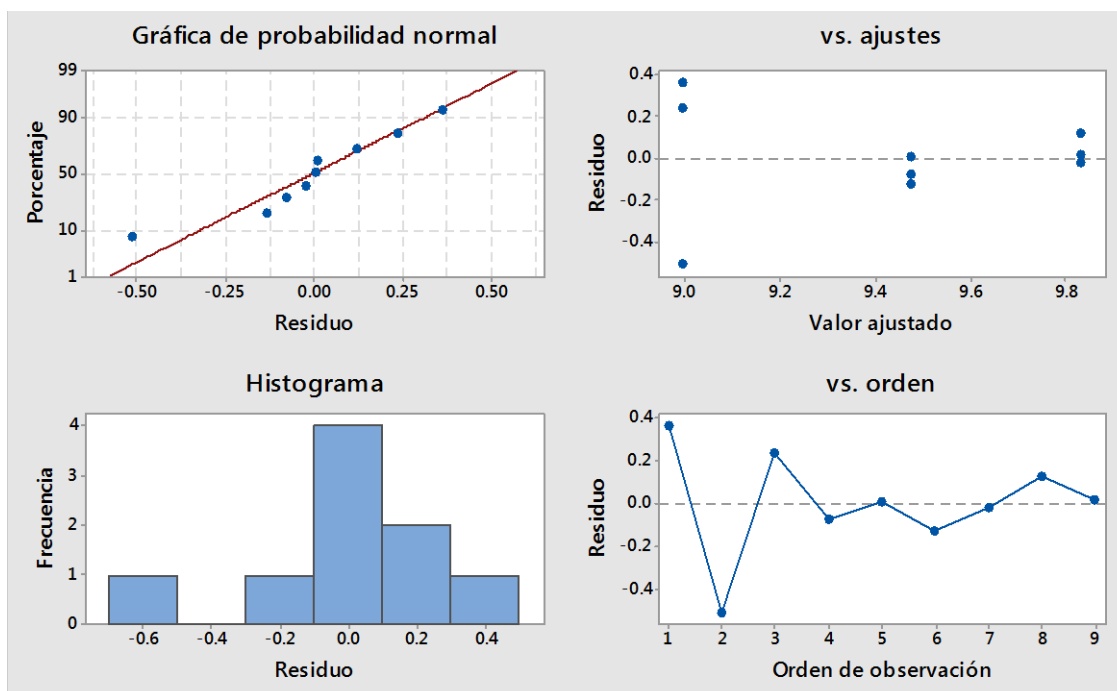


Figura 8.18 Gráficas de residuos para el valor linealizado de las UFC para el estudio del cumplimiento de los supuestos del modelo.

8.4.1. Cuantificación de azúcares fermentables y el estudio de la degradación del medio de cultivo

Para estudiar el comportamiento de los azúcares fermentables luego de realizar un procedimiento de esterilización y poder cuantificar la degradación de azúcares más complejos se utiliza un analizador bioquímico. Los resultados obtenidos aparecen en el Cuadro A.24 (ver Apéndice A), el comportamiento general se analiza a partir de los resultados mostrados en el Cuadro 8.6.

Los resultados permiten afirmar que hay una mayor cantidad de sacarosa en comparación con la glucosa en el medio tanto antes y después de esterilizar. El aumento en la concentración de ambos azúcares se puede atribuir a la descomposición térmica de cadenas de azúcares más complejos (polisacáridos) como por ejemplo el almidón, utilizado como estabilizante en muchos productos alimenticios.

Cuadro 8.6 Resultados de concentración de azúcares fermentables presentes en las muestras de melaza para cada esterilización con el biorreactor de 7,0, con un tiempo de esterilización de 60 min.

Corrida	Temperatura (°C)	Volumen (L)	Sacarosa ₁ (g/L)	Sacarosa ₂ (g/L)	Dextrosa ₁ (g/L)	Dextrosa ₂ (g/L)
1	125	1,5	9,33	12,2	0,160	0,920
5	127	3,0	7,57	12,2	0,085	0,859
9	127	4,5	11,0	11,7	1,90	3,59

¹ Concentración inicial: previo a la esterilización

² Concentración final: luego de la esterilización

Puesto que la presencia de azúcares fermentables favorece el crecimiento de los microorganismos inoculados al biorreactor, es importante que no haya una disminución abrupta en la concentración de los mismos ya que esto podría afectar la composición del medio de cultivo y el rendimiento de los metabolitos producidos en la fermentación y .

Si se desea un estudio más extenso acerca de la degradación de estos azúcares superiores se recomienda realizar pruebas con un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

8.4.2. Identificación del microorganismo contaminante en la melaza grado alimenticio utilizando técnicas de biología molecular

Debido a que los conteos microbianos de las muestras de melaza analizadas se mantuvieron por debajo de lo recomendado en la literatura, se recurrió a una técnica de biología molecular para la identificación de la bacteria presente en las placas de tripticosa soya.

Se centró la atención en la identificación del contaminante bacteriano debido a que como se muestra en el Cuadro 3.1 las esporas bacterianas presentan una resistencia a los procesos de esterilización mucho mayor que los hongos. Se infiere de lo anterior, que al lograr eliminar el contaminante de naturaleza bacteriana, el tratamiento resulta suficiente para eliminar del medio de cultivo también los hongos presentes.

Para la identificación del microorganismo de interés se siguió el procedimiento descrito en la sección 7.3.7. Luego de comparar la secuencia obtenida con los registros existentes en la base de datos en línea del NCBI, se utilizó el método BLAST® y se obtuvieron tres posibles identidades para el microorganismo en estudio *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus*.

El motivo por el cual no se obtiene en la base de datos la identidad del microorganismo es debido a que la región del ADN estudiada es una región conservada. Esto quiere decir que lo que se obtiene es un acercamiento a la identidad de la bacteria analizada y se ubica a la bacteria en esta clasificación de *Bacillus*.

Para poder llegar a un resultado más específico se recurre a la identificación por morfología realizando tinciones y pruebas para características específicas de estos microorganismos. Con el fin de resumir la información necesaria para terminar el proceso de identificación se incluye el Cuadro 8.7.

Se realizaron las tinciones con cristal violeta y azul de coomassie con el fin de observar si había presencia de estructuras cristalinas (proteínas), sin embargo luego de ver las tinciones (Figura 8.19) realizadas al microscopio no se encuentra presencia cristalina al esporular. Lo anterior permite descartar *B. thuringiensis* de las opciones.

Cuadro 8.7 Características de los *Bacillus* para identificación final, a partir de la información obtenida en la secuencia del microorganismo.

	<i>B. Thuringiensis</i>	<i>B. Anthracis</i>	<i>B. Cereus</i>
Gram positivo	✓	✓	✓
Anaerobio facultativo	✓	✓	✓
Móvil	✓	✗	✓
Cristal al esporular	✓	✗	✗

La segunda prueba seleccionada es la de movilidad, tal como se observa el Figura 8.20 el microorganismo presente en la muestra analizada sí muestra movilidad, es decir, durante su

crecimiento se extiende hacia los bordes de la placa Petri, por lo que se descarta que el microorganismo sea *B. Anthracis*.

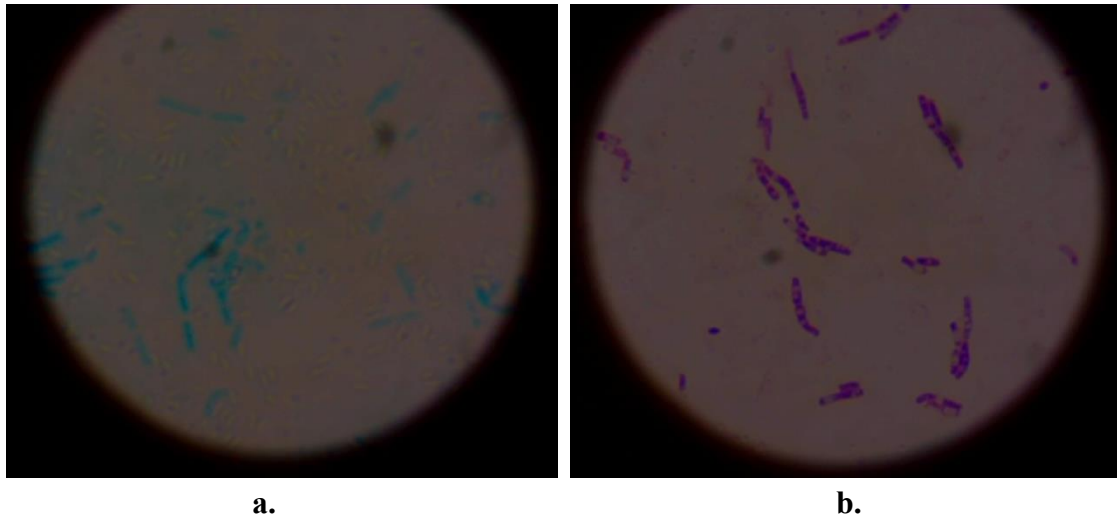


Figura 8.19 Tinciones realizadas al frotis del *Bacillus* en estudio **a.** Tinción con azul de coomassie, en azul se observa la cadena correspondiente al microorganismo y en el contraste las esporas **b.** Tinción con cristal violeta, las bacterias con coloración morado se clasifican como Gram positivo

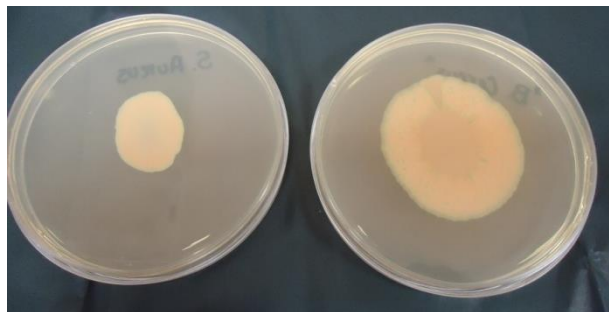


Figura 8.20 Prueba de movilidad realizada en placas de tripticasa soya, a la izquierda un microorganismo de referencia no móvil (*Bacillus aureus*) y a la derecha el microorganismo de interés.

Este resultado arroja finalmente la identidad del contaminante principal en la melaza estudiada: *Bacillus Cereus*. Por lo que se justifica los conteos bajos en las unidades formadoras de colonias, debido a que este microorganismo es una excepción y sus conteos van entre los 3 – 30 UFC tal como se indica el Apéndice D, sección D.

Capítulo 9 Conclusiones y recomendaciones

Se presenta en este capítulo las conclusiones obtenidas a partir de la investigación y las recomendaciones en caso de trabajo posteriores en este tema.

9.1. Conclusiones

- Para los biorreactores de 7,0 L se determinaron los siguientes parámetros de esterilización de acuerdo al volumen de medio, si se desea esterilizar 1,5 L de un medio del cultivo se debe programar el autoclave para esterilizar a 125 °C durante 60 minutos, si se desea esterilizar un volumen superior como por ejemplo 3,0 L ó 4,5 L así como volúmenes intermedios se debe aumentar la temperatura a 127 °C durante 60 min.
- Para los biorreactores de 15,0 L con un volumen de medio de cultivo igual a 3,6 L se determinó que los parámetros de esterilización satisfactorios son 75 minutos a 125 °C y para un volumen de 7,2 L los parámetros son 75 minutos a 127 °C.
- Se concluye que para esterilizar los medios de cultivo en biorreactores de 15,0 L lo recomendable es esterilizar por aparte el medio y el biorreactor. Además se debe realizar el trasvase del medio y la inoculación en condiciones asépticas.
- Los parámetros determinados durante la esterilización de biorreactores de 7,0 L logran condiciones estériles para medios de cultivos sintéticos y medios de cultivo complejos, siempre que éstos últimos tengan una composición homogénea y una carga microbiana inicial igual o similar a la de la melaza utilizada en el presente estudio.
- El tratamiento térmico verificado para en el biorreactor de 7,0 L con un medio de cultivo complejo provoca una degradación de los azúcares complejos presentes en

la melaza y ocasiona un aumento en la concentración de azúcares fermentables: sacarosa y glucosa.

- El principal contaminante bacteriano de la melaza utilizada en el presente estudio como medio de cultivo complejo es el *Bacillus cereus*. Este microorganismo es una excepción a la regla de los conteos microbianos y su identificación justifica los resultados obtenidos en las unidades formadoras de colonias.

9.2. Recomendaciones

- En todos los ciclos de esterilización se recomienda incluir al menos un monitor de esterilidad ya que aunque se utilicen los valores dados en esta investigación, es importante tener controles de rutina que garanticen que cada uno de las esterilizaciones es satisfactoria.
- Si se desea trabajar con los biorreactores de 15,0 L se recomienda esterilizar por aparte el medio de cultivo y el biorreactor. De forma que el medio se pueda esterilizar en botellas en un autoclave pequeño, mientras que el biorreactor se esteriliza en el autoclave donde se realizaron las pruebas del presente estudio.
- Si se decide esterilizar por aparte el medio de cultivo en autoclave pequeña lo recomendable es utilizar los monitores o indicadores presentados en este documento con el fin de verificar que el medio es realmente estéril y hacer uso de estos indicadores en cada una de las cargas a esterilizar.
- Se recomienda repetir la serie de experimentos presentadas en este estudio con un número mayor de biorreactores, con el fin de comparar las curvas temperatura-tiempo de cada uno con el fin de validar el uso del protocolo diseñado con una carga mayor de esterilización.

- Para la esterilización de medios de cultivos complejos con una alta carga microbiana y composición heterogénea, por ejemplo con restos sólidos u otras impurezas, se recomienda un tratamiento previo con operaciones como filtración y pasteurización.
- Caracterización de la melaza utilizando el método de HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) para la identificación de la totalidad de azúcares y otras sustancias que componen la melaza. Se recomienda realizar estas pruebas con muestras no estériles y muestras luego del tratamiento térmico para cuantificar la disminución en la concentración de azúcares complejos y el aumento de concentración en moléculas de azúcares más simples.
- Con el fin de identificar los principales contaminantes de la melaza se recomienda la identificación del principal contaminante presente en las placas de papa dextrosa.

Capítulo 10 Nomenclatura

Símbolo	Definición	Unidades
<i>A</i>	Área de la superficie de transmisión de calor	m ²
<i>A</i>	Constante de Arrhenius	min ⁻¹
<i>C</i>	Capacidad calorífica	
<i>C</i>	Concentración	mg/L
<i>CFU</i>	Unidades formadoras de colonias	-
<i>D</i>	Reducción decimal	min
<i>E_a</i>	Energía de activación	kJ mol ⁻¹
<i>F</i>	Tiempo de muerte	min
<i>M</i>	Caudal másico	kg/s
<i>Q</i>	Velocidad de transmisión de calor	W
<i>R</i>	Constante universal de los gases	J mol/K
<i>T</i>	Temperatura	°C, °F, K
<i>U</i>	Coefficiente global de transmisión de calor	W/m ² K
<i>Z</i>	Resistencia térmica	°C
<i>k</i>	Velocidad específica de muerte	min ⁻¹
<i>t</i>	Tiempo	min, s
Subíndices		
0	Inicial/Entrada	Adimensional
1	Punto inicial	Adimensional
2	Punto final	Adimensional
A	Hace referencia al autoclave	Adimensional
B	Hace referencia al biorreactor	Adimensional
E	Hace referencia a la esterilización	Adimensional
R	Estado de referencia	Adimensional

Símbolo	Definición	Unidades
<i>ci</i>	Hace referencia a la entrada del agua de refrigeración	Adimensional
<i>m</i>	Hace referencia al medio	Adimensional
<i>p</i>	Hace referencia a la presión contante	Adimensional
<i>pw</i>	Hace referencia al agua de refrigeración	Adimensional
<i>s</i>	Hace referencia al vapor	Adimensional
<i>w</i>	Hace referencia al agua de refrigeración	Adimensional

Capítulo 11 Bibliografía

- 3M Chile. (2013). *Ficha técnica: Control químico clase 5 comply 1243B Integrador para Vapor*. Chile.
- Baird, R. (2004). Sterility assurance: concepts, methods and problems. En H. & Russell, *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization* (págs. 526-539). Oxford: Blackwell Publishing.
- Becton Dickinson France SA. (2003). *Instructions for use - partially completed bottled media: BD Tryptic Soy Agar*. Le Pont de Claix: BD Diagnostic Systems Europe.
- Block, S. (1971). *Disinfection, sterilization and preservation*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Bungay, H., Humphrey, A., & Tsao, G. (1999). Biochemical Engineering. En R. Perrit, *Manual del ingeniero químico - Perry* (págs. 24-7). McGraw-Hill.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima: Centro Internacional de la Papa.
- Deindoerfer, F., & Humphrey, A. (1959). Analytical Method for Calculating Heat Sterilization Times. *Applied Microbiology*, 256-264.
- DIACK. (2013). *DIACK® Sterilization Monitors*. Recuperado el 28 de Agosto de 2013, de <http://www.diackinc.com/diack-sterilization-monitors/how-they-work>
- Doran, P. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Zaragoza: Acribia S.A. .
- Ertola, R., Yantorno, O., & Mignone, C. (2003). *Microbiología Industrial*. Departamento de Asuntos Científicos y Tecnológicos de la Secretaría.
- Escuela de Ciencias Biológicas UNA. (2011). *Manual de Laboratorio: Microbiología aplicada*. Heredia.
- Fuller, J. (2007). *Instrumentación quirúrgica: teoría, técnicas y procedimientos*. España: Médica Panamericana S.A.
- García, V. (2004). *Introducción a la microbiología*. San José: EUNED.
- Garfinkle, B., & Henley, M. (2003). *Remington: Farmacia*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Ghani, A., & Farid, M. (2006). *Sterilization of Food in Retort Pouches*. New York: Springer Science.
- Gould, G. (2004). Sterilization. En H. & Russell, *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization* (págs. 361-383). Oxford: Blackwell Publishing.
- Granados, R., & Vilaverde, M. (1997). *Microbiología*. Madrid: Ediciones Paraninfo.
- Hopp, V. (2005). *Fundamentos de tecnología química*. Barcelona: Reverté.

