

	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS		CÓDIGO	FO-GS-15	
			VERSIÓN	02	
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN			FECHA	03/04/2017
				PÁGINA	1 de 1
ELABORÓ		REVISÓ		APROBÓ	
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad		Líder de Calidad	

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE(S): DEISY MALLERLIN APELLIDOS: BASTO CONTRERAS

NOMBRE(S): DAYANA ANDREA APELLIDOS: MENDOZA MONTOYA

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): GERMAN RICARDO APELLIDOS: GELVES ZAMBRANO

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): MODELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TANASA A PARTIR DE *Bacillus cereus* EN DIFERENTES MODOS DE OPERACIÓN

RESUMEN

La tanasa es una enzima que se puede encontrar en hongos, levaduras y bacterias, la cual es importante para la obtención de vinos, cervezas, clarificación de bebidas y licor de bellota. No obstante, la producción de tanasa se realiza mediante el modo de operación batch. Por esta razón se presenta varios tiempos muertos y su producción es baja. Mediante esta investigación se evaluó el enfoque computacional de un biorreactor con distintos modos de operación como: batch, continuo y fed-batch para la producción de tanasa a partir de *Bacillus cereus*, para poder determinar con cuál de estos modelos de operación se puede obtener una mayor productividad de tanasa. Se realizaron cuatro simulaciones en los distintos modos de operación, por lo tanto, se realizó una comparación con los modos de operación, demostrando que el modo más eficiente fue el fed-batch con un valor de 0,405 U/g, seguido del modo batch con 0,32 U/g y, por último, el modo continuo con un valor de 0,26. Implementando técnicas computacionales, con el fin de reducir los tiempos muertos y ayudar a economizar a las industrias.

Palabras claves: Modo de operación, biorreactor, tanasa, *Bacillus cereus* y simulación.

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 59 PLANOS: ILUSTRACIONES: 24 CD ROOM:

MODELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TANASA A PARTIR DE *Bacillus cereus*
EN DIFERENTES MODOS DE OPERACIÓN

DEISY MALLERLIN BASTO CONTRERAS

DAYANA ANDREA MENDOZA MONTOYA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE.
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA BIOTECNOLOGICA
SAN JOSE DE CUCUTA,

2022

MODELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TANASA A PARTIR DE *Bacillus cereus*
EN DIFERENTES MODOS DE OPERACIÓN

DEISY MALLERLIN BASTO CONTRERAS

DAYANA ANDREA MENDOZA MONTOYA

Anteproyecto modalidad Trabajo de Investigación presentado como requisito para optar
por el título de Ingeniero (a) Biotecnológico (s)

Director (a):

German Ricardo Gelves Zambrano, Ing, PhD

Docente TC UFPS

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE.
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA BIOTECNOLOGICA
SAN JOSE DE CUCUTA,

2022

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 28 septiembre de 2022

HORA: 08:00 A.M.

LUGAR: SALA 5 – CREAD

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: “MODELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TANASA A PARTIR DE *Bacillus cereus* EN DIFERENTES MODOS DE OPERACIÓN”

MODALIDAD: INVESTIGACION

JURADO: JANET BIBIANA GARCIA MARTINEZ
HEBERTH MILTON MOJICA SÁNCHEZ
DANNY WALDIR IBARRA VEGA

ENTIDAD: UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER

DIRECTOR: GERMAN RICARDO GELVES ZAMBRANO, ING, PHD

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Deisy Mallerlin Basto Contreras	1611360	4.3
Dayana Andrea Mendoza Montoya	1611381	4.3

OBSERVACIONES: APROBADO

FIRMA DE LOS JURADOS

Bibiana Garcia

Heberth

Danny Ibarra V.

Janet Bibiana Garcia Martinez Heberth Milton Mojica Sanchez Danny Waldir Ibarra Vega

German Ricardo Gelves Zambrano

Va. Bo Coordinador Comité Curricular _____

Contenido

Introducción	9
1. El problema	9
1.1 Título	9
1.2 Planteamiento del problema	9
1.3 Formulación del problema	10
1.4 Justificación	10
1.5 Objetivos	11
1.5.1. Objetivo general	11
1.5.2. Objetivos específicos	11
1.6 Alcances y delimitaciones	11
1.6.1. Alcances	11
1.7 Delimitaciones	11
1.7.1. Delimitación espacial	11
1.7.2. Delimitación temporal	12
2. Marco referencial	12
2.1 Antecedentes	12
2.2 Marco teórico	13
2.2.1 Desarrollo de los modelos matemáticos	15
2.3 Marco conceptual	18
2.4 Marco contextual	19
2.5 Marco legal	19
3. Diseño metodológico	20
3.1 Tipo de investigación	20
3.2 Población y muestra	20
3.3 Hipótesis	20
3.4 Fases de la investigación	21
4. Administración del proyecto	21
4.1 Recursos humanos	21
4.2 Recursos institucionales	21
4.3 Recursos financieros	22
5. Resultados	23
6. Conclusiones	54
7. Bibliografías	55

Lista de tablas

- Tabla 1. Parámetros cinéticos proporcionados para la producción de tanasa a través de los modelos Fed-Batch y Continuo a partir de *Bacillus cereus*. 23
- Tabla 2. Caracteres iniciales para la producción de tanasa a través de la simulación en modo Fed-Bach y modo Continuo. 23
- Tabla 3. Parámetros iniciales para las simulaciones de producción de tanasa a través del modo Bach. 26
- Tabla 4. Parámetros iniciales para las simulaciones de producción de tanasa a través del modo Continuo.34
- Tabla 5. Parámetros iniciales para las simulaciones de producción de tanasa a través del modo Fed-Batch. 42

Lista de figuras

- Figura 1. Calibración del modelo para la productividad de la tanasa mediante los datos experimentados (Selvaraj, S., Natarajan, K., Nowak, A y Ramachandra, V, 2016). Asteriscos (Experimento) y líneas sólidas (datos simulados). A) Sustrato, B) Biomasa y C) Producto. 24
- Figura 2. Primera simulación en modo Batch para la producción de tanasa. Con los siguientes parámetros: A) Sustrato (58 mg/g), B) Biomasa (0.105 g/g) y C) Producto. 27
- Figura 3. Segunda simulación en modo Batch para la producción de tanasa. Con los siguientes parámetros: A) Sustrato (58 mg/g), B) Biomasa (0.405 g/g) y C) Producto. 28
- Figura 4. Tercera simulación en modo Batch para la producción de tanasa. Con diversos parámetros: A) Sustrato (90 mg/g), B) Biomasa (0.105 g/g) y C) Producto. 29
- Figura 5. Cuarta simulación en modo Batch para la producción de tanasa. Con diversos parámetros: A) Sustrato (90 mg/g), B) Biomasa (0.405 g/g) y C) Producto. 30
- Figura 6. Concentración final del sustrato para las simulaciones en el modo Batch implementando las siguientes concentraciones iniciales del sustrato: S1: S0=85 mg/g; S2: S0= 85 mg/g; S3: S0=90 mg/g y S4: S0=90 mg/g, en donde, se puede observar las concentración finales después de transcurrir 60 horas. 32
- Figura 7. Concentración final de la biomasa para las simulaciones en el modo Batch implementando las siguientes concentraciones iniciales del sustrato: X1: X0= 0.105 g/g; X2: X0= 0.405 g/g; X3: X0= 0.105 g/g y X4: X0= 0.405 g/g, en donde, se puede observar las c concentración finales después de transcurrir 60 horas. 32
- Figura 8. Productividad final de las simulaciones para el producto en modo Batch. 33
- Figura 9. Primera simulación en modo Continúo para la producción de tanasa. Con las siguientes condiciones: A) Biomasa (0.105 g/g), B) Sustrato (58 mg/g), C) Producto y Caudal de 1.5 m³/s. 35
- Figura 10. Primera simulación en modo Continúo para la producción de tanasa. Con las siguientes condiciones: A) Biomasa (0.405 g/g), B) Sustrato (58 mg/g), C) Producto y Caudal de 2.5 m³/s. 36
- Figura 11. Tercera simulación en modo Continúo para la producción de tanasa. Con las siguientes condiciones: A) Biomasa (0.105 g/g), B) Sustrato (90 mg/g), C) Producto y Caudal de 1.5 m³/s. 37
- Figura 12. Cuarta simulación en modo Continúo para la producción de tanasa. Con las siguientes condiciones: A) Biomasa (0.405 g/g), B) Sustrato (90 mg/g), C) Producto y Caudal de 2.5 m³/s. 38
- Figura 13. Concentración final del sustrato para las simulaciones en el modo Continúo implementando las siguientes concentraciones iniciales del sustrato: S1: S0=85 mg/g; S2: S0= 85 mg/g; S3: S0=90 mg/g y S4: S0=90 mg/g, en donde, se puede observar las concentraciones finales después de transcurrir 60 horas. 40
- Figura 14. Concentración final de la biomasa para las simulaciones en el modo Continúo implementando las siguientes concentraciones iniciales del sustrato: X1: X0= 0.105 g/g; X2: X0= 0.405 g/g; X3: X0= 0.105 g/g. 40

- g/g y X4: $X_0 = 0.405$ g/g, en donde, se puede observar las concentraciones finales después de transcurrir 60 horas. 40
- Figura 15. Productividad final de las simulaciones del producto en modo Continuo. 41
- Figura 16. Primera simulación en modo Fed-Bach para la producción de tanasa. Con los siguientes parámetros: A) Sustrato (58mg/g), B) Biomasa (0.105 g/g), C) Producto y Caudal de 1.5 m³/s. 43
- Figura 17. Primera simulación en modo Fed-Bach para la producción de tanasa. Con los siguientes parámetros: A) Sustrato (58mg/g), B) Biomasa (0.405 g/g), C) Producto y Caudal de 2.5 m³/s. 44
- Figura 18. Primera simulación en modo Fed-Bach para la producción de tanasa. Con los siguientes parámetros: A) Sustrato (90 g/g), B) Biomasa (0.105 g/g), C) Producto y Caudal de 1.5 m³/s. 45
- Figura 19. Primera simulación en modo Fed-Bach para la producción de tanasa. Con los siguientes parámetros: A) Sustrato (90 g/g), B) Biomasa (0.405 g/g), C) Producto y Caudal de 2.5 m³/s. 46
- Figura 20. Volumen simulado del biorreactor (8 L) para la simulación de tanasa en modo Fed-Batch. 48
- Figura 21. Volumen simulado del biorreactor (10 L) para la simulación de tanasa en modo Fed-Batch. 48
- Figura 22. Concentración final del sustrato para las simulaciones en el modo Fed-Bach implementando las siguientes concentraciones iniciales del sustrato: S1: $S_0 = 85$ mg/g; S2: $S_0 = 85$ mg/g; S3: $S_0 = 90$ mg/g y S4: $S_0 = 90$ mg/g, en donde, se puede observar las concentraciones finales después de transcurrir 180 horas. 50
- Figura 23. Concentración final de la biomasa para las simulaciones en el modo Fed-Bach implementando las siguientes concentraciones iniciales del sustrato: X1: $X_0 = 0.105$ g/g; X2: $X_0 = 0.405$ g/g; X3: $X_0 = 0.105$ g/g y X4: $X_0 = 0.405$ g/g, en donde, se puede observar las concentraciones finales después de transcurrir 180 horas. 51
- Figura 24. Productividad final de las simulaciones del producto en modo Fed-Batch. 51

Introducción

Hoy en día la biotecnología ha ido experimentando en avances científicos y tecnológicos. Esto ayuda al crecimiento y a la renovación de las industrias y ambientales, a través de la modificación de los panoramas establecidos. Uno de los métodos que se ha ido implementando en las industrias es la utilización de microorganismo, para la producción de enzimas y otros productos, los cuales han ido relevando los procesos que utilizan químicos. Las enzimas se comenzaron a emplear para las fabricaciones de productos benéficos para el consumo del ser humano alrededor de los 2000 años, mediante la utilización de microorganismos para la producción de pan y la sacarificación del arroz en la producción de koji (Cortes, 2015). Con base en lo anterior, hoy en día se han descubierto alrededor de 5500 enzimas (Cortes, 2015). *Bacillus cereus* es un microorganismo mesófilo y neutrófilo (Perez, Orbera, and Tamayo, 2011). El mismo, es uno de los grandes potenciadores en la fermentación microbiana utilizados en la producción de enzimas extracelulares (Schallmey, Singh, and Ward, 2004).

La enzima tanasa, también conocida como tanin acil-hidrolasa, es una estearasa encargada de la hidrólisis de los enlaces de prototipo éster galoil (Castillo, Acuache, Osorio, and Fuentes, 2009). Estos enlaces éster igualmente se ven reflejados en los taninos hidrolizables y en los taninos complejos (Rodríguez, Rodríguez, Hernández, and Aguilar, 2009), los cuales son un conjunto compuesto polifenolicos impermeables con distintos pesos moleculares (Mata, Cruz, Rodríguez, Contreras, and Aguilar, 1999). Además, la tanasa es una enzima producida por bacterias, hongos y levaduras. Al hidrolizar el ácido tánico a través de la tanasa se obtiene la liberación del ácido gálico, glucosa y algunos esteres de galoil. La tanasa se aplica en los procesos de bebidas y alimentos. Sus principales aplicaciones se centran en la producción de té instantáneo, ácido y licor de bellota (Aguilar, Cruz, Montañez, Belmares, and Aguilar, 2014). Esta enzima también es utilizada en la producción de cervezas y vinos, en la clarificación de algunos jugos de frutas y en la industria de cueros, entre otros (Subbalaxmi, and Ramachandra, 2016).

La tanasa se ha podido reconocer en los microorganismos, vegetales y animales (Selvaraj, and Vytla 2017). Sin embargo, su aplicación a gran escala se ha visto limitada debido a su bajo rendimiento y altos costos de producción (Rodríguez, Valdivia, Contreras, Rodríguez, and Aguilar, 2014). Aun así, su producción se fundamenta en el modo batch en la cual la tanasa es obtenida mediante un sistema cerrado, de tal manera que su obtención está limitada a la concentración dinámica del medio de cultivo presente en el biorreactor (Selvaraj, Natarajan, Nowak, Aleksandra, and Ramachandra, 2016). Estrategias alternativas de producción podrían evitar estos tiempos muertos de proceso, tales como el modo fed-batch (Reyes, 2020) o el modo continuo en la cual, se adiciona medio fresco de cultivo para evitar la desaceleración del proceso bioquímico. Es por eso que mediante esta investigación se plantea la modelación computacional de un bioproceso, con el fin de realizar un análisis de las condiciones que permita obtener una mejor productividad de tanasa a partir de *Bacillus cereus*. Lo anterior, podría significar un ahorro en tiempo y presupuesto para las industrias del sector de enzimas (Ruiz, Rodríguez, Rodríguez, Contreras, and Aguilar, 2007).

1. El problema

1.1 Título

Modelación de la producción de tanasa a partir de *Bacillus cereus* en diferentes modos de operación.

1.2 Planteamiento del problema

La tanasa puede obtenerse a partir de microorganismos y también utilizando células vegetales y animales (Veana, Vázquez, Guerrero, Viader, Aguilar, and Rodríguez. 2016) Sin embargo, su aplicación a escala industrial se ha visto limitada debido a su bajo rendimiento y altos costos de producción (Rodríguez, Valdivia, Contreras, Rodríguez, and Aguilar, 2014). Aun así, su obtención se fundamenta en el modo batch en la cual la tanasa es obtenida mediante un sistema cerrado, de tal manera que su obtención está limitada a la concentración dinámica del medio de cultivo presente en el biorreactor (Selvaraj, Natarajan, Nowak, Aleksandra, and Ramachandra, 2016). Al momento en el que el medio de cultivo se va consumiendo, a la vez la tanasa se va a ir generando en el biorreactor. En el momento en el que el procedimiento tenga agotada la totalidad del medio de cultivo donde crecen los microorganismos productores de tanasa, el biorreactor debe desmontarse, esterilizarse y cargarse nuevamente con medio de cultivo fresco para reiniciar un nuevo proceso de fermentación. Se debe de tener en supervisión la traducción de los tiempos muertos de fermentación y mano de obra que podrían afectar significativamente la productividad global de la enzima tanasa. Por último, la producción de un metabolito en modo batch requiere de grandes volúmenes de operación, de tal manera que el área necesaria para la construcción de una planta de producción de tanasa, requiere de dimensiones significativas que podrían incrementar los costos de operación.