- Jarvis, B. (2008). *Statistical aspects of microbiological examination of foods*. Academic Press.
- Kumar, R. (2007). *Food and industrial microbiology*. New Delhi.
- Liu, S. (2013). *Bioprocess Engineering*. Elsevier.
- MacFaddin, J. (1985). *Media for isolation-cultivation-maintenance of medical bacteria*. Baltimore: Williams and Wilkins.
- MadgeTech. (2008). *Operation Manual for RF Series Data Loggers*. Madge Tech, Inc. .
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock: Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Prentice Hall.
- Marshall, R. (1993). *Standard methods for the examination on dairy products*. Washington, D.C. : American Public Health Association .
- McDonnell, G. (2007). *Antisepsis, disinfection and sterilization*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Merck. (2014). *Merck Microbiology Manual* . Alemania.
- Mora, L., & Paz, R. *Manual de bioindicadores y otras técnicas de control en la esterilidad por calor seco y húmedo*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Morales, E., & Villalobos, A. (1985). *Comercialización de productos agropecuarios*. San José: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Moreno, S., & Bayo, J. (1996). *Diseño de biorreactores y enzimología*. Murcia: Universidad de Murcia: Servicio de Publicaciones.
- Okafor, N. (2007). *Modern Industrial: Microbiology and Biotechnology*. Enfield: Science Publishers.
- Olivas, E. (2001). *Manual de prácticas de microbiología I,II y parasitología*. Chihuahua: Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez.
- Organización Panamericana de la Salud. (2008). *Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis*. Organización Panamericana de la Salud.
- Padrón, A., Fernández, J., Suárez, J., Pucheta, L., Limia, G., Carballosa, L., y otros. (2001). Determinación del tiempo equivalente acumulado durante los ciclos de esterilización por vapor saturado en un fermentador empleado en la producción de vacunas. *VacciMonitor* , 1-6.
- Pascual, M., & Calderón, V. (2000). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Madrid: Días de Santos S.A.
- Pelczar, M., & Chan, E. (1981). *Elements of microbiology*. Tokyo: McGraw-Hill, Inc.
- Prats, G. (2005). *Microbiología clínica*. Madrid: Médica Panamericana.

- Ramaswamy, H., & Marcotte, M. (2006). *Food Processing: Principles and Applications*. Florida: CRC Press.
- Ramírez, R. (1986). *Estudio de prefactibilidad para la producción de ácido cítrico en Costa Rica vía fermentativa a partir de melazas*. San José: Universidad de Costa Rica.
- Sharma, S., Mulvaney, S., & Rizvi, S. (2003). *Ingeniería de alimentos: Operaciones unitarias y práctica de laboratorio*. México, D.F.: Limusa, S.A. .
- Singh, P., & Heldmand, D. (1993). *Introduction to food engineering* (Segunda edición ed.). Reino Unido: Academic Press Limited.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires: Panamericana.
- Tuttnauer. (2009). *Operation & Maintenance Manual*. Israel.
- Valentas, K., Rotstein, E., & Singh, P. (1997). *Handbook of Food Engineering Practice*. Estados Unidos: CRC Press.
- Yousef, A., & Carlstrom, C. (2003). *Food microbiology: a laboratory manual*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- YSI incorporated. (2000). *YSI 2700 SELECT: Biochemistry analyzer*. Ohio.
- YSI-Incorporated. (2000). *YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyzer User's Manual*. Ohio: YSI Incorporated.
- Zuñiga, L. D. (2010). *Evaluación del rendimiento en la producción de bioetanol con una levadura seleccionada utilizando dos fuentes de sustrato*. San José: Universidad de Costa Rica.

APÉNDICES

Cuadro A.1 Resultados para la corrida 1 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 127 °C durante 75 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	24,1	30,8	-	-
1	24,5	32,3	-	-
2	25,2	-	-	-
3	25,8	112	-	-
4	26,1	77,5	-	-
5	25,8	-	-	-
6	25,3	-	-	-
7	25,0	-	-	-
8	24,8	-	-	-
9	24,7	127,2	0,000	0,000
10	24,6	127,1	0,000	0,000
11	24,5	127,5	0,000	0,000
12	24,5	127,5	0,000	0,000
13	24,5	127,5	0,000	0,000
14	24,6	127,5	0,000	0,000
15	25,3	127,5	0,000	0,001
16	28,5	127,5	0,000	0,001
17	32,3	127,5	0,000	0,001
18	35,1	127,5	0,000	0,001
19	38,2	127,2	0,000	0,001
20	41,5	127,2	0,000	0,002
21	44,8	127,3	0,001	0,002
22	48,2	127,3	0,001	0,003
23	51,6	127,3	0,001	0,004
24	54,8	127,3	0,002	0,006
25	58,0	127,3	0,002	0,008
26	61,1	127,3	0,003	0,011
27	64,0	127,2	0,004	0,014
28	66,9	127,2	0,006	0,019
29	69,6	127,2	0,007	0,026
30	72,3	127,3	0,009	0,034
31	74,8	127,3	0,012	0,045
32	77,2	127,3	0,015	0,058
33	79,5	127,3	0,019	0,075
34	81,7	127,4	0,023	0,096
35	83,8	127,3	0,028	0,121

Cuadro A.1 Resultados para la corrida 1 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 127 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
36	85,8	127,3	0,034	0,152
37	87,6	127,4	0,041	0,190
38	89,5	127,2	0,049	0,234
39	91,2	127,3	0,057	0,287
40	92,8	127,3	0,067	0,350
41	94,4	127,3	0,078	0,422
42	95,9	127,3	0,090	0,506
43	97,3	127,3	0,103	0,602
44	98,7	127,3	0,118	0,713
45	100,0	127,4	0,133	0,838
46	101,2	127,3	0,150	0,980
47	102,4	127,3	0,168	1,138
48	103,5	127,4	0,187	1,316
49	104,5	127,4	0,205	1,512
50	105,5	127,3	0,226	1,727
51	106,5	127,3	0,249	1,965
52	107,4	127,3	0,271	2,225
53	108,3	127,3	0,296	2,508
54	109,1	127,4	0,319	2,816
55	109,9	127,3	0,345	3,148
56	110,6	127,3	0,369	3,504
57	111,4	127,3	0,398	3,888
58	112,1	127,3	0,426	4,300
59	112,8	127,3	0,455	4,740
60	113,4	127,3	0,482	5,209
61	114,0	127,3	0,511	5,706
62	114,6	127,4	0,541	6,232
63	115,2	127,3	0,573	6,789
64	115,6	127,3	0,596	7,373
65	116,2	127,4	0,631	7,987
66	116,6	127,3	0,656	8,630
67	117,1	127,3	0,688	9,302
68	117,5	127,3	0,715	10,003
69	117,9	127,3	0,743	10,732
70	118,3	127,3	0,772	11,489
71	118,6	127,5	0,794	12,272
72	119,0	127,3	0,825	13,082
73	119,3	127,5	0,850	13,919
74	119,6	127,2	0,874	14,781

Cuadro A.1 Resultados para la corrida 1 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 127 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
75	120,0	127,4	0,909	15,673
76	120,3	127,4	0,935	16,595
77	120,5	127,3	0,953	17,539
78	120,8	127,2	0,981	18,506
79	121,0	127,2	1,000	19,496
80	121,3	127,3	1,029	20,511
81	121,5	127,5	1,049	21,550
82	121,8	127,3	1,080	22,614
83	122,0	127,4	1,101	23,705
84	122,2	127,3	1,122	24,816
85	122,3	127,2	1,133	25,943
86	122,5	127,3	1,155	27,087
87	122,7	-	1,177	28,253
88	122,9	-	1,200	29,442
89	123,0	-	1,212	30,648
90	123,2	-	1,235	31,871
91	123,3	-	1,247	33,112
92	123,5	-	1,271	34,371
93	123,6	-	1,283	35,648
94	123,7	-	1,296	36,937
95	123,8	-	1,308	38,239
96	123,9	106,8	1,321	39,554
97	123,3	-	-	-
98	122,0	-	-	-
99	120,3	-	-	-
100	118,4	-	-	-
101	116,4	-	-	-
102	114,3	-	-	-
103	112,3	-	-	-
104	110,5	-	-	-
105	108,6	-	-	-
106	106,8	102,6	-	-
107	105,3	-	-	-
108	103,8	-	-	-
109	102,4	-	-	-
110	101,2	-	-	-
111	100,1	-	-	-
112	99,2	-	-	-
130	96,5	109,1	-	-

Cuadro A.1 Resultados para la corrida 1 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 127 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
114	98,0	-	-	-
115	97,6	-	-	-
116	97,3	107,2	-	-
117	97,1	-	-	-
118	97,0	-	-	-
119	96,8	-	-	-
120	96,7	-	-	-
121	96,7	-	-	-
122	96,6	-	-	-
123	96,6	-	-	-
124	96,6	-	-	-
125	96,5	-	-	-
126	96,5	108,9	-	-
127	96,5	-	-	-
128	96,5	-	-	-
129	96,5	-	-	-
130	96,5	109,1	-	-

Cuadro A.2 Resultados para la corrida 2 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 125 °C durante 75 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	22,3	53,1	-	-
1	22,4	-	-	-
2	22,5	-	-	-
3	22,5	112,2	-	-
4	22,8	-	-	-
5	23,6	76,8	-	-
6	25,8	-	-	-
7	28,4	-	-	-
8	31,3	-	-	-
9	34,5	125,3	0,000	0,000
10	38,0	125,3	0,000	0,001
11	41,5	125,2	0,000	0,001
12	44,9	125,3	0,001	0,002
13	48,2	125,3	0,001	0,002
14	51,3	125,3	0,001	0,003

Cuadro A.2 Resultados para la corrida 2 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 125 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
15	54,5	125,3	0,002	0,005
16	57,5	125,3	0,002	0,007
17	60,3	125,3	0,003	0,009
18	63,0	125,4	0,004	0,013
19	65,6	125,3	0,005	0,017
20	68,1	125,3	0,006	0,023
21	70,5	125,4	0,008	0,030
22	72,7	125,3	0,010	0,039
23	74,9	125,5	0,012	0,050
24	77,0	125,5	0,015	0,063
25	79,0	125,4	0,018	0,079
26	80,8	125,3	0,021	0,099
27	82,6	125,4	0,025	0,122
28	84,4	125,4	0,030	0,149
29	86,1	125,3	0,035	0,182
30	87,6	125,4	0,041	0,220
31	89,2	125,3	0,047	0,263
32	90,6	125,4	0,054	0,314
33	92,0	125,5	0,062	0,372
34	93,3	125,3	0,070	0,438
35	94,6	125,5	0,079	0,513
36	95,8	125,3	0,089	0,597
37	97,0	125,4	0,100	0,692
38	98,2	125,3	0,112	0,798
39	99,3	125,4	0,125	0,916
40	100,3	125,4	0,137	1,047
41	101,3	125,3	0,151	1,192
42	102,2	125,4	0,165	1,349
43	103,1	125,4	0,180	1,522
44	104	125,3	0,196	1,709
45	104,8	125,4	0,211	1,913
46	105,6	125,4	0,228	2,132
47	106,3	125,4	0,244	2,369
48	107,1	125,3	0,264	2,622
49	107,8	125,4	0,282	2,895
50	108,5	125,3	0,301	3,187
51	109,1	125,4	0,319	3,497
52	109,7	125,3	0,338	3,826
53	110,3	125,3	0,358	4,174

Cuadro A.2 Resultados para la corrida 2 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 125 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
54	110,8	125,3	0,376	4,541
55	111,4	125,4	0,398	4,928
56	112,0	125,4	0,422	5,338
57	112,5	125,4	0,442	5,770
58	112,9	125,3	0,460	6,221
59	113,3	125,4	0,478	6,690
60	113,8	125,3	0,501	7,179
61	114,3	125,3	0,526	7,693
62	114,6	125,5	0,541	8,226
63	115,0	125,3	0,562	8,778
64	115,4	125,3	0,584	9,351
65	115,8	125,5	0,607	9,947
66	116,1	125,4	0,625	10,563
67	116,5	125,3	0,649	11,200
68	116,8	125,4	0,668	11,859
69	117,0	125,3	0,681	12,534
70	117,3	125,4	0,701	13,225
71	117,6	125,3	0,722	13,937
72	117,9	125,3	0,743	14,669
73	118,2	125,3	0,764	15,422
74	118,4	125,5	0,779	16,194
75	118,6	125,3	0,794	16,981
76	118,9	125,4	0,818	17,787
77	119,1	125,4	0,833	18,612
78	119,3	125,4	0,850	19,454
79	119,5	125,4	0,866	20,312
80	119,7	125,3	0,883	21,186
81	119,9	125,3	0,900	22,077
82	120,1	125,4	0,917	22,986
83	120,3	125,3	0,935	23,912
84	120,4	125,5	0,944	24,851
85	120,6	-	0,962	25,805
86	120,5	-	-	-
87	119,7	-	-	-
88	118,2	-	-	-
89	116,5	-	-	-
90	114,6	-	-	-
91	112,6	-	-	-
92	110,7	-	-	-

Cuadro A.2 Resultados para la corrida 2 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 125 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
93	108,9	-	-	-
94	107,1	107,6	-	-
95	105,5	-	-	-
96	104,0	-	-	-
97	102,6	-	-	-
98	101,4	-	-	-
99	100,3	-	-	-
100	99,4	-	-	-
101	98,6	-	-	-
102	98,0	-	-	-
103	97,6	-	-	-
104	97,3	103,3	-	-
105	97,1	-	-	-
106	97,0	-	-	-
107	96,8	-	-	-
108	96,8	-	-	-
109	96,7	-	-	-
110	96,7	-	-	-
111	96,6	-	-	-
112	96,6	-	-	-
113	96,6	-	-	-
114	96,6	108,3	-	-
115	96,6	-	-	-
116	96,6	-	-	-
117	96,5	-	-	-
118	96,6	-	-	-
119	96,5	-	-	-
120	96,5	-	-	-
121	96,5	-	-	-
122	96,5	-	-	-
123	96,5	-	-	-
124	96,5	109,0	-	-
125	96,5	-	-	-
126	96,4	-	-	-
127	96,4	-	-	-
128	96,3	-	-	-
129	96,3	-	-	-
130	96,3	-	-	-
131	96,3	-	-	-

Cuadro A.2 Resultados para la corrida 2 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 125 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
132	96,3	-	-	-
133	96,3	-	-	-
134	96,2	109,0	-	-
135	96,2	-	-	-
136	96,2	-	-	-
137	96,2	-	-	-
138	96,1	-	-	-
139	96,1	-	-	-
140	96,1	-	-	-
141	96,1	-	-	-
142	96,2	-	-	-
143	96,2	-	-	-
144	96,2	108,8	-	-
145	96,2	-	-	-
146	96,2	-	-	-
147	96,2	-	-	-
148	96,2	-	-	-
149	96,2	-	-	-
150	96,2	-	-	-
151	96,2	-	-	-
152	96,2	-	-	-
153	96,2	-	-	-
154	96,2	108,3	-	-
155	96,3	-	-	-
156	96,3	-	-	-
157	96,3	-	-	-
158	96,3	-	-	-
159	96,3	-	-	-
160	96,3	-	-	-
161	96,3	-	-	-
162	96,3	-	-	-
163	96,3	-	-	-
164	96,3	107,6	-	-
165	96,3	-	-	-
166	96,3	-	-	-
167	96,3	-	-	-
168	96,3	-	-	-
169	96,3	-	-	-
170	96,3	-	-	-

Cuadro A.2 Resultados para la corrida 2 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 125 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
171	96,3	-	-	-
172	96,3	-	-	-
173	96,3	-	-	-
174	96,3	106,5	-	-
175	96,3	-	-	-
176	96,3	-	-	-
177	96,3	-	-	-
178	96,3	-	-	-
179	96,3	-	-	-
180	96,3	-	-	-
181	96,3	-	-	-
182	96,3	-	-	-
183	96,3	-	-	-
184	96,3	105,5	-	-
185	96,3	-	-	-
186	96,3	-	-	-
187	96,3	-	-	-
188	96,3	-	-	-
189	96,3	-	-	-
190	96,3	-	-	-
191	96,3	-	-	-
192	96,3	-	-	-
193	96,3	-	-	-
194	96,3	104,4	-	-
195	96,3	-	-	-
196	96,3	-	-	-
197	96,3	-	-	-
198	96,3	-	-	-
199	96,3	-	-	-
200	96,3	-	-	-
201	96,3	-	-	-
202	96,3	-	-	-
203	96,3	-	-	-
204	96,3	103,4	-	-
205	96,3	-	-	-
206	96,3	-	-	-
207	96,3	-	-	-
208	96,3	-	-	-
209	96,3	-	-	-

Cuadro A.2 Resultados para la corrida 2 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 125 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
210	96,3	-	-	-
211	96,3	-	-	-
212	96,3	-	-	-
213	96,3	-	-	-
214	96,3	102,3	-	-
215	96,3	-	-	-
216	96,3	-	-	-
217	96,3	-	-	-
218	96,3	-	-	-
219	96,3	-	-	-
220	96,3	-	-	-
221	96,3	-	-	-
222	96,3	-	-	-
223	96,3	-	-	-
224	96,3	101,4	-	-
225	96,3	-	-	-
226	96,3	-	-	-
227	96,3	-	-	-
228	96,2	-	-	-
229	96,3	-	-	-
230	96,3	-	-	-
231	96,2	-	-	-
232	96,3	-	-	-
233	96,3	-	-	-
234	96,3	100,5	-	-
235	96,2	-	-	-
236	96,2	-	-	-
237	96,2	-	-	-
238	96,2	-	-	-
239	96,2	-	-	-
240	96,2	-	-	-
241	96,2	-	-	-
242	96,2	-	-	-
243	96,2	-	-	-
244	96,2	99,9	-	-

Cuadro A.3 Resultados para la corrida 3 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 125 °C durante 60 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	22,6	37,4	-	-
1	22,6	38,0	-	-
2	22,7	-	-	-
3	22,7	111,9	-	-
4	23,1	76,7	-	-
5	24,1	-	-	-
6	27,0	-	-	-
7	29,4	-	-	-
8	32,1	-	-	-
9	35,0	125,3	0,000	0,000
10	38,2	125,4	0,000	0,001
11	41,5	125,6	0,000	0,001
12	44,9	125,5	0,001	0,002
13	48,3	125,3	0,001	0,002
14	51,6	125,5	0,001	0,003
15	54,8	125,3	0,002	0,005
16	57,8	125,3	0,002	0,007
17	60,8	125,5	0,003	0,010
18	63,7	125,3	0,004	0,013
19	66,5	125,4	0,005	0,018
20	69,1	125,4	0,007	0,024
21	71,6	125,4	0,009	0,032
22	74,1	125,4	0,011	0,042
23	76,4	125,3	0,014	0,054
24	78,6	125,4	0,017	0,070
25	80,8	125,4	0,021	0,089
26	82,8	125,3	0,026	0,112
27	84,7	125,4	0,031	0,141
28	86,5	125,4	0,037	0,174
29	88,3	125,3	0,043	0,214
30	90,0	125,5	0,051	0,261
31	91,6	125,3	0,060	0,317
32	93,1	125,4	0,069	0,381
33	94,6	125,5	0,079	0,455
34	96,0	125,3	0,091	0,540
35	97,3	125,5	0,103	0,637
36	98,5	125,4	0,115	0,746
37	99,7	125,4	0,130	0,869
38	100,9	125,3	0,145	1,006

Cuadro A.3 Resultados para la corrida 3 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 125 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
39	102,0	125,4	0,162	1,160
40	103,0	125,3	0,178	1,329
41	104,0	125,4	0,196	1,516
42	105,0	125,3	0,215	1,722
43	105,8	125,5	0,233	1,946
44	106,8	125,3	0,256	2,190
45	107,6	125,3	0,276	2,456
46	108,4	125,2	0,299	2,744
47	109,1	125,4	0,319	3,053
48	109,9	125,3	0,345	3,385
49	110,5	125,3	0,365	3,740
50	111,2	125,4	0,391	4,118
51	111,8	125,4	0,414	4,520
52	112,5	125,2	0,442	4,948
53	113,0	125,3	0,464	5,401
54	113,5	125,4	0,487	5,877
55	114,0	125,3	0,511	6,376
56	114,5	125,4	0,536	6,899
57	115,0	125,3	0,562	7,448
58	115,5	125,4	0,590	8,024
59	115,9	125,5	0,613	8,626
60	116,3	125,5	0,637	9,251
61	116,7	125,5	0,662	9,900
62	117,1	125,3	0,688	10,575
63	117,4	125,5	0,708	11,273
64	117,8	125,3	0,736	11,995
65	118,1	125,5	0,757	12,741
66	118,4	125,3	0,779	13,510
67	118,7	125,3	0,802	14,300
68	119,0	125,3	0,825	15,114
69	119,2	125,3	0,841	15,947
70	119,5	-	0,866	16,801
71	119,6	-	0,874	17,671
79	106,9	105,6	-	-
89	97,3	101,4	-	-
99	96,5	105,3	-	-
109	96,4	106,3	-	-
119	96,3	107,0	-	-

Cuadro A.3 Resultados para la corrida 3 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 125 °C durante 60 min (continuación)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
129	96,2	107,5	-	-
139	96,1	107,5	-	-
149	96,2	107,0	-	-
159	96,2	106,3	-	-
169	96,2	105,3	-	-
179	96,1	104,5	-	-
189	96,0	103,4	-	-
199	95,9	102,3	-	-
209	95,8	101,3	-	-
219	95,6	100,3	-	-
229	95,4	99,9	-	-

Cuadro A.4 Resultados para la corrida 4 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 127 °C durante 60 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	22,3	32,2	-	-
1	22,3	-	-	-
2	22,4	-	-	-
3	22,4	112,0	-	-
4	22,4	78,3	-	-
5	22,4	-	-	-
6	22,6	-	-	-
7	23,3	-	-	-
8	25,9	-	-	-
9	28,0	127,2	0,000	0,000
10	30,5	127,1	0,000	0,000
11	33,3	127,2	0,000	0,000
12	36,4	127,2	0,000	0,001
13	39,6	127,3	0,000	0,001
14	43,0	127,3	0,001	0,002
15	46,4	127,3	0,001	0,002
16	49,8	127,3	0,001	0,003
17	53,1	127,3	0,001	0,004
18	56,3	127,3	0,002	0,006
19	59,5	127,3	0,003	0,009
20	62,5	127,3	0,004	0,012
21	65,4	127,3	0,005	0,016
22	68,2	127,3	0,006	0,022

Cuadro A.4 Resultados para la corrida 4 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
23	70,8	127,3	0,008	0,029
24	73,5	127,3	0,010	0,038
25	75,9	127,2	0,013	0,050
26	78,2	127,3	0,016	0,065
27	80,5	127,3	0,021	0,083
28	82,6	127,3	0,025	0,106
29	84,6	127,3	0,030	0,134
30	86,6	127,2	0,037	0,168
31	88,5	127,3	0,044	0,208
32	90,3	127,3	0,053	0,256
33	91,9	127,3	0,061	0,313
34	93,5	127,5	0,071	0,380
35	95,1	127,3	0,083	0,457
36	96,5	127,3	0,095	0,547
37	98,0	127,3	0,110	0,649
38	99,3	127,4	0,125	0,767
39	100,5	127,5	0,140	0,899
40	101,7	127,5	0,157	1,047
41	102,8	127,5	0,174	1,213
42	104,0	127,4	0,196	1,398
43	105,0	127,5	0,215	1,604
44	106,0	127,5	0,237	1,830
45	107,0	127,5	0,261	2,079
46	108,0	127,4	0,287	2,353
47	108,8	127,4	0,310	2,652
48	109,6	127,5	0,335	2,975
49	110,5	127,5	0,365	3,325
50	111,2	127,5	0,391	3,703
51	111,9	127,4	0,418	4,107
52	112,6	127,5	0,447	4,539
53	113,3	127,4	0,478	5,001
54	113,9	127,5	0,506	5,493
55	114,5	127,5	0,536	6,014
56	115,1	127,4	0,568	6,566
57	115,6	127,5	0,596	7,148
58	116,2	127,3	0,631	7,761
59	116,6	127,3	0,656	8,404
60	117,1	127,3	0,688	9,076
61	117,6	127,3	0,722	9,781

Cuadro A.4 Resultados para la corrida 4 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 3 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
62	118,0	127,3	0,750	10,516
63	118,4	127,3	0,779	11,281
64	118,8	127,3	0,810	12,075
65	119,2	127,3	0,841	12,901
66	119,5	127,3	0,866	13,755
67	119,8	127,3	0,891	14,633
68	120,2	127,5	0,926	15,542
69	120,5	127,3	0,953	16,482
70	120,8	-	0,981	17,449
71	121,0	-	1,000	18,439
72	121,3	-	1,029	19,454
73	121,6	-	1,059	20,498
74	121,6	-	1,059	21,557
75	121,0	-	-	-
76	119,5	-	-	-
77	117,6	-	-	-
78	115,5	-	-	-
79	113,6	105,6	-	-
89	99,0	101,6	-	-
99	96,6	105,8	-	-
109	96,5	107,3	-	-
119	96,4	108,1	-	-
129	96,3	108,3	-	-
139	96,3	108,0	-	-
149	96,3	107,6	-	-
159	96,3	107,0	-	-
169	96,2	106,1	-	-
179	96,2	105,1	-	-
189	96,2	104,3	-	-
199	96,1	103,2	-	-
209	96,0	102,3	-	-
219	95,9	101,1	-	-
229	95,7	100,3	-	-
239	95,5	99,9	-	-

Cuadro A.5 Resultados para la corrida 5 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 1,5 L a 125 °C durante 60 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	23,4	33,4	-	-
1	23,4	-	-	-
2	23,4	-	-	-
3	23,4	112,3	-	-
4	23,5	-	-	-
5	24,1	78,8	-	-
6	27,2	-	-	-
7	30,8	-	-	-
8	33,3	-	-	-
9	36,1	125,3	0,000	0,000
10	39,3	125,3	0,000	0,001
11	42,7	125,3	0,001	0,001
12	46,1	125,5	0,001	0,002
13	49,5	125,5	0,001	0,003
14	52,9	125,5	0,001	0,004
15	56,2	125,4	0,002	0,006
16	59,4	125,3	0,003	0,008
17	62,5	125,5	0,004	0,011
18	65,5	125,3	0,005	0,015
19	68,4	125,3	0,006	0,021
20	71,2	125,5	0,008	0,029
21	73,8	125,5	0,011	0,038
22	76,3	125,3	0,014	0,050
23	78,8	125,4	0,017	0,066
24	81,0	125,4	0,022	0,085
25	83,2	125,3	0,027	0,110
26	85,3	125,2	0,033	0,139
27	87,3	125,3	0,039	0,175
28	89,2	125,5	0,047	0,218
29	91,0	125,5	0,056	0,270
30	92,6	125,5	0,066	0,331
31	94,3	125,3	0,077	0,403
32	95,8	125,2	0,089	0,486
33	97,3	125,3	0,103	0,582
34	98,6	125,5	0,117	0,691
35	99,9	125,3	0,132	0,816
36	101,2	125,5	0,150	0,957
37	102,3	125,3	0,166	1,115

Cuadro A.5 Resultados para la corrida 5 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 1,5 L a 125 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
38	103,5	125,4	0,187	1,291
39	104,5	125,3	0,205	1,487
40	105,6	125,3	0,228	1,704
41	106,5	125,3	0,249	1,942
42	107,5	125,5	0,274	2,204
43	108,3	125,3	0,296	2,488
44	109,2	125,3	0,322	2,797
45	110,0	125,5	0,348	3,133
46	110,7	125,5	0,372	3,493
47	111,5	125,6	0,402	3,880
48	112,1	125,5	0,426	4,294
49	112,7	125,3	0,451	4,732
50	113,3	125,3	0,478	5,196
51	113,9	125,4	0,506	5,688
52	114,5	125,3	0,536	6,209
53	115,0	125,5	0,562	6,758
54	115,5	125,3	0,590	7,335
55	115,9	125,5	0,613	7,936
56	116,3	125,6	0,637	8,561
57	116,8	125,5	0,668	9,214
58	117,2	125,3	0,694	9,895
59	117,6	125,5	0,722	10,603
60	118,0	125,4	0,750	11,339
61	118,3	125,4	0,772	12,100
62	118,6	125,5	0,794	12,883
63	118,9	125,4	0,818	13,689
64	119,2	125,4	0,841	14,518
65	119,5	125,4	0,866	15,372
66	119,7	125,3	0,883	16,246
67	120,0	125,3	0,909	17,142
68	120,2	125,4	0,926	18,059
69	120,5	125,6	0,953	18,999
70	120,6	-	0,962	19,957
71	120,8	-	0,981	20,928
79	108,4	105,2	-	-
89	97,5	100,8	-	-
99	96,6	103,7	-	-
109	96,5	105,6	-	-

Cuadro A.5 Resultados para la corrida 5 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 1,5 L a 125 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
119	96,3	106,3	-	-
129	96,3	106,5	-	-
139	96,3	106,2	-	-
149	96,3	105,6	-	-
159	96,2	105,0	-	-
169	96,2	104,1	-	-
179	96,0	103,1	-	-
189	95,9	102,2	-	-
199	95,8	101,2	-	-
209	95,5	100,3	-	-
212	95,5	99,9	-	-

Cuadro A.6 Resultados para la corrida 6 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 125 °C durante 60 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	22,5	31,6	-	-
1	22,5	-	-	-
2	22,5	-	-	-
3	22,5	112,1	-	-
4	22,6	77,5	-	-
5	22,8	-	-	-
6	23,5	-	-	-
7	26,6	-	-	-
8	30,2	-	-	-
9	34,2	125,2	0,000	0,000
10	38,6	125,1	0,000	0,001
11	43,1	125,1	0,001	0,001
12	47,5	125,2	0,001	0,002
13	51,6	125,2	0,001	0,003
14	55,6	125,3	0,002	0,004
15	59,2	125,4	0,003	0,007
16	62,6	125,3	0,004	0,010
17	65,7	125,5	0,005	0,014
18	68,6	125,4	0,007	0,020
19	71,3	125,4	0,008	0,027
20	73,8	125,5	0,011	0,037

Cuadro A.6 Resultados para la corrida 6 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 125 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
21	76,2	125,5	0,014	0,049
22	78,4	125,6	0,017	0,064
23	80,5	125,5	0,021	0,083
24	82,4	125,5	0,025	0,106
25	84,3	125,5	0,030	0,133
26	86	125,5	0,035	0,165
27	87,6	125,4	0,041	0,203
28	89,2	125,3	0,047	0,247
29	90,7	125,5	0,055	0,298
30	92,1	125,4	0,062	0,356
31	93,5	125,3	0,071	0,423
32	94,8	125,5	0,081	0,499
33	96,0	125,5	0,091	0,585
34	97,2	125,5	0,102	0,682
35	98,3	125,5	0,113	0,789
36	99,3	125,5	0,125	0,908
37	100,3	125,4	0,137	1,039
38	101,3	125,5	0,151	1,183
39	102,2	125,4	0,165	1,341
40	103,0	125,4	0,178	1,513
41	103,9	125,4	0,194	1,698
42	104,6	125,5	0,207	1,899
43	105,5	125,3	0,226	2,116
44	106,2	125,4	0,242	2,350
45	106,9	125,4	0,259	2,600
46	107,6	125,4	0,276	2,867
47	108,2	125,4	0,293	3,152
48	108,8	125,4	0,310	3,453
49	109,5	125,3	0,332	3,774
50	110,0	125,3	0,348	4,114
51	110,6	125,4	0,369	4,473
52	111,1	125,5	0,387	4,850
53	111,6	125,4	0,406	5,247
54	112,2	125,4	0,430	5,665
55	112,6	125,4	0,447	6,103
56	113,0	125,5	0,464	6,558
57	113,5	125,2	0,487	7,034
58	113,9	125,5	0,506	7,530