1.3 Formulación del problema

¿Se puede determinar, mediante simulación computacional, la efectividad en el modo de operación de la producción de la enzima tanasa a partir de *Bacillus cereus*?

1.4 Justificación

Una posible solución que podría evitar los tiempos muertos de proceso durante la producción de tanasa a partir de *Bacillus cereus*, consiste en la implementación de estrategias en modo fed-batch o en modo continuo (Reyes, 2020) en el cual mediante los intervalos de tiempo a la fermentación se le va adicionando del medio fresco del cultivo para así evitar la desaceleración del proceso bioquímico y simultáneamente mantener la producción de tanasa durante un tiempo más prolongado al que se podría obtener en un modo batch. Esto se realiza debido a que la velocidad de crecimiento microbiano y la producción de tanasa son correspondientes a la disminución de la tasa de nutrientes, de tal manera que, controlando la tasa de alimentación del sustrato limitante, la producción de la enzima tanasa podría incrementarse en un biorreactor.

Adicional a lo mencionado, la concentración de metabolitos que resultan inhibitorios para el proceso bioquímico de crecimiento microbiano son diluidas concentraciones mínimas debido a la adición de medio fresco durante el proceso de fermentación. Es por eso que mediante esta investigación se plantea la modelación computacional de un bioproceso en diferentes modos de operación con el fin de realizar un análisis de las condiciones que permita obtener una mejor productividad de tanasa a partir de *Bacillus cereus*. Lo precedente podría significar un ahorro en tiempo y presupuesto para las industrias del sector de enzimas (Ruiz, Rodríguez, Rodríguez, Contreras, and Aguilar, 2007).

1.5 Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Evaluar desde un enfoque computacional la producción de la enzima tanasa a partir de *Bacillus cereus* bajo diferentes modos de operación.

1.5.2. Objetivos específicos

- Determinar un modelo matemático que permita simular la cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato limitante y formación de tanasa a partir de *Bacillus cereus*.
- Realizar una parametrización de una cinética microbiana de los datos obtenidos de una revisión bibliográfica.
- Establecer mediante análisis numérico el modo de operación que permita incrementar la producción de la enzima tanasa partir de *Bacillus cereus*.

1.6 Alcances y delimitaciones

1.6.1. Alcances

Mediante esta investigación se pretende generar conocimiento relacionado con el efecto del modo de operación durante la producción de la enzima tanasa utilizando *Bacillus cereus* como biocatalizador del proceso. La información será obtenida a través de predicciones con el software Matlab.

1.7 Delimitaciones

1.7.1. Delimitación espacial

Este proyecto se llevará a cabo en el laboratorio BIOPROCESOS, localizado en el edificio de calidad ambiental, de la Universidad Francisco De Paula Santander, Sede Campos Elíseos. Sin embargo, teniendo en cuenta las restricciones actuales, la investigación puede realizarse de modo virtual.

1.7.2. Delimitación temporal

El presente trabajo de investigación tendrá una duración aproximada de 6 meses a partir de su aprobación.

2. Marco referencial

2.1 Antecedentes

Las enzimas se comenzaron a emplear para las fabricaciones de productos benéficos para el consumo del ser humano alrededor de los 2000 años, mediante la utilización de microorganismos para la producción de pan y la sacarificación del arroz en la producción de koji (Cortes, 2015). Los taninos son compuestos polifenólicos de distintos pesos moleculares y están presentes de manera natural en el reino vegetal. En el reino vegetal estos taninos se encuentran en hojas, corteza y madera y tienen un papel importante en la inmunidad de las plantas, por lo que las protege de los ataques microbianos (Cortes, 2015). El efecto negativo de los taninos se relaciona no sólo con problemas de su sabor, sino también para nutrición animal debido a la capacidad conocida de los taninos de unirse a macromoléculas, haciéndolas por lo tanto indigeribles. Esto resulta en la formación de complejos estables con enzimas y minerales requeridos por microorganismos ruminales (Perez, Orbera, and Tamayo, 2011). El sabor amargo también es la razón por la cual el consumo de alimento se reduce. Sin embargo, bajas concentraciones de taninos en alimentación se ha mostrado que resultan en un incremento en la asimilación de nitrógeno en rumiantes representando velocidades más altas de crecimiento y de producción de leche (Schallmey, Singh, and Ward, 2004).

Los taninos complejos pueden ser generados a través de reacciones entre el ácido gálico con catequinas o glucósidos. Los taninos también causan varios problemas nutricionales y de procesamiento como indigestibilidad, inhibición de reacciones enzimáticas y procesos microbianos esenciales como los necesarios para la elaboración de cerveza. Por lo tanto, altas concentraciones de taninos disminuyen el consumo voluntario de alimentos, la eficiencia en la digestión y la productividad animal (Castillo, Acuache, Osorio, and Fuentes, 2009). Rodríguez, Rodríguez, Hernández y Aguilar (2009) reportaron que una baja

concentración de taninos en los alimentos resulta en un incremento en la asimilación de nitrógeno en los organismos rumiantes, lo que impacta en tasas de crecimiento mayores y en la producción de leche. Adicionalmente, taninos en la dieta han sido implicados en el desarrollo de algunas formas de cáncer. Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos, llevan a cabo reacciones bioquímicas a altas velocidades, no se consumen durante la reacción y en general presentan un elevado grado de especificidad.

La fuente de obtención de las enzimas puede ser a partir de diferentes extractos de origen vegetal, animal o microbiano, siendo este último la fuente más importante. Las enzimas tanasas o tanin-acil-hidrolasas (TAH), son hidrolasas (E.C.3.1.1.20) que catalizan la reacción de hidrólisis de enlaces éster de taninos hidrolizables y el ácido gálico (Mata, Cruz, Rodríguez, Contreras, and Aguilar, 1999). Las tanasas son hidrolasas intracelulares/extracelulares inducibles en la naturaleza y se encuentran ubicadas en la superfamilia de las esterases (Aguilar, Cruz, Montañez, Belmares, and Aguilar, 2014). Las tanasas actúan sobre los taninos hidrolizando los enlaces tipo éster formados entre los grupos galoil y polihidroxicóholes o la unión entre dos grupos galoil. Las TAH catalizan la hidrólisis completa del ácido tánico a ácido gálico y glucosa. Los intermediarios en la reacción son la 1,2,3,4,6-pentagaloilglucosa, 2,3,4,6-tetragaloilglucosa, y dos tipos de monogaloilglucosa (Aguilar, Cruz, Montañez, Belmares, and Aguilar, 2014).

2.2 Marco teórico

Los bioprocesos o fermentaciones pueden ser clasificados en función de su operatividad en 4 grandes grupos:

Operación discontinua (batch). Se trata de un sistema cerrado, en el que en el inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. En los procesos a escala industrial, se interrumpe la fermentación al final de la fase logarítmica (metabolitos primarios) o antes de que comience la fase de muerte (metabolitos secundarios). Se trata de un método robusto, bien conocido y que precisa de

instalaciones simples. Sin embargo, la utilización de los medios materiales y humanos no es óptima (Diego, Martinez and Tomas, 2021).

Operación alimentada (fed-batch). Es básicamente similar a la fermentación discontinua, pero en este caso, algunos sustratos se añaden escalonadamente a lo largo del proceso. También es un método robusto, bien conocido, que precisa de instalaciones simples, y, además, ofrece una mejora en la producción. Sin embargo, la utilización de los medios materiales y humanos sigue sin ser óptima (Diego, Martines and Tomas, 2021).

Operación continúa. En la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de cultivo con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema. Se trata de un proceso continuo que permite una buena utilización de los recursos materiales y humanos. Sin embargo, requiere una atención mucho mayor que los modos de operación anteriores para lograr el mantenimiento de la estabilidad, por ejemplo, en la composición del sustrato, y de la esterilidad del sistema (Cristina, and Astudillo, 2010).

Condiciones de esterilidad: El diseño del biorreactor deberá garantizar las condiciones de esterilidad, evitando la aparición de contaminación, ya sea química o microbiológica. Para ello, la selección de materiales debe garantizar la inocuidad total, deben ser inertes químicamente y deben ser resistentes a las soluciones de lavado y los procesos de desinfección. El diseño de los equipos deberá garantizar la esterilidad del proceso y la selección de los accesorios, deberá permitir la operación en condiciones asépticas (Maya, 2017).

Características e impacto del diseño del proceso. El diseño del proceso debe permitir que tanto el rendimiento del equipo como la capacidad de producción sean los óptimos. Para lograr ambos objetivos, el diseño del sistema deberá garantizar en todo el volumen del equipo los siguientes aspectos: Distribución uniforme de células. Temperatura constante y homogénea. Mínimo gradiente de concentración de nutrientes. Ausencia de sedimentación y de floculación. Difusión de gases nutrientes fácil y controlada.

2.2.1 Desarrollo de los modelos matemáticos

Los modelos de los biorreactores son caracterizados por: Alta dimensión del espacio de estados, múltiples entradas y salidas, disturbios externos, significativa no linealidad e incertidumbre y sofisticados, múltiples objetivos y crítico desempeño. Los biorreactores que se encuentran en esta investigación son: Batch (biorreactores discontinuos), Chemostat y auxostat (biorreactores continuos) y fed-batch (biorreactores de lote alimentado).

- **Modo batch**

El modelo matemático del modo de alimentación batch está dado por las Ecuaciones 1, 2 y 3:

- $\frac{dx}{dt} = \mu \cdot X$ (Eq. 1)

- $\frac{ds}{dt} = q_s \cdot X$ (Eq. 2)

- $\frac{dp}{dt} = q_p \cdot X$ (Eq. 3)

- Donde se representa:

q_s : Vector de velocidad volumétrica.

q_p : Vector de concentración.

$\frac{dx}{dt}$: Concentración de biomasa adimensional.

$\frac{ds}{dt}$: Concentración de sustrato adimensional.

$\frac{dp}{dt}$: Concentración de producto metabólico adimensional.

Dentro del biorreactor no se evidencia ningún fluido líquido ni gaseoso, por ende, se tiene en cuenta los valores iniciales de las variables. En donde, si todas las velocidades son

proporcionales, se obtienen los siguientes balances de masa: biomasa (X), sustrato (S), y producto (P) (Eq. 1, 2 y 3).

Cuando los coeficientes de rendimiento Y_{xs} y Y_{sp} son independientes de S, X y P se debe realizar una suposición clave en el modelo no estructurado. Las tres ecuaciones diferenciales de primer orden pueden ser reordenadas en una sola ecuación diferencial en X y dos ecuaciones algebraicas puesto que S y P se pueden obtener directamente, ya que la ecuación diferencial ha sido resuelta (Olver Peter, J, & Shakiban, Chehrzad, 2013).

- **Modo continuó**

El modelo matemático del modo continuo está dado por las Eq 4, 5 y 6:

- $$\frac{dx}{dt} = \mu * X - \frac{F}{V} * X \quad (\text{Eq. 4})$$

- $$\frac{ds}{dt} = \frac{F}{V} * S_i - q_s * X - \frac{F}{V} * S \quad (\text{Eq. 5})$$

- $$\frac{dp}{dt} = q_p * X \quad (\text{Eq. 6})$$

- Donde se representa:

S_i : concentración del componente en la alimentación (kg/m³).

q_s : Vector de velocidad volumétrica.

q_p : Vector de concentración.

$\frac{dx}{dt}$: Concentración de biomasa adimensional.

$\frac{ds}{dt}$: Concentración de sustrato adimensional.

$\frac{dp}{dt}$: Concentración de producto metabólico adimensional.

F: Caudal.

V: Volumen del biorreactor.

Se evidencia que el estado de las variables cambia continuamente como una función de tiempo. Así mismo el volumen permanece constante y el flujo de entrada y salida son

iguales caudales ($F_1 = F_2 = F$). Teniendo en cuenta que los parámetros de transferencia se mantienen constantes como son la temperatura, pH, velocidad de transferencia de oxígeno, entre otros. En donde, para poder iniciar un cultivo en modo continuo el biorreactor debe cargarse previamente con el inóculo del cultivo, a medida que esté logrando crecer es necesario alimentar el sistema con un medio nutritivo fresco, donde, el volumen del modo continuo siempre permanecerá constante (Decker, Eva L. & Reski, Ralf, 2007).

- **Modo fed-batch**

El modelo matemático del modo de alimentación Fed-batch está dado por las Eq 7, 8, 9 y 10:

- $$\frac{dX}{dt} = \mu * X - \frac{F_1+F_2}{V} * X \quad (\text{Eq. 7})$$

- $$\frac{dS}{dt} = -q_s * X + \left(\frac{F_1}{V}\right) * S + \left(\frac{F_2}{V}\right) * S + \left(\frac{F_1+F_2}{V}\right) * S \quad (\text{Eq. 8})$$

- $$\frac{dP}{dt} = q_p * X - \frac{F_1+F_2}{V} * P \quad (\text{Eq. 9})$$

- $$\frac{dV}{dt} = F \quad (\text{Eq 10})$$

- Donde se representa:

q_s : Vector de velocidad volumétrica.

q_p : Vector de concentración.

$\frac{dX}{dt}$: Concentración de biomasa adimensional.

$\frac{dS}{dt}$: Concentración de sustrato adimensional.

$\frac{dP}{dt}$: Concentración de producto metabólico adimensional.

$\frac{dV}{dt}$: Volumen del biorreactor.

F_1 : Caudal de alimentación.

F_2 : Caudal de Salida.

Para obtener un producto deseado se exige el mantenimiento de una tasa de crecimiento específica constante, por esta razón la biomasa y el volumen crecen indefinidamente hasta que no hay más sustrato o se alcance la máxima capacidad del biorreactor.

2.3 Marco conceptual

Biorreactores. Se define como un recipiente que lleva a cabo una reacción biológica y se utiliza para cultivar células aeróbicas para realizar la inmovilización celular o enzimática.

Parámetro: un parámetro es un dato o un modelo de la realidad que se comparan los datos reales obtenidos y que permite predecir.

Cepa: Es un conjunto de células que tienen, al menos, una característica de una especie de una bacteria, se usar para propagar clones de la especie.

2.4 Marco contextual

El trabajo se desarrollará en la Sede de Campos Elíseos de la Universidad Francisco de Paula Santander, en el primer piso de los laboratorios de calidad ambiental en el laboratorio de BIOPROCESOS, con una flexibilidad de trabajo remoto y actividad fuera de horarios laborales como lo son los periodos de vacaciones o cuarentenas.

2.5 Marco legal

DECRETO 3075 DE 1997. Por el cual se reglamenta parcialmente la Ley 9 de 1979 y se dictan otras disposiciones. La salud es un bien de interés público. En consecuencia, las disposiciones contenidas en el presente Decreto son de orden público, regulan todas las actividades que puedan generar factores de riesgo por el consumo de alimentos, y se aplicaran: a. A todas las fábricas y establecimientos donde se procesan los alimentos; los equipos y utensilios y el personal manipulador de alimentos. b. A todas las actividades de fabricación, procesamiento, preparación, envase, almacenamiento, transporte, distribución y comercialización de alimentos en el territorio nacional. c. A los alimentos y materias primas para alimentos que se fabriquen, envasen, expendan, exporten o importen, para el consumo humano. d. A las actividades de vigilancia y control que ejerzan las autoridades sanitarias sobre la fabricación, procesamiento, preparación, envase, almacenamiento, transporte, distribución, importación, exportación y comercialización de alimentos, sobre los alimentos y materias primas para alimentos.

LEY 9 de 1979: Código Sanitario Nacional por cuanto dicta medidas sobre las condiciones sanitarias básicas para la protección en el medio ambiente, suministro de agua, saneamiento de edificaciones, alimentos, droga, medicamentos, cosméticos, vigilancia y control epidemiológico, prevención y control de desastres, derechos de los habitantes respecto a la salud.

RESOLUCIÓN 5109 DE 2005: Reglamento Técnico sobre los requisitos de rotulado o etiquetado para alimentos envasados y materias primas de alimentos para consumo humano, expedido por el Ministerio de Protección Social y publicado en el Diario Oficial 46150 de enero 13 de 2006.