Cuadro A.6 Resultados para la corrida 6 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 125 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
59	114,3	125,4	0,526	8,046
60	114,7	125,5	0,546	8,582
61	115,1	125,5	0,568	9,139
62	115,5	125,5	0,590	9,718
63	115,8	125,4	0,607	10,317
64	116,2	125,4	0,631	10,936
65	116,5	125,4	0,649	11,576
66	116,8	125,5	0,668	12,235
67	117,1	125,5	0,688	12,913
68	117,4	125,4	0,708	13,611
69	117,6	125,5	0,722	14,326
70	118,0	-	0,750	15,062
71	118,2	-	0,764	15,819
72	118,5	-	0,787	16,594
73	118,6	-	0,794	17,385
79	110,2	104,6	-	-
89	98,3	101,0	-	-
99	96,7	102,0	-	-
109	96,6	105,1	-	-
119	96,5	105,5	-	-
129	96,4	105,5	-	-
139	96,3	105,6	-	-
149	96,3	105,6	-	-
159	96,3	104,5	-	-
169	96,3	103,6	-	-
179	96,2	102,7	-	-
189	96,2	101,7	-	-
199	96,1	100,5	-	-
207	96,9	99,9	-	-

Cuadro A.7 Resultados para la corrida 7 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 127 °C durante 60 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	21,1	33,2	-	-
1	21,1	-	-	-
2	21,1	-	-	-
3	21,2	112,1	-	-
4	21,5	86,9	-	-
5	22,5	-	-	-
6	26,5	-	-	-
7	29,8	-	-	-
8	33,4	-	-	-
9	37,3	-	-	-
10	41,3	127,3	0,000	0,000
11	45,2	127,4	0,001	0,001
12	49,0	127,3	0,001	0,002
13	52,7	127,2	0,001	0,003
14	56,3	127,2	0,002	0,005
15	59,6	127,2	0,003	0,007
16	62,7	127,2	0,004	0,010
17	65,7	127,3	0,005	0,015
18	68,5	127,2	0,006	0,021
19	71,2	127,2	0,008	0,028
20	73,8	127,3	0,011	0,038
21	76,2	127,4	0,014	0,050
22	78,5	127,3	0,017	0,065
23	80,6	127,4	0,021	0,084
24	82,8	127,3	0,026	0,107
25	84,7	127,3	0,031	0,135
26	86,6	127,3	0,037	0,169
27	88,4	127,5	0,044	0,209
28	90,1	127,3	0,052	0,257
29	91,7	127,4	0,060	0,313
30	93,3	127,3	0,070	0,378
31	94,7	127,4	0,080	0,453
32	96,2	127,5	0,093	0,540
33	97,5	127,4	0,105	0,638
34	98,8	127,5	0,119	0,750
35	100,0	127,5	0,133	0,876
36	101,2	127,4	0,150	1,018
37	102,3	127,3	0,166	1,176

Cuadro A.7 Resultados para la corrida 7 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
38	103,3	127,4	0,183	1,350
39	104,3	127,5	0,201	1,543
40	105,3	127,3	0,222	1,754
41	106,3	127,3	0,244	1,987
42	107,2	127,3	0,266	2,242
43	108,0	127,3	0,287	2,519
44	108,8	127,3	0,310	2,818
45	109,6	127,2	0,335	3,140
46	110,4	127,3	0,362	3,489
47	111,1	127,4	0,387	3,863
48	111,8	127,4	0,414	4,263
49	112,5	127,5	0,442	4,691
50	113,1	127,5	0,469	5,147
51	113,6	127,5	0,492	5,627
52	114,3	127,5	0,526	6,136
53	114,8	127,5	0,552	6,674
54	115,3	127,4	0,579	7,240
55	115,8	127,5	0,607	7,833
56	116,3	127,4	0,637	8,455
57	116,8	127,3	0,668	9,107
58	117,3	127,3	0,701	9,792
59	117,6	127,3	0,722	10,504
60	118,1	127,2	0,757	11,243
61	118,5	127,5	0,787	12,015
62	118,8	127,5	0,810	12,813
63	119,2	127,4	0,841	13,639
64	119,5	127,2	0,866	14,492
65	119,8	127,5	0,891	15,371
66	120,2	127,3	0,926	16,280
67	120,5	127,3	0,953	17,219
68	120,8	127,4	0,981	18,186
69	121,1	127,3	1,010	19,182
70	121,3	127,5	1,029	20,201
71	121,6	-	1,059	21,245
72	121,7	-	1,069	22,310
80	108,2	109,7	-	-
90	97,6	106,5	-	-
100	96,6	106,7	-	-
110	96,6	107,7	-	-

Cuadro A.7 Resultados para la corrida 7 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
120	96,5	108,1	-	-
130	96,5	108,2	-	-
140	96,5	108,0	-	-
150	96,4	107,3	-	-
160	96,3	106,5	-	-
170	96,3	105,5	-	-
180	96,2	104,5	-	-
190	96,2	103,3	-	-
200	96,0	102,3	-	-
210	96,0	101,4	-	-
220	95,8	100,5	-	-
226	95,7	99,9	-	-

Cuadro A.8 Resultados para la corrida 8 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 125 °C durante 65 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	21,2	34,8	-	-
1	21,2	-	-	-
2	21,2	-	-	-
3	21,3	111,8	-	-
4	21,5	81,2	-	-
5	22,3	-	-	-
6	25,3	-	-	-
7	28,6	-	-	-
8	32,4	-	-	-
9	36,5	125,2	0,000	0,000
10	40,8	125,1	0,000	0,001
11	45	125,2	0,001	0,001
12	49,1	125,2	0,001	0,003
13	52,9	125,2	0,001	0,004
14	56,5	125,4	0,002	0,007
15	59,9	125,3	0,003	0,010
16	63,1	125,3	0,004	0,015
17	66,0	125,2	0,005	0,021
18	68,8	125,2	0,007	0,028
19	71,3	125,1	0,008	0,038
20	73,8	125,2	0,011	0,050

Cuadro A.8 Resultados para la corrida 8 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 125 °C durante 65 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
21	76,1	125,3	0,013	0,065
22	78,2	125,2	0,016	0,083
23	80,3	125,3	0,020	0,105
24	82,2	125,4	0,024	0,132
25	84,0	125,5	0,029	0,163
26	85,8	125,2	0,034	0,200
27	87,5	125,2	0,040	0,244
28	89,0	125,2	0,046	0,294
29	90,5	125,2	0,054	0,352
30	92,0	125,3	0,062	0,418
31	93,3	125,2	0,070	0,492
32	94,6	125,3	0,079	0,577
33	95,9	125,3	0,090	0,672
34	97,1	125,3	0,101	0,779
35	98,2	125,3	0,112	0,898
36	99,3	125,5	0,125	1,028
37	100,3	125,6	0,137	1,173
38	101,3	125,5	0,151	1,331
39	102,2	125,5	0,165	1,503
40	103,1	125,5	0,180	1,689
41	103,9	125,5	0,194	1,892
42	104,8	125,3	0,211	2,111
43	105,5	125,4	0,226	2,346
44	106,3	125,5	0,244	2,598
45	107,0	125,5	0,261	2,870
46	107,8	125,5	0,282	3,161
47	108,5	125,4	0,301	3,472
48	109,1	125,3	0,319	3,799
49	109,6	125,5	0,335	4,145
50	110,3	125,5	0,358	4,512
51	110,8	125,5	0,376	4,899
52	111,4	125,5	0,398	5,307
53	111,9	125,4	0,418	5,735
54	112,4	125,3	0,438	6,184
55	112,9	125,5	0,460	6,655
56	113,4	125,4	0,482	7,147
57	113,8	125,3	0,501	7,658
58	114,2	125,5	0,521	8,189
59	114,6	125,6	0,541	8,741

Cuadro A.8 Resultados para la corrida 8 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 125 °C durante 65 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
60	115,0	125,5	0,562	9,314
61	115,4	125,5	0,584	9,910
62	115,8	125,4	0,607	10,529
63	116,2	125,4	0,631	11,169
64	116,5	125,6	0,649	11,828
65	116,8	125,4	0,668	12,509
66	117,2	125,5	0,694	13,214
67	117,5	125,5	0,715	13,939
68	117,8	125,3	0,736	14,682
69	118,0	125,6	0,750	15,443
70	118,3	125,5	0,772	16,226
71	118,6	125,5	0,794	17,028
72	118,8	125,3	0,810	17,849
73	119,1	125,5	0,833	18,691
74	119,3	125,5	0,850	19,549
75	119,5	-	0,866	20,423
84	108,6	106,4	-	-
94	97,8	104,0	-	-
104	96,6	105,1	-	-
114	96,6	106,1	-	-
124	96,5	106,6	-	-
134	96,3	106,2	-	-
144	96,3	105,7	-	-
154	96,3	105,1	-	-
164	96,3	104,3	-	-
174	96,2	103,5	-	-
184	96,2	102,5	-	-
194	96,1	101,5	-	-
204	96,0	100,7	-	-
214	95,8	99,9	-	-

Cuadro A.9 Datos experimentales para la corrida 9 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 125 °C durante 75 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	24,6	34,3	-	-
1	24,6	-	-	-
2	24,6	-	-	-
3	24,6	111,6	-	-
4	24,6	78,9	-	-
5	24,8	-	-	-
6	25,2	-	-	-
7	27,1	-	-	-
8	30,9	-	-	-
9	34,6	125,3	0,000	0,000
10	38,8	125,3	0,000	0,001
11	43,1	125,3	0,001	0,001
12	47,5	125,3	0,001	0,002
13	51,5	125,5	0,001	0,003
14	55,3	125,3	0,002	0,004
15	59,0	125,4	0,003	0,007
16	62,3	125,3	0,004	0,010
17	65,4	125,4	0,005	0,014
18	68,3	125,3	0,006	0,019
19	71,0	125,5	0,008	0,027
20	73,5	125,3	0,010	0,036
21	75,8	125,4	0,013	0,048
22	78,1	125,3	0,016	0,063
23	80,2	125,5	0,020	0,081
24	82,1	125,5	0,024	0,103
25	84,0	125,5	0,029	0,129
26	85,7	125,5	0,034	0,160
27	87,4	125,3	0,040	0,197
28	89,0	125,3	0,046	0,240
29	90,5	125,5	0,054	0,290
30	92,0	125,4	0,062	0,348
31	93,3	125,4	0,070	0,414
32	94,6	125,3	0,079	0,489
33	95,9	125,3	0,090	0,574
34	97,1	125,5	0,101	0,669
35	98,2	125,4	0,112	0,776
36	99,3	125,3	0,125	0,894
37	100,3	125,5	0,137	1,025
38	101,3	125,5	0,151	1,169

Cuadro A.9 Datos experimentales para la corrida 9 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 125 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
39	102,2	125,3	0,165	1,327
40	103,2	125,5	0,181	1,500
41	104,0	125,6	0,196	1,689
42	104,8	125,5	0,211	1,892
43	105,6	125,5	0,228	2,112
44	106,4	125,4	0,246	2,349
45	107,1	125,3	0,264	2,604
46	107,8	125,4	0,282	2,877
47	108,5	125,5	0,301	3,168
48	109,2	125,3	0,322	3,480
49	109,7	125,5	0,338	3,811
50	110,3	125,3	0,358	4,159
51	110,9	125,4	0,379	4,528
52	111,4	125,6	0,398	4,916
53	112,0	125,5	0,422	5,326
54	112,5	125,5	0,442	5,758
55	113,0	125,3	0,464	6,212
56	113,4	125,3	0,482	6,685
57	113,8	125,6	0,501	7,177
58	114,3	125,6	0,526	7,690
59	114,7	125,3	0,546	8,226
60	115,1	125,3	0,568	8,783
61	115,5	125,5	0,590	9,362
62	115,8	125,3	0,607	9,961
63	116,2	125,4	0,631	10,580
64	116,5	125,5	0,649	11,220
65	116,9	125,3	0,675	11,882
66	117,2	125,5	0,694	12,567
67	117,5	125,5	0,715	13,271
68	117,8	125,3	0,736	13,997
69	118,1	125,3	0,757	14,743
70	118,3	125,5	0,772	15,507
71	118,6	125,3	0,794	16,291
72	118,9	125,5	0,818	17,096
73	119,1	125,3	0,833	17,922
74	119,3	125,5	0,850	18,763
75	119,6	125,3	0,874	19,625
76	119,8	125,3	0,891	20,508
77	120,0	125,3	0,909	21,408

Cuadro A.9 Datos experimentales para la corrida 9 con el biorreactor de 7 L, volumen de medio 4,5 L a 125 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
78	120,2	125,3	0,926	22,325
79	120,4	125,3	0,944	23,260
80	120,6	125,3	0,962	24,214
81	120,8	125,5	0,981	25,185
82	121,0	125,2	1,000	26,176
83	121,1	125,3	1,010	27,181
84	121,3	125,3	1,029	28,200
85	121,4	-	1,039	29,234
86	121,6	-	1,059	30,283
94	111,0	106,7	-	-
104	98,6	101,3	-	-
114	96,7	104,7	-	-
124	96,6	106,3	-	-
134	96,5	106,9	-	-
144	96,4	107,1	-	-
154	96,2	106,8	-	-
164	96,2	106,3	-	-
174	96,2	105,8	-	-
184	96,2	105,9	-	-
194	96,2	104,0	-	-
204	96,1	103,1	-	-
214	96,1	102,1	-	-
224	96,0	101,3	-	-
234	95,8	100,5	-	-
244	95,6	99,9	-	-

Cuadro A.10 Resultados para la corrida 10 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 125 °C durante 60 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	21,2	31,3	-	-
1	21,2	-	-	-
2	21,2	-	-	-
3	21,2	112,3	-	-
4	21,2	-	-	-
5	21,3	77,4	-	-
6	21,5	-	-	-

Cuadro A.10 Resultados para la corrida 10 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 125 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
7	21,8	-	-	-
8	26,6	-	-	-
9	28,7	-	-	-
10	30,0	125,2	0,000	0,000
11	31,8	125,2	0,000	0,000
12	33,8	125,3	0,000	0,001
13	36,0	125,3	0,000	0,001
14	38,3	125,3	0,000	0,001
15	40,8	125,3	0,000	0,002
16	43,3	125,5	0,001	0,002
17	46,0	125,3	0,001	0,003
18	48,6	125,4	0,001	0,004
19	51,3	125,3	0,001	0,005
20	53,9	125,3	0,002	0,006
21	56,5	125,4	0,002	0,008
22	59,1	125,3	0,003	0,010
23	61,6	125,5	0,003	0,013
24	64,1	125,3	0,004	0,017
25	66,5	125,4	0,005	0,022
26	68,8	125,3	0,007	0,028
27	71,1	125,3	0,008	0,035
28	73,2	125,3	0,010	0,045
29	75,3	125,3	0,012	0,056
30	77,4	125,4	0,015	0,070
31	79,3	125,3	0,018	0,087
32	81,3	125,4	0,022	0,107
33	83,1	125,3	0,026	0,131
34	84,8	125,3	0,031	0,160
35	86,5	125,5	0,037	0,194
36	88,1	125,3	0,043	0,233
37	89,6	125,5	0,049	0,279
38	91,1	125,5	0,057	0,332
39	92,5	125,3	0,065	0,393
40	93,8	125,5	0,074	0,462
41	95,2	125,3	0,084	0,541
42	96,4	125,3	0,094	0,630
43	97,6	125,5	0,106	0,730
44	98,7	125,5	0,118	0,842