DECRETO 1575 DE 2007: El objeto del presente decreto es establecer el sistema para la protección y control de la calidad del agua, con el fin de monitorear, prevenir y controlar los riesgos para la salud humana causados por su consumo, exceptuando el agua envasada. Aplica a todas las personas prestadoras que suministren o distribuyan agua para consumo humano, ya sea cruda o tratada, en todo el territorio nacional, independientemente del uso que de ella se haga para otras actividades económicas, a las direcciones territoriales de salud, autoridades ambientales y sanitarias y a los usuarios.

3. Diseño metodológico

3.1 Tipo de investigación

El trabajo será en modalidad de investigación aplicada, ya que se espera determinar el efecto del modo de operación durante la producción de la enzima tanasa utilizando *Bacillus cereus* como biocatalizador del proceso.

3.2 Población y muestra

Se empleará una recopilación bibliografía relacionada con los datos experimentales obtenidos durante la producción de la enzima tanasa a partir de microorganismos.

3.3 Hipótesis

Mediante la simulación computacional es posible evaluar el efecto del modo de operación que permita incrementar la producción de la enzima tanasa a partir del microorganismo *Bacillus cereus*.

3.4 Fases de la investigación

Los pasos a seguir para la realización de este proyecto son:

- Búsqueda de la información bibliográfica relacionada a través de bases de Datos
- Análisis de la información bibliográfica disponible. Este análisis ha permitirá la estructuración de este informe, su redacción y la obtención de las conclusiones del mismo que derivaran a propuestas de actuación específicas.
- Modelación de la producción de la enzima tanasa mediante un modelo matemático que simule en estado dinámico el crecimiento celular y el consumo de sustrato y formación de producto.
- Ajuste de parámetros cinéticos.
- Análisis de diferentes modos de operación.

4. Administración del proyecto

4.1 Recursos humanos

Director del proyecto: PhD. German Ricardo Gelves Zambrano

Co director del Proyecto: PhD. Lilibeth Niño

Investigadores del Proyecto: Ingenieros Biotecnológico en formación; Deisy Mallerlin Basto Contreras cod: 1611360 y Dayana Andrea Mendoza Montoya cod: 1611381.

4.2 Recursos institucionales

El software como el programa computacional Matlab y Todo el trabajo se hará en el laboratorio de BIOPROCESOS, en la Sede Campos Elíseos de la Universidad Francisco de Paula Santander.

4.3 Recursos financieros

RUBRO	ESPECIE	TOTAL
PERSONAL	1'500.000	1'500.00 0
EQUIPOS - HERRAMIENTAS	4'000.000	4'000.00 0
PAPELERÍA Y ÚTILES DE ESCRITORIO ³	500.000	500.000
DOCUMENTACIÓN Y BIBLIOGRAFÍA ⁵	0	0
ANÁLISIS POR MEDIO DE SOFTWARE	0	0
TOTAL	6'000.000	6'000.00 0

5. Resultados

Esta investigación proyecta la modelación computacional de un bioproceso en diversos modos de operación como es el batch, fed-batch y el modo continuo, con el fin de analizar el modo de operación asertivo para una mejor productividad de la enzima tanasa. Mediante esto se realiza un análisis de las condiciones que permita considerar la mejor productividad de tanasa a partir de *Bacillus cereus*, el cual se ejerce a través de la simulación. Observando los datos en la tabla 1 y 2.

PARAMETROS	VOLUMEN	UNIDAD
μ_{\max}	0.0858	h-1
k_s	1.5	Mg/g
β	0.5058	[-]
α	0.00016	[-]
m	319.82	g/g
n	-434.54	g/U
m_s	0.4	[-]
x_m	0.761	g/g

Tabla 1. Parámetros cinéticos proporcionados para la producción de tanasa a través de los modelos Fed-Batch y Continuo a partir de *Bacillus cereus*.

PARAMETROS	VOLUMEN	UNIDADES
S_0	58.00	mg/g
X_0	0.438	g/g
P_0	0.00	U/g
V_0	6.00	L

Tabla 2. Caracteres iniciales para la producción de tanasa a través de la simulación en modo Fed-Bach y modo Continuo.

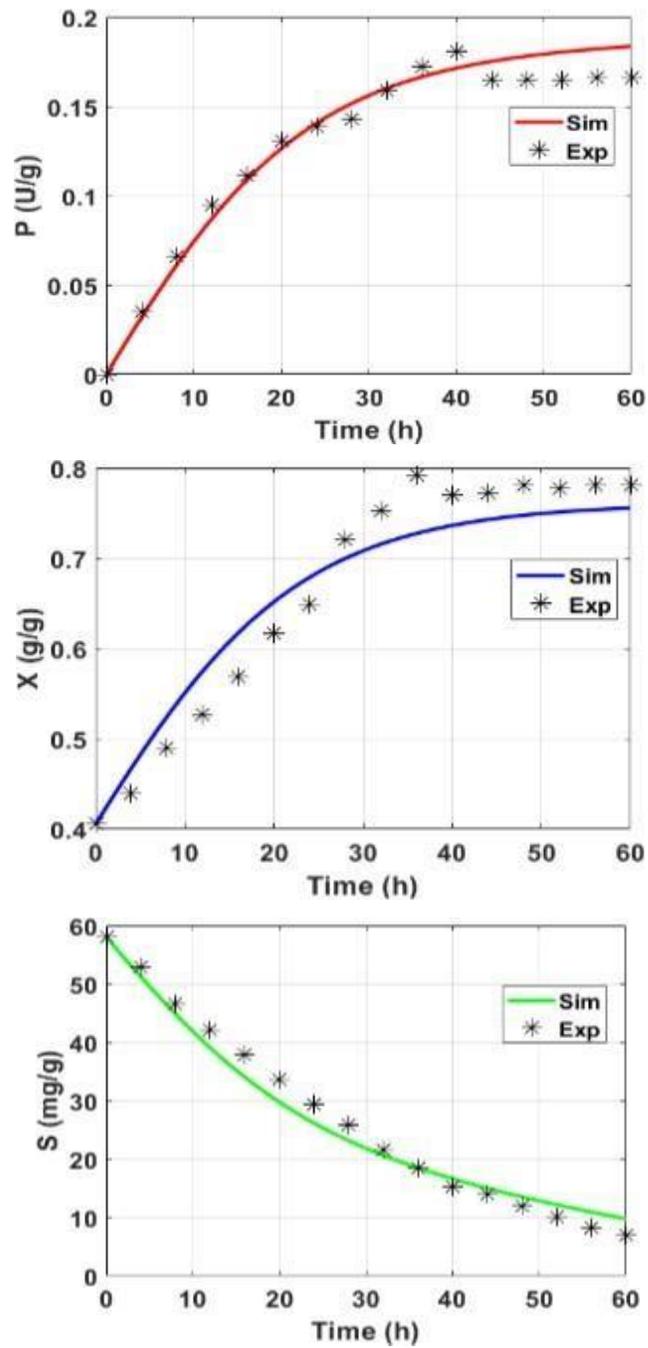


Figura 1. Calibración del modelo para la productividad de la tanasa mediante los datos experimentados (Selvaraj, S., Natarajan, K., Nowak, A y Ramachandra, V, 2016). Asteriscos (Experimento) y líneas sólidas (datos simulados). A) Sustrato, B) Biomasa y C) Producto.

Acorde con los resultados alcanzados en la Fig. 1, hay una exactitud favorable para el modelo matemático establecido en esta investigación para la simulación del crecimiento del microorganismo *Bacillus cereus*, la formación de la enzima tanasa y el consumo de ácido tánico (fuente de carbono). En donde, de acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se plantea la modelación computacional de un bioproceso en diversos modos de operación como es el modo batch, fed-batch y continuo. Se realiza un análisis de las condiciones para mayor efectividad de la enzima tanasa teniendo en cuenta la forma en que se ejerce la simulación, la formación, el comportamiento de la enzima y el agotamiento del ácido tánico como ascendiente, mediante el estudio de la biomasa, el sustrato y el producto de la tanasa a partir del microorganismo *Bacillus cereus*.

- **Simulación en modo Batch**

En el proceso Batch es fundamentales los nutrientes para obtener un buen crecimiento microbiano, los cuales son añadidos desde el inicio del proceso. El crecimiento microbiano es un proceso no restringido, el cual ocurre por la limitación de oxígeno que hay en el biorreactor, los cambios de pH y el agotamiento de los nutrientes esenciales (Jonasson y Cols, 2002). Al analizar todo los factores y el proceso, se pudo observar algunas desventajas en su producción la cual no es a gran escala, ya que requiere mucho tiempo entre cada producción, alta proporción de tiempo improductivo entre lotes, cada vez que se carga y se descarga el biorreactor debe de ser esterilizado para poder volver a comenzar con el procedimiento.

Se implementó una matriz de dos factores por dos niveles. Teniendo en cuenta las concentraciones del sustrato y la biomasa que son parámetros importantes para la obtención del producto de la tanasa, mediante esto se realizó cuatro simulaciones, las cuales son:

SIMULACIÓN	PAR A.	V OL	UN ID.	PARA .	V OL	UN ID.
S1	S_0	5 8	m g/g	X_0	0. 105	g/ g
S2	S_0	5 8	m g/g	X_0	0. 405	g/ g
S3	S_0	9 0	m g/g	X_0	0. 105	g/ g
S4	S_0	9 0	m g/g	X_0	0. 405	g/ g

Tabla 3. Parámetros iniciales para las simulaciones de producción de tanasa a través del modo Batch.

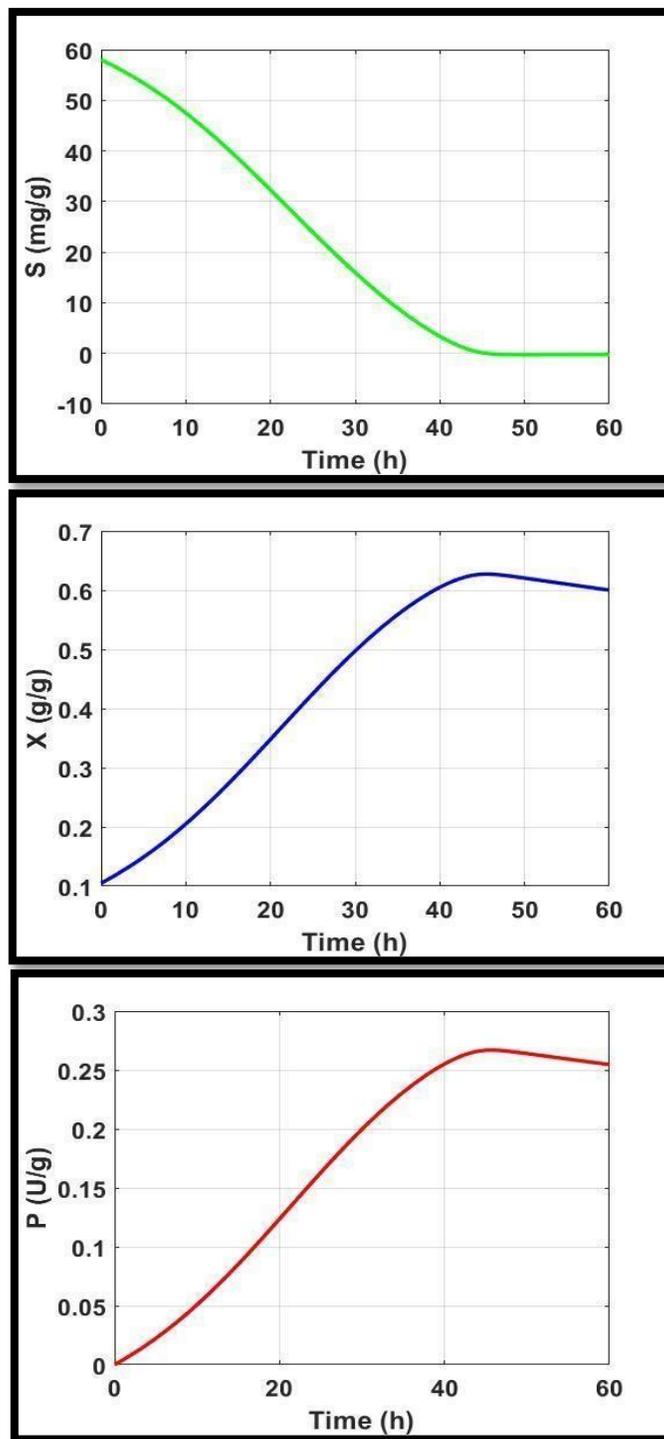


Figura 2. Primera simulación en modo Batch para la producción de tanasa. Con los siguientes parámetros: A) Sustrato (58 mg/g), B) Biomasa (0.105 g/g) y C) Producto.

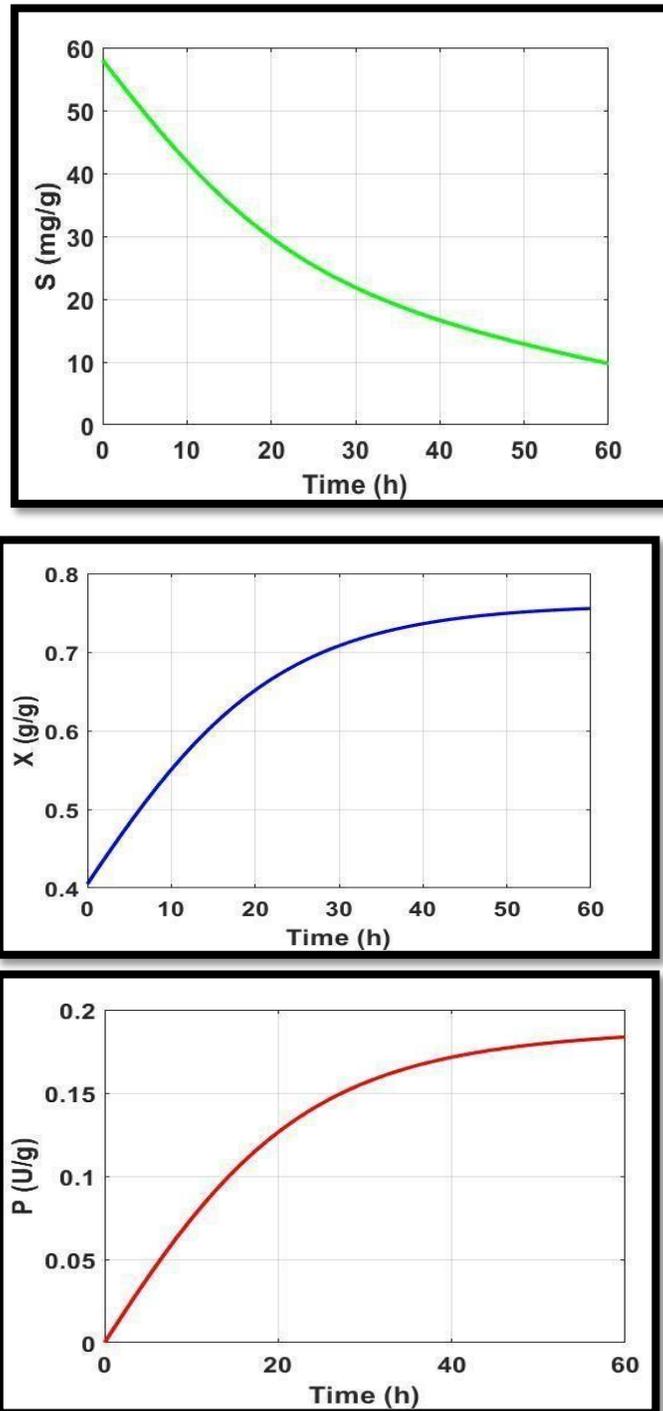


Figura 3. Segunda simulación en modo Batch para la producción de tanasa. Con los siguientes parámetros: A) Sustrato (58 mg/g), B) Biomasa (0.405 g/g) y C) Producto.

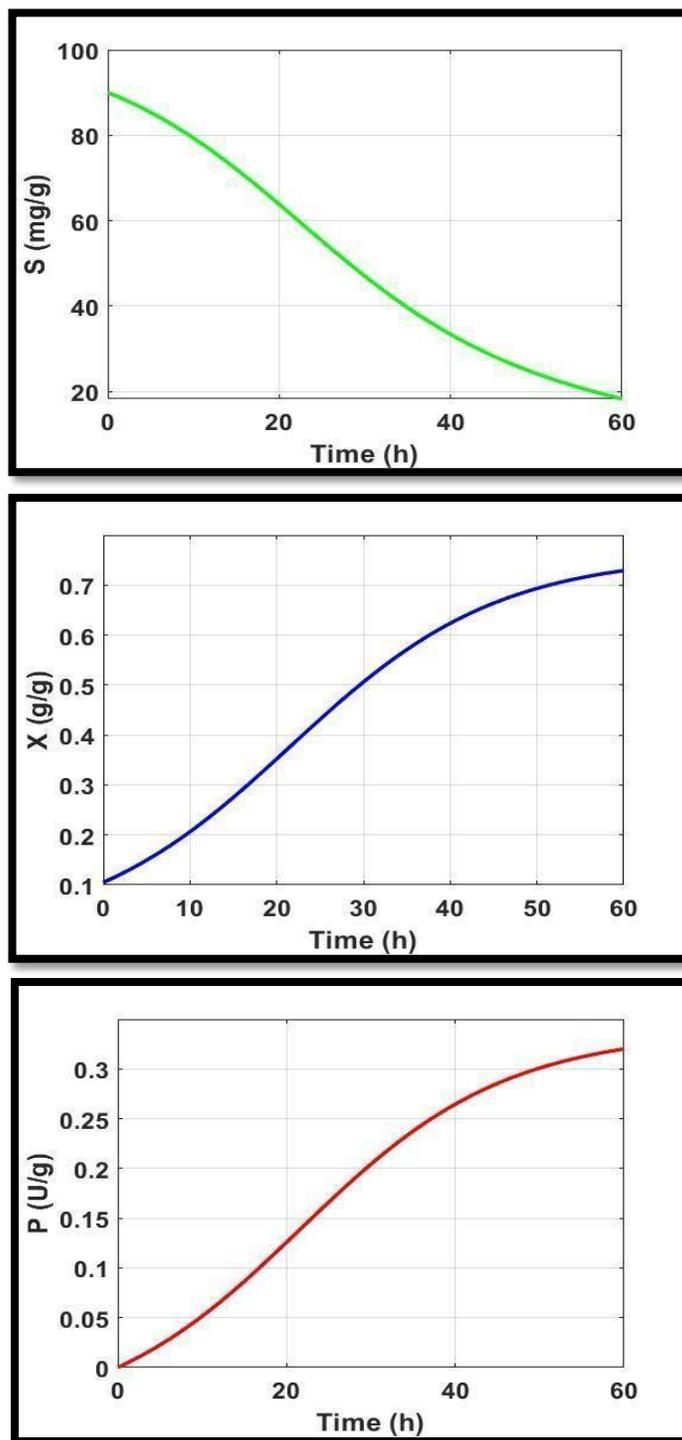


Figura 4. Tercera simulación en modo Batch para la producción de tanasa. Con diversos parámetros: A) Sustrato (90 mg/g), B) Biomasa (0.105 g/g) y C) Producto.

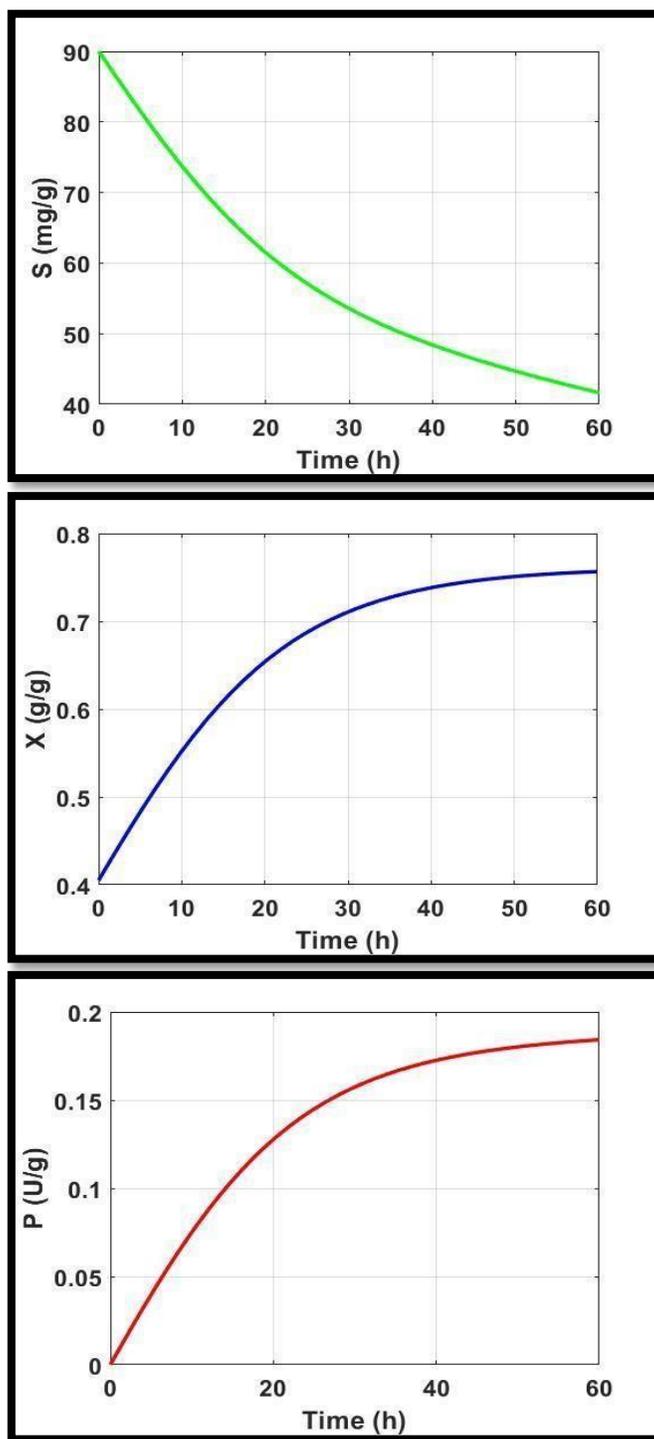


Figura 5. Cuarta simulación en modo Batch para la producción de tanasa. Con diversos parámetros: A) Sustrato (90 mg/g), B) Biomasa (0.405 g/g) y C) Producto.

Al analizar las tres simulaciones implementadas en el modo batch, se puede determinar que en la Fig. 2 (A) el sustrato al transcurrir las 43 horas el sustrato llega a 0 mg/g conservándose así hasta sus 60 horas, la Fig. 3 (A) pasa de 90 mg/g a 0 mg/g a las 60 horas, en la Fig. 4 (A) pasa de 90 mg/g a 20 mg/g a las 60 horas y en la Fig. 5 (A) se sigue observando el decrecimiento pasando de 90 mg/g a 41 mg/g generando una diferencia de 49 mg/g, como se puede analizar el decrecimiento se va minimizando.

En la Fig. 2 (B) se interpreta a la biomasa la cual alcanza una concentración de 0.62 g/g a las 43 horas, al pasar las 60 horas llega a una concentración de 0.6 g/g presentando una leve disminución, mientras tanto en la Fig. 3 (B) se puede observar una concentración de 0.76 g/g al transcurrir las 60 horas, la Fig. 4 (B) presenta una concentración de 0.72 g/g a las 60 horas y en la Fig. 5 (B) alcanza una concentración de 0.76 g/g. En la segunda y cuarta simulación se puede apreciar un alto rendimiento de productividad hacia la biomasa.

Por último, se llevó a cabo el análisis de la Fig. 2 (C) en la cual se determina la productividad de la tanasa observándose un incremento de 0.27 U/g a las 43 horas, como también se observa un decrecimiento a las 60 horas llegando a los 0.25 U/g, en la Fig. 3 (C) presenta una concentración final de 0.18 U/g al pasar las 60 horas, en la Fig. 4 (C) presenta una concentración final de 0.32 U/g al pasar las 60 horas y por último, la Fig. 5 (C) alcanza una concentración de 0.18 U/g al pasar las 60 horas.

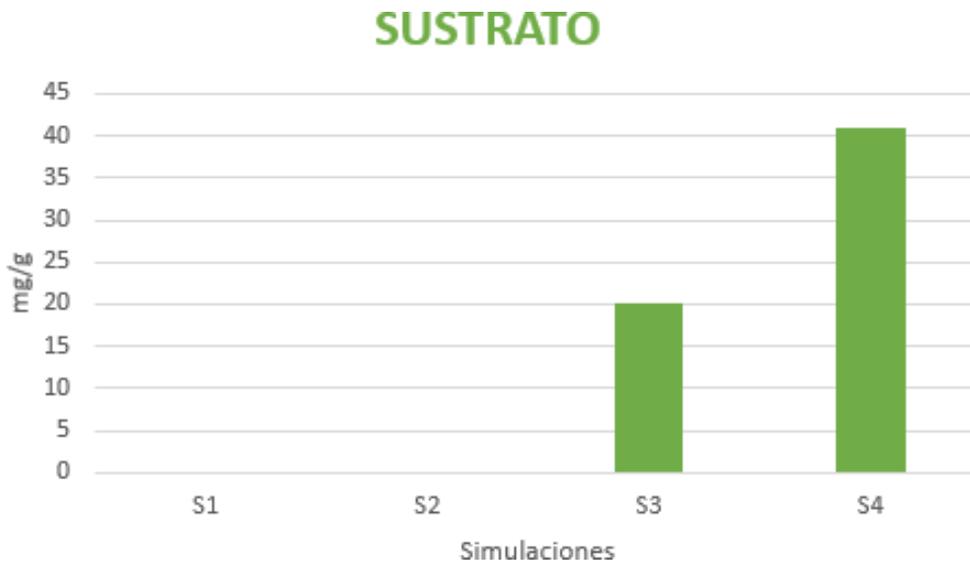


Figura 6. Concentración final del sustrato para las simulaciones en el modo Batch implementando las siguientes concentraciones iniciales del sustrato: S1: $S_0=85$ mg/g; S2: $S_0=85$ mg/g; S3: $S_0=90$ mg/g y S4: $S_0=90$ mg/g, en donde, se puede observar las concentraciones finales después de transcurrir 60 horas.

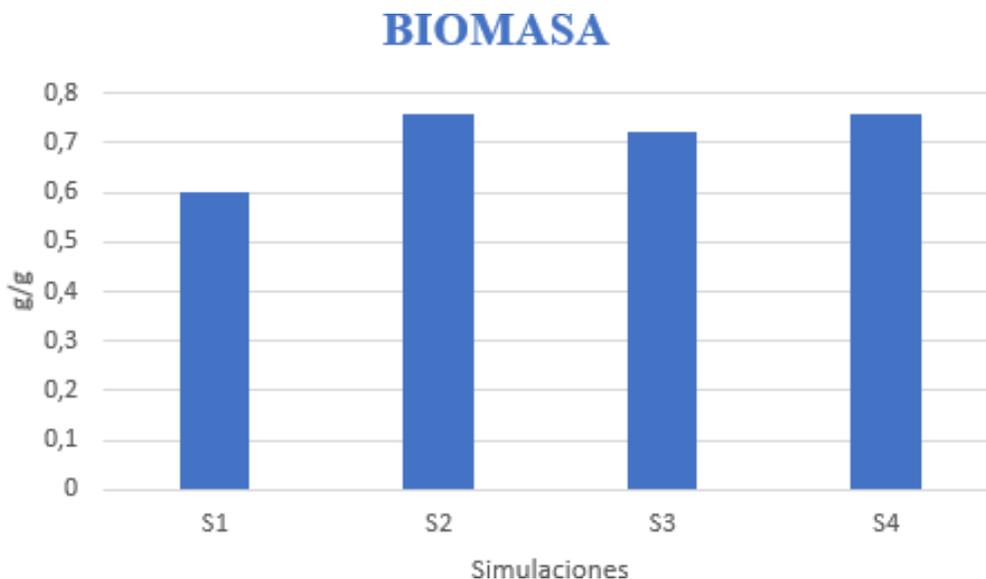


Figura 7. Concentración final de la biomasa para las simulaciones en el modo Batch implementando las siguientes concentraciones iniciales del sustrato: X1: $X_0=0.105$ g/g; X2: $X_0=0.405$ g/g; X3: $X_0=0.105$ g/g y X4: $X_0=0.405$ g/g, en donde, se puede observar las c concentración finales después de transcurrir 60 horas.

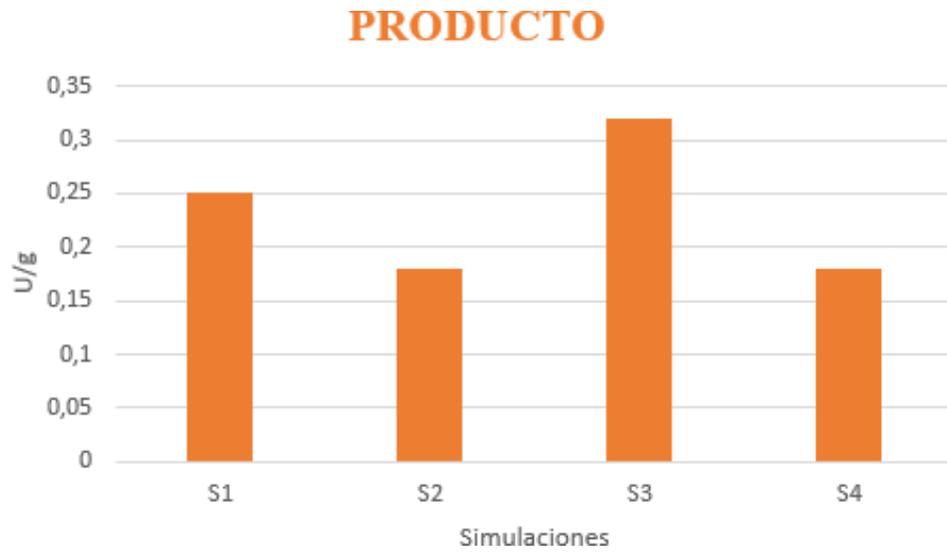


Figura 8. Productividad final de las simulaciones para el producto en modo Batch.

- **Simulación en modo Continúo**

En el modo continuo, los nutrientes son proporcionados continuamente, descargando fracciones de masa de un medio consumido, ayudando a mantener el volumen de operación constante. Su principal función es conservar el crecimiento del cultivo y sus parámetros de una forma constante mediante el control de adición de un medio nutritivo. Mediante este proceso se puede aumentenla la productividad, ya que la tasa de crecimiento está en sus niveles óptimos para la tasa de formación del producto, aunque también se debe tener en cuenta que esté proceso puede tener posibilidades de contaminación del cultivo y las cepas recombinantes pueden perder su estabilidad.

Se implementó una matriz de dos factores por dos niveles. Teniendo en cuenta las concentraciones del sustrato y la biomasa que son parámetros importantes para la obtención del producto de la tanasa, mediante esto se realizó cuatro simulaciones, las cuales son:

SIMULACION	PAR A.	V OL	UN ID.	PARA .	V OL	UN ID.	PARA .	V OL	UN ID.
S1	S_0	5 8	m g/g	X_0	0. 105	g/ g	F1	1 .5	m^3 /s
S2	S_0	5 8	m g/g	X_0	0. 405	g/ g	F2	2 .5	m^3 /s
S3	S_0	9 0	m g/g	X_0	0. 105	g/ g	F1	1 .5	m^3 /s
S4	S_0	9 0	m g/g	X_0	0. 405	g/ g	F2	2 .5	m^3 /s

Tabla 4. Parámetros iniciales para las simulaciones de producción de tanasa a través del modo Continuo.