Cuadro A.10 Resultados para la corrida 10 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 125 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
45	99,8	125,5	0,131	0,966
46	100,8	125,3	0,144	1,104
47	101,8	125,3	0,158	1,255
48	102,8	125,3	0,174	1,422
49	103,7	125,5	0,190	1,604
50	104,6	125,3	0,207	1,803
51	105,4	125,5	0,224	2,018
52	106,3	125,5	0,244	2,252
53	107,0	125,5	0,261	2,505
54	107,8	125,4	0,282	2,776
55	108,5	125,3	0,301	3,068
56	109,2	125,5	0,322	3,380
57	109,8	125,3	0,341	3,712
58	110,5	125,3	0,365	4,065
59	111,0	125,5	0,383	4,439
60	111,6	125,3	0,406	4,834
61	112,2	125,3	0,430	5,251
62	112,7	125,5	0,451	5,692
63	113,2	125,3	0,473	6,154
64	113,6	125,3	0,492	6,636
65	114,2	125,5	0,521	7,143
66	114,6	125,5	0,541	7,674
67	115,0	125,5	0,562	8,225
68	115,4	125,3	0,584	8,799
69	115,8	125,5	0,607	9,394
70	116,2	125,5	0,631	10,013
71	116,5	-	0,649	10,654
72	116,8	-	0,668	11,312
73	117,1	-	0,688	11,991
74	117,2	-	0,694	12,682
80	111,0	106,1	-	-
90	99,5	101,3	-	-
100	96,6	100,8	-	-
110	96,4	103,2	-	-
120	96,3	105,2	-	-
130	96,2	105,6	-	-
140	96,3	105,6	-	-
150	96,2	105,4	-	-
160	96,2	104,9	-	-

Cuadro A.10 Resultados para la corrida 10 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 125 °C durante 60 min (continuación)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
170	96,1	104,1	-	-
180	96,0	103,2	-	-
190	95,9	102,2	-	-
200	95,8	101,6	-	-
210	95,5	100,8	-	-
220	95,3	99,9	-	-

Cuadro A.11 Resultados para la corrida 11 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 127 °C durante 60 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	15,5	33,0	-	-
1	15,5	-	-	-
2	15,7	-	-	-
3	16,6	112,3	-	-
4	14,9	-	-	-
5	17,3	77,4	-	-
6	24,5	-	-	-
7	27,8	-	-	-
8	29,5	-	-	-
9	31,5	-	-	-
10	33,5	127,2	0,000	0,000
11	35,8	127,2	0,000	0,000
12	38,2	127,3	0,000	0,001
13	40,8	127,4	0,000	0,001
14	43,4	127,4	0,001	0,002
15	46,1	127,4	0,001	0,002
16	48,9	127,4	0,001	0,003
17	51,6	127,4	0,001	0,004
18	54,4	127,4	0,002	0,006
19	57,2	127,4	0,002	0,008
20	59,8	127,4	0,003	0,010
21	62,4	127,4	0,004	0,014
22	65,0	127,5	0,005	0,018
23	67,5	127,3	0,006	0,023
24	69,9	127,3	0,007	0,030
25	72,3	127,3	0,009	0,038
26	74,5	127,2	0,012	0,048
27	76,7	127,3	0,014	0,061
28	78,8	127,3	0,017	0,077

Cuadro A.11 Resultados para la corrida 11 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
29	80,8	127,3	0,021	0,096
30	82,8	127,4	0,026	0,120
31	84,6	127,3	0,030	0,148
32	86,5	127,4	0,037	0,181
33	88,2	127,4	0,043	0,221
34	89,8	127,3	0,050	0,268
35	91,4	127,4	0,058	0,322
36	93,0	127,3	0,068	0,385
37	94,4	127,3	0,078	0,458
38	95,8	127,3	0,089	0,542
39	97,1	127,4	0,101	0,637
40	98,4	127,4	0,114	0,744
41	99,6	127,3	0,128	0,866
42	100,7	127,3	0,143	1,001
43	101,8	127,4	0,158	1,152
44	102,8	127,3	0,174	1,318
45	103,9	127,4	0,194	1,502
46	104,9	127,4	0,213	1,706
47	105,8	127,5	0,233	1,929
48	106,7	127,5	0,254	2,172
49	107,6	127,3	0,276	2,437
50	108,4	127,3	0,299	2,725
51	109,2	127,4	0,322	3,035
52	110,0	127,4	0,348	3,370
53	110,6	127,3	0,369	3,729
54	111,3	127,4	0,394	4,110
55	112,0	127,5	0,422	4,518
56	112,6	127,4	0,447	4,953
57	113,2	127,3	0,473	5,412
58	113,8	127,3	0,501	5,900
59	114,3	127,5	0,526	6,413
60	114,9	127,5	0,557	6,955
61	115,4	127,3	0,584	7,525
62	115,8	127,4	0,607	8,121
63	116,3	127,5	0,637	8,743
64	116,8	127,3	0,668	9,396
65	117,2	127,3	0,694	10,077
66	117,6	127,3	0,722	10,785
67	118,0	127,4	0,750	11,521
68	118,3	127,4	0,772	12,282

Cuadro A.11 Resultados para la corrida 11 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
69	118,7	127,3	0,802	13,069
70	119,0	127,3	0,825	13,882
71	119,3	-	0,850	14,720
72	119,5	-	0,866	15,578
80	109,5	107,2	-	-
90	98,8	100,9	-	-
100	96,6	105,8	-	-
110	96,5	107,1	-	-
120	96,4	107,6	-	-
130	96,3	107,8	-	-
140	96,3	107,7	-	-
150	96,3	107,3	-	-
170	96,2	105,7	-	-
180	96,1	104,8	-	-
190	96,0	103,7	-	-
200	95,9	102,7	-	-
210	95,7	101,9	-	-
220	95,5	101,1	-	-
230	95,2	100,1	-	-
240	94,9	99,9	-	-

Cuadro A.12 Resultados para la corrida 12 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 125 °C durante 75 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	14,5	30,6	-	-
1	16,3	-	-	-
2	16,5	-	-	-
3	16,1	112,3	-	-
4	14,6	-	-	-
5	14,5	80,1	-	-
6	12,0	-	-	-
7	12,1	-	-	-
8	27,8	-	-	-
9	32,6	125,2	0,000	0,000
10	34,9	125,5	0,000	0,000
11	37,0	125,2	0,000	0,001
12	39,2	125,2	0,000	0,001
13	41,5	125,2	0,000	0,002

Cuadro A.12 Resultados para la corrida 12 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 125 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
14	43,9	125,2	0,001	0,002
15	46,5	125,2	0,001	0,003
16	49,0	125,3	0,001	0,004
17	51,6	125,3	0,001	0,005
18	54,2	125,3	0,002	0,006
19	56,8	125,4	0,002	0,008
20	59,3	125,3	0,003	0,011
21	61,8	125,3	0,003	0,014
22	64,3	125,3	0,004	0,017
23	66,6	125,4	0,005	0,022
24	69,0	125,3	0,007	0,028
25	71,2	125,3	0,008	0,036
26	73,4	125,3	0,010	0,045
27	75,5	125,3	0,013	0,057
28	77,6	125,4	0,016	0,071
29	79,5	125,3	0,019	0,088
30	81,4	125,3	0,022	0,109
31	83,2	125,4	0,027	0,133
32	85,0	125,3	0,032	0,162
33	86,6	125,3	0,037	0,197
34	88,3	125,3	0,043	0,237
35	89,8	125,3	0,050	0,284
36	91,3	125,3	0,058	0,338
37	92,7	125,3	0,066	0,400
38	94,1	125,4	0,076	0,471
39	95,4	125,3	0,086	0,551
40	96,6	125,5	0,096	0,642
41	97,8	125,2	0,108	0,744
42	99,0	125,5	0,121	0,859
43	100,1	125,5	0,135	0,987
44	101,2	125,5	0,150	1,129
45	102,1	125,5	0,163	1,285
46	103,1	125,3	0,180	1,457
47	104,0	125,4	0,196	1,644
48	104,9	125,4	0,213	1,849
49	105,7	125,3	0,230	2,071
50	106,5	125,4	0,249	2,310
51	107,3	125,5	0,269	2,569

Cuadro A.12 Resultados para la corrida 12 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 125 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
52	108,1	125,4	0,290	2,848
53	108,8	125,5	0,310	3,149
54	109,5	125,4	0,332	3,470
55	110,1	125,3	0,351	3,811
56	110,7	125,4	0,372	4,173
57	111,3	125,3	0,394	4,556
58	111,9	125,4	0,418	4,962
59	112,5	125,4	0,442	5,392
60	113,0	125,4	0,464	5,846
61	113,5	125,5	0,487	6,321
62	114,0	125,4	0,511	6,820
63	114,4	125,4	0,531	7,341
64	114,8	125,3	0,552	7,882
65	115,2	125,4	0,573	8,445
66	115,6	125,4	0,596	9,029
67	116,0	125,3	0,619	9,636
68	116,3	125,4	0,637	10,264
69	116,7	125,5	0,662	10,914
70	117,0	125,4	0,681	11,586
71	117,3	125,4	0,701	12,277
72	117,6	125,3	0,722	12,988
73	118,0	125,3	0,750	13,724
74	118,2	125,2	0,764	14,481
75	118,5	125,3	0,787	15,257
76	118,8	125,5	0,810	16,055
77	119,0	125,5	0,825	16,873
78	119,2	125,5	0,841	17,706
79	119,4	125,5	0,858	18,556
80	119,6	125,5	0,874	19,422
81	119,8	125,5	0,891	20,304
82	120,0	125,5	0,909	21,204
83	120,2	125,5	0,926	22,121
84	120,4	125,5	0,944	23,057
85	120,5	-	0,953	24,005
86	120,7	-	0,972	24,968
87	120,8	-	0,981	25,944
94	112,5	106,2	-	-

Cuadro A.12 Resultados para la corrida 12 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 125 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
104	100,0	101,1	-	-
114	96,6	101,1	-	-
124	96,5	105,0	-	-
134	96,4	106,2	-	-
144	96,3	106,4	-	-
154	96,3	106,4	-	-
164	96,3	106,0	-	-
174	96,2	105,3	-	-
184	96,2	104,6	-	-
194	96,1	103,8	-	-
204	96,0	103,0	-	-
214	95,9	102,1	-	-
224	95,7	101,3	-	-
234	95,5	100,6	-	-
247	95,2	99,9	-	-

Cuadro A.13 Resultados para la corrida 13 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 127 °C durante 75 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	16,7	34,4	-	-
1	16,8	-	-	-
2	17,4	-	-	-
3	15,8	112	-	-
4	12,6	79,9	-	-
5	20,8	-	-	-
6	24,8	-	-	-
7	28,9	-	-	-
8	33,1	-	-	-
9	36,3	-	-	-
10	38,8	127,3	0,000	0,000
11	41,3	127,2	0,000	0,001
12	43,8	127,2	0,001	0,001
13	46,4	127,2	0,001	0,002
14	49,0	127,2	0,001	0,003
15	51,7	127,2	0,001	0,004
16	54,4	127,3	0,002	0,006

Cuadro A.13 Resultados para la corrida 13 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 127 °C durante 75 min (continuación)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
17	57,0	127,2	0,002	0,007
18	59,6	127,3	0,003	0,010
19	62,2	127,3	0,004	0,013
20	64,8	127,4	0,005	0,017
21	67,2	127,3	0,006	0,022
22	69,6	127,3	0,007	0,029
23	71,9	127,4	0,009	0,037
24	74,2	127,3	0,011	0,047
25	76,3	127,5	0,014	0,059
26	78,4	127,4	0,017	0,075
27	80,4	127,3	0,020	0,093
28	82,4	127,4	0,025	0,116
29	84,3	127,3	0,030	0,143
30	86,1	127,4	0,035	0,175
31	87,8	127,3	0,041	0,213
32	89,5	127,4	0,049	0,259
33	91,0	127,3	0,056	0,311
34	92,6	127,3	0,066	0,372
35	94,0	127,4	0,075	0,442
36	95,4	127,4	0,086	0,523
37	96,8	127,4	0,098	0,614
38	98,0	127,3	0,110	0,719
39	99,3	127,4	0,125	0,836
40	100,4	127,3	0,139	0,968
41	101,6	127,3	0,155	1,115
42	102,6	127,3	0,171	1,278
43	103,6	127,4	0,188	1,458
44	104,6	127,4	0,207	1,655
45	105,6	127,4	0,228	1,873
46	106,5	127,2	0,249	2,112
47	107,4	127,5	0,271	2,372
48	108,2	127,5	0,293	2,654
49	109,0	127,4	0,316	2,958
50	109,8	127,3	0,341	3,287
51	110,5	127,5	0,365	3,641
52	111,2	127,5	0,391	4,018
53	111,8	127,3	0,414	4,420
54	112,5	127,3	0,442	4,849

Cuadro A.13 Resultados para la corrida 13 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 127 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
55	113,1	127,4	0,469	5,304
56	113,7	127,4	0,496	5,787
57	114,2	127,5	0,521	6,295
58	114,7	127,4	0,546	6,829
59	115,3	127,3	0,579	7,391
60	115,8	127,3	0,607	7,984
61	116,2	127,3	0,631	8,603
62	116,6	127,3	0,656	9,247
63	117,1	127,3	0,688	9,918
64	117,5	127,4	0,715	10,620
65	117,9	127,3	0,743	11,349
66	118,2	127,4	0,764	12,102
67	118,6	127,3	0,794	12,881
68	119,0	127,4	0,825	13,691
69	119,3	127,4	0,850	14,529
70	119,6	127,3	0,874	15,391
71	119,8	127,4	0,891	16,273
72	120,2	127,3	0,926	17,182
73	120,4	127,4	0,944	18,117
74	120,7	127,4	0,972	19,075
75	120,9	127,3	0,990	20,056
76	121,2	127,5	1,019	21,061
77	121,4	127,5	1,039	22,090
78	121,6	127,3	1,059	23,139
79	121,8	127,2	1,080	24,209
80	122,0	127,3	1,101	25,299
81	122,2	127,3	1,122	26,411
82	122,4	127,4	1,144	27,543
83	122,5	127,4	1,155	28,693
84	122,7	127,3	1,177	29,859
85	122,8	127,3	1,189	31,042
95	108,9	107,5	-	-
105	98,3	102,6	-	-
115	96,5	103,6	-	-
125	96,4	107,8	-	-
135	96,3	108,9	-	-
145	96,3	108,6	-	-

Cuadro A.13 Resultados para la corrida 13 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 3,6 L a 127 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
155	96,3	108,3	-	-
165	96,3	107,8	-	-
175	96,2	107,2	-	-
187	96,2	106,4	-	-
197	96,2	105,5	-	-
207	96,0	104,5	-	-
211	96,0	104,0	-	-
221	95,8	103,3	-	-
241	95,4	101,5	-	-
251	95,2	100,6	-	-
258	95,0	99,9	-	-

Cuadro A.14 Resultados para la corrida 14 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 7,2 L a 127 °C durante 60 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	16,0	29,6	-	-
1	14,8	-	-	-
2	14,8	-	-	-
3	14,5	112,5	-	-
4	15,2	-	-	-
5	15,7	77,9	-	-
6	19,5	-	-	-
7	23,1	-	-	-
8	28,4	-	-	-
9	32,0	-	-	-
10	34,3	127,3	0,000	0,000
11	36,7	127,5	0,000	0,001
12	39,1	127,4	0,001	0,001
13	41,6	127,2	0,001	0,001
14	44,1	127,2	0,004	0,002
15	46,5	127,2	0,005	0,003
16	49,0	127,2	0,006	0,003
17	51,5	127,3	0,001	0,005
18	53,8	127,2	0,002	0,006
19	56,2	127,2	0,002	0,008
20	58,5	127,2	0,002	0,010

Cuadro A.14 Resultados para la corrida 14 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 7,2 L a 127 °C durante 60 min (continuación)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
21	60,7	127,3	0,003	0,013
22	62,9	127,2	0,004	0,016
23	65,0	127,3	0,005	0,020
24	67,0	127,3	0,006	0,026
25	69,0	127,4	0,007	0,032
26	70,9	127,4	0,008	0,039
27	72,8	127,3	0,010	0,048
28	74,6	127,4	0,012	0,059
29	76,3	127,3	0,014	0,072
30	78,0	127,4	0,016	0,087
31	79,6	127,4	0,019	0,104
32	81,2	127,5	0,022	0,125
33	82,8	127,3	0,026	0,148
34	84,2	127,3	0,029	0,176
35	85,6	127,3	0,033	0,207
36	87,0	127,3	0,038	0,243
37	88,3	127,3	0,043	0,284
38	89,6	127,4	0,049	0,330
39	90,9	127,4	0,056	0,383
40	92,1	127,4	0,062	0,442
41	93,3	127,4	0,070	0,508
42	94,3	127,3	0,077	0,582
43	95,5	127,3	0,087	0,664
44	96,5	127,3	0,095	0,755
45	97,5	127,3	0,105	0,855
46	98,5	127,3	0,115	0,965
47	99,4	127,4	0,126	1,086
48	100,3	127,3	0,137	1,217
49	101,2	127,4	0,150	1,361
50	102,0	127,4	0,162	1,516
51	102,8	127,4	0,174	1,684
52	103,6	127,4	0,188	1,866
53	104,4	127,4	0,203	2,061
54	105,1	127,4	0,218	2,272
55	105,8	127,3	0,233	2,497
56	106,5	127,3	0,249	2,738
57	107,2	127,3	0,266	2,995
58	107,9	127,3	0,285	3,270

Cuadro A.14 Resultados para la corrida 14 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 7,2 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
59	108,5	127,4	0,301	3,563
60	109,1	127,4	0,319	3,874
61	109,7	127,3	0,338	4,203
62	110,3	127,3	0,358	4,551
63	110,8	127,3	0,376	4,918
64	111,3	127,3	0,394	5,303
65	111,8	127,3	0,414	5,707
66	112,3	127,3	0,434	6,131
67	112,8	127,3	0,455	6,575
68	113,3	127,4	0,478	7,042
69	113,8	127,5	0,501	7,531
70	114,2	-	0,521	8,042
71	114,6	-	0,541	8,573
72	115,0	-	0,562	9,125
73	115,3	-	0,579	9,696
74	115,6	-	0,596	10,283
75	115,7	-	0,601	10,881
80	110,5	107,2	-	-
90	100,0	102,0	-	-
100	96,8	104,6	-	-
110	96,6	107,1	-	-
120	96,5	107,5	-	-
130	96,5	107,5	-	-
140	96,4	107,3	-	-
150	96,4	106,8	-	-
160	96,3	106,1	-	-
170	96,3	105,3	-	-
180	96,2	104,5	-	-
190	96,2	103,5	-	-
200	96,1	102,5	-	-
210	96,0	101,8	-	-
220	95,8	100,9	-	-
230	95,6	100,0	-	-
231	95,6	99,9	-	-

Cuadro A.15 Resultados para la corrida 15 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 7,2 L a 125 °C durante 75 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	26,2	29,5	-	-
1	26,2	-	-	-
2	26,2	-	-	-
3	26,2	112,3	-	-
4	26,2	-	-	-
5	26,2	78,5	-	-
6	26,2	-	-	-
7	26,2	-	-	-
8	25,9	-	-	-
9	26,1	-	-	-
10	23,1	125,3	0,000	0,000
11	28,2	125,5	0,000	0,000
12	28,7	125,2	0,000	0,000
13	36,1	125,1	0,000	0,001
14	40,8	125,1	0,000	0,001
15	44,1	125,1	0,001	0,001
16	47,5	125,2	0,001	0,002
17	49,8	125,1	0,001	0,003
18	52,2	125,1	0,001	0,004
19	54,5	125,2	0,002	0,006
20	56,8	125,3	0,002	0,008
21	59,0	125,2	0,003	0,010
22	61,1	125,3	0,003	0,013
23	63,2	125,3	0,004	0,017
24	65,3	125,2	0,005	0,021
25	67,2	125,4	0,006	0,026
26	69,2	125,3	0,007	0,033
27	71,0	125,3	0,008	0,040
28	72,8	125,3	0,010	0,049
29	74,5	125,4	0,012	0,060
30	76,2	125,3	0,014	0,072
31	77,9	125,5	0,016	0,087
32	79,5	125,3	0,019	0,105
33	81,0	125,2	0,022	0,125
34	82,5	125,1	0,025	0,148
35	83,9	125,2	0,028	0,175
36	85,3	125,3	0,033	0,205
37	86,6	125,3	0,037	0,240

Cuadro A.15 Resultados para la corrida 15 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 7,2 L a 125 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
38	87,9	125,3	0,042	0,279
39	89,2	125,3	0,047	0,324
40	90,3	125,2	0,053	0,374
41	91,5	125,4	0,059	0,429
42	92,6	125,3	0,066	0,492
43	93,7	125,3	0,073	0,561
44	94,8	125,4	0,081	0,638
45	95,8	125,3	0,089	0,723
46	96,8	125,4	0,098	0,816
47	97,7	125,3	0,107	0,919
48	98,6	125,4	0,117	1,031
49	99,5	125,3	0,127	1,153
50	100,3	125,4	0,137	1,285
51	101,2	125,3	0,150	1,428
52	101,9	125,5	0,160	1,583
53	102,7	125,3	0,173	1,749
54	103,4	125,3	0,185	1,928
55	104,2	125,3	0,200	2,120
56	104,8	125,3	0,211	2,326
57	105,5	125,3	0,226	2,544
58	106,2	125,3	0,242	2,778
59	106,8	125,3	0,256	3,027
60	107,4	125,4	0,271	3,291
61	108,0	125,3	0,287	3,570
62	108,6	125,3	0,304	3,866
63	109,2	125,4	0,322	4,179
64	109,6	125,2	0,335	4,508
65	110,2	125,3	0,355	4,853
66	110,6	125,3	0,369	5,215
67	111,1	125,2	0,387	5,592
68	111,5	125,4	0,402	5,987
69	112,0	125,2	0,422	6,399
70	112,4	125,3	0,438	6,829
71	112,8	125,3	0,455	7,275
72	113,2	125,3	0,473	7,740
73	113,6	125,3	0,492	8,222
74	114,0	125,3	0,511	8,723
75	114,3	125,4	0,526	9,242

Cuadro A.16 Resultados para la corrida 16 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 7,2 L a 127 °C durante 75 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	-	28,4	-	-
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	112,1	-	-
4	-	78,0	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	29,1	127,3	0,000	0,000
11	29,7	127,2	0,000	0,000
12	29,8	127,2	0,000	0,000
13	28,3	127,2	0,000	0,001
14	32,2	127,3	0,000	0,001
15	34,1	127,2	0,000	0,001
16	42,1	127,3	0,001	0,001
17	45,6	127,2	0,001	0,002
18	49,3	127,2	0,001	0,003
19	51,7	127,2	0,001	0,004
20	54,1	127,2	0,002	0,005
21	56,4	127,2	0,002	0,007
22	58,6	127,3	0,003	0,010
23	60,9	127,3	0,003	0,012
24	63,0	127,3	0,004	0,016
25	65,1	127,2	0,005	0,020
26	67,2	127,3	0,006	0,025
27	69,1	127,4	0,007	0,032
28	71,0	127,3	0,008	0,039
29	72,8	127,4	0,010	0,048
30	74,6	127,3	0,012	0,059
31	76,4	127,4	0,014	0,072
32	78,1	127,3	0,016	0,087
33	79,6	127,4	0,019	0,104
34	81,3	127,4	0,022	0,125
35	82,8	127,4	0,026	0,149
36	84,2	127,3	0,029	0,176
37	85,6	127,3	0,033	0,208

Cuadro A.16 Resultados para la corrida 16 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 7,2 L a 127 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
38	87,0	127,3	0,038	0,244
39	88,3	127,3	0,043	0,284
40	89,6	127,3	0,049	0,331
41	90,8	127,3	0,055	0,383
42	92,1	127,4	0,062	0,442
43	93,2	127,2	0,069	0,508
44	94,3	127,3	0,077	0,581
45	95,4	127,4	0,086	0,662
46	96,5	127,4	0,095	0,753
47	97,5	127,3	0,105	0,853
48	98,5	127,4	0,115	0,963
49	99,4	127,4	0,126	1,084
50	100,3	127,3	0,137	1,216
51	101,2	127,5	0,150	1,359
52	102,0	127,4	0,162	1,515
53	102,8	127,4	0,174	1,683
54	103,6	127,4	0,188	1,864
55	104,4	127,3	0,203	2,060
56	105,2	127,3	0,220	2,271
57	105,8	127,3	0,233	2,498
58	106,6	127,4	0,251	2,739
59	107,2	127,3	0,266	2,998
60	107,9	127,4	0,285	3,273
61	108,5	127,4	0,301	3,566
62	109,2	127,3	0,322	3,878
63	109,7	127,4	0,338	4,209
64	110,3	127,4	0,358	4,557
65	110,8	127,3	0,376	4,924
66	111,3	127,4	0,394	5,309
67	111,9	127,3	0,418	5,715
68	112,4	127,3	0,438	6,143
69	112,8	127,4	0,455	6,590
70	113,3	127,3	0,478	7,056
71	113,8	127,3	0,501	7,545
72	114,2	127,4	0,521	8,056
73	114,6	127,3	0,541	8,587
74	115,0	127,5	0,562	9,139
75	115,4	127,3	0,584	9,713

Cuadro A.16 Resultados para la corrida 16 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 7,2 L a 127 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
76	115,8	127,4	0,607	10,308
77	116,2	127,3	0,631	10,927
78	116,5	127,4	0,649	11,568
79	116,8	127,4	0,668	12,226
80	117,2	127,3	0,694	12,908
81	117,5	127,4	0,715	13,612
82	117,8	127,4	0,736	14,338
83	118,1	127,4	0,757	15,084
84	118,4	127,3	0,779	15,852
85	118,7	127,3	0,802	16,643
86	119,0	-	0,825	17,457
87	119,2	-	0,841	18,290
88	119,5	-	0,866	19,144
89	119,6	-	0,874	20,014
90	119,8	-	0,891	20,897
95	113,8	104,8	-	-
105	101,3	105,9	-	-
115	97,0	107,2	-	-
125	96,6	108,0	-	-
135	96,5	107,8	-	-
145	96,5	107,3	-	-
155	96,3	106,8	-	-
165	96,2	106,0	-	-
175	96,3	105,1	-	-
185	96,3	104,1	-	-
195	96,2	103,1	-	-
205	96,2	102,4	-	-
215	96,0	101,6	-	-
225	96,0	100,0	-	-
230	95,8	99,9	-	-

Cuadro A. 17 Resultados para la corrida 17 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 10,8 L a 127 °C durante 60 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	-	29,7	-	-
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	112,4	-	-
4	-	-	-	-
5	-	83,1	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	28,6	127,1	0,000	0,000
11	31,5	127,3	0,000	0,000
12	31,8	127,5	0,000	0,000
13	39,8	127,5	0,000	0,001
14	46,0	127,4	0,001	0,001
15	51,3	127,2	0,001	0,002
16	54,6	127,1	0,002	0,004
17	57,8	127,1	0,002	0,006
18	60,8	127,4	0,003	0,009
19	63,5	127,5	0,004	0,012
20	66,2	127,3	0,005	0,017
21	68,5	127,1	0,006	0,023
22	70,8	127,2	0,008	0,030
23	72,9	127,3	0,010	0,039
24	74,9	127,2	0,012	0,050
25	76,8	127,3	0,014	0,063
26	78,5	127,4	0,017	0,079
27	80,2	127,4	0,020	0,097
28	81,8	127,3	0,023	0,119
29	83,3	127,3	0,027	0,144
30	84,8	127,4	0,031	0,173
31	86,1	127,3	0,035	0,206
32	87,5	127,5	0,040	0,244
33	88,7	127,3	0,045	0,286
34	89,9	127,5	0,051	0,334
35	91,0	127,2	0,056	0,387
36	92,2	127,3	0,063	0,447
37	93,2	127,5	0,069	0,513

Cuadro A.17 Resultados para la corrida 17 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 10,8 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	t (min)	t (min)	t (min)	t (min)
38	94,3	127,4	0,077	0,587
39	95,2	127,3	0,084	0,667
40	96,2	127,3	0,093	0,756
41	97,1	127,3	0,101	0,853
42	98,0	127,5	0,110	0,958
43	98,8	127,5	0,119	1,073
44	99,6	127,3	0,128	1,196
45	100,3	127,3	0,137	1,329
46	101,1	127,3	0,148	1,472
47	101,8	127,4	0,158	1,625
48	102,5	127,4	0,169	1,789
49	103,2	127,5	0,181	1,964
50	103,9	127,3	0,194	2,152
51	104,5	127,4	0,205	2,352
52	105,2	127,5	0,220	2,564
53	105,7	127,3	0,230	2,789
54	106,3	127,3	0,244	3,026
55	106,9	127,3	0,259	3,278
56	107,5	127,3	0,274	3,544
57	108,0	127,4	0,287	3,824
58	108,5	127,3	0,301	4,119
59	109,0	127,4	0,316	4,427
60	109,5	127,5	0,332	4,751
61	110,0	127,4	0,348	5,091
62	110,5	127,3	0,365	5,448
63	110,9	127,3	0,379	5,820
64	111,3	127,4	0,394	6,207
65	111,7	127,3	0,410	6,609
66	112,2	127,5	0,430	7,029
67	112,5	127,5	0,442	7,465
68	112,9	127,3	0,460	7,916
69	113,3	127,2	0,478	8,385
70	113,6	127,2	0,492	8,870
71	113,6	-	0,511	9,371
72	114,0	-	0,526	9,889
73	114,3	-	0,541	10,423
74	114,6	-	0,562	10,975
75	115,0	-	0,573	11,542

Cuadro A.17 Resultados para la corrida 17 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 10,8 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	t (min)	t (min)	t (min)	t (min)
76	115,2	-	0,584	12,121
77	115,4	-	0,590	12,708
80	112,9	109,0	-	-
90	101,8	103,5	-	-
100	97,3	102,1	-	-
110	96,6	107,0	-	-
120	96,6	107,8	-	-
130	96,5	107,8	-	-
140	96,4	107,5	-	-
150	96,3	107,1	-	-
160	96,3	106,5	-	-
170	96,3	105,6	-	-
180	96,2	104,7	-	-
190	96,2	103,7	-	-
200	96,1	102,8	-	-
210	96,0	101,8	-	-
220	95,9	101,1	-	-
223	95,8	99,7	-	-

Cuadro A.18 Resultados para la corrida 18 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 10,8 L a 127 °C durante 75 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	-	28,4	-	-
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	112,1	-	-
4	-	78,0	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	24,1	127,3	0,000	0,000
11	24,7	127,2	0,000	0,000
12	24,8	127,2	0,000	0,000
13	24,3	127,2	0,000	0,000

Cuadro A.18 Resultados para la corrida 18 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 10,8 L a 127 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
14	28,3	127,3	0,000	0,000
15	30,1	127,2	0,000	0,001
16	38,2	127,3	0,000	0,001
17	41,6	127,2	0,000	0,001
18	45,3	127,2	0,001	0,002
19	47,7	127,2	0,001	0,003
20	50,1	127,2	0,001	0,004
21	52,4	127,2	0,001	0,005
22	54,6	127,3	0,002	0,007
23	56,7	127,3	0,002	0,008
24	59,0	127,3	0,003	0,011
25	61,1	127,2	0,003	0,014
26	64,2	127,3	0,004	0,017
27	65,1	127,4	0,005	0,022
28	67,0	127,3	0,006	0,027
29	68,8	127,4	0,007	0,033
30	70,6	127,3	0,008	0,041
31	72,4	127,4	0,009	0,049
32	74,1	127,3	0,011	0,059
33	75,6	127,4	0,013	0,071
34	77,6	127,4	0,016	0,086
35	78,8	127,4	0,017	0,102
36	80,2	127,3	0,020	0,121
37	81,6	127,3	0,023	0,142
38	84,0	127,3	0,029	0,168
39	84,3	127,3	0,030	0,197
40	85,6	127,3	0,033	0,229
41	86,8	127,3	0,038	0,264
42	88,1	127,4	0,043	0,304
43	89,1	127,2	0,047	0,349
44	89,3	127,3	0,048	0,396
45	91,4	127,4	0,058	0,449
46	92,5	127,4	0,065	0,511
47	93,5	127,3	0,071	0,579
48	94,5	127,4	0,079	0,654
49	95,4	127,4	0,086	0,737
50	96,3	127,3	0,094	0,826