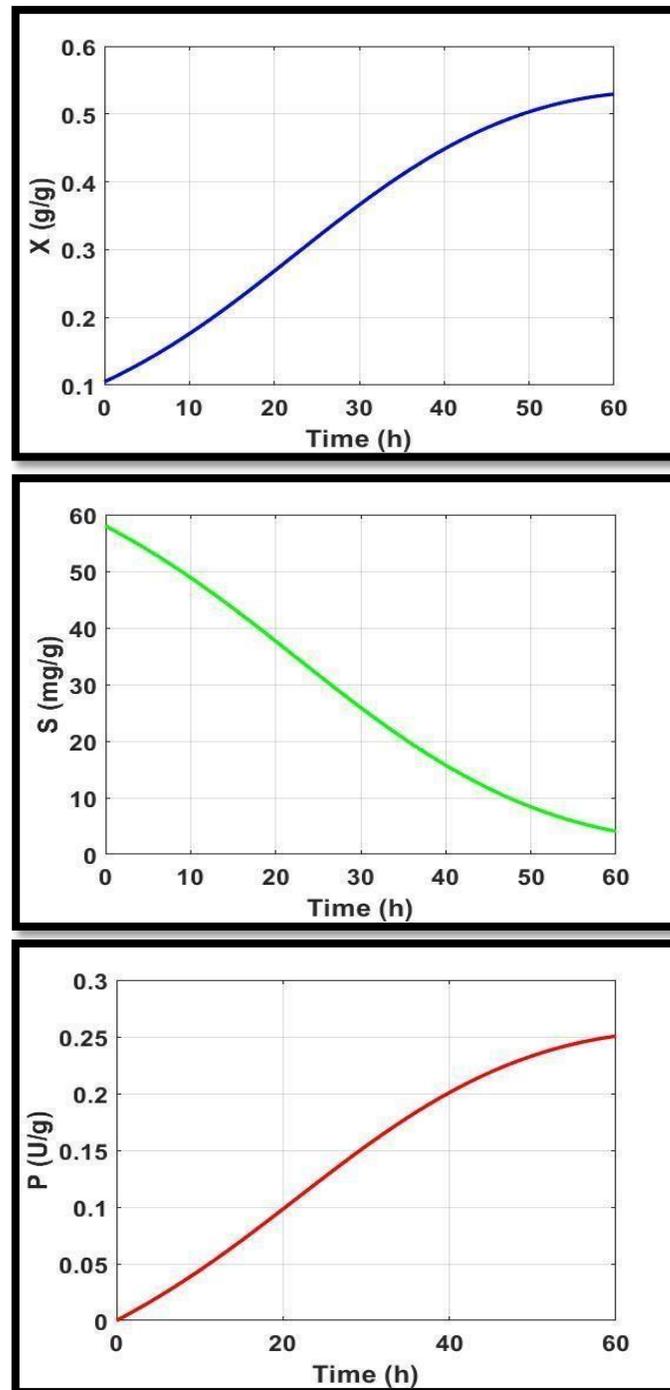


Figura 9. Primera simulación en modo Continuo para la producción de tanasa. Con las siguientes condiciones: A) Biomasa (0.105 g/g), B) Sustrato (58 mg/g), C) Producto y Caudal de 1.5 m³/s.

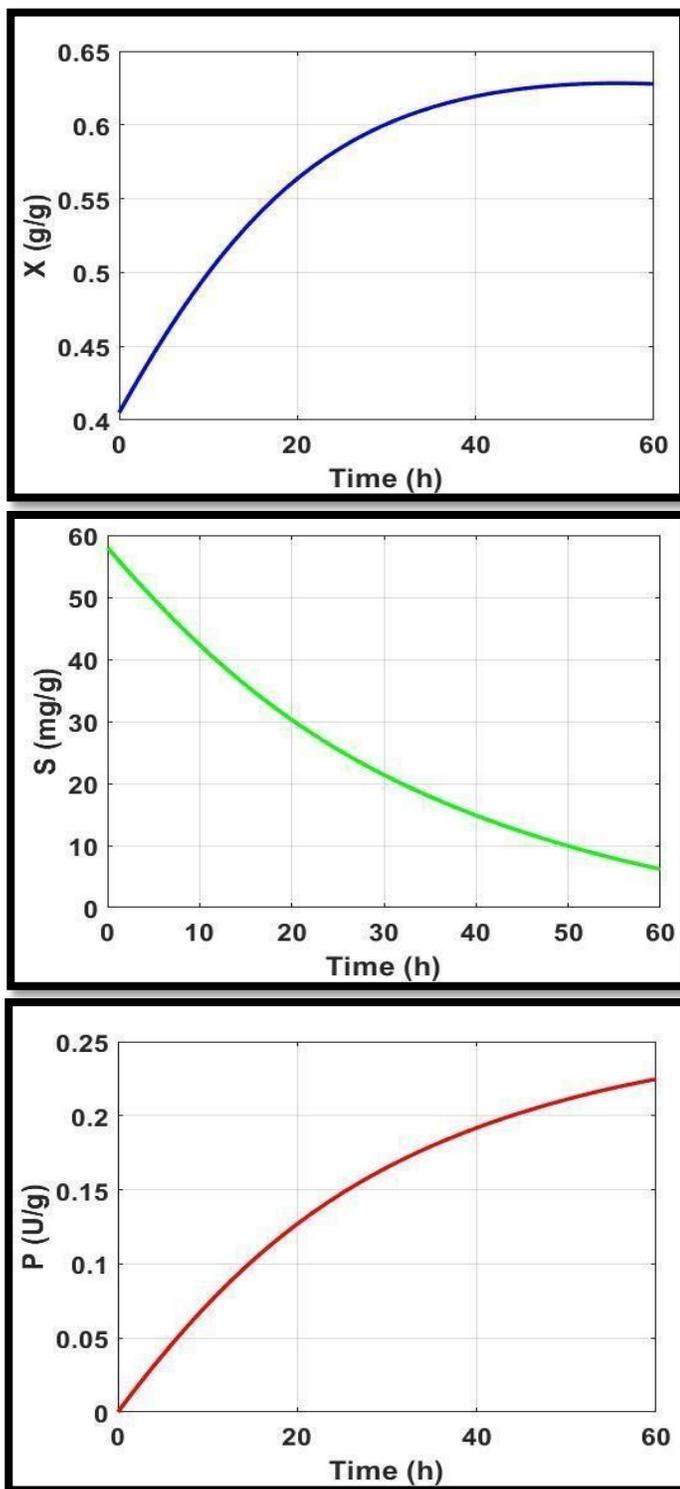


Figura 10. Primera simulación en modo Continuo para la producción de tanasa. Con las siguientes condiciones: A) Biomasa (0.405 g/g), B) Sustrato (58 mg/g), C) Producto y Caudal de 2.5 m³/s.

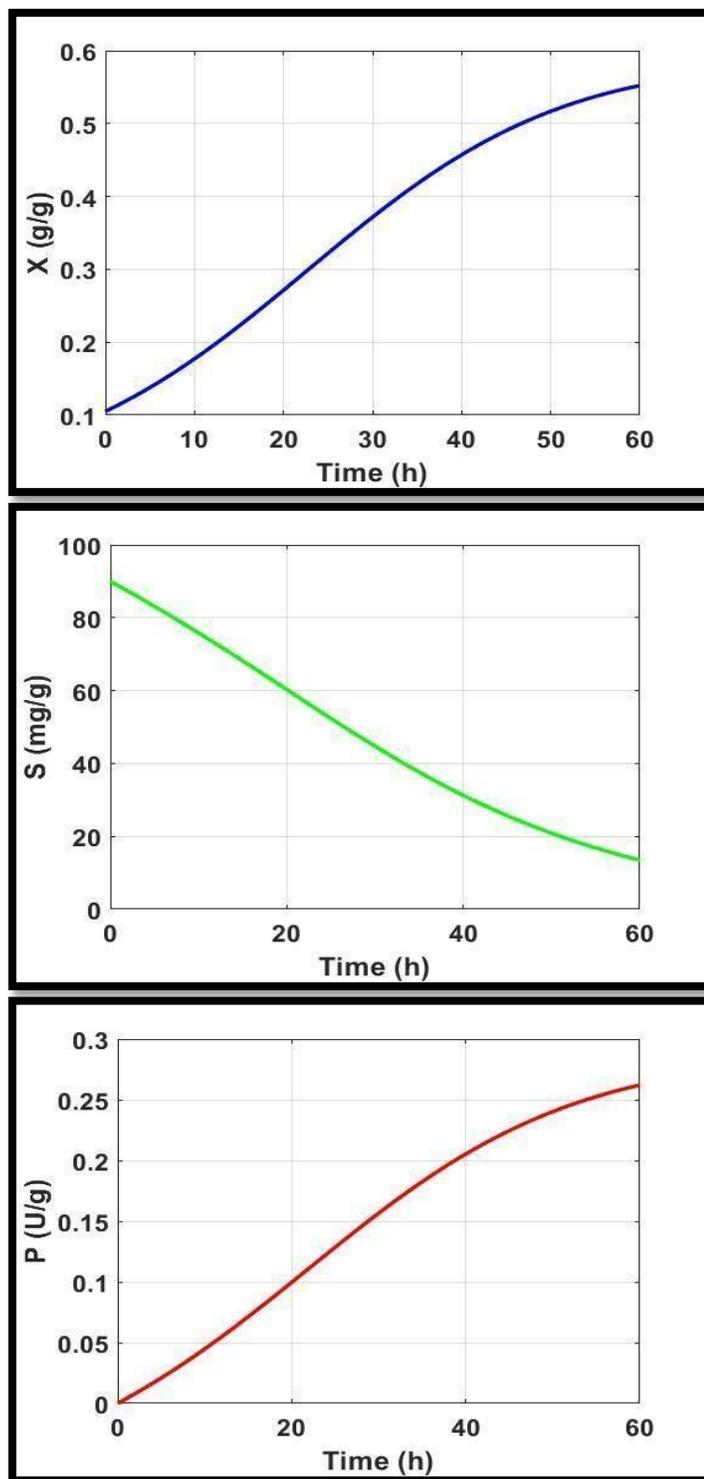


Figura 11. Tercera simulación en modo Continúo para la producción de tanasa. Con las siguientes condiciones: A) Biomasa (0.105 g/g), B) Sustrato (90 mg/g), C) Producto y Caudal de 1.5 m³/s.

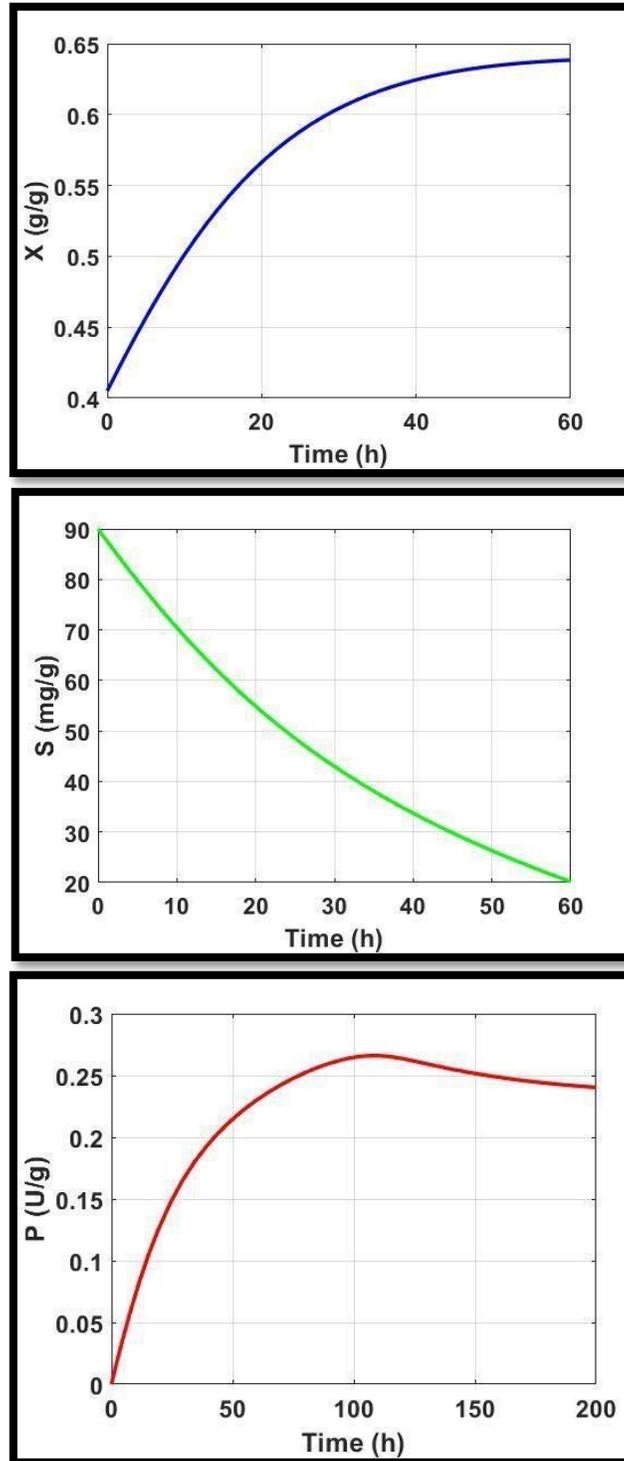


Figura 12. Cuarta simulación en modo Continuo para la producción de tanasa. Con las siguientes condiciones: A) Biomasa (0.405 g/g), B) Sustrato (90 mg/g), C) Producto y Caudal de 2.5 m³/s.

El modo Continuo cuenta con dos simulaciones, en donde, se observa que en la Fig. 9 (A) la biomasa alcanzó una concentración de 0.52 g/g al pasar 60 horas, en la Fig. 10 (A) se observa que presenta una concentración de 0.625 g/g a las 60 horas, en la Fig. 11 (A) se puede analizar que presenta una concentración de 0.55 g/g a las 60 horas y la Fig. 12 (A) presenta una concentración de 0.64 g/g a las 60 horas, donde, se pudo analizar que las mejores concentración de biomasa se obtuvieron en la segunda y cuarta simulación, en la cual se implementó el parámetro de biomasa a 0.405 g/g y la diferencia de concentración entre estas dos simulaciones fue de 0.015 g/g.

En la Fig. 9 (B) en el sustrato se puede observar que a medida que se modifica los datos los valores presentan un decrecimiento el cual pasa de 58 mg/g a 4 mg/g a las 60 horas, en la Fig. 10 (B) pasa de 90 mg/g a 7 mg/g transcurrir 60 horas, en la Fig. 11 (B) se observa una disminución pasando de 90 mg/g a 16 mg/g a las 60 horas y la Fig. 12 (B) pasa de 90 mg/g a 20 mg/g a las 60 horas, en la primera y segunda simulación son las más aptas para las concentraciones de sustrato. Por último, la Fig. 9 (C) el producto cuenta con una concentración de 0.25 U/g al transcurrir 60 horas, la Fig. 10 (C) se observa una concentración final de 0.225 U/g a las 60 horas, en la Fig. 11 (C) se observa un crecimiento de 0.26 U/g a las 60 horas y en la Fig. 12 (C) tiene una productividad final de 0.24 U/g a las 60 horas, siendo la tercera simulación la más apta para la productividad de la enzima tanasa.

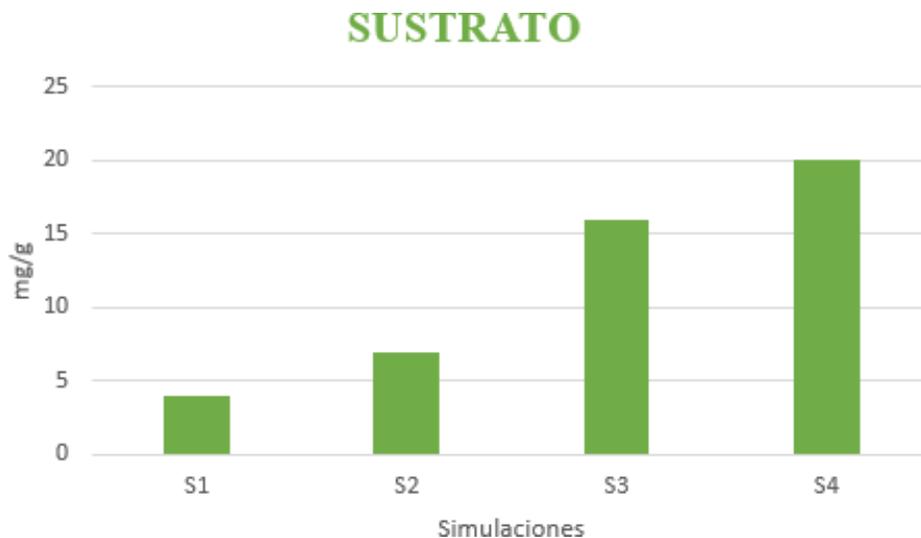


Figura 13. Concentración final del sustrato para las simulaciones en el modo Continúo implementando las siguientes concentraciones iniciales del sustrato: S1: $S_0=85$ mg/g; S2: $S_0= 85$ mg/g; S3: $S_0=90$ mg/g y S4: $S_0=90$ mg/g, en donde, se puede observar las concentraciones finales después de transcurrir 60 horas.