Cuadro A.18 Resultados para la corrida 18 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 10,8 L a 127 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
51	97,2	127,5	0,102	0,924
52	98,0	127,4	0,110	1,030
53	98,8	127,4	0,119	1,144
54	99,6	127,4	0,128	1,268
55	100,4	127,3	0,139	1,402
56	101,0	127,3	0,147	1,544
57	101,8	127,3	0,158	1,697
58	102,6	127,4	0,171	1,862
59	102,6	127,3	0,171	2,033
60	103,9	127,4	0,194	2,215
61	104,5	127,4	0,205	2,415
62	105,4	127,3	0,224	2,629
63	105,9	127,4	0,235	2,859
64	106,3	127,4	0,244	3,098
65	106,8	127,3	0,256	3,348
66	107,3	127,4	0,269	3,611
67	107,9	127,3	0,285	3,887
68	108,3	127,3	0,296	4,177
69	108,8	127,4	0,310	4,480
70	109,3	127,3	0,325	4,798
71	109,8	127,3	0,341	5,132
72	110,7	127,4	0,372	5,489
73	110,9	127,3	0,379	5,864
74	110,0	127,5	0,348	6,228
75	111,4	127,3	0,398	6,601
76	111,8	127,4	0,414	7,007
77	112,2	127,3	0,430	7,429
78	112,5	127,4	0,442	7,865
79	112,8	127,4	0,455	8,314
80	113,1	127,3	0,469	8,776
81	113,5	127,4	0,487	9,254
82	113,8	127,4	0,501	9,748
83	114,1	127,4	0,516	10,256
84	114,3	127,3	0,526	10,777
85	114,7	127,3	0,546	11,313
86	115,0	-	0,562	11,868
87	115,2	-	0,573	12,435
88	115,5	-	0,590	13,017

Cuadro A.18 Resultados para la corrida 18 con el biorreactor de 15 L, volumen de medio 10,8 L a 127 °C durante 75 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
89	115,6	-	0,596	13,610
90	115,8	-	0,607	14,211
91	115,9	-	0,613	14,821
95	109,8	104,8	-	-
105	97,3	105,9	-	-
115	93,0	107,2	-	-
125	92,4	108,0	-	-
135	92,2	107,8	-	-
145	91,0	107,3	-	-
155	89,9	106,8	-	-
165	89,5	105,9	-	-
175	89,5	105,1	-	-
185	89,3	104,2	-	-
195	89,2	103,1	-	-
205	89,2	102,3	-	-
215	89,1	101,6	-	-
225	89,0	100,0	-	-
230	88,9	99,9	-	-

Cuadro A.19 Resultados para la corrida 2 con el biorreactor de 7 L, volumen de melaza 1,5 L a 125 °C durante 60 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	30,4	47,1	-	-
1	28,1	-	-	-
2	30,2	-	-	-
3	29,6	111,8	-	-
4	31,2	-	-	-
5	29,5	82,4	-	-
6	30,8	-	-	-
7	28,8	-	-	-
8	31,1	-	-	-
9	31,8	125,3	0,000	0,000
10	35,2	125,2	0,000	0,000
11	36,3	125,5	0,000	0,001
12	38,5	125,3	0,000	0,001

Cuadro A.19 Resultados para la corrida 2 con el biorreactor de 7 L, volumen de melaza 1,5 L a 125 °C durante 60 min (continuación)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
13	38,9	125,3	0,000	0,001
14	39,5	125,3	0,000	0,002
15	50,0	125,3	0,001	0,003
16	54,2	125,3	0,002	0,004
17	57,1	125,3	0,002	0,006
18	59,9	125,3	0,003	0,008
19	62,6	125,2	0,004	0,012
20	65,4	125,2	0,005	0,016
21	68,2	125,2	0,006	0,021
22	70,8	125,3	0,008	0,029
23	73,5	125,3	0,010	0,038
24	76,2	125,3	0,014	0,050
25	78,7	125,3	0,017	0,065
26	81,1	125,3	0,022	0,085
27	83,5	125,3	0,027	0,109
28	85,6	125,5	0,033	0,140
29	87,8	125,6	0,041	0,177
30	89,8	125,6	0,050	0,223
31	91,6	125,5	0,060	0,278
32	93,5	125,5	0,071	0,343
33	95,2	125,5	0,084	0,421
34	96,8	125,3	0,098	0,512
35	98,3	125,4	0,113	0,618
36	99,7	125,5	0,130	0,740
37	101,0	125,5	0,147	0,878
38	102,3	125,5	0,166	1,034
39	103,5	125,3	0,187	1,211
40	104,6	125,5	0,207	1,408
41	105,8	125,5	0,233	1,628
42	106,8	125,5	0,256	1,872
43	107,8	125,4	0,282	2,141
44	108,7	125,4	0,307	2,435
45	109,6	125,4	0,335	2,757
46	110,5	125,3	0,365	3,107
47	111,2	125,4	0,391	3,484
48	112,0	125,5	0,422	3,891
49	112,6	125,4	0,447	4,325

Cuadro A.19 Resultados para la corrida 2 con el biorreactor de 7 L, volumen de melaza 1,5 L a 125 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
50	113,3	125,4	0,478	4,787
51	113,9	125,3	0,506	5,279
52	114,5	125,6	0,536	5,800
53	115,0	125,6	0,562	6,349
54	115,5	125,5	0,590	6,925
55	116,0	125,5	0,619	7,530
56	116,5	125,5	0,649	8,164
57	116,9	125,4	0,675	8,826
58	117,3	125,4	0,701	9,514
59	117,7	125,4	0,729	10,229
60	118,0	125,3	0,750	10,968
61	118,3	125,6	0,772	11,729
62	118,6	125,5	0,794	12,512
63	118,9	125,5	0,818	13,318
64	119,2	125,5	0,841	14,147
65	119,5	125,5	0,866	15,001
66	119,6	125,4	0,874	15,871
67	119,9	125,4	0,900	16,758
68	120,1	125,6	0,917	17,667
69	120,2	-	0,926	18,588
70	120,3	-	0,935	19,519
71	120,5	-	0,953	20,463
72	120,9	-	0,990	21,435
79	119,1	107,0	-	-
89	100,3	108,1	-	-
99	96,8	108,5	-	-
109	96,6	108,6	-	-
119	96,6	108,3	-	-
129	96,5	107,8	-	-
139	96,3	107,0	-	-
149	96,3	106,0	-	-
159	96,3	105,1	-	-
169	96,4	104,1	-	-
179	96,5	103,0	-	-
189	96,5	102,0	-	-
199	96,5	101,1	-	-
209	96,5	100,1	-	-
212	96,5	99,9	-	-

Cuadro A.20 Resultados para la corrida 6 con el biorreactor de 7 L, volumen de melaza 3,0 L a 127 °C durante 60 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	28,1	41,0	-	-
1	25,3	-	-	-
2	24,1	-	-	-
3	25,1	113,6	-	-
4	25,9	87,5	-	-
5	26,3	-	-	-
6	25,0	-	-	-
7	26,2	-	-	-
8	24,8	126,3	0,000	0,000
9	24,3	127,4	0,000	0,000
10	25,0	127,4	0,000	0,000
11	26,8	127,5	0,000	0,000
12	25,8	127,5	0,000	0,000
13	24,6	127,4	0,000	0,001
14	26,5	127,4	0,000	0,001
15	24,9	127,5	0,000	0,001
16	26,1	127,4	0,000	0,001
17	26,2	127,5	0,000	0,001
18	26,3	127,5	0,000	0,001
19	26,4	127,5	0,000	0,001
20	25,1	127,4	0,000	0,001
21	23,1	127,4	0,000	0,001
22	24,5	127,4	0,000	0,001
23	27,9	127,4	0,000	0,002
24	34,6	127,4	0,000	0,002
25	42,6	127,4	0,001	0,002
26	43,1	127,4	0,001	0,003
27	43,9	127,4	0,001	0,003
28	44,7	127,4	0,001	0,004
29	45,6	127,4	0,001	0,005
30	46,6	127,4	0,001	0,005
31	47,8	127,4	0,001	0,006
32	53,8	127,4	0,002	0,007
33	58,0	127,4	0,002	0,009
34	61,3	127,4	0,003	0,012
35	64,0	127,5	0,004	0,016
36	66,6	127,4	0,005	0,021

Cuadro A.20 Resultados para la corrida 6 con el biorreactor de 7 L, volumen de melaza 3,0 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
37	69,2	127,4	0,007	0,027
38	71,6	127,4	0,009	0,035
39	74,0	127,4	0,011	0,045
40	76,3	127,4	0,014	0,057
41	78,5	127,4	0,017	0,072
42	80,5	127,4	0,021	0,091
43	82,5	127,4	0,025	0,114
44	84,4	127,4	0,030	0,141
45	86,2	127,4	0,035	0,174
46	87,9	127,5	0,042	0,213
47	89,6	127,5	0,049	0,258
48	91,2	127,4	0,057	0,311
49	92,6	127,5	0,066	0,373
50	94,1	127,4	0,076	0,443
51	95,5	127,5	0,087	0,524
52	96,8	127,5	0,098	0,617
53	98,0	127,4	0,110	0,721
54	99,2	127,4	0,123	0,838
55	100,3	127,5	0,137	0,968
56	101,4	127,4	0,153	1,113
57	102,4	127,4	0,168	1,273
58	103,4	127,4	0,185	1,449
59	104,3	127,4	0,201	1,643
60	105,3	127,5	0,222	1,854
61	106,2	127,4	0,242	2,086
62	107,0	127,4	0,261	2,337
63	107,8	127,4	0,282	2,609
64	108,6	127,4	0,304	2,902
65	109,3	127,5	0,325	3,217
66	110,0	127,4	0,348	3,553
67	110,6	127,4	0,369	3,912
68	111,3	127,4	0,394	4,293
69	111,9	-	0,418	4,699
70	112,5	-	0,442	5,129
71	113,0	-	0,464	5,583
72	113,5	-	0,487	6,058
73	114,0	-	0,511	6,557
74	114,5	-	0,536	7,081

Cuadro A.20 Resultados para la corrida 6 con el biorreactor de 7 L, volumen de melaza 3,0 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
75	114,9	-	0,557	7,627
76	115,3	-	0,579	8,195
77	115,6	-	0,596	8,782
78	116,0	109,9	0,619	9,389
79	116,4	-	0,643	10,021
80	116,7	-	0,662	10,673
82	117,1	-	0,688	11,348
83	117,4	-	0,708	12,046
84	117,7	-	0,729	12,764
85	118,0	-	0,750	13,503
86	118,3	-	0,772	14,264
87	118,5	-	0,787	15,044
88	117,5	109,8	-	-
98	103,7	110,3	-	-
108	97,5	110,3	-	-
118	96,9	110,3	-	-
128	96,8	110,1	-	-
138	96,8	109,5	-	-
148	96,6	109,0	-	-
158	96,4	107,9	-	-
168	96,2	106,9	-	-
178	96,2	105,8	-	-
188	96,3	104,3	-	-
198	96,3	103,6	-	-
208	96,4	102,6	-	-
218	96,4	101,6	-	-
228	96,5	100,5	-	-
235	96,5	99,2	-	-

Cuadro A.21 Resultados para la corrida 7 con el biorreactor de 7 L, volumen de melaza 4,5 L a 127 °C durante 60 min

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
0	19,9	33,2	-	-
1	20,1	-	-	-
2	20,5	-	-	-
3	21,0	112,1	-	-
4	21,1	86,9	-	-
5	21,1	-	-	-
6	21,1	-	-	-
7	21,2	-	-	-
8	21,5	-	-	-
9	22,5	-	-	-
10	26,5	127,3	0,000	0,000
11	29,8	127,4	0,000	0,000
12	33,4	127,3	0,000	0,000
13	35,7	127,2	0,000	0,001
14	36,6	127,2	0,000	0,001
15	37,0	127,2	0,000	0,001
16	37,5	127,2	0,000	0,002
17	37,6	127,3	0,000	0,002
18	38,0	127,2	0,000	0,002
19	38,3	127,2	0,000	0,003
20	38,4	127,3	0,000	0,003
21	39,0	127,4	0,000	0,003
22	39,5	127,3	0,000	0,004
23	40,7	127,4	0,000	0,004
24	44,1	127,3	0,001	0,005
25	50,6	127,3	0,001	0,006
26	55,2	127,3	0,002	0,007
27	58,2	127,5	0,002	0,009
28	61,2	127,3	0,003	0,012
29	63,2	127,4	0,004	0,016
30	65,1	127,3	0,005	0,020
31	67,0	127,4	0,006	0,025
32	68,9	127,5	0,007	0,031
33	70,6	127,4	0,008	0,039
34	72,5	127,5	0,010	0,047
35	74,2	127,5	0,011	0,058
36	75,8	127,4	0,013	0,070

Cuadro A.21 Resultados para la corrida 7 con el biorreactor de 7 L, volumen de melaza 4,5 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
37	77,4	127,3	0,015	0,084
38	79,0	127,4	0,018	0,101
39	80,5	127,5	0,021	0,120
40	82,0	127,3	0,024	0,142
41	83,5	127,3	0,027	0,167
42	84,8	127,3	0,031	0,197
43	86,2	127,3	0,035	0,230
44	87,5	127,3	0,040	0,268
45	88,8	127,2	0,046	0,311
46	90,0	127,3	0,051	0,359
47	91,2	127,4	0,057	0,413
48	92,3	127,4	0,064	0,474
49	93,5	127,5	0,071	0,541
50	94,5	127,5	0,079	0,616
51	95,6	127,5	0,087	0,699
52	96,6	127,5	0,096	0,791
53	97,6	127,5	0,106	0,892
54	98,5	127,4	0,115	1,003
55	99,5	127,5	0,127	1,124
56	100,3	127,4	0,137	1,256
57	101,2	127,3	0,150	1,400
58	102,1	127,3	0,163	1,556
59	102,9	127,3	0,176	1,726
60	103,7	127,2	0,190	1,909
61	104,5	127,5	0,205	2,107
62	105,3	127,5	0,222	2,320
63	106,0	127,4	0,237	2,550
64	106,7	127,2	0,254	2,795
65	107,4	127,5	0,271	3,058
66	108,0	127,3	0,287	3,337
67	108,6	127,3	0,304	3,633
68	109,3	127,4	0,325	3,947
69	109,8	127,3	0,341	4,281
70	110,4	127,5	0,362	4,632
71	111,0	-	0,383	5,005
72	111,5	-	0,402	5,397
73	112,0	-	0,422	5,809

Cuadro A.21 Resultados para la corrida 7 con el biorreactor de 7 L, volumen de melaza 4,5 L a 127 °C durante 60 min (**continuación**)

t (min)	T_B (°C)	T_A (°C)	L (adimensional)	F (min)
74	112,5	-	0,442	6,241
75	112,9	-	0,460	6,692
76	113,4	-	0,482	7,163
77	113,8	-	0,501	7,655
78	114,3	-	0,526	8,169
79	114,6	-	0,541	8,702
80	114,8	-	0,552	9,249
90	103,8	106,5	-	-
100	97,6	106,7	-	-
110	97,0	107,7	-	-
120	97,0	108,1	-	-
130	96,8	108,2	-	-
140	96,6	108,0	-	-
150	96,5	107,3	-	-
160	96,2	106,5	-	-
170	96,3	105,5	-	-
180	96,3	104,5	-	-
190	96,3	103,3	-	-
200	96,4	102,3	-	-
210	96,4	101,4	-	-
220	96,5	100,5	-	-
226	96,5	99,9	-	-

Cuadro A.22 Conteos y resultados del cálculo de unidades formadoras de colonias bacterianas en la muestra inicial y final de cada esterilización utilizando melaza como medio de cultivo en el biorreactor de 7,0 L

Corrida	T (°C)	V (L)	Dilución	UFC ₁ ^a	UFC ₂ ^a	UFC ₁ /mL	UFC ₂ /mL
1			10 ⁻⁶	23	0	2,3x10 ⁸	0
2	125	1,5	10 ⁻⁶	3	0	3,0E+07	0
3			10 ⁻⁶	17	0	1,7 x10 ⁸	0
4			10 ⁻⁶	25	0	2,5 x10 ⁸	0
5	127	3,0	10 ⁻⁷	3	0	3,0 x10 ⁸	0
6			10 ⁻⁶	22	0	2,2 x10 ⁸	0
7			10 ⁻⁷	7	0	6,5 x10 ⁸	0
8	127	4,5	10 ⁻⁷	9	0	9,0 x10 ⁸	0
9			10 ⁻⁷	7	0	7,0 x10 ⁸	0

a. Los conteos se realizaron por duplicado, el resultado que se muestra en Cuadro A.22 corresponde al promedio de las UFC de cada placa.

Cuadro A.23 Conteos y resultados del cálculo de unidades formadoras de colonias de hongos en la muestra inicial y final de cada esterilización utilizando melaza como medio de cultivo en el biorreactor de 7,0 L

Corrida	T (°C)	V (L)	Dilución	UFC ₁ ^a	UFC ₂ ^a	UFC ₁ /mL	UFC ₂ /mL
1			10 ⁻⁶	28	0	2,8x10 ⁸	0
2	125	1,5	10 ⁻⁶	9	0	9,0 x10 ⁷	0
3			10 ⁻⁶	25	0	2,0 x10 ⁸	0
4			10 ⁻⁷	21	0	2,1 x10 ⁹	0
5	127	3,0	10 ⁻⁷	3	0	3,0x10 ⁸	0
6			10 ⁻⁷	38	0	3,8 x10 ⁹	0
7			10 ⁻⁶	6	0	6,0 x10 ⁷	0
8	127	4,5	10 ⁻⁶	10	0	1,0x10 ⁸	0
9			10 ⁻⁶	15	0	1,5x10 ⁸	0

a. Los conteos se realizaron por duplicado, el resultado que se muestra en Cuadro A.23 corresponde al promedio de las UFC de cada placa.