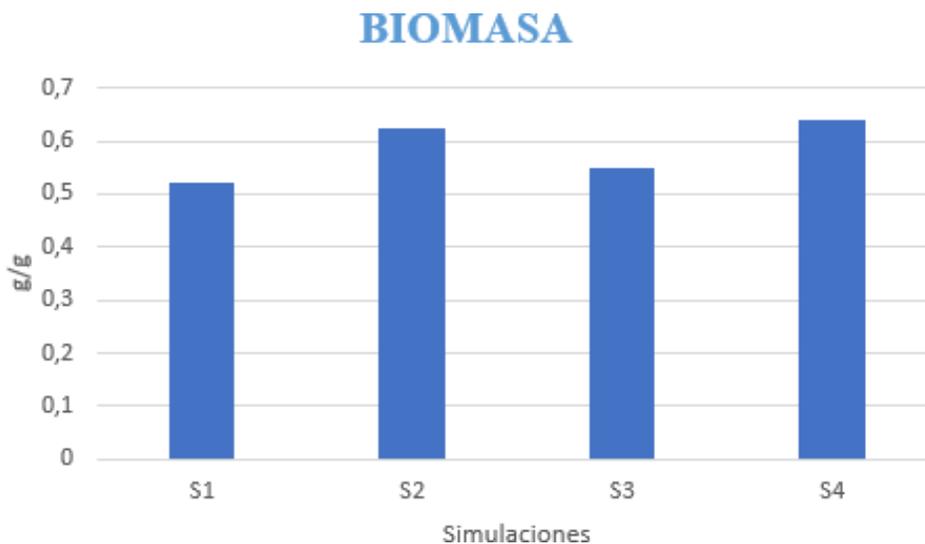


Figura 14. Concentración final de la biomasa para las simulaciones en el modo Continúo implementando las siguientes concentraciones iniciales del sustrato: X1: $X_0= 0.105$ g/g; X2: $X_0= 0.405$ g/g; X3: $X_0= 0.105$ g/g y X4: $X_0= 0.405$ g/g, en donde, se puede observar las concentraciones finales después de transcurrir 60 horas.

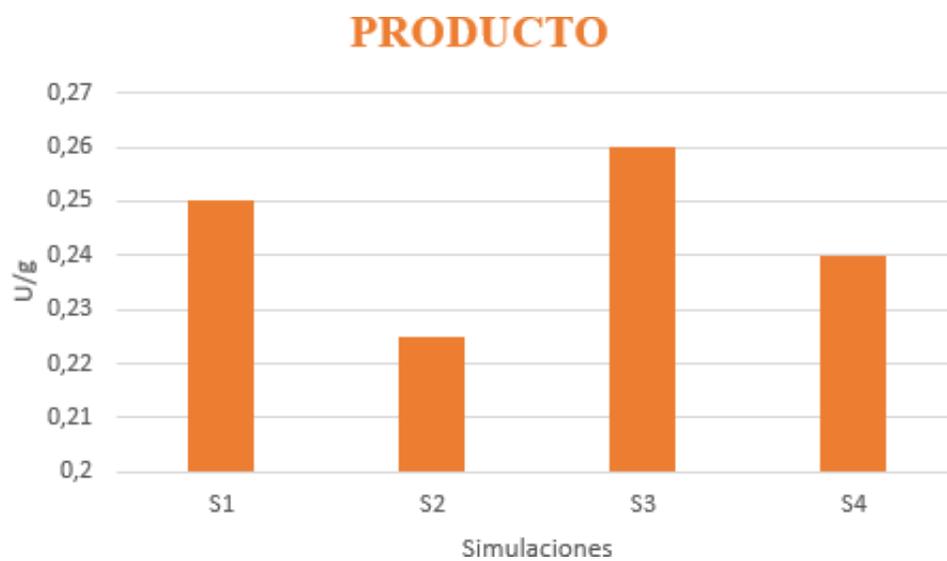


Figura 15. Productividad final de las simulaciones del producto en modo Continuo.

- **Simulación en modo Fed Batch**

En el modo Fed-Batch los lotes se alimentan secuencialmente con medios nutritivos frescos. En este caso si el nutriente es el limitante del crecimiento, se procede a controlar la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Por lo tanto, el volumen del modo fed-batch crece al transcurrir el tiempo. Este modelo permite disminuir la formación de productos secundarios que ocurren cuando hay exceso de sustrato. Como también permite establecer condiciones óptimas para la productividad de metabolitos secundarios.

Se implementó una matriz de dos factores por dos niveles. Teniendo en cuenta las concentraciones del sustrato y la biomasa que son parámetros importantes para la obtención del producto de la tanasa, mediante esto se realizó cuatro simulaciones, las cuales son:

SIMULACIÓN	PARA.	VOL.	UNID.	PARA.	VOL.	UNID.	PARA.	VOL.	UNID.
S1	S ₀	5	m	X ₀	0.	g/	F1	1	m ³
		8	g/g		105	g		.5	/s
S2	S ₀	5	m	X ₀	0.	g/	F2	2	m ³
		8	g/g		405	g		.5	/s
S3	S ₀	9	m	X ₀	0.	g/	F1	1	m ³
		0	g/g		105	g		.5	/s
S4	S ₀	9	m	X ₀	0.	g/	F2	2	m ³
		0	g/g		405	g		.5	/s

Tabla 5. Parámetros iniciales para las simulaciones de producción de tanasa a través del modo Fed-Batch.

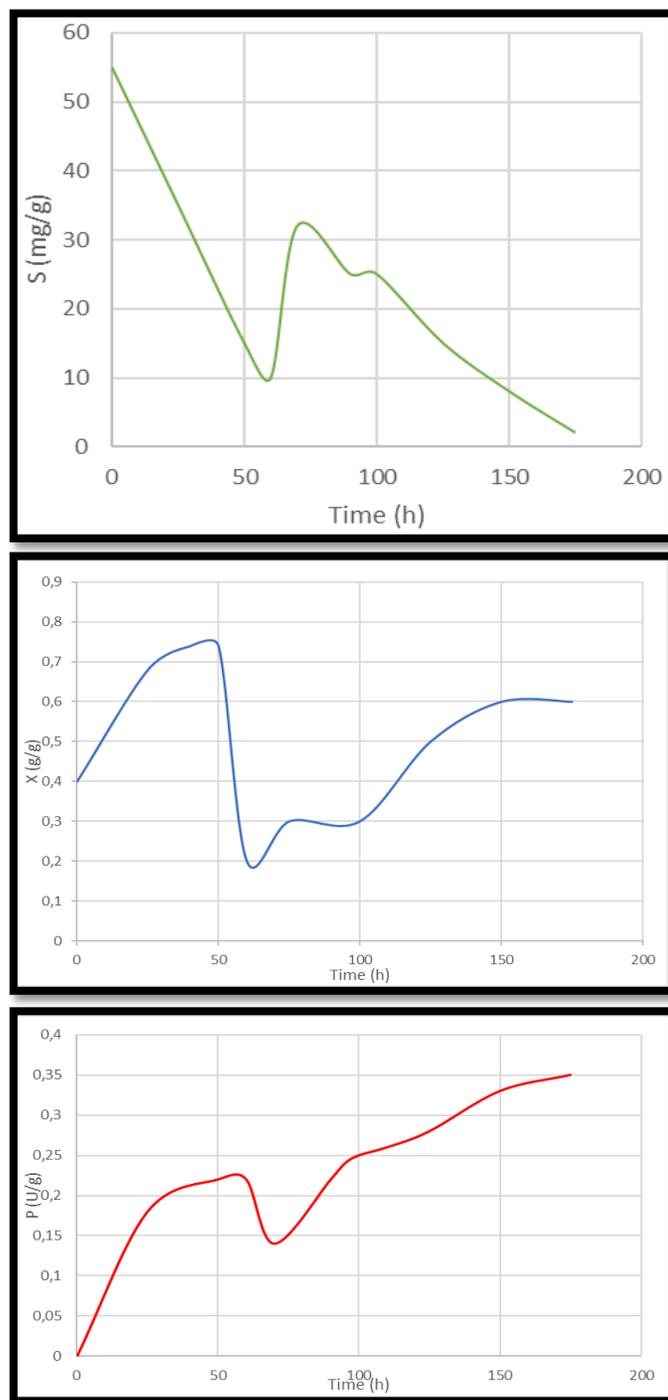


Figura 16. Primera simulación en modo Fed-Bach para la producción de tanasa. Con los siguientes parámetros: A) Sustrato (58mg/g), B) Biomasa (0.105 g/g), C) Producto y Caudal de 1.5 m³/s.

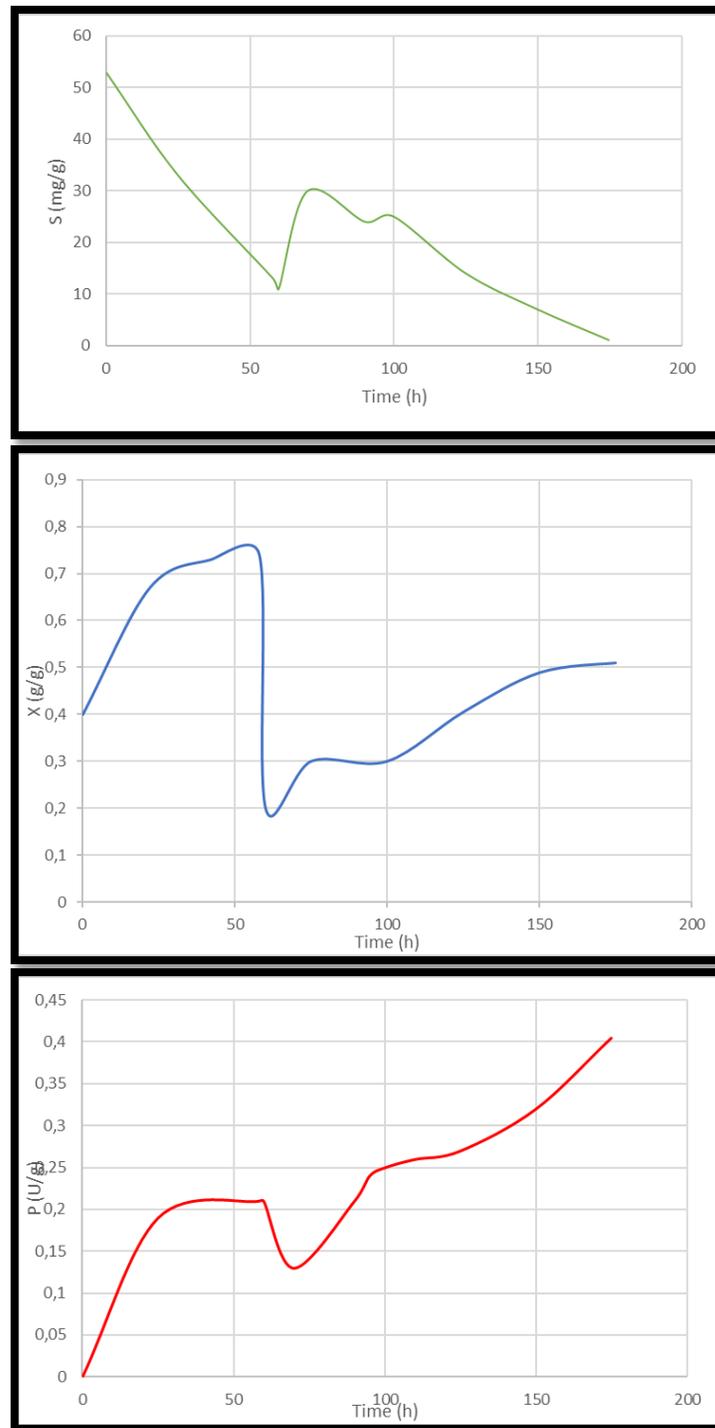


Figura 17. Primera simulación en modo Fed-Bach para la producción de tanasa. Con los siguientes parámetros: A) Sustrato (58mg/g), B) Biomasa (0.405 g/g), C) Producto y Caudal de 2.5 m³/s.

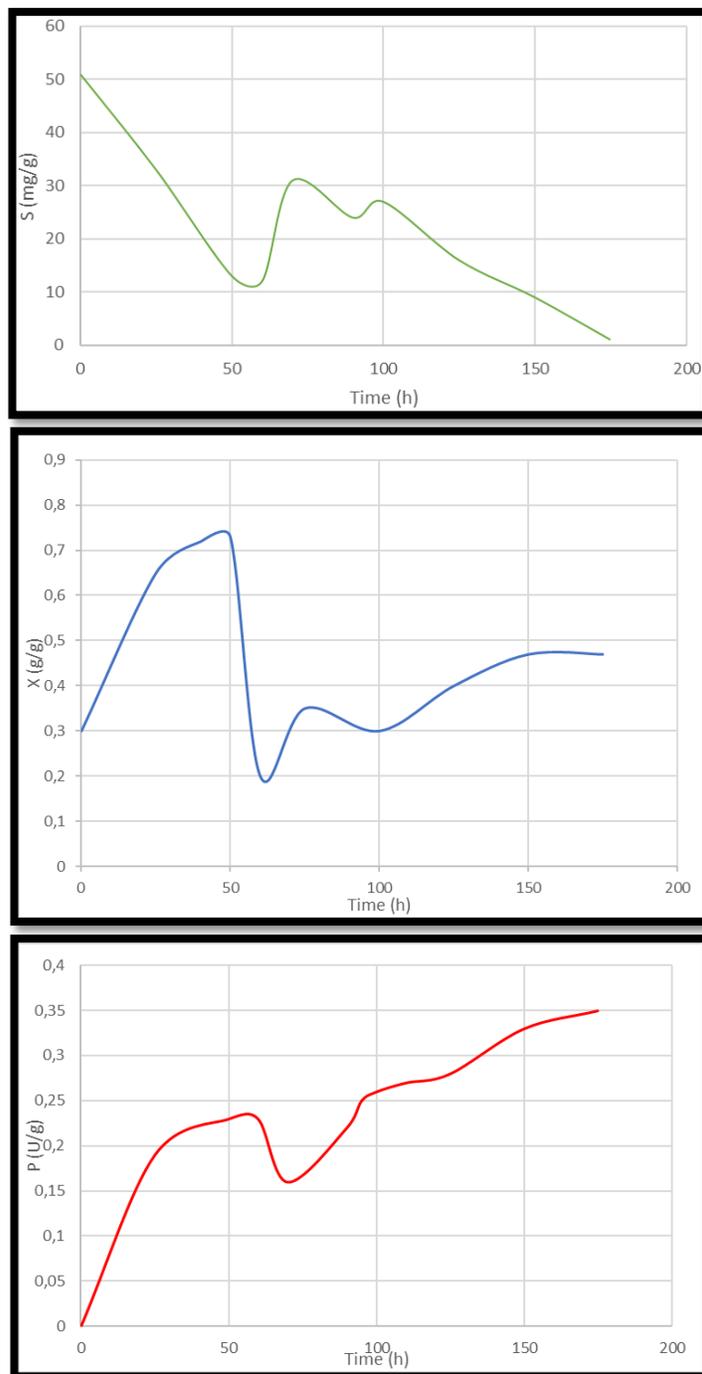


Figura 18. Primera simulación en modo Fed-Bach para la producción de tanasa. Con los siguientes parámetros: A) Sustrato (90 g/g), B) Biomasa (0.105 g/g), C) Producto y Caudal de 1.5 m³/s.