Cuadro A.24 Resultados de concentración de azúcares fermentables presentes en las muestras de melaza para cada esterilización con el biorreactor de 7,0 con un tiempo de esterilización de 60 min

Corrida	T (°C)	V (L)	Sacarosa₁ (g/L)	Sacarosa₂ (g/L)	Dextrosa₁ (g/L)	Dextrosa₂ (g/L)
1			9,33	12,2	0,160	0,920
2	125	1,5	9,24	12,1	0,044	0,890
3			9,41	12,7	0,275	0,943
4			9,76	11,5	0,248	0,783
5	127	3,0	7,57	12,2	0,085	0,859
6			3,40	9,13	0,061	0,696
7			12,9	13,4	0,860	1,05
8	127	4,5	4,38	12,4	0,218	0,908
9			11,0	11,7	1,90	3,59

Muestra de cálculos

B.1 Cálculo del tiempo de muerte requerido para lograr un SAL de 10^{-6}

A partir de la Ecuación 3.1 se despeja el tiempo requerido para lograr una reducción en la población original del microorganismo resistente a la temperatura igual a seis ciclos logarítmicos.

$$F_0 = t = D[\log(N_0) - \log(N)] \quad [C.1]$$

En el Cuadro 7.1, se incluye los valores de la ficha técnica del microorganismo, la población de las ampollas utilizadas como indicadores biológicas que corresponde al valor de N_0 y el valor del tiempo de reducción decimal es decir D , por otro lado N se obtiene al reducir el 90% de la población hasta alcanzar los seis ciclos.

$$F_0 = t = 1,7 \text{ min} [\log(9,1 \times 10^5) - \log(0,91)]$$

$$F_0 = 10,2 \text{ min}$$

B.2 Cálculo del valor de letalidad para cada combinación de tiempo y temperatura

Para el cálculo de la letalidad se utiliza la Ecuación 3.16, la expresión puntual es:

$$L = 10^{\left(\frac{T-T_R}{z}\right)} \quad [C.2]$$

Siendo la temperatura de referencia 121 °C, y z el valor correspondiente al microorganismo utilizado para la validación.

A continuación, se sustituye en la ecuación anterior el valor de temperatura correspondiente al minuto 24 de los datos experimentales para la corrida con el biorreactor de 7 L con 3 L de medio a 127 °C y 75 min (Ver Cuadro A.1),

$$L = 10^{\left(\frac{54,8-121}{24}\right)}$$

$$L = 0,002$$

B.3 Cálculo del área bajo la curva temperatura-tiempo

Para el cálculo del área bajo la curva se utiliza la regla del trapecio Para ejemplificar el dicho cálculo se toman los valores en el minuto 23 y 24 del Cuadro A.1.

$$A = \frac{(t_2 - t_1) * (L_2 - L_1)}{2} \quad [C.3]$$

Sustituyendo los valores de tiempo y letalidad del Cuadro A.1 y correspondientes a los minutos 23 y 24.

$$A = \frac{(24 - 23) * (0,002 - 0,001)}{2}$$

$$A = 0,002 \text{ min}$$

Dicho resultado no aparece como tal ya que lo que se reporta es el acumulado, es decir el factor F como se explica en la siguiente sección.

B.4 Cálculo del factor F o tiempo de muerte a partir de los datos de temperatura-tiempo de cada corrida

El tiempo de muerte corresponde al acumulado de las áreas obtenidas a partir de la regla del trapecio.

Por ejemplo, para el minuto 23 en el Cuadro A.1 el factor f tiene un valor de 0,001 min, si a este resultado se suma el valor del área bajo la curva de la secciones anterior (minuto 0 al 23) se obtiene un factor F del minuto 24 igual a 0,006 min.

Este cálculo se repite con los valores minuto a minuto con el fin de obtener un factor F de la corrida, Dichos cálculos se realizaron programando una hoja de EXCEL.

B.5 Cálculo de las UFC en la muestra inicial y final de melaza

Para el cálculo de las unidades formadoras de colonias se utiliza la siguiente relación:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{número de colonias por placa} * \text{factor de dilución}}{mL \text{ de la muestra}}$$

Para ejemplificar, se toma del Cuadro A.22 los datos de la melaza inicial para la corrida 1.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{23 * \left(\frac{1}{10^{-6}}\right)}{0,1}$$
$$2,3 \times 10^8 \frac{UFC}{mL}$$

El resultado anterior se presenta en el Cuadro A.22

Procedimiento experimental

C.1 Preparación del biorreactor para llevar a esterilizar

- El recipiente de vidrio se lava con una solución jabonosa y abundante agua mientras que las piezas de acero inoxidable que conforman la tapa luego del lavado se limpian con una disolución de etanol al 70%.
- Se llena la chaqueta del equipo con agua de ósmosis, hasta aproximadamente la mitad de su capacidad, utilizando el equipo de control automático marca Applikon asociado a cada biorreactor.
- Luego se alimenta el interior del biorreactor con la cantidad de medio según el volumen de trabajo de la corrida a realizar.
- Se enciende el autoclave, mientras este equipo alcanza la presión de operación al generar vapor en la caldera, se colocan los indicadores en el biorreactor y se programa el Data Logger para su inicio a la hora exacta en la que se va a introducir el biorreactor en el autoclave.
- Se cierra la puerta del autoclave comienza el proceso de esterilización. Durante la etapa de calentamiento el termopar ubicado dentro de la cámara del autoclave solo registra las temperaturas en los pulsos de vacío y calor que realiza. Durante la esterilización toma lecturas minuto a minuto y en la etapa de enfriamiento realiza una medición de la temperatura cada 10 minutos. El Data Logger ofrece una lectura de temperatura cada minuto durante la totalidad del proceso.
- Al terminar el proceso, se reduce la presión y al alcanzar la temperatura final, la cámara del autoclave permite la apertura, se debe esperar unos minutos hasta que el biorreactor baje su temperatura y sea fácil manipularlo, para extraer los indicadores y el Data Logger, y se toman los datos generados por el autoclave para su posterior análisis. El proceso en general, sin incluir el lavado y armado que deben realizarse previamente, tarda alrededor de 4 horas.

C.2 Preparación de placas Petri con agar papa dextrosa (PDA) y agar tripticasa soya (TSA)

- Se disuelve la cantidad indicada por el fabricante (40 g de PDA y 39 g TSA) en un litro de agua de ósmosis, se utiliza la plantilla de agitación magnética, para llevar cada una de las mezclas a ebullición y luego de esto inmediatamente se retiran del calentamiento.
- Se llevan los Erlenmeyer con los medios de cultivo preparados a la autoclave, donde se esterilizan por un tiempo de 20 minutos a 121 ° C.
- Una vez que se tiene el medio de cultivo estéril se deja que su temperatura descienda hasta que sea fácilmente manipulable y en la cámara de bioseguridad se chorrean las placas, Cada una queda cubierta con el material un espesor aproximado de 0,5 cm desde la base.
- Se deja enfriar las placas, se empacan y se rotulan, Una vez listas se guardan en frío para evitar la deshidratación del medio de cultivo.

C.3 Preparación del agua peptonada tamponada

- Se disuelve la cantidad indicada por el fabricante (25,5 g del sólido) en un litro de agua de ósmosis, se utiliza la plantilla de agitación magnética para lograr una composición homogénea.
- Se llevan los Erlenmeyer con las disoluciones preparadas al autoclave, donde se esterilizan por un tiempo de 20 minutos a 121 °C.

C.4 Activación de las bacterias y hongos presentes en la melaza grado alimenticio

Debido a que la melaza se almacena en frío para conservarla, es necesario promover la activación de los microorganismos presentes ya que si esto no se realiza el conteo se dificulta introduciendo un error negativo.

- Se prepara la disolución de melaza en agua peptonada tamponada según el volumen que se desea llevar a esterilizar, con una concentración de 30 g/L.

- Esta disolución se prepara en la cámara de bioseguridad para evitar contaminación cruzada y garantizar que la carga microbiana de la muestra corresponde exclusivamente a de la melaza en estudio.
- Los Erlenmeyer con las disoluciones preparadas se llevan a una incubadora con agitación a las siguientes condiciones: 30 °C y 170 rpm.

C.5 Dilución seriada de las muestras de melaza, previo y post esterilización

- La dilución seriada tiene un factor de dilución constante (FD = 10), se coloca 1 mL de la dilución original a un tubo que contiene 9 mL del solvente seleccionado, por lo que se tiene un volumen final de 10 mL. En el caso en estudio dicho solvente es agua peptonada tamponada. Uno de los cuidados que se debe tener es el cambio de la punta de micropipeta al pasar de una dilución a otra para evitar aumentar la carga en las diluciones más diluidas y la contaminación cruzada.
- Para los ensayos iniciales, es decir, cuando no se conoce la carga microbiana en la muestra se deben preparar diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Una vez que se identifica cuáles de las diluciones son las que permiten el conteo microbiano se continúan realizando solo las diluciones necesarias.

C.6 Recuento total por esparcimiento en placa Petri con PDA y TSA

- Se inocula por duplicado un volumen de 100,00 μ L de las diluciones seriadas preparadas anteriormente, en placas Petri con Agar PDA para el conteo de hongos y TSA para el conteo de bacterias.
- Se esparce el inóculo con asa Drigalski.
- Se deja secar por 15 min.

C.7 Incubación

- Se incuban las placas invertidas, las de Agar Papa Dextrosa a 30 °C durante 72 horas, mientras que las de Agar Trypticase Soya a 35 °C durante 16 horas, en incubadora biológica.
- Se realizan controles de esterilidad, en una placa con restos de PDA y TSA. La placa se coloca abierta en la cámara de flujo laminar mientras se siembran las

muestras en las distintas placas, una vez terminado el procedimiento se cierran y se incuban junto con las otras para comprobar que el ambiente de trabajo sea estéril.

C.8 Conteo

- Se deben contar las placas que contengan entre 25-250 UFC/placa para bacterias, con la excepción del *Bacillus cereus*, donde el rango contable 3-30 UFC (los recuentos se reportan con 2 cifras significativas).
- Los esparcidores siempre se cuentan como 1 UFC. Finalmente, el resultado se reporta en UFC/mL.
- Debido a que las pruebas se realizan por platos dobles, los resultados para una misma dilución se promedian.

Nota: Si dos diluciones son contables se obtiene una relación (ya multiplicado por el factor de dilución) del más diluido entre el más concentrado, Si el resultado es > 2 se reporta la más concentrada, Si el resultado es < 2 se reporta el promedio.

C.9 Cuantificación de azúcares (g/L) en el analizador bioquímico

- Se prepara la disolución buffer correspondiente y la disolución estándar para calibrar. Estas disoluciones se preparan a partir del reactivo que distribuye en fabricante particularmente para el YSI Model 2700 SELECT Biochemistry Analyze.
- De acuerdo al analito que se desea analizar se selecciona la membrana enzimática correspondiente. Para instalar la membrana se saca el sensor y se coloca una gota de disolución salina sobre la membrana y otra sobre el sensor, finalmente se acopla la membrana al sensor.
- Se colocan el carrusel de muestras dos disoluciones estándar, un patrón de linealidad y las muestras a analizar. Inicialmente el equipo comprueba su calibración con los primeros patrones y la linealidad se corrobora de acuerdo al manual del equipo, si el resultado es aceptable se proceden a analizar las muestras. Entre cada análisis el equipo realiza un lavado para remover los residuos de la toma de muestra y los coloca en el recipiente de residuos.

C.10 Tinción diferencial: tinción de Gram

- Se prepara un frotis o extendido colocando sobre un portaobjetos una gota de agua, en la cual se coloca el cultivo bacteriano de interés que ha sido tomado de la placa con un asa previamente esterilizada.
- Se deja secar al aire y se fija en la llama.
- Se cubre el extendido con cristal violeta por 1 minuto.
- Se lava con agua y se escurre.
- Se cubre con solución de lugol por 2 minutos.
- Se lava con agua y se escurre.
- Se decolora con alcohol-acetona (decolorante) y se lava inmediatamente con agua. Se repite esta operación hasta que casi no se libere cristal violeta.
- Se escurre el exceso de agua y se cubre con safranina por 30 segundos.
- Se lava con agua, se escurre y se deja secar.
- Se observa al microscopio.

C.11 Tinción de estructuras o materiales de reserva: tinción de esporas

- Se hace un extendido con el cultivo y se fija en la llama.
- Se cubre con verde malaquita y se calienta durante 10 minutos aplicando la llama con un mechero por debajo de la lámina. Debe haber emisión de vapor sin que la preparación hierva o se seque. Se adiciona más colorante en caso de que se seque.
- Se lava con agua durante 30 segundos.
- Se cubre con safranina por 30 segundos.
- Se lava, escurre y se deja secar.
- Se observa al microscopio.

ANEXOS

Anexo 1. Resumen de los resultados obtenidos en cada una de la esterilizaciones realizadas en las fases experimentales 1 y 2

Corrida	V_B (L)	V_{B,M} (L)	T_A (°C)	t_{A,E} (min)	CUT (min)	T_{B,2}^a (°C)	t_{A,2}^b (min)	F (min)
1			127	75	9	122,5	44 ^c	39,554
2		3	125	75	9	120,4	160	25,805
3			125	60	9	119,2	160	17,671
4			127	60	9	120,5	170	21,557
5	7		1,5	125	60	9	120,5	143
6			125	60	9	117,6	138	17,385
7		4,5	127	60	10	121,3	156	23,310
8			125	65	9	119,3	140	20,423
9			125	75	9	121,3	160	31,343
10			125	60	10	116,2	150	13,376
11		3,6	127	60	10	119,0	170	16,444
12			125	75	9	120,4	163	26,925
13			127	75	10	122,8	173	32,230
14	15		127	60	10	113,8	162	10,881
15		7,2	125	75	10	117,3	123	17,585
16			127	75	10	118,7	145	20,897
17		10,8	127	60	10	113,6	153	12,708
18			127	75	10	114,7	145	14,821

^aTemperatura en el interior del biorreactor al terminar el tiempo de esterilización programado en el autoclave

^bTiempo que tarda la etapa de enfriamiento, desde que finaliza el tiempo de esterilización programado en el autoclave hasta la apertura de la cámara

^cTiempo hasta alcanzar una temperatura de 109,1 °C

Anexo 2. Contribuciones porcentuales de cada una de las etapas de esterilización a la duración total del proceso, en función del aumento y disminución de temperatura en el interior del biorreactor

Corrida	V _B (L)	V _{B,M} (L)	CUT (min)	t _{B,F} ^a (min)	t _{B,2} ^b (min)	t _{total} (min)	%CUT	% t _{B,F}	% t _{B,2}
1			9	87	34 ^c	130	6,9	66,9 ^c	26,2
2		3	9	76	159	244	3,7	31,1	65,2
3			9	62	158	229	3,9	27,1	69,0
4			9	65	165	239	3,8	27,2	69,0
5	7	1,5	9	62	141	212	4,2	29,2	66,5
6			9	64	134	207	4,3	30,9	64,7
7		4,5	10	62	154	226	4,4	27,4	68,1
8			9	66	139	214	4,2	30,8	65,0
9			9	78	157	244	3,7	32,0	64,3
10			10	65	145	220	4,5	29,5	65,9
11		3,6	10	63	167	240	4,2	26,3	69,6
12			9	79	159	247	3,6	32,0	64,4
13			10	76	172	258	3,9	29,5	66,7
14	15		10	65	156	231	4,3	28,1	67,5
15		7,2	10	78	121	209	4,8	37,3	57,9
16			10	80	140	230	4,3	34,8	60,9
17			10,8	10	67	146	223	4,5	30,0
18			10	80	140	230	4,3	34,8	60,9

^a Tiempo desde que el autoclave comienza la etapa de esterilización hasta que el biorreactor alcanza su máxima temperatura. Intervalo para el cual se calcula la letalidad

^b Tiempo que tarda la etapa de enfriamiento, desde que el biorreactor alcanza su máxima temperatura hasta que hasta la apertura de la cámara

^c Tiempo hasta alcanzar una temperatura de 109,1 °C