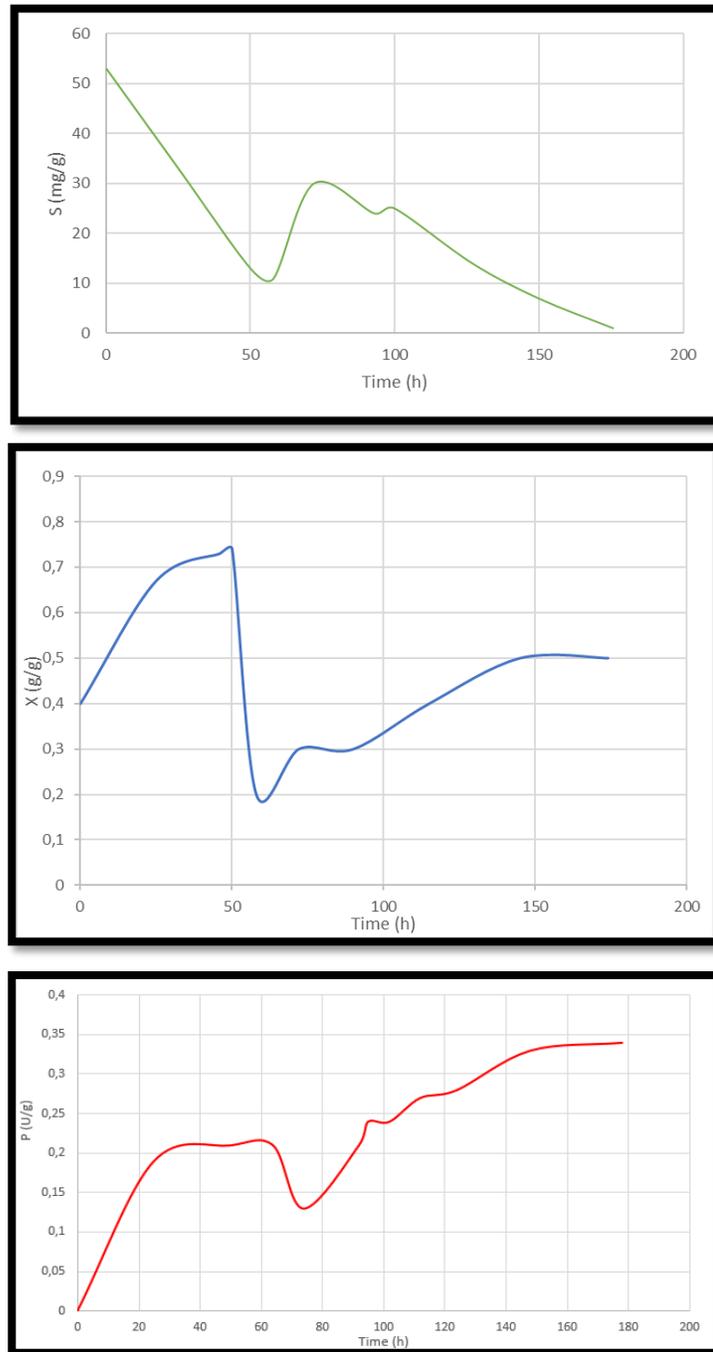


Figura 19. Primera simulación en modo Fed-Bach para la producción de tanasa. Con los siguientes parámetros: A) Sustrato (90 g/g), B) Biomasa (0.405 g/g), C) Producto y Caudal de 2.5 m³/s.

Como se puede observar se realizaron dos simulaciones en el modo Fed-Batch, en donde, se analizó el comportamiento del sustrato en la Fig. 16 (A) la cual presenta un decrecimiento de 10 mg/g a las 60 horas, en cambio a las 96 horas presenta una concentración alta de 35 mg/g y al pasar el tiempo y llegar a las 180 horas la concentración baja a 2mg/g, en la Fig. 17 (A) se observa una disminución de 11 mg/g a las 60 horas, al pasar 96 horas presenta un incremento de 24 mg/g y al final se vuelve a evidenciar un decrecimiento a 1 mg/g al transcurrir 180 horas, mientras tanto se puede analizar que en la Fig. 18 (A) presentan casi las mismas concentraciones iniciales que la primera simulación variando levemente, en donde, la concentración final es de 0.5 mg/g a las 180 horas, así como ocurrió anteriormente donde las simulaciones tenían los valores iniciales parecidos y lo que variaba era la concentración final ocurrió en la Fig. 19 (A), donde, su concentración final de sustrato es de 0 mg/g a las 180 horas.

En la Fig. 16 (B) se estudia la biomasa presentando una concentración de 0.19 g/g a las 60 horas, la cual iba aumentando hasta llegar a 0.6 g/g a las 180 horas, en la Fig. 17 (B) se puede analizar que al pasar 60 horas llega a una concentración de 0.19 g/g, en el segundo pulso alcanzo una concentración de a 0.295 g/g al pasar 96 horas, al final alcanza una concentración de 0.505 g/g a las 180, en la Fig. 18 (B) se puede analizar que mediante el primer pulso esta concentración es de 0.19 g/g a las 60 horas, al pasar el tiempo de 96 horas está concentración aumenta a 0.305 g/g llegando alcanzar una concentración final de 0.48 g/g a las 180 y en la Fig. 19 (B) se observa que alcanza una concentración de 0.19 g/g a las 60 horas, en donde, al transcurrir el tiempo y llegar a las 96 horas está concentración llega a 0.3 g/g y al aplicar el último pulso se observa un aumento de concentración la cual llega a 0.5 g/g a las 180 horas.

Finalmente, se observa en la Fig. 16 (C) el producto que a sus 60 horas presenta una concentración de casi 0.15 U/g, a las 96 horas presenta una productividad de 0.24 U/g y la productividad final es de 0.35 U/g, en donde, esta simulación comporte los mismos valores que la Fig. 18 (C), en la Fig. 17 (C) se puede observar que a las 60 horas alcanza una concentración de 0.21 U/g, pero al pasar el tiempo y llegar a las 96 horas se ve un leve crecimiento el cual es de 0.245 U/g y la productividad final que alcanzo fue de 0.405 U/g a las 180 horas, por último, se analizó la Fig. 19 (C), la cual en el primer pulso llega a

obtener una concentración de 0.16 U/g a las 60 horas, pero al aplicar el segundo pulso esta alcanza una producción de 0.23 U/g al pasar 96 horas y a las 180 horas se ve que la productividad aumenta hasta llegar a 0.34 U/g.

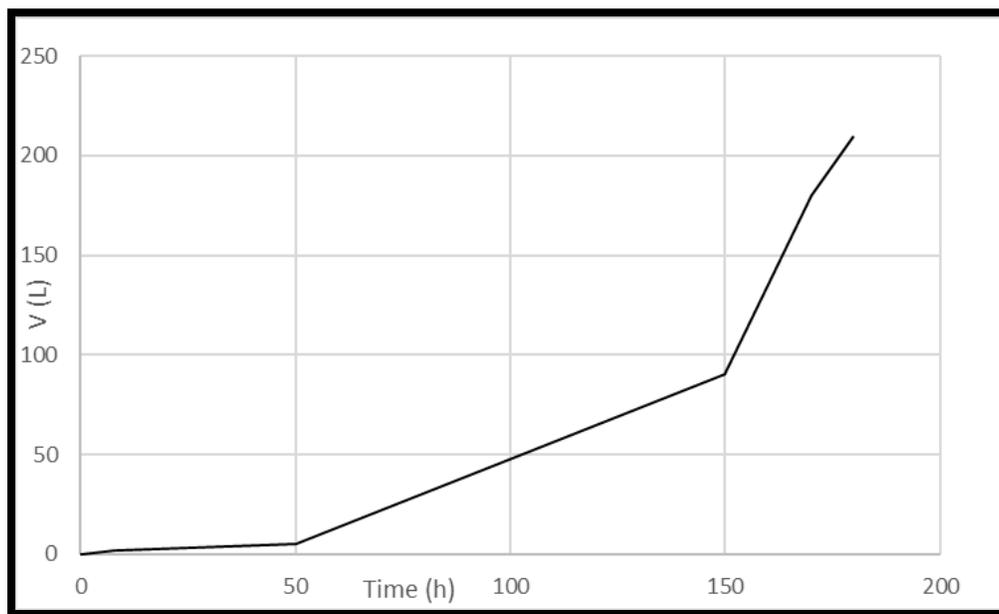


Figura 20. Volumen simulado del biorreactor (8 L) para la simulación de tanasa en modo Fed-Batch.

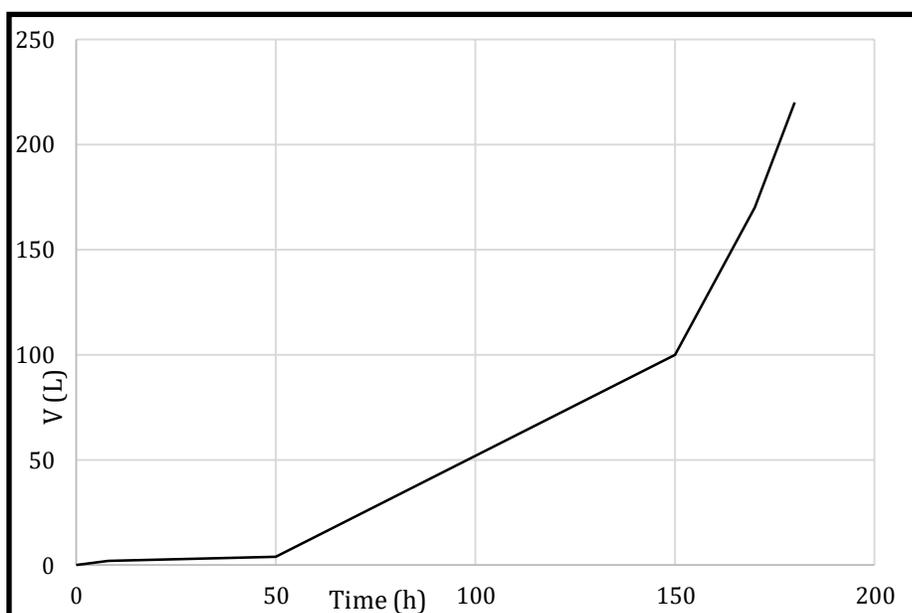


Figura 21. Volumen simulado del biorreactor (10 L) para la simulación de tanasa en modo Fed-Batch.

Al analizar las Fig. 20 y Fig. 21 se puede observar que no tiene mayores diferencias, ya que al aplicar el primer pulso en la Fig. 20 se obtiene un alcance de casi 50 litros a las 96 horas, y la Fig. 21 llega a los 50 litros al pasar las 96 horas, en el segundo pulso, se obtiene estos resultados implementando los siguientes parámetros del volumen: en la Fig. 20 se le colocó un volumen de 8 L y en la Fig. 21 se utilizó un volumen de 10L. La primera figura alcanza un volumen de 90 litros a las 150 horas y la segunda figura incrementa hasta obtener un volumen de 100 litros a las 150 horas, al momento de aplicar el último pulso la primera figura tiene una productividad de fermentación de más de 200 litros igual que la segunda figura, por ende, se necesita comprar un biorreactor con una capacidad de 270 L.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Alford, 2006) acerca del modelamiento de biorreactores continuos indican que las condiciones de operación del biorreactor están determinadas por el comportamiento del sistema en estado estable y en modo dinámico. Sin embargo, el diseño tradicional de este equipo se basa en experimentos y en resolver los balances de materia del biorreactor en estado estacionario, donde no se tiene una imagen completa de la estabilidad del sistema.

Por otro lado, podemos observar que los resultados de estos experimentos concuerdan con los de otros estudios sobre cinética de crecimiento descritos en otros lugares (Vinayagam y Vytla, 2015). En el año 2021, realizaron un estudio acerca modelado matemático y simulación de *Bacillus cereus* M1GT recién aislado para la producción de tanasa mediante fermentación en estado semisólido con residuos agrícolas tripala donde los parámetros cinéticos se estimaron con Microsoft Word Excel-13 y la ecuación logística se usó para ajustar los datos cinéticos experimentales y encontró la tasa de crecimiento específica (μ) 0.0814 h^{-1} y concentración de biomasa inicial (X_0) $0,4056 \text{ g/g}$, desde la pendiente y el intercepto respectivamente. El valor práctico de la biomasa final (X_f) fue de $0,438 \text{ g/g}$. Se encontró que el coeficiente de correlación (R^2) era $0,9491$. A comparación de las simulaciones realizadas en esta investigación donde se utilizó una concentración de biomasa de $0,105 \text{ g/g}$ y $0,405 \text{ g/g}$, en el cual se asemeja a los resultados evidenciados en las simulaciones dos y cuatro con la X_0 de $0,405 \text{ g/g}$.

Así mismo, se evidencia mediante los resultados obtenidos en las investigaciones mencionadas anteriormente, que el análisis de las simulaciones computacionales realizadas en el programa con los modos de operación: batch, fed-batch y continuo. De la misma forma, se determinó una alta productividad de tanasa a través de la estrategia de productividad por lotes de alimentación en modo feed-batch, ya que presenta las mejores condiciones de un modelo operativo de alimentación por lotes, en el cual se analizó el incremento en la producción de tanasa por microorganismos *Bacillus cereus* y se indicó una mejor simulación del ácido tánico. Por lo tanto, la fermentación por lotes alimentados es muy útil para los bioprocesos que buscan una alta densidad de biomasa. Cuando el producto deseado se correlaciona positivamente con el crecimiento microbiano.



Figura 22. Concentración final del sustrato para las simulaciones en el modo Fed-Batch implementando las siguientes concentraciones iniciales del sustrato: S1: S0=85 mg/g; S2: S0= 85 mg/g; S3: S0=90 mg/g y S4: S0=90 mg/g, en donde, se puede observar las concentraciones finales después de transcurrir 180 horas.

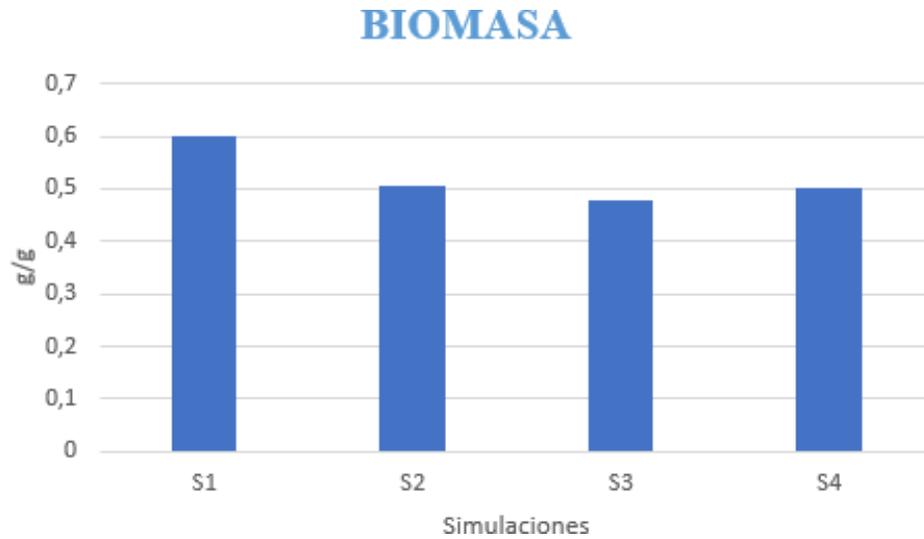


Figura 23. Concentración final de la biomasa para las simulaciones en el modo Fed-Batch implementando las siguientes concentraciones iniciales del sustrato: X1: $X_0 = 0.105$ g/g; X2: $X_0 = 0.405$ g/g; X3: $X_0 = 0.105$ g/g y X4: $X_0 = 0.405$ g/g, en donde, se puede observar las concentraciones finales después de transcurrir 180 horas.

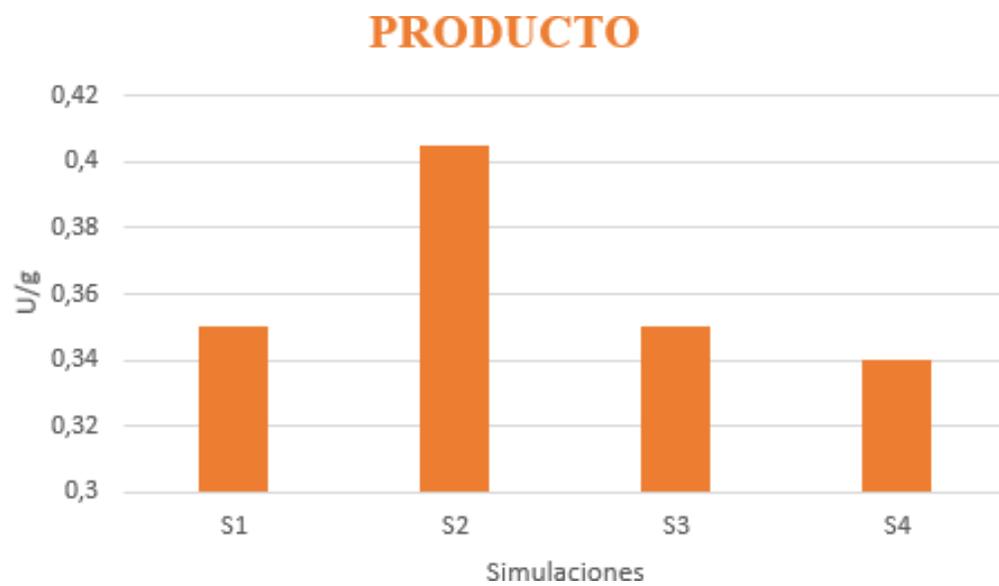


Figura 24. Productividad final de las simulaciones del producto en modo Fed-Batch.

Así mismo, en la investigación de Modelación, simulación y control de procesos de fermentación de los autores Aros, Nelson, Cifuentes, Marcelo, & Mardones, Javier en el año 2011 se evidencia los resultados acerca del sistema con control estabilizante en el modo fed-batch donde hay una variación del sustrato de entrada y se aprecia que la concentración de la biomasa llega a su término siempre al mismo tiempo, no hay una desviación excesiva en el tiempo de término del proceso. También se muestra el comportamiento de la velocidad de crecimiento, donde se aprecia que dependiendo del sustrato de entrada la velocidad sufre antes de llegar a una velocidad constante de crecimiento, ante la variación de λ de entrada se muestra el comportamiento de la concentración de la biomasa, donde se muestra una leve variación al comienzo de la fermentación debido a que la velocidad de crecimiento no es constante. Entonces cuando la tasa de crecimiento se mantiene dentro de un rango aceptable, el sistema de control es robusto (Aros, Nelson, Cifuentes, Marcelo, & Mardones, Javier; 2011)

Por otra parte, se pudo demostrar en la investigación acerca del diseño y construcción de un biorreactor tipo fed-batch realizado por Diego Martinez en el año 2019 donde se muestra los resultados obtenidos en cada una de las fases del proyecto, en el cual se concluye que este biorreactor de tipo Fed-Batch es una herramienta totalmente funcional y acorde a los estándares de este tipo de sistemas puesto que se logra demostrar a través de sus mecanismos para el monitoreo de variables como son el sustrato y la biomasa, permitiendo mantener un proceso de fermentación dentro de los rangos óptimos ya establecidos (Martinez D; 2019)

Considerando los resultados obtenidos mediante esta investigación se pudo observar la semejanza con el estudio realizado por Mendoza, D., Niño, L., & Gelves, G, 2021, acerca de “Modelado dinámico de la producción de tanasa de *Bacillus cereus*” en el cual existe una aceptable precisión del modelo matemático planteado en esta investigación para simular el crecimiento microbiano de *Bacillus cereus* principalmente en el modo fed-batch, donde, se evidencia el consumo de ácido tánico como precursor, fuente de carbono y la formación de la enzima tanasa. Así mismo, se observa los efectos de la biomasa, el producto y el sustrato a través de la producción de la tanasa. De tal manera que los

impactos de la inhibición de la biomasa en todas las velocidades de reacción se han considerado a través del modelo logístico (Mendoza, D., Niño, L., & Gelves, G, 2021).

Con los resultados obtenidos mediante las simulaciones en modo batch, continuo y fed-batch, se pudo determinar que el modo de operación apto para la producción de tanasa a partir de *Bacillus cereus* es el modo fed-batch, el cual es un método de cultivo muy efectivo en la producción de la enzima tanasa a comparación del modo batch y continuo; puesto a que es un método el cual permite que el uso de sustratos que inhibe el crecimiento si están en altas concentraciones. También permite establecer condiciones óptimas para la producción de metabolitos secundarios, ya que la alimentación del sustrato se realiza de modo que permita el desarrollo de dos fases: crecimiento y producción. En cambio, el modo batch se alimenta continuamente a través del medio nutritivo, y, eso hace que se límite el crecimiento, pues el nutriente controla la velocidad de crecimiento de los microorganismos dado que este método es mayormente utilizado para evitar fenómenos de inhibición de sustrato y así requería alcanzar una alta concentración de la biomasa, y en el modo continuo se mantiene constante el volumen.

6. Conclusiones

De acuerdo a lo abordado con anterioridad, podemos observar que los objetivos propuestos en la investigación fueron cumplidos en su totalidad mediante la evaluación desde un enfoque computacional de la producción de la enzima tanasa a partir de *Bacillus cereus* bajo diferentes modos de operación (fed batch, batch y continuo) determinando un modelo matemático de mínimos cuadrados que permitió simular la cinética de crecimiento celular, consumo de sustrato limitante y formación de tanasa, mediante un análisis numérico de los modos de operación que permitieron incrementar la producción de dicha enzima usando el software MATLAB, implementando el híbrido de manok y crecimiento logístico, a través del análisis de las simulaciones se determinó que el modo de operación más apto para la producción de tanasa es el modo fed-batch.

Esta investigación llevo a cabo el análisis de la modelación computacional de un bioproceso en diversos modos de operación, los cuales son batch, continuo y fed-batch, mediante esto se realizó el análisis de las gráficas de cada modelo para poder determinar la mejor simulación, en donde las empresas estarían beneficiadas al momento de la producción de enzimas, ya que se ahorrarían tiempo y tendrían una producción más amplia. El modo fed-batch es apto para la producción a gran escala, ya que fue el que más se adaptó en esta investigación controlando la cinética de la producción de tanasa.

7. Bibliografías

- Cortés, P (2015). *Universidad nacional agraria la molina* “producción de tanasa de *Aspergillus niger* mediante un sistema de fermentación por adhesión a superficie (FAS)” Presentada por.
http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1790/Q04_C67_T%20BAN%20UNALM.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Pérez, I., Orbera, T., and Tamayo, j. (2011). *centro nacional de invetigacion cientificas cuba* “aislamiento e identificacion de *Bacillus cereus* a partir de dos variables de arroz comercial (*Oryza sativa* L)” Presentado por. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321005.pdf>
- Schallmey, M., Singh, A., and Ward, O. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17.
<https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Castillo, A., Acuache, K., Osorio, A., and Fuertes, C. (2009). Obtención de galato de n-propilo mediante transesterificación enzimática con tanino, propanol y tanasa inmovilización en quitina. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(4), 488-494.
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v75n4/a11v75n4.pdf>
- Rodríguez, L., Rodríguez, N., Hernández, M., and Aguilar, C. (2009). Estudio de la inhibición de la enzima tanasa producida por *Aspergillus niger* GHI en fermentador en estado sólido. *Universidad Autonoma de Tam.* <https://www.redalyc.org/pdf/4419/441942915011.pdf>
- Mata, M., Cruz, M., Rodriguez, R., Contreras, J., and Aguilar, C. (1999). Evaluación de la actividad tanasa producida por *A. niger* GH1 en cultivo medio solido (CMS), a *comparación of Methods to Determine Tanic Acil Hidrolase Activity.* *Brazilian archives of Biology and tecnology.* 42(1), 355-361.
https://smbb.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/AREA_III/CIII-16.pdf
- Aguilar, P., Cruz, M., Montañez, J., Belmares, R., and Aguilar, C. (2014). Bacterial tannases: production, properties and applications tanasas bacterianas: produccion, propiedades y aplicaciones. *Medica Image Analisis*, 13(1), 63-74.
<https://doi.org/10.1016/j.media.2008.10.003>

- Subbalaxmi, S., and Ramachandra, V. (2016). Optimización del proceso para la producción de tanasa por *Bacillus gottheilii* M2S2 en inerte soporte de espuma de poliuretano, *Biocatálisis y Biotecnología Agrícola*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.004>
- Veana, F., Vázquez, D., Guerrero, M., Viader, J., Aguilar, C., and Rodriguez, R. (2016). Tannase production by the xerophilic *Aspergillus niger* GH1 strain and partial isolation of the tannase gene. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(1), 51-56. http://scielo.org.mx/scielo.php?scrips=sci_arttext&pid=S1665-27382016000100051&lang=es#B3
- Selvaraj, S., and Vytla, R. (2017). Evaluation of model parameters for growth tannic, acid utilization and tannase production in *Bacillus gottheilii* M2S2 using polyurethane foam blocks as support. *3 biotech*, 7(5). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0909-0>
- Rodríguez, L., Valdivia, B, Contreras, J., Rodríguez, R., and Aguilar. C. (2014). Química y biotecnología de la tanasa, *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 2(4). https://researchgate.net/profile/Luis_V_Rodriguez-Duran/publication/266372327_QUIMICA_Y_BIOTECNOLOGIA_DE_LA_TANASA/links/54418fce0cf2a76a3cc821b2/QUIMICA-Y-BIOTECNOLOGIA-DE-LA-TANASA.pdf
- Selvaraj, S., Natarajan, K., Nowak, Aleksandra., and Ramachandra. V. (2016). Mathematical modeling and simulation of newly isolated *Bacillus cereus* M1GT for tannase production through semi-solid state fermentation with agriculture residue tripala. *South African Journal of Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.10.001>
- Reyes, L. (2020). Control óptimo de un reactor por lotes con alimentación para la producción de penicilina, *Universidad de los Andes*. <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/18992/u729371.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ruiz, A., Rodriguez, R., Rodriguez, R., Contreras, J., and Aguilar. C. (2007). bio-reactors desing for solid state fermentation, *Universidad Autónoma de Coahuila*. <https://www.redalyc.org/pdf/620/62060105.pdf>

- Chheda, A., and Vernekar, M. (2015). Enhancement of -poly-l-lysine (-PL) production by a novel producer *Bacillus cereus* using metabolic precursors and glucose feeding. *3 Biotech*, 5(5), 839-846. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0291-8>
- [16] Hernandez S, Niño L and Gelves G 2020 Simulating of Microbial Growth Scale Up in a Stirred Tank Bioreactor for Aerobic Processes using Computational Fluid Dynamics *Journal of Physics: Conference. Series.* 1655 012109
- Diego, E., Martinez, F., M., & Tomas, S. (n.d.). *DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR TIPO FED-BATCH PARA FINES*. Retrieved May 25, 2021, from <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/18145/2019diegomartinez?sequence=11&isAllowed=y>
- Cristina, I., & Astudillo, P. (2010). *DISEÑO INTEGRAL DE BIORREACTORES CONTINUOS DE TANQUE AGITADO APLICADOS A PROCESOS DE FERMENTACIÓN*. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/70178/isabelcristinapazastudillo.2009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Moya, N., Magister En Calidad, R., & Del Paciente, S. (2017). *3M Health Care Academy SM PROCESO DE ESTERILIZACIÓN*. http://afam.org.ar/textos/13_08/proceso_estirilizacion.pdf
- Carrera Flores, I. E. (2014). *Diseño de sistemas de control para procesos aplicados a reactores continuos tipo tanque agitado (CSTR)* (Bachelor's thesis, Quito, 2014.). <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/8684/3/CD-5829.pdf>
- Suárez Zuluaga, D. A. (2007). *Evaluación y simulación de la producción de ácido láctico con Lactobacillus Casei ATCC 7469* (Bachelor's thesis, Universidad EAFIT). https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/394/DiegoAndres_SuarezZuluaga_2007.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ana Luz Quiroga Campano. (2012). *MODELAMIENTO DEL CULTIVO DE E. COLI PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CUTINASAS RECOMBINANTES: OPERACIÓN BATCH Y FED-BATCH*. 2015, de *ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/profile/Ana-Quiroga->

9/publication/309464192_MODELAMIENTO_DEL_CULTIVO_DE_E_COLI_PARA_LA_OPTIMIZACION_DE_LA_PRODUCCION_DE_CUTINASAS_RECOMBINANTES_OPERACION_BATCH_Y_FED-BATCH/links/5811d3ca08aec29d99f7fd03/MODELAMIENTO-DEL-CULTIVO-DE-E-COLI-PARA-LA-OPTIMIZACION-DE-LA-PRODUCCION-DE-CUTINASAS-RECOMBINANTES-OPERACION-BATCH-Y-FED-BATCH.pdf

Olver Peter J. and Shakiban Chehrzad, Applied Mathematics. School of Mathematics, University of Minnesota and Department of Mathematics, University of St. Thomas. Disponible en: <https://slideplayer.es/slide/7307129/>

Aros, Nelson, Cifuentes, Marcelo, & Mardones, Javier. (2011). Modelación, simulación y control de procesos de fermentación. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 19(2), 210-218. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-33052011000200006>

Decker, Eva L.; Reski, Ralf (14 August 2007). "Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors". *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 31 (1): 3–9

Carolina Andrea Zerda Méndez. (2004). *Análisis y validación de un modelo matemático para el crecimiento microbial del Bacillus thuringiensis subespecie. Kurstaki por el método de fermentación Fed-Batch continuo. 2004, de Universidad de los Andes.* <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/21455/u250973.pdf?sequence=1>

Martinez D; 2019. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR TIPO FED-BATCH PARA FINES EXPERIMENTALES. Disponible en <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/18145/2019diegomartinez?sequence=11&isAllowed=y>

Selvaraj, S., Natarajan, K., Nowak, A., & Murty, V. R. (2021). Mathematical modeling and simulation of newly isolated bacillus cereus MIGT for tannase production through semi-solid state fermentation with agriculture residue triphala. *South African Journal of Chemical Engineering*, 35(1), 89-97.

- Zhang, S., Cui, F. C., Cao, Y., & Li, Y. Q. (2016). Sequence identification, structure prediction and validation of tannase from *Aspergillus niger* N5-5. *Chinese Chemical Letters*, 27(7), 1087-1090.
- Aharwar, A., & Parihar, D. K. (2018). Tannases: production, properties, applications. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 15, 322-334.
- Skariyachan, S., Taskeen, N., Kishore, A. P., & Krishna, B. V. (2021). Recent advances in plastic degradation-From microbial consortia-based methods to data sciences and computational biology driven approaches. *Journal of Hazardous Materials*, 128086.
- Arya, P. S., Yagnik, S. M., Rajput, K. N., Panchal, R. R., & Raval, V. H. (2022). Valorization of agro-food wastes: ease of concomitant-enzymes production with application in food and biofuel industries. *Bioresource Technology*, 127738.
- Kasemiire, A., Avohou, H. T., De Bleye, C., Sacre, P. Y., Dumont, E., Hubert, P., & Ziemons, E. (2021). Design of experiments and design space approaches in the pharmaceutical bioprocess optimization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 166, 144-154.
- Fasim, A., More, V. S., & More, S. S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 68-76.
- Y., Hirose, S., & Yanase, E. (2020). Understanding the regioselectivity in the oxidative condensation of catechins using pyrogallol-type model compounds. *The Journal of Organic Chemistry*, 85(19), 12359-12366.
- Antonopoulou, I., Iancu, L., Jütten, P., Piechot, A., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2018). Optimized enzymatic synthesis of feruloyl derivatives catalyzed by three novel feruloyl esterases from *Talaromyces wortmannii* in detergentless microemulsions. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, 361-369.

- Ghovvati et al., 2015 M. Ghovvati, G. Khayati, H. Attar, A. Vaziri Comparison across growth kinetic models of alkaline protease production in batch and fed-batch fermentation using hybrid genetic algorithm and particle swarm optimization *Biotechnol. & Biotechnol. Equip.*, 29 (6) (2015), pp. 1216-1225
- Subbalaxmi and Vytla, 2017 S. Subbalaxmi, R.M. Vytla Evaluation of kinetic parameters for growth, tannic acid utilization and tannase production in *Bacillus gottheilii* M2S2 using Polyurethane foam blocks as support *3-Biotech*, 7 (2017), p. 275
- S. Subbalaxmi, V.R. Murty 2016 Process optimization for tannase production by *Bacillus gottheilii* M2S2 on inert polyurethane foam support *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 7 (2016), pp. 48-55